

Klick-Klick-Klick: Ein- bis Dreifachmodifizierung von DNA**

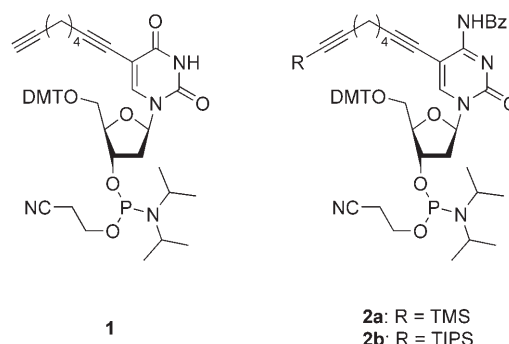
Philipp M. E. Gramlich, Simon Warncke, Johannes Gierlich und Thomas Carell*

Die Funktionalisierung von DNA mit z.B. Fluoreszenzfarbstoffen oder Biotin ist von außerordentlicher Bedeutung für die molekulare Diagnostik auf DNA-Basis^[1] und die Nanotechnologie.^[2,3] Die Nachfrage nach solchen modifizierten Oligonucleotiden ist groß, allerdings sind die Funktionalisierungsprozesse präparativ anspruchsvoll, und die modifizierten Oligonucleotide werden meist in geringer Ausbeute erhalten. Momentan werden entsprechende Marker über die jeweiligen Phosphoramidite^[4] bei der Festphasensynthese der Oligonucleotide eingebaut, wodurch sich die Ausbeute bei den Kupplungsschritten häufig erheblich verringert. Zusätzlich ist die Methode auf solche Marker beschränkt, die den rauen Bedingungen der DNA-Synthese und -Entschützung widerstehen. Alternativ werden die Marker im Anschluss an die Oligonucleotidsynthese eingeführt,^[5] z.B. durch Reaktion des jeweiligen aktivierten Esters mit Aminoalkyl-modifizierten Oligonucleotiden.^[6] Nachteil dieser Methode sind die geringen Kupplungsausbeuten, die die Aufreinigung der funktionalisierten Oligonucleotide sehr erschweren.

Aufgrund der steigenden Nachfrage nach funktionalisierten Oligonucleotiden werden neue Methoden für den effizienten Einbau mehrerer verschiedener Marker benötigt. Seela, Sirivolu^[7] und wir^[2,8] haben unlängst herausgefunden, dass die Kupfer(I)-katalysierte Version der Azid-Alkin-Reaktion zu Triazolen, die von Meldal et al.^[9] sowie Sharpless et al.^[10] entwickelt wurde, die hocheffiziente Funktionalisierung Alkin-modifizierter DNA-Nucleobasen ermöglicht. Entscheidend ist das Vorhandensein einer ausreichenden Menge eines Liganden,^[11] der Kupfer(I) komplexiert, um die Kupfer-katalysierte Spaltung von DNA in wässrigem Medium zu verhindern.^[12] Wir berichten hier, dass diese Methode auf die Modifizierung von Oligonucleotiden mit bis zu drei (und möglicherweise mehr) verschiedenen Markern erweitert werden kann. Diese Funktionalisierungen können entweder direkt an der festen Phase^[13] oder nach der Entschützung des Oligonucleotids in Lösung durchgeführt werden. Die zweite

Methode ermöglicht den Einbau hochempfindlicher Marker mit beispielloser Effizienz.

Das erste Ziel war es, eine Methode zu finden, die den Einbau von zwei verschiedenen Markern^[14] während der Festphasensynthese der Oligonucleotide ermöglicht. Zu diesem Zweck wollten wir ein freies Alkin für die erste Klickreaktion sowie ein zweites, TMS-geschütztes Alkin für die zweite Klickreaktion nach Entschützung mit einer schwachen Säure an der festen Phase einführen (Schema 1).



Schema 1. Phosphoramidite **1** und **2**. DMT = 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl, TMS = Trimethylsilyl, TIPS = Triisopropylsilyl, Bz = Benzoyl.

Um die Machbarkeit einer Klickreaktion an der festen Phase zu prüfen, synthetisierten wir einen Teststrang, der eine von Alkin **1** abgeleitete Base enthielt, und führten eine Klickreaktion direkt an der festen Phase mit anschließender Entschützung der DNA durch. Der Vergleich des HPLC-Chromatogramms des funktionalisierten DNA-Strangs mit dem des entsprechenden nichtfunktionalisierten Strangs ergab einen fast quantitativen Umsatz, was belegt, dass die Klickreaktion hocheffizient direkt an der festen Phase (Glas mit kontrollierter Porengröße, CPG) abläuft, die zur DNA-Synthese verwendet wird (Daten nicht gezeigt).

Um zwei Marker einzuführen, haben wir die Thymidin- und Cytidin-Bausteine **1** bzw. **2a** mit der Phosphoramidit-Methode in die Oligodesoxyribonucleotide ODN-**1** bzw. ODN-**2** eingebaut (Tabelle 1). Die Ausbeuten der Kupplungen beider Phosphoramidite waren exzellent. Nach vollständigem Aufbau der Oligonucleotide an der festen Phase wurde diese getrocknet und die erste Klickreaktion durch Schütteln mit einer Lösung aus CuBr, dem Liganden Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA),^[11] Natriumascorbat und Benzylazid (**3**; Schema 2) durchgeführt. Im Anschluss wurde die feste Phase gewaschen und mit einprozentiger Essigsäure gespült, um die TMS-Schutzgruppe am zweiten Alkinrest abzuspalten. Nachfolgend wurde die zweite Klickreaktion analog zur ersten mit dem Azid **8** durchgeführt. Schließlich

[*] Dipl.-Chem. P. M. E. Gramlich, Dipl.-Chem. S. Warncke, Dr. J. Gierlich, Prof. Dr. T. Carell
Department Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians-Universität
Butenandtstraße 5-13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

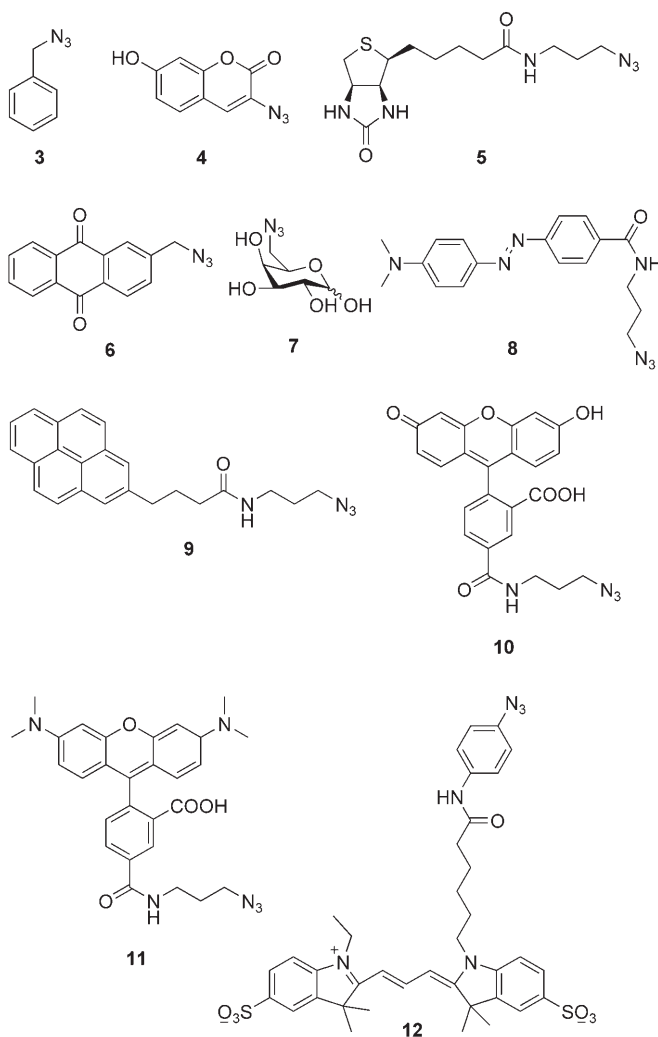
[**] P.M.E.G. und J.G. danken dem Cusanuswerk bzw. dem Fonds der chemischen Industrie (FCI) für ein Doktorandenstipendium. Wir danken Dr. G. Clever für die Herstellung der Anthrachinon- und Pyrenazide. Die Arbeit wurde unterstützt vom Exzellenzcluster NIM (Nanoinitiative Munich), vom FCI und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 749 und 486).

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

Tabelle 1: In dieser Studie verwendete ODNs.^[a]

ODN	Sequenz
ODN-1	5'-GCGC X GTTTCATT Y GCG-3'
ODN-2	5'-CGC Y ACACGA X CCG-3'
ODN-3	5'-GCGC Z GTTTCATT X GCG-3'
ODN-4	5'-GCGC Y GTT X ATT Z CGC-3'

[a] **X**=DNA-Nucleotid basierend auf **1**, **Y**=DNA-Nucleotid basierend auf **2a**, **Z**=DNA-Nucleotid basierend auf **2b**.


Schema 2. Verwendete Azidbausteine.

wurde die DNA von der festen Phase abgespalten, und alle Schutzgruppen wurden entfernt, indem das Festphasenmaterial mit Ammoniak in H₂O/EtOH (3:1) versetzt wurde. Das erhaltene MALDI-TOF-Spektrum des Rohprodukts stimmte völlig mit der erwarteten Masse des doppelt modifizierten Oligonucleotids überein (Tabelle 2, Nr. 1 und Hintergrundinformationen), was bestätigt, dass zwei stabile funktionelle Gruppen in DNA an der festen Phase direkt eingeführt werden können.

Um die Funktionalisierung von Oligonucleotiden mit Markern zu ermöglichen, die zu instabil für die rauen Be-

Tabelle 2: Modifizierung der ODNs 1–4 nach der Oligonucleotidsynthese.^[d]

Nr.	DNA	Marker 1	Marker 2	Marker 3	Ausb. ^[a]
1	ODN-1	3*	8*	–	[b]
2	ODN-2	3*	4	–	75 ^[c]
3	ODN-3	5	4	–	67
4	ODN-3	4	6	–	59
5	ODN-3	4	7	–	59
6	ODN-3	3	5	–	70
7	ODN-3	3	4	–	85
8	ODN-3	3	7	–	67
9	ODN-3	3	9	–	66
10	ODN-3	8	4	–	83
11	ODN-3	9	3	–	92
12	ODN-3	9	5	–	62
13	ODN-3	9	4	–	90
14	ODN-3	10	5	–	74
15	ODN-3	8	11	–	58
16	ODN-4	3*	8	7	45 ^[c]
17	ODN-4	3*	7	5	52 ^[c]

[a] Bestimmt durch Integration des Chromatogramms des Rohprodukts bei 260 nm nach der letzten Klickreaktion. [b] Nicht bestimmt. [c] HPLC-Reinigung nach der Klickreaktion an der festen Phase. [d] *: Klickreaktion an der festen Phase.

dingungen bei der Abspaltung sind, wurde die zweite Klickreaktion in Lösung nach der Entschützung des Oligonucleotids durchgeführt. Die Umsetzung des einfach modifizierten ODN-2 (Tabelle 1) mit konz. NH₃ in Wasser/Ethanol führte zur Abspaltung von der festen Phase. Unter diesen Bedingungen wurden die Schutzgruppen der Basen sowie die TMS-Gruppe, die den zweiten Alkinrest schützt, entfernt. Die erhaltene, einfach modifizierte DNA mit einem freien Alkinrest wurde in einer zweiten Klickreaktion in Lösung umgesetzt (CuBr, TBTA, **4**), wodurch man die doppelt modifizierte DNA in ausgezeichneter Ausbeute und Reinheit erhielt (Tabelle 2, Nr. 2).

Bislang unerreicht war das Ziel, DNA mit zwei empfindlichen Markern herzustellen. Dies gelingt nun bequem mit den Bausteinen **1** und **2b**, die mithilfe der Phosphoramidit-Methode in ODN-3 eingeführt werden (Tabelle 1). Nach Entschützung und Abspaltung des Oligonucleotids von der festen Phase wurde die erste Klickreaktion durchgeführt (unter den oben beschriebenen Bedingungen), wodurch das einfach modifizierte Oligonucleotid in erwarteter hoher Ausbeute von durchschnittlich > 90% unter kompletter Erhaltung der TIPS-Schutzgruppe entstand. Für die zweite Klickreaktion spalteten wir die TIPS-Schutzgruppe mit einer Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in Acetonitril/DMF (4:1 v/v) ab, ohne die DNA zu beschädigen. Die zweite Klickreaktion in Lösung ergab doppelt modifizierte Oligonucleotide in Ausbeuten von 60–90% über drei Stufen. Wir führten den Doppelklick mit einer ganzen Serie verschiedener Marker durch und erhielten immer ausgezeichnete Ausbeuten (Tabelle 2, Nr. 3–15). Erwähnenswert ist, dass in allen Fällen eine einfache Ethanolgefällung nach jedem Reaktionsschritt zur Reinigung ausreichte. Abbildung 1 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm und ein MALDI-TOF-Spektrum des Rohprodukts, die nach einer doppelten Modifizierung von ODN-3 erhalten wurden. Für sehr empfindliche

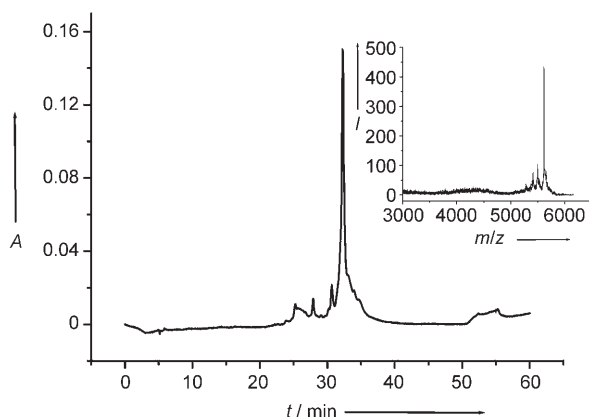


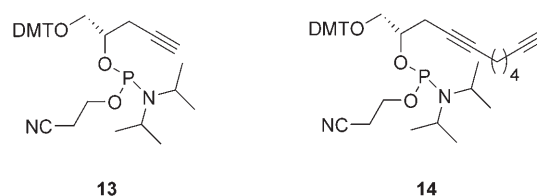
Abbildung 1. HPLC-Spektrum (260 nm) des Rohprodukts ODN-3, modifiziert mit **8** und **4** (Tabelle 2, Nr. 10), und MALDI-TOF-Spektrum (Einschub).

Anwendungen empfiehlt sich eine abschließende Reinigung durch HPLC. In seltenen Fällen, beispielsweise beim Cy3-Azid **12**, wurde der Linker zu einem kleinen Teil abgespalten, was die Entwicklung eines stabileren Linkers nötig macht.

Durch Klickreaktion mit anschließender Ethanol-fällung war es auch möglich, Oligonucleotide mit drei verschiedenen Markern zu versehen. Dazu führten wir die Bausteine **1**, **2a** und **2b** in Oligonucleotide wie ODN-4 ein (Tabelle 1). Die erste Klickreaktion wurde direkt an der festen Phase durchgeführt. Das einfach modifizierte Oligonucleotid wurde danach von der festen Phase, unter gleichzeitiger Abspaltung der TMS-Gruppe, abgespalten und durch HPLC gereinigt. Die zweite Klickreaktion wurde in Lösung mit der erwarteten hohen Ausbeute durchgeführt. Ethanol-fällung des doppelt modifizierten Oligonucleotids, Abspaltung der TIPS-Gruppe mit TBAF und eine anschließende dritte Klickreaktion in Lösung führten nach einer letzten Ethanol-fällung zum gewünschten, dreifach modifizierten Oligonucleotid mit Ausbeuten um die 50% (Tabelle 2, Nr. 16 und 17).

Zwar ist das Modifizieren von Oligonucleotiden direkt an bestimmten Basen sehr wünschenswert (hier dC und dT), oft wird jedoch eine Einführung von Markern außerhalb der Nucleobasen, z.B. an der Phosphatgruppe oder an der Zuckereinheit, gewünscht. Zu diesem Zweck haben wir die nicht-nucleosidischen DNA-Modifikatoren **13** und **14** mit Alkinsubstituenten hergestellt (Schema 3). Klickreaktionen mit diesen Bausteinen in DNA verliefen genauso effizient.^[15]

Wir haben hier über ein hocheffizientes, modulares und robustes Protokoll für die mehrfache Modifizierung von DNA berichtet. Die Effizienz der Methode hat drei Gründe: 1. Die TMS-Schutzgruppe wird quantitativ mit Ammoniak während der DNA-Entschützung entfernt. 2. Der TIPS-geschützte Alkinrest bleibt während dieser Umsetzung mit Ammoniak quantitativ erhalten. 3. Die Abspaltung des TIPS-



Schema 3. Nicht-nucleosidische DNA-Modifikatoren **13** und **14**.

geschützten Alkinrests verläuft effizient und mild. Wir glauben, dass das hier vorgestellte Verfahren die Art und Weise der Herstellung modifizierter Oligonucleotide verändern kann.

Eingegangen am 11. Dezember 2007

Online veröffentlicht am 28. März 2008

Stichwörter: Alkine · Azide · Cycloadditionen · Klickchemie · Oligonucleotide

- [1] D. M. Hammond, A. Manetto, J. Gierlich, V. A. Azov, P. M. E. Gramlich, G. A. Burley, M. Maul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4262; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4184.
- [2] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, S. T. H. Nir, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398.
- [3] J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1849; Q. Gu, C. Cheng, R. Gonela, S. Suryanarayanan, S. Anabathula, K. Dai, D. T. Haynie, *Nanotechnology* **2006**, *17*, R14.
- [4] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871; S. Kodama, S. Asano, T. Moriguchi, H. Sawai, K. Shinozuka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2685.
- [5] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13.
- [6] L. M. Smith, S. Fung, M. W. Hunkapiller, T. J. Hunkapiller, L. E. Hood, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 2399.
- [7] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. Biodiversity* **2006**, *3*, 509.
- [8] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639.
- [9] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- [10] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [11] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853.
- [12] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109; S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7003.
- [13] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 535; C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Jochum, Y. Chevolut, J.-P. Cloarec, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4700.
- [14] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505.
- [15] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1997.