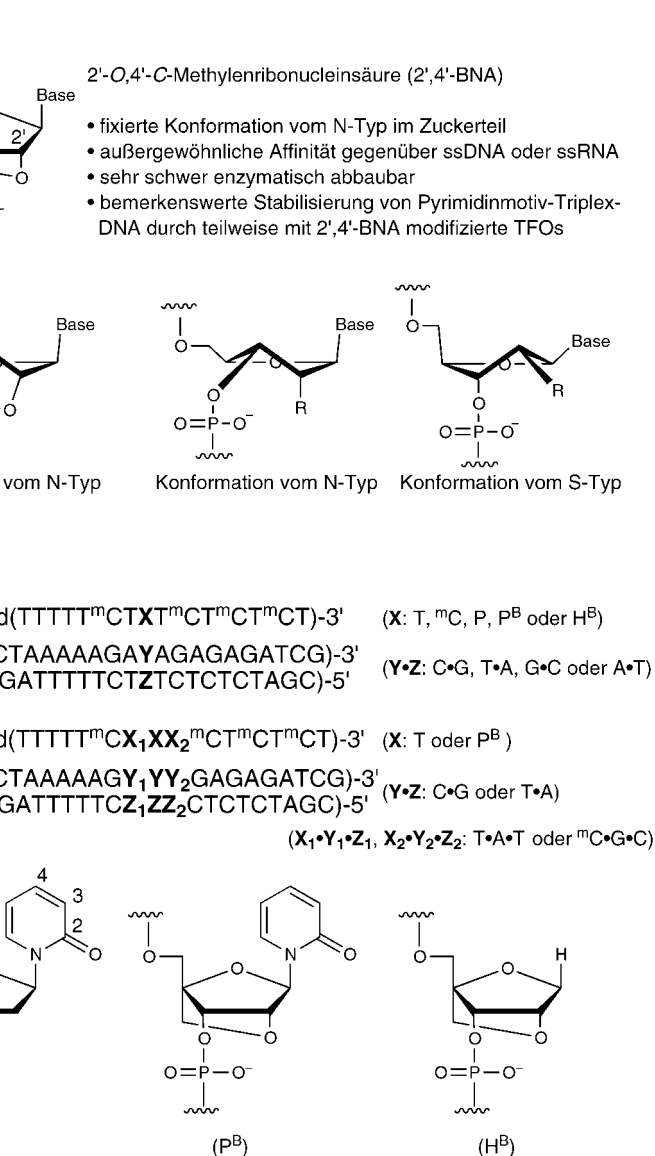


Eine 2',4'-verbrückte Nucleinsäure mit 2-Pyridon als Nucleobase: effiziente Erkennung einer C·G-Unterbrechung durch Triplexbildung mit einem Pyrimidinmotiv**

Satoshi Obika, Yoshiyuki Hari, Mitsuaki Sekiguchi und Takeshi Imanishi*

Die Triplexbildung zwischen doppelsträngiger DNA und einem Triplex-bildenden Oligonucleotid (TFO) ist für praktische Anwendungen der Antigenmethode und in der Genomanalyse von Bedeutung. In einer mit dem Pyrimidinmotiv gebildeten Triplex-DNA bindet das Homopyrimidin-TFO über Hoogsteen-Wasserstoffbrücken sequenzspezifisch an den Homopurinstrang der doppelsträngigen Ziel-DNA unter Bildung von T·A·T- und C⁺·G·C-Triaden. Eine Unterbrechung der Homopurinsequenz der doppelsträngigen Ziel-DNA durch ein Pyrimidinnucleotid destabilisiert den Dreifachstrang. Durch chemische Modifizierung der TFOs im Nucleobasenteil gelang es, Pyrimidin·Purin-Basenpaare wie C·G oder T·A effizient zu erkennen.^[1, 2] Die Entwicklung brauchbarer TFOs zur Erkennung beliebiger Sequenzen in doppelsträngiger DNA steht allerdings noch aus. Bei einem von uns hergestellten neuartigen Nucleosid mit einer fixierten Konformation vom N-Typ (C-3'-endo)^[3] – 2'-O,4'-C-Methylenribonucleinsäure (2',4'-BNA; Schema 1 A)^[4, 5] – stellten wir fest, dass mit diesem Nucleosid partiell modifizierte Pyrimidin-Oligonucleotide unter neutralen Bedingungen sehr gute Triplexbildende Eigenschaften haben.^[6–9]

Da zwischen den Pyrimidinbasen T oder C und einem C·G-Basenpaar in doppelsträngiger Homopurin·Homopyrimidin-DNA (dsDNA) mäßig starke Wechselwirkungen bestehen,^[10–12] gingen wir davon aus, dass das Sauerstoffatom der 2-Carbonylgruppe in T und C für die Erkennung des C·G-Basenpaares entscheidend ist. Daher wählten wir als Nucleobase für die Wechselwirkung mit einem C·G-Basenpaar 2-Pyridon,^[13, 14] das nur die 2-Carbonylgruppe hat (das Stickstoffatom in 3-Stellung sowie die 4-Carbonyl- von Thymin bzw. die 4-Aminogruppe von Cytosin fehlen, Schema 1 B). Wir berichten nun über die Synthese des 2',4'-BNA-Monomers **1** mit 2-Pyridoneinheit und seinen Einsatz zur effizienten Erkennung einer C·G-Unterbrechung in einer Homopurin·Homopyrimidin-dsDNA.

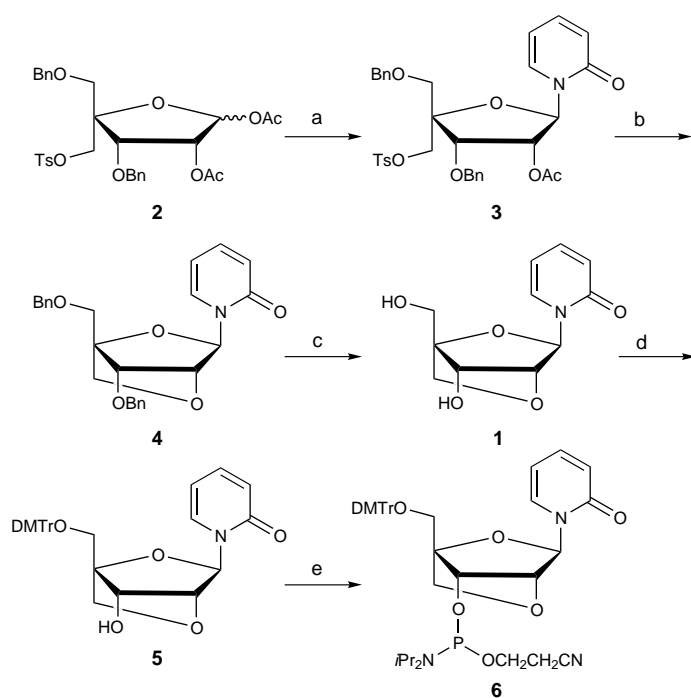


Schema 1. A) Struktur und Eigenschaften von 2',4'-BNA. B) In dieser Arbeit verwendete Oligonucleotide.

Die Kristallstrukturanalyse von **1** (Abbildung 1) ergab,^[16] dass die Zuckereinheit in der Konformation vom N-Typ fixiert ist (der Pseudorotationsphasenwinkel *P* beträgt 16.7°), die auch im 2',4'-BNA-Uracil-Monomer vorliegt (*P* = 17.4°).^[4] Einführung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (**1** → **5**) und Phosphitylierung (**5** → **6**) lieferten das Phosphoramidit **6** als DNA-Synthesebaustein, das mit einem automatisierten Phosphoramidit-Standardverfahren in die TFOs I und I' (Schema 1 B) eingebaut wurde. Die Reinheit der modifizierten TFOs wurde durch Umkehrphasen-HPLC ge-

[*] Prof. Dr. T. Imanishi, Dr. S. Obika, Y. Hari, M. Sekiguchi
Graduate School of Pharmaceutical Sciences
Osaka University
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871 (Japan)
Fax: (+81) 6-6879-8204
E-mail: imanishi@phs.osaka-u.ac.jp

[**] Diese Arbeit wurde durch ein Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (Nr. 12557201) von der japanischen Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften unterstützt.



Scheme 2. Synthese des 2',4'-BNA-Pyridon-Monomers **1** und des Phosphoramiditderivats **6**. a) 2-Pyridon, BSA, TMSOTf, Dichlorethan, Rückfluss, 74 %; b) K_2CO_3 , MeOH, RT, 100 %; c) 20 % $Pd(OH)_2/C$, Cyclohexen, EtOH, Rückfluss, 95 %; d) DMTrCl, Pyridin, RT, 96 %; e) 2-Cyanoethyl- N,N,N',N' -tetraisopropylphosphordiamidit, Diisopropylammoniumtetrazolid, MeCN/THF, RT, 98 %. Bn = Benzyl, Ac = Acetyl, Ts = Toluol-4-sulfonyl, DMTr = Dimethoxytrityl.

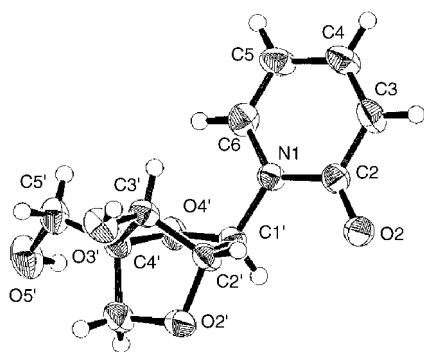


Abbildung 1. Struktur des 2',4'-BNA-Pyridon-Monomers **1** im Kristall.

prüft und die Zusammensetzungen durch Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie bestimmt.^[17]

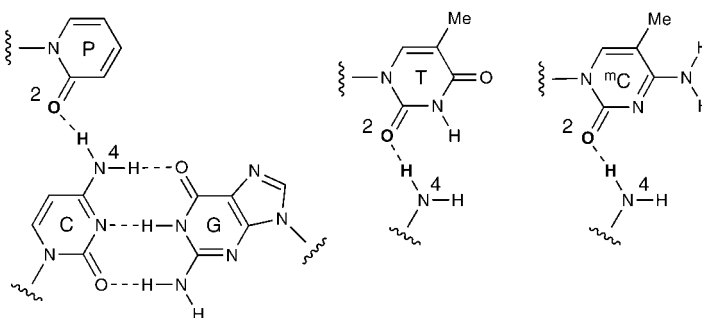
Die Schmelztemperaturen T_m der Triplexen mit dem TFO I, das das 2',4'-BNA-2-Pyridon-Monomer enthielt (P^B), wurden mit denen von Triplexen verglichen, bei denen TFO I eine natürliche Nucleobase (T oder mC), das DNA-2-Pyridon-Monomer (P)^[14] oder das nucleobasenfreie 2',4'-BNA-Monomer (H^B) enthielt (Tabelle 1).^[7, 18] Dabei stellte sich heraus, dass der Triplex I · II · III mit der P · C · G-Triade ebenso stabil war wie die Triplexen mit einer T · C · G- oder mC · C · G-Triade, was auf die große Bedeutung des 2-Carbonylsauerstoffatom in T, mC und P für das Erkennen eines C · G-Basenpaares schließen lässt.^[19] Zudem zeigte das P-haltige TFO I erwartungsgemäß hohe Sequenzspezifität, während die TFOs mit T

Tabelle 1. T_m -Werte [$^{\circ}C$] für den aus TFO I und dem Duplex II · III gebildeten Triplex.^[a]

X	Y · Z			
	C · G	G · C	T · A	A · T
T	25	20	17	44
mC	25	43	16	18
P	24	16	15	15
P^B	33	19	14	23
H^B	24	20	20	16

[a] Die UV-Schmelzkurven wurden in 7 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mit 140 mM KCl und 10 mM $MgCl_2$ bei 260 nm und einer Messgeschwindigkeit von 0.5 K min^{-1} aufgenommen. Die Oligonucleotidkonzentration betrug $1.5\text{ }\mu\text{M}$ je Strang.

oder mC vorzugsweise ein A · T- bzw. G · C-Basenpaar erkennen. In Schema 3 ist das angenommene Wasserstoffbrücken-Bindungsmuster in der P · C · G-Triade wiedergegeben.



Schema 3. Angenommene Strukturen der P · C · G-, T · C · G- und mC · C · G-Triaden.

Die Triplexbildung zwischen TFO I ($X = P^B$) und dem Duplex II · III ist ebenfalls sequenzselektiv, wobei der Triplex mit einer P^B · C · G-Triade stabiler ist als die mit den anderen möglichen P^B · X · Y-Triaden (Abbildung 2A). Außerdem ist die thermische Stabilität des Triplex mit der P^B · C · G-Triade höher als die des Triplex mit der T · C · G-Triade (Abbildung 2B). Die T_m -Werte der Dreifachstränge mit der P^B · C · G- ($33^{\circ}C$) und der P · C · G-Triade ($24^{\circ}C$) belegen, dass die durch die 2',4'-BNA-Modifizierung des 2-Pyridonderivats zur Erkennung der C · G-Unterbrechung induzierte Triplexstabilisierung ($\Delta T_m = +9\text{ K}$) ähnlich hoch ist wie diejenige, die eine 2',4'-BNA-Modifizierung von Thymidin oder 5-Methylcytidin in den vollständig passenden Dreifachsträngen bewirkt.^[7]

Um die Allgemeingültigkeit unseres Befundes zu belegen, wurde auch das Erkennungsvermögen von P^B für eine C · G-Störung in anderen dsDNA-Zielmolekülen untersucht (Tabelle 2). Der Austausch eines A · T-Basenpaares gegen ein G · C-Basenpaar in Nachbarstellung zur C · G-Unterbrechung führte aufgrund der geringen Stabilität der mC · G · C-Triade unter neutralen Bedingungen zu niedrigeren T_m -Werten. Die Fähigkeit zur Triplexbildung mit dem entsprechenden Duplex ($Y · Z = C · G$) blieb jedoch bei der TFO I' ($X = P^B$) erhalten. Die Triplexen I' · II' · III' mit P^B · C · G-Triade waren zudem thermisch wesentlich stabiler als die mit einer P^B · T · A-, T · C · G- oder T · T · A-Triade.

Unseres Wissens ist P^B eines der besten Nucleinsäureanaloge zur Erkennung von C · G-Basenpaaren, da die Bindungs-

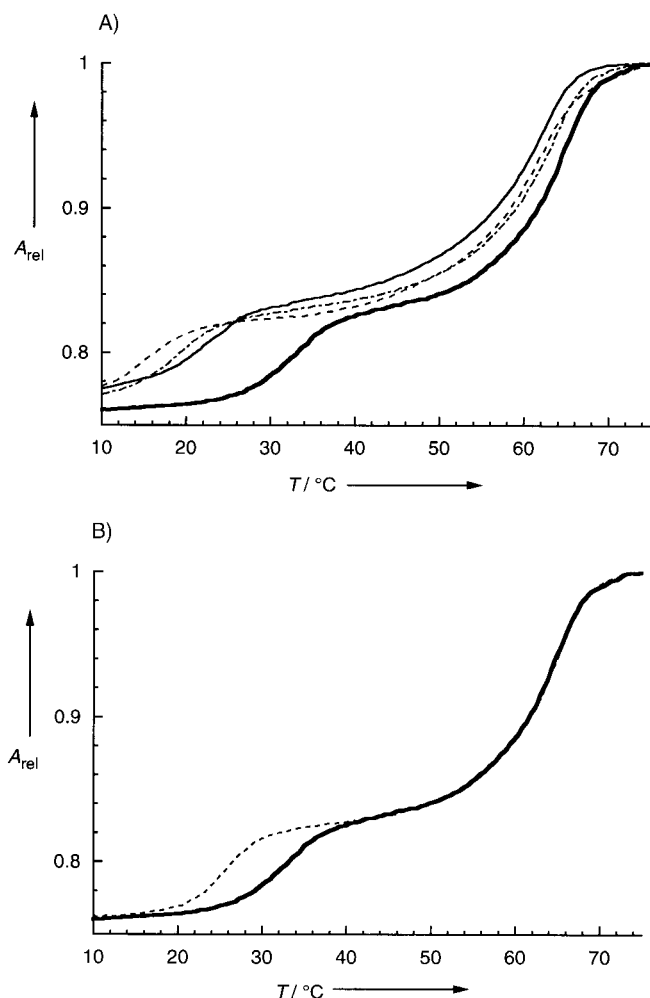


Abbildung 2. T_m -Kurven der Triplexe I·II·III mit A) $P^B \cdot C \cdot G$ - (—), $P^B \cdot T \cdot A$ - (---), $P^B \cdot G \cdot C$ - (—•—) und $P^B \cdot A \cdot T$ -Triade (—) sowie B) $P^B \cdot C \cdot G$ - (—) und $T \cdot C \cdot G$ -Triade (---).

Tabelle 2. T_m -Werte [°C] für den aus TFO I' und dem Duplex II'·III' gebildeten Triplex.^[a]

$X_1 \cdot X \cdot X_2$	Y·Z		$X_1 \cdot X \cdot X_2$	Y·Z	
	C·G	T·A		C·G	T·A
T·T· mC	16	ca. 10	$mC \cdot P^B \cdot T$	21	— ^[b]
T· $P^B \cdot mC$	27	ca. 10	$mC \cdot T \cdot mC$	— ^[b]	— ^[b]
$mC \cdot T \cdot T$	13	ca. 10	$mC \cdot P^B \cdot mC$	16	— ^[b]

[a] Siehe Fußnote in Tabelle 1. [b] Die für die Triplex-Dissoziation typische Hyperchromie trat nicht auf.

affinität ohne Selektivitätsverlust signifikant zunimmt. Berücksichtigt man, dass das TFO I mit dem nucleobasenfreien 2',4'-BNA-Monomer (H^B) nur geringen Einfluss auf die Triplexstabilität hat, lässt sich das außergewöhnliche Erkennungsvermögen von P^B für das C·G-Basenpaar auf die 2'-O,4'-C-Methylen-verbrückte Ribofuranose-Einheit und eine zugehörige Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem 2-Carbonylsauerstoffatom in P^B und der 4-Aminogruppe in C zurückführen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die 2-Carbonylsauerstoffatome von Pyridon- und Pyrimidinnucleobasen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von C·G-Basenpaaren spielen. Im Unterschied zu T oder mC hat das 2-Pyridonderivat (P) eine recht ordentliche C·G-Selektivität, weil das Stickstoffatom in 3-Stellung und die 4-Carbonyl- bzw. 4-Aminogruppe fehlen, die für Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Basenpaaren wesentlich sind. Die Kombination aus 2-Pyridon und der 2'-O,4'-C-Methylen-verbrückten Zuckereinheit führt ohne Selektivitätsverlust zu signifikant höherer Bindungsaffinität gegenüber dem C·G-Basenpaar. Die Anwendung dieser Ergebnisse auf die Regulation der Genexpression wird zurzeit untersucht.

Eingegangen am 4. Dezember 2000,
ergänzte Fassung am 2. März 2001 [Z16220]

- [1] I. Luyten, P. Herdewijn, *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, 33, 515–576, zit. Lit.
- [2] a) S. O. Doronina, J.-P. Behr, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 63–71, zit. Lit.; b) I. Prévot-Halter, C. J. Leumann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2657–2660.
- [3] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, Berlin, **1984**, S. 17.
- [4] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8735–8738.
- [5] Wir haben BNA als Abkürzung für eine neue Klasse von Nucleinsäureanaloga mit 2'-O,4'-C- oder 3'-O,4'-C-Methylen-verbrückter Struktur eingeführt (2',4'-BNA bzw. 3',4'-BNA). 2',4'-BNA wurde auch als LNA bezeichnet; siehe S. K. Singh, P. Nielsen, A. A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1998**, 455–456.
- [6] T. Imanishi, S. Obika, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **1999**, 57, 969–980.
- [7] S. Obika, Y. Hari, T. Sugimoto, M. Sekiguchi, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 8923–8927.
- [8] H. Torigoe, Y. Hari, M. Sekiguchi, S. Obika, T. Imanishi, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 2354–2360.
- [9] S. Obika, T. Uneda, T. Sugimoto, D. Nanbu, T. Minami, T. Doi, T. Imanishi, *Bioorg. Med. Chem.*, im Druck.
- [10] K. Yoon, C. A. Hobbs, J. Koch, M. Sardaro, R. Kutny, A. L. Weis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3840–3844.
- [11] J. L. Mergny, D. Collier, M. Rougée, T. Montanay-Garestier, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 1521–1526.
- [12] B. P. Belotserkovskii, A. G. Veselkov, S. A. Filippov, V. N. Dobrynin, S. M. Mirkin, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 6621–6624.
- [13] U. Niedballa, H. Vorbrüggen in *Nucleic Acid Chemistry, Part 1* (Hrsg.: L. B. Townsend, R. S. Tipson), Wiley, New York, **1978**, S. 481–484.
- [14] R. H. Durland, T. S. Rao, G. R. Revankar, J. H. Tinsley, M. A. Myrick, D. M. Seth, J. Rayford, P. Singh, K. Jayaraman, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 3233–3240.
- [15] A. A. Koshkin, V. K. Rajwanshi, J. Wengel, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4381–4384.
- [16] Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-152458“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [17] MALDI-TOF-MS: m/z (ber.): TFO I ($X = P^B$) [$M - H$][−] 4493.37 (4493.05); TFO I (H^B) [$M - H$][−] 4400.41 (4399.97); TFO I' ($X_1 \cdot X \cdot X_2 = T \cdot P^B \cdot mC$) [$M - H$][−] 4491.60 (4492.07); TFO I' ($mC \cdot P^B \cdot T$) [$M - H$][−] 4492.83 (4492.07); TFO I' ($mC \cdot P^B \cdot mC$) [$M - H$][−] 4490.48 (4491.08).
- [18] L. Kværnø, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1999**, 657–658.
- [19] Prévot-Halter und Leumann nehmen an, dass das 3-Stickstoffatom von Pyrimidin zur Wasserstoffbrückenbindung mit der 4-Aminogruppe in C beiträgt. Siehe Lit. [2b].