

# Künstliche genetische Systeme bestehend aus vergrößerten Basenpaaren

Malte Winnacker und Eric T. Kool\*

Nichtnatürliche Nukleobasen · Nukleinsäuren ·

Replikation · Synthetische Biologie ·

Watson-Crick-Basenpaarung

**W**ir beschreiben in diesem Kurzaufsatz die Synthese, Eigenschaften und Anwendungen von künstlichen genetischen Systemen, die aus Basenpaaren bestehen, die länger sind als die Basen der natürlichen Watson-Crick-Architektur. Derartige Systeme werden von mehreren Arbeitsgruppen untersucht, um fundamentale chemische Fragen bezüglich der Funktion der genetischen Speichersysteme und somit des Ursprungs und der Entwicklung des Lebens zu erforschen. Beispielsweise, ist die irdische DNA-Struktur die einzige mögliche oder können andere Architekturen genauso funktionieren? Das Arbeiten jenseits der Beschränkungen der Purin-Pyrimidin-Geometrie ermöglicht mehr chemische Flexibilität im Design, und die zusätzliche Größe ergänzt das System um nützliche Eigenschaften wie hohe Bindungsaffinität, Helix-Stabilität sowie Fluoreszenz. Diese Eigenschaften sind nützlich für die Untersuchung von fundamentalen biochemischen Fragestellungen sowie für die Entwicklung neuer biotechnologischer, biomedizinischer und nanostruktureller Werkzeuge und Methoden.

## 1. Einleitung

Die chemische Synthese komplexer modifizierter Biomoleküle ermöglicht die Entwicklung von Werkzeugen für die Untersuchung grundlegender Fragestellungen bezüglich der Evolution und der Funktionen von lebenden Systemen. Sie kann somit als eine wichtige Teildisziplin der synthetischen Biologie betrachtet werden, einem interdisziplinären Feld, das Chemiker, Biologen und Biotechnologen zusammenbringt, um biologische Systeme zu entwerfen und aufzubauen.<sup>[1]</sup> Aufgrund ihrer fundamentalen Bedeutung in allen Lebewesen sind Nukleinsäuren und deren Modifikationen in den Fokus vieler Forschungsgruppen gerückt. Zusätzlich zu den in der Natur vorkommenden nicht-kanonischen Nukleobasen<sup>[2]</sup> wurden bereits viele Beispiele für nicht-natürliche Basen und Basenpaare beschrieben,<sup>[3–6]</sup> inklusive Nukleobasen-Strukturanaloga,<sup>[4]</sup> hydrophoben Basenpaaren,<sup>[5]</sup>

Metall-vermittelten Basenpaaren<sup>[6]</sup> und Basenpaaren mit wechselndem Wasserstoffbrückenmotiv.<sup>[7]</sup>

Eine spezielle Rolle in diesem Zusammenhang nimmt das Konzept der „size-expanded“ (vergrößerten, gestreckten) Nukleobasen und ihr Einbau in neue genetische Sets ein (für frühere Aufsätze siehe Lit. [3,8]).

Neue genetische Sets können die fundamentalen chemischen Fragen des Lebens testen: ist die Watson-Crick-DNA-Architektur<sup>[9]</sup> die einzige mögliche oder können andere Systeme genauso funktionieren? Das Arbeiten außerhalb der Limits der Purin-Pyrimidin-Geometrie gibt mehr Flexibilität im molekularen Design, um diese Fragen anzugehen. Wie unten ausführlich diskutiert wird, führen die größeren Abmessungen gestreckter Nukleobasen zu nützlichen Eigenschaften wie hoher Bindungsaffinität, hoher Helix-Stabilität und Fluoreszenz. Diese Eigenschaften sind interessant für das direkte Bearbeiten von bioanalytischen Fragestellungen, und sie sind möglicherweise auch nützlich für die Entwicklung neuer biotechnologischer Methoden. Mehrere Gruppen haben dieses Thema aufgegriffen und verschiedene Konzepte für vergrößerte/gestreckte genetische Sets ausgearbeitet, die „größer als normale“ Nukleobasen und entsprechende Basenpaare enthalten. Diese Studien werden in diesem Kurzaufsatz beschrieben und diskutiert.

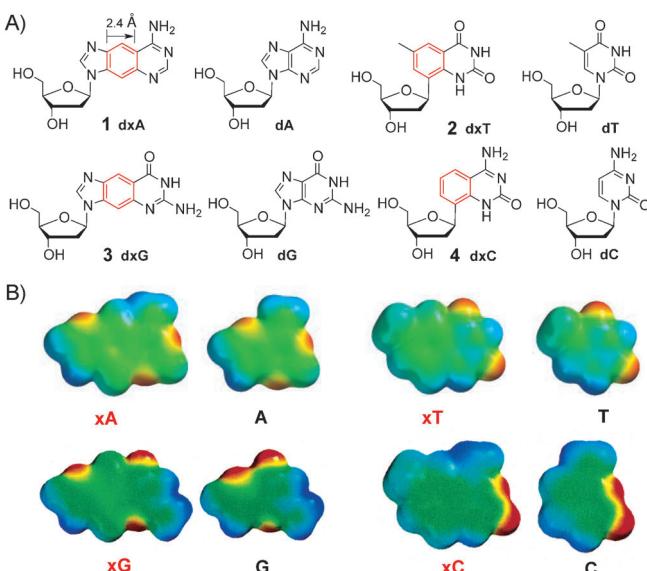
[\*] Dr. M. Winnacker, Prof. Dr. E. T. Kool  
Department of Chemistry, Stanford University  
Stanford, CA 94305 (USA)  
E-Mail: kool@stanford.edu

## 2. Synthese, Eigenschaften und Anwendungen von vergrößerten Nukleobasen in DNA

### 2.1. Benzo-Homologisierung: xDNA und yDNA

Eine wichtige Strategie für das Vergrößern von Nukleobasen ist die Benzo-Homologisierung. Durch Addition eines Phenylrings werden hierbei bicyclische Purine in 3-Ring-Analoga und monocyclische Pyrimidine in bicyclische Strukturen umgewandelt. Dieses Konzept wurde erstmals vor ca. vier Jahrzehnten von Leonard eingeführt, der „gestreckte“ Analoga von Adenin und des entsprechenden Ribonukleosides synthetisierte.<sup>[10]</sup> Letzteres wurde zum Testen von ATP-abhängigen Enzymen verwendet,<sup>[11]</sup> aber nicht innerhalb von DNA untersucht (Leonard betrachtete es als zu groß für DNA).

Inspiriert durch diese Arbeiten hat unsere Gruppe ein komplettes Set benzo-homologierter Desoxyribonukleoside („xDNA“) entworfen und untersucht.<sup>[12]</sup> Diese Benzo-Homologisierung führt zu einer Streckung der Nukleobasen um 2.4 Å. Abbildung 1 A zeigt die Strukturen dieser gestreckten



**Abbildung 1.** A) Die gestreckten xDNA-Nukleoside 1–4 im Vergleich zu den natürlichen Nukleosiden; B) raumfüllende Modelle der gestreckten Nukleobasen mit den berechneten elektrostatischen Potentialen, gekennzeichnet auf der Oberfläche (rot zeigt negatives Potential und blau positives). Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [12].

Nukleoside **dxA**, **dxT**, **dxG** und **dxC** (**1–4**) im Vergleich zu den natürlichen Nukleosiden **dA**, **dT**, **dG** und **dC**. Abbildung 1 B zeigt raumfüllende Modelle der gestreckten Nukleobasen mit den auf den Oberflächen gekennzeichneten berechneten elektrostatischen Potentialen. Wichtig hierbei ist, dass die vier Strukturen analoge Längen und Winkelverschiebungen in den Wasserstoffbrückenseiten der Nukleobasen haben, wodurch bei Basenpaarung die Bildung regulärer Helix-Konformationen begünstigt wird. Des Weiteren behalten sie – aufgrund ihrer vorhandenen ähnlichen elektrostatischen Ladungen – ihr eigentliches H-Brücken-Potential und paaren so normal mit komplementären Nukleobasen (siehe unten).<sup>[12]</sup>

Verfahren zur Herstellung von **1**, **2**, **3** und **4** sowie der entsprechenden Phosphoramidite wurden für die automatisierte Festphasensynthese entwickelt. Im Folgenden werden diese nur in Kürze beschrieben: Für die Synthese von **dxA** (**1**) wurde die modifizierte Nukleobase **5** an Chlorzucker **6** gekuppelt, gefolgt von der Umwandlung zu Nukleosid **1**, welches in das entsprechende Phosphoramidit (**1-PA**; fertig für die Festphasen-Oligonukleotidsynthese) umgewandelt wird (Schema 1). Für die Synthese von C-Glykosid **dxT** (**2**) wurde der iodierte Heterocyclus **7** mittels Heck-Chemie<sup>[13]</sup> an Verbindung **8** gekuppelt, gefolgt von der Entschützung zu **2** und der Synthese von **2-PA**. Auch **4-PA** kann aus **2** hergestellt werden (Schema 1 B). Die Herstellung von **dxG** (**3**) und **3-PA** wird mit der gestreckten Nukleobase **9**<sup>[10]</sup> bewerkstelligt (synthetisiert in fünf Schritten), die mittels Vorbrüggen-Glykosylierung<sup>[14]</sup> an das Ribosederivat **10** gekuppelt wird (gefolgt von einer reduktiven Entfernung der 2-OH-Gruppe; Schema 1 C).<sup>[12]</sup>

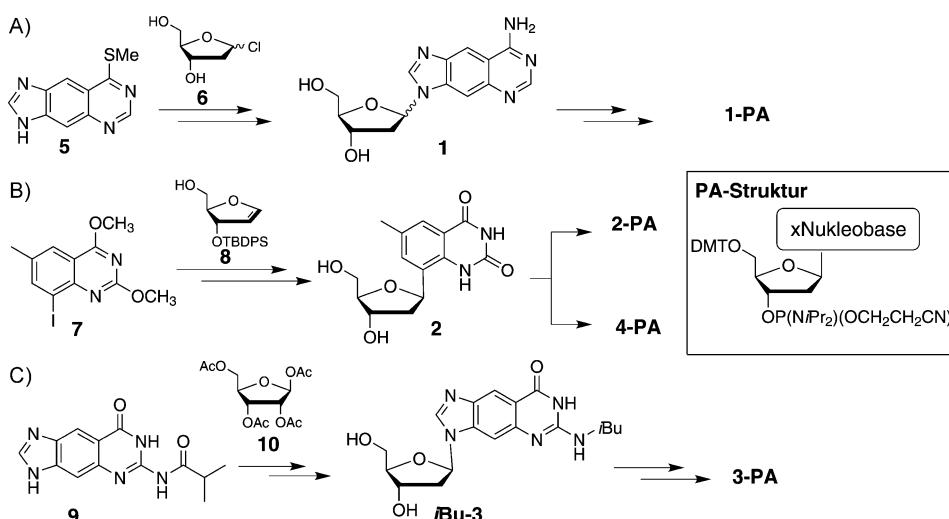
Das xDNA-Design beinhaltet die Paarung einer benzo-homologisierten Base mit einer komplementären „normalen“ Base in jedem Basenpaar, was einen komplett gestreckten Duplex ergibt, der aus acht genetischen Buchstaben anstatt den vier standardisierten besteht. Um diese Anordnung zu untersuchen, wurden die xDNA-Phosphoramidite in viele verschiedene Oligonukleotide in Längen von bis zu 20 Nukleotiden eingebaut, die entweder nur die gestreckten Monomere oder sowohl xDNA als auch natürliche DNA-Monomere enthielten (Abbildung 2 A). Mit diesen Oligonukleotiden wurde eine große Vielfalt von thermodynamischen und photophysikalischen Studien durchgeführt. Die vier xDNA-Basen sind stark fluoreszierend, mit Emissionsmaxima bei 380–410 nm. Interessanterweise kann sich bei Gruppierung nebeneinander die Emission drastisch ändern, abhängig von der Länge der Oligomere, der Hybridisierung



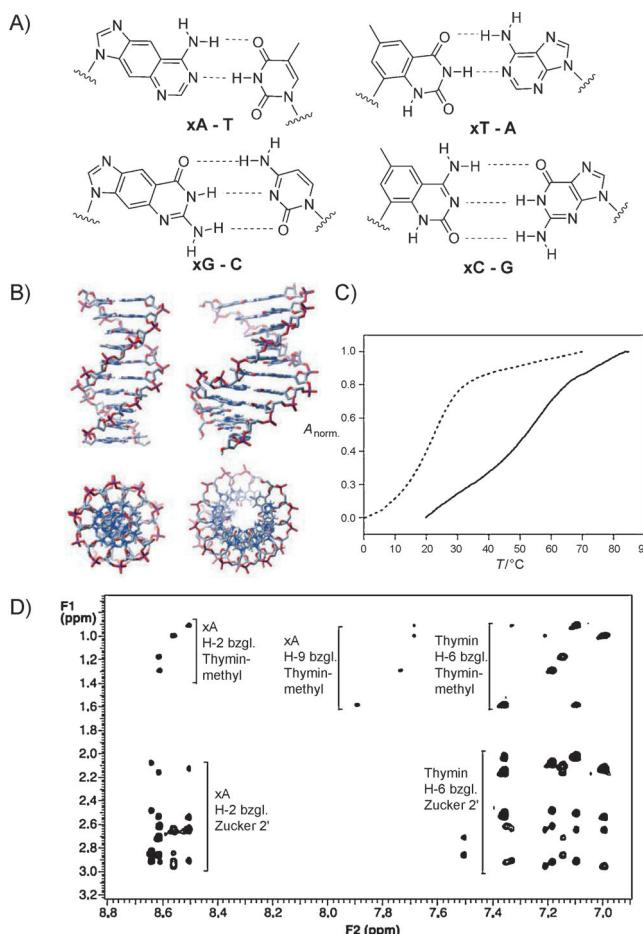
Eric T. Kool studierte an der Miami University in Oxford, Ohio, und promovierte 1988 an der Columbia University (NSF Predoctoral Fellow). Nach einem Postdoktorat am Caltech begann er 1990 seine unabhängige wissenschaftliche Laufbahn an der University of Rochester und wurde 1997 zum Professor befördert. 1999 wechselte er an die Stanford University, wo er der George and Hilda Daubert-Professor für Chemie ist.



Malte Winnacker studierte Chemie an der Universität Würzburg (Diplom 2006) und promovierte 2010 an der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. T. Carell. Danach war er Postdoktorand und DAAD-Stipendiat an der Stanford University bei Prof. Eric T. Kool. Derzeit ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter am WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie an der Technischen Universität München in der Gruppe von Prof. B. Rieger.



**Schema 1.** Synthesen der gestreckten Nukleoside und Phosphoramidite für die DNA-Festphasensynthese.<sup>[12]</sup>



**Abbildung 2.** A) Struktur der Basenpaare der gestreckten Nukleobasen mit den natürlichen Nukleobasen. B) Struktur von getreckter DNA (xDNA) im Vergleich zur natürlichen DNA. C) Thermische Denaturierungskurve einer gestreckten Helix mit der selbstkomplementären Sequenz d(xATxAxATxATTxAT) (Kontrolle d(ATTAATTTAT)), die eine höhere Stabilität im Vergleich zu einem analogen natürlichen DNA-Duplex zeigt. D) 2D-NMR-Spektrum, das die Struktur bestätigt (IUPAC-Standardnummerierung). Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [12].

und der genauen Zusammensetzung.<sup>[15]</sup> Diese Experimente eröffnen eine Vielzahl an Möglichkeiten, wie die expandierten DNA-Basen (alleine und in Oligomeren) als nützliche Werkzeuge bei biophysikalischen Analysen und biotechnologischen Anwendungen verwendet werden könnten.<sup>[12]</sup>

Computergestützte Studien haben bereits die Ursprünge der optischen Absorptionsspektren der xDNA-Basen erklärt<sup>[16]</sup> sowie weitere Details bezüglich ihrer Fähigkeiten, H-Brücken zu bilden und sich zu stapeln.<sup>[17]</sup> Zeitabhängige DFT-Rechnungen haben die Änderungen der Grenzorbitale, die durch den zusätzlichen aromatischen Ring induziert werden, deutlich gemacht. Die Hyperchromie – resultierend aus den Stapelwechselwirkungen – ist den Berechnungen zufolge in gestapelten xG-C und xA-T stärker ausgeprägt als bei natürlichen G-C- und A-T-Paaren. Es wurden zudem Berechnungen zur elektronischen Struktur in doppelsträngiger xDNA durchgeführt, die zeigten, dass xDNA eine kleinere  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Lücke hat als natürliche DNA, was xDNAs zu interessanten Kandidaten für effizienten positiven und negativen Ladungstransport und somit für Nanodraht-Anwendungen macht.<sup>[18]</sup> Die Wechselwirkungen zwischen gestrecktem Guanin (xG) und verschiedenen Gold-Nanoclustern wurde kürzlich mittels DFT untersucht.<sup>[19]</sup> Die Analyse der lokalen Aromatizitäten enthüllte relevante Unterschiede im aromatischen Charakter der einzelnen xDNA-Basen.<sup>[20]</sup>

Mehrere Studien wurden mit einzelnen xDNA-Basen durchgeführt, um die sterischen und elektronischen Effekte der zusätzlichen Größe zu untersuchen.<sup>[21]</sup> Zum Beispiel haben Untersuchungen bezüglich der Stapelung der xDNA-Basen gezeigt, dass die benzo-homologisierten Basen wesentlich stärker stapeln als ihre natürlichen Gegenstücke, was wahrscheinlich auf die größere Kontaktfläche und die stärkere Polarisierbarkeit und Hydrophobie zurückzuführen ist. Bei Platzierung in doppelsträngiger natürlicher DNA wirken einzelne Substitutionen von xDNA-Basen sterisch destabilisierend, was jedoch aufgehoben wird, wenn mehrfache benachbarte Substitutionen vorliegen. Dennoch werden trotz der lokalen Rückgrat-Spannung offensichtlich immer noch Watson-Crick-Basenpaare an den DNA-xDNA-Ver-

bindungsstellen ausgebildet. Die energetischen Kosten der 2.4-Å-Streckung eines isolierten Basenpaares wurden auf 1–2 kcal mol<sup>-1</sup> berechnet.<sup>[21]</sup>

Die durchgängige Paarung von gestreckten Basen mit kanonischen Basen in Helices resultiert in einer stabilen, doppelhelikalnen, antiparallelen xDNA-Struktur. Viele Untersuchungen haben diese Helix-bildenden Eigenschaften und Strukturen der xDNA aufgezeigt (Abbildung 2B–D).<sup>[22]</sup> Diese beinhalten NMR- und UV-Spektroskopie, Stöchiometriermittlung, Zirkulardichroismus(CD)-Spektren, Prüfung der Abhängigkeit von der Ionenstärke und thermodynamische Messungen sowie Simulationen der molekularen Dynamik.<sup>[23]</sup> xDNA ist aufgrund der verstärkten Stapelung der vergrößerten Basenpaare fast immer wesentlich stabiler als natürliche DNA einer analogen Sequenz. Die Struktur ist ähnlich derjenigen von B-DNA, mit analoger Paarung und Zucker-Konformationen. Interessanterweise benötigt der größere Durchmesser ca. 12 Basenpaare pro 360°-Drehung, im Vergleich zur natürlichen DNA mit 10.5 Paaren. Thermodynamische Studien bestätigten, dass xDNA sensibler gegenüber Einzelbasen-Fehlpaarungen ist, wobei sie eine gleiche Selektivität wie natürliche DNA zeigt.<sup>[24]</sup> Somit verhält sich xDNA als ein selbst-assozierendes System gleich oder sogar optimierter als natürliche DNA, was zeigt, dass xDNA vom chemischen und physikalischen Standpunkt aus als ein künstliches genetisches System funktionieren kann.

Als nächstes fokussierte man sich auf biochemische und biologische Fragen: Kann die Information, die in xDNA-Sequenzen gespeichert ist, zuverlässig kopiert werden? Wie erwähnt, besteht xDNA aus acht Buchstaben, was eine außergewöhnliche Dichte an Informationsspeicherung zur Verfügung stellt. Es wurden Studien bezüglich der Auslesung von einfachen und mehrfachen xDNA-Paaren durch das Klenow-Fragment (Kf, ein sterisch festes Enzym der A-Familie) der DNA-Polymerase 1 und durch die Polymerase Dpo4 von *Sulfolobus solfataricus* (einer flexiblen Polymerase der Y-Familie) durchgeführt, um das Potential von benzo-expandierter DNA bezüglich der Codierung und Übertragung von biochemischer Information zu überprüfen.<sup>[25,26]</sup> Meistens wählten die Polymerasen den korrekt gepaarten „Partner“ für jede xDNA-Base aus, allerdings mit geringerer Effizienz im Vergleich zu den natürlichen Basen. Kinetische Studien ergaben, dass das flexible Dpo4-Enzym im Hinblick auf das Extendieren der vergrößerten Paare wesentlich effizienter als Kf war, und weitere Untersuchungen zeigten, dass Dpo4 in der Lage ist, bis zu vier aufeinanderfolgende xDNA-Paare auf einer Vorlage korrekt zu synthetisieren. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse für die Nukleosid-Insertion durch Dpo4 (A), für die Nukleosid-Insertion durch Kf *exo* (B), die Primer/Templat-Basenpaar-Verlängerung durch Kf *exo* (C) und die Basenpaar-Verlängerung durch Dpo4 (D). Die Daten legen nahe, dass für eine erfolgreiche Replikation von xDNA und anderen vergrößerten Basenpaar-Konstrukten existierende Polymerasen einerseits geeignet sind (wenn auch eingeschränkt), dass aber andererseits auch die Verwendung von mehreren Enzymen in Kombination oder das Auffinden und Entwickeln von neuen Polymerasen hilfreich sein wird.

Als nächstes wurde das Kopieren von xDNA durch Polymerasen in lebenden Bakterien getestet. Ein ca. 7000 nt

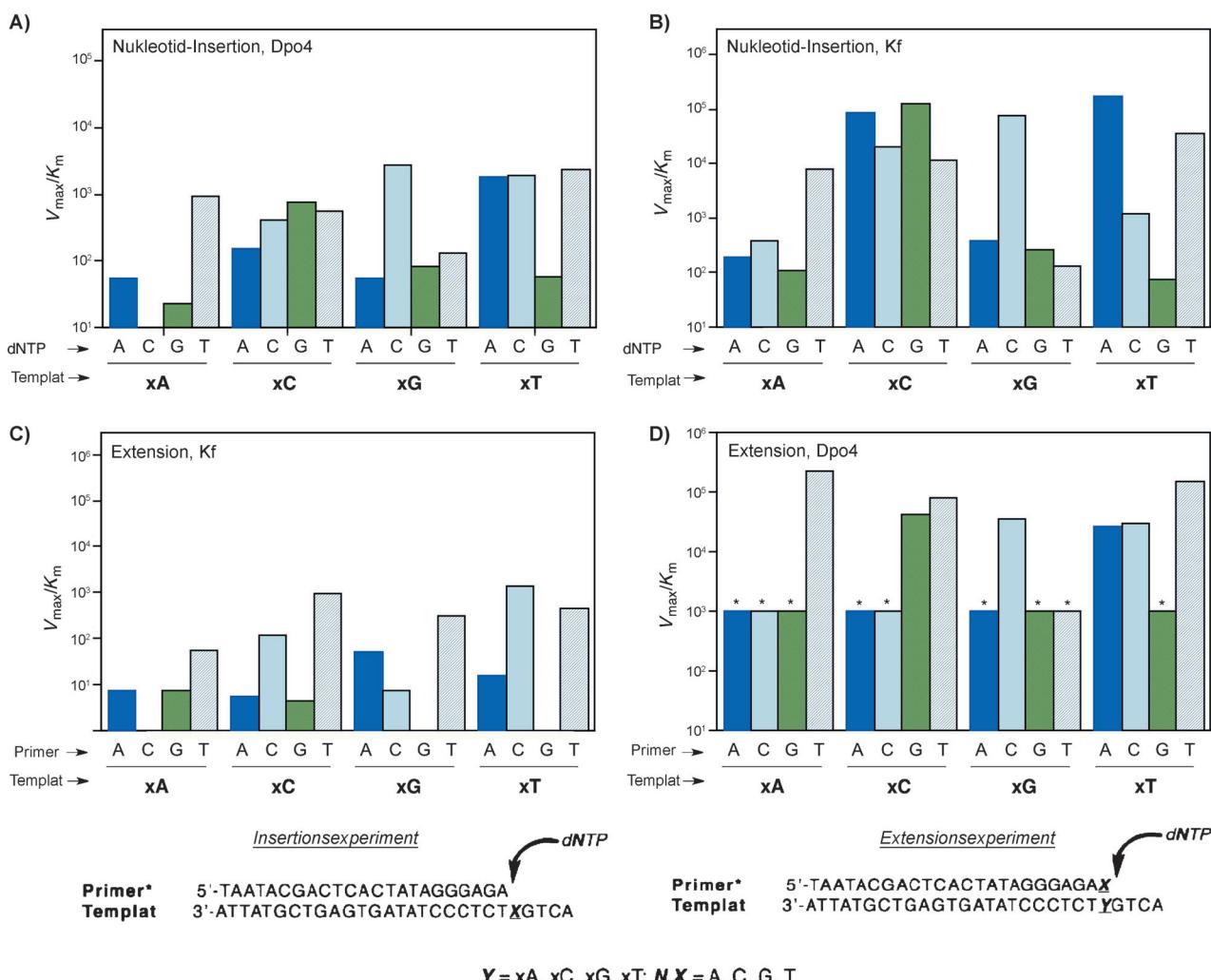
Phagengenom – konstruiert mit einzelnen xDNA-Basen – wurde in *E. coli* repliziert, das fünf verschiedene DNA-Polymerasen enthält, von denen einige flexible Polymerasen der Y-Familie sind. Die Ergebnisse zeigten einen effizienten By-pass einiger der xDNA-Basen.<sup>[27]</sup> Dann wurden Tests durchgeführt, um zu sehen, ob xDNA zur Codierung von einigen Aminosäuren des grün-fluoreszierenden Proteins verwendet werden kann. Plasmid-DNA, die bis zu acht xDNA-Basen enthielt, wurde korrekt von zellulären Polymerasen ausgespielen, was in grün-fluoreszierenden Bakterien resultierte.<sup>[28]</sup> Dies war das erste Beispiel für die Verwendung eines künstlichen genetischen Sets zur Codierung eines Phänotyps in einem lebenden Organismus, und ein signifikanter Schritt aus Sicht der synthetischen Biologie.

Synthesen und einige Replikationsstudien wurden auch für ein verwandtes Strukturdesign mit dem Namen „wide DNA“ (yDNA) durchgeführt, das für die Nukleoside **dyA**, **dyT** und **dyC** entwickelt wurde, um einen anderen Vektor der Benzo-Extension zu haben (Abbildung 4A).<sup>[29]</sup> Bei mehreren Sequenzen wurden hierbei hoch stabile doppelsträngige Helices gebildet. Dies zeigt die Möglichkeit eines genetischen Acht-Basen-Systems basierend auf der yDNA-Geometrie, analog zur Entwicklung der xDNA. Messungen zu den Fluoreszeizeigenschaften sowie zur Bindungsselektivität und -Affinität für yDNA wurden ebenfalls durchgeführt.<sup>[29]</sup>

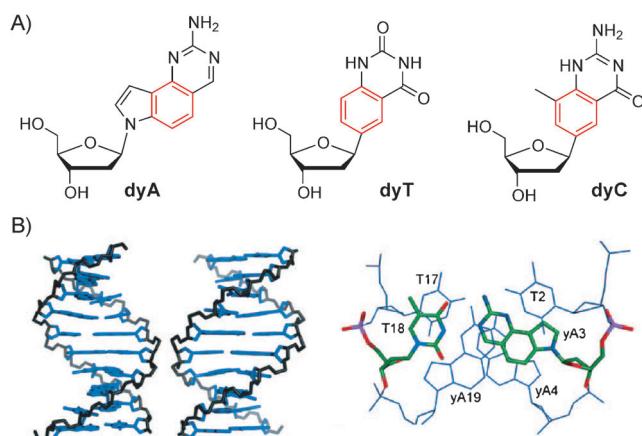
Abbildung 4B zeigt den Blick auf die y-DNA-Struktur von der großen (links) und der kleinen Furche aus (rechts) sowie die Strukturen von drei aufeinanderfolgenden Basenpaaren in der yDNA, was deutlich die Paarungsgeometrie und den Base-Base-Überlapp beweist (rechts).

In Experimenten zur Amplifikation durch Polymerasen, zur Klonierung und zur Genexpression von yDNA wurde festgestellt, dass das Auslesen der yDNA durch Polymerasen mit geringer Effizienz erfolgt. Es wurde auch ein starkes Potential für Fehlpaarungen gefunden, hauptsächlich aufgrund von y-yT und T-yC-Fehlpaarung. Dies ist somit anders als bei xDNA und röhrt wahrscheinlich von der unterschiedlichen yDNA-Geometrie her, bei der leichter die Wobble-Basenpaare gebildet werden können.<sup>[30]</sup>

Nach diesen Erfolgen bei der Benzo-Homologisierung untersuchten wir, ob eine weitere „Streckung“ der Basen möglich ist. Somit wurden anfängliche Experimente bezüglich der sogenannten Naphtho-Homologisierung durchgeführt.<sup>[31]</sup> Die doppelt erweiterten Naphthopyrimidine **yyT** und **yyC** wurden durch Heck-Kupplung synthetisiert (Abbildung 5A) und mittels Festphasenchemie in Oligonukleotide eingebaut. Diese Desoxyribonukleoside sind fluoreszent und haben Emissionsmaxima von 446 nm bzw. 433 nm. Daraufhin wurden verschiedene Sequenzen mit mehrfachen Substitutionen von yyT und yyC in Paarung mit gegenüberliegendem Adenin und Guanin gemischt und untersucht. Daten aus UV- und FRET-Experimenten (Förster-Energietransfer) sowie Quenching- und On-Bead-Hybridisierungsstudien zeigten, dass mittels Selbstanlagerung in helikale Komplexe komplementäre „doublewide DNA“(yyDNA)-Stränge mit einer 1:1-Stöchiometrie gebildet werden. Es wurden molekulare Modelle konstruiert, um natürliche B-Form-DNA-Dodekamere mit yyDNA zu vergleichen, die aus yyT-A- und yyC-G-Paaren besteht (Abbildung 5B, AMBER-Kraftfeld, Wasserkon-

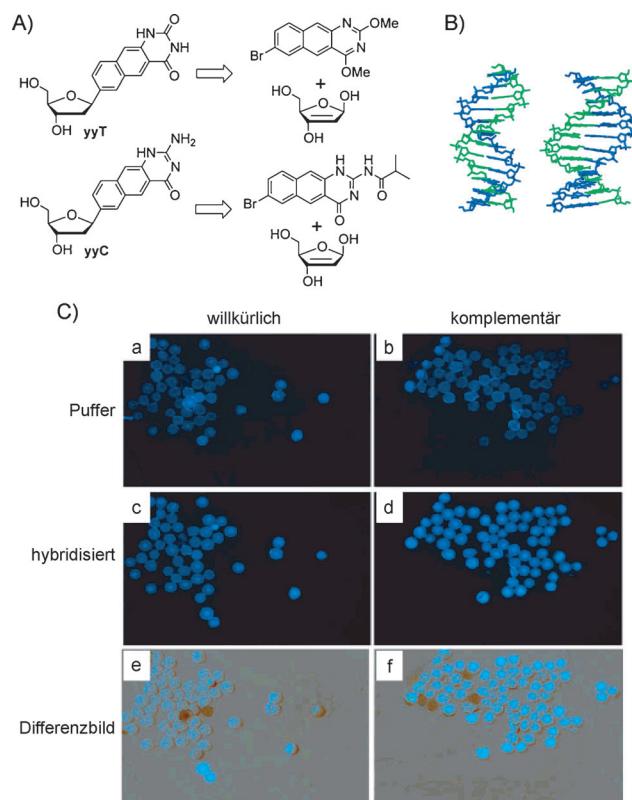


**Abbildung 3.** A–D) Vergleich der kinetischen Effizienzen und Selektivitäten für die xDNA-Basenpaar-Synthese bzw. xDNA-Basenpaar-Extension für die Exo-Enzyme Dpo4 und Kf (Erklärung siehe Text). Unten: Primer:Templat-Stränge, die für die Einzelnukleotidinsertions- und Einzelnukleotidextensiosexperimente verwendet wurden. Wiedergabe nach Lit. [25] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.



**Abbildung 4.** A) Struktur der drei synthetisierten yDNA-Nukleoside. B) Modellierte Struktur der yDNA-Helix und -Basenpaare (Erklärung siehe Text). Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [29].

tinuum). Die hypothetischen Basenpaarungsschemata sind analog zur Watson-Crick-Basenpaarung, aber mit glykosidischen C1'-C1'-Abständen, die um rund 45 % auf 15.2 Å erweitert sind. Das Hybridisierungsverhalten von yyDNA wurden auf PEG-Polystryrol-Beads unter einem Epifluoreszenzmikroskop getestet. In dieser Studie wurden zwei Sets von Beads mit verschiedenen kovalent konjugierten DNA-Oligonukleotiden vorbereitet, eine komplementär zur yyDNA-Sequenz 5'-CCTTCTCC und die andere mit einer willkürlichen Kontrollsequenz. Das yyDNA-Oligomer wurde mit den Beads inkubiert und anschließend gewaschen. Digitale Fluorezenzbilder (Abbildung 5 C) zeigten einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz für die sequenzkomplementären Beads (d,f) im Gegensatz zum Hintergrund (b) und den Beads mit den willkürlichen Sequenzen (c,e). Diese Beobachtungen bestätigen eine sequenzselektive nichtkovalente Bildung eines Komplexes zwischen den yyDNA-Oligonukleotiden und den komplementären DNA-Sequenzen auf den Polymer-Beads.



**Abbildung 5.** A) Retrosyntheseschema für die Synthese der Naphtho-homologisierten Desoxyribonucleoside yyT und yyC. B) Struktur von yyDNA (rechts) verglichen mit natürlicher DNA. C) Hybridisierungsstudien auf PEG-Polystyrol-Beads (60 µm). Erklärung siehe Text. Wiedergegeben mit Genehmigung nach Lit. [31].

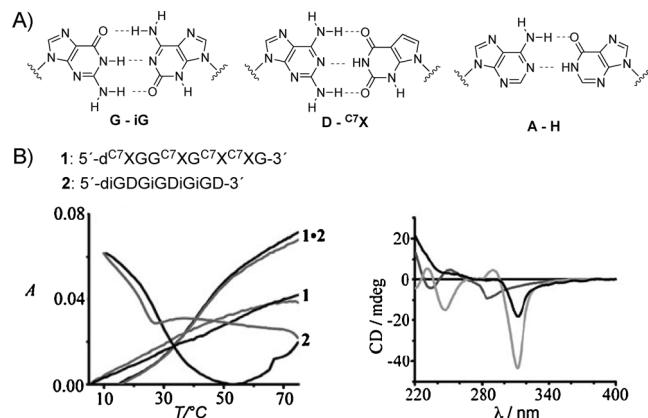
Die yyDNA-Experimente haben ein neues, noch größeres Limit für die Größe von informationskodierenden Nukleinsäure-basierenden Systemen definiert. Eine detaillierte Computeranalyse der verschiedenen Effekte, die aus der außergewöhnlichen Struktur von yDNA und yyDNA resultieren, wurde kürzlich von Sharma et al. beschrieben.<sup>[32]</sup> Eine weitere ausführliche theoretische Studie untersuchte den wichtigen Punkt der Tautomerie.<sup>[33]</sup> Naphtho-homologiertes yyG und seine fünf möglichen Tautomere wurden hierbei in Bezug auf ihre elektronischen Übergänge untersucht, und die Ergebnisse wurden mit denen von yDNA-Basen verglichen, was interessante Effekte zeigte. Beispielsweise waren die Absorptions- und Emissionsmaxima für yyG nach Lösen in Methanol blauverschoben, während die Maxima der tautomeren Basen rotverschoben waren. Allgemein legen die Fluoreszenzeigenschaften von yyDNA im sichtbaren Bereich deren Einsatz als Reporter für einen weiten Bereich von analytischen Anwendungen nahe.

## 2.2. Purin-Purin-Basenpaare

Ein anderes wichtiges Beispiel für gestreckte Nukleobasen sind die Purin-Purin-Basenpaare. Derartige Basenpaare können – in der anti-anti-Konfiguration – größere Abmessungen als die Watson-Crick-Pyrimidin-Purin-Basenpaare

annehmen. Während diese Nukleobasen an sich nicht notwendigerweise „künstlich“ sind, spielt die Purin-Purin-Paarung (Pu-Pu) aufgrund ihrer Bedeutung für den Ursprung des Lebens eine besondere Rolle im ganzen Kontext der vergrößerten Basenpaare. Die Untersuchung dieser nichtkanonischen Basenpaare ist von großem Interesse,<sup>[34]</sup> da sie die Frage aufwerfen, warum die genetische Information auf der Erde in Purin-Pyrimidin-Basenpaar-Systemen gespeichert ist. Es steht inzwischen fest, dass Purin-Purin-Basenpaare in natürlichen RNAs vorkommen,<sup>[35]</sup> und Benner et al. haben über Studien mit isolierten Pu-Pu-Paaren in ansonsten natürlichen DNA-Duplexen berichtet.<sup>[36]</sup> Jovin et al. haben einen parallel Duplex-DNA-Strang beschrieben und charakterisiert, der Segmente aus trans-Purin-Purin und Purin-Pyrimidin-Basenpaaren enthält.<sup>[37]</sup>

Auch komplett Purin-Purin-substituierte DNAs wurden bereits in mehreren Laboratorien erforscht. Ein bekanntes Beispiel sind die Guanin-Isoguanin- und Diaminopurin-7-Deazaxanthin-Basenpaare, die von Switzer et al. beschrieben wurden (Abbildung 6 A).<sup>[38]</sup> Die Studien zeigten, dass diese



**Abbildung 6.** A) Struktur der Purin-Purin-Basenpaare G-iG, D-C<sub>7</sub>X und A-H (Erklärung siehe Text). B) Zwei Einzelstrang-Oligonukleotide mit komplementären Purin-Purin-Basenpaaren sowie ein Denaturierungsprofil und ein CD-Spektrum dieser Oligonukleotide. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [38].

Purin-Purin-DNA-Duplexe Stabilitäten und freie Energien aufweisen, die den analogen Purin-Pyrimidin-DNA-Duplexen sehr nahe kommen. Mehrere Oligonukleotide wurden synthetisiert, die diese Purin-Basen enthalten, und Studien bezüglich des UV-Schmelzverhaltens ergaben, dass komplementäre Strände assoziieren, aber dass die Einzelstrände in der Abwesenheit ihres Komplements nicht selbstassoziiieren (Abbildung 6 B). Die Wechselwirkungen dieser Basenpaare sowie von Adenin-Ionosin-Basenpaaren mit vielen DNA-Intercalatoren wurden auch von Hud et al. untersucht.<sup>[39]</sup>

Battersby et al. führten thermische Schmelz- und Strukturstudien mit Oligonukleotiden durch, die Adenin-Hypoxanthin- und Guanin-Isoguanin-Basenpaare enthielten.<sup>[40]</sup> Die Ergebnisse bestätigten, dass auch Nukleinsäuren mit diesen Purin-Nukleobasen stabile Duplexe bilden können.

Weitere Studien mit mehrfachen Purin-Purin-Basenpaaren wurden von Seela et al. und von Eschenmoser und Mit-

arbeitern beschrieben, die ebenfalls Fragestellungen im Zusammenhang mit der Helixbildung von Purin-Oligonukleotiden im Paar mit anderen Purin-enthaltenden Strängen untersuchten.<sup>[41]</sup> Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden keine derartigen kompletten Strukturen mittels 2D-NMR-Spektroskopie und Kristallographie untersucht. Zudem wurde in den oben genannten Studien nicht die Fähigkeit von Polymerasen zum Kopieren von Homopurin-DNA in Gegenwart von komplementären Purin-Nukleosiden getestet; somit muss die Fähigkeit von Pu-Pu-Paaren, enzymatisch ausgelesen zu werden, erst noch untersucht werden.

Diese Studien der Purin-Purin-Basenpaare haben eine große Bedeutung für das Verständnis der Struktur von Nukleinsäuren und der Evolution lebender Systeme. Diese Basenpaare sollten als ein alternatives Konzept für das Speichern von genetischer Information betrachtet werden, und detaillierte Vergleiche mit den Purin-Pyrimidin-Basenpaaren geben uns aufschlussreiche Einblicke in den Ursprung der genetischen Informationsspeicherungssysteme auf unserem Planeten.

### 2.3. Basenpaare mit Naphthyridin und Imidazopyridopyrimidin

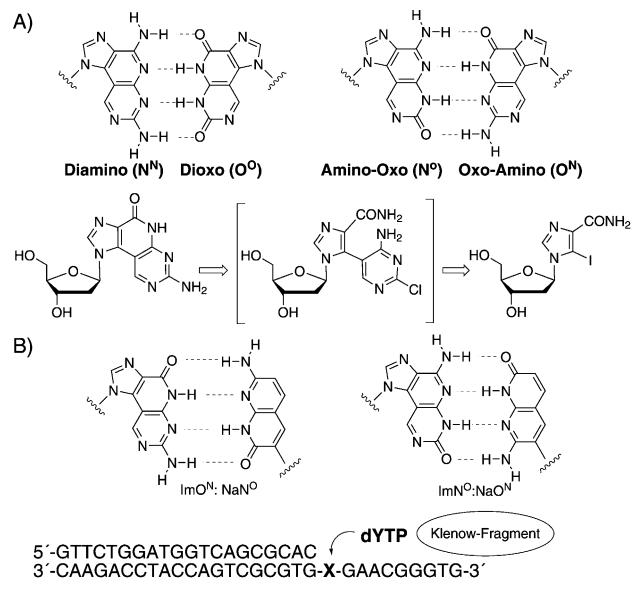
Minakawa, Matsuda und Mitarbeiter haben an der Entwicklung von vergrößerten Basenpaar-Motiven geforscht, die vier Wasserstoffbrücken enthalten. Beispielsweise wurden die Synthese und Eigenschaften von Oligonukleotiden beschrieben, die Imidazopyrimidin(Im)-Nukleoside enthalten (Kombinationen Diamino, Dioxo, Amino-Oxo, Oxo-Amino; Abbildung 7 A, oben).<sup>[42]</sup> Diese tricyclischen Strukturen wurden

durch Stille-Kupplung und anschließende intramolekulare Cyclisierung synthetisiert (Abbildung 7 A, unten). Der Einbau der großen tricyclischen Nukleoside jeweils gegenüber zueinander in einer komplementären DNA-Helix ergab aufgrund der Größenfehlpassung bezüglich der benachbarten Watson-Crick-Paare eine Destabilisierung des Duplexes, während der Einbau von drei aneinander gereihten tricyclischen Nukleosiden pro Strang zu einer thermischen und thermodynamischen Stabilisierung des Komplexes führte. Weitere Vergleiche der Schmelztemperaturen bestätigten das 4-Wasserstoffbrücken-Motiv. In weiterführenden Studien wurden 1,8-Naphthyridin (Na)-C-Nukleoside und ihre Paarungseigenschaften in Oligonukleotiden beschrieben<sup>[43]</sup> sowie die Synthese und selektive Erkennung von Naphthyridin:Imidazopyridopyrimidin-Basenpaaren ( $\text{ImO}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$  und  $\text{ImO}^{\text{O}}:\text{NaO}^{\text{N}}$ ) durch die Klenow-Fragment-DNA-Polymerase (Abbildung 7 B).<sup>[44]</sup> Die Im-Basen können als ringerweiterete Purin-Analoga in Richtung der kleinen Furche betrachtet werden, während die Na-Basen als ringerweiterete Analoga der Pyrimidine in Richtung der großen Furche betrachtet werden können. Untersuchungen zeigten, dass die DNA-Duplexe mit diesen künstlichen Nukleobasen thermisch stark stabilisiert sind (um 8–9 K), was an den vier nicht-kanonischen H-Bindungen, an der starken Basenstapelung sowie an der Gestaltkompatibilität des Im:Na-Paares liegt.

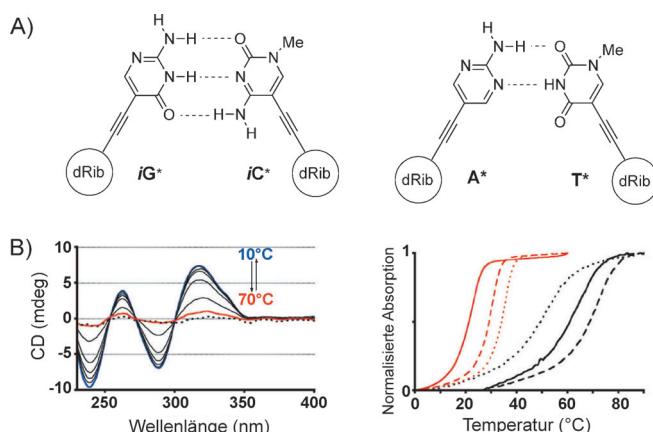
In dieser Studie wurde auch die Insertion von einzelnen Nukleosiden (Selektivität gegenüber natürlichen dNTPs und Selektivität gegenüber nicht-kanonischen dNTPs) durch das Klenow-Fragment in einer Reihe von Experimenten getestet. Ein Primer-Templat-Duplex wurde hierbei, wie in Abbildung 7 gezeigt, mit einer DNA-Polymerase verwendet. Als ein Beispiel wurden die verschiedenen dYTP-Nukleoside gegenüber ImN<sup>O</sup> in das Templat eingebaut. Die Triphosphate dATP und ImO<sup>N</sup>TP wurden mit diesem Enzym selektiv gegenüber NaN<sup>O</sup> in das Templat eingebaut, gemäß ihrer elektrostatischen und Gestaltkompatibilität. Paare vom Typ Im:Na wurden relativ zu den vergrößerten Paaren vom Typ Im:Im selektiv eingebaut, im Einklang mit der Tatsache, dass man von Im:Na-Paaren annimmt, dass sie ähnlich groß sind wie die natürlichen Purin:Pyrimidin-Basenpaare. Somit ist noch nicht ganz klar, ob die neuen gestreckten Im:Im-Systeme mit natürlichen Enzymen replizierbar sind oder ob hierzu „maßgeschneiderte“ Polymerasen benötigt werden.

### 2.4. Alkinyl-substituierte Basenpaare

Ein anderes Design für DNA-artige Systeme mit vergrößertem Durchmesser wurde von Inouye et al. entwickelt.<sup>[45]</sup> In dieser kreativen Studie wurde ein Set von vier Nukleosiden beschrieben, in dem die nichtnatürlichen Basen über eine Acetylenbrücke in β-Konformation an den Desoxyribosetyl angebracht sind (Abbildung 8 A). Diese Nukleoside – gestreckt um ungefähr 3 Å – wurden mittels der entsprechenden Phosphoramidite in Oligonukleotide eingebaut, und es wurde gezeigt, dass die daraus resultierende DNA rechtsgängige Duplexe und Triplexe mit komplementärer DNA bildet. Eine Serie von Absorptionsexperimenten zeigte, dass die daraus resultierenden Duplexe thermische Stabilitäten aufweisen,



**Abbildung 7.** A) Imidazopyridopyrimidin-Basenpaare und retrosynthetischer Zugang zu diesen modifizierten Nukleosiden. B) Imidazopyridopyrimidin:Naphthyridin-Basenpaare und ein experimentelles Design zum Testen der Einzelnukleosid-Insertion durch das Klenow-Fragment. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [42–44].



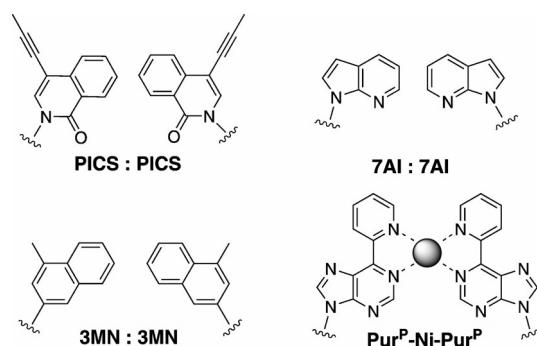
**Abbildung 8.** A) Die künstlichen Alkinyl-Basenpaare **iG\***:**iC\*** und **A\***:**T\***. B) Links: CD-Spektrum des Duplexes 5'-d(**iG\***)<sub>8</sub>/3'-d(**iC\***)<sub>8</sub> bei unterschiedlichen Temperaturen von 10 bis 70°C; die gepunktete Linie ist die Summe der Einzelstrangespektren von d(**iG\***)<sub>8</sub> und d(**iC\***)<sub>8</sub>; rechts: UV-Schmelzkurven des Duplexes 5'-d(**iG\***)<sub>8</sub>/3'-d(**iC\***)<sub>8</sub> (schwarz) und weiterer Sequenzen mit verschiedenen d(**iG\***)/d(**iC\***)-enthaltenden Sequenzen. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [45].

die denen von natürlicher DNA sehr nahe kommen (Abbildung 8B). Es trat eine spontane und sequenzselektive Hybridisierung ein, was dieses künstliche genetische System für die Speicherung von Information geeignet macht und somit mögliche Anwendungen im Bereich der synthetischen Biologie ermöglicht, sofern es repliziert werden kann. Strukturstudien für dieses System werden von großem Interesse sein, um zu sehen, wie sich die Helix- und Rückgrat-Geometrien an die Anwesenheit des Alkin-Linkers anpassen.

### 2.5. Vergrößerte Basenpaare, die durch andere Kräfte als Wasserstoffbrücken gebildet werden

Es wurde bereits gezeigt, dass auch hydrophobe Packungs- und Basenstapelungswechselwirkungen zwischen Nukleobasen in Abwesenheit von H-Brücken genutzt werden können, um die Bildung von Basenpaaren zu stabilisieren.<sup>[4,5,46]</sup> In diesem Zusammenhang entwarfen Romesberg und Mitarbeiter Nukleobasen – größer als Pyrimidine – die mit sich selbst oder mit anderen großen Partnern gepaart werden können, z.B. 7-Propinylisocarbostiryl:7-Propinylisocarbostiryl (PICS:PICS),<sup>[47]</sup> Azaindol:Azaindol (7AI:7AI) und 3-Methylnaphthalin:3-Methylnaphthalin (3MN:3MN; Abbildung 9).<sup>[48]</sup> PICS:PICS erwies sich als stabiler als natürliche Basenpaare und kann durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* effizient in DNA eingebaut werden. Dennoch beschränkt der natürliche DNA-Kontext, in dem diese untersucht wurden, die Möglichkeit solcher Basenpaare, größere Abmessungen anzunehmen. Strukturstudien zeigten auch, dass die großen Basen miteinander interkalieren und sich an die natürliche Helixgröße anpassen.<sup>[4,5]</sup>

Eine weitere neue Strategie für den Entwurf stabiler Basenpaare ist die metallvermittelte Paarung.<sup>[6]</sup> Wenn diese Basen größer als Pyrimidine sind, kann dies zu generell vergrößerten Basenpaaren führen. Ein gutes Beispiel hierfür ist



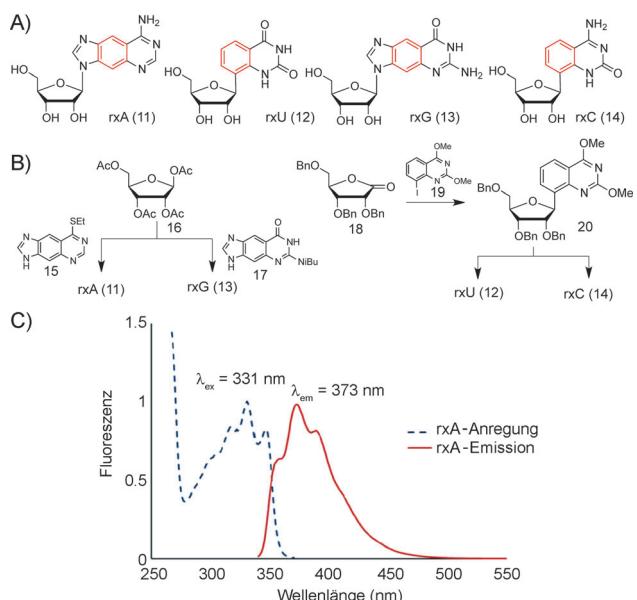
**Abbildung 9.** Die H-Brücken-freien Basenpaare PICS:PICS, 7AI:7AI, 3MN:3MN und PuP-Ni-PurP, die vergrößerte Basen enthalten.<sup>[47-49]</sup>

das Pyridylpurin-System Pur<sup>P</sup>-Ni<sup>2+</sup>-Pur<sup>P</sup>, dass von Switzer et al. entwickelt wurde (Abbildung 9).<sup>[49]</sup> Auch bei diesem wurde gezeigt, dass es stabiler ist als natürliche Basenpaare. Außerdem hatte es offensichtlich das Potential, die funktionelle Komponente eines ionenaktivierten Schalters zu bilden. Es gibt noch weitere Beispiele für solche H-Brücken-freien Basenpaare, deren Beschreibung den Rahmen dieses Kurzaufsatzes übersteigen würde; sie können in der entsprechenden Literatur gefunden werden.<sup>[50]</sup>

## 3. Vergrößerte RNA-Nukleoside (xRNA)

### 3.1. Benzo-Homologisierung von RNA

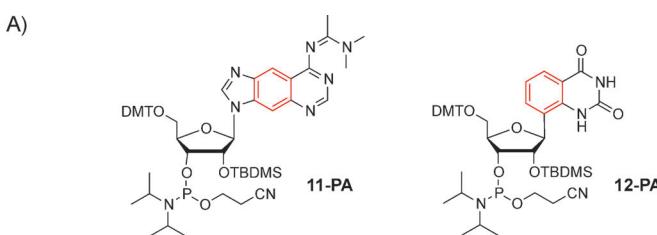
Im natürlichen genetischen System zeigt RNA andere biophysikalische und strukturelle Eigenschaften als DNA und spielt zudem auch andere biologische Rollen. Diese Erkenntnisse führten uns zu der Frage, ob auch eine vergrößerte Variante von RNA entwickelt werden könnte, woraufhin wir Synthesen und Untersuchungen von xRNA in unserem Labor durchführten.<sup>[51]</sup> Die photophysikalischen Eigenschaften dieser Moleküle, die effiziente Fluorophore sind, und ihre verstärkten Stapelungseigenschaften machen xRNAs für eine Vielzahl biochemischer Anwendungen hochinteressant (Abbildung 10), und sie werden bereits als biophysikalische und biologische Werkzeuge verwendet. Die zusätzliche OH-Gruppe der Ribose (im Vergleich zur Desoxyribose der DNA) bringt eigene Herausforderungen für die Synthese dieser Verbindungen mit sich (Abbildung 10B). Ein zusätzlicher wichtiger Punkt ist der Glykosylierungsschritt. Für die vergrößerten Purin-Derivate **rxA** (**11**)<sup>[10]</sup> und **rxG** (**13**) wird dieser Schritt mittels einer Kupplung entweder der Nukleobase **15** (synthetisiert in vier Stufen) oder der Nukleobase **17** (synthetisiert in fünf Stufen) an Tetraacetylribose **16** unter Vorbrüggen-Bedingungen<sup>[14]</sup> bewerkstelligt, gefolgt von weiteren Entschützungsschritten. Für die vergrößerten Pyridin-Nukleoside **rxU** (**12**) und **rxC** (**14**) wird die iodierte Verbindung **19** (synthetisiert in vier Stufen) an Ribonolacton **18** gekuppelt. Die folgenden Reaktionen werden mit verschiedenen Mengen der Lewis-Säure BBr<sub>3</sub> durchgeführt, um entweder zu **rxU** (**12**) oder zu **rxC** (**14**) zu gelangen (für Details siehe Lit. [51]). Für diese Moleküle wurden bereits photophysikalische Daten aufgenommen. So zeigt beispielsweise



**Abbildung 10.** A) Die xRNA-Nukleoside rxA, rxU, rxG und rxC. B) Syntheseschemata für diese Nukleoside. C) Absorptions- und Emissionspektrum von rxA. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [51].

Abbildung 10C ein Absorptions- und Emissionsspektrum von rxA (11).<sup>[51]</sup>

Diese xRNA-Nukleoside wurden auch in die entsprechenden Phosphoramidite für die Oligonukleotid-Festphasonsensynthese umgewandelt (Abbildung 11 A). Aufgrund der zusätzlichen OH-Gruppe ist die Herstellung der xRNA-Phosphoramidite wesentlich schwieriger als die der modifizierten xDNA-Phosphoramidite. Kürzlich wurden die Phos-



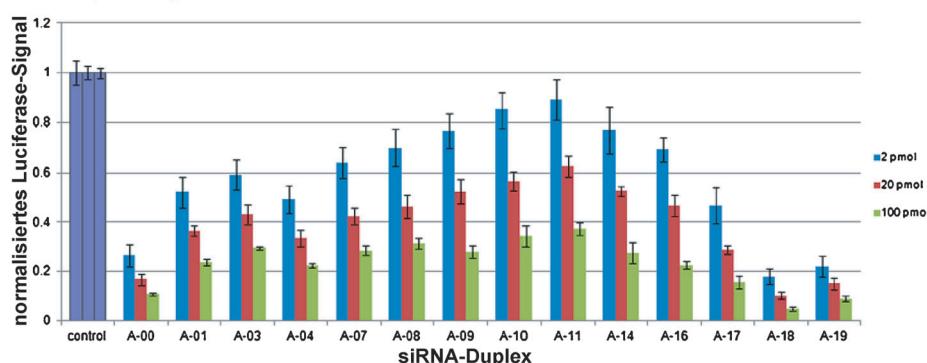
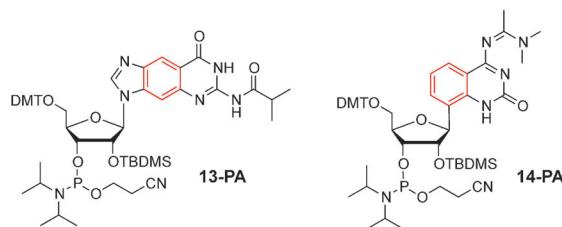
1. AS-00 5' - AGAACCAAUUUCGUGUAATT - 3'
2. AS-01 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
3. AS-03 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
4. AS-04 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
5. AS-07 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
6. AS-08 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
7. AS-09 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
8. AS-10 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
9. AS-11 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
10. AS-14 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
11. AS-16 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
12. AS-17 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
13. AS-18 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
14. AS-19 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
15. AS-xU3 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
16. AS-xA3 5' - **AGAACCAAUUUCGUGUAATT** - 3'
17. SS-U 3' - TTUCUUCGUUAAAGCACAUUU - 5'
18. SS-A 3' - TTACUUCGUUAAAGCACAUUU - 5'
19. SS-xU 3' - TT**ACUUCGUUAAAGCACAUUU** - 5'
20. SS-xA 3' - TT**ACUUCGUUAAAGCACAUUU** - 5'

phoramidite rxA-PA (11-PA) und rxU-PA (12-PA) von unserer Gruppe beschrieben,<sup>[52]</sup> während die Synthesen der anderen beiden (rxG-PA und rxC-PA) derzeit noch entwickelt werden.

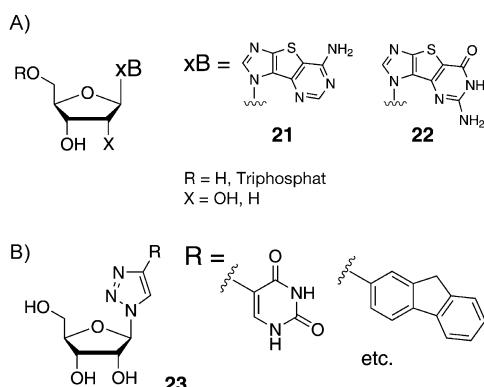
Oligonukleotide mit diesen xRNA-Nukleosiden wurden bereits als sterische Sonden für RNA-Interferenz-Experimente verwendet. Von diesem zellulären Pfad weiß man, dass es sich um eine wichtige Strategie für die Herabregulierung von spezifischen Genen in Zellen handelt.<sup>[53]</sup> Um die Effekte der sterischen Größe von siRNA auf die biologische Aktivität zu testen, wurden mehrere Sonden synthetisiert, die rxA oder rxU im Guide-Strang enthielten (Abbildung 11 B); dann wurde die so entstandene modifizierte RNA zur Herabregulierung des Luciferase-Gens in einem Dual-Reporter-Luciferase-Assay in HeLa-Zellen verwendet.<sup>[52]</sup> Während xRNA-Nukleobasen im Guide-Strang an einigen zentralen Positionen in der Nähe der Seed-Region die Aktivität reduzierten (offensichtlich aufgrund von ungünstigen sterischen Effekten), wurden sie am Ende gut toleriert. Am wichtigsten ist die Tatsache, dass Substitutionen in der Nähe des 3'-Endes die Aktivität über diejenige von Wildtyp-siRNA steigerten (Abbildung 11 B, rechts). Weitere Studien zeigten, dass xRNA-Substitutionen die siRNA gegen Abbau durch Nukleasen schützen und die Helizes thermisch stabilisieren. Hierbei wurde biologisch aktive siRNA mit bis zu drei aufeinanderfolgenden xRNA-Basen beschrieben.

### 3.2. Weitere Beispiele für gestreckte Ribonukleoside

Seley-Radke et al. beschrieben den Entwurf, die Synthese und erste Experimente zu den biologischen Aktivitäten einiger Purin-Nukleoside, die um einen Heterocyclus erweitert



**Abbildung 11.** A) Strukturen der xRNA-Phosphoramidite rxA (11-PA), rxU (12-PA), rxG (13-PA) und rxC (14-PA). B) Doppelsträngige RNA-Sonden mit xRNA-Basen für RNA-Interferenz-Experimente und Ergebnisse der RNAi-Luciferaseaktivitätsassays mit siRNAs, die die xRNA-Nukleoside enthalten. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [52].



**Abbildung 12.** A) Die von Seley-Radtke et al. beschriebenen Thieno-gestreckten Purin-Nukleoside.<sup>[54]</sup> B) Die von Hudson et al. beschriebenen Klick-Fleximere.<sup>[55]</sup>

waren (21, 22, Abbildung 12 A).<sup>[54]</sup> Diese Thieno-gestreckten Purin-Nukleoside wurden bezüglich ihrer Nukleinsäurestruktur und -funktion untersucht, und es wurde gezeigt, dass die Rd-RNA-Polymerase die entsprechenden nichtnatürlichen Triphosphate leicht erkennt. Dabei zeigten verschiedene Enzyme beachtliche Unterschiede in Bezug auf deren Erkennung. Außerdem wurde gezeigt, dass der Einbau von nichtnatürlichen Basen wie z. B. einer getreckten Thienylimidazol-substituierten Nukleobase in Aptamere zu Aptameren mit verstärkten Affinitäten zu Zielproteinen wie z. B. zellulären Wachstumsfaktoren führen kann.<sup>[55]</sup>

Hudson et al. beschrieben die Synthese von Nukleosid-Analoga mit 4-(5-Pyrimidinyl)-1,2,3-triazolen als vergrößerte Nukleobasen-Mimetika (23, Abbildung 12 B)<sup>[56,57]</sup> mittels einer Azid-Alkin-Huisgen-Cycloaddition<sup>[58]</sup> zwischen dem entsprechenden Ribosylazid und einer Vielzahl von 5-Alkinylpyrimidinen. Es wurde gezeigt, dass die Heterocyclen der ungebundenen Nukleobase coplanare Anordnung bevorzugen und dass das anti-glykosidische Konformer begünstigt wird. Diese vergrößerten Modelle wurde allerdings noch nicht in oligomerer Form beschrieben.

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

Künstliche genetische Sets, die vergrößerte Basenpaare enthalten, haben die Möglichkeit aufgezeigt, in vielerlei Hinsicht – wenn nicht sogar komplett – so zu funktionieren, wie die natürlichen genetischen Systeme. Vom chemischen Standpunkt ist ein genetisches, auf Basenpaarung basierendes Konzept nicht zwangsläufig auf die Größe der natürlichen DNA-Helix limitiert, die sich im Zuge der Evolution für die lebenden Systeme auf der Erde entwickelt hat.

Trotz aller Fortschritte liegen noch viele interessante Herausforderungen vor uns, die es mit vergrößerten genetischen Sets zu untersuchen gilt. Die fundamentale Wissenschaft der chemischen Evolution ruft hierbei noch viele Fragen hervor. So ist beispielsweise die Rolle der  $pK_a$ -Werte und der Tautomerisierung der Nukleobasen im Hinblick auf die vergrößerten Basenpaare und auf den Effekt der Unterscheidung von Fehlpaarungen von fortlaufendem Interesse.<sup>[59]</sup> Da vergrößerte Basenpaare offensichtlich stabile Helizes

bilden können, wird die Implikation für die stattgefundene Purin-Pyrimidin-Selektion der Natur im Detail diskutiert werden müssen.

Außerdem verbleiben noch strukturelle und funktionale Fragen. Beispielsweise wurden einige der oben erwähnten vergrößerten Basenpaarsysteme noch nicht strukturell im Gesamtzusammenhang einer Helix studiert, und es wird interessant sein zu sehen, wie sich das helikale Rückgrat an die nicht-kanonischen Paargeometrien anpasst. Außerdem ist noch nicht bekannt, wo die Größenlimits bei vergrößerten Basenpaarsystemen liegen. Da die Naphtho-homologisierten Basenpaare selbstassoziiieren, kommt die Frage auf, ob noch größere derartige Systeme möglich sein könnten. Abgesehen von der Struktur bleibt natürlich auch die Funktion entsprechend wichtig. So gesehen wird die Entwicklung effizienter replizierender Enzyme für die vergrößerten Systeme von hohem Interesse sein, da dies den Forschern ermöglichen wird, längere Sequenzen aneinanderzulagern als sie mittels DNA-Synthesizer erzeugt werden können. Der Zugang zu längeren vergrößerten DNA-Strängen zeigt die interessante Möglichkeit auf, deren Stabilität, Festigkeit und eventuell Leitfähigkeit für selbst-assemblierende Nanostrukturen zu nutzen. Außerdem ergibt sich aus der Fähigkeit, diese Systeme zu amplifizieren, die Möglichkeit der Selektion und Evolution von derartigen genetischen Sets. Zuletzt verbleiben noch viele biologische Anwendungen zu untersuchen; insbesondere sind wir hierbei an der Durchführung weiterer biochemischer und biologischer Studien mit vergrößerten RNAs interessiert, um zu sehen, ob diese analog zu natürlichen RNAs funktionieren, die in der Natur nicht nur genetische Information tragen, sondern in den Zellen auch als Liganden, Schalter und Enzyme wirken.

Die chemische Erweiterung der natürlichen Nukleosid-Architekturen stellt Werkzeuge für die Untersuchung von fundamentalen biochemischen Prozessen auf der Erde zur Verfügung. Dies erlaubt es uns, viel über die Lebensprozesse zu lernen, die sich in der Natur mit bewundernswerter Prägnanz und Komplexität entwickelt haben. Außerdem sind die Konzepte von neuen genetischen Systemen für die Entwicklung von modifizierten lebenden Systemen für die synthetische Biologie relevant, sowie für die Untersuchung der „Realisierbarkeit“ von alternativen Lebensformen, was insbesondere dann interessant wird, sollte irgendwann außerirdisches Leben entdeckt werden.

M.W. dankt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für ein Postdoktorandenstipendium. E.T.K. dankt den U.S. National Institutes of Health (GM063587, GM072705).

Eingegangen am 19. Juni 2013  
Online veröffentlicht am 7. November 2013

[1] S. A. Benner, *Nature* **2003**, *421*, 118; E. T. Kool, M. L. Waters, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 70–73; A. S. Khalil, J. J. Collins, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 367–379.

[2] Übersichtsartikel: T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Müller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner,

- Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7220–7242; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7110–7131.
- [3] J. Chiba, M. Inouye, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 259–282; A. T. Krueger, E. T. Kool, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 588–594.
- [4] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1046–1068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990–1009.
- [5] I. Hirao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 622–627; A. A. Henry, F. E. Romesberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 727–733.
- [6] G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6340–6350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226–6236; K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 190–195; E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715; H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375–3376.
- [7] S. A. Benner, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 784–797; für Studien zur Paarung von Nukleobasen in erweiterten Watson-Crick-ähnlichen genetischen Systemen siehe z. B. C. R. Geyer, T. R. Battersby, S. A. Benner, *Structure* **2003**, *11*, 1485–1498.
- [8] A. T. Krueger, E. T. Kool, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 242–248.
- [9] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964–967.
- [10] N. J. Leonard, F. Kaźmierczak, A. Rykowski, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2933–2935; N. J. Leonard, G. E. Keyser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 4262–4264; D. I. C. Scopes, J. R. Barrio, N. J. Leonard, *Science* **1977**, *195*, 296–298; N. J. Leonard, A. G. Morrice, M. A. Sprecker, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 356–363.
- [11] R. A. Lessor, K. J. Gibson, N. J. Leonard, *Biochemistry* **1984**, *23*, 3868–3873.
- [12] H. Liu, J. Gao, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 639–647; H. Liu, J. Gao, L. Maynard, Y. D. Saito, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1102–1109; H. Liu, J. Gao, S. R. Lynch, Y. D. Saito, L. Maynard, E. T. Kool, *Science* **2003**, *302*, 868–871; für einen anderen Synthesezugang zu Pyridin-gestreckten 2'-Desoxynukleosiden, allerdings ohne Basenpaarung, siehe auch R. Clayton, M. L. Davis, W. Fraser, W. Li, C. A. Ramsden, *Synlett* **2002**, *9*, 1483–1486.
- [13] R. F. Heck, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5531–5534.
- [14] H. Vorbrüggen, G. Höfle, *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1256–1268.
- [15] A. T. Krueger, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3989–3999; J. N. Wilson, E. T. Kool, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4265–4274.
- [16] D. Varsano, A. Garbesi, R. Di Felice, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 14012–14021.
- [17] T. L. McConnell, S. D. Wetmore, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2999–3009.
- [18] M. Fuentes-Cabrera, X. Zhao, P. R. C. Kent, B. G. Sumpter, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9057–9061.
- [19] L. Zhang, T. Ren, X. Yang, L. Zhou, X. Li, *Int. J. Quantum Chem.* **2013**, DOI: 10.1002/qua.24436.
- [20] O. Huertas, J. Poater, M. Fuentes-Cabrera, M. Orozco, M. Solà, F. J. Luque, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 12249–12258.
- [21] J. Gao, H. Liu, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11826–11831.
- [22] H. Liu, J. Gao, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1396–1402; S. R. Lynch, H. Liu, J. Gao, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14704–14711.
- [23] J. R. Blas, O. Huertas, C. Tabares, B. G. Sumpter, M. Fuentes-Cabrera, M. Orozco, P. Ordejón, F. J. Luque, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 11344–11354.
- [24] H. Lu, K. He, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5958–5960; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5834–5836.
- [25] H. Lu, A. T. Krueger, J. Gao, H. Liu, E. T. Kool, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2704–2710.
- [26] A. T. Krueger, H. Lu, T. Hojland, H. Liu, J. Gao, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **2008**, *52*, 233–234.
- [27] J. C. Delaney, J. Gao, H. Liu, N. Shrivastav, J. M. Essigmann, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4594–4597; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4524–4527.
- [28] A. T. Krueger, L. W. Peterson, J. Chelliserry, D. J. Kleinbaum, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18447–18451.
- [29] H. Lu, S. R. Lynch, A. H. F. Lee, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2530–2538; H. Lu, K. He, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5958–5960; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5834–5836.
- [30] J. Chelliserrykattil, H. Lu, A. H. F. Lee, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2976–2980.
- [31] A. H. F. Lee, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9219–9230.
- [32] P. Sharma, L. A. Lait, S. D. Wetmore, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 2435–2448.
- [33] L. Zhang, T. Ren, *Int. J. Quantum Chem.* **2013**, *113*, 1225–1233.
- [34] G. Wächtershäuser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1134–1135.
- [35] a) J. Stombaugh, C. L. Zirbel, E. Westhof, N. B. Leontis, *Nucleic Acid Res.* **2009**, *37*, 2294–2312; b) U. Nagaswamy, N. Voss, Z. Zhang, G. E. Fox, *Nucleic Acid Res.* **2000**, *28*, 375–376.
- [36] C. R. Geyer, T. R. Battersby, S. A. Benner, *Structure* **2003**, *11*, 1485–1498.
- [37] E. M. Evertsz, K. Rippe, T. M. Jovin, *Nucleic Acid Res.* **1994**, *22*, 3293–3303.
- [38] B. D. Heuberger, C. Switzer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2779–2783.
- [39] R. Buckley, C. D. Enekwa, L. D. Williams, N. V. Hud, *Chem-BioChem* **2011**, *12*, 2155–2158.
- [40] T. R. Battersby, M. Albalos, M. J. Friesenhahn, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 525–531.
- [41] a) F. Seela, A. Melenewski, C. Wei, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2173–2176; b) K. Groebke, J. Hunziker, W. Fraser, L. Peng, U. Diederichsen, K. Zimmermann, A. Holzner, C. Lehmann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 375–474; c) F. Seela, C. Wei, A. Malenewski, E. Feiling, *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 2045–2052.
- [42] N. Minakawa, N. Kojima, S. Hikishima, T. Sasaki, A. Kiyosue, N. Atsumi, Y. Ueno, A. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9970–9982.
- [43] S. Hikishima, N. Minakawa, K. Kuramoto, Y. Fujisawa, M. Ogawa, A. Matsuda, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 602–604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 596–598.
- [44] N. Minakawa, S. Ogata, M. Takahashi, A. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1644–1645.
- [45] Y. Doi, J. Chiba, T. Morikawa, M. Inouye, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8762–8768.
- [46] E. T. Kool, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 602–608; K. M. Guckian, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2942–2945; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2825–2828.
- [47] D. L. McMinn, A. K. Ogawa, Y. Wu, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11585–11586.
- [48] A. K. Ogawa, Y. Wu, D. L. McMinn, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3274–3287.
- [49] C. Switzer, S. Sinha, P. H. Kim, B. D. Heuberger, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1553–1556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1529–1532.
- [50] T. Lavergne, M. Degardin, D. A. Malyshev, H. T. Quach, K. Dhami, P. Ordoukhalian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5408–5419; J. M. Walsh, P. J. Beuning, *J. Nucl. Acids* **2012**, ID 530963; L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2002**, 1–11.
- [51] A. R. Hernández, E. T. Kool, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 676–679.
- [52] A. R. Hernández, L. W. Peterson, E. T. Kool, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1454–1461.
- [53] G. Meister, T. Tuschl, *Nature* **2004**, *431*, 343–349; D. M. Dykhoorn, C. D. Novina, P. A. Sharp, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 457–467.

- [54] K. L. Seley-Radtke, Z. Zhang, O. R. Wauchope, S. C. Zimmermann, A. Ivanov, B. Korba, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 635–636.
- [55] M. Kimoto, R. Yamashige, K.-i. Matsunaga, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 453–458.
- [56] A. H. St. Amant, L. A. Bean, J. P. Guthrie, R. H. E. Hudson, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6521–6525.
- [57] Für die erste Beschreibung derartiger „Fleximere“ siehe: K. L. Seley, L. Zhang, A. Hagos, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3209–3210; K. L. Seley, L. Zhang, A. Hagos, S. Quirk, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3365–3373.
- [58] R. Huisgen in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Hrsg.: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, S. 1–176; R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357–396.
- [59] R. Krishnamurthy, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2035–2044.