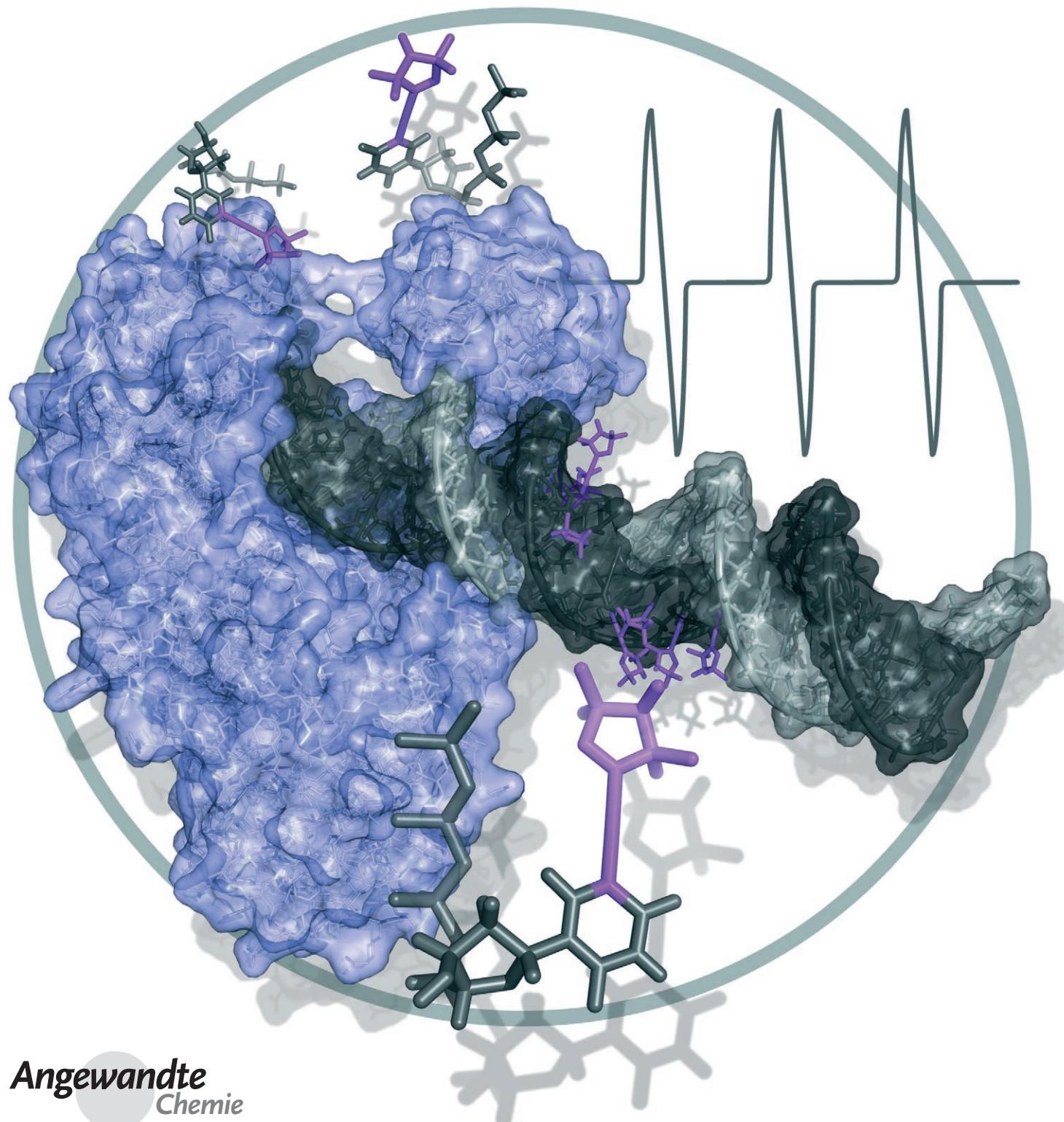


Enzymatische Synthese mehrfach spinmarkierter DNA**

Samra Obeid, Maxim Yulikov, Gunnar Jeschke und Andreas Marx*



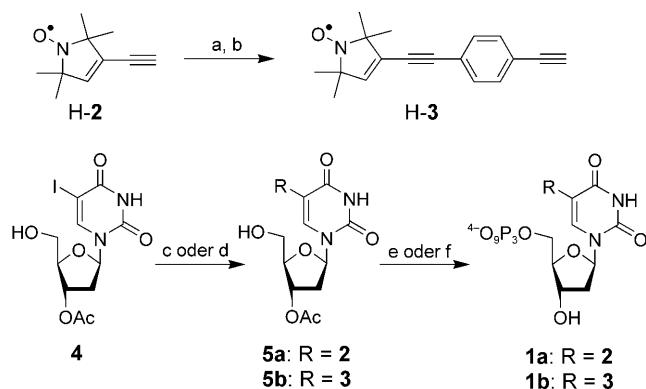
Die Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie dient vielfach dazu, strukturelle und dynamische Eigenschaften von biologischen Makromolekülen zu untersuchen. Viele der Anwendungen beruhen auf der Sensitivität von Nitroxid-Sonden^[1] bezüglich der Moleküldynamik im Bereich von Piko- bis Mikrosekunden und der Möglichkeit, Abstände zwischen zwei Sonden im Nanometer-Längenbereich zu messen.^[2] Diese Techniken sind auch auf ungeordnete Systeme uneingeschränkt anwendbar. Sie weisen eine höhere Sensitivität als NMR-Messungen auf und liefern detailliertere Informationen als Techniken, die auf optischer Anregung basieren. Die meisten Biomakromoleküle sind in ihrem Grundzustand diamagnetisch und geben folglich keine ESR-Hintergrundsignale. Demnach lassen sich durch Spinmarkierung selektiv interessante Positionen in großen Molekülen oder komplexen Aggregaten untersuchen.^[3] Um den Einfluss der Eigenbewegung der Spinsonde auf die Spektren zu minimieren und denjenigen der Rückgrat-Bewegung des Biomakromoleküls zu maximieren, ist eine Verknüpfung über einen starren Linker notwendig.^[4] Solche starren Linker sind auch für Abstandsmessungen zu bevorzugen, da sie zu einer engen Abstandsverteilung und damit zu kleineren Ungenauigkeiten in abstandsbasierten Strukturmodellen führen. Allerdings bergen starre Linker das Risiko einer Störung der nativen Struktur in sich, da sich die Sonden nicht den sterischen Anforderungen ihrer Umgebung anpassen können. Aus diesem Grund müssen Strategien zur Markierung mit großer Sorgfalt entworfen und getestet werden.^[5]

In der jüngsten Vergangenheit wurde die ESR-Spektroskopie ausgiebig zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von Nucleinsäuren eingesetzt.^[1,6] Da Nucleinsäuren kein paramagnetisches Zentrum aufweisen, müssen vor ESR-Untersuchungen Spinsonden eingeführt werden. Dafür existieren bereits einige Methoden, z.B. die Anbindung stabiler Nitroxide an einer spezifischen Position in der DNA. Solche Spinsonden wurden entweder über spinmarkierte Bausteine während der automatisierten DNA-Synthese eingeführt,^[7] oder es wurden zunächst funktionalisierte Bausteine in die wachsende DNA eingeführt und die Spinsonden anschließend an der Festphase an die funktionellen Gruppen gebunden, z.B. durch Pd-katalysierte Kupplung.^[8] Mit diesen Techniken konnten relativ kurze, einfach spinmarkierte Oligonucleotide erhalten werden. Allerdings sind dabei die Länge der Oligonucleotide und der Grad ihrer Modifikation durch die Einschränkungen limitiert, die der automatisierten DNA-Synthese eigen sind. Nach unserem Wissen ist der

mehrfache spezifische Einbau von Spinsonden in DNA mithilfe dieser Methoden noch nicht gelungen. Andere Ansätze basieren auf der Einführung zusätzlicher Funktionalitäten in Nucleinsäuren, an die nach der chemischen oder enzymatischen Synthese passend aktivierte Spinsonden konjugiert werden.^[9] Diese Methoden erlauben den Einbau von mehreren Sonden in ein Molekül. Die eingesetzten kurzen Linker zwischen den Nucleinsäuren und dem paramagnetischen Zentrum sind allerdings noch recht flexibel, was für die Interpretation der ESR-Spektren von Nachteil ist.

Wir berichten nun über die positionsspezifische Einführung von Spinsonden in DNA mithilfe passend modifizierter Nucleosidtriphosphate als Bausteine in der durch DNA-Polymerase katalysierten, templatgesteuerten Reaktion. Auf diese Art ist die Synthese mehrfach spinmarkierter, längerer DNA-Oligonucleotide möglich, wobei sich DNA-Polymerasen eukaryotischen, prokaryotischen und archaischen Ursprungs als für die Einführung spinmarkierter Nucleotide geeignet erwiesen haben.

Zunächst synthetisierten wir die spinmarkierten Nucleosidtriphosphate **1**, die ein auf Nitroxid-Radikalen basierendes paramagnetisches Zentrum an die Nucleobase gebunden enthalten (Schema 1). Wir haben für die Modifikation die C5-Position von 2'-Desoxyuridin gewählt, da Modifikationen hier die Watson-Crick-Basenpaarung nicht merklich beeinträchtigen. Zudem ist bekannt, dass DNA-Polymerasen Modifikationen an dieser Stelle tolerieren und in einem gewissen Ausmaß Thymidin durch derartig modifizierte Basen ersetzen können.^[10,11] Außerdem wurde die Pd-katalysierte Kupplung von Alkinen an die entsprechenden 5-Iod-2'-desoxyuridin-Analoga bereits entwickelt.^[12,13] Um die Akzeptanz von **1** in Abhängigkeit von der Länge des Linkers zwischen Spinsonde und Nucleotid abschätzen zu können, haben wir ausgehend von der bekannten Spinsonde H-**2**^[7b,14] das Alkin-modifizierte Nitroxid H-**3** mithilfe einer Sonogashira-Kreuzkupplung synthetisiert. Die Nitroxide H-**2** und H-**3** wurden dann mit dem geschützten 5-Iod-2'-desoxyuridin-Derivat **4** verknüpft



Schema 1. Synthese der spinmarkierten TTP-Analoga **1**. Bedingungen und Reagentien: a) (2-(4-iodophenyl)ethynyl)trimethylsilan, $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, CuI , DMF, Mikrowelle, 15 min, 100°C, 64%; b) Tetrabutylammonium-fluorid, CH_2Cl_2 , 5 min, 0°C, 83%; c) H-**2**, $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, CuI , DMF, 43% (**5a**); d) H-**3**, $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, CuI , DMF, 67% (**5b**); e) 2-Chlor-4H-benzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-on, $(\text{nBu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, I_2 , Pyridin, H_2O , dann NH_3 , 31% (**1a**); f) 2-Chlor-4H-benzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-on, $(\text{nBu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, dann I_2 , Pyridin, H_2O , dann NH_3 , 31% (**1b**).

[*] S. Obeid, Dr. M. Yulikov,^[+] Prof. Dr. G. Jeschke,^[+] Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie und
Konstanz Research School
Chemical Biology
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-5140
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[+] Neue Anschrift: Departement Chemie, ETH Zürich (Schweiz)

[**] Wir bedanken uns für finanzielle Unterstützung seitens der DFG.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802314> zu finden.

und die resultierenden Nucleoside **5** in die Nucleosidtriphosphate **1** überführt.^[15]

Zur Analyse des Einflusses der Nucleosidtriphosphate **1** auf DNA-Polymerasen bestimmten wir die Aktivitäten des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I von *E. coli* (Mutante mit defizienter 3'→5'-Exonuclease-Funktion, KF(exo-)) und der humanen DNA-Polymerase β (Pol β) in Primerverlängerungsexperimenten in Abhängigkeit von **1**. Zunächst verwendeten wir einen am 5'-Terminus 32 P-markierten Komplex aus einem 23meren Primer und einem 35meren Templat, der den Einbau eines Thymidin-Derivats an Position 27 nach dem Einbau von drei Nucleotiden bedingt (Abbildung 1a).

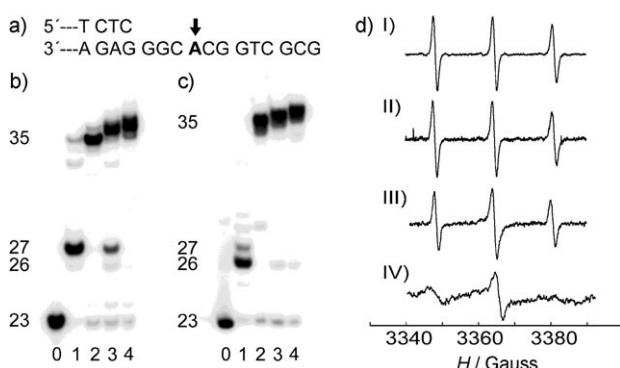


Abbildung 1. Einbau von **1a,b** und ESR-Untersuchungen. a) Teilsequenzen der verwendeten Primer und Template. b) Primerverlängerungsexperimente mit KF(exo-): Spur 0: nur Primer, Spur 1: nach Primerverlängerung in Gegenwart von dATP, dGTP, dCTP, doch ohne TTP-Analoga; Spur 2: wie Spur 1, aber in Gegenwart von TTP; Spur 3: wie Spur 1, aber in Gegenwart von **1a**; Spur 4: wie Spur 1, aber in Gegenwart von **1b**. c) wie in (b) mit Pol β anstelle von KF(exo-). d) ESR-Spektren von **1a** (I), **1b** (II), dem bei der Reaktion in (b), Spur 3, erhaltenen Produkt (III) und dem bei der Reaktion in (b), Spur 4 erhaltenen Produkt (IV). Weitere experimentelle Einzelheiten befinden sich in den Hintergrundinformationen.

Bei beiden Enzymen setzte die Primerverlängerung an den Positionen 26 oder 27 aus, wenn ausschließlich dATP, dGTP und dCTP zugegen waren (Abbildung 1b,c; Spuren 1). Wenn dagegen alle vier natürlichen dNTPs zugegeben wurden, entstand mit beiden Enzymen das Volllängenprodukt. Wurde natürliches Thymidintriphosphat (TTP) durch **1a** oder **1b** ersetzt, bildeten sich Produkte, die in der Polyacrylamidgel-elektrophorese(PAGE)-Analyse langsamer wanderten als die aus TTP abgeleiteten ursprünglichen Volllängenprodukte. Die Verzögerung kann gut damit erklärt werden, dass das Oligonucleotid durch die Modifikation sperriger wird. Über ähnliche Effekte wurde bereits berichtet.^[10] Interessanterweise wurden bei der KF(exo)-katalysierten Reaktion signifikante Verzögerungsbanden an Position 27 beobachtet, wenn **1a** verwendet wurde (Abbildung 1b, Spur 3). Das deutet darauf hin, dass nach dem Einbau von **1a** eine weitere Verlängerung erschwert ist. Bei Verwendung des Nucleotids **1b** wurde hingegen keine solche Verzögerungsbande beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass die recht voluminöse Nitroxid-Modifikation von KF(exo-) besser toleriert wird, wenn ein längerer Linker eingesetzt wird. Nach der Reinigung der enzymatisch synthetisierten DNA durch HPLC

wurden CD-Spektren aufgenommen, nach denen die Konformation der modifizierten Oligonucleotide ähnlich wie diejenige der unmodifizierten Stränge der B-Form entspricht (siehe Hintergrundinformationen).

Der erfolgreiche Einbau beider von **1a** und **1b** abgeleiteten Nucleotide wurde weiterhin durch ESI-Massenspektren und ESR-Spektren bestätigt. Die ESR-Spektren von **1a** und **1b** (Abbildung 1d, I und II) können gut unter der Annahme einer isotropen Rotationsdiffusion im schnellen Regime^[16] mit Rotationskorrelationszeiten τ_c von 57 bzw. 95 ps modelliert werden (siehe Hintergrundinformationen). Der Anstieg von τ_c mit steigender Linkerlänge entspricht den Erwartungen. Nach dem Einbau (Abbildung 1d, III und IV) können die Spektren nicht mehr gut unter der Annahme einer isotropen Rotationsdiffusion modelliert werden. Vielmehr ist die Intensität der Linien konsistent mit einer bevorzugten Bewegung um das Linkerrückgrat. Die senkrecht zu dieser Achse laufende Molekülrotation ist langsamer, aber für den kürzeren Linker immer noch im schnellen Regime (Spektrum III). Dies deutet darauf hin, dass die DNA-Helix im Subnanosekunden-Bereich um ihre Längsachse rotiert. Für den längeren Linker (Spektrum IV) ist diese Rotation verlangsamt und erreicht den Nanosekunden-Bereich. Da die Modellierung der spektralen Linienform unter der Annahme einer anisotropen Rotationsdiffusion im schnellen Regime mehrdeutig ist, geben wir hier keine Werte für den Rotationsdiffusionstensor an.

Ermutigt durch diese Befunde untersuchten wir als Nächstes, ob durch eine DNA-Polymerase mehrere Spinsonden in eine Helix eingebaut werden können. Dazu erzeugten wir zwei Template für den Einbau eines spinmarkierten Nucleotids nach jedem zweiten bzw. vierten Nucleotid. Ein drittes Templat wurde so konzipiert, dass elf aufeinanderfolgende 2'-Desoxyadenosin-Reste den Einbau von elf aufeinanderfolgenden spinmarkierten Nucleotiden bewirken, sodass eine ganze DNA-Helixwindung mit Spinsonden versehen wird. Erste Untersuchungen verschiedener DNA-Polymerasen ergaben, dass die kommerziell erhältliche Therminator-DNA-Polymerase (A485L-Mutante der DNA-Polymerase von *Thermococcus species 9°N*) am besten geeignet ist, um mehrere spinmarkierte Nucleotide **1a** und **1b** einzuführen. Weiterhin stellte sich heraus, dass diese Polymerase **1a** besser akzeptiert als **1b**. Daher verwendeten wir in den weiteren Untersuchungen ausschließlich **1a**. Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse der Mehrfacheinbau-Experimente unter Verwendung der Therminator-DNA-Polymerase. In allen Fällen wurde das Volllängenprodukt erhalten, wenn natürliches TTP durch **1a** ersetzt wurde, wobei in der PAGE-Analyse im Fall von **1a** wieder langsamer wandernde Banden beobachtet wurden.

Interessanterweise beherrscht die Therminator-DNA-Polymerase den Einbau von elf aufeinanderfolgenden modifizierten Nucleotiden von **1a**, sodass tatsächlich eine ganze DNA-Helixwindung durch ein Mehrspinsystem modifiziert wurde (Abbildung 2c). Das Reaktionsprodukt wurde durch HPLC gereinigt und weiter durch Messung der thermischen Denaturierung (T_m) sowie CD- und ESR-Spektroskopie charakterisiert. Das CD-Spektrum deutet darauf hin, dass die Konformation der durch elf aufeinanderfolgende Spinsonden

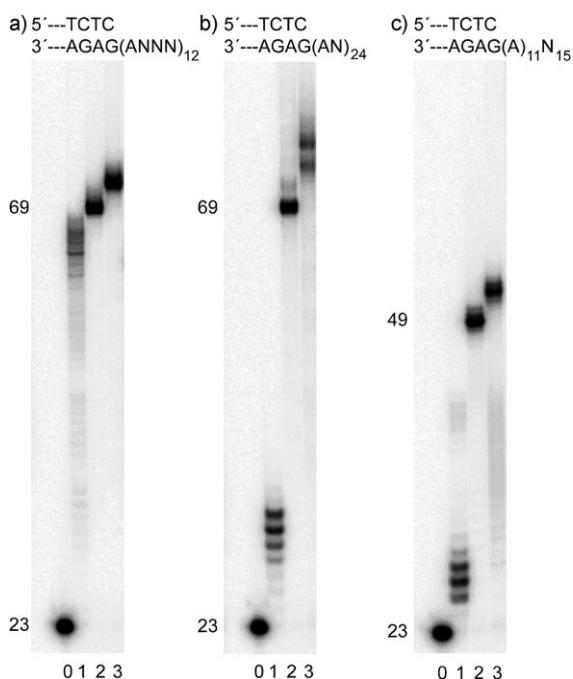


Abbildung 2. Mehrfach-Spinmarkierung durch Einbau von **1a** unter Katalyse durch die Terminator-DNA-Polymerase. Die verwendeten Primer-Templat-Sequenzen sind am oberen Ende jeder Tafel angegeben. Spuren 0: nur Primer, Spuren 1: nach Primerverlängerung in Gegenwart von dATP, dGTP, dCTP, doch ohne TTP-Analoga; Spuren 2: wie Spuren 1, aber in Gegenwart von TTP; Spuren 3: wie Spuren 1, aber in Gegenwart von **1a**.

stark modifizierten DNA ähnlich wie die der unmodifizierten DNA der B-Form entspricht (siehe Hintergrundinformationen). Zusätzlich folgt aus den T_m -Messungen nur ein geringer Einfluss der Modifikation auf die Duplexstabilität (siehe Hintergrundinformationen).

Erstaunlicherweise deutet das ESR-Spektrum (Abbildung 3) auf eine geringere Anisotropie der Rotationsdiffusion als bei der einfach markierten DNA hin, weist aber eine merklich kleinere Amplitude der Tieffeldlinie gegenüber der Zentrallinie auf als das Spektrum von **1a**. Die Bewegung ist also nicht vollständig isotrop. Das Fehlen von Linienformeffekten infolge einer Austauschkopplung durch den Raum, wenn man von der homogenen Linienverbreiterung gegenüber den Spektren von **1a** absieht, ist bei einer starren

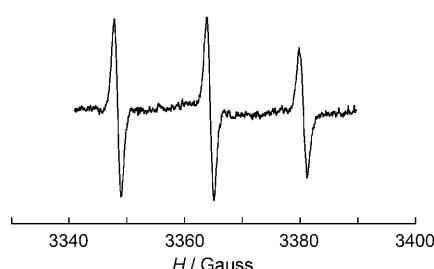


Abbildung 3. ESR-Spektrum einer DNA-Helix mit einer Länge von 49 Basenpaaren, die infolge des Einbaus von **1a** elf aufeinanderfolgende spinmarkierte Nucleotide aufweist.

Struktur wenig überraschend. Festkörperspektren, die bezüglich der An- oder Abwesenheit einer Dipol-Dipol-Kopplung zwischen den Spins eindeutig wären, konnten mit der derzeit verfügbaren Probenkonzentration nicht erhalten werden. Die Intensität des Spektrums bezogen auf die DNA-Konzentration ist jedoch mit dem Vorliegen von elf Spins pro DNA-Molekül konsistent. Auch die ESR-Spektren sind somit in Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur, obgleich es zurzeit noch unklar ist, warum die Bewegung um die Helixachse bei einem mehrfach markierten 49mer schneller ist als bei einem einfach markierten 35mer.

Zusammenfassend konnten wir zum ersten Mal die Synthese von spinmarkierten Nucleosidtriphosphaten **1** und deren Akzeptanz als Substrat von DNA-Polymerasen demonstrieren. DNA-Polymerasen eukaryotischen, prokaryotischen und archaischen Ursprungs konnten diese spinmarkierten Nucleotide als Ersatz für die natürlichen Bausteine in der enzymatischen DNA-Synthese verwenden. Diese Ergebnisse eröffnen neue Anwendungsmöglichkeiten wie die In-vivo-Spinmarkierung oder die Generierung von komplexen, mehrfach spinmarkierten Systemen. Solche Systeme können für die auf DNA basierenden Nanobiotechnologien von Nutzen sein. Weitere darauf aufbauende Untersuchungen sind im Gange.

Eingegangen am 17. Mai 2008
Online veröffentlicht am 31. Juli 2008

Stichwörter: DNA · DNA-Polymerasen · EPR-Spektroskopie · Nucleotide · Spinmarkierung

- [1] *Spin Labeling: The Next Millennium* (*Biol. Magn. Reson.* **1998**, *14*).
- [2] a) G. Jeschke, Y. Polyhach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1895; b) O. Schiemann, T. F. Prisner, *Q. Rev. Biophys.* **2007**, *40*, 1.
- [3] W. L. Hubbell, D. S. Cafiso, C. Altenbach, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 735.
- [4] A. Spaltenstein, B. H. Robinson, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1299.
- [5] O. Schiemann, N. Piton, J. Plackmeyer, B. E. Bode, T. F. Prisner, J. W. Engels, *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 904.
- [6] a) P. Z. Qin, I. S. Haworth, Q. Cai, A. K. Kusnetzow, G. P. G. Grant, E. A. Price, G. Z. Sowa, A. Popova, B. Herreros, H. He, *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 2354; b) R. Ward, D. J. Keeble, H. El-Mkami, D. G. Norman, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1957; c) N. Barhate, P. Cekan, A. P. Massey, S. T. Sigurdsson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2709; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2655.
- [7] a) A. Spaltenstein, B. H. Robinson, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1299; b) A. Spaltenstein, B. H. Robinson, P. B. Hopkins, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9484.
- [8] a) O. Schiemann, N. Piton, Y. Mu, G. Stock, J. W. Engels, T. F. Prisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5722; b) O. Schiemann, N. Piton, J. Plackmeyer, B. E. Bode, T. F. Prisner, J. W. Engels, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 771; c) N. Piton, Y. Mu, G. Stock, T. F. Prisner, O. Schiemann, J. W. Engels, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3128.
- [9] a) P. W. Langenmeier, A. M. Bobst, *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *208*, 205; b) A. M. Bobst, S.-C. Kao, R. C. Toppin, J. C. Ireland, I. E. Thomas, *J. Mol. Biol.* **1984**, *173*, 63.
- [10] a) O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4112; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3990; b) S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3399; *Angew. Chem. Int. Ed.*

- 2004, 43, 3337; c) S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15071; d) P. Čapek, H. Cahová, R. Pohl, M. Hocek, C. Gloeckner, A. Marx, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 6115.
- [11] H. Sawai, A. N. Ozaki, F. Satoh, T. Ohbayashi, M. M. Masud, H. Osaki, *Chem. Commun.* **2001**, 2604.
- [12] a) M. J. Robbins, P. Barr, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 421; b) F. W. J. Hobbs, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3420; c) J. D. Kahl, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 597.
- [13] a) L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1875; b) R. Chinhilla, C. Najera, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 874.
- [14] S. W. Stork, M. W. Makinen, *Synthesis* **1999**, 1309.
- [15] J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 631.
- [16] J. H. Freed, G. K. Fraenkel, *J. Chem. Phys.* **1963**, 39, 326.