

**Polycyclische aromatische DNA-Basensurrogate:
stark erhöhte Bindungsaffinitäten zu
einer Adenin-spezifischen, basen-
ausklappenden DNA-
Methyltransferase****

Christine Beuck, Ishwar Singh,
Anupam Bhattacharya,
Walburga Hecker, Virinder S. Parmar,
Oliver Seitz* und Elmar Weinhold*

Die Methylierung von DNA ist ein wichtiger biologischer Prozess, der sehr unterschiedliche zelluläre Funktionen steuert, z.B. den Schutz vor endogenen Restriktionsendonucleasen, die Richtung der Basenfehlpaarungs-Reparatur sowie die Regulation von Gen-expression und DNA-Replikation.^[1] Die DNA-Methylierung wird von DNA-Methyltransferasen (MTasen) katalysiert. Diese binden an spezifische DNA-Sequenzen und übertragen eine Methylgruppe von S-Adenosyl-L-methionin auf die exocyclischen Aminogruppen von Adenin oder Cytosin.^[2] Besonders interessant ist, dass zur Methylierungsreaktion das Ziehnucleotid vollständig aus

der DNA-Helix rotiert wird.^[3] Für diesen Prozess muss das Brechen der Watson-Crick-Wasserstoffbrücken und das Aufheben der Basenstapelwechselwirkungen in Kauf genommen

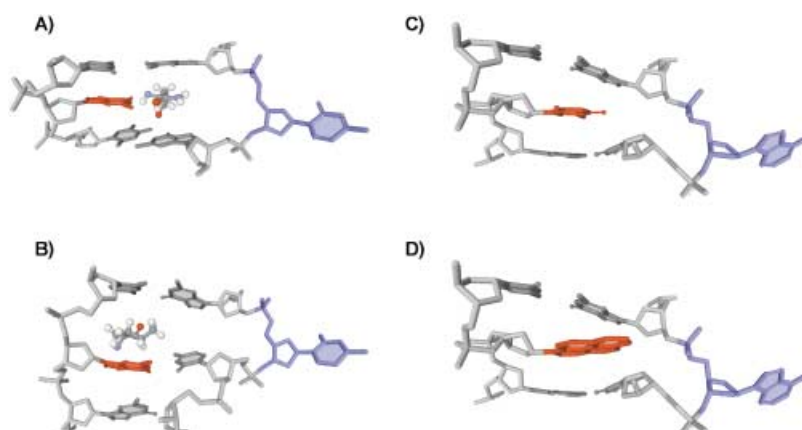


Abbildung 1. In MTase-DNA-Komplexen gefundene DNA-Strukturen mit dem extrahelicalen Ziehnucleotid in Blau und der zurückbleibenden Nucleobase in Rot: A) In der Struktur von *M-HhaI* besetzt Gln 237 (dargestellt als Kugel-Stab-Modell) teilweise die nach dem Ausklappen des Cytosins entstandene Lücke und bildet Wasserstoffbrücken mit dem zurückbleibenden Guanin. B) *M-HaeIII* inseriert Ile 221 (dargestellt als Kugel-Stab-Modell) in die DNA, und das zurückbleibende Guanin paart mit dem 3'-Cytosin, das das ausgeklappte Zielcytosin flankiert. C) In *M-TaqI* ist das verbliebene Thymin in Richtung des Helixzentrums verschoben. Daraus resultiert eine Interstrang-Stapelwechselwirkung mit der dem Zieladenin 5'-benachbarten Base. D) Ein aromatisches Basensurrogat wie Pyren (rot), das anstelle des zurückbleibenden Thymins in die *M-TaqI*-DNA-Struktur modelliert wird, passt sich gut in die beim Ausklappen des Zieladenins entstehende Lücke ein und könnte so die Interstrang-Stapelung verbessern. Dieses Ausfüllen der scheinbaren Leerstelle sollte zu einer Stabilisierung des Enzym-DNA-Komplexes beitragen.

[*] 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

Prof. Dr. E. Weinhold, C. Beuck
Institut für Organische Chemie
RWTH Aachen
Prof.-Pirlet-Straße 1, 52056 Aachen (Deutschland)
Fax: (+49) 241-80-92528
E-mail: elmar.weinhold@oc.rwth-aachen.de

W. Hecker
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

I. Singh, A. Bhattacharya, Prof. Dr. V. S. Parmar
Bioorganic Laboratory
Department of Chemistry
University of Delhi
Delhi 110007 (Indien)

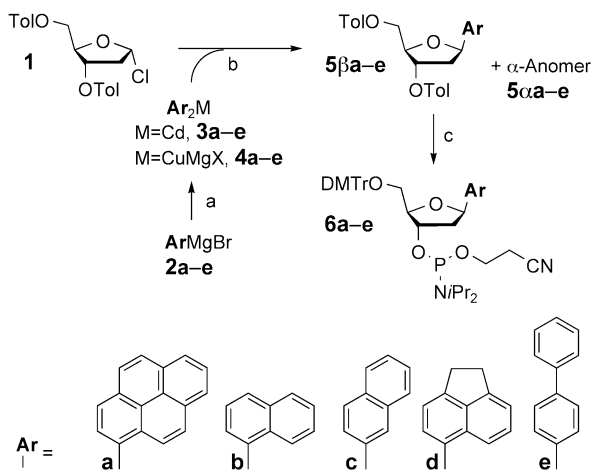
[**] Diese Arbeit wurde von der DFG, dem indischen Department of Science and Technology, dem Fonds der Chemischen Industrie und dem DAAD gefördert. O.S. bedankt sich für ein DFG- und Heisenberg-Stipendium und C.B. für ein Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes. Wir danken R. S. Goody für hilfreiche Diskussionen über die kompetitiven DNA-MTase-Bindungstests.

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

werden. Der erforderliche Energieaufwand wird vorwiegend durch spezifische Bindung der Zielbase im aktiven Zentrum und durch Stabilisierung der entstandenen scheinbaren Leerstelle (der abasischen Stelle) kompensiert. Drei Mechanismen zur Stabilisierung der scheinbaren Leerstelle wurden anhand der Kristallstrukturen von DNA-MTasen im Komplex mit DNA abgeleitet. Die Cytosin-spezifischen DNA-MTasen *M-HhaI*^[4] (Abbildung 1 A) und *M-HaeIII*^[5] (Abbildung 1 B) inserieren eine Aminosäureseitenkette entweder direkt oder nach Umordnung von Basenpaarungen in die entstandene Lücke. Dies unterscheidet sie von der Adenin-spezifischen DNA-MTase *M-TaqI*^[6] (Abbildung 1 C), die die verbleibende Partnerbase in die gebildete Lücke hineinschiebt und somit Stapelwechselwirkungen mit dem gegenüberliegenden Strang ermöglicht.

Ein Blick auf die Kristallstruktur des *M-TaqI*-DNA-Komplexes deutet darauf hin, dass ein Ersatz des Partner-Thymins durch größere aromatische DNA-Basensurrogate die Interstrang-Stapelwechselwirkungen verbessern könnte (Abbildung 1 D). Das damit einhergehende bessere Ausfüllen der scheinbaren Leerstelle sollte eine Stabilisierung des *M-TaqI*-DNA-Komplexes zur Folge haben. Außerdem ist es vorstellbar, dass ein polycyclisches Basensurrogat die innerhelicale Konformation des gegenüberliegenden Adenins destabilisieren könnte. Die DNA-MTase könnte demnach an Doppelstrang-DNA binden, bei der die Zielbase nicht im Basenstapel eingebettet ist, ohne dabei Energie für den Bruch

von Wasserstoffbrücken und Basenstapelung investieren zu müssen. Diese Hypothesen wurden anhand von DNA-Substraten untersucht, die Pyrenyl-, 1-Naphthyl-, 2-Naphthyl-, Acenaphthyl- und Biphenyl-Reste (**a–e**, Schema 1) gegenüber der Zielposition in der *M·TaqI*-Erkennungssequenz enthielten.



Schema 1. a) $M = \text{Cd}$: CdCl_2 , THF, 40–50 °C, 2–3 h; $M = \text{CuMgX}$: CuI , THF, 0 °C, 5 min; b) $M = \text{Cd}$: 0 °C–Rückfluss, THF, 1–2 h; $M = \text{CuMgX}$: THF, 25 °C, 30 min; c) 1) NaOMe , MeOH , 4 h; 2) DMTr-Cl , DMAP , Et_3N , CH_2Cl_2 , 8 h; 3) $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, Tetrazol, CH_2Cl_2 , MeCN , 1–2 h. Ausbeuten: **6a** 59%, **6b** 67%, **6c** 40%, **6d** 80%, **6e** 51%. DMTr = Dimethoxytrityl, DMAP = Dimethylaminopyridin.

Die Synthese der bekannten Bausteine **6a–c** und der neuen Phosphoramidite **6d** und **6e** beruht auf der Knüpfung einer C-glycosidischen Bindung. Wir^[7] und andere Arbeitsgruppen^[8] haben dazu den 2-Desoxyribosendonator **1**^[9] und Cadmium-organische Reagentien wie **3a–e** als Glycosylacceptoren eingesetzt (Schema 1).^[10] Um das toxische Cadmium zu ersetzen und die teilweise niedrigen Glycosylierungsausbeuten zu verbessern, untersuchten wir alternative Glycosylierungsmethoden. Bei der Kupplung reaktiver Alkylhalogenide haben sich Organocuprate als milde und vielseitige C-Nucleophile bewährt,^[11] und in der Tat erwiesen sich die Normant-Reagentien **4a–e** in der C-Glycosylierung gegenüber den Organocadmiumreagentien **3a–e** sowohl hinsichtlich Handhabbarkeit als auch Ausbeuten als überlegen (Tabelle 1). Die Bausteine **6a–e** wurden nach Abspaltung der Toly-Schutzgruppen von **5a–e**, regioselektiver Einführung der Tritylgruppe und abschließender Phosphitylierung erhalten.

Die Phosphoramidite **6a–e** wurden in der automatisierten Festphasen-DNA-Synthese der Oligonucleotide **7a–e** eingesetzt (Tabelle 2).^[7] Zunächst untersuchten wir, ob Duplex-DNA die Anwesenheit der Basen-

Tabelle 1: Ausbeuten (in %) der C-Glycosylierungsreaktionen.^[a]

| Organometallreagents | 5a | 5b | 5c | 5d | 5e |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Ar_2Cd 3a–e | 72 (4:1) | 67 (4:1) | 47 (2:1) | 47 (2:1) | 41 (2:1) |
| Ar_2CuMgX 4a–e | 74 (3:1) | 81 (4:1) | 74 (3:1) | | 75 (2:1) |

[a] In Klammern ist das α : β -Verhältnis angegeben.

surrogate toleriert. Die modifizierten Oligonucleotide **7a–e** wurden mit dem komplementären Strang **8a**, der innerhalb der 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenz von *M·TaqI* ein Zieladenin gegenüber den Basensurrogaten enthält, hybridisiert (Tabelle 2). In allen Fällen zeigten die Schmelzkurven sigmoidales Verhalten. Die Substitution des Thymins in **7T** durch die aromatischen Basensurrogate in **7a–e** führte zu einer Abnahme der Schmelztemperatur um 4.9 bis 8.7 K.

Nachdem die Integrität der Doppelstränge **7a–e·8a** bestätigt war, wurden die Bindungsaffinitäten zur *M·TaqI*-DNA-MTase in Lösung untersucht und mit den Bindungsaffinitäten des vollständig gepaarten Doppelstranges **7T·8a** sowie der Doppelstränge **7C·8a**, **7G·8a** und **7A·8a**, die ein fehlgepaartes Zieladenin enthalten, verglichen. Hierzu kam ein neuer kompetitiver Fluoreszenz-Bindungstest zum Einsatz, bei dem eine konkurrierende Doppelstrang-DNA verwendet wird, die das fluoreszierende Basenanalogon 2-Aminopurin an der Zielposition enthält.^[12,13] Da die Spektren des 2-Aminopurin- und des Pyren-Fluorophors teilweise überlappen, ist dieser Bindungstest nicht für den Pyren-modifizierten Doppelstrang **7a·8a** geeignet. Deshalb wurde hier die Pyren-Fluoreszenz gemessen und ein nichtfluoreszierendes Duplex-Oligonucleotid als Kompetitor eingesetzt.^[13]

M·TaqI bindet das unmodifizierte Substrat **7T·8a** mit einer Affinität von $K_A = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ sowie die Doppelstränge **7C·8a**, **7G·8a** und **7A·8a** mit fehlgepaartem Zieladenin mit annähernd gleicher Affinität (Tabelle 2). Diese Ähnlichkeit deutet darauf hin, dass eine Störung der Wasserstoffbrücken im Zielbasenpaar nur einen geringfügigen Einfluss ausübt. Dies unterscheidet sich allerdings von Untersuchungen mit der Cytosin-spezifischen DNA-MTase *M·HhaI*, bei

Tabelle 2: Thermische Stabilität der Doppelstränge und Bindungsaffinitäten zur Adenin-spezifischen DNA-MTase *M·TaqI*.^[a]

| Y | X = Adenin, 8a | | X = H, 8b | |
|------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| | T_M [°C] ^[b] | K_A [10^9 M^{-1}] ^[c] | T_M [°C] ^[b] | ΔT_M [K] ^[d] |
| Thymin, 7T | 65.9 ± 0.2 | 0.05 ± 0.02 | 49.8 ± 0.1 | 0.0 |
| Cytosin, 7C | 55.7 ± 0.1 | 0.03 ± 0.02 | 50.6 ± 0.1 | +0.8 |
| Guanin, 7G | 61.0 ± 0.2 | 0.03 ± 0.02 | 48.7 ± 0.2 | −1.1 |
| Adenin, 7A | 56.1 ± 0.2 | 0.04 ± 0.02 | 52.5 ± 0.2 | +2.7 |
| 1-Pyrenyl, 7a | 61.0 ± 0.3 | 20 ± 10 | 63.6 ± 0.4 | +13.8 |
| 4-Biphenyl, 7e | 57.5 ± 0.3 | 3.0 ± 1.0 | 59.0 ± 0.3 | +9.2 |
| Acenaphthyl, 7d | 59.0 ± 0.4 | 2.0 ± 1.0 | 57.9 ± 0.3 | +8.1 |
| 1-Naphthyl, 7b | 57.2 ± 0.1 | 2.0 ± 1.0 | 56.0 ± 0.2 | +6.2 |
| 2-Naphthyl, 7c | 58.0 ± 0.1 | 1.0 ± 0.5 | 57.8 ± 0.2 | +8.0 |

[a] Die doppelsträngige Erkennungssequenz von *M·TaqI* ist durch das gestrichelte Kästchen hervorgehoben. [b] Gemessen durch Denaturierungskurven bei einer DNA-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ in gepufferter Lösung (100 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0). [c] Experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen enthalten. [d] ΔT_M -Werte beziehen sich auf T_M von **8b·7T**.

denen eine bis zu 20fach höhere Bindungsaffinität zu DNA mit einem fehlgepaarten Zielcytosin gemessen wurde.^[14]

Im Unterschied zu den Strängen mit natürlichen Nucleobasen wurden für die Duplex-Oligonucleotide, die Naphthyl-, Acenaphthyl- und Biphenyl-Basensurrogate enthalten, 20- bis 60fach höhere Bindungsaffinitäten bestimmt. Bemerkenswert ist die um den Faktor 400 höhere Bindungsaffinität des Pyren-substituierten Doppelstranges **7a-e-8A**, die einer Dissoziationskonstanten von $K_D = 50$ pM entspricht.

Prinzipiell könnte die erhöhte Bindungsaffinität von *M-TaqI* zu den Doppelsträngen **7a-e-8A** auf eine von den Basensurrogaten herbeigeführte Entstapelung zurückgeführt werden. Diese Möglichkeit wurde bereits in früheren Experimenten untersucht.^[7] Fluoreszenzuntersuchungen ließen allerdings darauf schließen, dass der Pyrenyl-Rest die Basenstapelwechselwirkungen der Zielbase nicht effektiv unterbinden kann. Andererseits war der Biphenyl-Rest, der eine siebenfach geringere Bindungsaffinität an *M-TaqI* vermittelte, in diesem Experiment den anderen Basensurrogaten überlegen. Es ist daher zu vermuten, dass die Bindung von DNA an *M-TaqI* zwar von einer ungestapelten Zielbase profitiert, dies aber nicht den entscheidenden Beitrag für die beobachtete Reihenfolge der Bindungsaffinitäten liefert.

Die Bindung von *M-TaqI* an ihre Ziel-DNA führt zur Bildung einer scheinbaren Leerstelle, die vom Interstrangstapelnden Partner-Thymin nur zum Teil ausgefüllt wird (Abbildung 1C). Das Einführen einer abasischen Stelle hat aber im Allgemeinen eine drastische Destabilisierung des betreffenden Duplex zur Folge. Verdeutlicht wird dies durch die substanzielle Verringerung der Schmelztemperatur nach Austausch des Zielnucleosids 2'-Desoxyadenosin in **7T-8A** durch das Leerstellenanalogon 1,2-Didesoxy-D-ribose in **7T-8b** ($\Delta T_M = -16.1$ K). Diese Destabilisierung tritt ebenso bei jeder anderen natürlichen Nucleobase auf, wie die ähnlichen T_M -Werte der Doppelstränge **7C-8b**, **7G-8b** und **7A-8b** belegen. Wir untersuchten, ob Basensurrogate, die gegenüber der Leerstelle angeordnet werden, die Duplex-Stabilität erhöhen können. Den Ergebnissen zufolge zeigt jeder der Leerstellen-Stränge **7a-e-8b** eine höhere Thermostabilität als **7T-8b** (Tabelle 2). Von besonderer Bedeutung ist die gute Korrelation zwischen den Thermostabilitäten der Leerstellen-Doppelstränge **7a-e-8b** und den Bindungsaffinitäten der Doppelstränge **7a-e-8A** zu *M-TaqI* (Tabelle 2). Der Pyrenyl-Rest stabilisiert die Leerstelle am besten und zeigt die höchste Bindungsaffinität zu *M-TaqI*. Daraus schließen wir, dass der Pyrenyl-Rest die Bindung von *M-TaqI* in erster Linie durch eine verbesserte Kompensation des Energieverlustes, der aus der Enzym-induzierten Leerstellen-Bildung resultiert, verstärkt.

Kürzlich wurde über Untersuchungen der Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) und Varianten mit einem Duplex, der einen Pyren-Rest gegenüber einem unreaktiven Uracil-Analogon enthält, berichtet.^[15,16] Ähnlich wie die Cytosin-spezifische DNA-MTase *M-HhaI* klappt UDG ihre Zielbase aus der DNA-Helix heraus und stabilisiert die effektive Leerstelle durch Insertion einer Aminosäureseitenkette. Anders als bei unseren Bindungsstudien mit *M-TaqI* wurde dort nur eine geringe Veränderung der Bindungsaffinität zu UDG durch den Pyren-Rest verursacht, was mit den unterschied-

lichen Mechanismen der Leerstellen-Stabilisierung in Einklang ist. In *M-TaqI* füllt der Pyren-Rest die durch das Ausklappen der Zielbase entstehende Lücke besser aus als das natürliche Partner-Thymin, während in UDG ein sterischer Konflikt mit der hereingeschobenen Aminosäureseitenkette zu erwarten ist. In Übereinstimmung mit dieser Interpretation konnte durch Einführung eines Pyren-Nucleotids die verminderte Bindungsaffinität einer UDG-Variante, bei der die entscheidende Aminosäureseitenkette entfernt ist, wieder erhöht werden.^[15,16] Dieser Vergleich zwischen *M-TaqI* und UDG illustriert, dass Doppelstränge mit polycyclischen aromatischen Basensurrogaten an der Zielbasen-Partner-Position als Sonden für mechanistische Untersuchungen von DNA-basenausklappenden Enzymen dienen könnten. Adenin-spezifische DNA-MTasen sind außerdem essenziell für die Virulenz etlicher pathogener Bakterien.^[17] Die hohe Bindungsaffinität, die durch Pyren-Modifizierung vermittelt wurde, könnte für die Inhibierung dieser DNA-MTasen von Interesse sein.

Wir haben eine verbesserte und weniger toxische C-Glycosylierung vorgestellt, die einen zuverlässigen Zugang zu einer Vielzahl unpolarer Nucleosidanaloga ermöglichen sollte. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass die verbesserte Stabilisierung einer Leerstelle ein wichtiges Kriterium für die Erhöhung der Bindungsaffinität von *M-TaqI* ist. In künftigen Studien soll dieses Design in die Entwicklung hochaffiner Bindungspartner für andere Adenin-spezifische DNA-MTasen einfließen – ein Forschungsprojekt, das zu Inhibitoren dieser interessanten Enzyme führen soll.

Eingegangen am 14. August 2002,

veränderte Fassung am 14. Mai 2003 [Z19972]

Stichwörter: Abasische Stellen · DNA-Methylierungen · Enzyme · Glycoside · Nucleinsäuren

- [1] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, 3, 275–293.
- [2] X. Cheng, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 293–318.
- [3] X. Cheng, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 3784–3795.
- [4] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell* **1994**, 76, 357–369.
- [5] K. M. Reinisch, L. Chen, G. L. Verdine, W. N. Lipscomb, *Cell* **1995**, 82, 143–153.
- [6] K. Goedecke, M. Pignot, R. S. Goody, A. J. Scheidig, E. Weinhold, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 121–125.
- [7] I. Singh, W. Hecker, A. K. Prasad, V. S. Parmar, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2002**, 500–501.
- [8] A. K. Ogawa, Y. Q. Wu, M. Berger, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8803–8804.
- [9] M. Hoffer, *Chem. Ber.* **1960**, 93, 2777–2781.
- [10] R. X. F. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, S. Rumney, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7671–7678.
- [11] Die Reaktion von Lithium-Dialkylcupraten mit Glucopyranosylhalogeniden wurde beschrieben: R. Bihovsky, C. Selick, I. Giusti, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4026–4031.
- [12] B. Holz, S. Klimasauskas, S. Serva, E. Weinhold, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1076–1083.
- [13] Die experimentelle Ausführung ist in der Hintergrundinformation beschrieben.

- [14] S. Klimasauskas, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1388–1395.
- [15] Y. L. Jiang, K. Kwon, J. T. Stivers, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 42347–42354.
- [16] Y. L. Jiang, J. T. Stivers, F. Song, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11248–11254.
- [17] D. M. Heithoff, R. L. Sinsheimer, D. A. Low, M. J. Mahan, *Science* **1999**, *284*, 967–970.