

Selbstorganisation eines DNA-Dodekaeders aus 20 Trisoligonucleotiden mit C_{3h} -Linker**

Jan Zimmermann, Martin P. J. Cebulla, Sven Mönninghoff und Günter von Kiedrowski*

Seit den bahnbrechenden Arbeiten von Seeman^[1a-c] wird DNA als Konstruktionsmaterial für programmierbare hohle 3D-Nanoobjekte untersucht und genutzt. Nanokonstrukte aus DNA profitieren von der Rigidität kurzer DNA-Doppelstränge, der Skalierbarkeit, der guten Verfügbarkeit synthetischer und chemisch modifizierter DNA und der Möglichkeit, DNA enzymatisch zu amplifizieren und zu prozessieren. Bisher sind vier Strategien zur Konstruktion von Objekten wie Polyedern beschrieben worden. Strategie I beruht auf einer eckenzentrierten Verknüpfung und führt ausgehend von nichtkovalenten DNA-Verzweigungspunkten zu kovalenten Objekten. Nichtkovalente Dreivegekreuzungen (three-way junctions) entstehen durch Selbstorganisation von drei linearen Oligonucleotiden; jeder Arm hat ein kohäsives einzelsträngiges Ende (sticky end), das mit einem komplementären einzelsträngigen Ende einer weiteren Dreivegekreuzung hybridisiert und anschließend durch DNA-Ligase kovalent verknüpft wird.^[1] Strategie II verläuft entgegengesetzt zu Strategie I und verwendet Trisoligonucleotide, d.h. kovalent verknüpfte DNA-Verzweigungspunkte, die sich nichtkovalent zu den Zielstrukturen selbstorganisieren.^[2d,e] Nichtnatürliche Kopier-^[2a] und Amplifikationsverfahren^[2b] wurden vorgeschlagen, um die Replikation und Amplifikation von Trisoligonucleotiden oder der daraus entstehenden Nanostrukturen zu ermöglichen.^[2c] Strategie III ist ein flächenzentrierter Ansatz, bei dem die Zahl der eingesetzten Oligonucleotide der Zahl der Flächen des zu synthetisierenden Objektes entspricht. Jedes Oligonucleotid besteht aus Segmenten, die für je eine Kante der Flächen stehen.^[3a-d] Strategie IV bestimmt als erstes den längsten Pfad durch das Objekt, der alle Eckpunkte durch einen sehr langen DNA-Strang verbindet. Ein Satz kürzerer Oligonucleotide ermöglicht dann die Bildung starrer Double-Crossover-Strukturen, während zusätzliche Verknüpfungen mithilfe von Paranemic-Crossover-Motiven erzeugt werden.^[4] Kürzlich wurde über den Aufbau von Prismen mit drei-, fünf- und sechseckigen

Grundflächen sowie Würfeln berichtet. Hierfür wurde ein Satz von einzelsträngigen linearen und cyclischen DNA-Elementen verwendet, wobei letztere starre organische Linkermoleküle als Ecken enthalten.^[5]

Wir berichten hier über eine neue Generation von Trisoligonucleotiden und deren Verwendung in Benchmark-Experimenten, um die Leistungsfähigkeit von Strategie II zu überprüfen. Wir wählten als Zielstruktur ein Dodekaeder, da Polyeder mit einer geringeren Zahl von Ecken bereits beschrieben wurden.^[1-5] Der mögliche Aufbau eines DNA-Dodekaeders, das die einem Virus zugrundeliegende Symmetrie hat, wurde bereits für Strategie III vorhergesehen,^[1d] ist aber bislang durch keine Strategie realisiert worden.

Früher verwendete Trisoligonucleotide mit drei unterschiedlichen Armen basierten auf asymmetrischen Linkerkonstrukten,^[2a,e,f,6] sodass die drei unterschiedlichen Sequenzen auf drei verschiedene Arten verknüpft werden konnten. Linkergerüste mit C_{3h} -Symmetrie sollten vorteilhaft sein, weil davon auszugehen ist, dass alle Ecken dieselben konformativen Einschränkungen erfahren. Darüber hinaus werden Mischungen von Diastereomeren, wie sie bei der Verwendung kommerziell erhältlicher racemischer Linkeramidite entstehen, vermieden.^[6b,7]

Bisher wurden Trisoligonucleotide mit C_{3h} -symmetrischen Linkern über das CCC-Verfahren (chemisches Kopieren von Konnektivitätsinformation) hergestellt, also durch Verwendung eines 3'-verknüpften Trisoligonucleotids als Templat für das Trislinking entsprechend 5'-modifizierter linearer Oligonucleotide.^[2a]

C_{3h} -symmetrische Linker wurden auch verwendet, um verzweigte Oligonucleotide mit unterschiedlicher^[8a] oder gleicher Sequenzrichtung, aber zwei^[8b] bzw. drei^[8c] identischen Sequenzen zu synthetisieren. Erst kürzlich wurde die Synthese eines verzweigten Oligonucleotids unter Verwendung eines C_{3h} -symmetrischen Linkers beschrieben, die der hier präsentierten Synthesestrategie ähnlich ist.^[8d]

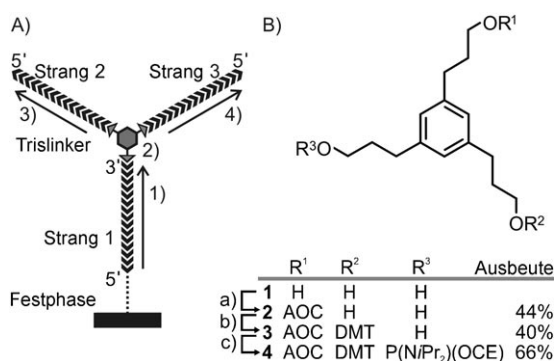
Schema 1 zeigt das Prinzip unseres Verfahrens. Die zu synthetisierenden Trisoligonucleotide mit drei unterschiedlichen Sequenzen wurden an einem DNA-Syntheseroboter unter Verwendung eines durch die orthogonal abspaltbaren 4,4'-Dimethoxytrityl- (DMT) und Allyloxycarbonylgruppe (AOC) geschützten Trislinkeramidites aufgebaut. Der erste Strang wird mit reversen Amiditen (in 5'-3'-Richtung) aufgebaut. Es folgt die Kupplung des vom Tris-Alkohol **1** abgeleiteten Linkers **4**. Der zweite Strang wird nach Detritylierung des Linkers und der dritte Strang anschließend nach Pd-katalysierter Abspaltung der AOC-Gruppe aufgebaut (Schema 1 A).

Die Synthese des Trislinkeramidits **4** ausgehend von 1,3,5-Tris(hydroxypropyl)benzol (**1**) gelang durch Behandlung mit

[*] J. Zimmermann, M. P. J. Cebulla, S. Mönninghoff, Prof. Dr. G. von Kiedrowski
Lehrstuhl für Organische Chemie I, Bioorganische Chemie
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150, NC 2/173, 44780 Bochum (Deutschland)
Fax: (+49) 234-32-14355
E-Mail: kiedro@ruhr-uni-bochum.de
Homepage: <http://www.ruhr-uni-bochum.de/oc1>

[**] Diese Arbeit wurde durch das Integrierte Projekt PACE (EU-IST-FET) gefördert. Wir danken M. Wüstefeld für die automatisierte DNA-Synthese und die Protokollentwicklung für Trisoligonucleotide.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. A) Trisilgonucleotidsynthese: 1) Der erste Strang wird unter Verwendung reverser 5'-Nucleosidamidite in 5'→3'-Richtung aufgebaut. 2) Das Trisilgonucleotid 4 wird gekuppelt und anschließend detrityliert. 3) Der zweite Strang wird in 3'→5'-Richtung mit herkömmlichen Amiditen synthetisiert. 4) Nach Pd-katalysierter Entfernung der AOC-Schutzgruppe wird der dritte Strang – ebenfalls in 3'→5'-Richtung – aufgebaut. B) Synthese des Trisilgonucleotids 4: a) 0.85 Äquiv. Allyloxycarbonylchlorid (AOC-Cl), 0.85 Äquiv. Pyridin, THF; b) 0.85 Äquiv. 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMT-Cl), Pyridin; c) 1.3 Äquiv. 2-Cyanethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit, 1.3 Äquiv. Diisopropylammoniumtetrazolid, Dichlormethan. Die angegebenen Ausbeuten wurden nach chromatographischer Aufreinigung bestimmt.

a) Allyloxycarbonylchlorid in Gegenwart von Pyridin (Bis-Alkohol 2), b) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in Pyridin (Alkohol 3) und c) Bannwarths Reagens in Gegenwart von Diisopropylammoniumtetrazolid (Phosphoramidit 4) (Schema 1 B).

Die Trisilgonucleotide wurden im 1.3-μmol-Maßstab an einer kommerziell erhältlichen Polystyrolfestphase hergestellt, an die zuvor das Starternucleosid in Form des 5'-Bernsteinsäureesters gekuppelt wurde.^[9c,12] Nach Abspaltung von der Festphase wurden die Trisilgonucleotide durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) gereinigt, aus dem Gel extrahiert, durch Größenausschlusschromatographie entsalzt (NAP-25 Säulen), durch UV-Spektroskopie quantifiziert und durch MALDI-TOF-MS charakterisiert. Die Ausbeuten lagen nach der Aufreinigung zwischen 30 und 100 nmol.

Ein regelmäßiges Dodekaeder besteht aus 30 Kanten und 20 Ecken, die zwölf regelmäßige pentagonale Flächen bilden, von denen sich drei an jeder Ecke berühren. Um das Stabmodell eines Dodekaeders herzustellen, ist ein Satz von 20 Trisilgonucleotiden notwendig: Die Zentren der Trisilgonucleotide repräsentieren die Ecken, die Kanten entstehen durch Hybridisieren komplementärer Stränge benachbarter Trisilgonucleotide. Ein Satz von 30 unabhängigen, 15 Basenpaaren langen doppelsträngigen DNA-Sequenzen mit ähnlichen Schmelzpunkten wurde mit dem Programm DNA Sequence Generator von Feldkamp et al. erstellt (Bedingungen: *T_m* zwischen 52.3 und 56.2 °C, neutraler pH-Wert, 50 mM NaCl).^[10] Die doppelsträngigen Sequenzen wurden dann den Kanten des Dodekaeders zugewiesen, sodass ein Schlegel-Diagramm mit einer Zuordnung der Ecken (Abbildung 1) und eine Tabelle der Trisilgonucleotide resultiert, die die entsprechenden Konnektivitäten der Ecken definiert (Tabelle 1).

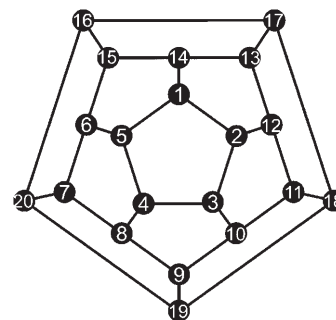


Abbildung 1. Schlegel-Diagramm mit den Nummern der den Ecken zugeordneten Trisilgonucleotide (siehe Tabelle 1). Jedes 3'-Ende ist über eine Phosphorsäurediesterbindung mit Linker 1 verbunden.

Tabelle 1: Sequenzen der den 20 Ecken zugeordneten Trisilgonucleotide; Konnektivitäten wie in Abbildung 1.

Sequenz 5'-3'	Ecke	Sequenz 5'-3'	Ecke
CGTACTGCCTCTTTC	v1	CTCGAACCTGAACATG	v11
GCATGACGGAGAAAG		GAGACACGGAAGATC	
CACTAGCAGCTAGAC		GGCGAAACGTTATAC	
GTCTAGCTGCTAGTG	v2	GTAGCGGATATGCTG	v12
CCTCAGCAATCTAGC		GTATAACGTTTCGCC	
CAGCATATCCGCTAC		GAACGAAGGATTCCG	
GCTAGATTCGTGAGG	v3	CCGAATCCTTCGTTC	v13
CGCATATGGAAAGCC		GTTCACTCTTAGCCG	
CGGATCTTGCTAGAC		GTCCGCTATCTATGG	
GGCTTCCATATGCG	v4	CTTTCTCCGTCATGC	v14
CTGAGTCGCTTACAC		CGGCTAAGACTGAAC	
CTGAGCTGTCGATAC		GAGGTCATAAGCGAG	
GAAAGAGGCAGTACG	v5	CTCTAGGAGATGCAG	v15
GTATCGACAGCTCAG		CTCGCTTATGACCTC	
CTACTCTGATCGCAC		GAACAGATCGCTTGG	
GTGCGATCAGAGTAG	v6	CCAAGCGATCTGTTC	v16
CTGCATCTCCTAGAG		GCATTCGCCAAAAAG	
CATTGCTGTATTGCG		GTCTAAGTCTTTGCG	
CGCAATACAGCAATG	v7	CCATAGATACGCGAC	v17
CTCGTTCAAGACAGG		CTTTTTCGGAATGC	
CGTCTGATGTGTACG		GATCACTCTTGCGTG	
GTGTAAGCGACTCAG	v8	GATCTTCCGTGTCTC	v18
CCTGTCTTGAACGAG		CACGCAAGAGTGATC	
GAACGTTAATACGGC		GATGACTCTGTAGCG	
GCCGTATTAACGTTT	v9	CGCTAGTAAGGTGTG	v19
CTTACGAATCCGGTG		CGCTACAGAGTCATC	
CACACCTTACTAGCG		GTTGTAGAGGAAGCG	
GTCTAGCAAGATCCG	v10	CGTACACATCAGACG	v20
CACCGGATTCGTAAG		CGCAAGACCTTAGAC	
CAGTTCAGGTTTCGAG		CGCTTCCTCTACAAC	

Für die Selbstorganisation des Dodekaeders wurden alle 20 Trisilgonucleotide in äquimolaren Mengen vereinigt (typisches Experiment: 0.5 μM je Trisilgonucleotid, 10 mM HEPES-Puffer pH 7.4, 100 mM NaCl). Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn sub-mikromolare Konzentrationen je

Trisilignucleotid und ein Temperaturprogramm verwendet wurden, das ein Aufschmelzen (90 °C, 5 Minuten), eine Temperung bei 45 °C (etwa 10 °C unter dem Schmelzpunkt der Doppelstränge) für wenigstens 30 Minuten und schließlich einen Kühleffekt auf 4 °C umfasst. Gelelektrophorese der getemperten Mischungen in nativen Agarosegelen ergab eine einzelne diskrete Bande mit einer elektrophoretischen Mobilität, die etwa der von linearer doppelsträngiger DNA von 400 Basenpaaren (3 % Gel) bzw. 450 Basenpaaren (2 % Gel) Länge entspricht, was in Übereinstimmung mit der tatsächlichen Zahl von 450 Basenpaaren des komplett zusammengesetzten Dodekaeders ist (Abbildung 2, siehe auch Hintergrundinformationen).

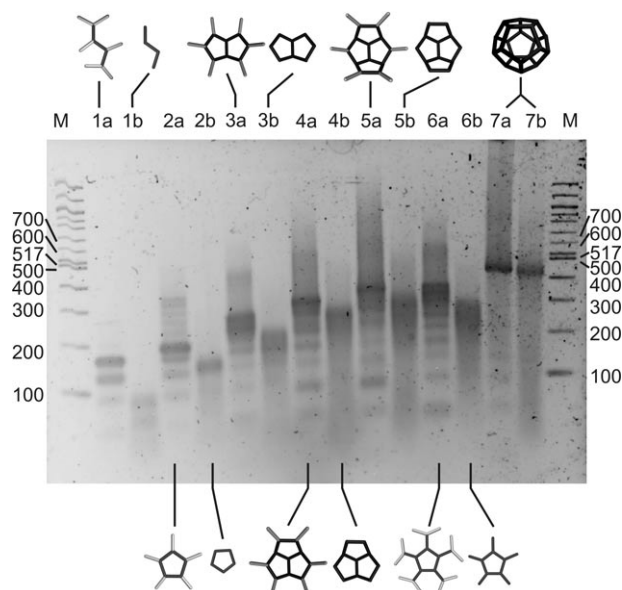


Abbildung 2. Natives Agarosegel (2%) des Dodekaeders und von Teilsätzen a) bevor und b) nach Behandlung mit Mungbohnen-Nuclease (Verdau einzelsträngiger DNA). Bahn M: DNA-Leiter von 100 bp Länge. Bahn 1a,b: v14–v17; Bahn 2a,b: v13–v17; Bahn 3a,b: v1, v2, v12–v17; Bahn 4a,b: v1, v2, v11–v18; Bahn 5a,b: v1, v2, v5, v6, v11–v18; Bahn 6a,b: v1, v6, v12–v18, v20; Bahn 7a,b: v1–v20.

Behandlung des nichtkovalenten Produkts mit Mungbohnen-Nuclease führte zu keiner Veränderung der elektrophoretischen Mobilität, während in Verdauexperimenten mit Teilsätzen des Dodekaeders solche Veränderungen beobachtet wurden (Abbildung 2). Dies ist zu erwarten, da das vollständig zusammengesetzte Dodekaeder nur aus doppelsträngiger DNA besteht, während Teilsätze zwangsläufig verdaubare einzelsträngige Arme enthalten. Wie bereits in früheren Untersuchungen an einem Tetraeder aus Trisilignucleotiden beobachtet wurde, erscheint das vollständig aufgebaute Produkt als eine einzelne Bande, während Fragmente oft zwei oder mehr Banden im Gel aufweisen.^[2e] Wir sind versucht, dies als Hinweis auf eine kooperative strukturelle Integrität des vollständig zusammengesetzten Objekts zu deuten.

Rasterkraftmikroskopie des selbstorganisierten Produkts in Flüssigphase auf Glimmer zeigte gleichförmige Partikel

von etwa 20 nm Durchmesser, was unseren Erwartungen entspricht (Abbildung 3). Die auf 4 nm beschränkte Höhe weist darauf hin, dass das Dodekaeder flexibel gegenüber

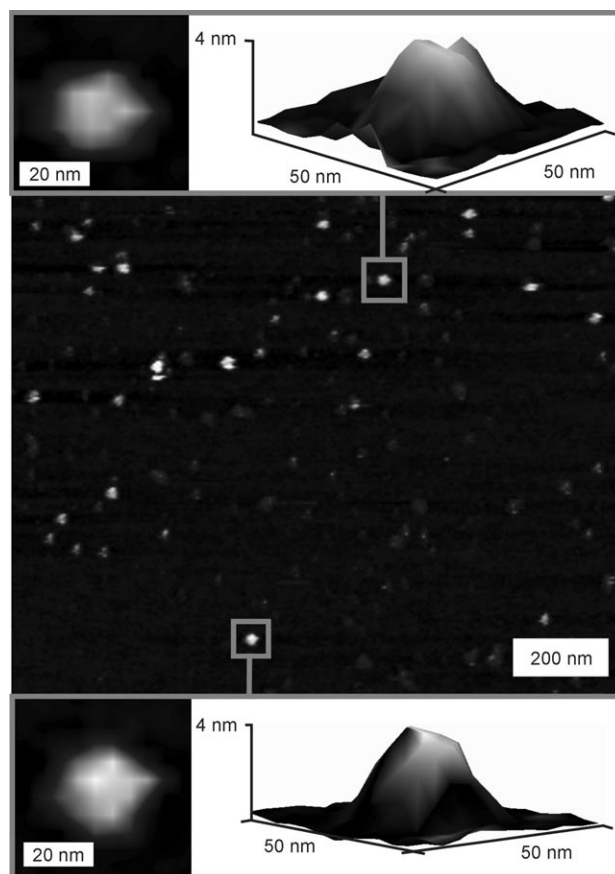


Abbildung 3. Das AFM-Bild von v1–v20, adsorbiert auf Glimmer, zeigt diskrete Objekte von etwa 20 nm Größe (Tapping-Modus in Flüssigphase, 10 mM HEPES-Puffer, pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM NiCl₂).

Kompression und Adsorption ist. Zukünftige Anwendungen könnten von der induzierten Deformierbarkeit solcher „Softbälle“ profitieren.

Um die mögliche Verwendung der Dodekaeder als Gerüstbausteine zu demonstrieren, bauten wir Dodekaeder auf, die ein bis sechs Trisilignucleotide enthielten, die in jeweils einem Arm um eine überhängende Sequenz verlängert waren. Diese Objekte wurden dann mit Lösungen der komplementären 5'-Fluorescein-markierten Oligonucleotide zusammengebracht. Abbildung 4 zeigt das Agarosegel der zusammengesetzten Objekte. Wie erwartet, steigt die Fluoreszenzintensität mit der Zahl der an das Gerüst gebundenen Fluoreszenzmarkierungen (Abbildung 4A), während die damit einhergehende Abnahme der elektrophoretischen Mobilität gerade noch erkennbar ist. Ähnliche Experimente wurden mit neu entwickelten^[11] Goldclustern als Markierung durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen).

Wir haben gezeigt, dass die Selbstorganisation von 3'-Trisilignucleotiden mit einem C_{3h}-Linkerkern die dodekaedrische Zielstruktur als das Hauptprodukt generiert. Überhangsequenzen hybridisieren mit Hybridmolekülen, die aus

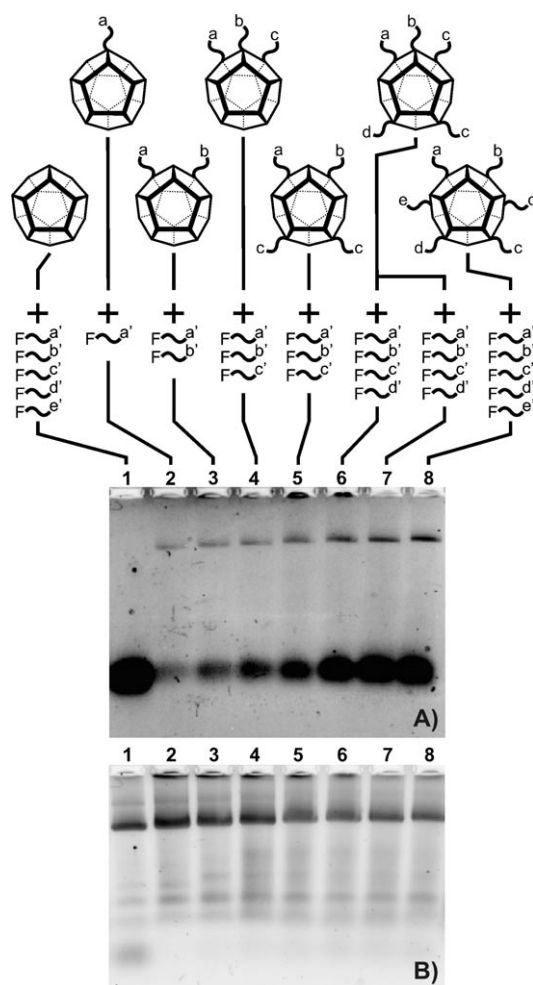


Abbildung 4. Natives Agarosegel (3%, 1×TBE-Puffer, 6.7 Vcm⁻¹, 60 Minuten bei 5°C) der dodekaedrischen Konstrukte mit unterschiedlicher Zahl von Überhangsequenzen, hybridisiert mit Fluorescein-markierten komplementären Oligonucleotiden (siehe Tabelle S8 in den Hintergrundinformationen); A) vor und B) nach Behandlung mit SYBR-Gold-Nucleinsäurefärbung.

einer komplementären Erkennungssequenz und einer modularen Funktion wie einem Farbstoff oder einem nanoskaligen Cluster bestehen. Bis zu sechs Positionen sind bisher erfolgreich adressiert worden, was Grund zu der Annahme gibt, dass der Aufbau hochkomplexer Aggregate durch Selbstorganisation von multimodularen DNA-Gerüsten im Rahmen dieses Ansatzes möglich ist. Vorstellbare Anwendungen solcher Konstrukte sind weitläufig und reichen vom Einfang und der Funktionalisierung nanoskaliger Objekte bis hin zu multimodularen Maschinen.

Experimentelles

1 wurde nach Lit. [12] synthetisiert.

2: 8.0 g (31.7 nmol) **1** und 2.2 mL (2.1 g, 26.5 mmol) Pyridin wurden in 40 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren auf 0°C gekühlt und tropfenweise mit einer Lösung von 2.85 mL (3.24 g, 26.9 mmol) Allyloxycarbonylchlorid in 20 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran ver-

setzt. Die Reaktionsmischung wurde weitere 3 h gerührt, während dessen sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde filtriert, das Filtrat wurde evaporiert und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Silicagel (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt. Man erhielt 3.97 g (11.8 mmol, 44%) der Verbindung **2**. ¹H-NMR: (400 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.66–1.73 (m, 4H, CH₂CH₂OH), 1.85–1.92 (m, 2H, CH₂CH₂OAC), 2.52–2.59 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂OH und CH₂CH₂CH₂OAC), 3.41 (m_c, 4H, CH₂OH), 4.08 (t, ³J = 6.48 Hz, 2H, CH₂OAC), 4.41 (t, ³J = 5.08 Hz, 2H, CH₂OH), 4.59 (dt, ³J = 5.56, ⁵J = 1.5 Hz, 2H, CH₂CH=CH₂), 5.23–5.35 (2 dm, ³J_{trans} = 17.2, ³J_{cis} = 10.41 Hz, 2H, CH=CH₂), 5.93 (m_c, 1H, CH=CH₂), 6.83 (s, 2H, ArH), 6.84 ppm (s, 1H, ArH). ¹³C-NMR: (100.6 MHz, [D₆]DMSO): δ = 30.26 (CH₂CH₂OAC), 31.59 (CH₂CH₂CH₂OAC), 32.04 (CH₂CH₂CH₂OH), 34.80 (CH₂CH₂OH), 60.63 (CH₂OH), 67.47 (CH₂OAC), 68.14 (CH₂CH=CH₂), 118.69 (CH₂CH=CH₂), 126.08 126.48 (H-C_{Ar}), 132.72 (CH₂CH=CH₂), 141.15 142.55 (CH₂C_{Ar}), 154.83 ppm (O(CO)O). MALDI-TOF-MS, *m/z* ber. für C₁₉H₂₈O₅Na ([M+Na]⁺): 359.42; gef.: 359.43. ESI-MS, *m/z* ber. für [M+H]⁺: 337.44; gef.: 337.1.

3: Eine Lösung von 3.38 g (10 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in 20 mL wasserfreiem Pyridin wurde tropfenweise über einen Zeitraum von 30 Minuten zu einer Lösung von 3.97 g (11.8 mmol) **2** in 30 mL wasserfreiem Pyridin gegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde an Silicagel mit Cyclohexan/Ethylacetat (2:1, 0.5% Triethylamin) als Elutionsmittel chromatographiert. Es wurden 2.57 g der Verbindung **3** (4.0 mmol, 40%) erhalten. ¹H-NMR: (400 MHz, [D₆]DMSO): δ = 1.62–1.71 (m, 2H, CH₂CH₂OH), 1.75–1.90 (m, 4H, CH₂CH₂O), 2.47–2.67 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂), 2.97 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, CH₂ODMT), 3.40 (m, 2H, CH₂OH), 3.73 (s, 6H, OCH₃), 4.04 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂OAC), 4.41 (t, ³J = 5.0 Hz, 1H, CH₂OH), 4.60 (dt, ³J = 5.56, ⁵J = 1.52 Hz, 2H, CH₂CH=CH₂), 5.21–5.36 (2 dm, ³J_{trans} = 17.3, ³J_{cis} = 10.36 Hz, 2H, CH=CH₂), 5.93 (m_c, 1H, CH=CH₂), 6.74–7.39 ppm (m, 16H, ArH). ¹³C-NMR: (100.6 MHz, [D₆]DMSO): δ = 30.24 (CH₂CH₂OAC), 31.56 (CH₂CH₂ODMT), 31.59 (CH₂CH₂CH₂OAC), 32.02 32.23 (CH₂CH₂CH₂O), 34.76 (CH₂CH₂OH), 55.43 und 55.40 (OCH₃), 60.63 (CH₂OH), 62.52 (CH₂ODMT), 67.44 (CH₂OAC), 68.11 (CH₂CH=CH₂), 85.65 (C_q DMT), 113.32 (C-3, C-3', C-5, C-5' DMT), 118.64 (CH₂CH=CH₂), 126.07 126.13 126.46 (H-C_{Ar}), 126.95 128.10 128.17 (C_{Ar} DMT), 130.0 (C-2, C-2', C-6, C-6' DMT), 132.69 (CH₂CH=CH₂), 136.51 (C-1, C-1' PhOCH₃ DMT), 141.09 142.03 142.52 (CH₂C_{Ar}), 145.68 (C-1 Ph DMT), 154.83 (O(CO)O), 158.41 ppm (C-4, C-4' PhOCH₃ DMT). MALDI-TOF-MS, *m/z* ber. für C₄₀H₄₆O₇Na ([M+Na]⁺): 661.80; gef.: 661.97; ESI-MS, *m/z* ber. für [M+Na]⁺: 661.8; gef.: 661.3.

4: 1.0 g (1.57 mmol) **3**, 0.31 g (1.86 mmol) Diisopropylammoniumtetrazolid und 0.59 mL (0.56 g, 1.86 mmol) 2-Cyanethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit wurden in 20 mL abs. Dichlormethan 2 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Rohprodukt wurde an Silicagel mit Cyclohexan/Ethylacetat (2:1, 0.5% Triethylamin) als Elutionsmittel chromatographiert. Es wurden 0.87 g (1.03 mmol, 66%) der Verbindung **4** erhalten. ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.19–1.24 (2 d, ³J = 7.04, 6.84 Hz, 12H, NCH(CH₃)₂), 1.88–2.02 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂O), 2.63–2.70 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂O und CH₂CH₂OP), 3.13 (t, 2H, ³J = 6.32 Hz, CH₂ODMT), 3.58–3.92 (m, 6H, OCH₂CH₂CN und CH(CH₃)₂ und CH₂CH₂CH₂OP), 3.82 (s, 6H, OCH₃), 4.18 (t, ³J = 6.48 Hz, 2H, CH₂OAC), 4.66 (dt, ³J = 5.8, ⁵J = 1.28 Hz, 2H, CH₂CH=CH₂), 5.27–5.42 (2 dm, ³J_{trans} = 17.2, ³J_{cis} = 10.4 Hz, 2H, CH=CH₂), 5.92–6.04 (m, 1H, CH=CH₂), 6.81–6.87 (m, 7H, ArH), 7.20–7.48 ppm (m, 9H, ArH). ¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 20.69 20.76 (CH₂CN), 24.90 24.97 25.04 (CH(CH₃)₂), 30.70 32.20 33.21 33.28 (CH₂CH₂O), 32.25 32.51 32.96 (CH₂CH₂CH₂O), 43.36 43.48 (CH(CH₃)₂), 55.54 (OCH₃), 58.61 58.80 (CH₂CH₂CH₂OP), 63.24 (CH₂ODMT), 63.33 63.50 (OCH₂CH₂CN), 67.87 (CH₂OAC), 68.70 (CH₂CH=CH₂), 86.10 (C_q DMT), 113.32 113.35 (C-3, C-3', C-5, C-5' DMT), 117.95 (CN), 119.20 (CH₂CH=CH₂), 126.31 126.41 126.71 (H-C_{Ar}), 126.93 128.13 128.59 (C_{Ar} DMT),

130.38 (C-2, C-2', C-6, C-6' DMT), 132.04 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 137.07 (C-1, C-1' PhOCH_3 DMT), 141.32 142.28 142.91 ($\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$), 145.74 (C-1 Ph DMT), 155.42 ($\text{O}(\text{CO})\text{O}$), 158.71 ppm (C-4, C-4' PhOCH_3 DMT). ^{31}P -NMR: (162 MHz, CDCl_3 , Phosphorsäure): $\delta = 148.71$ ppm. ESI-MS, m/z ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 840.04; gef.: 839.4.

Polystyrolfestphase für die reverse DNA-Synthese: Die Festphasen wurden synthetisiert, indem 3'-O-Succinat-5'-O-DMT Nucleoside (hergestellt nach Lit. [13]) an eine Custom Primer Support 200 Amino (GE Healthcare) gekuppelt wurden; 3'-O-Succinat-5'-O-DMT-Nucleoside wurden nach Lit. [9b,c] synthetisiert. Die Bernsteinsäureester wurden an die Festphase (200 μmol Aminofunktionen pro g) gekuppelt, indem äquimolare Mengen der 3'-O-Succinat-5'-O-DMT-Nucleoside und aminomodifizierter Festphase mit 1.3 Äquivalenten HBTU und 2 Äquivalenten Triethylamin in wasserfreiem DMF (4 mL pro g Festphase) langsam in einer Fritte 16 h bei Raumtemperatur durchmischt wurden. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden acetyliert, indem 1 g Festphase in einer Lösung von 25 mg DMAP und 0.5 mL Essigsäureanhydrid in 7.5 mL Pyridin suspendiert und in einer Fritte 16 h bei Raumtemperatur durchmischt wurde. Die Beladungen der Festphasen lagen zwischen 50 und 60 μmol pro g.

Synthese der Trisoligonucleotide: Reverse Amidite (ChemGene) wurden 5 min am DNA-Synthesizer (Gene Assembler Plus) unter Verwendung von 5-Benzylmercaptotetrazol (emp Biotech) als Aktivator gekuppelt. Standardprotokolle für Detritylierung, Capping und Oxidation wurden bei allen drei Strängen verwendet. Linker 4 wurde zweifach jeweils 5 Minuten gekuppelt, die Kupplungszeiten im zweiten Strang betrugen 1.5 min, während beim dritten Strang das erste Amidit 3×15 min und die nachfolgenden Amidite 3×2 min gekuppelt wurden. Die Entfernung der AOC-Schutzgruppe am DNA-Synthesizer erfolgte durch Behandlung mit einer Lösung von 17.1 mg Bis(diphenylphosphon)ethan, 24.7 mg Bis(dibenzylidenacetone)palladium (Acros Organics) und 10.7 μL Pyrrolidin in 10.0 mL Acetonitril für 15 min bei einer Flussrate von 0.5 mL pro min.

Aufreinigung der Trisoligonucleotide und Charakterisierung durch MALDI-TOF-MS: Nach Abspaltung von der Festphase (konz. Ammoniak, 55°C, 16 h) wurden die Trisoligonucleotide durch denaturierende PAGE (12%, TBE-Puffer, 450 V, 4 Stunden) aufgereinigt, aus dem Gel extrahiert und über NAP-25-Säulen (Amersham Biosciences) entsalzt. MALDI-MS (Bruker Daltonics) wurde unter Verwendung von 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix durchgeführt.

Selbstorganisationsexperimente: Die Trisoligonucleotide wurden stöchiometrisch in HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4, 100 mM NaCl) zusammengegeben, sodass eine Konzentration von 0.5 μM je Trisoligonucleotid erreicht wurde. Diese Lösung wurde auf 90°C erhitzt (5 min), auf 45°C abgekühlt (0.1°C s^{-1} , 40 min) und schließlich auf 4°C gekühlt (0.1°C s^{-1}). Verdau einzelsträngiger DNA mit Mungbohnen-Nuclease (Promega) wurde für 30 min bei 30°C in Acetatpuffer (50 mM, pH 5, 1 mM Zn^{2+}) unter Verwendung von 10 U Mungbohnen-Nuclease pro μg DNA durchgeführt. AFM-Bilder (Flüssigphase, Tapping-Modus) wurden mit einer Siliconnitrid-Spitze (AU NM-10, Radius der Spitze 10 nm, Veeco) an einem Solver-Pro-AFM (NT-MDT), ausgestattet mit einer AU028NTF-Justiereinheit, aufgenommen und mit Image Analysis 2.2.0 prozessiert. Die DNA-Nanostrukturen wurden auf Glimmer in einem 10 mM HEPES-Puffer (10 mM, pH 7.4, 100 mM NaCl) fixiert, der zusätzlich 1 mM NiCl_2 enthielt.

Eingegangen am 19. Juni 2007,
veränderte Fassung am 11. Februar 2008
Online veröffentlicht am 28. März 2008

Stichwörter: DNA-Strukturen · Nanostrukturen · Selbstorganisation · Supramolekulare Chemie · Trisoligonucleotide

- [1] a) N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237–247; b) J. H. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, 350, 631–633; c) Y. W. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1661–1669; d) N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3408–3428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3220–3238.
- [2] a) L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, 420, 286; b) A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, 396, 245–248; c) G. von Kiedrowski, L.-H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Reimold, M. Rein, *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, 609–619; d) M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3513–3518; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3311–3315; e) A. Dorenbeck, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum **2000**; <http://www-brs.ub.ruhr-uni-bochum.de/netathtml/HSS/Diss/DorenbeckAxel/diss.pdf>; f) L. H. Eckardt, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2006**; <http://www-brs.ub.ruhr-uni-bochum.de/netathtml/HSS/Diss/EckardtLarsHenning/diss.pdf>.
- [3] a) R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2005**, 310, 1661–1665; b) R. P. Goodman, R. M. Berry, A. J. Turberfield, *Chem. Commun.* **2004**, 1372–1373; c) C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7574–7577; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7414–7417; d) C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6992–6993.
- [4] W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, 427, 618–621.
- [5] F. A. Aldaye, H. F. Sleiman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13376–13377.
- [6] a) M. Chandra, S. Keller, C. Gloeckner, B. Bornemann, A. Marx, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 3558–3564; b) asymmetrische verzweigende Amidite sind kommerziell erhältlich, z.B. bei Glen Research (asymmetric doubler amidite, 5'-Me-dC Brancher Phosphoramidite) oder Biosearch Technologies (5'-DMT-T C6-O-Lev).
- [7] M. S. Shchepinov, E. M. Southern, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **1998**, 24, 794.
- [8] a) K. V. Gothelf, A. Thomsen, N. Nielsen, E. Cló, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1044–1046; b) T. Kuroda, Y. Sakurai, Y. Suzuki, A. O. Nakamura, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *Chem. Asian J.* **2006**, 1, 575–580; c) F. A. Aldaye, H. F. Sleiman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10070–10071; d) J. Tumpane, P. Sandin, R. Kumar, V. E. C. Powers, E. P. Lundberg, N. Gale, P. Baglioni, J.-M. Lehn, B. Albinsson, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, B. Nordén, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, 440, 125–129.
- [9] a) M. Koga, M. F. Moore, S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3757–3759; b) M. Koga, A. Wilk, M. F. Moore, C. L. Scremin, L. Zhou, S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 1520–1530; c) M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 3243–3246.
- [10] U. Feldkamp, S. Saghafi, W. Banzhaf, H. Rauhe, „DNA Sequence Generator: A Program for the construction of DNA sequences“; <http://www.cs.mun.ca/~banzhaf/molcomp.html#DNASequenceGenerator>.
- [11] W. M. Pankau, S. Mönninghoff, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1923–1926; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1889–1891.
- [12] Y. Yamagiwa, Y. Koreishi, S. Kiyozumi, M. Kobayashi, T. Kamikawa, M. Tsukino, H. Goi, M. Yamamoto, M. Munakata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, 69, 3317–3323.
- [13] H. Roesch, A. Froehlich, J. F. Ramalho-Ortigao, M. Montenarh, H. Seliger, Eur. Pat. EP 464638, **1992**.