

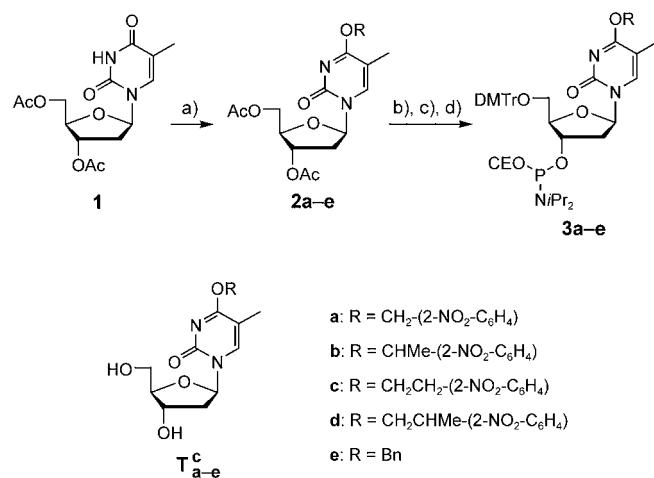
## Lichtinduzierte Transkription mit vorübergehend fehlgepaarten Oligonucleotiden\*\*

Lenz Kröck und Alexander Heckel\*

DNA und RNA sind in der Natur verantwortlich für die Speicherung und den Fluss von Information. Darüber hinaus gibt es für DNA und RNA und besonders für ihre Derivate und Analoga eine ganze Reihe von Anwendungsmöglichkeiten, z.B. die Regulation der Genexpression (RNA-Interferenz,<sup>[1a]</sup> microRNA,<sup>[1b]</sup> „Riboswitches“,<sup>[1c]</sup> Antisense-Strategie,<sup>[1d]</sup> DNAAzyme<sup>[1e]</sup>), die Modulation der Funktion von Proteinen (Aptamere,<sup>[1f]</sup> „DNA/RNA decoys“<sup>[1g]</sup>), für molekulare Diagnostik (Microarrays<sup>[1h]</sup>) oder als strukturgebendes oder funktionelles Baumaterial für Nanoarchitekturen.<sup>[1i]</sup> In all diesen Anwendungen kommt den Nucleobasen die zentrale Rolle zu. Mit dem Ziel einer räumlichen und zeitlichen Kontrolle der jeweils ausgeübten Funktion untersuchen wir Wege zur vorübergehenden Blockierung der Watson-Crick-Paarungseigenschaften der Nucleobasen. Da die Bestrahlung mit Licht ein orthogonaler Auslösemechanismus ist, bietet die Verwendung photolabiler „Schutz“-Gruppen eine ideale Lösung für diese Aufgabenstellung. So wäre z.B. die Regulation der Genexpression mit Licht ein wertvolles Hilfsmittel für die Analyse der Funktion von Proteinen. Das vorübergehende Inaktivieren einer biologisch aktiven Verbindung durch photolabile Schutzgruppen ist eine Vorgehensweise, die „caging“ genannt wird. Es wurden z.B. bereits photoaktivierbare („caged“) Neurotransmitter oder Ca<sup>2+</sup>-Komplexbildner hergestellt und studiert.<sup>[2]</sup> Ebenso wurde ATP mit einem photolabilen 1-(2-Nitrophenyl)ethyl-Rest in einer Pionierarbeit vorübergehend inaktiviert und für Untersuchungen der Na/K-Pumpe in Membranpräparationen verwendet.<sup>[3]</sup>

Wir berichten hier über die Herstellung von photoaktivierbaren („caged“) Thymidinphosphoramiditen und ihre Verwendung für die Induktion der Transkription mit Licht. Photolabile Gruppen wurden bereits als temporäre Schutzgruppen in der Oligonucleotid-Synthese verwendet;<sup>[4]</sup> zudem können photolabile Schutzgruppen an der 2'-Position in RNA die Funktion von Ribozymen inhibieren,<sup>[4b,5]</sup> verhindern aber nicht die Watson-Crick-Basenpaarung. Des Weiteren wurden Nucleosidanaloga und -derivate hergestellt, die bei Bestrahlung zu Strangbrüchen führen.<sup>[6]</sup>

Als Position für das Anbringen der photolablen Gruppe („caging group“) wurde die exocyclische O4-Position in Thymidin gewählt (Schema 1). O4-substituierte Derivate von Thymidin sind über die Reaktion der geeignet geschützt-



**Schema 1.** Synthese der geschützten photoaktivierbaren Phosphoramidite **3a–e**; photoaktivierbare Nucleoside **T<sup>c</sup><sub>a–e</sub>**. Reaktionsbedingungen: a) *i*Pr<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Cl, DMAP, Et<sub>3</sub>N; 2. jeweiliger Alkohol, Et<sub>3</sub>N; b) NH<sub>3</sub>/MeOH (quant.); c) DMTrCl, Pyridin; d) CEOP(Cl)NiPr<sub>2</sub>, DIIEA. DMAP = *N,N*-Dimethyl-4-aminopyridin, DMTr = Dimethoxytrityl, DIIEA = Diisopropylethylamin, CE = 2-Cyanethyl, Bn = Benzyl.

ten Vorstufe **1** zunächst mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid und dann mit dem jeweiligen Alkohol der photolablen Gruppe (**2a–e**) einfach zugänglich. Als photolabile Gruppen wurden die üblicherweise verwendete 2-Nitrobenzyl-Gruppe und ihr schneller abzuspaltendes α-Methyl-Derivat sowie die 2-Nitrophenethyl-Gruppe und deren α-Methyl-Derivat gewählt. Letzteres wurde z. B. von Pfeiderer et al.<sup>[7]</sup> verwendet und bildet bei der Entschützung keine Nitrosoverbindung<sup>[8]</sup> – eine Tatsache, die später für Studien in Zellkultur und in vivo von Bedeutung sein wird. Das benzilierte Derivat **2e** und seine Folgeprodukte wurden als Kontrollverbindungen, die nicht durch Licht entschützt werden können, in diese Studie aufgenommen. Durch Desacetylierung und DMTr-Schützung der 5'-Position wurden die 3'-OH-freien Intermediate erhalten, die anschließend unter Standardbedingungen zu den Phosphoramiditen **3a–e** umgesetzt wurden.

Um die duplexdestabilisierenden Eigenschaften der photoaktivierbaren Monomere **T<sup>c</sup><sub>a–e</sub>** (Schema 1; **c** = caged) zu testen, wurden sie in 25-mer-Oligonucleotide an den in Tabelle 1 gezeigten Positionen eingebaut und dann Schmelzpunktstudien mit dA<sub>25</sub> als Gegenstrang durchgeführt. Wie man in Tabelle 1 sieht, führt bereits der Einbau nur eines photoaktivierbaren Nucleotids zu einer deutlichen Herabsetzung des Schmelzpunktes (von bis zu 5 °C). Dieser Effekt kann durch den Einbau von mehreren modifizierten Nucleotiden verstärkt werden, besonders wenn sie über die gesamte Länge des Oligomers verteilt eingebaut werden. Verzweigte photolabile Gruppen führen gegenüber ihren unverzweigten Analoga zu einer etwas stärkeren Duplexdestabilisierung (man vergleiche z. B. die Einträge mit **T<sup>c</sup><sub>a</sub>** und **T<sup>c</sup><sub>b</sub>**). Durch den

[\*] L. Kröck, Dr. A. Heckel

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)  
Fax: (+49) 228-73-5388  
E-mail: heckel@uni-bonn.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch ein Liebig-Stipendium des Verbandes der Chemischen Industrie für A.H. unterstützt.

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

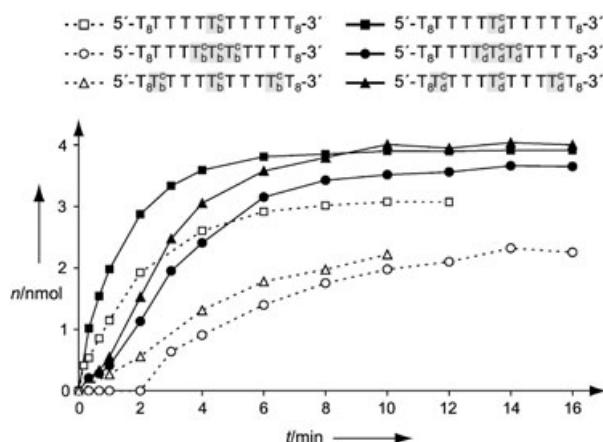
**Tabelle 1:** Ergebnisse von Schmelzpunktstudien mit den gezeigten Oligonucleotiden und dA<sub>25</sub> als Gegenstrang.<sup>[a]</sup>

X	5'-T <sub>8</sub> TTTTXTTTT <sub>8</sub> -3'	5'-T <sub>8</sub> TTTXXXTTT <sub>8</sub> -3'	5'-T <sub>8</sub> XTTTXTTTT <sub>8</sub> -3'
T <sub>a</sub> <sup>c</sup>	50.3 (51.1)	47.3 (46.9)	41.2 (44.3)
T <sub>b</sub> <sup>c</sup>	48.6 (53.2)	44.2 (51.1)	32.3 (51.9)
T <sub>c</sub> <sup>c</sup>	48.9 (53.0)	44.9 (51.7)	34.7 (51.8)
T <sub>d</sub> <sup>c</sup>	48.5 (54.0)	44.5 (52.7)	32.3 (53.2)
T <sub>e</sub> <sup>c</sup>			33.8 (34.2)

[a] Die Schmelzpunkte sind angegeben in °C, jeweils vor und (in Klammern) nach Bestrahlung der Proben bei 366 nm für 30 min (Fehler ca. ± 0.7°C). Mit unmodifiziertem T<sub>25</sub> wurde ein Schmelzpunkt von 53.8 (54.0) °C gemessen.

Einbau von nur drei modifizierten Nucleotiden konnte eine maximale Herabsetzung des Schmelzpunkts von 21.5 °C erreicht werden. In einer zweiten Serie von Experimenten wurden die Schmelzpunkte nach Bestrahlung über 30 min bei 366 nm bestimmt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, zeigten nur die Oligonucleotide mit T<sub>d</sub><sup>c</sup> nach der Bestrahlung dieselben Schmelzpunkte wie die unmodifizierte Kontrollverbindung (T<sub>25</sub>). Diese Ergebnisse legen die Sichtweise einer „vorübergehenden Fehlpaarung“ nahe. Der Einbau des benzylierten Thymidin-Derivates T<sub>e</sub><sup>c</sup> führt zu einer Herabsetzung des Schmelzpunktes, die erwartungsgemäß auch nach der Bestrahlung bestehen bleibt.

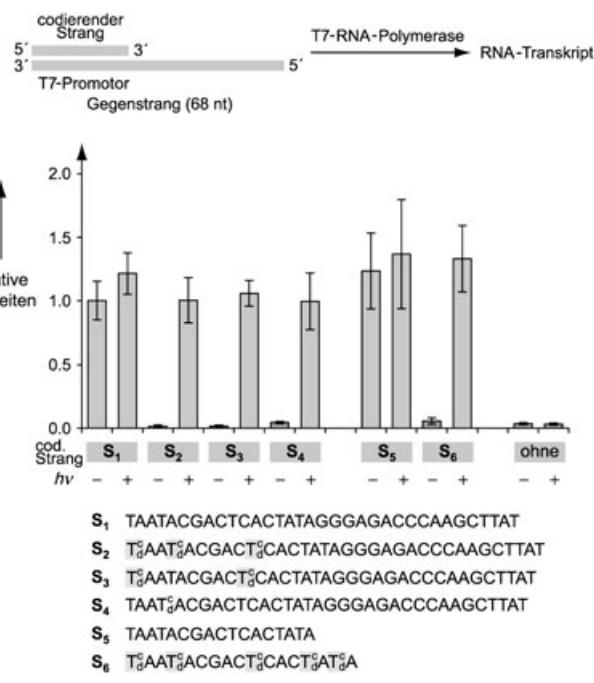
Als nächstes wurde die Kinetik der Photoentschützung untersucht: 4 nmol jedes Oligonucleotids aus Tabelle 1 wurden bei 366 nm bestrahlt, und die Bildung des entschützten T<sub>25</sub> wurde mit HPLC verfolgt. Die Entschützung der Oligomere mit dem modifizierten Nucleosid T<sub>d</sub><sup>c</sup> erreicht einen stationären Zustand, in dem außer dem gewünschten, unmodifizierten Produkt eine zweite, bisher noch nicht identifizierte Verbindung vorliegt, die bei Bestrahlung nicht weiterreagiert (Abbildung 1). Im Fall der Oligomere mit T<sub>d</sub><sup>c</sup> verließ die Entschützung nicht nur schneller, sondern auch innerhalb der Fehlergrenzen praktisch quantitativ. Die Oligomere mit T<sub>a</sub><sup>c</sup> und T<sub>c</sub><sup>c</sup> wurden ebenfalls untersucht: Besonders beim Vorliegen mehrerer modifizierter Nucleotide in einem Oli-



**Abbildung 1:** Freigesetzte Menge an unmodifiziertem Oligonucleotid bei Bestrahlung (366 nm). Bei jedem Experiment wurden 4 nmol an modifiziertem Oligonucleotid verwendet, und die Produktbildung wurde mit HPLC verfolgt.

gomer verließ die Entschützung sehr langsam und in schlechten Ausbeuten. Von den modifizierten Nucleotiden führte T<sub>d</sub><sup>c</sup> zur stärksten Duplexdestabilisierung und ließ sich beim Entschützen am leichtesten entfernen.

Um die Anwendbarkeit von photoaktivierbaren Nucleotiden in biologischen Systemen zu demonstrieren, wollten wir vorübergehend eine Transkriptionsreaktion blockieren (Abbildung 2). Hierfür verwendeten wir einen Gegenstrang



**Abbildung 2:** Relative Mengen an gebildetem Transkriptionsprodukt nach 1 h – mit oder ohne Bestrahlung (1 h, 366 nm) vor dem Start der Transkription durch Zugabe der T7-RNA-Polymerase.

mit 68 Nucleotiden mit einem T7-Promotor als Transkriptionstemplat. Der Bereich des T7-Promotors wurde mit den kürzeren Oligonucleotiden S<sub>1</sub>–S<sub>6</sub> zum Doppelstrang ergänzt, um der T7-RNA-Polymerase ein Erkennen der Promotorregion zu ermöglichen. Die Menge an gebildetem Transkriptionsprodukt nach einständiger Inkubation wurde mit Autoradiographie bestimmt ( $\alpha^{32}$ P-GTP wurde zur internen Markierung verwendet). Die drei Oligonucleotide S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> und S<sub>4</sub> enthielten jeweils drei, zwei bzw. ein modifizierte(s) Nucleotid(e) in der Region des T7-Promotors. Anders als bei Verwendung des unmodifizierten Kontrolloligonukleotids S<sub>1</sub> findet mit den modifizierten Oligonukleotiden keine Transkription statt. Dies ist nicht darauf zurückzuführen, dass die Oligonucleotide unter den Versuchsbedingungen einzelsträngig vorliegen, da z. B. S<sub>4</sub> und der Gegenstrang im Transkriptionspuffer einen Schmelzpunkt von 72.0 °C aufweisen. Der Grund muss eher eine durch die photolabilen Gruppen verursachte starke lokale Störung der Duplexstruktur sein, die verhindert, dass die RNA-Polymerase die Promotorregion erkennt.<sup>[9]</sup> Nach der Bestrahlung der jeweiligen Proben (vor der Zugabe der T7-RNA-Polymerase) wurde in allen Fällen dieselbe Menge an Transkriptionsprodukt gebildet wie bei Verwendung des unmodifizierten Oligomers S<sub>1</sub>. Ein Start

der Transkription erfolgte auch durch die nachträgliche Bestrahlung der Proben mit den intakten modifizierten Oligomeren und T7-RNA-Polymerase, in denen sich während der ersten Stunde – wie gezeigt – kein Transkriptionsprodukt gebildet hatte. Die kürzeren Oligomere **S<sub>5</sub>** und **S<sub>6</sub>** verhielten sich in diesen Experimenten analog.<sup>[10]</sup> Die Ergebnisse in Abbildung 2 zeigen allerdings, dass zum Verhindern der Transkription keine Destabilisierung des Doppelstrangs auf voller Länge nötig ist, sondern dass der Einbau von ein bis zwei photoaktivierbaren Nucleotiden an der richtigen Stelle vollkommen ausreicht.

Andere Arbeitsgruppen haben ebenfalls die Möglichkeit der Regulation von Genexpression mit Licht studiert,<sup>[11]</sup> jedoch wurden hier ganze Plasmide oder mRNA-Stränge unter benzylierenden Bedingungen modifiziert, wobei die photolabiles Gruppen vermutlich hauptsächlich an den Phosphatgruppen des Rückgrates zu liegen kommen. Anders als bei der hier vorgestellten Strategie führt dies nicht zu wohldefinierten Produkten, sondern eher zu einer statistischen Verteilung der Positionen der Modifikationen, und es werden mehr Modifikationen eingeführt als nötig. In beiden Untersuchungen konnte die volle Transkriptionsaktivität durch Belichten nicht wiederhergestellt werden.

Wir konnten zeigen, dass photoaktivierbare Thymidin-Monomere dazu verwendet werden können, über „vorübergehende Fehlpaarungen“ eine Funktion wie in diesem Fall die Transkription zu inhibieren. Über ihre leicht zugänglichen Phosphoramidite **3a–e** können sie gezielt an jeder gewünschten Stelle in Oligomere eingebaut werden. Durch langwelliges UV-Licht (366 nm) konnten die Oligonucleotide mit dem modifizierten **T<sub>d</sub><sup>c</sup>** relativ schnell, mit hohen Ausbeuten und ohne die Bildung von Nitrosoverbindungen entschützt werden. Ein oder zwei photoaktivierbare Nucleotide an der richtigen Stelle können vollkommen ausreichen, um eine Funktion vollständig zu inhibieren.

Eingegangen am 25. August 2004

**Stichwörter:** DNA · Genexpression · Oligonucleotide · Photoaktivierbare Verbindungen

- [1] a) Y. Dorsett, T. Tuschl, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 318–329; b) D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281–297; c) M. Mandal, R. R. Breaker, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 451–463; d) S. T. Crooke, *Curr. Mol. Med.* **2004**, *4*, 465–487; e) C. R. Dass, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *8*, 395–397; f) D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611–647; g) Y. S. Cho-Chung, Y. G. Park, Y. N. Lee, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1999**, *1*, 386–392; h) M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276–1289; i) N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3408–3428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3220–3238.
- [2] a) „Caged Compounds“: *Methods in Enzymology*, Bd. 291 (Hrsg.: G. Mariott), Academic, London, **1998**; b) A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458.
- [3] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [4] a) K. Alvarez, J. J. Vasseur, T. Beltran, J. L. Imbach, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6319–6328; b) S. Pitsch, P. A. Weiss, X. Wu, D.

Ackermann, T. Honegger, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1753–1761.

- [5] S. G. Chaulk, A. M. MacMillan, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 3173–3178.
- [6] a) A. Dussy, C. Meyer, E. Quennet, T. A. Bickle, B. Giese, A. Marx, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 54–60; b) C. Crey-Desbiolles, J. Lhomme, P. Dumy, M. Kotera, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9532–9533; c) H. J. Lenox, C. P. McCoy, T. L. Sheppard, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2415–2418; d) M. C. Pirrung, X. Zhao, S. V. Harris, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2067–2071; e) P. Ordukhianian, J. S. Taylor, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 94–103.
- [7] a) A. Hasan, K. P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247–4264; b) H. Giegrich, S. Eisele-Bühler, C. Hermann, E. Kvasyuk, R. Charubala, W. Pfleiderer, *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 1987–1996; c) S. Bühler, H. Giegrich, W. Pfleiderer, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1281–1283.
- [8] S. Walbert, W. Pfleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.
- [9] Für eine Kristallstruktur der T7-RNA-Polymerase mit der T7-Promotorregion siehe: G. M. T. Cheetham, D. Jeruzalmi, T. A. Steitz, *Nature* **1999**, *399*, 80–83.
- [10] In allen Fällen wurde experimentell bestätigt, dass die jeweiligen Oligonucleotide nach Bestrahlung die erwarteten Produkte lieferten.
- [11] a) W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895–20900; b) H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.