

Stereochemischer Verlauf einer Benzyl-Kohlenstoff-Substitution kombiniert mit Ringmodifikation der 2-Nitrobenzylgruppen als Schlüsselfaktoren für schnell spaltende, reversible Terminatoren**

Brian P. Stupi, Hong Li, Jinchun Wang, Weidong Wu, Sidney E. Morris, Vladislav A. Litosh, Jesse Muniz, Megan N. Hersch und Michael L. Metzker*

Next-Generation-Sequencing(NGS)-Techniken haben bereits wichtige biomedizinische Entdeckungen ermöglicht, aber hohe Fehlerraten und langsame Zykluszeiten rechtfertigen weitere chemische Verbesserungen.^[1a] Techniken, die die Methode der zyklischen reversiblen Termination (cyclic reversible termination, CRT) nutzen,^[1a,b] setzen typischerweise auf 3'-O-blockierte reversible Terminatoren.^[2] Kürzlich beschrieben wir einen neuen 3'-OH-unblockierten reversiblen Terminator, der auf einem 2-Nitrobenzyl-modifizierten 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (HOMedU-5'-triphosphat) basiert.^[3] Unsere Studie zeigte, dass die Nähe der 2-Nitrobenzylgruppe zur Nukleobase und die Größe der Alkylgruppe am α -Kohlenstoffatom der Doppelbindung wichtige Strukturmerkmale sind, die diesen 3'-OH-unblockierten Nukleotiden die einzigartigen Eigenschaften der Einzelbasentermination, des effizienten Einbaus und der hohen Nukleotidselektivität (d.h. hohen Genauigkeit) verleihen.^[3] Diese Eigenschaften haben das Potenzial, die Genauigkeit und die Leselängen der CRT-Methode zu verbessern. Da HOMedU ein natürliches, hypermodifiziertes Nukleosid ist,^[4a] suchten wir noch weitere solche Beispiele. 5-Hydroxymethyl-2'-desoxycytidin (HOMedC) kann in der Natur in den Genomen von T-ähnlichen Bakteriophagen^[4] und Säugetieren^[5] vorkommen. Pyrrolopyrimidin (7-Desazapurin) kann in Nukleosid-Antibiotika^[6] und tRNAs^[7] ge-

funden werden. Somit wurden verschiedene Analoga von 2-Nitrobenzyl-modifiziertem 7-Desaza-7-hydroxymethyl-2'-desoxyadenosin (C^7 -HOMedA),^[8] HOMedC, 7-Desaza-7-hydroxymethyl-2'-desoxyguanosin (C^7 -HOMedG)^[9] und HOMedU synthetisiert, mit dem Ziel, einen kompletten Satz von reversiblen Terminatoren zu entwickeln (Abbildung 1).

Idealerweise sollten diese Terminatoren hohe Einbaugeschwindigkeiten, Einzelbasentermination, eine hohe Nukleotidselektivität und eine schnelle Abspaltung der terminalen

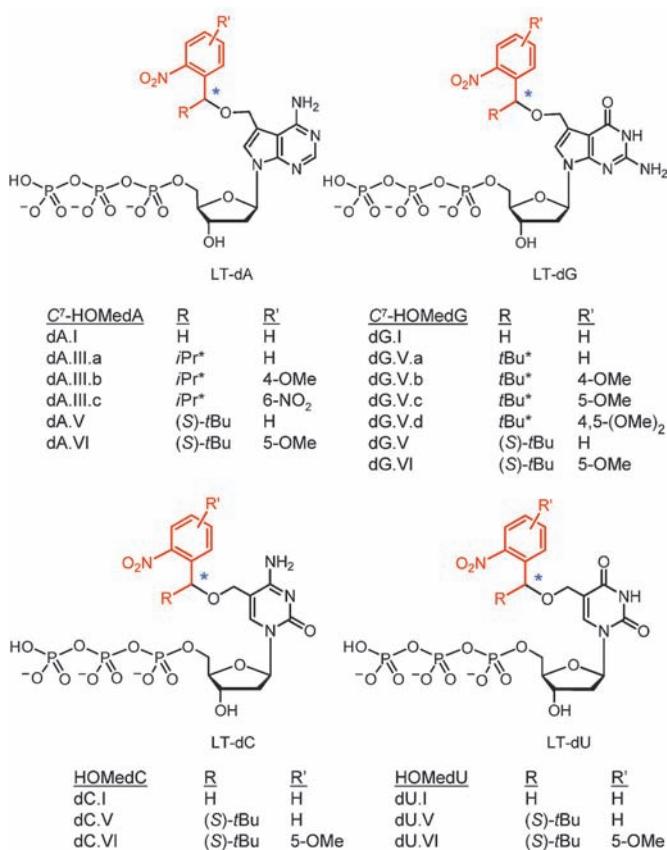


Abbildung 1. Strukturen der 2-Nitrobenzyl-modifizierten HOMedNTP-Analoga, genannt Lightning-Terminatoren (LT); R = H, Isopropyl, *tert*-Butyl; R' = H, 4-OMe, 5-OMe, 4,5-(OMe)₂ oder 6-NO₂, siehe Schlüssel für ein spezifisches Beispiel. „*“ bezeichnet zwei unterschiedliche Diastereomere (R + S). Rot gezeichnete Strukturen sind terminierende funktionelle Gruppen, die bei UV-Lichtexposition gespalten werden. Die Synthese aller Nukleotide wird in den Hintergrundinformationen beschrieben, mit der Ausnahme von dU.I und dU.V, über die bereits vorher berichtet wurde.^[3]

[*] B. P. Stupi, Dr. H. Li, J. Wang, Dr. W. Wu, S. E. Morris, Prof. V. A. Litosh,^[†] Dr. M. N. Hersch, Prof. M. L. Metzker LaserGen, Inc. Houston, TX 77054 (USA)

S. E. Morris, J. Muniz, Prof. M. L. Metzker Human Genome Sequencing Center (USA) Prof. M. L. Metzker Department of Molecular & Human Genetics Baylor College of Medicine One Baylor Plaza, N1409, Houston, TX 77030 (USA) E-Mail: mmetzker@bcm.edu

[†] Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy University of Illinois Chicago, IL 60612 (USA)

[**] Wir danken Sherry Metzker von LaserGen für die kritische Durchsicht unseres Manuskripts. Diese Arbeit wurde in Teilen von den National Institutes of Health [R01 HG003573] unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106516> zu finden.

Die Wiederverwertung dieses Beitrags ist gestattet in Übereinstimmung mit den Geschäftsbedingungen, die unter <http://angewandte.de/open> aufgeführt sind.

Gruppe aufweisen. Bei der letzten Eigenschaft hängt die Änderung der Rate der photochemischen Spaltung von zahlreichen Faktoren ab, wie der Substitution des Benzyl-Kohlenstoffatoms,^[10a-c] der Verknüpfung funktioneller Gruppen mit dem Benzylring,^[10b-d] der Art der Abgangsgruppe,^[10a] dem pH-Wert,^[10a,d,e] dem Lösungsmittel^[10c,f,g] und der Lichtintensität.^[10e,g] Eine Eigenschaft wurde allerdings bisher noch nicht untersucht: die Stereochemie, wobei die Substitution des Benzyl- (oder α -)Kohlenstoffatoms des 2-Nitrobenzylrestes zur Bildung eines Stereozentrums führt. Im Fall der Nukleotidsynthese führt die Anknüpfung eines racemischen α -substituierten 2-Nitrobenzylalkohols zu zwei Diastereomeren, die sich lediglich durch die absolute Konfiguration (*R* oder *S*) am Benzyl-Kohlenstoffatom unterscheiden („*“ in Abbildung 1). Hier beschreiben wir unsere Versuche, die Fähigkeit zu photochemischer Spaltung zu verbessern, indem wir verschiedene ringsubstituierte, stereospezifische α -Isopropyl- und α -tert-Butyl-2-nitrobenzyl-modifizierte reversible Terminatoren untersuchten.

Anders als in unserer Arbeit mit α -substituierten HOMedU-Analoga^[3] identifizierten wir chromatographische Eigenschaften, um C^7 -HOMedA-Analoga in einzelne diastereomere Nukleotide zu trennen, wobei das erste eluierende Isomer mit ds1 und das zweite mit ds2 bezeichnet wird. Zur Untersuchung der Spaltungseffekte wurden drei 2-Nitrobenzyl-modifizierte C^7 -HOMedA-Analoga synthetisiert und in einzelne Diastereomere zerlegt: dA.III.a (α -Isopropyl-), dA.III.b (α -Isopropyl-4-OMe-), dA.III.c (α -Isopropyl-6-NO₂-), gemeinsam mit der Ausgangsverbindung dA.I (siehe Hintergrundinformationen). Mit diesen C^7 -HOMedATP-Analoga wurden Inkorporationsassays sowie anschließende photochemische UV-Spaltungsexperimente in Natriumazidlösung durchgeführt (Tabelle 1). In allen Fällen zeigten die ds2-Isomere von dA.III.a, dA.III.b und dA.III.c schnellere photochemische Spaltungen (d.h. niedrigere DT₅₀-Werte) als ihre ds1-Gegenstücke (Faktoren um 2.0, 6.4 bzw. 1.2). Dabei erreichten die ds1-Isomere ähnliche (dA.III.c) oder höhere DT₅₀-Werte (dA.III.a und dA.III.b) als die Ausgangsverbindung dA.I. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Konfiguration der α -Isopropylgruppe eine wichtige Einflussgröße ist. In Kombination mit einer 4-OMe-Substitution lieferte das Analogon dA.III.bds2 den niedrigsten DT₅₀-Wert für den C^7 -HOMedA-Satz.

Tabelle 1: Raten der photochemischen Spaltung der C^7 -HOMedA-Analoga.^[a]

C^7 -HOMedA-Analogon	DT ₅₀ in 1 mM NaN ₃	
	kein DTT	50 mM DTT
dA.I	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
dA.III.a ds1	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2
dA.III.a ds2	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
dA.III.b ds1	7.0 ± 0.3	6.1 ± 0.4
dA.III.b ds2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
dA.III.c ds1	3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.2
dA.III.c ds2	2.8 ± 0.2	2.5 ± 0.1

[a] Der DT₅₀-Wert ist definiert als der Zeitpunkt, an dem 50% der 2-Nitrobenzylgruppen photochemisch vom erweiterten Primer/Templat-Komplex abgespalten sind. Niedrigere DT₅₀-Werte entsprechen schnellerer photochemischer Abspaltung. DTT = Dithiothreitol.

Unsere vorangegangene Arbeit hatte demonstriert, dass das α -tert-Butylanalogon dU.V exzellente CRT-Eigenschaften wie Einzelbasentermination und hohe Nukleotidselektivität aufweist.^[3] Dies ermöglichte es uns, den stereospezifischen Effekt unter Verwendung einer anderen α -Substitutionsgruppe in Kombination mit verschiedenen OMe-Ringsubstitutionen weiter zu untersuchen, indem wir vier α -tert-Butyl- C^7 -HOMedG-Analoga (dG.V.a–dG.V.d) gemeinsam mit der Ausgangsverbindung dG.I synthetisierten (Abbildung 1). Übereinstimmend mit den α -Isopropyl- C^7 -HOMedATP-Analoga zeigten die photochemischen UV-Spaltungsexperimente der ds2-Isomere von dG.V.a–dG.V.d 3.1-, 4.5-, 4.4- und 3.0-mal höhere Raten als ihre ds1-Pendants (Tabelle 2). Die beiden 5-OMe-ds1- und 5-OMe-ds2-Isomere erzielten jeweils eine 1.4-mal schnellere photochemische Spaltung als ihre 4-OMe-Isomere, was zeigt, dass die Ringposition die Spal-

Tabelle 2: Raten der photochemischen Spaltung der C^7 -HOMedG-Analoga.

C^7 -HOMedG-Analogon	DT ₅₀ in 1 mM NaN ₃	
	kein DTT	50 mM DTT
dG.I	9.2 ± 0.3	8.1 ± 0.2
dG.V.a ds1	11.0 ± 0.4	10.7 ± 0.2
dG.V.a ds2	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.3
dG.V.b ds1	4.9 ± 0.3	4.6 ± 0.3
dG.V.b ds2	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2
dG.V.c ds1	3.5 ± 0.3	3.0 ± 0.1
dG.V.c ds2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
dG.V.d ds1	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2
dG.V.d ds2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1

tungsrate beeinflusst. Das disubstituierte 4,5-(OMe)₂-ds1-Isomer ergab höhere Raten als die monosubstituierten 4-OMe- (Faktor 2.0) oder 5-OMe-ds1-Isomere (Faktor 1.5). Im Gegenzug zeigten beide 5-OMe- und 4,5-(OMe)₂-ds2-Isomere identische DT₅₀-Werte von lediglich 0.8 s. Hasan et al. beobachteten in Abwesenheit eines α -Substituenten eine Ratenzunahme um lediglich den Faktor 1.2 für ein 5-OMe-2-Nitrobenzylanalogon gegenüber dem Wert für die Ausgangsverbindung.^[10b] Ein Vergleich der ds1- und ds2-Isomere von dG.V.c und dG.V.a offenbarte größere Ratenzunahmen um die Faktoren 3.6 bzw. 4.4, was zu Vermutungen führt, dass die stereospezifische tert-Butylgruppe die Wirkung der 5-OMe-Gruppe verstärkt. Bei Vierfarb-CRT-Anwendungen lässt sich das Ringsystem dank dieser Kombination flexibler nutzen, da ein Linker an der 4-Position angebracht werden kann, um Farbstoff-markierte Analoga herzustellen.^[1a]

Um die Konfiguration dieser α -tert-Butyl- C^7 -HOMedG-Verbindungen zu ermitteln, wurde aus dem (1*S*)-Camphanat von (*R/S*)-1-(5-Methoxy-2-nitrophenyl)-2,2-dimethyl-1-propanol durch fraktionierende Kristallisation^[11] der enantiomerenreine (*S*)-Alkohol erhalten (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Dieser (*S*)-Alkohol und der (*S*)- α -tert-Butyl-2-nitrobenzylalkohol^[3] wurden jeweils an C^7 -HOMedG gekuppelt (Abbildung 1). Die Analyse mit Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) der zugehörigen Triphosphate ergab, dass die beiden ds2-Isomere

von dG.V.a und dG.V.c identische Hauptretentionszeiten wie diejenigen von dG.V und dG.VI aufweisen, was dafür spricht, dass beide ds2-Isomere dieselbe (*S*)-Konfiguration am α -Kohlenstoffatom haben. Im Rückschluss folgt daraus, dass die entsprechenden ds1-Isomere von dG.V.a und dG.V.c die (*R*)-Konfiguration aufweisen.

Diese (*S*)-Alkohole wurden anschließend an die verbliebenen Nukleoside gekuppelt, um die Auswirkungen der Nukleotid-Abgangsgruppe auf die Rate der photochemischen Spaltung zu ermitteln. Zum Beispiel zeigten photochemische UV-Spaltungsexperimente, dass die DT_{50} -Werte der Ausgangsverbindungen zwischen 2.0 s für dC.I und 9.2 s für dG.I schwanken, was darauf schließen lässt, dass die Abgangsgruppe die Rate der photochemischen Spaltung beeinflussen kann (Abbildung 2). Substitution des Benzyl-Kohlenstoffatoms mit einer *tert*-Butylgruppe in der stereospezifischen (*S*)-Konfiguration (hier einfach als „(*S*)- α -*tert*-Butyl“ be-

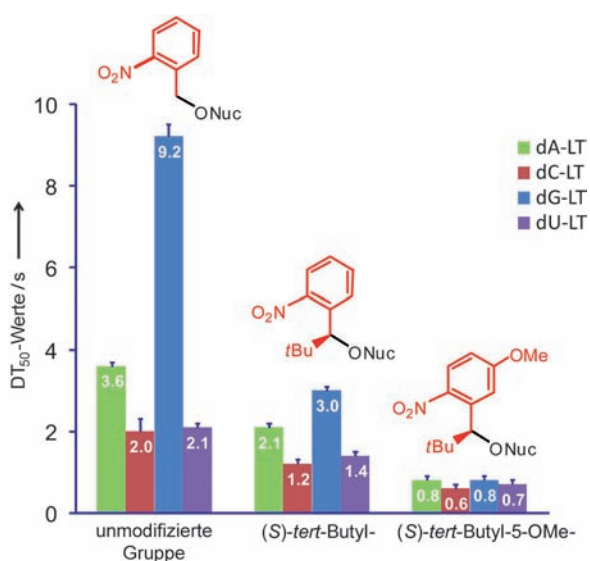


Abbildung 2. Raten der photochemischen Spaltung der unmodifizierten 2-Nitrobenzylgruppe sowie der (*S*)- α -*tert*-Butyl- und (*S*)- α -*tert*-Butyl-5-OMe-modifizierten 2-Nitrobenzylgruppen an C^7 -HOMedA-, HOMedC-, C^7 -HOMedG- und HOMedU-Nukleosiden. Nuc = Nukleotid.

zeichnet) resultierte in einer Erhöhung der Spaltungsrate um Faktoren von 1.5–3.1, und die zusätzliche Substitution mit einer 5-OMe-Gruppe erhöhte die Raten weiter – um Faktoren zwischen 3.0 und 11.5 – gegenüber den Werten für die unmodifizierten Analoga. Die größte Ratenverbesserung wurde beim Vergleich von C^7 -HOMedG-Analoga beobachtet, wo die DT_{50} -Werte von 9.2 auf 0.8 s gesenkt wurden (Abbildung 2, blaue Säulen). Der komplette Satz von (*S*)- α -*tert*-Butyl-5-OMe-Terminatoren zeigte einen schmalen Bereich der DT_{50} -Werte zwischen 0.6 und 0.8 s. Diese Daten sprechen dafür, dass der kombinierte Effekt der (*S*)- α -*tert*-Butyl- und 5-OMe-Gruppen eine wichtige Rolle bei der Verringerung von Variationen in den Spaltungsrate spielt, wie sie bei bestimmten Nukleotid-Abgangsgruppen beobachtet wurden. Dies bringt die praktische Anwendung mit

sich, dass auf diese Weise normierte und effizientere Spaltungsbedingungen für den CRT-Zyklus zur Verfügung gestellt werden.

Nach kurzer UV-Exposition wurden kurzlebige Produkte bei Inkorporationsassays für (*S*)- α -*tert*-Butyl-5-OMe- C^7 -HOMedA, -HOMedC und -HOMedU, aber nicht für C^7 -HOMedG beobachtet (Abbildung 3A). Da der einzige Unterschied im zuletzt eingebauten Nukleotid besteht, nehmen wir an, dass die schneller spaltende (*S*)- α -*tert*-Butyl-5-OMe-2-nitrobenzylgruppe ein reaktiveres 2-Nitroso-Ne-

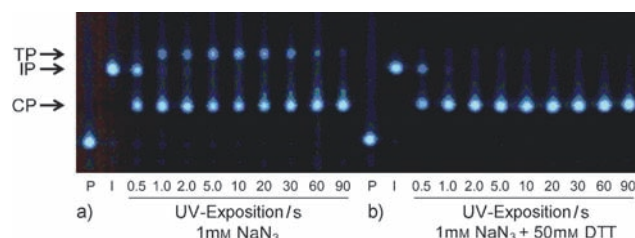


Abbildung 3. Eliminierung kurzlebiger Produkte (TPs) mit DTT. Fluoreszenzgelaufergebnisse der photochemischen Spaltung von dU.VI, eingebaut durch Thernimator-Polymerase bei a) 1 mM NaN_3 und b) 1 mM NaN_3 , 50 mM DTT, zu verschiedenen Zeitpunkten. Bahnen: „P“ (Primer) enthält Thernimator, gebunden an oligoTemplat-4, hybridisiert mit Bodipy-FL-markiertem Primer-1 in 1x-ThermoPol-Puffer;^[3] „I“ (Inkorporation) enthält die Komponenten von Bahn „P“ plus 100 nM dU.VI; die Bahnen zu bestimmten Zeitpunkten enthalten die Komponenten aus „I“ zusammen mit den Produkten nach Bestrahlung mit 0.70 W cm^{-2} bei 365 nm; „IP“ bezeichnet das eingebaute Produkt und „CP“ das gesplante Produkt.

produkt produziert, welches das Nukleotid am 3'-Ende des wachsenden Primer-Strangs angreift. Um die Bedingungen für das Abfangen des Nitroso-Zwischenprodukts zu untersuchen, wurde eine Vielzahl an Amino- und Sulfanylverbindungen getestet (Abbildung S2 der Hintergrundinformationen). Von diesen eliminierte lediglich DTT^[12] das Zwischenprodukt (Abbildung 3b). Um die Rateneffekte zu testen, wurden die photochemischen Spaltungsexperimente für alle Gemische in Gegenwart von DTT wiederholt. Hier wurden bei einigen Ausgangsverbindungen und ds1-Isomeren die DT_{50} -Werte verringert (Tabellen 1, 2 und S3, Hintergrundinformationen). Corrie et al. schlugen vor, dass DTT die Nitrosogruppe durch nukleophile Addition angreift,^[13] wobei es in unserem Fall schützend vor solchen ungewünschten Reaktionen wirkt.

Wir haben hier gezeigt, dass die stereospezifische (*S*)-Konfiguration einer α -*tert*-Butylgruppe und die Ringmodifikation durch eine 5-OMe-Gruppe die Hauptfaktoren für die Herstellung eines vollständigen Satzes von schnell spaltenden reversiblen Terminatoren mit normierten Raten sind. Wir glauben jedoch, dass dieser stereospezifische Effekt nicht nur auf eine α -*tert*-Butylgruppe beschränkt ist. Wir haben verschiedene Beispiele von α -Isopropyl-ds2-Isomeren mit angennommener (*S*)-Konfiguration vorgestellt, die auch schnellere photochemische Spaltungen als ihre ds1-Isomere ergeben. In der Gegenwart von DTT kann das reaktive Nitroso-Ne-

Spaltung eliminiert werden, was angemessene Bedingungen schafft, um die biologische Integrität der CRT-Reaktion aufrechtzuerhalten. Wir merken an, dass diese 3'-OH-unblockierten (*S*)- α -*tert*-Butyl-5-OMe-2-nitrobenzyl-modifizierten Nukleotide sowohl Einzelbasentermination, schnellen Einbau als auch hohe Nukleotidselektivität (unveröffentlichte Ergebnisse) aufweisen. Dementsprechend erweitert diese Arbeit das Repertoire an 2-Nitrobenzyl-Modifikationen, die nicht nur zu schneller abspaltenden Schutzgruppen führen, sondern auch (sofern an reversible Terminatoren gekuppelt) zu kürzeren Zykluszeiten für NGS-Systeme.

Eingegangen am 14. September 2011

Online veröffentlicht am 9. Januar 2012

Stichwörter: Nucleotide · Photochemie ·
Reversible Terminatoren · Spaltungsreaktionen

-
- [1] a) M. L. Metzker, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 31–46; b) M. L. Metzker, *Genome Res.* **2005**, *15*, 1767–1776.
- [2] a) J. Ju, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19635–19640; b) J. Guo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9145–9150; c) D. R. Bentley et al., *Nature* **2008**, *456*, 53–59 (siehe Hintergrundinformationen).
- [3] V. A. Litosh, W. Wu, B. P. Stupi, J. Wang, S. E. Morris, M. N. Hersch, M. L. Metzker, *Nucleic Acid Res.* **2011**, *39*, e39.
- [4] a) J. H. Gommers-Ampt, P. Borst, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1034–1042; b) G. R. Wyatt, S. S. Cohen, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 774–782.
- [5] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929–930.
- [6] L. Carrasco, D. Vázquez, *Med. Res. Rev.* **1984**, *4*, 471–512.
- [7] P. A. Limbach, P. F. Crain, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2183–2196.
- [8] J. K. Rockhill, S. R. Wilson, R. I. Gumpert, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10065–10068.
- [9] M. G. McDougall, L. Sun, I. Livshin, L. P. Hosta, B. F. McArdle, S.-B. Samols, C. W. Fuller, S. Kumar, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 501–506.
- [10] a) J. W. Walker, J. A. McCray, G. P. Hess, *Biochemistry* **1986**, *25*, 1799–1805; b) A. Hasan, K.-P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247–4264; c) H. Giegrich, S. Eisele-Bühler, C. Hermann, E. Kvasnyuk, R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 1987–1996; d) J. F. Wootton, D. R. Trentham in *Photochemical probes in biochemistry (NATO Science Series C)*, Vol. 272 (Hrsg.: P. E. Nielsen), Kluwer Academic Publishers, Ann Arbor, **1989**, S. 277–296; e) J. A. McCray, L. Herbette, T. Kihara, D. R. Trentham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 7237–7241; f) J. A. Sousa, J. Weinstein, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3155–3159; g) G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5081–5090.
- [11] J. E. T. Corrie, G. P. Reid, D. R. Trentham, M. B. Hursthouse, M. A. Mazid, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 1015–1019.
- [12] W. W. Cleland, *Biochemistry* **1964**, *3*, 480–482.
- [13] A. Barth, J. E. T. Corrie, M. J. Gradwell, Y. Maeda, W. Mäntele, T. Meier, D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4149–4159.
-