

# Bicyclo[3.2.1]DNA: über die strukturelle und energetische Rolle der Furanose-Einheit bei der Komplementärstrang-Erkennung von DNA\*\*

Bernhard M. Keller und Christian J. Leumann\*

*Professor Richard Neidlein zum 70. Geburtstag gewidmet*

Die Nucleinsäuren (DNA, RNA) sind die molekulare Matrize der gesamten genetischen Information in lebenden Organismen. In Zellen läuft die Protein-gesteuerte DNA-Replikation mit hoher Effizienz, hoher Geschwindigkeit und hoher Kopiertreue ab. Dabei werden nur wenige Mutationen zugelassen, die jedoch für die Evolution der Basenabfolge und damit für die Evolution der Spezies essentiell sind. Die funktionalen Eigenschaften von DNA und RNA, welche alternative komplementäre Basenpaarungssysteme in der molekularen Evolution verdrängt haben,<sup>[1]</sup> verlangen deshalb nach einer vertieften Struktur-Funktions-Korrelation.<sup>[2]</sup> Experimentelle Untersuchungen ergaben, dass die Entfernung der zentralen Ringstruktur in den Nucleosideinheiten, z. B. in den acyclischen DNA-Analoga Glycerin-DNA,<sup>[3]</sup> 1,2-seco-DNA<sup>[4]</sup> (Abbildung 1) und ähnlichen Systemen,<sup>[5]</sup> zu inkompetenten Basenpaarungssystemen führt. Sehr wahrscheinlich ist dies auf die hohen entropischen Kosten der konformativen Reorganisation der Einzelstränge bei der Duplexbildung zurückzuführen. Untersuchungen im Bereich der Antisense-Forschung<sup>[6-12]</sup> und der präbiotischen Forschung<sup>[13-16]</sup> wiederum fördern immer neue DNA-ähnliche Paarungssysteme mit charakteristischen strukturellen und funktionalen Eigenschaften zutage, welche auf cyclischen Nucleosid-Analoga beruhen.

Vom Standpunkt der supramolekularen Erkennung ist es nun eine offene Frage, ob die cyclische Verknüpfung von Base und Phosphodiester-Rückgrat eine zwingende Voraussetzung ist, um ein kompetentes, Basenfehlpaarungs-sensibles und Strangorientierungs-selektives Basenpaarungssystem zu erhalten. Wir beschlossen, diese Frage mit dem DNA-Analogon Bicyclo[3.2.1]DNA experimentell zu untersuchen. In diesem Analogon ist das Phosphodiester-Rückgrat in der B-DNA-Konformation präorganisiert, während die Basen über einen acyclischen Abstandshalter an das Rückgrat geknüpft sind.<sup>[17]</sup> Wir haben bereits gezeigt, dass Pyrimidin-haltige Bicyclo[3.2.1]oligonucleotide Duplexe mit komplementärer DNA bilden.<sup>[18]</sup> Nun belegen wir, dass Bicyclo[3.2.1]DNA selbst ein selektives Basenpaarungssystem ist.

Die Synthese von Bicyclo[3.2.1]oligonucleotiden begann mit den entsprechenden Phosphoramidit-Bausteinen **1–4** gemäß einem geringfügig veränderten Protokoll zur DNA-Festphasensynthese, welches an anderer Stelle detailliert

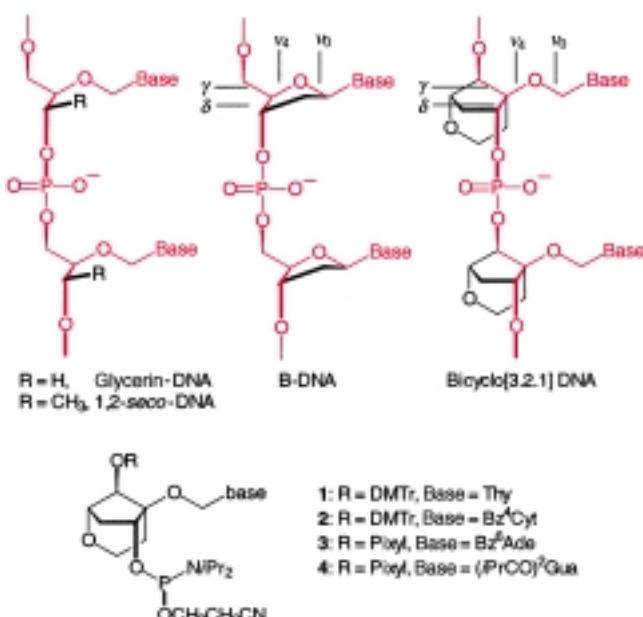


Abbildung 1. Oben: Ausschnitte aus den chemischen Strukturen von Glycerin-DNA, 1,2-*seco*-DNA, natürlicher B-DNA und Bicyclo[3.2.1]-DNA. Die gemeinsamen Strukturmerkmale im Zuckerphosphat-Rückgrat der vier Systeme sind rot dargestellt. Die Zucker- und Rückgrat-Torsionswinkel  $\nu_0$ ,  $\nu_4$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  unterscheiden sich in der jeweiligen konformativen Einschränkung. Im Wesentlichen nicht eingeschränkt ist die Rotation um alle vier Torsionswinkel in Glycerin-DNA und 1,2-*seco*-DNA. In B-DNA sind die Torsionswinkel  $\delta$ ,  $\nu_0$  und  $\nu_4$  durch den Furanose-Ring eingeschränkt. In Bicyclo[3.2.1]DNA sind die Torsionswinkel  $\gamma$  und  $\delta$  in einer Konformation ähnlich der von B-DNA eingefroren, während die (endocyclischen) Torsionswinkel  $\nu_0$ ,  $\nu_4$  konformativ frei gegeben sind. Unten: Für die Synthese der untersuchten Bicyclo[3.2.1]oligonucleotide verwendete Bausteine. DMT<sub>r</sub> = 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl, Pixyl = 9-Phe-nylxanthenyl, Bz = Benzoyl.

beschrieben werden wird. Um die Basenpaarungseigenschaften auszuloten, wurde eine Serie von Oligonucleotidsequenzen im Längenbereich von 10–20 Nucleotideinheiten hergestellt und deren strukturelle Integrität mittels ESI<sup>+</sup>-Massenspektrometrie verifiziert (Tabelle 1). Aus syntheseökonomischen Gründen enthalten alle Bicyclo[3.2.1]oligonucleotide eine natürliche Desoxynucleotideinheit an ihrem 3'-Ende (in der Tabelle fett gedruckt).

Die relativen Stabilitätsunterschiede zwischen Duplexen der Bicyclo[3.2.1]DNA- und der natürlichen DNA-Reihe wurde mittels UV-Schmelzkurvenanalytik ermittelt. Mit Aus-

Tabelle 1. Sequenzen und massenspektrometrische Daten der in dieser Studie verwendeten Bicyclo[3.2.1]oligonukleotide.

| Bicyclo[3.2.1]oligonucleotid | ESI <sup>+</sup> -MS<br>ber. | gef.                  |
|------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 5'-AAAAAAAAAA-3'             | 3574.5                       | 3574.0                |
| 5'-AAGAGAGGGAAGA-3'          | 4778.3                       | 4777.8                |
| 5'-AGAGAGAGAGAAAAA-3'        | 5500.8                       | 5500.1                |
| 5'-AAAGAAAAAGAGAGGGAAAGA-3'  | 7379.1                       | 7379.3                |
| 5'-TTTTTTTTTT-3'             | 3484.5                       | 3482.1 <sup>[a]</sup> |
| 5'-TCTTCCCCCTCTT-3'          | 4473.3                       | 4474.6                |
| 5'-TTCTCTCCCCCTCT-3'         | 4473.3                       | 4474.6                |
| 5'-TCTTCCCCCTCTT-3'          | 4458.8                       | 4459.5                |
| 5'-TTTTCTCTCTCTCT-3'         | 5210.8                       | 5212.6 <sup>[a]</sup> |
| 5'-TCTTCCCCCTCTTTTCTT-3'     | 6982.1                       | 6980.2 <sup>[a]</sup> |

[a] MALDI-TOF-massenspektrometrisch bestimmt.

nahme der Adenin- und Thymin-haltigen Homodecamere bildeten alle Bicyclo[3.2.1]oligonucleotide stabile, antiparallele Duplexe (Tabelle 2). Deren Schmelztemperaturen  $T_m$  waren generell um 1.5–2.5 K pro Basenpaar niedriger als bei den natürlichen Oligonucleotiden. Unter Vernachlässigung des energetischen Beitrags der endständigen Basenpaare ergibt sich daraus eine Erhöhung der  $\Delta G^0$ -Werte pro Basenpaar von 0.7–0.8 kcal mol<sup>-1</sup> (25 °C). Der leichte Rückgang der Schmelztemperatur des Bicyclo[3.2.1]-15mer-Duplex gegenüber dem Bicyclo[3.2.1]-13mer-Duplex (18.4 gegenüber 20.8 °C, Eintrag 3 bzw. 2 in Tabelle 2) ist vermutlich auf den höheren Gehalt an A-T-Basenpaaren im 15mer-Duplex zurückzuführen und weist damit auf einen größeren energetischen Beitrag von G-C-Basenpaaren zur Duplexstabilität bei Bicyclo[3.2.1]DNA hin.

Die Strangassoziation in Bicyclo[3.2.1]DNA ist orientationsspezifisch: Nur Duplexe zwischen antiparallelen Oligonucleotidsträngen traten auf. Ein Duplex zwischen zwei parallelen Bicyclo[3.2.1]DNA-13meren konnte nicht nachgewiesen werden (Eintrag 5, Tabelle 2). Die Strangorientierung wird somit durch die Geometrie der Rückgrateinheit ferngesteuert. Darüber hinaus wird die Bildung von Basenfehlpaarungen in Bicyclo[3.2.1]DNA, wie auch in natürlicher DNA, stark diskriminiert. Dies kann aus der Beobachtung abgeleitet werden, dass eine A-C-Fehlpaarung im Zentrum eines 13mers der Bicyclo[3.2.1]DNA die Duplexbildung komplett verhindert (Eintrag 6, Tabelle 2; zu vergleichen mit Eintrag 2, in welchem der korrekt gepaarte Duplex beschrieben wird).

Mittels CD-Spektroskopie und Computermodellierung wurden erste Informationen zur Struktur von Bicyclo[3.2.1]DNA-Duplexen erhalten. Das CD-Spektrum des antiparallel-komplementären Bicyclo[3.2.1]DNA-20mer-Duplex (Eintrag 4, Tabelle 2) gleicht stark dem einer Watson-Crick-gepaarten Doppelhelix des A-Konformationstyps und unterscheidet sich damit von dem des entsprechenden DNA-Duplex, welcher erwartungsgemäß den B-Konformationstyp bevorzugt (Abbildung 2). Dieses Resultat ist insofern unerwartet, als in der Bicyclo[3.2.1]DNA der Rückgrat-Torsionswinkel  $\delta$ , welcher wesentlich für die strukturellen Unterschiede der B- und A-Konformationsfamilien verantwortlich ist, Werte annimmt, die typisch für B-DNA sind.

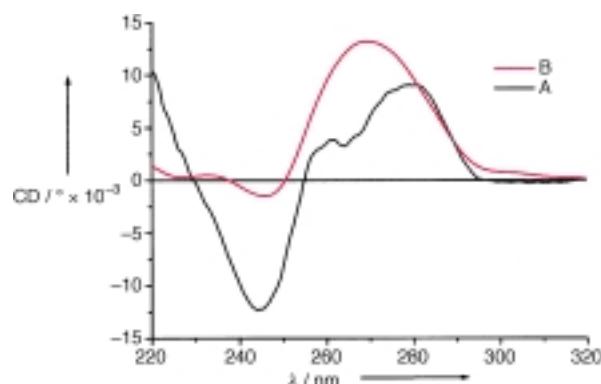


Abbildung 2. CD-Spektren des DNA- (A) und des Bicyclo[3.2.1]DNA-Duplex (B) aus Eintrag 4 in Tabelle 2 bei 4 °C. Pufferbedingungen wie in Fußnote [a] von Tabelle 2 angegeben.

Eine Moleküldynamiksimulation des Bicyclo[3.2.1]DNA-13mer-Duplex (Eintrag 2, Tabelle 2) auf einer 200-ps-Trajektorie mit einer B-DNA-Geometrie als Ausgangsstruktur führte zu einer intakten Doppelhelix, welche im Wesentlichen die Charakteristika einer B-DNA-Doppelhelix behielt (Abbildung 3). Es treten keine größeren Abweichungen der

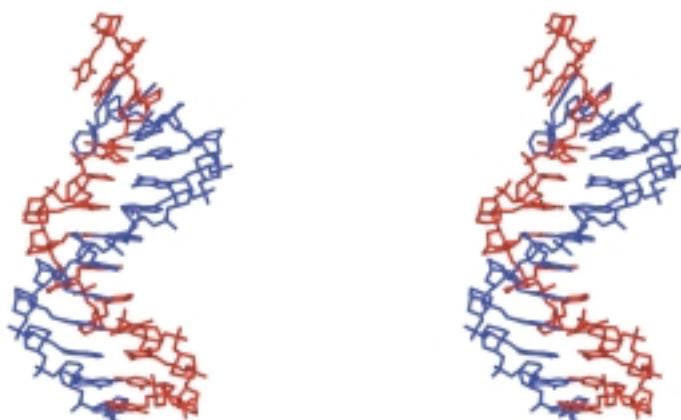


Abbildung 3. Stereobild der gemittelten Struktur der letzten 50 ps der 200-ps-Moleküldynamiksimulation (Insight II/Discover) des Bicyclo[3.2.1]DNA-Duplex aus Eintrag 2 in Tabelle 2. Die Simulation beruht auf dem AMBER-Kraftfeld. Eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante von  $\epsilon = 4r$  wurde zur Simulation einer wässrigen Umgebung verwendet.

Tabelle 2.  $T_m$ -Daten aus UV-Schmelzkurven (260 nm) für eine Serie von DNA- und Bicyclo[3.2.1]DNA-Duplexen mit Längen von 10–20 Basenpaaren.<sup>[a]</sup>

| Eintrag | Duplex                                          |                   | $T_m$ [°C]   | $\Delta T_m$ [K] <sup>[b]</sup> | $\Delta G^{25\text{ °C}}$ [kcal mol <sup>-1</sup> ] <sup>[c]</sup> |
|---------|-------------------------------------------------|-------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1       | 5'-AAAAAAA<br>TTTTTTTT-5'                       | DNA<br>[3.2.1]DNA | 33<br><0     | –<br>–                          | –7.3<br>–                                                          |
| 2       | 5'-AAGAGAGGAAGA<br>TTCTCTCCCTTCT-5'             | DNA<br>[3.2.1]DNA | 52.6<br>20.8 | –<br>–2.4                       | –16.0<br>–7.7                                                      |
| 3       | 5'-AGAGAGAGAGAAAA<br>TCTCTCTCTTTT-5'            | DNA<br>[3.2.1]DNA | 54.9<br>18.4 | –<br>–2.4                       | –17.1<br>–6.6                                                      |
| 4       | 5'-AGAAGGGAGAGAAAAAGAAA<br>TCTTCCCTCTCTTTCTT-5' | DNA<br>[3.2.1]DNA | 61.9<br>30.6 | –<br>–1.6                       | –25.2<br>–11.2                                                     |
| 5       | 5'-AAGAGAGGAAGA<br>5'-TTCTCTCCCTCT-5'           | DNA<br>[3.2.1]DNA | [d]<br><0    | –<br>–                          | –<br>–                                                             |
| 6       | 5'-AAGAGAGGAAGA<br>TTCTCCCCCTTCT-5'             | DNA<br>[3.2.1]DNA | [d]<br><0    | –<br>–                          | –<br>–                                                             |

[a] Experimentelle Bedingungen:  $c$ (Duplex) = 2  $\mu$ M, in 10 mM Na-cacodylat, 1M NaCl, pH 7.0. [b]  $T_m$ -Differenz zwischen DNA- und Bicyclo[3.2.1]DNA-Duplex pro Basenpaar. [c] Durch Kurvenanpassung an die experimentelle Schmelzkurve entsprechend bekannter Verfahren bestimmt.<sup>[18]</sup> [d] Nicht bestimmt.

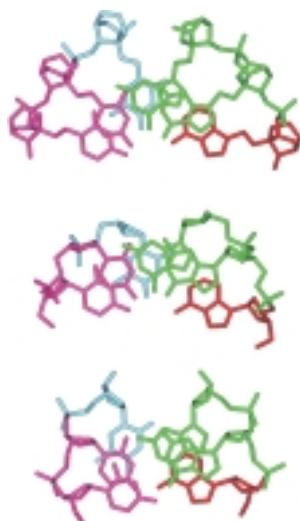


Abbildung 4. Blick entlang der Helixachse auf die zentralen AGG-CCT-Abschnitte der modellierten Struktur des Bicyclo[3.2.1]DNA-13mer-Duplex (oben), von kanonischer A-DNA (Mitte) und von kanonischer B-DNA (unten). Die Ähnlichkeit des Basenstapelungsmusters zwischen A-DNA und Bicyclo[3.2.1]DNA ist offensichtlich.

Rückgrat-Torsionswinkel  $\alpha$ - $\zeta$  von denen der B-DNA auf Erwartungsgemäß ergeben sich jedoch Abweichungen im Abstandshalter zwischen Rückgrat und Base. In der Bicyclo[3.2.1]DNA liegt er quasi perfekt gestreckt vor und unterscheidet sich damit deutlich von der entsprechenden DNA-Struktureinheit. Dies führt zu einem Basenstapelungsmuster, welches deutlich demjenigen von A-DNA gleicht (Abbildung 4), was in Einklang mit den CD-Spektren ist.

Aus den experimentellen Resultaten lassen sich vorerst die folgenden Schlüsse über die strukturelle und energetische Rolle des Furanose-Ringsystems der DNA ziehen: 1) Die entropischen Kosten der Bildung eines Duplex mit einem DNA-Analogon auf Phosphodiesterbasis, in welchem die Basen flexibel an die Rückgrateinheit gebunden sind, lassen sich überwinden, wenn die Rückgrateinheit selbst konformativ fixiert ist. 2) Selbst ohne ein Ringsystem, welches die Nucleobase relativ zur Rückgrateinheit in eine wohldefinierte Lage bringt, kann die Strangorientierungsselektivität in der Duplexbildung beibehalten werden. Dies ist sowohl im Hinblick auf das acyclische, auf Peptidbasis aufgebaute DNA-Analogon PNA von Interesse, welches nur eine bescheidene Strangorientierungsselektivität zeigt,<sup>[19]</sup> als auch im Zusammenhang mit gemischten  $\alpha/\beta$ -DNA-Duplexen, welche im Unterschied zu  $\beta/\beta$ -DNA-Duplexen eine parallele Strangorientierung bevorzugen.<sup>[20]</sup> 3) Eine Erhöhung der translatotrischen und rotatorischen Freiheitsgrade eines Basenpaares im Zentrum einer Doppelhelix führt nicht zu einer Verminderung der Basenpaarungsselektivität.

Was auch immer die chemischen Gründe waren, nach welchen die Natur RNA und DNA als genetisches Material auswählte – Paarungssysteme auf Phosphodiesterbasis, welche zwischen Base und Rückgrat keinen Ring als Verbindungsstück aufweisen, lassen sich nicht kollektiv von der Liste der potentiellen Kandidaten im Selektionsprozess streichen.

Eingegangen am 16. Februar 2000 [Z14713]

- [1] *The RNA World* (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999.
- [2] A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 218–259.
- [3] K. C. Schneider, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 453–455.
- [4] L. Peng, H.-J. Roth, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1494–1512.
- [5] P. Nielsen, L. H. Dreieck, J. Wengel, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 19–28.
- [6] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, 54, 3607–3630.

- [7] V. K. Rajwanshi, A. E. Hakansson, B. Dahl, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1999**, 1395–1396.
- [8] C. Hendrix, H. Rosemeyer, I. Verheggen, F. Seela, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 110–120.
- [9] Y. Maurinsh, H. Rosemeyer, R. Esnouf, A. Medvedovici, J. Wang, G. Ceulemans, E. Lescrinier, C. Hendrix, R. Busson, P. Sandra, F. Seela, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2139–2150.
- [10] M. Bolli, C. Litten, R. Schütz, C. Leumann, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 197–206.
- [11] M. Bolli, H. U. Trafelet, C. Leumann, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 4660–4667.
- [12] R. Steffens, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3249–3255.
- [13] M. Beier, F. Reck, T. Wagner, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Science* **1999**, 283, 699–703.
- [14] J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 259–352.
- [15] O. Jungmann, H. Wippo, M. Stanek, H. K. Huynh, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Org. Lett.* **1999**, 1, 1527–1530.
- [16] S. Pitsch, R. Krishnamurthy, M. Bolli, S. Wendeborn, A. Holzner, M. Minton, C. Lesueur, I. Schönvogt, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1621–1635.
- [17] Ein anderes Nucleosid-Analogon, welches auf ähnlichen Entwurfskriterien beruht, ist kürzlich vorgestellt worden (M. Marangoni, A. Van Aerschot, P. Augustyns, J. Rozenski, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3034–3041). Jedoch wurden nur Eigenschaften von Oligonucleotiden, welche eine solcherart modifizierte Einheit aufwiesen, beschrieben. Eine Extrapolation auf die Eigenschaften vollständig modifizierter Oligonucleotide ist unmöglich.
- [18] C. Epple, C. Leumann, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 209–216.
- [19] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, 365, 566–568.
- [20] F. Morvan, B. Rayner, J.-L. Imbach, M. Lee, J. A. Hartley, D.-K. Chang, J. W. Lown, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 7027–7044.

## Regioselektive $\alpha$ -Phosphorylierung von Aldosen in wässriger Lösung\*\*

Ramanarayanan Krishnamurthy, Sreenivasulu Guntha und Albert Eschenmoser\*

Im Zusammenhang mit Studien über eine potentielle präbiotische Chemie des Glycolaldehyds<sup>[3]</sup> beschrieben wir vor kurzem eine unter milden Bedingungen in wässriger

[\*] Prof. Dr. A. Eschenmoser, Prof. Dr. R. Krishnamurthy, Dr. S. Guntha  
Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical  
Biology  
The Scripps Research Institute  
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Fax: (+1) 858-784-9573  
E-mail: rkrishna@scripps.edu  
und

Laboratorium für Organische Chemie  
Eidgenössische Technische Hochschule  
Universitätstrasse 16, 8092 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 1-632-1043

[\*\*] Chemie von  $\alpha$ -Aminonitrilen, 29. Mitteilung. 28. Mitteilung: Lit. [1], 27. Mitteilung: Lit. [2]. Diese Arbeit wurde durch die Skaggs Foundation unterstützt. S.G. dankt dem NASA NSCORT Exobiology Programm (La Jolla) für ein Postdoktorandenstipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können bei R.K. (rkrishna@scripps.edu) angefordert werden.