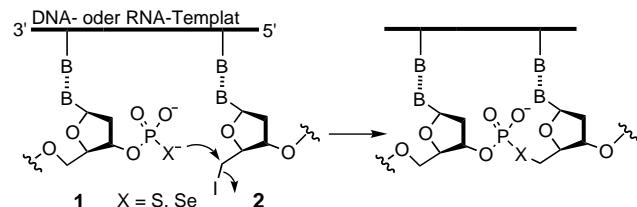


Synthesesteuerung mit DNA-Templaten: vielseitiger als erwartet

Daniel Summerer und Andreas Marx*

Seit fast zwanzig Jahren ist bekannt, dass Nucleinsäuren chemische Reaktionen beschleunigen können. Katalytische Nucleinsäuren kommen in der Natur vor oder können durch In-vitro-Selektion gewonnen werden.^[1] Strukturelle und funktionelle Untersuchungen legen nahe, dass katalytisch aktive Nucleinsäuren ähnlich wie Enzyme Reaktionen durch präzise räumliche Anordnung der Reaktionspartner, Stabilisierung der Übergangszustände und Bindung der Reaktionsprodukte auf ausgeklügelte Weise beschleunigen.^[1] Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigen neue Aspekte der Nucleinsäure-katalysierten Chemie und deuten darauf hin, dass DNA-Stränge fähig sind, chemische Reaktionen schon dadurch zu beschleunigen, dass sie Reaktionspartner in räumliche Nachbarschaft bringen. Dieser Aufsatz konzentriert sich auf neueste Ergebnisse in diesem vielseitigen Forschungsgebiet.^[2] Für ein tiefergehendes Studium verweisen wir auf die zitierte Literatur.

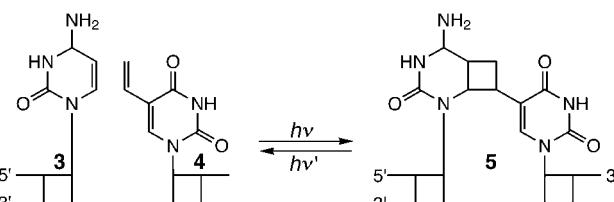
Es ist bekannt, dass Nucleinsäuretemplate die Kupplung von benachbart gebundenen Reaktionspartnern zu den entsprechenden Verknüpfungsprodukten beschleunigen können.^[3] Diese Eigenschaft wurde im Wettlauf um die Entwicklung von neuen und effizienten Methoden zur Detektion von Nucleotidvariationen in Genen wie Einzel-Nucleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) genutzt. Kool et al. berichteten über chemische Autoligationsprozesse, welche die Reaktion von einem Phosphorthioat- oder Phosphorselenoat **1** an einem Strang mit einem 5'-Kohlenstoffatom unter Substitution eines Iodids am anderen Strang **2** einschlossen (Schema 1).^[4] Eine effiziente Ver-



Schema 1. Chemie der Phosphorthioat- und -selenoat-Autoligation von DNA.^[4] B = Nucleobase.

[*] Dr. A. Marx, Dipl.-Chem. D. Summerer
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Str. 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-73-5388
E-mail: a.marx@uni-bonn.de

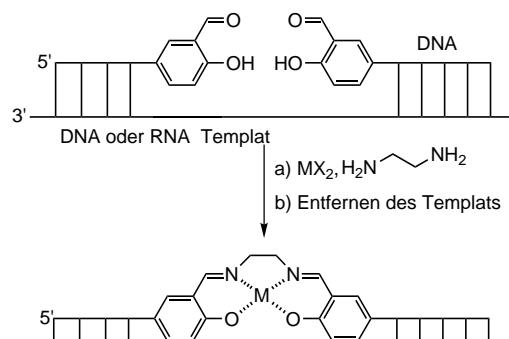
knüpfung zweier DNA-Stränge wurde nur beobachtet, wenn komplementäre Template für die Bindung der Oligonucleotidreagenzien **1** und **2** verwendet wurden. Kürzlich wurde von Mattes und Seitz gezeigt, dass zwei modifizierte Peptidnucleinsäurestränge (PNA), die zu einer DNA-Templat-Sequenz komplementär sind, sequenzspezifisch verknüpft werden können.^[5] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beobachtete Sequenzspezifität nicht auf ein Phosphorsäurediesterrückgrat beschränkt ist. Saito et al. berichteten über die Photoreversibilität der DNA-vermittelten Ligation von Oligonucleotiden über 5-Vinyldeoxyuridin (Schema 2).^[6] Unterschiedliche photochemische Eigenschaften der Ausgangs-



Schema 2. Photoreversible Ligation mit DNA als Templat von Oligonucleotiden über 5-Vinyldeoxyuridin.^[6] DNA-Doppelstrangregionen sind zur Vereinfachung als Leiter dargestellt. $h\nu: \lambda = 366 \text{ nm}$, $h\nu': \lambda = 302 \text{ nm}$.

verbindungen **3**, **4** und dem [2+2]-Addukt **5** ermöglichte das Schalten zwischen Ligation und dem Umkehrprozess. Die Autoren sehen in diesem Photoligationsansatz Potential für Anwendungen im DNA-Engineering und in der Nanotechnologie.

Ein neuer Aspekt von Synthesen mit DNA als Templat wurde von Czapinski und Sheppard aufgezeigt, die die Bildung von Metallosalen-DNA-Konjugaten beschrieben. Diese Verbindungen stellen eine neue Klasse von Metall-DNA-Hybriden dar, die in der gezielten Nucleinsäurespaltung oder der Entwicklung von Biosensoren von Nutzen sein könnten (Schema 3).^[7] Die Bildung dieser Komplexe wird vermutlich durch mehrere Templateffekte angetrieben. Zunächst werden zwei Salicylaldehydeinheiten von modifizierten Oligonucleotidreaktanten durch ein komplementäres DNA-Templat in räumliche Nähe gebracht. Der resultierende Komplex dient wiederum als Templat für die Bindung eines Metallions (Mn^{II} , Ni^{II}), welches anschließend die Salenbildung durch eine Metalltemplat-gesteuerte Reaktion zwischen den Aldehydfunktionen und Ethylenamin ermöglicht.



Schema 3. Metallosalen-DNA-Bildung mithilfe von Nucleinsäure-Templaten.^[7] M = Mn^{II}, Ni^{II}.

Eine kürzlich von Gartner und Liu publizierte Arbeit deutet darauf hin, dass DNA chemische Reaktionen sequenzspezifisch auf vielseitigere Weise als bisher vermutet steuern kann.^[8] Zwei DNA-Strukturen, Helixende (**E**) und Haarnadel (**H**), wurden mit Elektrophilen versehen und mit komplementären DNA-Oligonucleotiden hybridisiert, die mit einem Nucleophil verknüpft waren (Abbildung 1). Beide Ansätze führten zur Bildung der erwarteten Reaktionsprodukte, während nur wenig Umsatz in der nicht templatgesteuerten Reaktion beobachtet wurde. Bemerkenswerterweise beinhalteten die Reaktionen eine Vielzahl verschiedener Reaktionstypen und Reaktantstrukturen trotz beträchtlicher Unterschiede in der Geometrie der Übergangszustände, dem sterischen Anspruch und der konformationellen Flexibilität.

Interessanterweise wurde gefunden, dass eine in die DNA eingeführte einzelne Basenfehlpaarung eine über hundertfache Abnahme in der Reaktionsgeschwindigkeit verursachte. Die Ursachen dieser fast allgegenwärtigen Sequenzselektivität in DNA-vermittelten Synthesen müssen jedoch noch weiter untersucht werden, bevor ihr Ursprung vollständig ersichtlich ist. Es wurde auch untersucht, welchen Einfluss die Länge und Art der Verknüpfung auf die Produktbildung hat (Schema 4). Reaktanten, die nur durch eine Base getrennt

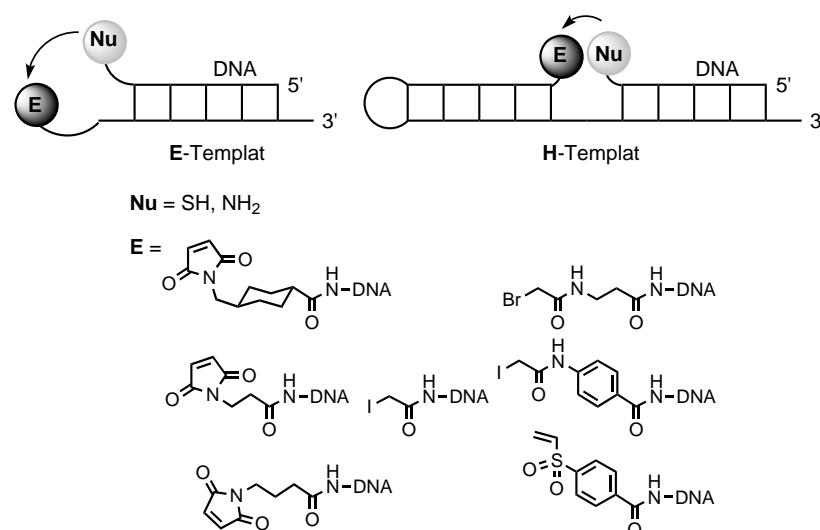
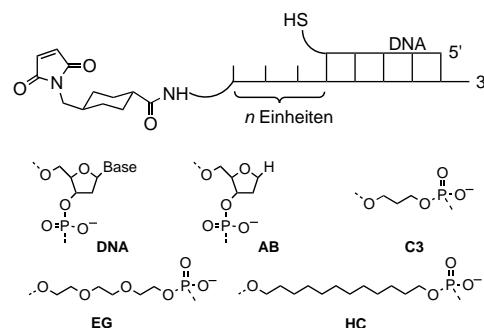


Abbildung 1. Durch Helixende- (**E**) und Haarnadeltemplate (**H**) gesteuerte Synthese. E = Elektrophil, Nu = Nucleophil; DNA-Doppelstrangregionen sind zur Vereinfachung als Leiter dargestellt.



Schema 4. Distanzabhängigkeit von Synthesen mit DNA-Templaten.^[8] Untersuchte Konstrukte: n: 1–30 (**DNA**), 9 (**AB**), 9 (**C3**), 6 (**EG**), 5–6 (**HC**).

waren, reagierten mit ähnlichen Geschwindigkeiten wie jene, die durch 30 Basen getrennt waren, wobei die Sequenzselektivität erhalten blieb. Weiterhin hatte der Austausch der verbindenden Nucleotide im Templat durch eine der in Schema 4 dargestellten alternativen Verknüpfungen nur wenig Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit, was zeigt, dass strukturelle Eigenschaften der DNA nicht für die beobachtete Distanzunabhängigkeit verantwortlich sind. Die gezeigte Sequenzspezifität und Distanzunabhängigkeit lässt es möglich erscheinen, dass Gemische von Reaktanten mit komplementären Gemischen von Templaten voraussagbar reagieren können. In Zukunft könnten chemische Reaktionen durch Verwendung von DNA-Sequenzen als spezifische Reaktionsmarker in geordneter und voraussagbarer Weise „programmiert“ werden. Gartner und Liu berichteten über erste, viel versprechende Ergebnisse auf diesem Gebiet, obgleich die allgemeine Anwendbarkeit dieses Ansatzes noch zu zeigen ist.

Die hier beschriebenen neuen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Synthese mit DNA-Templaten ein Phänomen ist, welches für eine Vielfalt von chemischen Reaktionen Gültigkeit aufweist. Die Einfachheit der automatisierten DNA-Synthese, voraussagbare Bindungseigenschaften und etablierte Methoden zur Amplifikation und Sequenzanalyse machen DNA zu einem viel versprechenden Templat für zukünftige Entwicklungen und Anwendungen. Synthesesteuerung mit DNA-Templaten ist nach wie vor ein noch wachsendes Forschungsfeld, das ein hohes Potential für weitere Fortschritte in der organischen und supramolekularen Synthese, der kombinatorischen Chemie und der Biotechnologie hat.

[1] Neuere Übersichten: a) D. M. J. Lilly, *ChemBioChem* **2001**, 2, 31–35; b) A. Jäschke, B. Seelig, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 257–262; c) E. A. Doherty, J. A. Doudna, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 597–615; d) M. Famulok, A. Jenne, *Top. Curr. Chem.* **1999**, 202, 101–131; e) C. Carola, F. Eckstein, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 274–283.

[2] Aspekte der supramolekularen DNA-vermittelten Synthese sind kürzlich dargestellt worden und werden daher in dieser Kurzübersicht nicht behandelt. Siehe zum Beispiel: a) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2002**, 114, Nr. 1

- gew. Chem. **2001**, *113*, 4254–4287; Angew. Chem. Int. Ed. **2001**, *40*, 4128–4158; b) C. M. Niemeyer, Chem. Eur. J. **2001**, *7*, 3189–3195; c) N. C. Seeman, *Synlett* **2000**, 1536–1548; d) C. M. Niemeyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 609–618.
- [3] Ausgewählte Beispiele und Übersichten: a) J. Ye, Y. Gat, D. G. Lynn, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3787–3789; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3641–3643; b) Y. Gat, D. G. Lynn in *Templated Organic Synthesis* (Hrsg.: P. J. Stang, F. Diederich), Wiley-VCH, Weinheim **1999**, S. 133–157; c) A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, *396*, 245–248; d) I. A. Kozlov, B. D. Bouvere, A. V. Aerschot, P. Herdewijn, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5856–5859; e) R. K. Bruick, P. E. Dawson, S. B. H. Kent, N. Usman, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 49–56; f) E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109–118; g) M. K. Herrlein, J. S. Nelson, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10151–10152.
- [4] a) Y. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 148–152; b) Y. Xu, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9040–9041.
- [5] A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3277–3280; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3178–3181.
- [6] K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5646–5647.
- [7] J. L. Czlapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8618–8619.
- [8] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961–6963.