

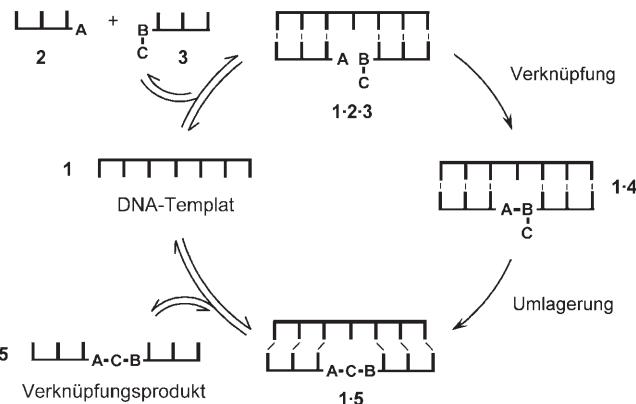
Verringerung der Produkthemmung bei DNA-templatkontrollierten Verknüpfungsreaktionen**

Christian Dose, Simon Ficht und Oliver Seitz*

Templatkontrollierte chemische Reaktionen zeigen Eigenschaften, die für enzymatische Reaktionen typisch sind.^[1] Das Binden von Reaktanten ordnet reaktive Gruppen in räumlicher Nähe an, sodass Reaktionen, die ohne Templat mit geringer Effizienz verlaufen, erleichtert werden. Die templatkontrollierte Synthese wurde in der Nucleinsäurechemie vielfach für den Aufbau von Architekturen im Nanometermaßstab,^[2] für die Kodierung von Bibliotheken amplifizierbarer kleiner Moleküle,^[3] in Studien über die molekularen Mechanismen der Evolution,^[4] für die Freisetzung von Wirkstoffen^[5] und in diagnostischen Ansätzen zum Nachweis des Vorhandenseins eines Nucleinsäuretemplates verwendet.^[6] Anders als bei enzymatischen Reaktionen, insbesondere bei Verknüpfungsreaktionen, wird in templatkontrollierten Reaktionen nur selten ein katalytischer Umsatz erreicht, da das Produkt üblicherweise stärker an das Templat bindet als die Reaktanten.^[7] Aus diesem Grund werden stöchiometrische Mengen des Templates benötigt, was besonders für Studien zur chemischen Evolution und in der DNA/RNA-Detektion von Bedeutung ist. Wir stellen hier eine möglicherweise universelle Methode zur Verringerung der Produkthemmung in templatkontrollierten Verknüpfungsreaktionen vor. Es wird gezeigt, dass eine der Verknüpfung nachgeschaltete Umlagerung die Templataffinität des zunächst gebildeten Verknüpfungsprodukts senkt und damit eine katalytische Reaktionsführung erleichtert.

Wir erkundeten templatkontrollierte Verknüpfungsreaktionen als eine der leistungsfähigsten Methoden zur sequenzspezifischen DNA-Detektion.^[6a-c] Chemische Verknüpfungsmethoden können eine ausgesuchte DNA von ihrer Einzelbasenmutante mit einem 10³fachen Unterschied bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeiten diskriminieren.^[6c] Konventionelle Methoden der chemischen Oligonucleotidverknüpfung liefern nur ein Äquivalent Verknüpfungsprodukt pro Mol DNA-Analyt. Eine Verstärkung des Produktsignals, d.h. mehr als ein Produktmolekül pro Templatäquivalenter, wäre daher wünschenswert, vor allem falls die zu detektierende DNA oder RNA in geringer Konzentration vorliegt. Für die Sicherstellung ihrer Einzigartigkeit muss die nachzuweisende Sequenz üblicherweise mindestens 16 Nucleotide umfassen.^[8] Ein Problem für das Design einer katalytisch ablaufenden Verknüpfung ist die hohe Zahl der kooperativ gebildeten Watson-Crick-Basenpaare. Dabei ist die Herausforderung, die DNA-Affinität des Verknüpfungsprodukts zu senken, ohne die Affinität der Reaktanten zum Templat oder die Reaktion selbst zu beeinflussen. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Einführung von flexiblen Linkern an der Verknüpfungsstelle hilft, die Produkthemmung zu verringern.^[7a] Als eine möglicherweise universell anwendbare Lösung für das Problem der Produkthemmung in DNA-kontrollierten Reaktionen schlagen wir eine zweistufige Verknüpfungs-Umlagerungs-Sequenz vor (Schema 1).

Templatkontrollierte chemische Reaktionen zeigen Eigenschaften, die für enzymatische Reaktionen typisch sind.^[1] Das Binden von Reaktanten ordnet reaktive Gruppen in räumlicher Nähe an, sodass Reaktionen, die ohne Templat mit geringer Effizienz verlaufen, erleichtert werden. Die templatkontrollierte Synthese wurde in der Nucleinsäurechemie vielfach für den Aufbau von Architekturen im Nanometermaßstab,^[2] für die Kodierung von Bibliotheken amplifizierbarer kleiner Moleküle,^[3] in Studien über die molekularen Mechanismen der Evolution,^[4] für die Freisetzung von Wirkstoffen^[5] und in diagnostischen Ansätzen zum Nachweis des Vorhandenseins eines Nucleinsäuretemplates verwendet.^[6] Anders als bei enzymatischen Reaktionen, insbesondere bei Verknüpfungsreaktionen, wird in templatkontrollierten Reaktionen nur selten ein katalytischer Umsatz erreicht, da das Produkt üblicherweise stärker an das Templat bindet als die Reaktanten.^[7] Aus diesem Grund werden stöchiometrische Mengen des Templates benötigt, was besonders für Studien zur chemischen Evolution und in der DNA/RNA-Detektion von Bedeutung ist. Wir stellen hier eine möglicherweise universelle Methode zur Verringerung der Produkthemmung in templatkontrollierten Verknüpfungsreaktionen vor. Es wird gezeigt, dass eine der Verknüpfung nachgeschaltete Umlagerung die Templataffinität des zunächst gebildeten Verknüpfungsprodukts senkt und damit eine katalytische Reaktionsführung erleichtert.



Schema 1. Verknüpfungs-Umlagerungs-Sequenz zur Reduktion der Produkthemmung in templatkontrollierten Verknüpfungsreaktionen.

Diesem Konzept folgend, würde durch Hybridisierung die Bildung des Verknüpfungsintermediats **1-4** ausgelöst. Wirstellten uns vor, dass eine spontan verlaufende Umlagerung die Kettenlänge des Rückgrats ändert und damit die Templataffinität des Umlagerungsprodukts **5** reduziert. Als Resultat wird die Dissoziation des Produkt-Templat-Duplex **1-5** erleichtert, und das freigesetzte Templat **1** könnte für einen weiteren Katalyzyklus zur Verfügung stehen. Zur Erhöhung der Sequenzspezifität und als zusätzliche Maßnahme zur Verringerung der Templataffinität des Verknüpfungsprodukts war geplant, die Verknüpfung gegenüber einer nichtpaaren Nucleobase stattfinden zu lassen.^[6c]

Kürzlich stellten wir die native chemische PNA-Verknüpfung („native chemical PNA ligation“; PNA = Peptid-nucleinsäure) vor,^[6b] eine besonders schnelle und selektive Reaktion,^[9] die über eine Verknüpfungs-Umlagerungs-Sequenz verläuft. Beim Design einer Verknüpfungsarchitektur, die eine Dissoziation des Produkt-Templat-Duplex erleichtern könnte, wurden Studien von Egholm und Buchardt berücksichtigt. Diese zeigten, dass die Verlängerung des Amidoethylglycin-Rückgrats in einer PNA um eine CH₂-Gruppe zu einer Destabilisierung des entsprechenden PNA-DNA-Duplex führt.^[10] Wir vermuteten, dass der korrekte Abstand zwischen den Nucleobasen nicht nur bei nahtlosen Basen-

[*] Dipl.-Ing. C. Dose, Dr. S. Ficht, Prof. Dr. O. Seitz

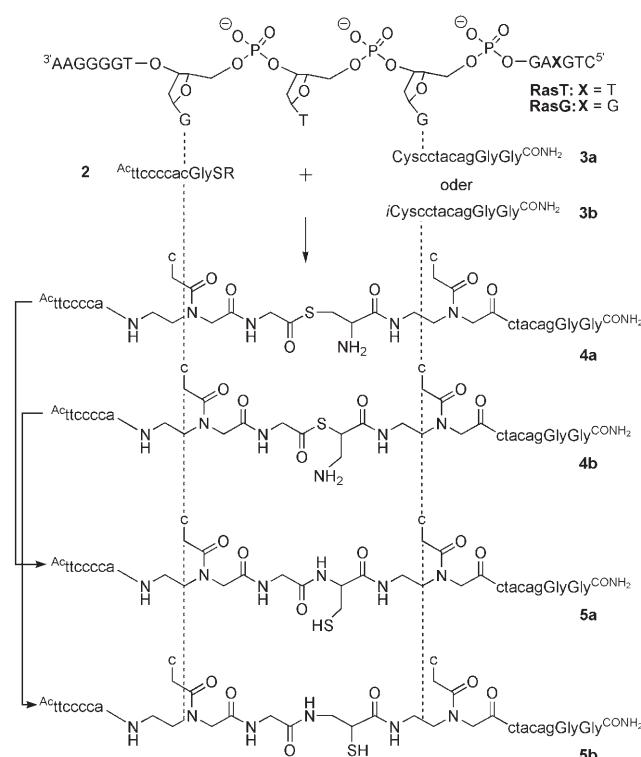
Institut für Chemie
Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7266
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

[**] Dieses Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Schering AG finanziell unterstützt. S. Ficht dankt der Regierung des Großherzogtums Luxemburg für ein Dissertationsstipendium.

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

paarungen (6 σ -Bindungen) benötigt würde, sondern auch bei Hybridisierungen, die eine Basenlücke enthalten (12 σ -Bindungen). In der Tat übertraf die Schmelztemperatur $T_M = 58^\circ\text{C}$ eines PNA-DNA-Duplex mit einer Glycin-Glycin-Einheit (Abstand zwischen den Nucleobasen = 12 σ -Bindungen) als Basenlückenanalogen die Schmelztemperatur von $T_M = 55^\circ\text{C}$, die für den Duplex mit einer Glycin- β -Alanin-Einheit (Abstand zwischen den Nucleobasen = 13 σ -Bindungen) gemessen wurde (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).

Bei der zuvor beschriebenen nativen chemischen PNA-Verknüpfung des PNA-Glycinthioesters **2** mit der Cys-PNA **3a** wird das Thioesterintermediat **4a** gebildet (Schema 2).^[6b]



Schema 2. Cys- und iCys-vermittelte chemische PNA-Verknüpfung an DNA-Templaten ($R = \text{Bn}$ ($\text{Bn} = \text{Benzyl}$) oder $(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{Na}$, $\text{Ac} = \text{Acyl}$).

Eine anschließende S→N-Acylierung führt zu einer Kontraktion der Hauptkette, wodurch die Nucleobasen im Produkt **5a** vermutlich in einem günstigeren Abstand von 12 σ -Bindungen positioniert werden als im Intermediat **4a** (Nucleobasenabstand = 13 σ -Bindungen). Für eine Verringerung der Produkthemmung wurde die Reaktion von Thioester **2** mit der Isocystein(iCys)-PNA **3b** in Erwägung gezo- gen. In iCys-PNA **3b** sind die Positionen der Thiol- und der Aminogruppe vertauscht.^[11] Demnach verläuft die Isocystein-vermittelte Verknüpfung über eine Erweiterung der Hauptkette, und im Endprodukt **5b** sind die Basen in einem Abstand von 13 σ -Bindungen angeordnet. Das Endprodukt **5b** sollte daher weniger stark an das DNA-Templat binden als das Thioesterintermediat **4b**.

Zur Evaluierung des Konzepts wurden die Affinitäten von PNA-Sonden, die spezifisch an die karzinogene G12V-Mutation eines 16meren *ras*-Gensegments binden, abge-

schätzt. T_M -Analysen bestätigten, dass PNA-DNA-Duplexe, die das Endprodukt **5b** der iCys-vermittelten Verknüpfung enthielten ($T_M = 53^\circ\text{C}$) weniger stabil waren als Duplexe, in denen das Produkt **5a** der nativen chemischen Verknüpfung über Cystein ($T_M = 57^\circ\text{C}$) enthalten war. Als nächstes wurde die templatunabhängige Reaktion von Cys-PNA **3a** und iCys-PNA **3b** mit PNA-Glycinthioester **2** unter den Bedingungen der bimolekularen nativen chemischen Verknüpfung untersucht. Bei 100 μM Konzentration verliefen Cys- und iCys-vermittelte Verknüpfung reibungslos und lieferten nach 6.5 h Produkt **5a** in 77% bzw. **5b** in 49% Ausbeute. (Abbildung 1a). Der Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten offenbarte, dass die templatunabhängige bimolekulare iCys-vermittelte PNA-Verknüpfung 4.4fach langsamer verlief als die entsprechende Cys-vermittelte Reaktion. Bei 1 μM Sondenkonzentration war die bimolekulare Verknüpfung äußerst langsam (Tabelle S3 in den Hintergrundinformationen). Interessanterweise reagierten die Cys- und iCys-PNA in Gegenwart des komplementären DNA-Templats **RasT** gleich schnell (Abbildung 1b). In beiden Fällen führte die Zugabe von 1 μM Templat **RasT** zu einer drastischen Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, sodass **5a** und **5b** nach einer Reaktionszeit von 90 s in einer Ausbeute von 20% gebildet

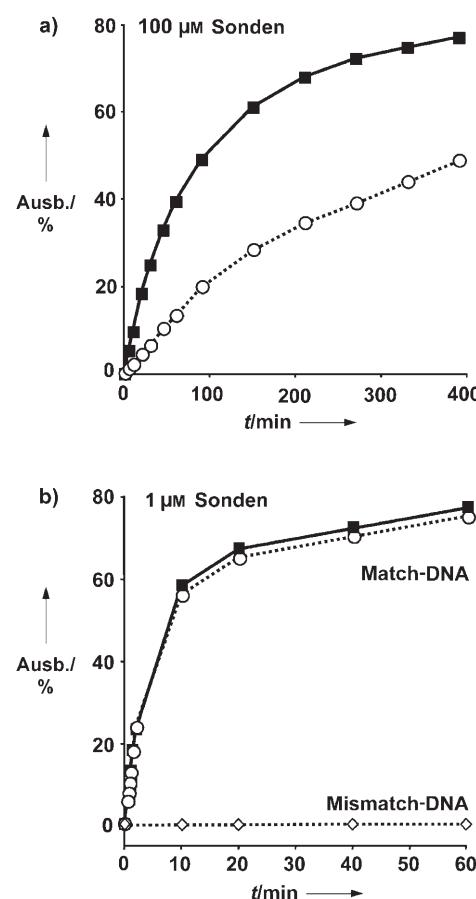


Abbildung 1. Zeitlicher Verlauf der Cys- (■) und iCys-vermittelten (○) PNA-Verknüpfung bei a) 100 μM **2** und **3** (100 mM Na_2HPO_4 , ges. BnSH , pH 7.4, 25 °C) und b) bei 1 μM **2** und **3** an komplementärer DNA **RasT** oder einzelbasenfehlpaarernder einzelsträngiger DNA **RasG** (◊, nur die iCys-vermittelte Verknüpfung ist dargestellt, 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaCl , ges. BnSH , pH 7.4, 25 °C).

wurden (scheinbare Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung $k_{app} = 2.470 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Durch Verwendung von Mercaptoethansulfonat konnten noch stärkere Beschleunigungen beobachtet werden ($k_{app} = 10.820 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$), sodass die Ausbeute nach 5 min Reaktionszeit bereits 75 % betrug (Ergebnisse nicht gezeigt). Demnach ist die Geschwindigkeit der Cys- und der iCys-vermittelten PNA-Verknüpfung deutlich höher als die alternativer sequenzspezifischer Reaktionen^[6d-i] und liegt in der Größenordnung der schnellsten DNA-templatkontrollierten Reaktionen.^[12]

Die iCys-Verknüpfung verläuft mit derselben hohen Sequenzselektivität (3450fach niedrigere Anfangsgeschwindigkeit an der einzelbasenfehlpaarenden DNA **RasT** als an **RasT**) wie die Cys-Verknüpfung (Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen).^[6c] Man kann daraus schließen, dass die Verwendung von iCys anstelle von Cys in der nativen chemischen PNA-Verknüpfung die templatunabhängige Hintergrundreaktion verlangsamt, ohne jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit und die Sequenzselektivität der templatkontrollierten Reaktion zu beeinträchtigen.

Die oben beschriebenen Eigenschaften der iCys-vermittelten Verknüpfung schienen für eine katalytische Reaktionsführung nützlich. Zur Ermittlung der Turnover-Zahlen (TO) wurden die Cys- und iCys-Verknüpfungen bei unterschiedlichen Templat/Sonden-Verhältnissen ermittelt. Um sicherzustellen, dass die ermittelten Ausbeuten ausschließlich aus templatabhängigen Reaktionen resultierten, wurden die Ausbeuten der Reaktionen in Abwesenheit der Ziel-DNA **RasT** subtrahiert. Es wurde erwartet, dass ein im Verhältnis zum Templat großer Überschuss an Verknüpfungssonden die Verdrängung des Verknüpfungsprodukts fördert. Tatsächlich wurden bei kleinen Templat/Sonden-Verhältnissen signifikante Turnover-Zahlen erhalten (Abbildung 2). So lieferte beispielsweise die iCys-Verknüpfung bei 1 μM Sondenkonzentration und 10 nm DNA-Konzentration TO = 3.5, was bei 0.1 nm DNA-Konzentration bis auf TO = 43 gesteigert werden konnte. Durch Erhöhung der Konzentration der Verknüpfungssonden konnten die Turnover-Zahlen bei jedem Templat/Sonden-Verhältnis weiter erhöht werden. Zum Beispiel ergab die Cys-Verknüpfung bei 1 μM Konzentration 14 Produktäquivalente pro Templatäquivalent, während bei 5 μM oder 10 μM Sondenkonzentration 42 bzw. 51 Produktäquivalente gebildet wurden. Am bemerkenswertesten war jedoch die Beobachtung, dass die iCys-vermittelte chemische Verknüpfung in allen Fällen höhere Turnover-Zahlen als die Cys-vermittelte Reaktion lieferte. Die iCys-Verknüpfung ergab bei 10 μM Verknüpfungssonden und 1 nm Ziel-DNA mit TO = 226 die höchste Signalverstärkung und ermöglichte damit höhere Turnover-Zahlen als für alternative Methoden berichtet (siehe unten).^[7]

Der Ersatz von Cys durch iCys beeinträchtigt die Stabilität der Sonden-DNA-Komplexe nicht. Beide Duplexe **3a-RasT** und **3b-RasT** dissoziieren bei $T_m = 38^\circ\text{C}$. Die deutliche Zunahme der Turnover-Zahlen, die bei der Isocysteinverknüpfung beobachtet wurde, muss demnach das Resultat der subtilen Änderung der Verknüpfungsarchitektur sein. Die Geschwindigkeitsverringerung der bimolekularen iCys-Reaktion wird vermutlich durch die geringere Nucleophilie der Thiolgruppe in iCys als in Cys hervorgerufen. Allerdings

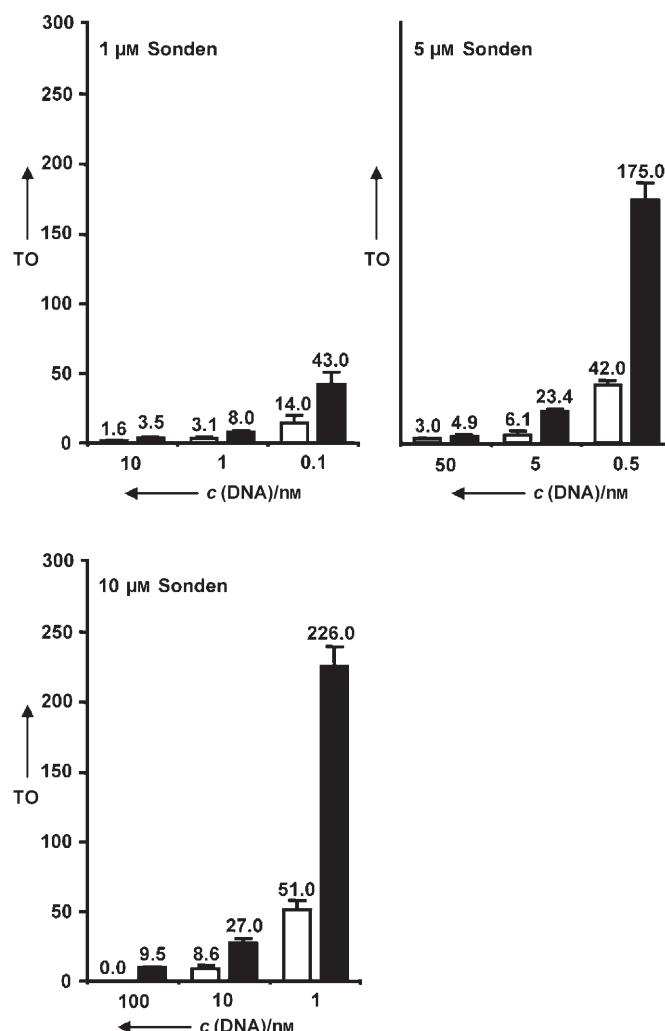


Abbildung 2. Turnover-Zahlen der Cys- (weiß) und iCys-vermittelten (schwarz) PNA-Verknüpfungen (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 10 mM Mercaptoethansulfonsäure (MESNA), pH 7.4, 25 °C, 24 h).

scheinen Templateffekte die verminderte iCys-Reaktivität kompensieren zu können, wie die identischen Reaktionsgeschwindigkeiten der DNA-vermittelten iCys- und Cys-Verknüpfung verdeutlichen.^[13] Als Folge dieses Templateffekts verläuft die DNA-vermittelte iCys-Verknüpfung 43 000fach schneller als die templatunabhängige Reaktion, während die Cys-Verknüpfung lediglich eine 10 000fache Reaktionsbeschleunigung erfährt (Tabelle S3 in den Hintergrundinformationen). Die geringere DNA-Affinität des iCys-Verknüpfungsprodukts deutet darauf hin, dass die erhöhte Flexibilität, die aus der kettenverlängernden Umlagerung resultiert, die katalytische Wirksamkeit des Templat fördert.

Die Produktsignale wurden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie quantifiziert, was die präzise Analyse der Reaktionspfade erleichterte. Auf Fluoreszenzdetektion basierende Methoden ermöglichen Echtzeitmessungen und bieten daher Vorteile bei der Handhabung und Detektionsgeschwindigkeit.^[16] Wir schätzten, dass eine Methode, in der resonanter Fluoreszenzenergietransfer (FRET) zwischen 6-Carboxyfluorescein (FAM) in PNA-Glycinthioester **6** und 5-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) in iCys-PNA **7** ge-

nutzt würde, eine spezifische Detektion des gebildeten Produkts ermöglichen sollte.^[14] Die HPLC-Analyse dokumentierte, dass die Verknüpfung nach 60 min an komplementärer DNA **Ras2T** eine Ausbeute von 52 % und am einzelbasenfehlpaarenden Templat **Ras2G** eine Ausbeute von weniger als 1 % ergab (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Die gleiche Verknüpfungsreaktion wurde in Echtzeit fluoreszenzspektrometrisch verfolgt (Anregung bei 470 nm). Abbildung 3 a zeigt, dass das Fluoreszenzspektrum der Sonden **6** und **7** in Abwesenheit des Templaats durch die FAM-Emission bei 523 nm dominiert wird. Die Zugabe von Templat **Ras2T** löste die Verknüpfung aus und bewirkte eine deutliche Veränderung des Fluoreszenzspektrums, die durch einen Anstieg der TAMRA-Emission (585 nm) und eine Abnahme der FAM-Emission (523 nm) charakterisiert war. Die T_m -Analysen der Duplexe **6-Ras2T** ($T_m = 38^\circ\text{C}$) und **7-Ras2T** ($T_m = 36^\circ\text{C}$) bestätigten, dass bei 25°C beide PNA-

Sonden am Templat gebunden waren. Erwähnenswert ist, dass die benachbarte Hybridisierung von Sonden, die nicht miteinander verknüpft werden können, eine deutlich geringere Fluoreszenzänderung hervorrief (Abbildung 3a). Die Produktbildung kann entweder durch Betrachtung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten F_{585}/F_{523} oder durch direkte Beobachtung der TAMRA-Emission bei 585 nm verfolgt werden (Abbildung 3b,c). Beide Methoden liefern ein positives Signal und bleiben im Unterschied zu anderen Methoden, die auf die Verwendung einer fluoreszenzlöschenden Abgangsgruppe angewiesen sind, von Hydrolyse unbeeinflusst. Die Sequenzselektivität der fluoreszenzüberwachten Verknüpfung war hoch. Die aus dem Anstieg von F_{585}/F_{523} ermittelte Anfangsgeschwindigkeit zeigte, dass die Reaktion bei 25°C am perfekt komplementären Templat **Ras2T** 127fach schneller verlief als am einzelbasenfehlpaarenden Templat **Ras2G**. Eine perfekte Selektivität wurde bei 37°C erhalten. Hier konnte durch Verfolgung der TAMRA-Emission nachgewiesen werden, dass an **Ras2G** kein Verknüpfungsprodukt gebildet wird (Abbildung 3c).

Die vorgelegten Ergebnisse attestieren der DNA-templatkontrollierten *iCys*-Verknüpfung eine hohe Einzelbasenselektivität (3450:1), Geschwindigkeit ($k_{app} = 10.820 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$) und Reaktionsbeschleunigung (43 000fach). Außerdem demonstrierten wir eine Signalverstärkung ($\text{TO} = 226$) und ein geeignetes Auslesen der Produktbildung über Fluoreszenz. Strategien zur Reduktion der Produkthemmung wurden bereits für andere templatkontrollierte Oligonucleotidreaktionen beschrieben. Von Kiedrowski et al. berichteten über einen oberflächenbasierten Ansatz, der im Unterschied zu der hier beschriebenen Methode aufeinanderfolgende Denaturierungs-Renaturierungs-Zyklen erforderte.^[15] Albagli et al. verwendeten für die Selbstreplikation von Oligonucleotidsystemen eine photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition.^[7c] Lynn et al. stellten eine DNA-Verknüpfung von Trinucleotiden mittels reduktiver Aminierung vor, bei der sie mehr als $\text{TO} = 50$ erreichten.^[7b] Sequenzspezifität und Fluoreszenzdetektion wurden nicht beschrieben. Kool et al. führten eine Verknüpfungsreaktion ein, bei der einzelbasenfehlpaarende Sonden 180fach langsamer verknüpft wurden als perfekt komplementäre Sonden.^[6f] Die Einführung eines flexiblen Linkers an der Verknüpfungsstelle lieferte $\text{TO} = 92$ unter Turnover-Bedingungen, verringerte jedoch die Sequenzdiskriminierung (12:1).^[7a] Der Einsatz eines Fluoreszenzlöschers als Fluchtgruppe ermöglichte sogar eine Detektion der innerhalb lebender Zellen erfolgenden Produktbildung über Fluoreszenz. Das entstehende Fluoreszenzsignal ist jedoch nicht spezifisch für die Produktbildung und kann auch durch templatunabhängige Hydrolyse hervorgerufen werden. Krämer, Mokhir et al. entwarfen ein System, in dem die benachbarte Hybridisierung zweier PNA-Sonden, von denen eine einen Kupferkomplex und die andere eine Esterfunktion trug, die Hydrolyse des Esters bewirkte.^[6i] Diese Reaktion zeichnete sich durch eine DNA-vermittelte Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit um das 500fache, 100fach geringere Geschwindigkeiten an fehlpaarenden Templayen und $\text{TO} = 5$ aus. Anhand PNA-basierter Systeme demonstrierten Taylor et al. das Potenzial zur Signalverstärkung. Hierbei bewirkte die gleichzeitige Hybridisierung von

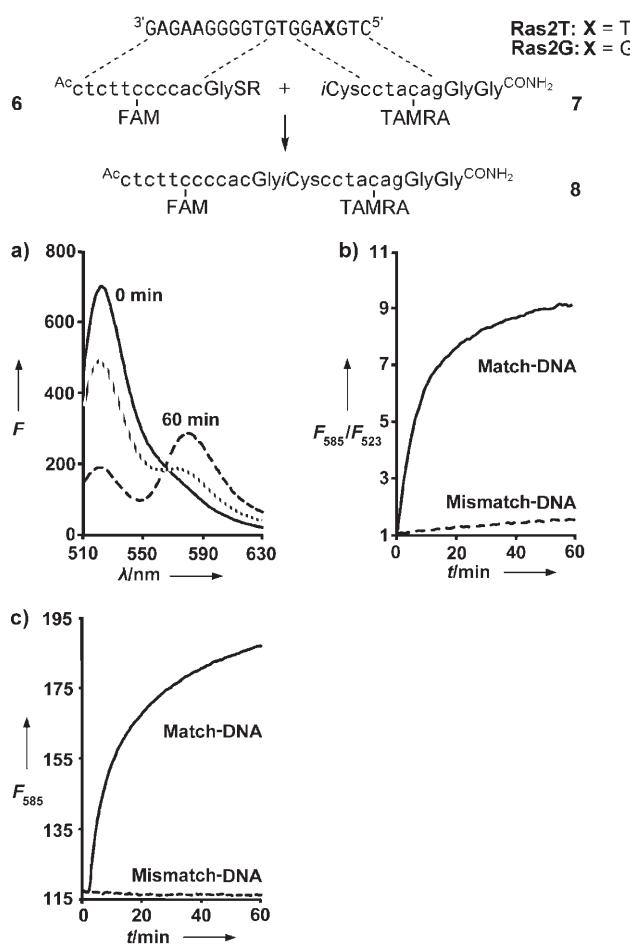


Abbildung 3. Fluoreszenzmessung der *iCys*-vermittelten PNA-Verknüpfung von PNA-Sonde **6** und **7**. a) Fluoreszenzspektren vor Zugabe der komplementären DNA **Ras2T** (—) und 60 min nach Zugabe (----). Zusätzlich ist das Spektrum von $\text{Ac}^{\text{t}}\text{cttc}(\text{FAM})\text{cccacGly-OH}$ **9** und **7** nach 60 min Inkubation mit **Ras2T** gezeigt (.....). b) Verhältnis zwischen den Fluoreszenzintensitäten bei 585 und 523 nm für die Verknüpfungen bei 25°C und c) Fluoreszenzintensität bei 585 nm gemessen für die Verknüpfungen bei 37°C an komplementärer DNA **Ras2T** (—) und einzelbasenfehlpaarendem DNA **Ras2G** (----) ($1 \mu\text{M}$ Sonden, $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 150 mM NaCl , 10 mM MESNA , pH 7.4, $\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{Na}$).

Imidazol oder Azid enthaltenden Sonden eine Desacylierung Acyl-gelöschter Fluoreszenzsonden.^[16] Das Fluoreszenzsignal war nicht spezifisch für die Produktbildung, und die templatkontrollierte Desacylierung verlief lediglich 36-mal schneller als die templatunabhängige Reaktion.

Wir haben mit der nativen chemischen *i*Cys-Verknüpfung eine neue PNA-Verknüpfungsreaktion präsentiert, die pro DNA-Templatäquivalent mehr Produktäquivalente (= höhere Signalverstärkung) liefert als die Cystein-vermittelte PNA-Verknüpfung und alternative DNA-Verknüpfungsmethoden. Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass die in einer templatkontrollierten Verknüpfung üblicherweise wirkende Produkthemmung durch Implementierung eines flexibilitätserhöhenden Umlagerungsschritts reduziert werden kann.

Eingegangen am 3. Februar 2006
Online veröffentlicht am 17. Juli 2006

Stichwörter: Einzelnucleotidpolymorphie · FRET (Resonanter Fluoreszenzenergietransfer) · Native chemische Verknüpfung · Sequenzanalyse · Templatsynthesen

- [11] C. Dose, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 59–65.
 - [12] a) I. Saito, Y. Miyauchi, Y. Saito, K. Fujimoto, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 97–99; b) S. M. Gryaznov, R. Schultz, S. K. Chaturvedi, R. L. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 2366–2369; c) N. I. Sokolova, D. T. Ashirbekova, N. G. Dolinnaya, Z. A. Shabarova, *FEBS Lett.* **1988**, 232, 153–155.
 - [13] Es ist denkbar, dass das Templat den Übergangszustand der *i*Cys-Verknüpfung besser stabilisiert als den der Cys-Verknüpfung. Gleiche Verknüpfungsgeschwindigkeiten können auch erklärt werden, falls die Hybridisierung geschwindigkeitsbestimmend wäre: a) Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1874–1878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1796–1800; b) Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6961–6963. Es wurde jedoch berichtet, dass PNA-Hybridisierung an einzelsträngiger DNA mit $k > 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ abläuft, während Verknüpfungen mit $k_{\text{app}} = 10^3\text{--}10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ voranschreiten; c) H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1097–1103.
 - [14] Die Struktur der fluorophormarkierten PNA ist in den Hintergrundinformationen zu finden. Über die Synthese wird an anderer Stelle berichtet werden.
 - [15] A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, 396, 245–248.
 - [16] a) J. Cai, X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16324–16325; b) J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, 7, 751–754.
- [1] *Templated Organic Synthesis* (Hrsg.: F. Diederich, P. J. Stang), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [2] a) K. V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Clo, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1044–1046; b) L. H. Eckhardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, 420, 286.
- [3] a) Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, 305, 1601–1605; b) X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4956–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4848–4870.
- [4] a) L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 109–118; b) G. F. Joyce, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. LII: Evolution of Catalytic Function*, Cold Spring Harbor Laboratory, **1987**, S. 41–51.
- [5] a) Z. C. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 11159–11163; b) Q. B. Zhou, S. E. Rokita, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 15452–15457.
- [6] a) A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3277–3280; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3178–3181; b) S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9970–9981; c) S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 2098–2103; d) Y. Z. Xu, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 875–881; e) Y. Z. Xu, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9040–9041; f) Y. Z. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 148–152; g) S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2096–2097; h) J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12410–12411; i) I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7849–7856; j) P. Hägenbuch, E. Kervio, A. Hochgesand, U. Plutowski, C. Richert, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6746–6750; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6588–6592.
- [7] Templatkatalysierte Oligonucleotidverknüpfungen: a) H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13980–13986; b) Zh.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12420–12421; c) D. Albagli, R. van Atta, P. Cheng, B. Huan, M. L. Wood, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6954–6955.
- [8] Q. Liu, D. J. Segal, J. B. Ghira, C. F. Barbas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 5525–5530.
- [9] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [10] B. Hyrup, M. Egholm, P. E. Nielsen, P. Wittung, B. Nordén, O. Buchardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7964–7970.