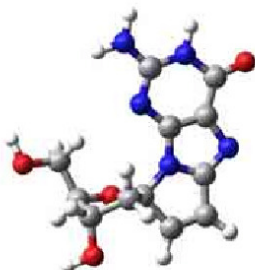




Ansgar Fitzner (Autor)
**Synthese eines Spironukleosids im Hinblick auf
Induktion der Z-DNA Konformation**

Ansgar Fitzner

Synthese eines Spironukleosids im
Hinblick auf Induktion der Z-DNA
Konformation



 Cuvillier Verlag Goettingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2252>

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>

1 Einleitung und Zielsetzung

Neben der Kodierung der genetischen Information dient DNA aufgrund der Fähigkeit zahlreiche Sekundärstrukturen annehmen zu können zur Regulation von zellulären Abläufen.^[1,2] Unter anderem basieren intrazelluläre Prozesse wie z.B. die Transkription oder die DNA-Reparatur auf der molekularen Erkennung von DNA Konformationen. Dabei spielen lokale DNA Konformationen und somit auch örtlich begrenzte Konformationsänderungen, wie z.B. Biegen oder Abknicken der DNA, eine große Rolle.^[3,4] Die wohl grundlegendste strukturelle Veränderung einer DNA Doppelhelix tritt während des Überganges der in Zellen überwiegend vorliegenden rechtsgängigen B-DNA zur linksgängigen Z-Konformation auf.^[5] Durch den Wechsel der Konformation der glykosidischen Bindung bei Purinnukleosiden von der *anti*- in die *syn*-Stellung ändert sich der helikale Drehsinn. Die Doppelhelix der Z-DNA ist im Vergleich zur B-DNA gestreckter und die Erkennungsoberfläche verändert sich grundlegend, so dass die große Furche verschwindet und eine tiefe, enge kleine Furche resultiert. Aufgrund der *syn*-Konformation der Purinnukleotide und den entstehenden repulsiven Wechselwirkungen zwischen den sich angenäherten Phosphatgruppen, ist die Z-DNA im Vergleich zur B-DNA energetisch benachteiligt.

Die biologische Funktion der Z-DNA ist nicht gänzlich geklärt, aber es wird eine regulatorische Funktion angenommen.^[6,7] In jüngster Zeit wurden mehrere Vertreter von Z-DNA bindenden Proteinen charakterisiert, die alle eine sogenannte $Z\alpha$ Domäne aufweisen, mit der sie selektiv die Z-Konformation erkennen können.^[8-11] Dabei verläuft die Erkennung weniger sequenz- als viel mehr konformationsspe-

zifisch, da die Erkennungsoberfläche des Proteins die Z-DNA über Wechselwirkungen mit dem Phosphordiesterückgrat erkennt. Die dreidimensionalen Strukturen aller Vertreter dieser Familie sind sehr ähnlich, obwohl sich die Proteine in ihren Aminosäuresequenzen teilweise stark unterscheiden und aus unterschiedlichen Zellen isoliert wurden.

Die Stabilisierung der Z-DNA Konformation lässt sich auf unterschiedlichen Wegen erreichen. Zum einen ist eine Stabilisierung durch die Veränderung der Lösungsmittleigenschaften möglich, entweder durch Zugabe von Salz oder zusätzlichen Lösungsmitteln, welche die Dielektrizitätskonstante von Wasser verringern. Zum anderen besteht die Möglichkeit zur Induktion der Z-DNA durch Zugabe von Molekülen, die selektiv an Z-DNA binden oder deren Struktur induzieren können. Beispiele sind Oligopeptide mit der Sequenz H-(Lys-Ala)_n-OH, welche an die Z-DNA binden^[12] und der Tetrazyklininterkalator WP900, der selektiv in Gegenwart von B-DNA die Z-Konformation erkennt und zusätzlich als allosterischer Effektor wirkt.^[13]

Eine weitere Möglichkeit besteht in der konformationellen Stabilisierung durch eine synthetische, kovalente Modifizierung der Guanin- bzw. Cytosin-Basen. Unter anderem ist sowohl durch Bromierung als auch durch Methylierung der C8 Position in Purinen und der C5 Position in Cytosinen eine Bevorzugung der Z-DNA zu erreichen.^[14,15] Darüberhinaus gibt es weitere synthetische Konzepte zur Stabilisierung der Z-DNA, wie der in unserer Arbeitsgruppe verfolgte isostere Ersatz von Desoxyguanosin-Einheiten durch C-Nukleoside mit flexibler Seitenkette. Derartige Analoga sollten einerseits durch die flexible Seitenkette in *syn*-Stellung eine geringere sterische Benachteiligung gegenüber Desoxyguanosin erfahren und andererseits Wasserstoffbrückenbindungen zum gegenüberliegenden Cytosin ausbilden.^[16,17]

Ein Ansatz, welcher in dieser Arbeit verfolgt werden soll, ist die kovalente Verbrückung der Nukleobase mit dem anomeren Zentrum zur Stabilisierung der *syn*-

Konformation des Desoxyguanosins.^[16,17] In dieser Arbeit wird die Synthese eines Spironukleosids, in welchem das Guanin durch eine Ethyleneinheit mit dem Zuckerring verknüpft ist, vorgestellt. Oligonukleotide, die diese rigiden Spironukleotide beinhalten wären dazu gezwungen die Z-Konformation einzunehmen. Mit Hilfe solch einer stabilisierten Z-DNA wäre es möglich durch Affinitätschromatographie neuartige Z-DNA-Protein-Komplexe zu isolieren und zu charakterisieren.

Aufgrund der Funktion der DNA als Informationsträger und ihrer regulatorischen Rolle in biologischen Prozessen ist sie nicht nur für körpereigene Moleküle wie Proteine von Bedeutung, sondern stellt auch einen Angriffspunkt für zytotoxische Naturstoffe, chemische Karzinogene und synthetische Chemotherapeutika dar. Die Struktur und dadurch die Funktion der DNA wird an den Bindungsstellen solcher Moleküle durch kovalente Modifikation geändert, woraufhin DNA Schäden resultieren. Die Aufklärung der genauen Mechanismen dieser Abläufe ist sowohl für das Wissen über die chemische Karzinogenese, als auch für die Entwicklung neuer potenter Chemotherapeutika extrem wichtig.

DNA Schäden können durch eine Vielzahl von Substanzen verursacht werden, jedoch stand in den letzten Jahren eine Klasse von Naturstoffen im Zentrum des Interesses, deren Vertreter eine spezifische Interaktion mit DNA zeigen und an ihrer Bindungsstelle die DNA modifizieren, alkylieren oder spalten.^[18] Die Alkylierung durch Naturstoffe findet vorwiegend sequenzspezifisch an den Stickstoffatomen der Purinbasen statt. Im Gegensatz zur Alkylierung von Purinen durch kleine Reste wie Methyl- oder Ethylgruppen, die von Zellen toleriert werden, erweisen sich Alkylierungen durch sterisch anspruchsvolle Moleküle meist als zytotoxisch oder mutagen.^[19]

Die Alkylierung von Purinen vollzieht sich häufig an der N7 Position und führt zur Bildung eines kationischen Adduktes sowie zur Schwächung der N-glykosidischen Bindung zum Zucker. Im Anschluss folgt die Depurinierung durch einen Bruch

der *N*-glykosidischen Bindung. Die entstehende instabile abasische Stelle¹ führt zu einem Strangbruch durch Spaltung des Phosphordiesterückgrates.^[20,21]

Die Isolierung von Gutingimycin aus marinen Bakterien von *Laatsch et al.* ermöglichte die Charakterisierung eines in der Natur vorkommenden kationischen Naturstoff-DNA Adduktes.^[22] Es wird angenommen, dass Gutingimycin nicht aus niedermolekularen Vorstufen gebildet wird, sondern in einer Reaktion von Trioxacarcin A mit DNA entsteht, wobei die N7 Position des Guanins alkyliert wird und ein Bruch des DNA Stranges eintritt. Trioxacarcin A ist ein zytotoxisches Antibiotikum, welches strukturell mit den Naturstoffen Hedamycin B und Kapurimycin A3 verwandt ist.^[23,24] Durch eine vorhandene Epoxidfunktion als reaktive Gruppe alkyliert es den Stickstoff in 7-Position der Nukleobase Guanin in der großen Furche von DNA Doppelsträngen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden die nötigen Bedingungen und der Verlauf der Umsetzung von Trioxacarcin A mit DNA zu Gutingimycin untersucht. Dabei steht vor allem die Identifikation möglicher Zwischen- sowie Endprodukte und die Bestimmung der Sequenzselektivität von Trioxacarcin A im Zentrum des Interesses.

¹Die abasische Stelle wird im Englischen meist als *AP site* bezeichnet, was sich von *apurinic site* ableitet.

2 Struktur, Eigenschaften und biologische Bedeutung der linksgängigen Z-DNA

2.1 Struktur und Eigenschaften

Die Doppelhelix als dreidimensionale Struktur für DNA wurde zum ersten Mal 1953 von *Watson* und *Crick* vorgeschlagen.^[25] Bis zum heutigen Tag sind zirka zwanzig unterschiedliche rechtsgängige Konformationen der DNA, darunter die bekannte B-DNA nachgewiesen worden. Dabei sind die Nukleotide über je eine Phosphatgruppe zu einem Strang verknüpft und zwei Einzelstränge ordnen sich aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelungswechselwirkungen zwischen den Nukleobasen in einer Doppelhelix an.^[2,26,27] *Pohl* und *Jovin* beschrieben 1972 erstmals das Vorkommen einer linksgängigen doppelhelikalen Struktur, die Z-DNA, deren Kristallisation und Strukturaufklärung *Rich et al.* sieben Jahre später gelang. Aufgrund ihrer einzigartigen, linksgängigen Struktur ist die Z-DNA Gegenstand intensiver Forschung.^[5]

Wie in B-DNA sind die beiden Einzelstränge der Z-DNA antiparallel angeordnet und werden durch Watson-Crick-Basenpaarungen zusammengehalten. Die Nukleobasen der Z-DNA weisen jedoch, im Gegensatz zur B-DNA, in welcher die glykosidischen Bindungen aller Nukleobasen in *anti*-Konformation vorliegen, eine Alternanz zwischen *syn*- und *anti*-Konformation auf. Da die *syn*-Konformation für Purinbasen energetisch günstiger ist als für Pyrimidinbasen, wird die Z-Konformation bevorzugt von Nukleotidsequenzen mit alternierenden Purin- und Pyrimidinnukleo-

2. Struktur, Eigenschaften und biologische Bedeutung der linksgängigen Z-DNA

basen eingenommen, dabei sind Sequenzen mit Guanin und Cytosin als Nukleobasen am besten geeignet. Durch das Vorliegen der Purinbasen in *syn*- und der Pyrimidinbasen in *anti*-Stellung ist die Wiederholungseinheit der Z-DNA ein Dinukleotid, $d(XpYp)$,¹ und nicht, wie in anderen Helices üblich, ein einzelnes Nukleotid.^[6,7,28]

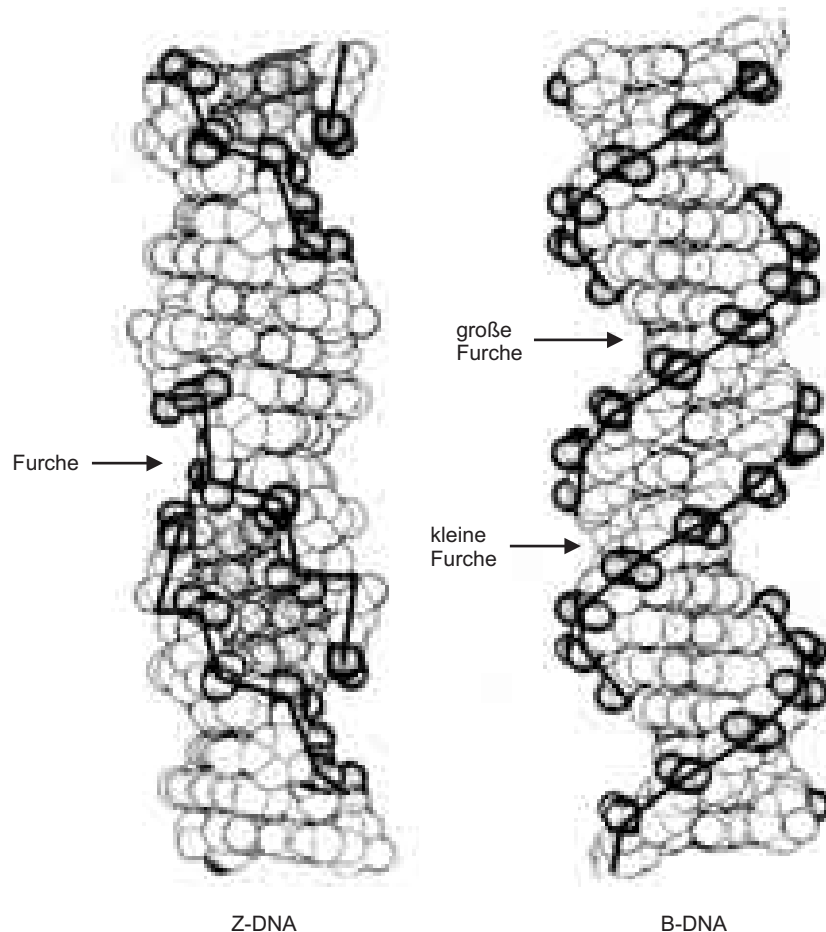


Abbildung 2.1: Vergleich der Strukturen von Z-DNA (links) und B-DNA (rechts) als CPK-Modell, das Rückgrat ist durch eine hervorgehobene Linie gekennzeichnet.^[7]

Als direkte Folge des Dinukleotids als Wiederholungseinheit verläuft das Rückgrat im Zick-Zack, weshalb diese Konformation Z-DNA genannt wurde und die Helix einen linksgängigen Drehsinn aufweist. Zusätzlich ist sie im Vergleich zu anderen DNA-Formen langgestreckter und schlanker. Des Weiteren liegt eine tiefe, sehr en-

¹X steht für eine Pyrimidin- und Y für eine Purinbase

2. Struktur, Eigenschaften und biologische Bedeutung der linksgängigen Z-DNA

ge Furche vor, die mit der kleinen Furche von B-DNA vergleichbar ist. Jedoch existiert keine ausgeprägte große Furche, da diese in der nach außen gewölbten, konvexen Oberfläche der Z-DNA aufgeht. Dadurch liegen die Hoogsteen-Seiten der Basenpaare als Erkennungsregionen auf dieser nach außen gewölbten Oberfläche (Abb. 2.1).

Tabelle 2.1: Strukturelle Eigenschaften von B- und Z-DNA.^[1]

	B-DNA	Z-DNA
HELIKALER DREHSINN	rechtsgängig	linksgängig
DURCHMESSER	20 Å	18 Å
ZAHL DER BASENPAARE PRO WINDUNG	10	12
GANGHÖHE (ANSTIEG PRO WINDUNG)	34 Å	45 Å
STEIGHÖHE PRO BASENPAAR	3.4 Å	3.7 Å
HELIKALE WINDUNG PRO DINUKLEOTID	72°	60°
ZUCKER-KONFORMATION	C2'-endo	C3'-endo
KONFORMATION DER GLYKOSIDISCHEN BINDUNG	<i>anti</i>	<i>anti</i> für C, T <i>syn</i> für G, A

Da bei einem Wechsel von B- zu Z-DNA die Stabilität der *syn*-Konformere der einzelnen Nukleotide eine entscheidende Rolle spielt, nimmt in Z-DNA Desoxyguanosin die *syn*-Stellung ein, während Desoxycytidin die *anti*-Konformation beibehält. In B-DNA weisen alle Basen eine *anti*-Konformation der glykosidischen Bindung auf und der Zuckerring liegt in der C2'-endo Konformation² vor. Während hingegen in Z-DNA die glykosidischen Bindungen der Desoxyguanosine in *syn*-Stellung vorliegen und die Zucker eine C3'-endo-Konformation aufweisen. Durch diese Anordnung entsteht eine repulsive Wechselwirkung zwischen dem 5'-Kohlenstoffatom

²Die Zahlenangabe kennzeichnet das Kohlenstoffatom, welches sich außerhalb der Zuckerebene, die durch C1'-O-C4' aufgespannt wird befindet. Die Bezeichnung *endo* steht für oberhalb und *exo* würde unterhalb kennzeichnen.

2. Struktur, Eigenschaften und biologische Bedeutung der linksgängigen Z-DNA

des Zuckers sowie des Phosphordiesterückgrates und der Nukleobase, die sich oberhalb der Zuckerebene befindet (Abb. 2.2).^[6,7,28]

Bei einem Übergang von der B- zur Z-Konformation müssen die energetischen Benachteiligungen aus dem Konformationswechsel des Zuckers, der Annäherung der benachbarten Phosphatreste von 7 Å auf 5.9 Å und der Annäherung der Phosphatreste der gegenüberliegenden Stränge kompensiert werden. Diese repulsive Wechselwirkungen der Phosphatgruppen und die erforderliche *syn*-Konformation der glykosidischen Bindung machen die Z-DNA zu einer energetisch ungünstigen Doppelstrang-Konformation. Die Leichtigkeit mit der Umwandlung geschieht ist sequenzabhängig, wobei d(CG)₂ die vorteilhafteste Sequenz ist. Energetisch weniger günstig ist d(TGAC), gefolgt von d(GGGC) und d(TA)₂.

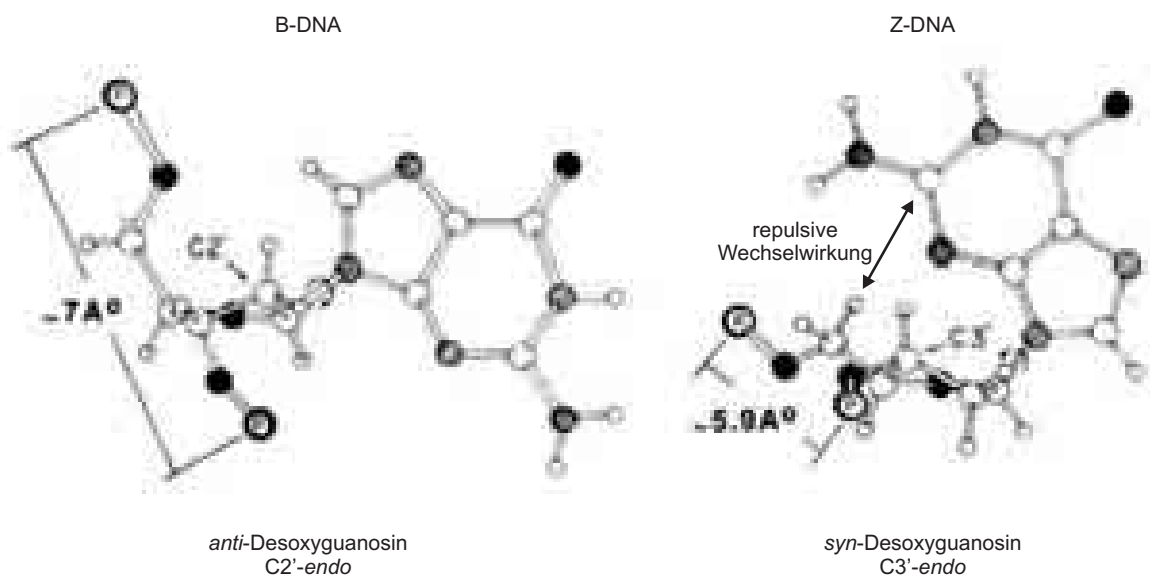


Abbildung 2.2: Links: Desoxyguanosin in *anti*-Konformation und rechts in *syn*-Stellung.^[6]

Berechnungen zufolge beträgt die Energiebarriere, welche für die Ausbildung eines B-Z Überganges innerhalb eines DNA Stranges überwunden werden muss, $d\Delta G = 4 \text{ kcal} * \text{mol}^{-1}$.^[29] Bei einer Umwandlung der B- in die Z-Konformation ist keine Trennung des Doppelstranges in die Einzelstränge erforderlich. Es erfolgt eine intrahelikale Umwandlung, welche mechanistisch als ein Umklappen der Basenpaare