

Sequenzspezifische DNA-Alkylierung durch Hybridmoleküle aus Segment A von Duocarmycin A und einem Pyrrol-Imidazol-Diamid**

Zhi-Fu Tao, Tsuyoshi Fujiwara, Isao Saito* und Hiroshi Sugiyama*

Verbindungen, die DNA sequenzspezifisch alkylieren, erfahren gegenwärtig viel Aufmerksamkeit aufgrund ihres großen Anwendungspotentials in Molekularbiologie und Humanmedizin.^[1-2] Die hochwirksamen Cytostatika-Antibiotika aus der Gruppe der Duocarmycine gehören zu den faszinierendsten Beispielen dieser Verbindungsklasse. Sie binden an AT-reiche Sequenzabschnitte und alkylieren selektiv das N3-Atom von Adenin (A) am 3'-Ende von drei oder mehr aufeinanderfolgenden AT-Basenpaaren in der DNA.^[2] Duocarmycin A (Duo) weist die höchste Reaktivität in der Duocarmycin-Familie auf und kann in einigen Fällen auch das N3-Atom von Guanin (G) alkylieren.^[3] Wir haben herausgefunden, daß der Zusatz von Distamycin A (Dist) die Alkylierungsspezifität von Duo erheblich dahingehend verändert, daß nun überwiegend Guaninreste in GC-reichen Abschnitten alkyliert werden.^[4] Mit NMR-Spektroskopie konnten wir auch zeigen, daß der Reaktionsmechanismus einer solchen Guanin-Alkylierung die kooperative Bildung eines Heterodimers beinhaltet (Abbildung 1).^[5]

Auch die von Dervan et al.^[6] entwickelten *N*-Methylimidazol(Im)-*N*-methylpyrrol(Py)-Polyamide sind als sequenzspezifische DNA-Liganden von großem Interesse. Diese Poly-

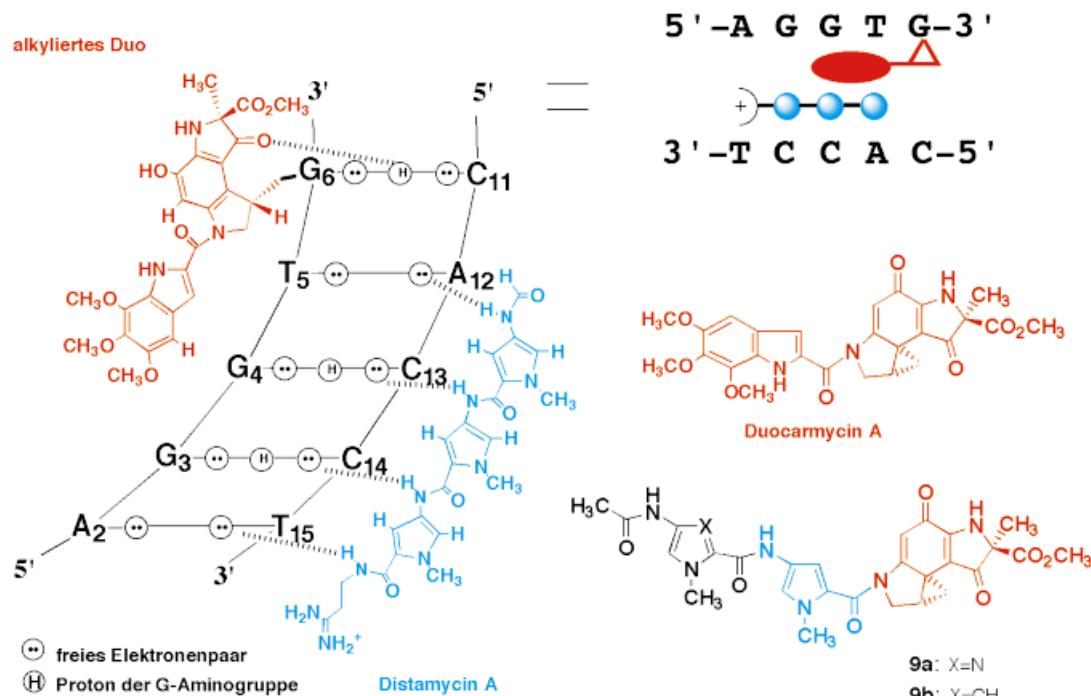


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Bindung des Heterodimers aus Duo und Dist in der kleinen Furche von 5'-d(AGGTG)-3' · 5'-d(CACCT)-3'; außerdem sind die Strukturen von Duo, Dist und den Hybridverbindungen 9a und 9b gezeigt. Gestrichelte Linien symbolisieren Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wirkstoffen und der DNA.

[*] Prof. I. Saito

Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry
Faculty of Engineering, Kyoto University
Yoshida, Sakyo, Kyoto 606-8501 (Japan)
CREST, Japan Science and Technology Cooperation
Fax: (+81) 75-753-5656
E-mail: saito@sbchem.kyoto-u.ac.jp

Prof. H. Sugiyama, Dr. Z.-F. Tao, Dr. T. Fujiwara
Institute for Medical and Dental Engineering
Tokyo Medical and Dental University
2-3-10 Surugadai, Kanda, Chiyoda, Tokyo 101-0062 (Japan)
CREST, Japan Science and Technology Cooperation
Fax: (+81) 3-5280-8127
E-mail: sugiyama@chem.i-mde.tmd.ac.jp

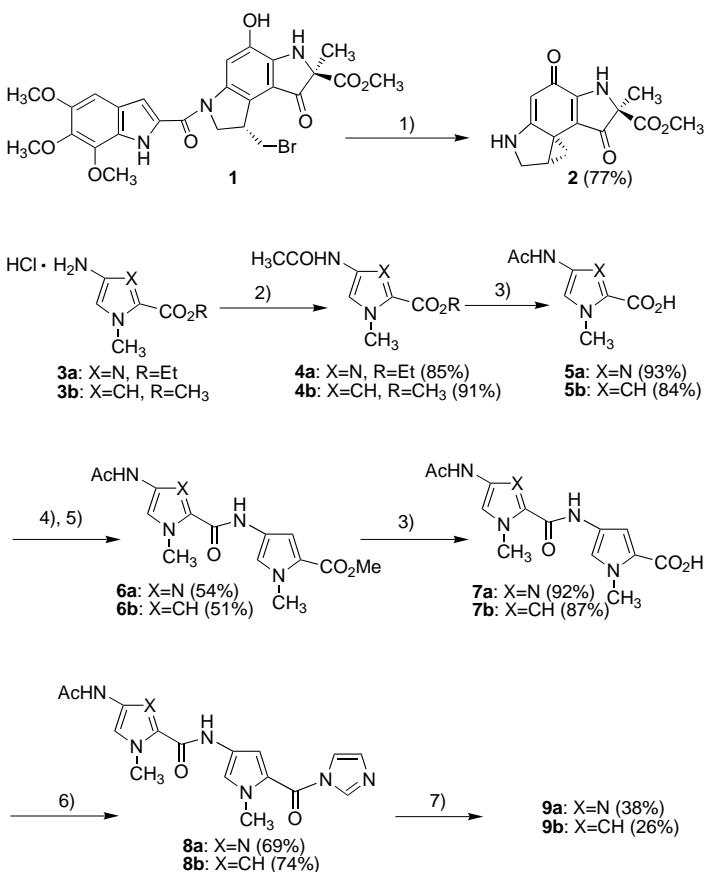
[**] Wir danken Dr. C. Murakata (Kyowa Hakko) für eine Spende von Duocarmycin B₂.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können vom Autor angefordert werden.

amide binden kooperativ als antiparallele Dimere an die kleine Furche der DNA-Helix. Nach einem einfachen binären Code läßt sich die erkannte DNA-Sequenz mit der lateralen Paarung zwischen Py- und Im-Carboxamiden korrelieren: Im/Py erkennt GC-Basenpaare und Py/Py erkennt AT-Basenpaare.^[7] Aus der von uns durch NMR-spektroskopische Messungen ermittelten Struktur eines Komplexes aus Duo, Dist und einem DNA-Octamer geht klar hervor, daß sich das Heterodimer aus Duo und Dist präzise in die kleine Furche einlagert, wo Dist die kleine Furche des einen Stranges gemäß dem binären Code für Im/Py-Polyamide erkennt.^[5] Tatsächlich ergaben unsere vorläufigen Untersuchungen, daß Substitutionen der Py-Einheit in Dist durch Im die Sequenzspezifität von Duo drastisch, aber vorhersagbar moduliert. Auf der Basis dieser Befunde läßt sich eine neue Klasse maßgeschneiderter sequenzspezifischer DNA-alkylierender

Verbindungen durch Einbau einer Py-Im-Polyamid-Einheit in das Cytostatikum-Antibiotikum Duo herstellen. Hier beschreiben wir die Synthese neuartiger Hybridmoleküle, die aus dem Segment A von Duo und Py-Im-Diamiden bestehen, und ihre DNA-Alkylierungs-Eigenschaften in Gegenwart oder Abwesenheit von Dist.

Die Synthese der Hybride **9a** und **9b** ist in Schema 1 dargestellt. Das Segment **2** lässt sich einfach durch Hydrolyse von Duocarmycin B₂ **1** herstellen.^[8] Die aktivierten Amide **8** wurden glatt in fünf Stufen aus den Aminhydrochloridsalzen



Schema 1. Synthese der Hybridverbindungen **9a** und **9b**. 1) NaOMe/MeOH/CH₃CN; 2) Pyridin, *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA), Ac₂O; 3) NaOH, MeOH, H₂O; 4) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol (HOBt), DMF; 5) **3b**, DIEA, DMF; 6) 1,1'-Carbonyldiimidazol, DMF; 7) NaH, DMF, **2**.

3^[9] hergestellt. Der Schlüsselschritt war die Kupplung der aktivierten Amide **8** mit dem Segment **2** zu den Zielverbindungen **9a** und **b**, die mit ¹H-NMR-Spektroskopie und HR-FAB-Massenspektrometrie vollständig charakterisiert wurden.

Die Oligodesoxyribonucleotide (ODNs) ODN 1 und ODN 2 wurden zunächst ausgewählt, um die DNA-Alkylierung durch die Hybride **9a** und **b** in Gegenwart und in Abwesenheit von Dist zu untersuchen. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, sind die Sequenzen von ODN 1 und 2 passend für **9a** bzw. **9b**. Inkubiert man diese ODNs mit **9a** und **b**, lassen sich in Abwesenheit von Dist durch HPLC-Analyse auch nach 46 h Inkubationszeit keine nennenswerten Mengen an Alkylierungsprodukten nachweisen. Dagegen alkylierten

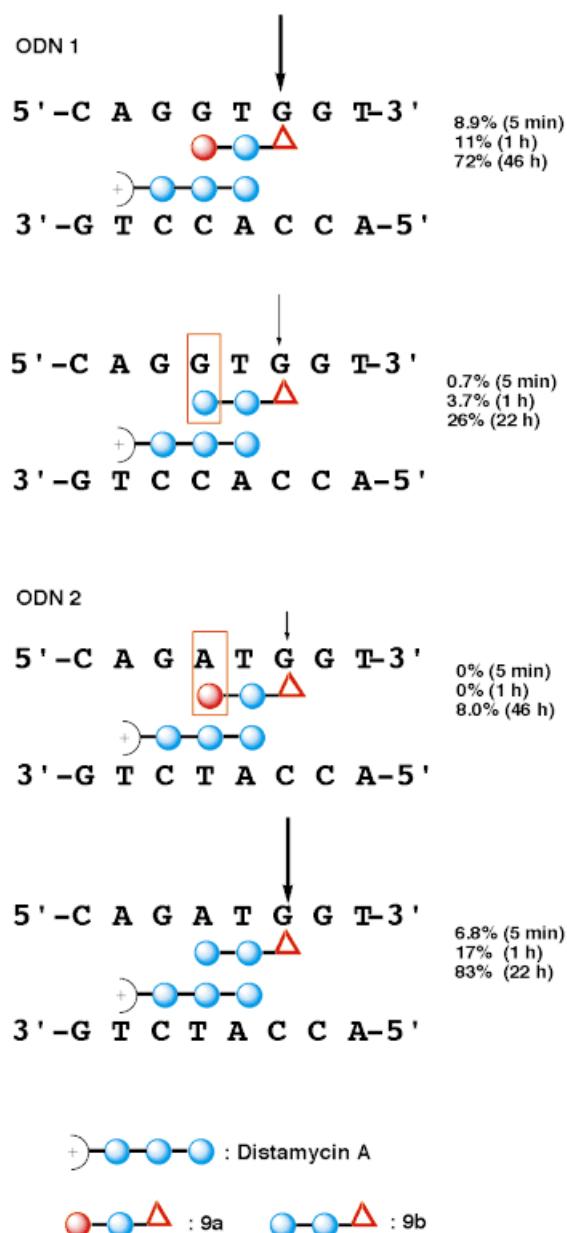


Abbildung 2. Sequenzspezifische Alkylierung von ODN 1 und ODN 2 durch die Hybridverbindungen **9a** und **9b** in Gegenwart von Dist. Die Pfeile deuten Position und Ausmaß der Alkylierung nach der jeweils angegebenen Inkubationszeit an. Die Imidazol- und Pyrrolringe sind durch rote bzw. blaue Kreise dargestellt. Gemäß dem binären Code der Im-Py-Polyamide erkennt Im/Py GC-Basenpaare, und Py/Py erkennt AT-Basenpaare.^[7] H-Brücken-Fehlpaarungen sind durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Ein Reaktionsansatz (50 µL) enthielt 0.1 mM einer der neuen Hybridverbindungen, 0.1 mM Distamycin A und das DNA-Octamer (Basenkonzentration 1 mM) in 50 mM Natriumkakodylatpuffer (pH 7.0) und wurde bei 0 °C unterschiedlich lange inkubiert. Das Fortschreiten der Reaktion wurde durch HPLC-Analyse verfolgt (Chemcobond 5-ODS-H-Säule, 4.6 × 150 mm). Eluiert wurde mit 0.05 M Ammoniumformiat und einem linearen Acetonitrilgradienten (0–50%; 0–40 min) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1.0 mL min⁻¹. Die Detektion erfolgte bei 254 nm. Unterschiedliche Peaks wurden anhand des UV-Absorptionspektrums zugeordnet. Die Bildung des Adduktes aus Guanin und der Hybridverbindung unter Abspaltung von Basen aus den Nucleotiden bei kurzem Erhitzen (90 °C, 5 min) wurde mit zuvor etablierten Methoden bestätigt.^[3,4]

diese neuen Hybride das Guanin an Position 6 der passenden Sequenz (G^6) in Gegenwart von Dist effizient und hochselektiv. So wird ODN 1 innerhalb von 46 h durch **9a** zu 72 % alkyliert, ODN 2 unter den gleichen Bedingungen dagegen nur zu 8 %, weil das Basenpaar A⁴T¹³ in ODN 2 gegenüber **9a** eine Fehlpaarung darstellt (Abbildung 2). Dagegen wurde ODN 2 durch **9b** glatt alkyliert, während ODN 1 nach 22 h Inkubationsdauer nur zu 26 % alkyliert wurde. Der direkte Nachweis eines dreifach negativ geladenen Ions des **9a**-Dist-ODN-1-Komplexes und eines vierfach negativ geladenen Ions des **9b**-Dist-ODN-2-Komplexes durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie deutet darauf hin, daß die Alkylierung über die kooperative Bildung eines Heterodimers stattfindet.^[10]

Die sequenzselektive Alkylierung durch diese Hybridmoleküle wurde außerdem durch Verwendung eines mit Texas-Red markierten, 450 Basenpaare langen DNA-Fragments bestätigt. Die alkylierten DNA-Fragmente wurden durch Erhitzen auf 90 °C an den Alkylierungsstellen gespalten und mit einem DNA-Sequenzierer analysiert.^[11] In Abwesenheit von Dist alkylierten **9a** und **9b** selektiv das 3'-Adenin AT-reicher Sequenzen, wobei **9b** wesentlich reaktiver als **9a** war (Abbildung 3). Je enger die kleine Furche ist, desto effizienter ist die Alkylierung, was mit früheren Berichten über eine Alkylierung durch Monomere übereinstimmt.^[12] Im Unterschied dazu findet in Gegenwart von Dist die Alkylierung durch **9a** vorwiegend am 3'-Guanin von 5'-GTG-3'-Sequenzen innerhalb des 450 Basenpaare langen DNA-Fragments statt. Dies entspricht auch dem bereits beschriebenen binären Code für die Erkennung von Basenpaaren durch Py-Im-Polyamide.^[7] Die Spezifität für T gegenüber A am 5'-Ende des reagierenden G, die bei beiden Hybriden festgestellt wurde, kann mit der schon früher beobachteten sterischen Wechselwirkung mit den H5-Protonen von Duo erklärt werden.^[5] In ähnlicher Weise alkylierte das Heterodimer aus **9b** und Dist spezifisch das 3'-G der 5'-(T/A)TG-3'-Sequenz, wie in Abbildung 3 zu sehen ist. Diese Befunde belegen eindeutig, daß die Zugabe von Dist die Sequenzselektivität der Hybridmoleküle drastisch und in vorhersagbarer Weise ändert. Dies ist das erste Beispiel dafür, daß eine sequenzspezifische DNA-Alkylierung an einem bestimmten Atom durch DNA-bindende Liganden vom Py-Im-Polyamid-Typ erreicht wird.

Wir haben hier die Herstellung neuer Hybridmoleküle zwischen dem Segment A von Duo und Py-Im-Diamiden beschrieben. Diese Hybride alkylieren in erster Linie, ebenso wie die Stammverbindung Duo, das 3'-A AT-reicher Sequenzen. Noch wichtiger ist, daß sie effizient und hochspezifisch Guaninreste gegebener DNA-Sequenzen über eine Heterodimerbildung mit Dist alkylieren. Kürzlich berichteten Deravan et al., daß synthetische Py-Im-Polyamide eine starke Affinität und einen weiten Spezifitätsbereich für DNA-Sequenzen aufweisen und somit natürlichen DNA-bindenden Proteinen vergleichbar sind.^[13] Sie sind membrangängig und hemmen in Zellkultur spezifisch die Transkription bestimmter Gene.^[14] Durch die Ergebnisse unserer Untersuchungen ergibt sich vielleicht die Möglichkeit, eine neue Generation DNA-alkylierender Verbindungen zu entwickeln, die Purinbasen an jeder gewünschten Stelle in der DNA alkylieren können.

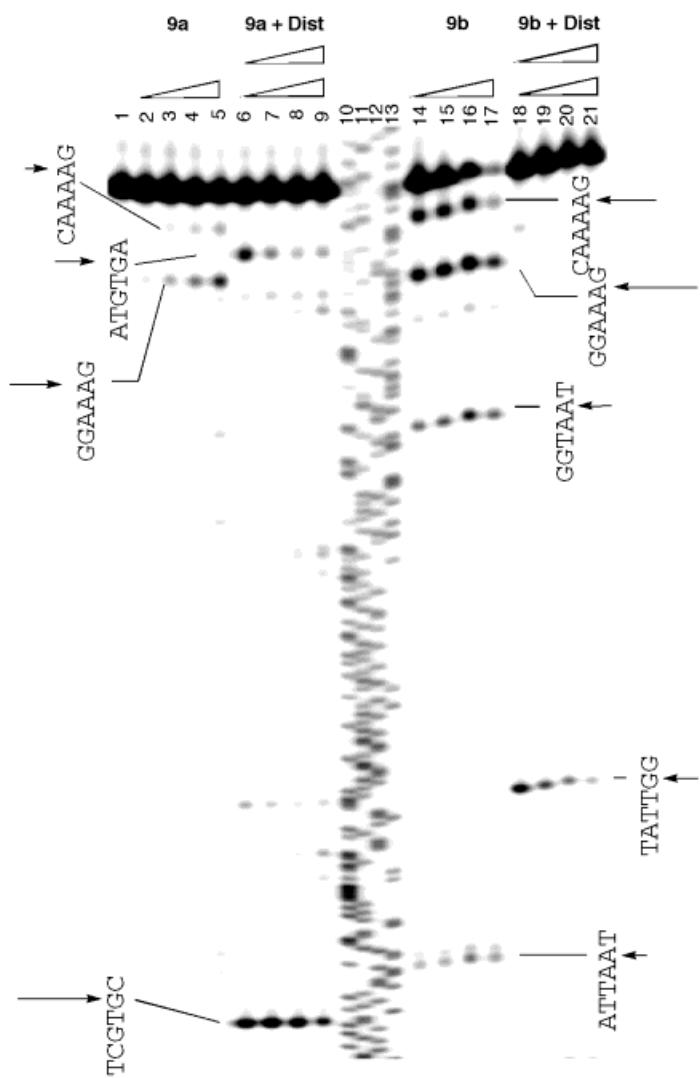


Abbildung 3. Thermisch induzierter Strangbruch des am 5'-Ende mit TexasRed markierten 450-bp-DNA-Fragment (pUC18 F, Basen 378–827) nach Inkubation mit den Hybridverbindungen **9a** und **9b** mit und ohne Dist. Bahn 1: Referenz-DNA; Bahnen 2–5: mit 4, 8, 16, 32 μ M **9a**; Bahnen 6–9: mit 4, 8, 16, 32 μ M **9a** und 8, 16, 32, 64 μ M Dist; Bahnen 10–13: G-, C-, T- und A-Sequenzierungsreaktion (DNA-Sequenzierung nach Sanger); Bahnen 14–17: mit 4, 8, 16, 32 μ M **9b**; Bahnen 18–21: mit 4, 8, 16, 32 μ M **9b** und 8, 16, 32, 64 μ M Dist. Ein einzelnes, am 5'-Ende mit TexasRed markiertes 450 bp langes Fragment wurde durch eine Polymerasenkettreaktion (PCR) hergestellt, als Primer dienten 5'-Texas-Red-markiertes 5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3' (pUC18, Basen 378–395, forward) und 5'-TGCTGGCCTTTGCTCACATG-3' (pUC18, Basen 1861–1881, reverse). 75 nm des 5'-TexasRed-markierten DNA-Fragments wurden in 8 μ L 12.5 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) bei Raumtemperatur 15 h alkyliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ L 5 mM Kalbsthymus-DNA unterbrochen und der Ansatz 5 min auf 90 °C erhitzt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, in 8 μ L Auftragspuffer (Formamid mit Fuschin-Rot) aufgenommen, 20 Minuten auf 94 °C erhitzt und dann sofort auf 0 °C abgekühlt. Ein 2- μ L-Aliquot wurde auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (6 %) aufgetragen, die Elektrophorese wurde mit einem 5500-S-DNA-Sequenzierer durchgeführt.

Eingegangen am 31. August 1998 [Z12351]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 650–653

Stichwörter: Alkylierungen • Antibiotika • Cytostatika • DNA-Erkennung • DNA-Spaltung

- [1] Für neuere Beispiele sequenzspezifischer DNA-alkylierender Verbindungen siehe: a) E. A. Lukhtanov, I. V. Kutyavin, V. V. Gorn, M. W. Reed, A. D. Adams, D. D. Lucas, R. B. Meyer, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6214–6225; b) K. Nakatani, A. Okamoto, I. Saito, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2881–2883; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2794–2797; c) K. Nakatani, J. Shirai, S. Sando, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7625–7635; d) J. A. Hartley, *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interaction* (Hrsg.: B. Pullman, J. Jortner), Kluwer, Dordrecht, **1990**, S. 513–530; e) B. F. Baker, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8266–8268.
- [2] a) D. L. Boger, D. S. Johnson, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1542–1580; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1438–1474; b) D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 20–29; c) D. L. Boger, D. S. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3642–3649; d) H. Sugiyama, M. Hosoda, I. Saito, A. Asai, H. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7197–7200.
- [3] H. Sugiyama, K. Ohmori, K. L. Chan, M. Hosoda, A. Asai, H. Saito, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2179–2182.
- [4] K. Yamamoto, H. Sugiyama, S. Kawanishi, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1059–1066.
- [5] H. Sugiyama, C. Lian, M. Isomura, I. Saito, A. H.-J. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 14405–14410.
- [6] a) Für aktuelle Übersichten siehe: a) D. E. Wemmer, P. B. Dervan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 355–361; b) P. E. Nielsen, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 505–508; siehe auch: c) J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7636–7644; d) R. P. Lamamie de Clairac, B. H. Geierstanger, M. Mrksinch, P. B. Dervan, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7909–7916; e) S. E. Swalley, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6953–6961; f) X. Chen, B. Ramakrishnan, M. Sundaralingam, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 1157–1170; g) M. L. Kapla, D. S. Goodsell, G. W. Han, T. K. Chiu, J. W. Lown, R. E. Dickerson, *Structure* **1997**, *5*, 1033–1046; h) S. E. Swalley, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1600–1607; i) C. L. Kielkopf, E. E. Baird, P. B. Dervan, D. C. Rees, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 104–109.
- [7] a) S. White, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 569–578; b) S. White, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12532–12537.
- [8] T. Yasuzawa, K. Muroi, M. Ichimura, I. Takahashi, T. Ogawa, K. Takahashi, H. Sano, Y. Saitoh, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 378–391.
- [9] E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141–6146.
- [10] Die Alkylierungen durch Heterodimere wurden direkt mit Elektrospray-Ionisations-MS nachgewiesen: **9a**/Dist/ODN 1: gef. (ber.): 5863.2 (5863.3); **9b**/Dist/ODN 2: gef. (ber.): 5860.8 (5861.4).
- [11] Eine nachfolgende Behandlung mit heißem Piperidin (90°C , 20 min) ergab keine weitere Steigerung der Intensität der Fragmentbanden, so daß die gewählten Bedingungen für die Hitzebehandlung für eine vollständige Spaltung alkylierter DNA ausreichend sein sollten.
- [12] a) A. Abu-Daya, P. M. Brown, K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3385–3392; b) C. M. Nun, E. Garman, S. Neidle, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4792–4799; c) D. L. Boger, T. Ishizaki, H. Zarrinmayeh, S. A. Munk, P. A. Kitos, O. Suntornwat, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8961–8971.
- [13] a) J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1996**, *382*, 559–561; b) S. White, J. W. Szewczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1998**, *391*, 468–471.
- [14] J. M. Gottesfeld, L. Neely, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1997**, *387*, 202–205.

Ln₂Al₃Si₂ (Ln = Ho, Er, Tm): neue Silicide aus Aluminiumschmelzen – Bestimmung der Al/Si-Verteilung mit Neutronenkristallographie und metamagnetische Übergänge**

Xian-Zhong Chen, Bradley Sieve, Robert Henning, Arthur J. Schultz, Paul Brazis, Carl R. Kannewurf, Jerry A. Cowen, Richard Crosby und Mercouri G. Kanatzidis*

Silicide haben sowohl wissenschaftliche als auch technologische Bedeutung und wurden in den letzten Jahrzehnten eingehend untersucht.^[1] Es gibt eine Vielzahl von Beiträgen und Übersichtsartikeln über ihre Herstellung, Eigenschaften, Kristallchemie,^[2] Thermodynamik,^[3] Anwendungen in der Siliciumtechnologie^[4] und Eignung als Materialien für fortgeschrittene Technologien.^[5] Die Silicide werden gewöhnlich durch direkte Reaktion der auf $>1000^{\circ}\text{C}$ erhitzten Elemente synthetisiert, wobei häufig ein Bogenschweißgerät oder ein Induktionsofen verwendet werden muß. Zwar können durch Tempern oder Abschrecken des Produkts zuweilen Einkristalle erhalten werden, doch sind mit diesen herkömmlichen Methoden meistens nur Pulverproben zugänglich. Dies kann die Strukturbestimmung erschweren und schränkt die Möglichkeiten der Charakterisierung ein. Vor kurzem haben wir in Arbeiten zur Synthese von Siliciden in geschmolzenen Metallen gezeigt, daß dabei viele neue Aluminiumsilicide entstehen, die meisten davon mit neuartigen Strukturtypen.^[6] Gewöhnlich zersetzen sich diese Verbindungen rasch beim Kontakt mit Säure, doch lassen sie sich leicht mit Natronlauge vom überschüssigen Al-Flußmittel abtrennen. Die Produkte bestehen häufig aus vielen, gut ausgebildeten Einkristallen. Wir berichten hier über unsere Ergebnisse mit den Ln-Al-Si-Systemen (Ln = Ho, Er, Tm). Es sind nur wenige Seltenerdmetall-Aluminium-Silicide beschrieben.^[7] Die meisten wurden als Pulver synthetisiert, und ihre Kristallstruktur konnte nicht bestimmt oder verfeinert werden. Für Ho, Er und Tm wurden nur Ln₆Al₃Si (Ln = Ho, Tm)^[8] und Er₄AlSi₃^[9] beschrieben. Wir berichten hier über die neuen Aluminium-

[*] Prof. Dr. M. G. Kanatzidis, Dr. X.-Z. Chen, B. Sieve

Department of Chemistry, Michigan State University

East Lansing, Michigan 48823 (USA)

Fax: (+1) 517-353-1793

E-mail: kanatzid@argus.cem.msu.edu

R. Henning, Dr. A. J. Schultz

Argonne National Laboratory, IPNS, Bldg. 360

Argonne, IL 60439-4814

P. Brazis, Prof. C. R. Kannewurf

Department of Electrical Engineering and Computer Science

Northwestern University, Evanston, IL 60208 (USA)

Prof. J. A. Cowen, R. Crosby

Department of Physics and Center for Fundamental Materials Research

Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1322

[**] M.G.K. ist ein Camille and Henry Dreyfus Teacher Scholar 1993–1998. In dieser Arbeit wurden die SEM-Geräte des Center for Electron Optics der Michigan State University verwendet. Die Arbeit am Argonne National Laboratory wurde vom Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences, unterstützt (W-31-109-ENG-38).