



Postsynthetische „Photoklick“-Modifizierung von DNA**

Stefanie Arndt und Hans-Achim Wagenknecht*

Abstract: Ein neu synthetisierter DNA-Baustein auf Basis von 2'-Desoxyuridin trägt in der 5-Position ein über eine Aminopropinylgruppe verknüpft, push-pull-substituiertes Diaryltetrazol. Das damit modifizierte Oligonucleotid ermöglicht die postsynthetische Markierung mit einem Maleinimid tragenden Sulfo-Cy3-Farbstoff, N-Methylmaleinimid und Methylmethacrylat als Dipolarophile jeweils durch Bestrahlung mit Licht bei $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ (LED). Die experimentell bestimmte Geschwindigkeitskonstante beträgt $(23 \pm 7) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und ist bemerkenswert groß gegenüber denen anderer kupferfreier, bioorthogonaler Reaktionen und ähnlich groß wie jene der kupferkatalysierten Cycloaddition von Aziden mit Acetylenen.

Die postsynthetische Modifizierung von Nucleinsäuren ist eine inzwischen gut etablierte Methodik, die hauptsächlich als kupferkatalysierte Cycloaddition von Acetylenen mit Aziden durchgeführt wird.^[1,2] Auch wenn die Markierung in lebenden Zellen durch kupferkatalysierte „Klick“-Reaktionen demonstriert wurde, ist es problematisch, sich dabei auf Kupfer zu verlassen,^[3] denn selbst Spuren von Kupferionen als Verunreinigungen aus der postsynthetischen oder In-vivo-Modifizierung stellen wegen ihrer Cytotoxizität eine deutliche Beeinträchtigung dar.^[4] Deswegen konzentrieren wir^[5] und andere uns darauf,^[6–11] bioorthogonale und kupferfreie Alternativen zu entwickeln, um Nucleinsäuren zu modifizieren. Das schließt ringspannungsgetriebene^[5] und andere 1,3-dipolare Cycloadditionen,^[6] Diels-Alder-Reaktionen mit normalem^[7] und inversem Elektronenbedarf,^[8] reduktive Aminierungen,^[9] Thiol-Alken-Additionen^[10] und Suzuki-Miyaura-Kupplungen^[11] mit ein. Es gibt zwei metallfreie, bioorthogonale Reaktionen, die eine gute Alternative bieten, weil ihre Geschwindigkeitskonstanten vergleichbar mit denen der kupferkatalysierten Azid-Acetylen-Cycloaddition sind ($k \approx 10\text{--}200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[12,13] Dies sind erstens die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf von Tetrazinen mit gespannten Alkenen ($k \approx 1\text{--}10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[8,12,14] und zweitens die lichtinduzierte Cycloaddition von Tetrazolen mit aktivierten Alkenen (Photoklick-Reaktion, $k \approx 60 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[12,13]

Die zweite Alternative scheint besonders lohnenswert, weil sie die Geschwindigkeit und Spezifität einer „Klick“-Reaktion mit einem photochemischen Prozess verbindet, der eine räumliche und zeitliche Kontrolle ermöglicht. Bereits in den 1960er Jahren berichteten Huisgen und Mitarbeiter nicht nur über diese photoinduzierte Cycloaddition von 2,5-Diphenyltetrazolen mit Methylcrotonat, sondern auch über den Nachweis von Diphenylnitrilimin als 1,3-dipolares Intermediat.^[15] Vor einigen Jahren haben Lin und Mitarbeiter diesen Reaktionstyp weiterentwickelt, um ihn in Wasser,^[16] für die Peptid-Kreuzkupplung^[17] und schlussendlich auch als Hilfsmittel für die Proteinmodifizierung anzuwenden.^[18] Allerdings wurde die „Photoklick“-Cycloaddition bisher nicht für die Nucleinsäure-Modifizierung angewendet, wahrscheinlich deswegen, weil 2,5-Diphenyltetrazole im Wellenlängenbereich von $\lambda_{\text{exc}} = 250\text{--}310 \text{ nm}$ belichtet werden müssen. Dieser Bereich überlappt sehr stark mit der Absorption der Nucleinsäuren. Lin und Mitarbeiter beschrieben aber auch ein photoaktivierbares Diaryltetrazol **1**, das eine elektronenschiebende Dimethylaminogruppe an einem Ende und eine elektronenschiebende Carboxygruppe am anderen Ende trägt.^[19] Das Push-pull-System dieses Diaryltetrazols verschiebt die Anregung nach $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$, eine Wellenlänge, die nicht nur die selektive Anregung außerhalb des Absorptionsbereiches der Nucleinsäuren, sondern auch die Verwendung von LEDs als preiswerte und verlässliche Lichtquelle ermöglicht. Hier beschreiben wir den neuen DNA-Baustein **3**, der das Diaryltetrazol **1**, verbrückt über eine Aminopropinylgruppe in der 5-Position des 2'-Desoxyuridins, trägt, den Einbau von **3** in ein Oligonucleotid durch automatisierte Phosphoramiditchemie und die anschließende „Photoklick“-Modifizierung mit einem sulfonylierten Cy3-Farbstoff.

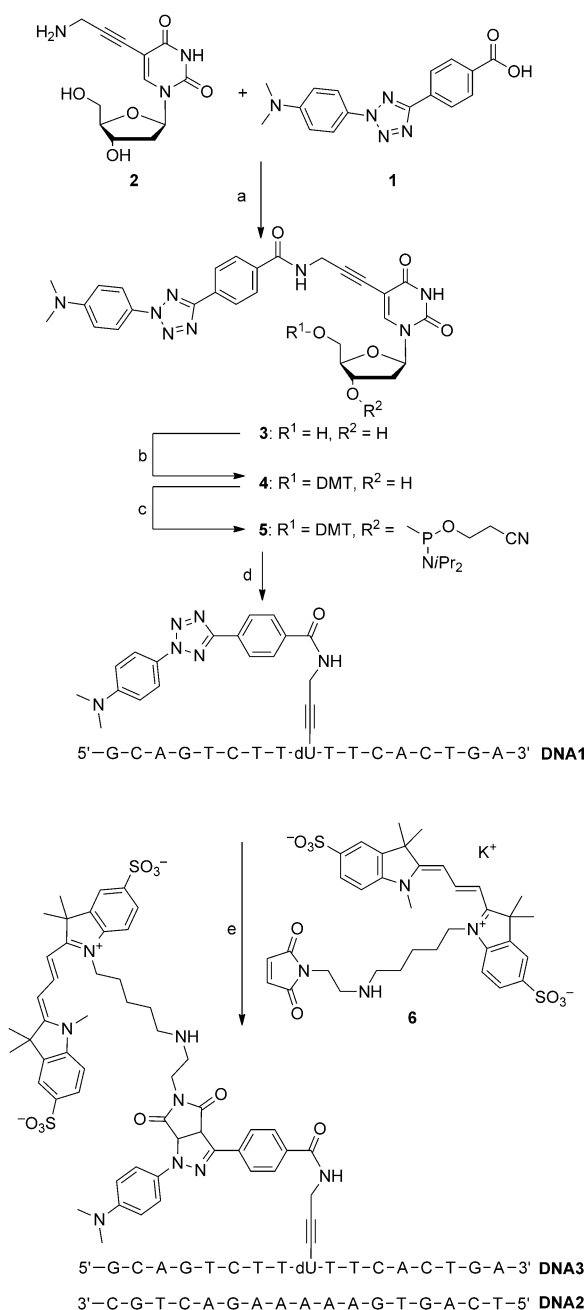
Die Synthesearbeiten (Schema 1) begannen mit 5-(3'-Aminopropinyl)-2'-desoxyuridin (**2**), das als Ausgangsmaterial durch literaturbekannte Vorschriften hergestellt wurde.^[15] Das push-pull-substituierte Diphenyltetrazol **1** als zweites Ausgangsmaterial wurde aus dem sulfonierten Hydrazon des 4-Formylbenzoesäuremethylesters und dem Diazoniumsalz von *p*-*N,N*-Dimethylanilin synthetisiert (siehe Hintergrundinformationen). Die Carboxygruppe des Tetrazols **1** wurde in Gegenwart des Peptidkupplungsreagens HBTU mit der Aminopropinylgruppe des Nucleosids **2** verknüpft. Das Nucleosid-Tetrazol-Konjugat **3** wurde in 83 % Ausbeute erhalten und über Standardverfahren in den DNA-Baustein **5** überführt. Mithilfe dieses DNA-Bausteins und der automatisierten Festphasenchemie (sowie einer verlängerten Kupplungszeit von $2 \times 300 \text{ s}$ für **5**) wurde **DNA1** hergestellt und über semipräparative HPLC gereinigt.

Anschließend fand das Tetrazol Anwendung als funktionelle und reaktive Gruppe in **DNA1** in einer postsynthetischen „Photoklick“-Modifizierung mit dem käuflich erwor-

[*] Dipl.-Chem. S. Arndt, Prof. Dr. H.-A. Wagenknecht
Institut für Organische Chemie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fritz-Haber-Weg 6, 76131 Karlsruhe (Deutschland)
E-Mail: Wagenknecht@kit.edu

[**] Für die finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (ERACHEM Wa 1386/15-1) und KIT wird gedankt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Synthesedetails, Bilder der NMR- und MS-Analysen, experimentelle Vorschriften der „Photoklick“-Modifikation und Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407874> zu finden.



Scheme 1. Synthese des tetrazolmodifizierten DNA-Bausteins **5** und postsynthetische Modifizierung von **DNA1** mit dem Sulfo-Cy3-Farbstoff **6**: a) HBTU, HOBT·H₂O, *i*Pr₂NEt, DMF, Raumtemperatur, 20 h; 83 %; b) DMT-Cl, Pyridin, Raumtemperatur, 3 Tage; 60 %; c) β -Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, Raumtemperatur, 24 h; 99 %; d) Festphasensynthese unter Standardbedingungen; e) **6**, LED mit $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$, 10 mM Natriumphosphatpuffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C, 30 min. DIPEA = Diisopropylethylamin, DMT = Dimethoxytrityl, HBTU = *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium-hexafluorophosphat, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol.

benen Sulfo-Cy3-Farbstoff **6**, der die Maleinimidfunktion am Ende eines kurzen Alkyllinkers aufweist. Unerwarteterweise scheiterte die Cycloaddition sowohl mit dem Nucleosid **4** in Wasser/MeCN-Mischungen als auch mit einzelsträngiger **DNA1** in DMSO oder Wasser/DMSO-Mischungen. Die Re-

aktion verlief nur erfolgreich in wässrigem Standardpuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, 250 mM NaCl, pH 7), was andererseits ein klarer Vorteil für zukünftige In-vivo-Anwendungen ist. Die Reaktion kann durch UV/Vis-Absorptionsspektroskopie beobachtet werden (Abbildung 1), weil der

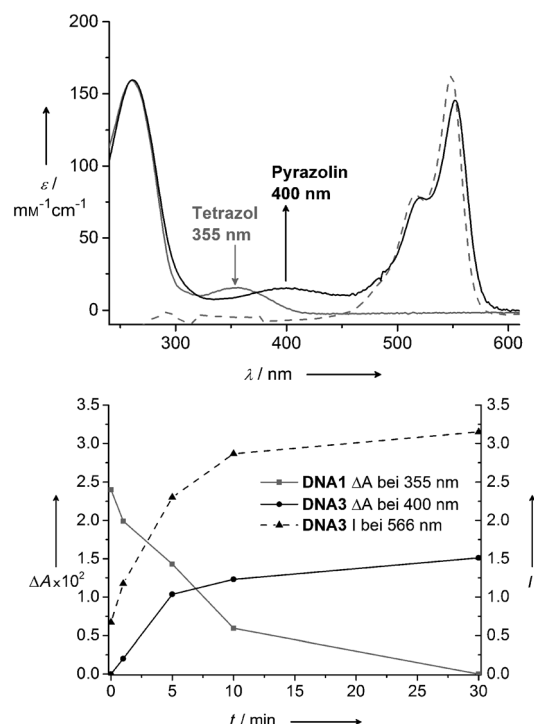


Abbildung 1. Oben: UV/Vis-Absorption des Ausgangsmaterials **DNA1** mit **6** im Vergleich zum „Photoklick“-Produkt **DNA3**; **DNA1** (2.5 μM), **6** (1.05 Äquiv., 2.63 μM). Unten: zeitabhängige Absorptionsveränderung bei $\lambda_{\text{max}} = 355 \text{ nm}$ (**DNA1**) und 400 nm (**DNA3**) und zeitabhängige Fluoreszenzintensität von **DNA3**, $\lambda_{\text{exc}} = 357 \text{ nm}$. Alle Messungen wurden in 50 mM Natriumphosphatpuffer, 250 mM NaCl, pH 7 und bei 20 °C durchgeführt.

Tetrazolchromophor von **DNA1** als charakteristische Seitenbande zwischen $\lambda_{\text{abs}} = 300$ und 400 nm mit einem breiten Maximum bei $\lambda_{\text{max}} = 355 \text{ nm}$ absorbiert. Nach Bestrahlung durch LEDs bei $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ nimmt die Absorption bei $\lambda_{\text{max}} = 355 \text{ nm}$ ab, und eine neue Absorption bei $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$, die der Entstehung des Pyrazolinchromophors zugeordnet werden kann, wächst an. Das Produkt wurde zusätzlich durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Der isobestische Punkt bei $\lambda_{\text{abs}} = 378 \text{ nm}$ (siehe Hintergrundinformationen) zeigt, dass diese „Photoklick“-Modifizierung ohne beobachtbare Intermediate verläuft, was die Annahme stützt, dass das Nitrilimin-Intermediat sehr kurzlebig ist und mit der Maleinimidfunktion von **6** sehr rasch reagiert. Die modifizierte **DNA3** wurde nochmals durch semipräparative HPLC gereinigt, durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und durch UV/Vis-Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ (unter Verwendung von $\epsilon(\mathbf{6})_{260 \text{ nm}} = 3400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) quantifiziert. Die Produktbildung wurde nach 30 min Bestrahlungsdauer durch LEDs bei $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ bestimmt. Die Ausbeute stieg von 8 auf 15 % (mit 1.05 Äquiv. **6**),

wenn doppelsträngige **DNA1-2** als Ausgangsmaterial verwendet wurde. Die Ausbeute ließ sich bis auf 34 % steigern (mit 5 Äquiv. **6**). Längere Bestrahlungszeiten waren nicht weiter produktiv, weil die photochemische Zersetzung der Diaryltetrazolgruppe mit der gewünschten photoinduzierten Cycloaddition konkurrierte. Die Beobachtung, dass doppelsträngige **DNA1-2** besser geeignet ist als einzelsträngige **DNA1**, kann durch die Annahme erklärt werden, dass die regelmäßige doppelhelikale Struktur das Tetrazol als funktionelle Gruppe besser zugänglich macht als der entsprechende Einzelstrang mit einer „verborgenen“ Tetrazolfunktion in einer ungünstigen Faltung. Die „Photoklick“-Cycloaddition von Tetrazolen zu Pyrazolen ist als fluorogene Reaktion bekannt,^[20,21] die Fluoreszenz des Pyrazolins von **DNA3** ist jedoch vergleichsweise schwach (siehe Hintergrundinformationen). Die Fluoreszenz (nach Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 357 \text{ nm}$) wird dominiert durch die intensive Emission des Sulfo-Cy3-Farbstoffes. Der zeitabhängige Anstieg dieser Sulfo-Cy3-Fluoreszenzintensität korreliert gut mit dem beobachteten Absorptionswechsel von **DNA1** (Tetrazol bei $\lambda_{\text{max}} = 355 \text{ nm}$) zu **DNA3** (Pyrazolin bei $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$).

Um die Bandbreite dieser „Photoklick“-Modifizierung abschätzen zu können, wurde **DNA1** in Gegenwart von *N*-Methylmaleinimid, Methylmethacrylat und Acrylnitril bestrahlt. Die ersten beiden Reaktionen lieferten die Produkte **DNA4** bzw. **DNA5**, die in 42 bzw. 23 % Ausbeute isoliert und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert wurden (siehe Hintergrundinformationen). Die dritte Reaktion scheiterte. Der kinetische Verlauf einer bioorthogonalen Reaktion ist von besonderer Bedeutung für ihre biologische Anwendbarkeit. Große Geschwindigkeitskonstanten sind wünschenswert, weil der ansonsten notwendige große Überschuss an Markierungsreagens zu Problemen bezüglich der Löslichkeit und Toxizität führen kann.^[12] Wir nahmen an, dass die Reaktion pseudoerster Ordnung verläuft; dies bedeutet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Konzentration des Dipolarophils **6** abhängt.^[22] Die Ausbeuten wurden per HPLC analysiert und daraus die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante beträgt $(23 \pm 7) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und ist bemerkenswert groß gegenüber denjenigen anderer kupferfreier, bioorthogonaler Reaktionen^[12] und ähnlich groß wie die der kupferkatalysierten Cycloaddition von Aziden mit Acetylenen.^[12,13]

Wir haben hier die photoinduzierte postsynthetische „Klick“-Modifikation am Oligonucleotid **DNA1** mit dem Sulfo-Cy3-Farbstoff **6** gezeigt. Der dafür notwendige DNA-Baustein **5** trägt ein Diaryltetrazol als photoaktivierbare Gruppe, die über eine Aminopropinylgruppe mit der 5-Position von 2'-Desoxyuridin verknüpft wurde. Diese Art der Verknüpfung hat zwei wesentliche Vorteile: Erstens ermöglicht sie, diese Tetrazol-Nucleosid-Konjugate in der enzymatischen Herstellung von Oligonucleotiden zu verwenden (Primer-Verlängerung und Polymerasekettenreaktion), weil DNA-Polymerasen (z.B. die KlenTaq-Polymerase) typischerweise Alkinmodifikationen in der 5-Position tolerieren.^[23] Zweitens wird erwartet, dass diese Verknüpfung die Struktur der DNA vergleichsweise wenig stört. Die Schmelztemperatur der modifizierten **DNA1-2** liegt bei 55.2°C und ist daher fast identisch mit der des vollständig

unmodifizierten Doppelstranges, der ein T anstelle des modifizierten 2'-Desoxyuridins aufweist (55.3°C). Die „Photoklick“-Modifizierung von **DNA1** kann bei $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$, und damit außerhalb des Absorptionsbereiches der Nucleinsäuren, sowie mithilfe von LEDs als preiswerten und verlässlichen Lichtquellen durchgeführt werden. Sie verläuft am besten in wässrigen Pufferlösungen und ergibt eine größere Ausbeute an gewünschter **DNA3**, wenn doppelsträngige **DNA1** als Ausgangsmaterial eingesetzt wird. Beide Beobachtungen sind ideale Voraussetzungen für chemisch-biologische Anwendungen dieser Modifizierungsmethode, besonders in lebenden Zellen. Darüber hinaus bietet die Methode alle Vorteile eines photochemischen Prozesses, hauptsächlich die der räumlichen und zeitlichen Auflösung.

Eingegangen am 1. August 2014,
veränderte Fassung am 12. September 2014
Online veröffentlicht am 30. Oktober 2014

Stichwörter: Bioorthogonalität · Cycloadditionen · Oligonucleotide · Photochemie · Tetrazol

- [1] Übersichten: a) P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8350–8358; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 8478–8487, zit. Lit.; b) F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4207–4220, zit. Lit.; c) A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1388–1405, zit. Lit.
- [2] F. Seela, S. A. Ingale, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 284–295.
- [3] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1912–1916.
- [4] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17993–18001.
- [5] C. Stubinitzky, G. B. Cserép, E. Bätzner, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 11218–11221.
- [6] a) K. Gutmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, 11, 2405–2408; b) I. Singh, J. S. Vyle, F. Heaney, *Chem. Commun.* **2009**, 3276–3278.
- [7] V. Borsenberger, S. Howorka, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 1477–1485.
- [8] a) U. Rieder, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 9168–9172; b) H. Bußkamp, E. Batroff, A. Niederwieser, O. S. Abdel-Rahman, R. F. Winter, V. Wittmann, A. Marx, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 10827–10829.
- [9] V. Raindlová, R. Pohl, M. Hocek, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 4080–4087.
- [10] J. Dadová, P. Orság, R. Pohl, M. Brázdová, M. Fojta, M. Hocek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10515–10518; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 10709–10712.
- [11] L. Lercher, J. F. McGouran, B. M. Kessler, C. Schofield, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10553–10558; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 10747–10752.
- [12] Übersichten: a) M. F. Debets, J. C. M. van Hest, F. P. J. T. Rutjes, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 6439–6455, zit. Lit.; b) K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 16–20, zit. Lit.; c) D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 592–605, zit. Lit.
- [13] Übersicht: > C. P. Ramil, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 11007–11022, zit. Lit.
- [14] J. Šečutě, N. K. Devaraj, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 761–767.

- [15] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60–70.
 - [16] Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155–4158.
 - [17] M. M. Madden, C. I. Rivera Vera, W. Song, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2009**, 5588–5590.
 - [18] Übersicht: R. K. V. Lim, Q. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 828–839, zit. Lit.
 - [19] Y. Wang, W. J. Hu, W. Song, R. K. V. Lim, Q. Lin, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3725–3728.
 - [20] M. Nuzzolo, A. Grabulosa, A. M. Z. Slawin, N. J. Meeuwenoord, G. A. van der Marel, P. C. J. Kamer, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3229–3236.
 - [21] J. Willenbacher, K. N. R. Wuest, J. O. Mueller, M. Kaupp, H.-A. Wagenknecht, C. Barner-Kowollik, *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 574–579.
 - [22] P. Leihkauf, V. Lohse, C. Csongar, G. Tomaschewski, *J. Prakt. Chem.* **1989**, *331*, 789–798.
 - [23] K. Bergen, A.-L. Steck, S. Schütt, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11840–11843.
-