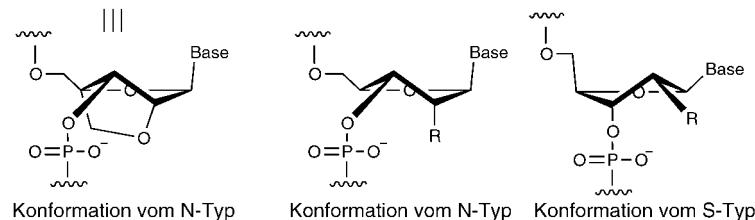
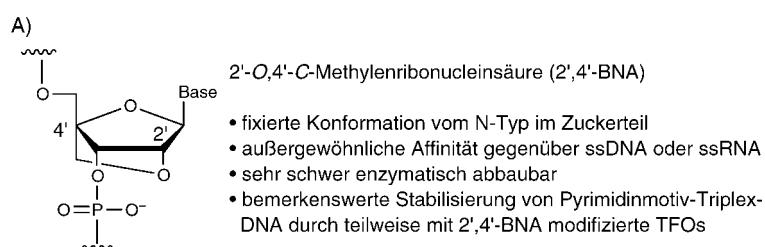


**Eine 2',4'-verbrückte Nucleinsäure mit 2-Pyridon als Nucleobase: effiziente Erkennung einer C·G-Unterbrechung durch Triplexbildung mit einem Pyrimidinmotiv\*\***

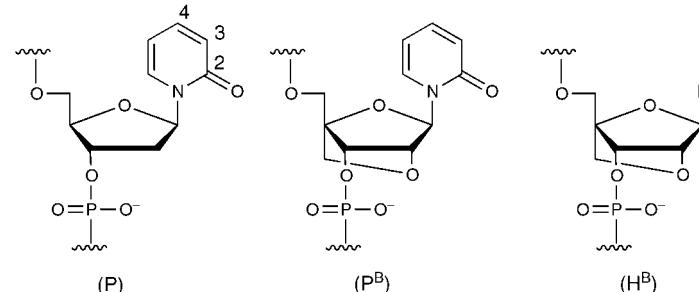
Satoshi Obika, Yoshiyuki Hari, Mitsuaki Sekiguchi und Takeshi Imanishi\*

Die Triplexbildung zwischen doppelsträngiger DNA und einem Triplex-bildenden Oligonukleotid (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<sup>+</sup>·G·C-Triaden. Eine Unterbrechung der Homopurinsequenz der doppelsträngigen Ziel-DNA durch ein Pyrimidinnukleotid destabilisiert den Dreifachstrang. Durch chemische Modifizierung der TFOs im Nucleobasenteil gelang es, Pyrimidin·Purin-Basenpaare wie C·G oder T·A effizient zu erkennen.<sup>[1,2]</sup> 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)<sup>[3]</sup> – 2'-O,4'-C-Methylenribonucleinsäure (2',4'-BNA; Schema 1 A)<sup>[4,5]</sup> – stellten wir fest, dass mit diesem Nucleosid partiell modifizierte Pyrimidin-Oligonukleotide unter neutralen Bedingungen sehr gute Triplexbildende Eigenschaften haben.<sup>[6–9]</sup>

Da zwischen den Pyrimidinbasen T oder C und einem C·G-Basenpaar in doppelsträngiger Homopurin·Homopyrimidin-DNA (dsDNA) mäßig starke Wechselwirkungen bestehen,<sup>[10–12]</sup> 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,<sup>[13,14]</sup> 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 1B). Wir berichten nun über die Synthese des 2',4'-BNA-Monomers **1** mit 2-Pyridoneinheit und seinen Einsatz zur effizienten Erken-



- B)
- I 5'-d(TTTTT<sup>m</sup>CTXT<sup>m</sup>CT<sup>m</sup>CT<sup>m</sup>CT)-3' (X: T, <sup>m</sup>C, P, P<sup>B</sup> oder H<sup>B</sup>)  
II 5'-d(GCTAAAAAGAYAGAGAGATCG)-3' (Y·Z: C·G, T·A, G·C oder A·T)  
III 3'-d(CGATTTTCZ<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>CTCTCTAGC)-5' (X<sub>1</sub>·Y<sub>1</sub>·Z<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>·Y<sub>2</sub>·Z<sub>2</sub>: T·A·T oder <sup>m</sup>C·G·C)
- I' 5'-d(TTTTT<sup>m</sup>CX<sub>1</sub>XX<sub>2</sub><sup>m</sup>CT<sup>m</sup>CT<sup>m</sup>CT)-3' (X: T oder P<sup>B</sup>)  
II' 5'-d(GCTAAAAGY<sub>1</sub>YY<sub>2</sub>GAGAGAGATCG)-3' (Y·Z: C·G oder T·A)  
III' 3'-d(CGATTTTCZ<sub>1</sub>ZZ<sub>2</sub>CTCTCTAGC)-5' (X<sub>1</sub>·Y<sub>1</sub>·Z<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>·Y<sub>2</sub>·Z<sub>2</sub>: T·A·T oder <sup>m</sup>C·G·C)



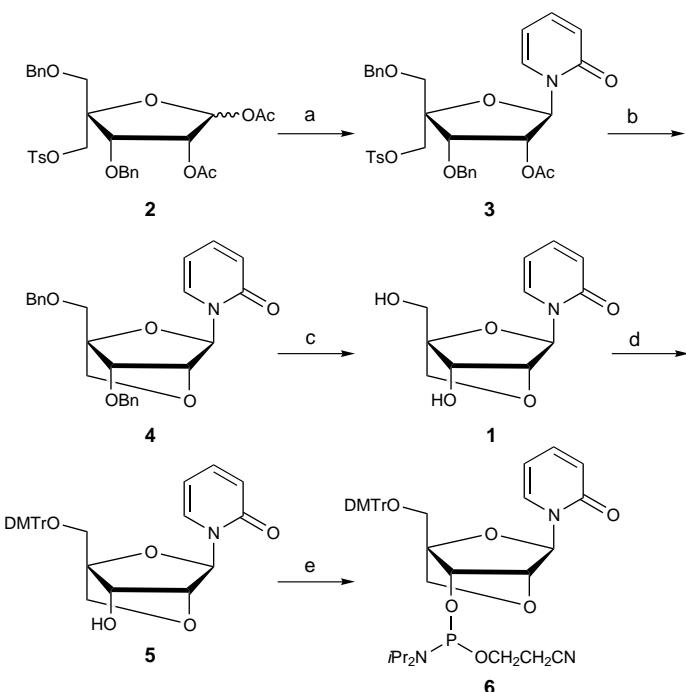
Schema 1. A) Struktur und Eigenschaften von 2',4'-BNA. B) In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

nung einer C·G-Unterbrechung in einer Homopurin·Homopyrimidin-dsDNA.

Die Synthese von **1** ist in Schema 2 skizziert. Die aus D-Glucose leicht erhältliche Ausgangsverbindung **2**<sup>[15]</sup> wurde mit 2-Pyridon, *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) und Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat (TMSOTf) in Dichlorethan zu **3** umgesetzt. Dieses wurde durch Reaktion mit Kaliumcarbonat in Methanol in das bicyclische Nucleosid **4** überführt, dessen Hydrogenolyse die gewünschte Verbindung **1** lieferte. Die Kristallstrukturanalyse von **1** (Abbildung 1) ergab,<sup>[16]</sup> 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°).<sup>[4]</sup> 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 1B) 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.



Schema 2. Synthese des 2',4'-BNA-Pyridon-Monomers **1** und des Phosphoramiditerivats **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, Diisopropylammoniumtetrizolet, MeCN/THF, RT, 98 %. Bn = Benzyl, Ac = Acetyl, Ts = Toluol-4-sulfonyl, DMTr = Dimethoxytrityl.

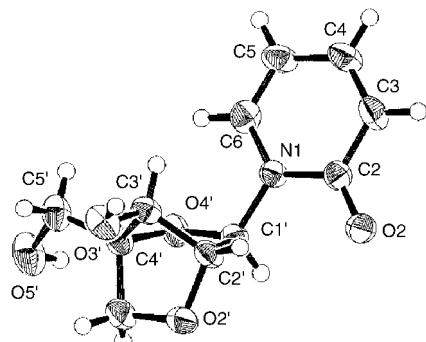


Abbildung 1. Struktur des 2',4'-BNA-Pyridon-Monomers **1** im Kristall.

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

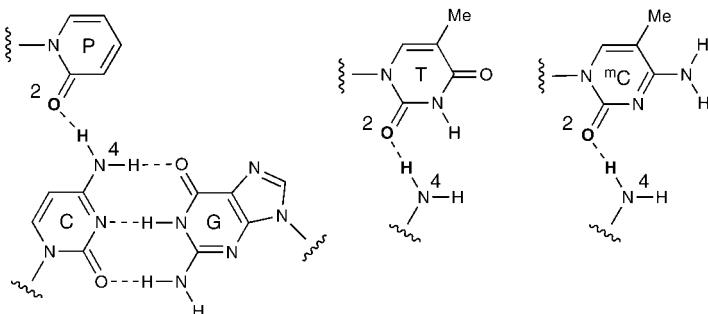
Die Schmelztemperaturen  $T_m$  der Triplexe mit dem TFO I, das das 2',4'-BNA-2-Pyridon-Monomer enthielt ( $P^B$ ), wurden mit denen von Triplexen verglichen, bei denen TFO I eine natürliche Nucleobase (T oder  $mC$ ), das DNA-2-Pyridon-Monomer (P)<sup>[14]</sup> oder das nucleobasenfreie 2',4'-BNA-Monomer (H<sup>B</sup>) enthielt (Tabelle 1).<sup>[7, 18]</sup> Dabei stellte sich heraus, dass der Triplex I · II · III mit der P · C · G-Triade ebenso stabil war wie die Triplexe 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.<sup>[19]</sup> Zudem zeigte das P-haltige TFO I erwartungsgemäß hohe Sequenzspezifität, während die TFOs mit T

Tabelle 1.  $T_m$ -Werte [°C] für den aus TFO I und dem Duplex II · III gebildeten Triplex.<sup>[a]</sup>

X	Y · Z			
	C · G	G · C	T · A	A · T
T	25	20	17	44
$mC$	25	43	16	18
P	<b>24</b>	16	15	15
$P^B$	<b>33</b>	19	14	23
H <sup>B</sup>	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<sub>2</sub> bei 260 nm und einer Messgeschwindigkeit von 0.5 K min<sup>-1</sup> aufgenommen. Die Oligonukleotidkonzentration betrug 1.5  $\mu$ M je Strang.

oder  $mC$  vorzugsweise ein A · T- bzw. G · C-Basenpaar erkennen. In Schema 3 ist das angenommene Wasserstoffbrückenbindungs muster 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 2 A). 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 2 B). Die  $T_m$ -Werte der Dreifachstränge mit der P · C · G- (33 °C) und der P · C · G-Triade (24 °C) belegen, dass die durch die 2',4'-BNA-Modifizierung des 2-Pyridonderivats zur Erkennung der C · G-Unterbrechung induzierte Triplexstabilisierung ( $\Delta T_m = +9$  K) ähnlich hoch ist wie diejenige, die eine 2',4'-BNA-Modifizierung von Thymidin oder 5-Methylcytidin in den vollständig passenden Dreifachsträngen bewirkt.<sup>[7]</sup>

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 Triplexe 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 Nucleinsäureanaloga zur Erkennung von C · G-Basenpaaren, da die Bindungs-

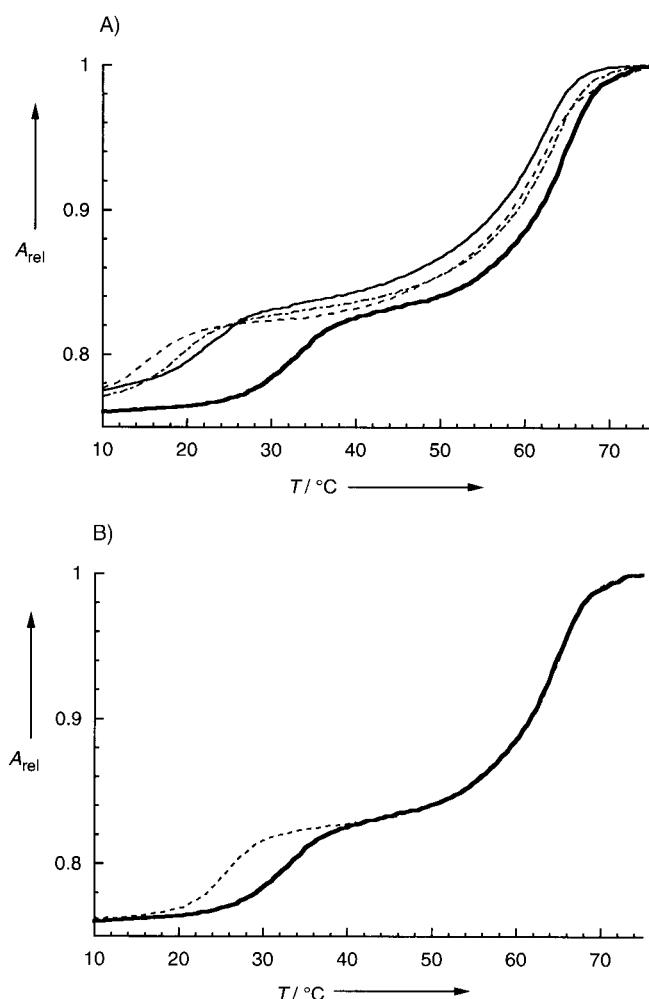


Abbildung 2.  $T_m$ -Kurven der Triplexe I'·II'·III mit A)  $P^B \cdot C \cdot G$ - (—),  $P^B \cdot T \cdot A$ - (---),  $P^B \cdot G \cdot C$ - (···) und  $P^B \cdot A \cdot T$ -Triade (—) sowie B)  $P^B \cdot C \cdot G$ - (—) und  $T \cdot C \cdot G$ -Triade (---).

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

$X_1 \cdot X \cdot X_2$	Y · Z	$X_1 \cdot X \cdot X_2$	Y · Z
	C · G	T · A	C · G
T-T- <sup>m</sup> C	16	ca. 10	<sup>m</sup> C-P <sup>B</sup> -T
T-P <sup>B</sup> - <sup>m</sup> C	<b>27</b>	ca. 10	<sup>m</sup> C-T- <sup>m</sup> C
<sup>m</sup> C-T-T	13	ca. 10	<sup>m</sup> C-P <sup>B</sup> - <sup>m</sup> C
			<b>16</b>
			— <sup>[b]</sup>

[a] Siehe Fußnote in Tabelle 1. [b] Die für die Triplex-Dissociation 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 Pyrimidin-nucleobasen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von C·G-Basenpaaren spielen. Im Unterschied zu T oder  $^{m}$ C hat das 2-Pyridon-derivat (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 Zucker-Einheit 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. Herdeijnen, *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. Ueda, 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. Montenay-Garestier, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1521–1526.
- [12] B. P. Belotserkovskii, A. G. Veselkov, S. A. Filippov, V. N. Dobrynnin, 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. Koshkin, V. K. Rajwanshi, J. Wengel, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4381–4384.
- [16] Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) 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' ( $X_1 \cdot X_2 = T \cdot P^B \cdot mC$ )  $[M - H]^-$  4491.60 (4492.07); TFO I' ( $^{m}C \cdot P^B \cdot T$ )  $[M - H]^-$  4492.83 (4492.07); TFO I' ( $^{m}C \cdot P^B \cdot mC$ )  $[M - H]^-$  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].