

# Reversible Stabilisierung von Übergangsmetallbindenden DNA-G-Quadruplexen\*\*

David M. Engelhard, Roberta Pievo und Guido H. Clever\*

Für die biologische Funktion von Oligonukleotiden spielt nicht nur die Primär-, sondern auch die Sekundär- und Tertiärstruktur eine tragende Rolle, besonders im Hinblick auf Proteinwechselwirkungen. DNA vermag neben der Doppelhelix eine Anzahl weiterer Sekundärstrukturen wie Triplex, das viersträngige i-Motiv sowie G-Quadruplexe zu bilden.<sup>[1]</sup> Letztere setzen sich durch Selbstorganisation von guaninreichen Oligonukleotiden über Hoogsteen-Basenpaarung zusammen, wobei sich durch zentrale Kationen stabilisierte Guanin-Tetraden bilden. G-Quadruplexe erfahren zunehmende Aufmerksamkeit,<sup>[2,3]</sup> da Studien zeigen, dass ihre In-vivo-Bildung sowohl die Verlängerung der Telomere verhindert (was die Lebensdauer von Krebszellen verkürzt), als auch in der Genexpression von Onkogenen eine Rolle spielt.<sup>[4]</sup>

Obwohl die G-Quartette nur eine geringe strukturelle Vielfalt aufweisen (*syn/anti*-Konformation der Guanosine), wird durch die relative Strangorientierung (parallel/antiparallel) sowie Variationen in der Topologie und Sequenz von einzelsträngigen Verbindungsschleifen Komplexität hervorgerufen.<sup>[5]</sup> Biomimetische G-Quadruplexe mit einer erhöhten und schaltbaren Stabilität sowie diagnostisch verwertbaren Eigenschaften wie Fluoreszenz<sup>[6]</sup> oder Magnetismus könnten nützlich für Markierungs- und Abfangstudien von DNA-spezifischen Bindungspartnern aus einer biologischen Matrix sein.<sup>[7]</sup> Es ist daher von großem Interesse, diskrete G-Quadruplex-Konstrukte zu entwickeln, die eine Kontrolle der Thermodynamik und Kinetik der De- und Renaturierung, eine Wahl der Schleifensequenz und Topologie, sowie die Einführung nichtbiogener Funktionalitäten über eine automatisierte DNA-Synthese ermöglichen.<sup>[8]</sup> Zusätzlich könnte die selektive Bildung von solch funktionalisierten G-Quadruplex-Strukturen wertvoll für das aufstrebende Feld der DNA Nanotechnologie sein.<sup>[9,10]</sup>

Bisher beschäftigten sich Studien über die Stabilisierung und Markierung von G-Quadruplexen hauptsächlich mit der Bindung von planaren organischen Verbindungen und flachen Metallkomplexen über nichtkovalente Wechselwirkungen wie End-on- $\pi$ -Stapelung oder Interkalation.<sup>[2c,11]</sup>

In den letzten Jahren bewies das Konzept der Metall-Basenpaarung, dass der synthetische Austausch natürlicher Nukleobasen durch Liganden die Inkorporation von Übergangsmetallionen in Duplex-DNA ermöglicht.<sup>[12,13]</sup> Sowohl die höhere Stabilität der Metall-Ligand-Bindung (im Vergleich zur Watson-Crick-Basenpaarung) als auch die einzigartigen magnetischen und elektronischen Eigenschaften der gebundenen Metalle haben zu einer Reihe funktioneller Nanokonstrukte geführt.

Beispiele umfassen eine reversible Haarnadel-Duplex-Transformation,<sup>[14]</sup> Ag/Hg-selektive Multiplexsensoren,<sup>[15]</sup> ferro- und antiferromagnetisch gekoppelte lineare Anordnungen,<sup>[16]</sup> programmierbar gemischte Stapel<sup>[17]</sup> sowie die metallkontrollierte Elektronenleitung durch einzelne DNA-Doppelstränge.<sup>[18]</sup>

Alle diese funktionalen Systeme basieren auf doppelsträngiger DNA. Im Hinblick auf andere DNA-Sekundärstrukturen wurde nur über eine kleine Zahl metallbindender Architekturen, wie Triplex<sup>[19,13a]</sup> und Dreiwegekreuzungen,<sup>[20]</sup> berichtet.<sup>[21]</sup> Insbesondere gibt es nur wenige Beispiele für G-Quadruplexe, die kovalent gebundene Metallkomplexe tragen, beispielsweise ein Thymin enthaltender G-Quadruplex, der Quecksilber bindet,<sup>[22]</sup> eine Cer(IV)-chelatisierende Struktur<sup>[23]</sup> und ein dimolekularer G-Quadruplex mit Bipyridineinheiten in den Schleifen.<sup>[24]</sup>

Wir berichten hier über den ersten tetramolekularen G-Quadruplex, der durch eine „Metall-Basentetrad“ terminiert wird, in welcher jedes Guanosin einer Guanin-Tetrad formal durch einen einzähnigen Pyridinliganden ersetzt ist. Zusammengekommen koordinieren die vier Pyridineinheiten Übergangsmetallionen wie Cu<sup>II</sup> oder Ni<sup>II</sup> in quadratisch-planarer Anordnung und stabilisieren dadurch die gesamte Struktur signifikant gegen thermische Denaturierung. Die Reversibilität der metallausgelösten Quadruplexstabilisierung wird durch Schmelzpunktbestimmungen, Zirkulardichroismus(CD)-Messungen und Gelelektrophorese-Experimente demonstriert. Zusätzlich liefert Elektronenspinresonanz(EPR)-Spektroskopie Hinweise auf die Art der Metallkoordination.<sup>[16a,b]</sup>

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide enthalten eine Guaninsequenz ( $n = 3-5$ ), die notwendig für die Quadruplex Bildung ist, und eine über einen Propan-1,3-diyl-Linker mit dem 5'-Ende des Strangs verknüpfte Pyridin-Donorfunktionalität. Die Auswahl der Linkerlänge basiert auf einer molekularen Modellierung (siehe Abbildung 1 c und die

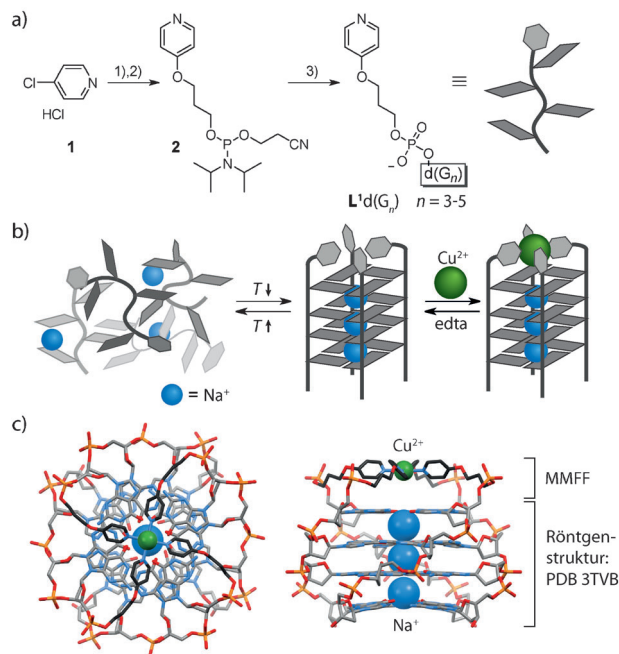
[\*] D. M. Engelhard, Prof. Dr. G. H. Clever  
Institut für Anorganische Chemie  
Georg-August-Universität Göttingen  
Tammannstraße 4, 37077 Göttingen (Deutschland)  
E-Mail: gclever@gwdg.de  
Homepage: <http://www.clever-lab.de>

Dr. R. Pievo  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die IRTG 1422 der DFG finanziert. D.M.E. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium. Wir danken Prof. Dr. U. Diederichsen und Prof. Dr. M. Bennati für den Zugang zu ihren Spektrometern.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201307594> zu finden.

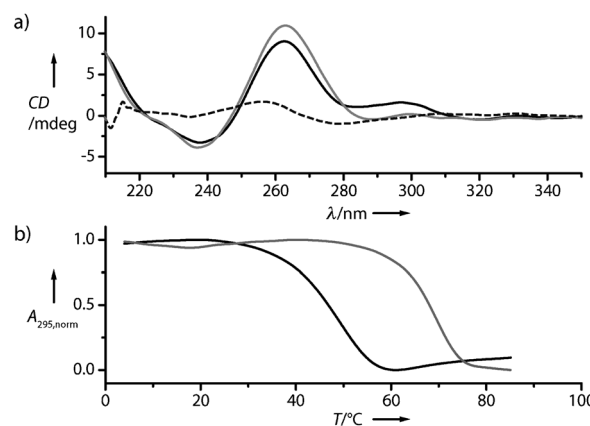
Hintergrundinformationen). Die Synthese startete mit der Anknüpfung des Linkers an 4-Chlorpyridin Hydrochlorid **1**. Anschließend Phosphorylierung führte zu Phosphoramidit **2**, mit dem in der automatisierten Oligonukleotid-Festphasensynthese die Einzelstränge  $L^1d(G_n)$  hergestellt wurden (Abbildung 1a, siehe die Hintergrundinformationen für experimentelle Details).



**Abbildung 1.** a) Synthese von 5'-ligandfunktionalisierten guaninreichen Oligonukleotiden  $L^1d(G_n)$  mit  $n = 3-5$ . Reaktionsbedingungen: 1) 1,3-Propanediol, NaOH, DMSO, 100 °C über Nacht; 2)  $P(OCH_2CH_2CN)(NIPr_2)Cl$ ,  $N,N$ -Diisopropylethylamin, THF, RT, 1 h; 3) automatisierte DNA-Festphasensynthese. b) Selbstorganisation des Quadruplexes  $[L^1d(G_4)]_4$  aus Einzelsträngen, Einbau von  $Cu^{II}$ -Ionen und Entfernen von  $Cu^{II}$  mit  $H_2EDTA^{2-}$  (edta). c) Molekülmodell von  $Cu^{II}[L^1d(G_4)]_4$  in Drauf- (links) und Seitenansicht (rechts); siehe die Hintergrundinformationen für Details.

Wie bei nichtmodifizierten G-Quadruplexen erfordert auch die Bildung von  $[L^1d(G_n)]_4$  eine hohe Elektrolytkonzentration und tiefe Temperaturen (Abbildung 1b).<sup>[25]</sup> Der Hybridisierungsprozess ist langsam (ca. 4 d bei 4 °C bis zum Erreichen des Gleichgewichts bei einer DNA-Konzentration von 7  $\mu M$ ), deshalb wurden alle Proben mit einem früher beschriebenen Frier-Auftau-Prozess behandelt, der die Quadruplex-Bildungsgeschwindigkeit enorm erhöhte.<sup>[26]</sup> Tetramolekulare Quadruplexe bevorzugen eine parallele Orientierung (alle Stränge mit derselben 3'-5'-Ausrichtung), was eine essenzielle Voraussetzung für die Realisierung des angestrebten metallchelatisierenden Systems ist.<sup>[25]</sup>

Die Hybridisierung von  $L^1d(G_4)$  wurde mit CD-Spektroskopie verfolgt. Der ligandmodifizierte G-Quadruplex  $[L^1d(G_4)]_4$  zeigt das charakteristische Spektrum eines parallelen G-Quadruplexes mit einer positiven Bande bei ca. 260 nm und einer negativen bei 240 nm (Abbildung 2a).<sup>[27]</sup> Zusätzliches Indiz für die Quadruplexbildung ist die hyperchrome Verschiebung der Absorbanz bei 295 nm.<sup>[28]</sup> Thermi-



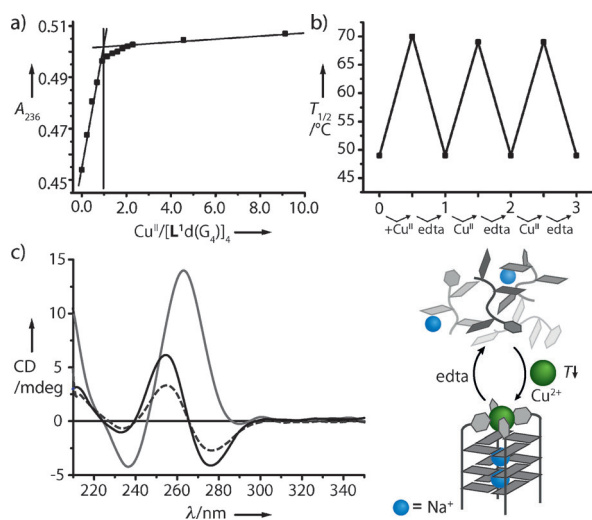
**Abbildung 2.** a) CD-Spektren von  $[L^1d(G_4)]_4$  in Abwesenheit (schwarze Linie) oder Anwesenheit (graue Linie) von  $Cu^{II}$  bei 4 °C und nach Schmelzen bei 85 °C (gestrichelte Linie); b) UV/Vis-Kurven der thermischen Denaturierung von  $[L^1d(G_4)]_4$  in Abwesenheit (schwarze Linie) und Anwesenheit (grau) von  $Cu^{II}$ . Die Absorbanz wurde bei 295 nm gemessen und ist normiert. 7  $\mu M$   $L^1d(G_4)$ , 10 mM Natriumkacodylat, 100 mM NaCl, 0 oder 7  $\mu M$   $CuSO_4$ .

sche Differenzspektren der Einzelstränge und der Quadruplexe wurden ebenfalls zur eindeutigen Detektion der Quadruplex-Bildung verwendet (siehe die Hintergrundinformationen für Details).<sup>[29]</sup> Die Abnahme der Absorbanz bei 295 nm bei Denaturierung wurde zur Bestimmung der Nichtgleichgewichts-Schmelztemperaturen der verschiedenen Quadruplexstrukturen genutzt, als Maß für deren relative thermodynamische Stabilitäten.

Nachfolgend wurden verschiedene Übergangsmetallionen hinzugefügt. Die Zugabe von  $Ni^{II}$ -Ionen zum Quadruplex  $[L^1d(G_4)]_4$  führte zu einer Zunahme der Schmelztemperatur um  $\Delta T_{1/2} = 15$  °C. Überraschenderweise ist dieser Effekt für  $Cu^{II}$ -Ionen mit einer Zunahme von  $\Delta T_{1/2} = 20$  °C noch ausgeprägter (Abbildung 2b). Der Vergleich dieser Beobachtung mit einem kürzlich erschienenen Bericht, in dem über die Destabilisierung nichtmodifizierter G-Quadruplexe in Anwesenheit eines  $Cu^{II}$ -Überschusses berichtet wurde, ist dabei recht interessant.<sup>[30]</sup>

Eine UV/Vis-kontrollierte Titration des Quadruplexes mit  $Cu^{II}$ -Ionen ergab eine stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 für  $Cu^{II}/[L^1d(G_4)]_4$  (Abbildung 3a). Das Molekülmodell (siehe Abbildung 1c und die Hintergrundinformationen) deutet dabei auf eine quadratisch-planare Anordnung der vier Pyridinreste um das  $Cu^{II}$ -Zentrum hin.

Dagegen führte die Zugabe von  $Ag^I$ -Ionen zu  $[L^1d(G_4)]_4$  zu einer Destabilisierung um  $\Delta T_{1/2} = -16$  °C, was in Übereinstimmung mit dem bereits berichteten Verhalten für nichtmodifizierte G-Quadruplexe ist.<sup>[31]</sup> Diese Ergebnisse weisen auf eine unterschiedliche Wechselwirkung der typischerweise linear koordinierten  $Ag^I$ -Ionen verglichen mit  $Cu^{II}$ - oder  $Ni^{II}$ -Ionen hin, die in Anwesenheit von vier Pyridinliganden eine quadratisch-planare oder axial-verzerrte oktaedrische Koordinationsumgebung bevorzugen. Um einen weiteren Nachweis der Bindung der  $Cu^{II}$ - und  $Ni^{II}$ -Ionen an das (Pyridin)<sub>4</sub>-Motiv zu führen, wurden Kontrollstränge  $L^{1*}d(G_n)$  synthetisiert, in denen der Pyridylligand durch eine Phenylgruppe ersetzt wurde, welcher die Donorfunktionalität



**Abbildung 3.** a) Titration von  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  durch Zugabe von  $\text{Cu}^{II}$ -Ionen bei 4 °C, gemessen anhand der UV/Vis-Absorption bei 236 nm. Die vertikale Linie zeigt die ungefähre Bindungsstöchiometrie von 1:1 für  $\text{Cu}^{II}/[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$ ; b) Schmelztemperaturzyklus für die wiederholende Stabilisierung und Destabilisierung des G-Quadruplexes  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  durch die abwechselnde Zugabe von  $\text{Cu}^{II}$  und edta ( $7 \mu\text{M}$   $\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)$ , 10 mM Natriumkacodylat, 100 mM NaCl;  $\text{CuSO}_4$ - und edta-Zugaben in 1-Äquivalentschritten); c) links: CD-Spektren von  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_3)]_4$  ( $15 \mu\text{M}$   $\text{L}^1\text{d}(\text{G}_3)$ , 10 mM Natriumkacodylat, 100 mM NaCl, 0 oder  $7 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ) in Anwesenheit (graue Linie) und Abwesenheit (schwarz) von  $\text{Cu}^{II}$  bei 4 °C und nach dem Schmelzen bei 35 °C (gestrichelte Linie); rechts: Selbstorganisation von  $\text{Cu}^{II}/[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_3)]_4$  und Denaturierung bei Zugabe von edta (schematische Darstellung). In Abwesenheit von  $\text{Cu}^{II}$  wurde keine Quadruplexbildung beobachtet.

fehlt (siehe die Hintergrundinformationen). In Abwesenheit der Übergangsmetallkationen zeigten die zugehörigen Quadruplexe eine höhere thermische Stabilität als die mit Pyridineinheiten, was möglicherweise auf eine günstigere  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung der elektronenreichen Phenylringe mit der 5'-Guanin-Tetrade in  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  und auf die schlechtere Solvatisierung der apolaren Phenylgruppen im wässrigen Puffer zurückzuführen ist. Wird der Kontrollquadruplex  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  mit  $\text{Ni}^{II}$ - oder  $\text{Cu}^{II}$ -Ionen versetzt, so erfolgt keine Veränderung der Schmelztemperatur, bei  $\text{Ag}^I$  dagegen wird eine Abnahme der Stabilität detektiert, ähnlich wie bei  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  ( $\Delta T_{1/2} = -15^\circ\text{C}$ ). Auch diese Ergebnisse sind mit einer vierfachen Koordination von  $\text{Ni}^{II}$  und  $\text{Cu}^{II}$  an die Pyridindonoren in  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  konsistent, was zu einem stark stabilisierenden, quadratisch-planaren (oder mit zwei weiteren apikalen Liganden axial-verzerrt oktaedrischen) Komplex führt. Der vorherrschende Bindungsmodus von  $\text{Ag}^I$  scheint dagegen unabhängig von der Anwesenheit der Pyridineinheiten zu sein.

Die hohe Stabilität des  $\text{Cu}^{II}$ -G-Quadruplexes kann durch Entfernen des  $\text{Cu}^{II}$ -Ions mit dem Chelatbildner Ethylendiamintetraessigsäure (edta) umgekehrt werden, wodurch das Schmelzverhalten des metallfreien G-Quadruplexes  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  vollständig wiederhergestellt wird (siehe die Hintergrundinformationen). Dieser Zyklus aus Stabilisierung und Destabilisierung kann mehrere Male wiederholt werden,

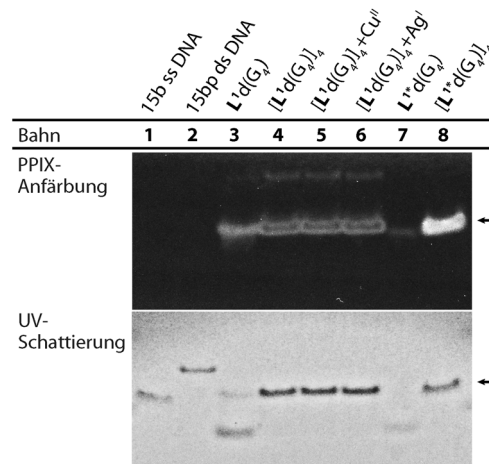
was die Reversibilität der Metall-Quadruplex-Assemblierung verdeutlicht (Abbildung 3b).

Um den Effekt der Metallkomplexierung weiter zu untersuchen, wurden Oligonukleotidstränge mit unterschiedlich langen Guaninsequenzen synthetisiert. Der längere Quadruplex  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_5)]_4$  zeigt eine Zunahme der Schmelztemperatur um  $\Delta T_{1/2} = 40^\circ\text{C}$  verglichen mit  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$ . Wie für  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  beobachtet, führt die Zugabe von  $\text{Cu}^{II}$  zu Stabilisierung, wogegen die Zugabe von  $\text{Ag}^I$  zu Destabilisierung führt (Abbildung S20).

Dagegen bildet die kürzere Guaninsequenz mit  $n = 3$  keinen G-Quadruplex, selbst nicht bei 4 °C, was auf eine Schmelztemperatur unter 4 °C hinweist und damit eine  $T_{1/2}$ -Abnahme von mehr als 45 °C im Vergleich zu  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  bedeutet. Die G-Quadruplex-Bildung kann allerdings durch Zugabe von  $\text{Cu}^{II}$  vor der Hybridisierung ausgelöst werden. Diese Ergebnisse werden durch die CD-Spektren unterstützt, die keine typischen Quadruplexbanden in Abwesenheit von  $\text{Cu}^{II}$ -Ionen zeigen. Nach Zugabe von  $\text{Cu}^{II}$ -Ionen konnte die Quadruplexbildung jedoch eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 3c). Die anschließende Zugabe von edta bei 4 °C führte wiederum zur schnellen Denaturierung dieses Quadruplexes (Abbildung S26).

Um die UV- und CD-spektroskopischen Ergebnisse zu bestätigen und um die Anwesenheit von Aggregaten höherer Ordnung einschätzen zu können, wurde die G-Quadruplex-Bildung mithilfe von Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht.

Zur Visualisierung der Banden wurden UV-Schattierung und der G-Quadruplex-anzeigende Fluoreszenzfarbstoff Protoporphyrin IX (PPIX) verwendet.<sup>[32]</sup> Tatsächlich zeigt das mit PPIX angefärbte Gel Fluoreszenz in den Bahnen 4–6 und 8, was auf die Anwesenheit intakter G-Quadruplexe hinweist (Abbildung 4). Verglichen mit den Referenz-DNA-Proben passen die Laufstrecken zu diskreten  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$ -Spezies. Keine Fluoreszenz wird für die einzel- und doppel-



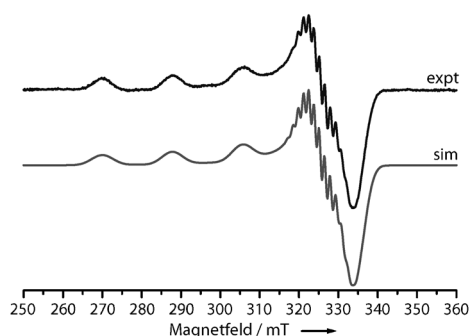
**Abbildung 4.** Nichtdenaturierende Gelelektrophorese von  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$  und Kontrollstrang  $[\text{L}^1\text{d}(\text{G}_4)]_4$ . G-Quadruplex-Banden wurden zuerst durch Färben des Gels mit PPIX (oberes Bild) und dann durch UV-Schattierung (unteres Bild) visualisiert. Die Pfeile markieren die gleiche Laufstrecke in den Gelen. Siehe die Hintergrundinformationen für Details.



strängigen Kontrollen beobachtet (Bahnen 1 und 2). Die Fluoreszenz in den Bahnen 3 und 7 kann auf partielle G-Quadruplex-Bildung während des PAGE-Experiments zurückgeführt werden. Des Weiteren konnten keine Unterschiede zwischen den Proben mit nur Quadruplex (Bahn 4) und zusätzlich Cu<sup>II</sup> (Bahn 5) oder Ag<sup>I</sup> (Bahn 6) beobachtet werden, was für die Beibehaltung der G-Quadruplex-Struktur in Anwesenheit der Metalle spricht.

Um weitere Einblicke in die Koordinationsumgebung zu gewinnen, wurden EPR-Messungen einer gefrorenen Lösung des Cu<sup>II</sup>[L<sup>d</sup>(G<sub>4</sub>)<sub>4</sub>]-Quadruplex durchgeführt. Der Cu<sup>II</sup>-gebundene G-Quadruplex zeigt ein Signal zentriert bei ungefähr 300 mT, typisch für einen einkernigen Cu<sup>II</sup>-Komplex. Die Abwesenheit von Resonanzen bei halbem Feld (ca. 160 mT; charakteristisch für einen  $\Delta M_S = \pm 2$ -Übergang) in den im Temperaturbereich 10–70 K aufgenommenen EPR-Spektren deutet daraufhin, dass keine mehrkernigen Cu<sup>II</sup>-Spezies vorhanden sind (Abbildung S30).

Wie in Abbildung 5 (schwarze Linie) dargestellt, zeigt das EPR-Spektrum die Hyperfeinstruktur für ein Kupferatom ( $I_{\text{Cu}} = 3/2$ ) sowie eine Superhyperfeinaufspaltung durch ko-



**Abbildung 5.** X-Band-CW-EPR-Spektrum einer gefrorenen Lösung von Cu<sup>II</sup>[L<sup>d</sup>(G<sub>4</sub>)<sub>4</sub>] (Natriumkakodylat 10 mM, NaCl 100 mM, L<sup>d</sup>(G<sub>4</sub>) 615  $\mu$ M, CuSO<sub>4</sub> 152  $\mu$ M, 10% (v/v) Glycerin) und Simulation (graue Linie). Experimentelle Parameter: 9.4 GHz,  $T = 50$  K, Mikrowellenleistung: 0.6325 mW, Konversionszeit: 123 ms, Modulationsamplitude: 10 G, Modulationsfrequenz: 100 kHz, 1 h Signalmittelung. Das Spektrum wurde mit der Matlab-Toolbox Easyspin (Version 4.51) simuliert.<sup>[34]</sup> Simulationsparameter:  $g_{x,y,z} = 2.0470, 2.0687, 2.2635$ ;  $A(\text{Cu}) = [47\ 45\ 552]$  MHz;  $A(\text{N}) = [40\ 39\ 40]$  MHz; Linienbreite = 5 G.

ordinierte Stickstoffatome ( $I_{\text{N}} = 1$ ). Das EPR-Spektrum wurde mit leicht rhombischen  $g$ - und  $A^{\text{Cu}}$ -Tensoren simuliert. Die  $g_{x,y}$ -Region ist besonders komplex, da die Cu- und <sup>14</sup>N-Hyperfeinaufspaltungen von derselben Größenordnung sind. Die Annahme einer CuN<sub>4</sub>-Einheit führte zur besten Übereinstimmung zwischen simuliertem und gemessenem Spektrum (Abbildung 5, graue Linie; Simulationsparameter sind in der Beschriftung angegeben).

Der Parameter  $R = (g_2 - g_1)/(g_3 - g_2)$  kann für die Charakterisierung des Kupfer(II)-Grundzustandes herangezogen werden.<sup>[33]</sup> Der gefundene Wert von  $R = 0.11$  legt nahe, dass der größte Beitrag zum Grundzustand durch das  $d_{x^2-y^2}$ -Orbital gegeben ist, konsistent mit einer quadratisch-planaren,

quadratisch-pyramidalen oder verzerrt-oktaedrischen Koordinationsumgebung.

Um die UV/Vis- und CD-spektroskopischen Ergebnisse zur Reversibilität des Metalleinbaus zu stützen, wurde auch hier die untersuchte Cu<sup>II</sup>-G-Quadruplex-Probe mit edta versetzt, was zu dem typischen EPR-Spektrum des Cu<sup>II</sup>-edta-Komplexes führte (Abbildung S31).

Zusammenfassend konnten wir neuartige G-Quadruplexe synthetisieren und charakterisieren, die aus vier parallel ausgerichteten Guaninsequenzen mit an den 5'-Enden gebundenen Pyridinliganden bestehen. Dabei sind die Pyridindonoren zu einem Chelatligand präorganisiert und zeigen eine hohe Affinität für die quadratisch-planare Koordination der Übergangsmetallkationen Cu<sup>II</sup> und Ni<sup>II</sup>. Zusätzlich stabilisiert die Zugabe von Cu<sup>II</sup> oder Ni<sup>II</sup> die Quadruplexe [L<sup>d</sup>(G<sub>n</sub>)<sub>4</sub>] ( $n = 3-5$ ) substanziell gegen thermische Denaturierung, wie anhand von UV/Vis- und CD-spektroskopisch verfolgten Schmelzexperimenten gezeigt werden konnte.

Unsere aktuellen Anstrengungen widmen sich der Entwicklung eines ligandmodifizierten Nukleosids, das in interne Sequenzpositionen eingebaut werden kann und dadurch die Synthese metallstabilisierter monomolekularer Quadruplexe ermöglicht, deren Faltungstopologie und Schleifenzusammensetzung systematisch variiert werden kann. Bibliotheken solcher metalltragender Quadruplexe, die als spektroskopisch verfolgbare Sonden dienen, könnten dann zur Suche neuer Oligonukleotid-Protein-Wechselwirkungen genutzt werden. Der Einbau weiterer Übergangsmetalle an der 3'- und an internen Positionen sollte zudem die Erforschung von Metall-Metall-Wechselwirkungen ermöglichen.<sup>[16]</sup> Wir sehen potenzielle Anwendungen für solche metallisierte G-Quadruplexe auf den Gebieten strukturelle Bionanotechnologie, molekulare Elektronik, Magnetismus und Katalyse.<sup>[35]</sup>

Eingegangen am 28. August 2013

Online veröffentlicht am 7. November 2013

**Stichwörter:** Bioanorganische Chemie · DNA · G-Quadruplexe · Metall-Basenpaare · Supramolekulare Chemie

- [1] J. Choi, T. Majima, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5893–5909.
- [2] a) S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402–5415; b) N. W. Luedtke, *Chimia* **2009**, *63*, 134–139; c) L. Davis, N. Maizels, *EMBO J.* **2011**, *30*, 3878–3879.
- [3] a) C. Schaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H. J. Lipps, A. Pluckthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8572–8577; b) G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 182–186; c) E. Y. N. Lam, D. Beraldi, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1796.
- [4] a) J. T. Davis, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 684–716; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668–698; b) S. Neidle, *FEBS J.* **2010**, *277*, 1118–1125; c) T. A. Brooks, L. H. Hurley, *Genes Cancer* **2010**, *1*, 641–649; d) G. W. Collie, G. N. Parkinson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5867–5892; e) S. Balasubramanian, L. H. Hurley, S. Neidle, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 261–275.
- [5] A. N. Lane, J. B. Chaires, R. D. Gray, J. O. Trent, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5482–5515.
- [6] A. Nadler, J. Strohmeier, U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5504–5508; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5392–5396.
- [7] C. Sissi, B. Gatto, M. Palumbo, *Biochimie* **2011**, *93*, 1219–1230.

- [8] a) M. A. Keniry, *Biopolymers* **2000**, 56, 123–146; b) T. Simonsen, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 621–628; c) X. Cang, J. Šponer, I. E. Cheatham, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14270–14279.
- [9] Für jüngere Beispiele siehe das Themenheft „Advances in DNA-Based Nanotechnology“ in *Chem. Soc. Rev.*: E. Stulz, G. H. Clever, M. Shionoya, C. Mao, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5633–5635.
- [10] a) N. Rosi, C. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547–1562; b) N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 65–87; c) E. Stulz, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 4456–4469.
- [11] a) S. N. Georgiades, N. H. Abd Karim, K. Suntharalingam, R. Vilar, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 4114–4128; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 4020–4034; b) O. Doluca, J. M. Withers, V. V. Filichev, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 3044–3083.
- [12] a) G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6340–6350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6226–6236; b) J. Müller, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 3749–3763; c) G. H. Clever, M. Shionoya, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254, 2391–2402; d) Y. Takezawa, M. Shionoya, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 2066–2076; e) P. Scharf, J. Müller, *ChemPlusChem* **2013**, 78, 20–34; für Übergangsmetallbindende Nukleobasen-Quartette siehe: f) K. Uchida, A. Toyama, Y. Tamura, M. Sugimura, F. Mitsumori, Y. Furukawa, H. Takeuchi, I. Harada, *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 2067–2073; g) M. Roitzsch, B. Lippert, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 153–156; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 147–150.
- [13] Für andere pyridinbasierte Metallbasenpaare siehe: a) E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10714–10715; b) K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8802–8803.
- [14] D. Böhme, N. Düpre, D. A. Megger, J. Müller, *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 10114–10119.
- [15] R. Freeman, T. Finder, I. Willner, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7958–7961; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7818–7821.
- [16] a) K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, 299, 1212–1213; b) S. S. Mallajosyula, S. K. Pati, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5077–5081; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4977–4981; c) G. H. Clever, S. J. Reitmeier, T. Carell, O. Schiemann, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 5047–5049; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 4927–4929; d) T. Ehrenschröder, W. Schmucker, C. Wellner, T. Augenstein, P. Carl, J. Harmer, F. Breher, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 12547–12552.
- [17] K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, 1, 190–194.
- [18] S. Liu, G. H. Clever, Y. Takezawa, M. Kaneko, K. Tanaka, X. Guo, M. Shionoya, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 9048–9052; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8886–8890.
- [19] Y. Takezawa, W. Maeda, K. Tanaka, M. Shionoya, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 1101–1104; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1081–1084.
- [20] J.-L. H. A. Duprey, Y. Takezawa, M. Shionoya, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 1250–1254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1212–1216.
- [21] Für Beispiele metallvermittelter Kontrolle über Tertiärstrukturen siehe: a) J. S. Choi, C. W. Kang, K. Jung, J. W. Yang, Y.-G. Kim, H. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8606–8607; b) H. Yang, H. F. Sleiman, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2477–2480; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2443–2446; c) N. Düpre, L. Welte, J. Gómez-Herrero, F. Zamora, J. Müller, *Inorg. Chim. Acta* **2009**, 362, 985–992; d) J. R. Burns, J. Zekonyte, G. Sili-gardi, R. Hussain, E. Stulz, *Molecules* **2011**, 16, 4912–4922.
- [22] N. M. Smith, S. Amrane, F. Rosu, V. Gabelica, J.-L. Mergny, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 11464–11466.
- [23] Y. Xu, Y. Suzuki, T. Lonnberg, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2871–2874.
- [24] D. Miyoshi, H. Karimata, Z.-M. Wang, K. Koumoto, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5919–5925.
- [25] J.-L. Mergny, A. de Cian, A. Ghelab, B. Saccà, L. Lacroix, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 81–94.
- [26] Q. Zhai, M. Deng, L. Xu, X. Zhang, X. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 1142–1145.
- [27] a) P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, D. Mohanty, M. Bansal, V. Sasisekharan, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 4061–4067; b) S. Masiero, R. Trotta, S. Pieraccini, S. de Tito, R. Perone, A. Randazzo, G. P. Spada, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2683–2692.
- [28] J.-L. Mergny, A.-T. Phan, L. Lacroix, *FEBS Lett.* **1998**, 435, 74–78.
- [29] J.-L. Mergny, J. Li, L. Lacroix, S. Amrane, J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, e138.
- [30] D. Monchaud, P. Yang, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, J.-L. Mergny, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 4936–4939; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4858–4861.
- [31] a) R. M. Izatt, J. J. Christensen, J. H. Rytting, *Chem. Rev.* **1971**, 71, 439–481; b) X.-H. Zhou, D.-M. Kong, H.-X. Shen, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 789–793.
- [32] a) T. Li, E. Wang, S. Dong, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 7576–7580; b) D.-L. Ma, H.-Z. He, K.-H. Leung, H.-J. Zhong, D. S.-H. Chan, C.-H. Leung, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 3427–3440.
- [33] B. J. Hathaway, D. E. Billing, *Coord. Chem. Rev.* **1970**, 5, 143–207.
- [34] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, 178, 42–55.
- [35] M. Wilking, U. Hennecke, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 6940–6945.