



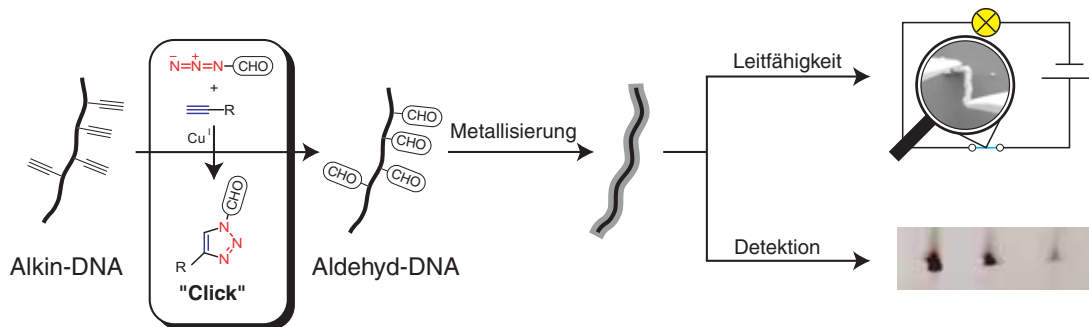
Johannes Gierlich (Autor)
**Selektive Modifikation von DNA durch
kupferkatalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1742>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Zusammenfassung



Die Einführung von funktionellen Gruppen in DNA unter Erhaltung der Basenpaarung und enzymatischen Prozessierbarkeit ist eine wichtige Möglichkeit DNA mit neuen Eigenschaften für neue Anwendungen zu erzeugen. Ziel der Arbeit war die Funktionalisierung von DNA mit Aldehyden zur Abscheidung von Silber mit Hilfe der Tollens-Reaktion. Dabei wurde nicht nur der direkte Einbau von aldehydmodifizierten Monomeren, sondern auch die Funktionalisierung von DNA mit Hilfe der Kupfer(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden und Alkinen („Click“-Chemie) untersucht. Diese erst vor kurzem entdeckte Reaktion zeichnet sich durch hohe Geschwindigkeit, hohe Ausbeute, hohe Toleranz funktioneller Gruppen und einfache Durchführung aus. Die Reaktion wurde schon in vielen Bereichen der Chemie und Biochemie erfolgreich eingesetzt.

Um die Kompatibilität der Reaktion mit DNA zu untersuchen, wurden mit Alkinen modifizierte Thymidine über Festphasensynthese in kurze DNA-Stränge eingebaut. Bei der Untersuchung der Produkte der Cycloaddition unter verschiedenen Bedingungen zeigte sich, dass die Stabilisierung der $\text{Cu}(\text{I})$ -Ionen durch spezielle Liganden, wie Tribenzyltriazolamin (TBTA), nötig war. Die direkte Zugabe von CuBr als Kupfer(I)-Quelle ohne Reduktionsmittel ergab die besten Ergebnisse. Mit diesen Bedingungen gelang es, sechs aufeinanderfolgende Alkine quantitativ mit verschiedenen Aziden umzusetzen. Die Bandbreite der eingeführten Funktionen reichte von Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluoreszein bis hin zu metallreduzierenden Gruppen, wie Zucker. Ein gewisser Abstand des Alkins zur Base war bei den Einzelsträngen für eine quantitati-

ve Umsetzung essentiell. Selbst die Reaktion an bis zu 2000 Basenpaare langen DNA-Strängen mit nur jeweils zwei Alkinen konnte ohne Schädigung der DNA durchgeführt werden.

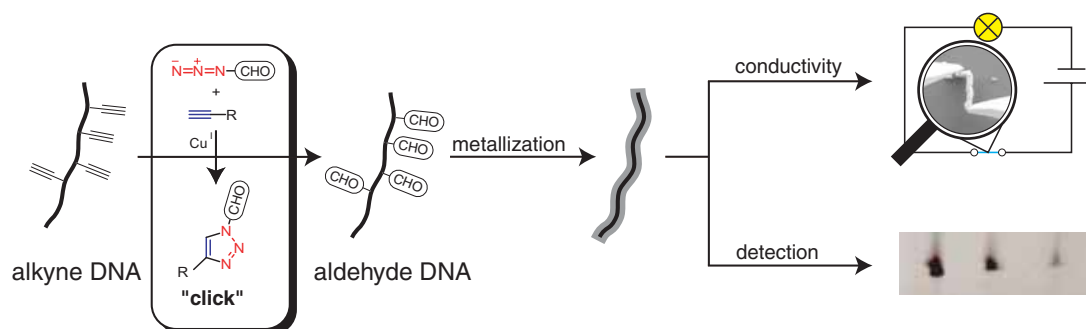
In Kooperation mit Prof. *Reinhoudt* an der Universität Twente wurde Alkin-DNA erfolgreich im *microcontact printing* (μ CP) auf azidmodifizierten Glasoberflächen verwendet. Um die DNA ohne Störung ihrer Struktur zu immobilisieren, wurden neue Festphasenmonomere für terminale Alkine synthetisiert. Diese Alkin-DNA wurde danach auf der Oberfläche erfolgreich mit einem fluoreszenzmarkierten Gegenstrang hybridisiert.

Zur Herstellung von langen DNA-Strängen (2000 Basenpaare) mit einer hohen Dichte an Aldehyden wurden Triphosphate mit Aldehyden oder Alkinen synthetisiert. Diese substituierten das entsprechende natürliche Triphosphat in der PCR. Bei den Aldehyd-Triphosphaten war die Freisetzung der Aldehyde, welche als Acetale geschützt waren, nicht ohne Schädigung der DNA möglich. Ein Baustein mit einem acetylgeschützten Zucker als Aldehydkomponente zeigte selektive Metallabscheidung. Diese sterisch anspruchsvollen Substrate erwiesen sich allerdings als schlechte Substrate für die Polymerasen in der PCR.

Triphosphate mit Alkinen wurden deutlich besser von den Polymerasen akzeptiert. So wurden mit 5-(1,7-Oktadiinyl)-2'-desoxyuridin- oder 5-(1,7-Oktadiinyl)-2'-desoxycytidintriphosphat PCR-Produkte mit bis zu 2000 Basenpaare Länge mit fast 900 Alkinen hergestellt. Die Alkin-Basen führten zu einer deutlichen Stabilisierung der DNA. Funktionalisierung der PCR-Produkte mit einem Galaktoseazid und anschließender enzymatischer Abbau zu den Monomeren zeigte für das Alkinocytidin quantitativen Umsatz. Bei PCR-Produkten mit Alkinuridinen reagierten mindestens 95 % der Alkine. Die Aldehyd-DNA konnte durch Silberfärbung auf Polyacrylamidgelen oder Membranen selektiv und sehr empfindlich nachgewiesen werden.

In einer Kooperation mit Prof. *Eichen* (Technion, Haifa) und Prof. *Simon* an der RWTH Aachen wurden die aldehydmodifizierten PCR-Produkte mit Silber oder Gold beschichtet. Mit AFM oder STM wurde die Selektivität und die Qualität der Metallabscheidung untersucht.

Summary



The introduction of new functional groups into DNA without disturbing the natural base pairing and the enzymatic processability is an important technique to broaden the usability of DNA for many applications. The aim of this thesis was the functionalization of DNA with aldehyde groups for the selective deposition of silver. This was reached not only by introducing these groups directly attached to nucleobases, but also by using the copper(I) catalyzed cycloaddition of alkynes and azides („Click“-chemistry). This reaction was discovered only very recently and combines high conversion rates, high yields, high tolerance of functional groups together with easy procedures.

In order to verify the compatibility of the reaction with DNA, modified thymidines with alkynes on alkyl chains of different lengths were synthesized and incorporated into short oligomers using solid phase synthesis. The use of the copper(I) stabilizing ligand trisbenzyltriazoleamine (TBTA) was needed to reduce the DNA damage caused by copper generated radicals. As a copper source CuBr gave best results. Using these conditions the quantitative conversion of six consecutive alkynes with different azides was accomplished. The azides used to modify DNA are wide-ranging, from fluorescent dyes like fluorescein to metal-reducing groups like sugars. A certain distance between the alkyne and the base was essential to obtain high conversion in these single strands. Even DNA strands with up to 2000 base pairs in length comprising only two alkyne functionalities were fluorescently labeled. Product analysis showed no damage of the DNA.

In a cooperation with the group of Prof. *Reinhoudt* (University of Twente) alkyne DNA was successfully used in *microcontact printing* (μ CP) on azide modified glass slides. In order to retain the structure of the DNA after immobilization new alkyne building blocks for introduction of terminal alkynes were synthesized. These strands were printed and hybridized with a fluorescent counter strand.

To obtain long DNA with a high density of modifications, nucleobase triphosphates containing aldehydes and alkynes were prepared. Substitution of a natural triphosphate with the modified one in PCR reactions allowed the production of long DNA strands. The release of the protected aldehyde functions turned out to be difficult in the case of acetals, since the used acids introduced DNA damage. Only a triphosphate comprising an acetyl-protected galactose showed selective metallization. Because of steric reasons it was not accepted very well by the DNA Polymerases in the PCR. The alkyne triphosphates were much better substrates. With 5-(1,7-octadiynyl)-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate or 5-(1,7-octadiynyl)-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate PCR products with a length of up to 2000 base pairs containing almost 900 alkynes were obtained. The introduction of alkyne bases lead to a significant stabilization of DNA. Reaction of PCR products using „Click“-chemistry with a galactoseazide yielded quantitative conversion of the cytidine. In case of the thymidines over 95 % of all alkynes reacted. Using silver staining the aldehyde modified DNA could be detected with high selectivity and sensitivity on gels or membranes.

In a cooperation with Prof. *Eichen* (Technion, Haifa) and Prof. *Simon* (RWTH Aachen) aldehyde modified PCR-products were coated with silver or gold. The selectivity and the quality of the metal deposition was examined by AFM and STM.

1. Einleitung

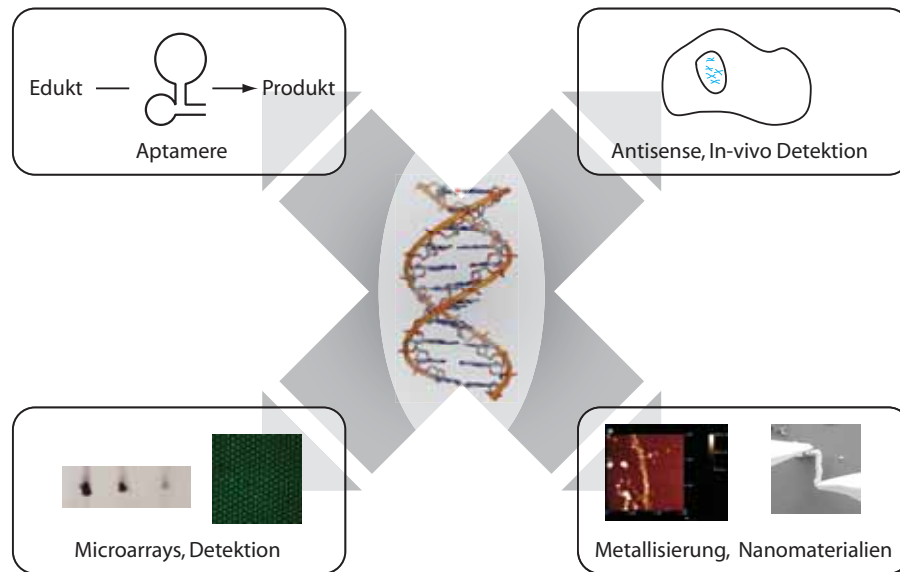


Abbildung 1.1: Verschiedene Anwendungen von DNA von Diagnostik bis hin zu Nanomaterialien (Bilder: D. Rożkiewicz, M. Fischler, Macmillan Publishers Ltd: *Nature*, © 1998).

Desoxyribonukleinsäure (DNA), das Baumaterial des genetischen Codes, kann nicht nur zur Speicherung der genetischen Information genutzt werden. Ihre einzigartige Doppelstrangstruktur aus zwei Einzelsträngen, welche durch die komplementäre Basenpaarung von Adenin und Thymin, bzw. Cytosin und Guanin gebildet wird, ist die Grundlage für die Weitergabe der genetischen Information bei der Zellteilung und der Amplifikation von DNA durch biochemische Methoden. Die hohe Spezifität der Basenpaarung erlaubt aber auch die Konstruktion selbstorganisierender Strukturen jenseits des Doppelstranges. Die „eingebaute“ Biokompatibilität von DNA ermöglicht die Anwendung in biologischen Systemen. Abbildung 1.1 zeigt einige Anwendungen von DNA in verschiedenen Bereichen. Allerdings ist das Repertoire an funktionellen Gruppen in natürlicher DNA limitiert. Neben den negativ geladenen Phosphatgruppen des Rückgrats besitzen die Basen vor allem Amino- und Ketogruppen, welche zum Aufbau und zur Stabilisierung der Struktur benötigt werden. Eine Erwei-

1. Einleitung

terung des funktionellen Spektrums von DNA unter Erhaltung ihrer besonderen selbstpaarenden Eigenschaften wäre ein großer Fortschritt für viele Anwendungen von DNA. Einige in der Abbildung 1.1 gezeigten Anwendungen können von einer solchen Erweiterung der chemischen Diversität profitieren.

Aptamere sind spezielle DNA-Sequenzen, welche aufgrund ihrer Struktur bestimmte Substanzen binden oder Übergangszustände stabilisieren, und daher zur Katalyse von Reaktionen und zur Detektion eingesetzt werden.^[1] Durch neue Funktionen kann das Spektrum der molekularen Erkennung und Katalyse erweitert werden. Bei der Anwendung in Zellen können Modifikationen die Zellgängigkeit von DNA und die Stabilität in der Zelle erhöhen, um zum Beispiel bessere Antisense-Eigenschaften zu ermöglichen.^[2] Bei der Detektion von DNA spielt die selektive Markierung mit Farbstoffen oder anderen detektierbaren Funktionen eine große Rolle. Neue Möglichkeiten der Funktionalisierung können eine höhere Dichte und damit eine bessere Detektion ermöglichen. Im Bereich der Nanomaterialien wird DNA bereits erfolgreich zum Aufbau komplizierter Strukturen verwendet.^[3] Eine Erweiterung um metallbindende oder -reduzierende Gruppen könnte diese Strukturen leitfähig machen.^[4] Diese Techniken stehen erst am Beginn ihrer Entwicklung und es gibt bisher noch nicht viele Untersuchungen zur Herstellung und Verwendung von modifizierter DNA. Allerdings ist das Potential solcher Methoden enorm, da sie vom Bereich der Nanomaterialien bis hin zur klinischen Diagnostik von Krankheiten eine große Rolle spielen können.

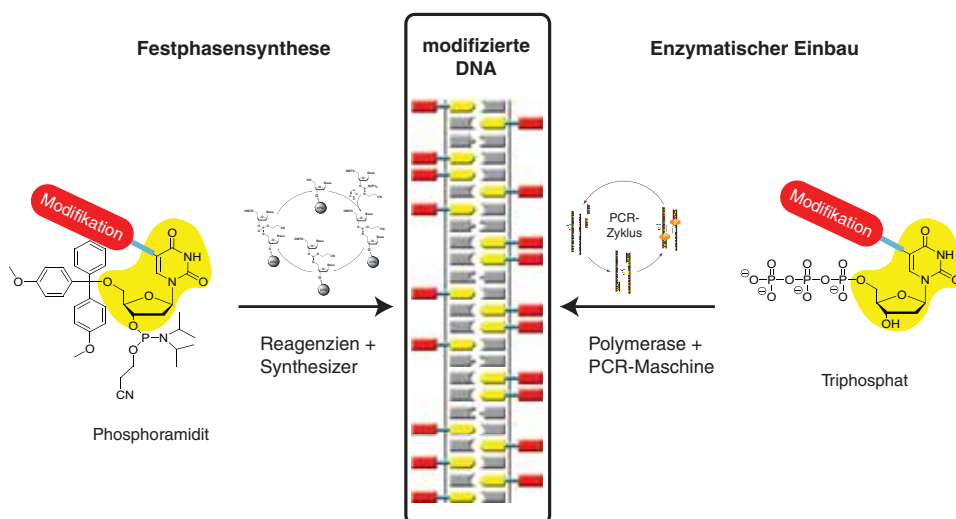


Abbildung 1.2: Verschiedene Methoden für die Herstellung von DNA durch Festphasensynthese mit Hilfe von Phosphoramiditchemie (links) oder durch enzymatischen Einbau des Triphosphats (rechts).

Um Modifikationen in DNA einzuführen, müssen die verschiedenen Arten der Herstellung von DNA berücksichtigt werden (s. Abb. 1.2). Kurze Oligomere werden an der festen Phase synthetisiert. Daher müssen die verwendeten Modifikationen mit den eingesetzten Reagenzien kompatibel sein. Im Gegensatz dazu können sehr lange DNA-Stränge nur über den enzymatischen Einbau mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) hergestellt werden. Beide Methoden sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.1. Festphasensynthese

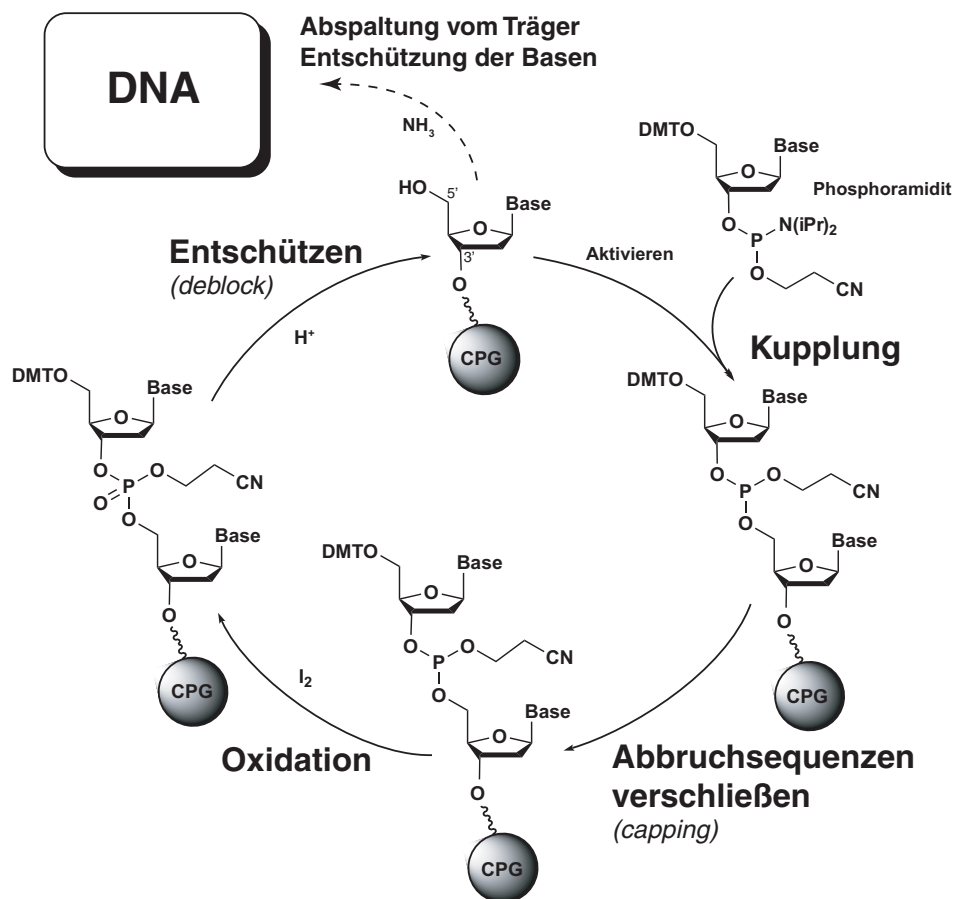


Abbildung 1.3: Prinzip der Festphasensynthese von DNA mit DMT-Phosphoramiditchemie.

Die Synthese an der festen Phase wird meistens mit Hilfe von DMT-Phosphoramiditchemie (DMT: 4,4'-Dimethoxytrityl) durchgeführt (s. Abb. 1.3).

1. Einleitung

Das Oligomer wird durch aufeinanderfolgende Kupplungen an der festen Phase von 3' in 5'-Richtung aufgebaut. Die zu kuppelnden Monomere werden als 5'-DMT-3'-Phosphoramidite eingesetzt. Zu Beginn eines Kupplungszyklus wird mit Hilfe von Säure die Dimethoxytritylgruppe abgespalten (*Entschützen*). Im nächsten Schritt werden die nun freien Hydroxylgruppen mit dem Phosphoramidit der nächsten Base gekuppelt. (*Kupplung*). Dazu wird das Phosphoramidit mit einem Aktivator aktiviert. Nach der Kupplung werden nicht umgesetzte freie 5'-OH-Gruppen im basischen Milieu durch Reaktion mit einem Anhydrid verestert, damit sie im nächsten Kupplungsschritt nicht reagieren (*Abbruchsequenzen verschließen*). Um eine Hydrolyse der Phosphorbindung während der weiteren Synthese zu verhindern wird der Phosphor mit einer Iod-Lösung zum Phosphat oxidiert (*Oxidation*). Die Cyanoethoxy-Gruppe bleibt dabei als Schutzgruppe des Phosphates erhalten. Danach kann der Zyklus mit einer neuen Entschützung des gerade gekuppelten Bausteins wieder beginnen.

In der Synthese werden für die reaktiven Gruppen der Basen säure- und oxidationsstabile Schutzgruppen eingesetzt. So sind die Aminogruppen der Nucleobasen mit basenlabilen Schutzgruppen, mit Acetyl oder Benzoyl-Gruppen geschützt. Durch Behandlung mit Base wird nach der Synthese das fertige Oligomer vom festen Träger abgespalten, die Basen entschützt und die Phosphate freigesetzt.

Die Bedingungen des Synthesesyklus zeigen die Anforderungen der Festphasensynthese an eine Modifikation. Sie wird im Laufe des Synthesesyklus und der Abspaltung sowohl stark sauren als auch basischen Bedingungen ausgesetzt. Allerdings lassen sich bestimmte Schritte durch spezielle Protokolle, z. B. bei der Abspaltung vom Träger oder bei der Entschützung, durch mildere Varianten ersetzen. Bei der Synthese sollte es außerdem zu keinerlei Zersetzung der Modifikation kommen, da sich Nebenprodukte bei langen Oligomeren kaum noch abtrennen lassen.

Mit Festphasensynthese lassen sich auch sehr große Mengen an DNA (bis zu mehreren Millimol) zuverlässig herstellen. Die Festphasensynthese ermöglicht die Einführung einer großen Anzahl an Modifikationen in einer Synthese. Im Extremfall könnte mit jeder Kupplung eine anders modifizierte Base eingebaut werden. Die Ausbeute im Kupplungsschritt begrenzt aber die maximale Länge der Oligomere auf ca. 50 Basen. Dies ist allerdings für Anwendungen, wie Antisense oder Microarrays ausreichend. Deutlich längere DNA lässt sich nur über die Polymerase Kettenreaktion (PCR) herstellen.

1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

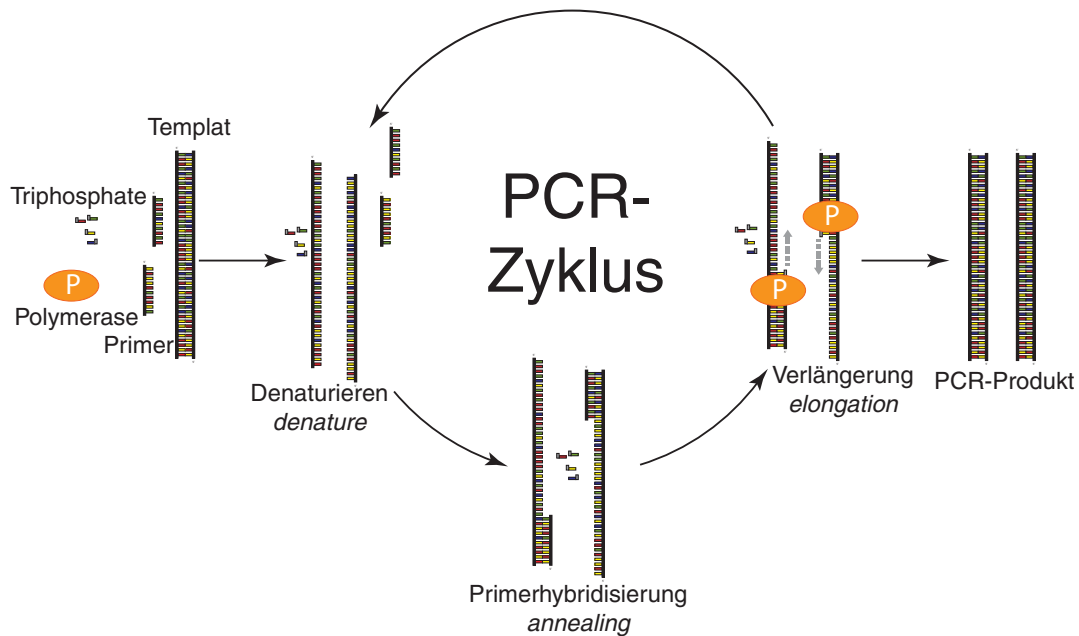


Abbildung 1.4: Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Die von *Kary B. Mullis* in den achtziger Jahren entwickelte Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR) revolutionierte die Biochemie.^[5-7] *Mullis* übertrug das Prinzip der natürlichen Vervielfältigung von DNA *in vivo* auf die Vervielfältigung von beliebigen DNA-Sequenzen *in vitro* (s. Abb. 1.4). Für die PCR werden die abzulesende Sequenz (Templat), die Triphosphate der vier Basen, die Polymerase und die Primer, welche zum Anfang und Ende der abzulesenden Sequenz komplementär sind, zusammengegeben. Dabei kann das Templat deutlich länger als das PCR-Produkt sein, z. B. ein komplettes Genom. Im ersten Schritt wird das Templat durch Erhitzen auf Temperaturen von über 90 °C in die Einzelstränge aufgetrennt (Denaturieren). Im nächsten Schritt werden bei niedrigerer Temperatur (ca. 50-60 °C) die Primer mit den entsprechenden Sequenzen am Templat hybridisiert (Primerhybridisierung). Dies wird dadurch begünstigt, dass die Primer in großem Überschuss eingesetzt werden. Im nächsten Schritt verlängert die Polymerase die Primer-Templat-Hybriden zu vollständigen Doppelsträngen (Verlängerung). Die gebildeten PCR-Produkte dienen nach erneuter Denaturierung als zusätzliches Templat im nächsten Zyklus. Dadurch wird unter idealen Bedingungen mit jedem Zyklus die Menge an DNA verdoppelt. In der ersten Zeit war die PCR noch ein mühseliger Pro-