

DNA- Strukturen

DOI: 10.1002/ange.200501589

Ein hochgradig DNA-Duplex-stabilisierendes Metall-Salen-Basenpaar***Guido H. Clever, Kurt Polborn und Thomas Carell**

Der definierte Einbau von einem oder mehreren Metallionen in Oligonucleotide ist von großem Interesse für die Entwicklung alternativer Basenpaare sowie für die Synthese von DNA und RNA mit neuen katalytischen und elektronischen Eigenschaften.^[1] Gemäß dem der Katalyse zugrunde liegenden Konzept stellt das Metallion die katalytische Eigenschaft bereit, während der umgebende Oligonucleotidstrang einen chiralen Liganden bildet, der über evolutionäre Methoden optimiert werden kann.^[2,3] Kürzlich haben die Arbeitsgruppen um Leumann,^[4] Meggers,^[5] Schultz,^[6] Shionoya,^[7] Switzer^[8] und Tor^[9] metallkoordinierende Nucleinsäuren („Ligandoside“) vorgestellt, die die Platzierung eines Metalls im Innern der DNA-Doppelhelix ermöglichen.

Mit Blick auf eine elektronische Anwendung bauten Shionoya et al. mehrere aufeinander folgende Ligandosid-Basenpaare in einen Doppelstrang ein und konnten so fünf wahrscheinlich übereinander gestapelte Kupferatome durch diesen Oligonucleotidduplex koordinieren.^[1] Auf dem Weg zur Synthese metallbasierter katalytischer DNA ist es von

[*] Dipl.-Chem. G. H. Clever, Dr. K. Polborn, Prof. Dr. T. Carell
Department für Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, Haus F, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

[**] Wir danken der Volkswagenstiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Forschergruppe: Hybridmaterialien) für großzügige Unterstützung. G. Clever dankt der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie e.V. für ein Kekulé-Stipendium. Wir danken Prof. P. Klüfers für hilfreiche Diskussionen und Heather Burks, Tanja Köpping, Kirsten Schwekendiek und Michaela Vedecnik für Unterstützung bei der Synthese.



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

besonderem Interesse, Metall-Basenpaare zu entwickeln, denen Systeme zugrunde liegen, die für ihre herausragenden katalytischen Eigenschaften bekannt sind (von Jacobsen „privilegierte Liganden“ genannt).^[10] Wir haben uns darum für die Entwicklung eines Metall-Basenpaares entschieden, das auf dem *N,N'*-Bis(salicyliden)ethylendiamin(Salen)-Liganden beruht.^[11] Dieser ist einer der heute am meisten genutzten Liganden für die enantioselektive Katalyse: Metall-Salen-Komplexe werden für die Beschleunigung einer Vielzahl von Reaktionen wie Cyclopropanierungen, Epoxidierungen,^[12] Oxidationen^[13] und kinetischen Racematspaltungen^[14] eingesetzt.

Die Entwicklung unseres Metall-Basenpaares basiert auf Studien von Sheppard, Gothelf et al., die Intrastrang-Salen-Komplexe aus Phosphat-gebundenen Salicylaldehyden aufgebaut haben.^[15] Zur Herstellung eines salenbasierten Metall-Basenpaares, das optimal in die DNA-Doppelhelix passt, entschieden wir uns, die Salicylaldehyde über das C4-Atom an die C1'-Position der 2'-Desoxyribose zu kuppeln. Die computergestützte Modellierung des Systems verspricht bei gegenüberliegender Anordnung der Salicylaldehyde in einem Oligonucleotidduplex die Bildung eines Salen-Komplexes nach Zugabe von Ethylendiamin und einem geeigneten Metallkation (Abbildung 1). Der Komplex sollte perfekt im Basenpaarstapel liegen und das Metall in der kleinen Furche exponieren. Anders als bei den bislang untersuchten Metall-

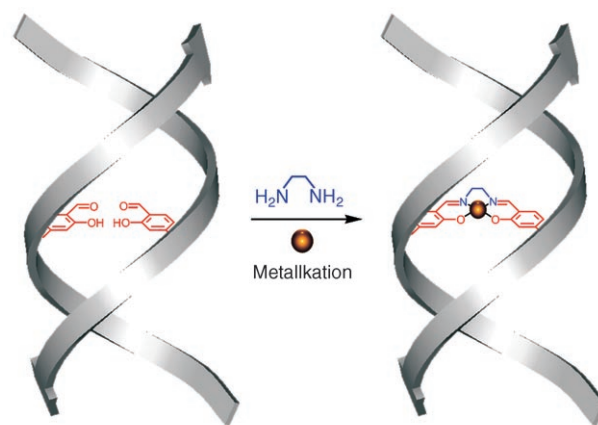
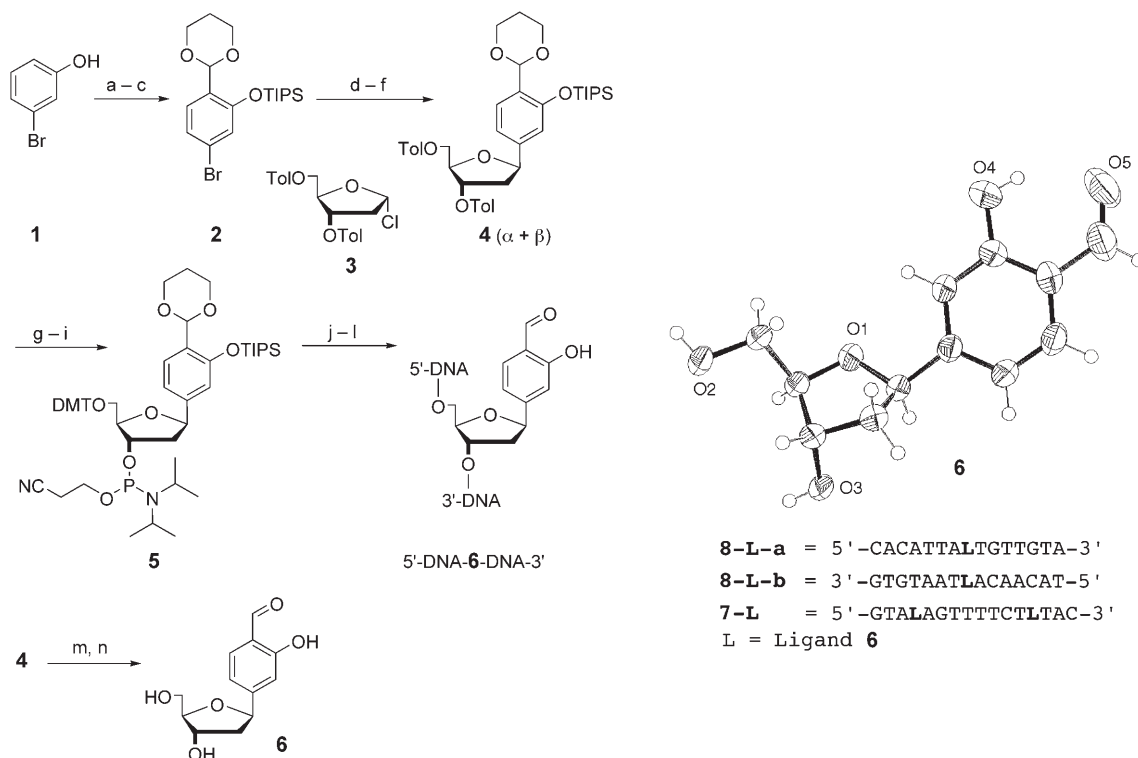


Abbildung 1. Das Salicylaldehyd-Basenpaar (LL) und die Bildung des Metall-Salen-Komplexes im Innern des Doppelstrangs.

Basenpaaren beruht die Bildung des Metall-Salen-Komplexes also auf der zwingenden Gegenwart zweier Komponenten: Metall und Ethylendiamin. Der Einbau von Ethylendiamin verleiht dem Metall-Basenpaar den Charakter einer Vernetzungseinheit zwischen Strang und Gegenstrang, wobei die Bildung des Schiff-Base-Liganden in Wasser reversibel ist.^[16]

Die Schutzgruppen am Liganden wurden wegen ihrer Kompatibilität mit der Ligandosidsynthese und der Chemie



Schema 1. Synthese des Salen-Ligandosids **6** und des entsprechenden Phosphoramidits zusammen mit der Kristallstruktur von **6** und den Sequenzen der DNA-Stränge, die für diese Arbeit synthetisiert wurden. a) $(\text{CH}_2\text{O})_m$, NEt_3 , MgCl_2 , Toluol, 100°C , 10 h, 49%; b) 1,3-Propanediol, $\text{HC}(\text{OEt})_3$, $\text{N}(\text{nBu})_4\text{Br}_3$, RT, 24 h, 86%; c) TIPS-OTf, $\text{NEt}(\text{iPr})_2$, CH_2Cl_2 , RT, 12 h, 87%; d) 2 Äquiv. tBuLi , Et_2O , -78°C , 2 h; e) $\text{CuBr}\cdot\text{SMe}_2$, $-78^\circ\text{C} \rightarrow -30^\circ\text{C}$, 20 min; f) **3**, CH_2Cl_2 , 12 h, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 78% ($\alpha/\beta = 3:2$); g) K_2CO_3 , MeOH, RT, 2 h, 72%; h) DMT-Cl, Pyridin, 3 h, 67%; i) CED-Cl, $\text{NEt}(\text{iPr})_2$, THF, RT, 2 h, 78%; j) automatisierte DNA-Synthese; k) Entschützung der Aldehyde mit wasserhaltiger 2-proz. CHCl_2COOH in CH_2Cl_2 ; l) Abspaltung vom Festphasenträger und Abspaltung der TIPS-Schutzgruppe mit $\text{NH}_3(\text{aq})/\text{EtOH} = 3:1$; m) $\text{N}(\text{nBu})_4\text{F}$, THF; n) 2-proz. CHCl_2COOH , CH_2Cl_2 . CED-Cl = (2-Cyanethyl)-*N,N*-diisopropylphosphorimidochlorid, DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl, Tf = Trifluormethansulfonyl, TIPS = Triisopropylsilyl, Tol = Toluyl. Kristallstruktur: Ligandosid **6** aus EtOAc kristallisiert.^[24]

der DNA-Oligonucleotidsynthese gewählt. Die Triisopropylsilyl(TIPS)-Schutzgruppe des Phenolrestes wird analog den Bedingungen gespalten, die auch zur Abspaltung des Oligonucleotides vom festen Träger angewendet werden. Die Aldehydfunktion wurde als cyclisches Acetal geschützt, das mit 2-proz. Dichloressigsäure in wasserhaltigem Dichlormethan gespalten werden kann. Diese Methode kommt während der DNA-Synthese auch zur Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppen zum Einsatz.

Die Synthese des geschützten Salicylaldehydes beginnt gemäß Schema 1 mit der Orthoformylierung von 3-Bromphenol (**1**) mit Paraformaldehyd in Gegenwart von MgCl_2 und Triethylamin.^[17] Der Formylierung folgt zunächst eine speziell für Salicylaldehyde entwickelte Acetalbildung.^[18] Eine anschließende TIPS-Schätzung führt zum Ligandbaustein **2**. Die C-Glycosidierung^[19] beginnt mit einem Brom-Lithium-Austausch durch *tert*-Butyllithium, gefolgt von Transmetallierung und Reaktion des erhaltenen Arylcuprates mit α -2'-Desoxyribosylchlorid **3**, das in zwei Stufen aus 2'-Desoxyribose hergestellt wurde.^[20] Nach säulenchromatographischer Trennung der Anomere des Nucleosids **4** wurden die Hydroxygruppen des Pentoserestes unter Zemplén-Bedingungen entschützt^[21] und an 5'-OH DMT-geschützt, wonach schließlich das Phosphoramidit **5** erhalten wurde. Die Konfiguration an C1' wurde für beide Anomere von **4** durch Auswertung der NOESY-Kontakte zwischen den Atomen C1'-H, C2'-H und C3'-H bestimmt. Zur Verifizierung der zugeordneten Konfiguration an C1' wurde **4** mit Tetrabutylammoniumfluorid und Dichloressigsäure umgesetzt, was das vollständig entschützte Nucleosid **6** lieferte. Die Kristallstruktur des aus Ethylacetat kristallisierten Salicylaldehydes **6** bestätigt das Vorliegen der gewünschten β -Konfiguration (siehe Schema 1).

Die DNA-Synthese erfolgte nach einem üblichen Phosphoramidit-Verfahren auf einem Expedite DNA Synthesizer mit verlängerten Kupplungszeiten für das Salicylaldehydphosphoramidit. Nach zusätzlicher Behandlung der trägerfixierten Oligonucleotide mit Dichloressigsäure in CH_2Cl_2 und Abspaltung vom Träger mit $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}/\text{EtOH}$ wurden die Stränge **7**, **8-a** und **8-b** über Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC) gereinigt und mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie charakterisiert. Das Vorliegen des freien Salicylaldehydes wurde zusätzlich durch Reaktion der Oligonucleotide mit einem Amin angezeigt, die zum Auftreten einer für Salicylaldimine charakteristischen gelben Färbung führte. Des Weiteren lieferten die Reaktion der DNA-Stränge mit *O*-Benzylhydroxylamin sowie die reduktive Aminierung mit verschiedenen primären Aminen und Natriumcyanoborhydrid quantitativ das entsprechende *O*-Benzylloxim bzw. die sekundären Amine, was massenspektrometrisch belegt wurde. Tabelle 1 zeigt die synthetisierten DNA-Doppelstränge und -Haarnadeln sowie ihre Schmelzpunkte. Das Salicylaldehyd-Basenpaar LL (Tabelle 1, Nr. 7) führt zu einer Herabsetzung des Schmelzpunktes um 9.0 K gegenüber demjenigen eines AT-Basenpaares in einer analogen Sequenz (Tabelle 1, Nr. 1). Zugabe eines Überschusses an Ethylendiamin (en) zu einer Lösung des DNA-Duplex führte zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes um 4.8 K (Tabelle 1, Nr. 4 und 5), begleitet von Änderungen

Tabelle 1: Schmelzpunktexperimente mit den Oligonucleotiden **7** und **8**.

Nr.	Stränge ^[a]	Additive	T_M [°C]
1	8-A-a/-T-b	[d]	50.1
2	8-L-a/b	[b]	39.9
3	8-L-a/b	100 μM en	82.4
4	8-L-a/b	[c]	40.7
5	8-L-a/b	100 μM en	45.5
6	8-L-a/b	100 μM en	68.8 ^[e]
7	8-L-a/b	[d]	41.1
8	8-L-a/b	100 μM en	48.8 ^[e]
9	8-L-a/b	100 μM en	36.5
10	8-L-a/b	200 μM MeNH ₂	52.3
11	8-L-a/b	4 μM Cu ²⁺ ^[b]	54.9
12	8-L-a/b	6 μM Mn ²⁺ ^[c]	40.7
13	7-L	[b]	19.9
14	7-L	100 μM en	65.2
15	7-L	[c]	22.1
16	7-L	100 μM en	[f]
17	7-T/A		46.5

[a] Sequenzen siehe Schema 1. In **8-A-a** und **8-T-b** ist der Salicylaldehyd durch ein A bzw. T ersetzt. Alle Proben enthielten 3 μM DNA (Duplex oder Haarnadel) und 150 mM NaCl. Die Schmelzkurven wurden zwischen 0 und 85 °C (für Cu²⁺: 95 °C) mit einer Temperaturänderung von 0.5 K min⁻¹ gemessen. Weitere Details in den Hintergrundinformationen. [b] Alle Experimente mit Cu²⁺ und die entsprechenden Kontrollen wurden in 10 mM *N*-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure(Ches)-Puffer bei pH 9.0 durchgeführt. [c] Alle Experimente mit Mn²⁺ und die entsprechenden Kontrollen wurden in 10 mM *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin-*N'*-(2-ethansulfonsäure)(Hepes)-Puffer bei pH 9.0 durchgeführt. [d] Gemessen in 10 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol(Tris)-Puffer bei pH 7.4. [e] Reproduzierbare Unterschiede zwischen der De- und Renaturierungskurve wegen des thermischen Zerfalls des Komplexes (siehe Hintergrundinformationen). [f] Kein T_M bestimmt (siehe Hintergrundinformationen).

der Fluoreszenz- und Emissionsspektren, die für die Bildung von Salicylaldiminen typisch sind.

Die anschließende Titration der Ethylendiamin enthaltenden Oligonucleotidlösung mit zweiwertigen Metallionen führte zu einer stark ausgeprägten Duplexstabilisierung (Abbildung 2a und b), begleitet von Änderungen der CD-Spektren (Abbildung 3a und b). Ein Äquivalent Cu²⁺ bewirkte einen Anstieg des Schmelzpunktes um mehr als 30 K (verglichen mit dem normalen AT-Basenpaar) auf 82.4 °C (Tabelle 1, Nr. 3; +42.5 K verglichen mit dem Duplex, der das LL-„Basenpaar“ enthält; Tabelle 1, Nr. 2 und Abbildung 2a). Zugabe von mehr Cu²⁺ hatte keine weitere Wirkung. Unseres Wissens ist dies die größte Duplexstabilisierung, die jemals für ein Metall-Basenpaar gemessen wurde. Zugabe eines Äquivalents Mn²⁺ (das nach der Komplexbildung durch Salen-Liganden zu Mn³⁺ oxidiert wird)^[22] erhöhte T_M um 28.1 K auf 68.8 °C (Tabelle 1, Nr. 4 und 6 und Abbildung 2b). Auch hier bewirkte die Zugabe von mehr Mn²⁺ keinen weiteren Effekt. Zugabe von Zn²⁺ erhöhte T_M um 7.7 K (Tabelle 1, Nr. 7 und 8). Interessanterweise verursachte die Zugabe von Ni²⁺ reproduzierbar eine Herabsetzung des Schmelzpunktes um 4.6 K (Tabelle 1, Nr. 7 und 9, Hintergrundinformationen). Die Experimente mit Zn und Ni erforderten allerdings hohe Metallkonzentrationen. Wurde Ethylendiamin durch Propylendiamin ersetzt, führte nur die Zugabe von Cu²⁺ zu einer Schmelzpunkterhöhung (Zusatz

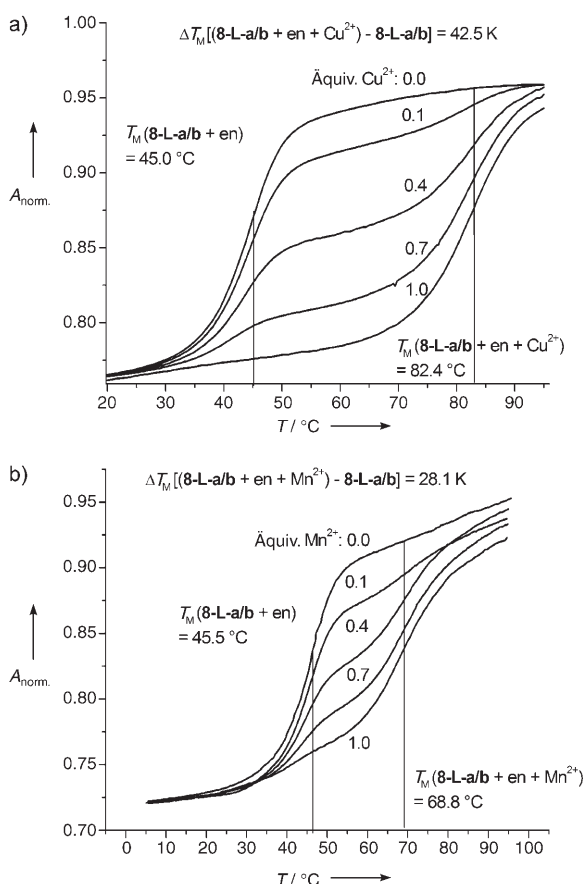


Abbildung 2. Schmelzprofile von 3 µM 8-L-a/b mit 100 µM Ethylendiamin (en) in Gegenwart verschiedener Mengen von a) Cu²⁺ (0–1 Äquiv.) und b) Mn²⁺ (0–1 Äquiv.). Die Proben enthielten 150 mM NaCl und 10 mM Puffer (Ches pH 9 für Cu²⁺, Hepes pH 9 für Mn²⁺).

von Butylendiamin hatte keinen Effekt). Alleinige Zugabe von Cu²⁺ ohne Ethylendiamin resultierte in einem Schmelzpunktanstieg von 15.0 K relativ zum Duplex mit dem LL-„Basenpaar“ (Tabelle 1, Nr. 2 und 11). Im Unterschied dazu veränderte Mn²⁺ in Abwesenheit von Ethylendiamin den Schmelzpunkt nicht. In Abwesenheit von einer oder beiden Salicylaldehydnucleobasen traten in keinem der Kontrollexperimente Schmelzpunktveränderungen auf, was eindeutig dafür spricht, dass die Bildung des Salenkomplexes für die drastischen Schmelzpunktveränderungen verantwortlich ist. Die Komplexbildung konnte durch Zugabe eines Überschusses an EDTA rückgängig gemacht werden. Um den Beitrag der Vernetzung zu untersuchen, wurden zum Duplex 8-L-a/b Cu²⁺ und Methylamin gegeben. In diesem Fall konnte eine Erhöhung des Schmelzpunktes von nur ca. 12 K beobachtet werden (Tabelle 1, Nr. 10).

Die Bildung des Salenkomplexes in der Helix konnte auch durch CD-Spektroskopie am Duplex 8-L-a/b und der Haarnadel 7-L bei Fehlen und in Gegenwart von Metall und Ethylendiamin verfolgt werden (Abbildung 3). Die zwischen 80 und 10 °C gemessenen CD-Spektren zeigen klar, dass die DNA in allen Fällen in der B-Konformation vorliegt (Hintergrundinformationen).^[23] Zugabe von Ethylendiamin und entweder Mn²⁺ oder Cu²⁺ resultierten in Änderungen der

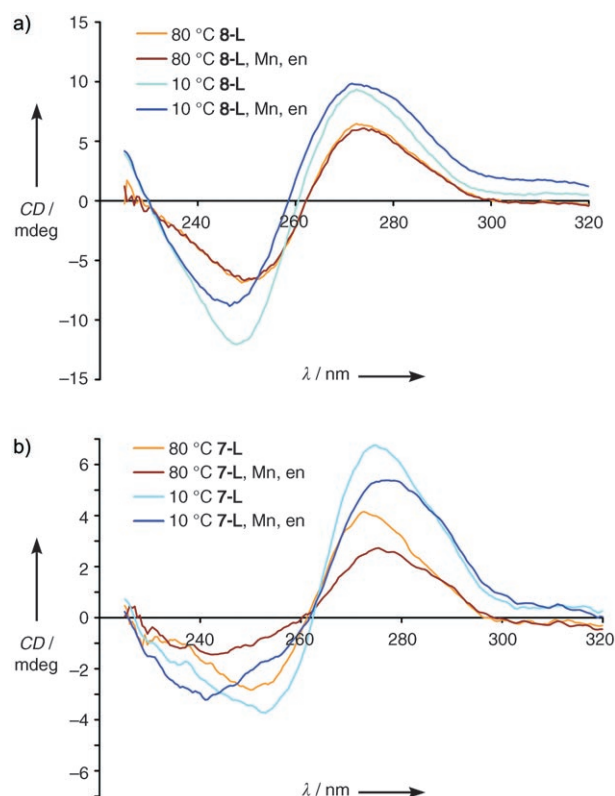


Abbildung 3. Vergleich der CD-Spektren bei 10 und 80 °C von a) 8-L-a/b und b) 7-L in Abwesenheit und Gegenwart von Ethylendiamin und Mn²⁺.

CD-Spektren unterhalb der jeweiligen Schmelzpunkte, was auf die Bildung der Salenkomplexe schließen lässt (nur die Mn²⁺-Spektren sind abgebildet). Oberhalb des Schmelzpunktes sind die CD-Spektren des Duplex unabhängig von der Gegenwart des Metalls ununterscheidbar. Die CD-Spektren der Haarnadeln 7-L unterscheiden sich jedoch bei 80 °C sehr stark für die Proben mit und ohne Metall, was darauf hindeutet, dass der Salenkomplex selbst bei sehr hohen Temperaturen in der Haarnadelstruktur intakt bleibt (analoge Ergebnisse wurden für die Proben mit Cu²⁺ beobachtet).

Wir haben hier den Einbau eines salenbasierten Metall-Basenpaares in einen DNA-Doppelstrang, der das Metall im Innern der Helix trägt, beschrieben. Wir glauben, dass die drastische Erhöhung des Schmelzpunktes um mehr als 40 K auf die reversible Vernetzung der Salicylaldehyde mit Ethylendiamin zurückzuführen ist. Zusätzlich spielt eventuell die axiale Koordination des Metalls durch Heteroatome der DNA-Basen oberhalb und unterhalb der Ebene des Metall-Basenpaares eine Rolle.

Eingegangen am 10. Mai 2005,
 veränderte Fassung am 4. Juli 2005
 Online veröffentlicht am 18. Oktober 2005

Stichwörter: DNA · DNA-Strukturen · Metall-Basenpaare · Nucleobasen

- [1] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, 299, 1212.
- [2] a) S. Klug, M. Famulok, *Mol. Biol. Rep.* **1994**, 20, 97; b) D. Zha, A. Eipper, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2003**, 4, 34.
- [3] G. Roelfes, B. L. Feringa, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3294; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3230.
- [4] C. Brotschi, C. J. Leumann, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, 22, 1195.
- [5] L. Zhang, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 74.
- [6] a) N. Zimmerman, E. Meggers, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13684; b) E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10714.
- [7] a) T. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12494; b) K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8802.
- [8] a) C. Switzer, S. Sinha, P. H. Kim, B. D. Heuberger, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1553; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1529; b) C. Switzer, D. Shin, *Chem. Commun.* **2005**, 1342.
- [9] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3375.
- [10] T. P. Yoon, E. N. Jacobsen, *Science* **2003**, 299, 1691.
- [11] a) J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *Top. Organomet. Chem.* **2004**, 6, 123; b) T. Katsuki, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 437.
- [12] T. Katsuki, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344, 131.
- [13] T. Katsuki, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, 140, 189.
- [14] a) M. Tokunaga, J. F. Larrow, F. Kakiuchi, E. N. Jacobsen, *Science* **1997**, 277, 936; b) W. Sun, H. Wang, C. Xia, J. Li, P. Zhao, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1072; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1042.
- [15] a) J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8618; b) J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *ChemBioChem* **2004**, 5, 127; c) M. Nielsen, A. H. Thomsen, E. Cló, F. Kirpekar, K. V. Gothelf, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2240; d) K. V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Cló, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1044.
- [16] S. Akine, T. Taniguchi, T. Nabeshima, *Chem. Lett.* **2001**, 7, 682.
- [17] N. U. Hofsløkken, L. Skattebøl, *Acta Chem. Scand.* **1999**, 53, 258.
- [18] R. Gopinath, S. J. Haque, B. K. Patel, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 5842.
- [19] R. Bihovsky, C. Selick, I. Guisti, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4026.
- [20] a) M. Hoffer, *Chem. Ber.* **1960**, 93, 2777; b) I. Singh, W. Hecker, A. K. Prasad, V. S. Parmar, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2002**, 500.
- [21] G. Zemplén, E. Pascu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, 62, 1613.
- [22] J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1939.
- [23] G. M. Segers-Nolten, N. M. Sijtsema, C. Otto, *Biochemistry* **1997**, 36, 13241.
- [24] CCDC 271234 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.