

## Ein stabiler DNA-Duplex mit einem nichtwasserstoffverbrückenden, nichtformkomplementären Basenpaar: Interstrang-Stapelwechselwirkungen als Stabilitätsbestimmender Faktor

Christine Brotschi, Adrian Häberli und Christian J. Leumann\*

Wasserstoffbrücken und Stapelwechselwirkungen zwischen Nucleobasen sind die wichtigsten nichtkovalenten Kräfte, die die DNA- und die RNA-Doppelhelix zusammenhalten.<sup>[1, 2]</sup> Deren relative Beiträge zur Stabilität werden jedoch seit der Entdeckung der Struktur der Doppelhelix kontrovers diskutiert. Neuere Berichte über die Bildung stabiler Duplexe und die selektive, DNA-Polymerase-induzierte Replikation von Oligonukleotiden mit hydrophoben, nichtwasserstoffverbrückenden Basenpaaren<sup>[3–14]</sup> haben die Diskussion wieder entfacht und zu einer Neubewertung der Rolle von aromatischen Stapelwechselwirkungen und Formkomplementarität bei der Basenpaarbildung geführt.<sup>[15]</sup>

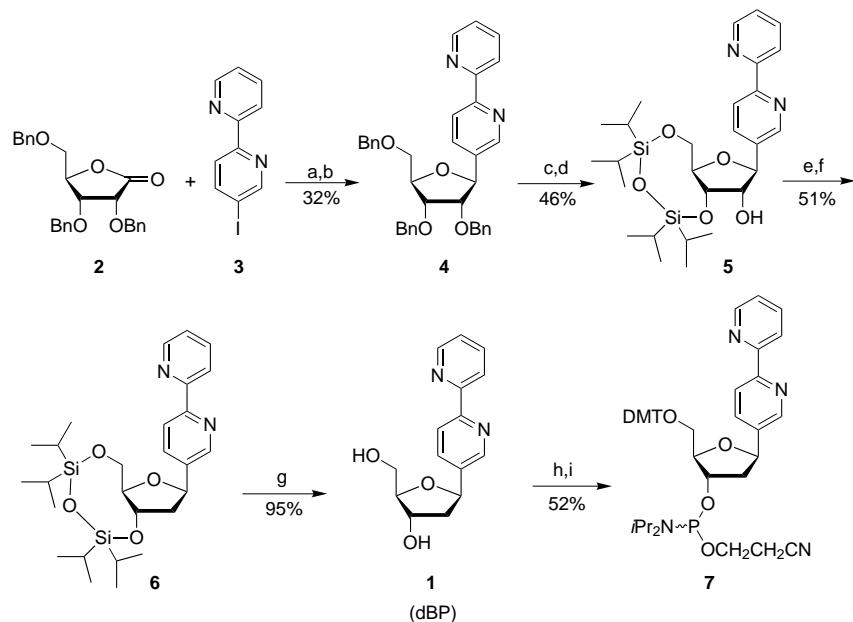
Im Rahmen eines Projektes zur Einführung von spezifischen Metallbindungsstellen in DNA<sup>[16–18]</sup> interessieren wir uns für das Nucleosid-Analogon **1** (dBP; siehe Schema 1), welches eine 2,2'-Bipyridyl(BP)-Einheit als Basenersatz trägt, und dessen Einbau in Oligonukleotide. Hier berichten wir über die selektive und hochaffine Selbsterkennung von dBP innerhalb eines DNA-Duplexes in Abwesenheit von Übergangsmetallionen.<sup>[19]</sup>

Das C-Nucleosid **1** wurde ausgehend von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-d-ribonolacton **2**<sup>[20]</sup> und 4-Iod-2,2'-bipyridin **3**<sup>[21, 22]</sup> nach bekannten Methoden der C-Glycosidchemie synthetisiert (Schema 1):<sup>[23, 24]</sup> Die Lithierung von **3** und die nachfolgende Addition an das Lacton **2** lieferten die intermediären Hemiacetale, welche nach In-situ-Reduktion mit Et<sub>3</sub>SiH selektiv in das  $\beta$ -C-Glycosid **4** (<sup>1</sup>H-NMR-NOE) überführt wurden. Mit einer typischen Reaktionsfolge zur Entfernung der 2'-Hydroxygruppe wurde die Synthese von **1** abgeschlossen, welches dann in das Phosphoramidit **7** umgewandelt wurde.

Dieser Baustein wurde nach Standardvorschriften der Oligonukleotidsynthese<sup>[25]</sup> in den Duplex **8** (siehe Tabelle 1) eingebaut. Die thermische Stabilität der Duplexe **8** (X, Y = dBp, dA, dG, dC, dT sowie das abasische Nucleosidanalogon  $\phi$ ) wurde durch UV-spektroskopische Bestimmung der Schmelztemperatur  $T_m$  ermittelt (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.0; Abbildung 1 a; Tabelle 1). Eine genauere Be-

[\*] Prof. Dr. C. J. Leumann, Dipl.-Chem. C. Brotschi, Dipl.-Chem. A. Häberli

Departement für Chemie und Biochemie der Universität Freiestraße 3, 3012 Bern (Schweiz)  
Fax: (+41) 31-631-3422  
E-mail: leumann@ioc.unibe.ch



Schema 1. a) 1.0 Äquiv. **3**, 1.0 Äquiv. *n*BuLi, THF, –78 °C, 2 h, dann 0.9 Äquiv. **2**, –78 °C → RT, 16 h; b) 5 Äquiv. Et<sub>3</sub>SiH, 5 Äquiv. BF<sub>3</sub> · OEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78 °C → RT, 16 h; c) 3.4 Äquiv. BBr<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, –78 °C, 4 h; d) 1.0 Äquiv. 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylsiloxane, Pyridin, RT, 5 h; e) 1.2 Äquiv. 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol, CH<sub>3</sub>CN, RT, 18 h; f) 1.6 Äquiv. Bu<sub>4</sub>SnH, 1.5 Äquiv. AIBN, Toluol, 80 °C, 2 h; g) 1.0 Äquiv. (HF)<sub>3</sub> · NEt<sub>3</sub>, THF, RT, 18 h; h) 1.2 Äquiv. 4,4'-Dimethoxytrityl(DMT)-chlorid, Pyridin, RT, 16 h; i) 3 Äquiv. *i*Pr<sub>2</sub>NEt, 1.3 Äquiv. [(*i*Pr<sub>2</sub>N)(NCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)P]Cl, THF, RT, 3 h. AIBN =  $\alpha, \alpha'$ -Azobisisobutyronitrile.

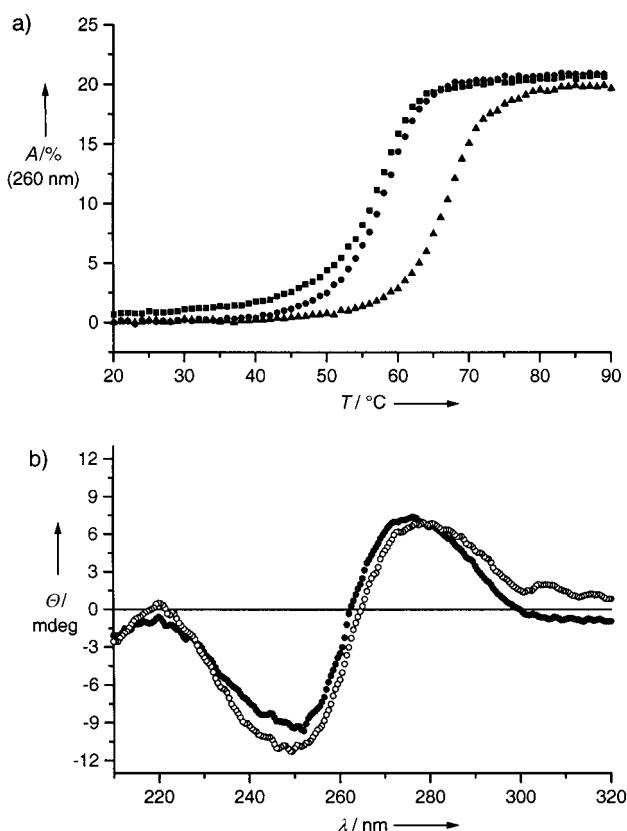


Abbildung 1. a) UV-Schmelzkurven der Duplexe **8** mit X = Y = dBp (▲), X = dBp, Y =  $\phi$  (●) und X = dBp, Y = dT (■); A = normierte Absorption; experimentelle Bedingungen siehe Tabelle 1; b) CD-Spektren der Duplexe **8** mit X = Y = dBp (○) und X = dA, Y = dT (●); c(**8**) = 2.4  $\mu$ M, Puffer siehe Tabelle 1.

Tabelle 1. Sequenz des 19-mer DNA-Duplexes **8** und aus UV-Schmelzkurven ermittelte  $T_m$ -Werte für eine Reihe von Kombinationen X und Y (260 nm,  $c(\mathbf{8}) = 1.2 \mu\text{M}$ , Puffer: 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.0).

Y	X	BP	5'-GATGACXGCTAGCTAGGAC					<b>8</b>
			φ	A	G	T	C	
BP	<b>67.4</b>	<b>58.5</b>	n.b. <sup>[a]</sup>	n.b. <sup>[a]</sup>	n.b. <sup>[a]</sup>	n.b. <sup>[a]</sup>	n.b. <sup>[a]</sup>	
T	57.9	50.1	<b>64.0</b>	60.0	58.5	55.7		
C	59.7	52.0	55.6	<b>66.7</b>	56.1	54.6		
A	61.4	52.5	57.0	59.2	<b>64.1</b>	55.8		
G	62.0	54.8	59.2	58.6	60.1	<b>66.0</b>		

[a] n.b. = nicht bestimmt.

trachtung der Daten zeigt, dass das nichtnatürliche Basenpaar dBp:dBp in der gegebenen Sequenz ( $T_m = 67.4^\circ\text{C}$ ) 3.4 K stabiler als ein dA:dT-Basenpaar und 0.7 K stabiler als ein dG:dC-Basenpaar ist. Die Selbsterkennung von dBp ist selektiv. Jede natürliche Base gegenüber einer dBp-Einheit destabilisiert den Duplex um 5.4–9.5 K. Dies entspricht Unterschieden in der Freien Paarungsenthalpie ( $\Delta\Delta G^\circ$ ) von 1.7–3.6 kcal mol<sup>-1</sup> relativ zu der des dBp:dBp-Duplex (Tabelle 2). Damit ähnelt der Effekt eines dBp:dN-Basenpaares auf die Duplexstabilität dem einer Basenfehlpaarung natürlicher Nucleobasen. Befindet sich gegenüber einer dBp-Einheit im Duplex eine abasische Einheit, so ist die thermische Stabilität des Duplex interessanterweise 8.9 K niedriger.

Tabelle 2. Durch Kurvenanpassung an die experimentellen Schmelzkurven nach dem Zweizustandsmodell erhaltene thermodynamische Daten der Duplexbildung.<sup>[27]</sup> Geschätzter Fehler  $\pm 5\%$ .

Y (X = BP)	$\Delta H$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S$ [cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]
A	−115	−317	−21.0
T	−106	−293	−19.1
G	−108	−296	−20.5
C	−112	−308	−20.4
BP	−113	−303	−22.7

Um sicherzustellen, dass die Resultate der Schmelzpunktsexperimente nicht durch an dBp-Einheiten gebundene Übergangsmetalle verfälscht waren, wurden Kontrollexperimente mit Ethyldiamintetraessigsäure(EDTA)-haltigen (0.1 M) Puffern durchgeführt. Dabei konnte jedoch keine Veränderung der  $T_m$ -Werte festgestellt werden. Unter Berücksichtigung des niedrigen  $pK_a$ -Wertes (4.3) der Bipyridyleinheit sowie der für die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen zwei Bipyridyleinheiten unvorteilhaften Anordnung der Ringstickstoffatome kann die Bildung eines protonierten dBPH<sup>+</sup>:dBp-Basenpaares bei pH 7.0 ebenfalls ausgeschlossen werden.

Ein Strukturmodell eines DNA-Duplexes mit zwei einander gegenüberliegenden dBp-Einheiten zeigt deutlich, dass die beiden Basen nur dann ohne größere Deformation des Rückgrates in der Doppelhelix untergebracht werden können, wenn die distalen Pyridinringe gestapelt vorliegen. In der Tat ergab eine Molekulardynamik(MD)-Simulation des Duplexes **8** (X = Y = dBp) mit zwei gegenüberliegenden Bipyridylbasen in der Ausgangskonformation bereits nach den

ersten Energieminimierungen einen Übergang in eine partiell gestapelte Konformation (Abbildung 2, oben). Diese Anordnung bleibt während der gesamten 200-ps-Trajektorie der Simulation stabil. Wie Abbildung 2 (unten) zeigt, führt die Stapelung der beiden dBp-Reste zu einer Erhöhung des

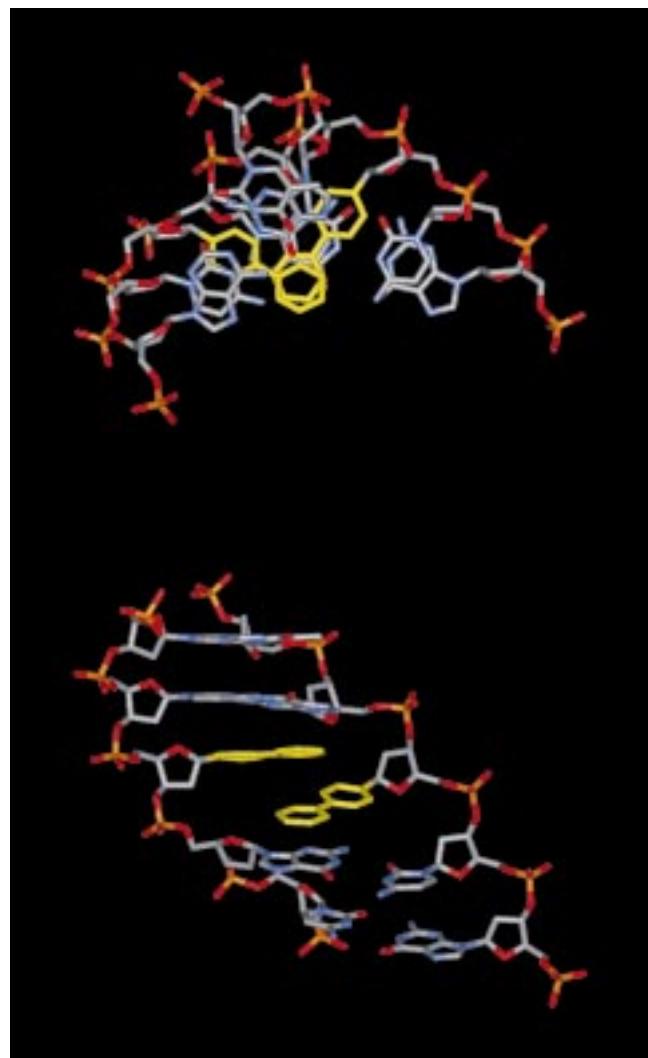


Abbildung 2. Struktur eines Ausschnitts des Duplexes **8** (X = Y = dBp), bestehend aus den beiden dBp-Einheiten (Basen in Gelb) sowie den benachbarten natürlichen Basenpaaren (zwei zu jeder Seite). Die Struktur entspricht dem Mittel der letzten 20 ps einer freien MD-Simulation bei 300 K entlang einer 200-ps-Trajektorie mit dem Kraftfeld Amber, wie es im Softwarepaket InsightII/Discover3 V98.0 implementiert ist. Anstelle von expliziten Lösungsmittelmolekülen wurde eine abstandsabhängige Permittivität von  $\epsilon = 4r$  ( $r$  = Abstand) als Screeningfunktion verwendet. Oben: Blick entlang der Helixachse, welcher die nahezu ideale Überlappung der distalen Pyridinringe der dBp-Einheiten wiedergibt; unten: Blick in die große Furche, welcher die Stapelung des dBp-Basenpaares im Gesamtzusammenhang des Basenstapels der DNA zeigt.

Abstands zwischen den Basen der beiden benachbarten dG:dC-Basenpaare. Dies wird durch eine lokale Änderung der Rückgratkonformation ermöglicht. Insgesamt bleibt dabei aber die B-Konformation der Doppelhelix erhalten. Dies wird durch die Circular dichroismus(CD)-Spektren der beiden Duplexe **8** mit X:Y = dA:dT bzw. dBp:dBp (Abbildung 1b) unterstützt.

Die Resultate der Schmelzexperimente und der Modellierungen des Duplexes **8** mit dem dBP:dBP-Paar führten uns zu dem Schluss, dass Interstrang-Stapelwechselwirkungen zweier benachbarter, nichtwasserstoffverbrückter und nichtformkomplementärer aromatischer Einheiten integraler Bestandteil der Duplexstabilisierung sind. Eine Analyse der Eigenschaften der kürzlich von Romesberg und Schultz<sup>[3, 5, 6]</sup> sowie der von Kool et al.<sup>[8, 10, 14]</sup> beschriebenen Duplexe mit verschiedenen hydrophoben Einheiten als Ersatz für die Nucleobasen ist hiermit vollkommen im Einklang. Das formkomplementäre Paar Difluortoluol:4-Methylindol und verwandte Paare<sup>[8, 14]</sup> sowie einander im Duplex gegenüberliegende substituierte Phenylreste, welche zu klein sind, um Interstrang-Stapelwechselwirkungen einzugehen,<sup>[5]</sup> destabilisieren einen Duplex. Ausgedehnte aromatische Einheiten hingegen, wie Isocarbostyryle (1-Hydroxyisochinoline)<sup>[3, 6]</sup> oder Pyrene,<sup>[10]</sup> welche sich (zumindest partiell) stapeln können, wenn sie sich in gegenüberliegenden Positionen eines Duplex befinden, führen zu ähnlich hoher oder gar höherer Stabilität verglichen mit einem natürlichen Basenpaar. Auf die Bedeutung der Interstrang-Basenstapelung für die Duplexstabilität wurde auch am Beispiel der DNA- und RNA-Analoga p-RNA und homo-DNA hingewiesen.<sup>[26]</sup> Eine hochauflösende Strukturanalyse eines Duplexes mit einem dBP-Basenpaar ist zurzeit in Arbeit.

Die hier beschriebenen experimentellen Befunde legen eine einfache Deutung nahe: Anordnungen nichtwasserstoffbrückender und nichtformkomplementärer Basen in DNA-Duplexen führen nur dann zu ähnlicher oder erhöhter Stabilität im Vergleich zu einem Watson-Crick-Basenpaar, wenn die entsprechenden Areneinheiten Interstrang-Stapelwechselwirkungen eingehen. Diese Erkenntnis dürfte für das Design neuer Nucleosidanaloge für Anwendungen in der Molekularbiologie oder in den Materialwissenschaften von großem Nutzen sein.

Eingegangen am 20. März 2001 [Z16817]  
Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht

- [1] C. R. Cantor, P. R. Schimmel in *Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, (Hrsg.: P. C. Vapnek), Freeman, New York, **1980**, S. 311–341.
- [2] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1984**.
- [3] M. Berger, A. K. Ogawa, D. L. McMinn, Y. Wu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3069–3071; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2940–2942.
- [4] D. L. McMinn, A. K. Ogawa, Y. Wu, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11585–11586.
- [5] A. K. Ogawa, Y. Q. Wu, D. L. McMinn, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3274–3287.
- [6] Y. Wu, A. K. Ogawa, M. Berger, D. L. McMinn, R. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7621–7632.
- [7] K. M. Guckian, T. R. Krugh, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6841–6847.
- [8] K. M. Guckian, J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9652–9656.
- [9] T. J. Matray, E. T. Kool, *Nature* **1999**, *399*, 704–708.
- [10] T. J. Matray, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6191–6192.
- [11] J. C. Morales, E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 950–954.
- [12] J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1001–1007.
- [13] S. Moran, R. X.-F. Ren, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10506–10511.

- [14] B. A. Schweitzer, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1863–1872.
- [15] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1046–1068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990–1009.
- [16] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715.
- [17] K. Tanaka, M. Shionoya, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5002–5003.
- [18] K. Wiederholt, L. W. McLaughlin, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2487–2493.
- [19] Während der Überarbeitung dieses Manuskriptes erschien eine Arbeit, in der ein DNA-Duplex mit zwei homo-dBP-Einheiten (mit einer Methylengruppe zwischen der Bipyridyleinheit und dem C1'-Atom der Deoxyriboseeinheit) in gegenüberliegenden Positionen beschrieben wird (H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375–3376). Schmelzexperimenten zufolge steigt die Stabilität dieses Duplexes in Gegenwart von Cu<sup>2+</sup>-Ionen an.
- [20] W. Timpe, K. Dax, N. Wolf, H. Weidmann, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 53–60.
- [21] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, P. L. Paris, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8182–8183.
- [22] B. Zhang, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1676–1681.
- [23] G. A. Kraus, M. T. Molina, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 752–753.
- [24] K. Krohn, H. Heins, K. Wielckens, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 511–517.
- [25] Die entsprechenden Oligonukleotide des Duplexes **8** mit X = Y = dBP wurden synthetisiert und gereinigt wie bereits beschrieben (I. Pompizi, A. Häberli, C. J. Leumann, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2702–2708). Die Ausbeuten der Kupplung mit dem Baustein **7** lagen bei > 98 %. Die durch Positiv-Ionen-ESI-MS bestimmten Massen der Oligonukleotide von *m/z* 5882.4 und 5784.6 ([M+H]<sup>+</sup>) stimmten gut mit den berechneten Massen von 5882.8 und 5784.8 überein und bestätigten damit die angegebenen Strukturen der Oligonukleotide.
- [26] R. Micura, R. Kudick, S. Pitsch, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 715–718; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 680–683, zit. Lit.
- [27] C. Epple, C. J. Leumann, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 209–216.

## Effizienter photooxidativer Abbau von organischen Verbindungen in Gegenwart von Eisentetrasulfophthalocyanin unter Bestrahlung mit sichtbarem Licht\*\*

Xia Tao, Wanhong Ma, Tianyong Zhang und Jincai Zhao\*

Der Abbau von organischen Schadstoffen durch Photokatalyse<sup>[1]</sup> und (photoinduzierte) Fenton-Reaktionen<sup>[2]</sup> ist ausgiebig untersucht worden. Meunier und Mitarbeiter berichteten über einen effizienten oxidativen Abbau von Tri-

[\*] Prof. J. Zhao,<sup>[+]</sup> X. Tao, W. Ma, T. Zhang  
Laboratory of Photochemistry, Center for Molecular Sciences  
Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences  
Beijing 100080 (China)  
Fax: (+86) 10-6487-9375  
E-mail: jc Zhao@ipc.ac.cn

[+] Derzeitige Adresse:  
Institute of Photographic Chemistry  
Chinese Academy of Sciences  
Beijing 100101 (China)

[\*\*] Diese Arbeit wurde finanziell vom NSFC (Förder-Nr. 29877026, 4001161947, 29725715 und 20077027) und vom CAS unterstützt. Die Autoren danken Dr. Huiyong Zhu, University of Queensland, Australien, für hilfreiche Diskussionen.