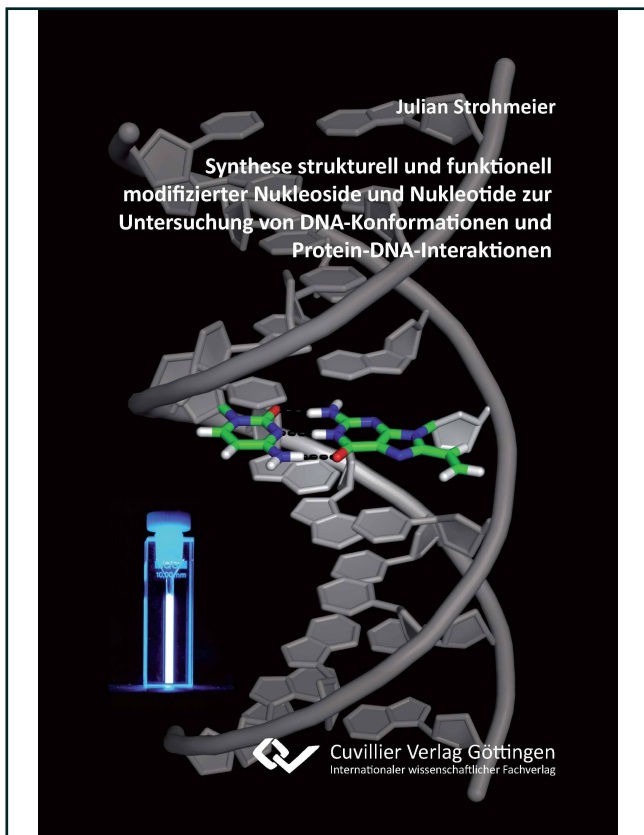




Julian Strohmeier (Autor)

# Synthese strukturell und funktionell modifizierter Nucleoside und Nucleotide zur Untersuchung von DNA-Konformationen und Protein-DNA-Interaktionen



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6126>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# Einleitung

Die Entwicklung der Biochemie, die aus den drei großen naturwissenschaftlichen Disziplinen Biologie, Physik und Chemie hervorgegangen ist, erlebte in den letzten Jahrzehnten eine geradezu stürmische Entwicklung, die ihren Höhepunkt in der Aufklärung des menschlichen Genoms fand.<sup>[1]</sup> Dabei liegt die Faszination dieses Faches nicht nur in der Beschreibung von Biomolekülen und ihren Interaktionen, sondern sehr wesentlich in der Beantwortung der Frage nach der Funktion der einzelnen Biomoleküle zur Aufrechterhaltung des Lebens.<sup>[1]</sup>

Neben den Nukleinsäuren nehmen die Proteine (griech. *protos* = erstes oder an erster Stelle) einen besonderen Stellenwert ein, wenn es um die zentralen Bausteine des Lebens auf der Erde geht. Dabei führten die revolutionären Erkenntnisse über den Aufbau der DNA (engl. *Deoxyribonucleic acid*) zum zentralen Dogma in der Biochemie, die den Weg der Informationsübertragung über die Replikation, Transkription und Translation beschreibt.<sup>[1-3]</sup> Die Proteine und insbesondere die Gruppe der Enzyme, die die Endprodukte des beschriebenen Informationsweges darstellen, sind für eine Vielzahl von biologischen Funktionen in Organismen verantwortlich. Somit sind die Proteine die molekularen Werkzeuge, mit denen die genetische Information exprimiert wird.<sup>[1]</sup> Ihr Aufbau wird durch relativ einfache monomere Untereinheiten, den 20 beziehungsweise 22



proteinogenen Aminosäuren beschrieben. Aus dieser Primärstruktur leiten sich die Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt ab, die wiederum zur Ausbildung der Tertiärstruktur führen und für die Spezifität und Funktion des Proteins verantwortlich sind. Die Unterscheidung zwischen Protein und Enzym resultiert in erster Linie aus der Funktion des Polypeptids, ob es sich dabei um eine strukturbildende (Protein) oder eine katalytisch aktive Einheit (Enzym) handelt.

Neben den Proteinen ist auch die DNA, die als Träger der Erbinformation eine zentrale Rolle in der Reihe der Biomoleküle einnimmt, an vielen regulatorischen Prozessen beteiligt. Der Grund hierfür liegt in der Fähigkeit der DNA zahlreiche Sekundärstrukturen auszubilden, wobei die DNA-Sequenz von ausschlaggebender Bedeutung für die Interaktionen mit weiteren Biomolekülen ist. Dabei ist für ein DNA-Oligomer mit einer beliebigen Basenabfolge die B-Konformation unter physiologischen Bedingungen die stabilste Form.<sup>[4]</sup> Allerdings können partiell entwundene Einzelstrang-Sequenzen, die repetitive DNA-Abschnitte aufweisen, unter bestimmten Bedingungen besondere Strukturen einnehmen.<sup>[5]</sup> Diese Sequenzen haben das Potential *non*-B-DNA-Strukturen, wie beispielsweise Haarnadel-Strukturen, Triplex-Strukturen, A-Motive, G-Quadruplex-Strukturen oder die linksgängige Z-DNA, deren Funktionen in Organismen bislang nur zum Teil geklärt sind, auszubilden.<sup>[6-9]</sup> Die repetitiven Sequenzen, die zur Ausbildung von *non*-B-DNA-Strukturen neigen, können zu einer genetischen Instabilität führen und bilden somit eine mögliche Grundlage von Krankheiten.<sup>[7,10]</sup> Die lückenlose Aufklärung der Funktionen der unterschiedlichen Strukturen und Motive im Organismus ist daher Gegenstand der aktuellen Forschung.

In dieser Arbeit werden in erster Linie Projekte, die sich mit der Synthese von modifizierten Nukleosiden und Nukleotiden zum Einbau in Oligonukleotide oder zur gezielten Untersuchung mit Enzymen befassen, vorgestellt. Bei dem Einbau der modifizierten Derivate in eine Oligonukleotid-Sequenz steht die Kontrolle und Untersuchung von DNA-Sekundärstrukturen im Vordergrund.

Die in Kapitel 1 beschriebenen Synthesen von 2'-Desoxyguanosin- und Guanosin-Derivaten sollen zu kovalent fixierten Spironukleosiden in *syn*-Konformation führen. Die *syn*-Konformation von Purin-Basen, insbesondere von 2'-Desoxyguanosin, stellt dabei ein wichtiges Kriterium für die effektive Induktion der Z-DNA-Konformation dar. Daher sollte durch den Einsatz der Spironukleoside die Z-DNA-Konformation bevorzugt ausgebildet werden.



Im zweiten Kapitel steht der Einbau von 8-Vinylguanin in DNA- und RNA-Oligonukleotid-Sequenzen im Vordergrund. Neben der Synthese der Phosphoramidit-Bausteine für die automatisierte DNA- und RNA-Festphasensynthese wird der Einbau des zugehörigen Triphosphats mittels enzymatischer Reaktionen beschrieben. Der Baustein 8-Vinylguanin zeichnet sich durch seine exzellenten Fluoreszenzeigenschaften und der geringen Modifikation gegenüber der natürlichen Nukleobase Guanin aus. Daher könnte 8-Vinylguanin als potentielle Fluoreszenzsonde zur Untersuchung beispielsweise von DNA-Konformationen oder DNA-Hybridisation dienen. Bislang findet auf diesem Gebiet nur die Verbindung 2-Aminopurin Verwendung. Allerdings erfordert diese Verbindung aufgrund der niedrigen Quantenausbeute hohe Konzentrationen an Oligonukleotid und stellt in erster Linie ein Adenin-Analogon dar. Die Verbindung 8-Vinylguanin könnte sich daher auf dem Gebiet der fluoreszierenden Nucleinsäuren als wertvolle Alternative zum 2-Aminopurin erweisen.

Das dritte Kapitel befasst sich mit der Änderung der Nukleotid-Spezifität der RNA-Helikase Hera, einer thermophilen DEAD-Box Helikase aus *Thermus thermophilus*. Die Änderung der Nukleotid-Spezifität des Enzyms und die anschließenden Untersuchungen setzen die Synthese eines modifizierten Triphosphats auf Adenosin-Basis voraus. Die Synthese und Aufreinigung der Verbindung 8-Oxo-adenosin-5'-triphosphat und die abschließenden Untersuchungen mit dem Enzym Hera und einer Q28E-Mutante werden detailliert in diesem Kapitel beschrieben.

Ähnlich dem vorangegangenen Kapitel setzen die Untersuchungen mit dem Enzym Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase (OMPD), welche in Kapitel 4 beschrieben werden, die Synthese von modifizierten Nukleotid-Derivaten voraus. Das Enzym OMPD zeichnet sich unter anderem durch seine enorme katalytische Aktivität aus und stellt den letzten Schritt in der *de novo* Biosynthese von Pyrimidin-Nukleotiden dar. Der Mechanismus der Decarboxylierung von Orotidin-5'-monophosphat (OMP) zu Uridin-5'-monophosphat (UMP) wird seit vielen Jahren untersucht und kontrovers diskutiert. Die Synthese von modifizierten Uridin-5'-monophosphat-Derivaten an Position C6 der Nukleobase, die in dieser Arbeit beschrieben werden, sollen dabei Hinweise auf einen möglichen Mechanismus liefern.

Im letzten Kapitel steht wieder die Kontrolle von DNA-Sekundärstrukturen durch Nucleoside mit einem Azobenzol-Photoschalter im Vordergrund. Der Einsatz von reversiblen Photoschaltern auf dem Gebiet der Nucleinsäurechemie fand in den letzten Jahren eine vermehrte Anwendung und führte bereits in biologischen



Systemen zur gezielten Kontrolle von Prozessen durch eine externe Lichtquelle. Der Ansatz in dieser Arbeit ist die Synthese von natürlichen Nukleosiden auf Adenosin-Basis, die an der Zucker-Einheit mit einem Azobenzol-Photoschalter modifiziert sind. Allerdings ist für die Einpassung des Photoschalters in den DNA-Doppelstrang nicht die in RNA natürliche *ribo*- sondern die sogenannte *arabino*-Konfiguration vorgesehen. Abschließend sollen die zugehörigen Phosphoramidit-Bausteine der Verbindungen synthetisiert und der Einfluss der *cis-trans*-Isomerisierung auf das System untersucht werden. Dabei soll die Photoisomerisierung der Azobenzol-Einheit zu einer Bevorzugung bestimmter DNA-Sekundärstrukturen oder zumindest zur Stabilisierung oder Destabilisierung des DNA-Doppelstranges führen.



## Kapitel 1

# Synthese eines Spironukleosids zur Induktion von Z-DNA

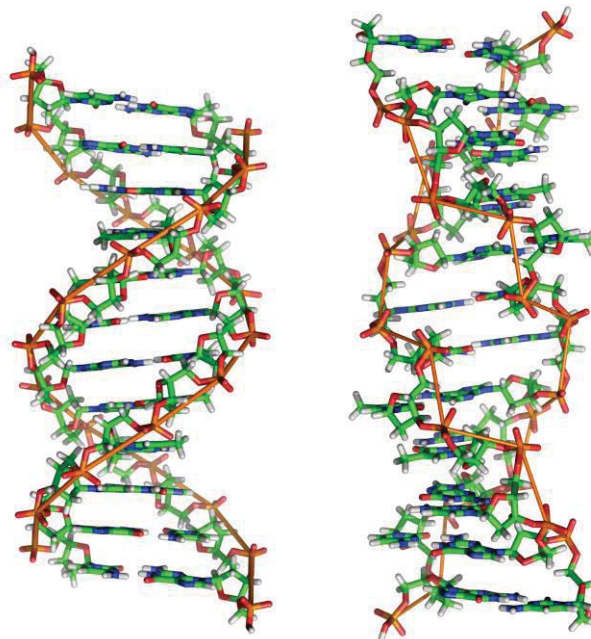
## 1.1 Die Z-DNA<sup>[11]</sup>

### 1.1.1 Struktur und Eigenschaften

Die Speicherung der genetischen Information und die Weitergabe an die jeweils nächste Generation ist eine fundamentale Voraussetzung für das Leben. Diese wichtige Aufgabe wird von der DNA (engl. *Deoxyribonucleic acid*) übernommen.<sup>[1]</sup> Die Aufklärung der Sekundärstruktur der DNA durch *Watson* und *Crick* im Jahre 1953 legte den Grundstein für das heutige Verständnis der DNA.<sup>[2]</sup> Nach bisherigem Kenntnisstand kann die DNA etwa 20 Konformationen einnehmen, die unter den Oberbegriffen A-, B-, C-, D- und Z-DNA zusammengefasst werden.<sup>[12,13]</sup>

Mononukleotide bilden die einzelnen Bausteine der DNA-Oligomere. Diese Nukleotide bestehen aus einem Phosphatrest, einer Desoxyribose und einer Nukleobase. Zu den vier kanonischen Nukleobasen zählen Guanin und Adenin als Purinbasen und Thymin und Cytosin als Pyrimidinbasen.<sup>[1]</sup> Die einzelnen Nukleobasen können spezifische Wasserstoffbrücken untereinander ausbilden, die als *Watson-Crick*-Basenpaarung bezeichnet wird. Im regulären Fall paart Adenin

unter der Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken mit Thymin sowie Guanin unter der Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken mit Cytosin.<sup>[2,3]</sup> Für ein DNA-Oligomer mit einer beliebigen Basensequenz ist die B-DNA unter physiologischen Bedingungen die stabilste Struktur (Abbildung 1, links).<sup>[4]</sup> Dabei handelt es sich um eine rechtsgängige und antiparallele Doppelhelix mit einer Wiederholungseinheit von einem Nukleotid. Die gepaarten Nukleobasen liegen dabei im Zentrum der Helix, wobei das Helixrückgrat durch die Zucker- und Phosphatreste ausgebildet wird. Aufgrund der genannten Eigenschaften kommt es zur Ausbildung von zwei Furchen, die in große und kleine Furche unterschieden werden.<sup>[1-3]</sup> In diesen Furchen findet die sequenzspezifische DNA-Erkennung durch andere Biomoleküle statt. Dabei spielt in der Regel die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den Nukleobasen eine entscheidende Rolle.<sup>[14]</sup>

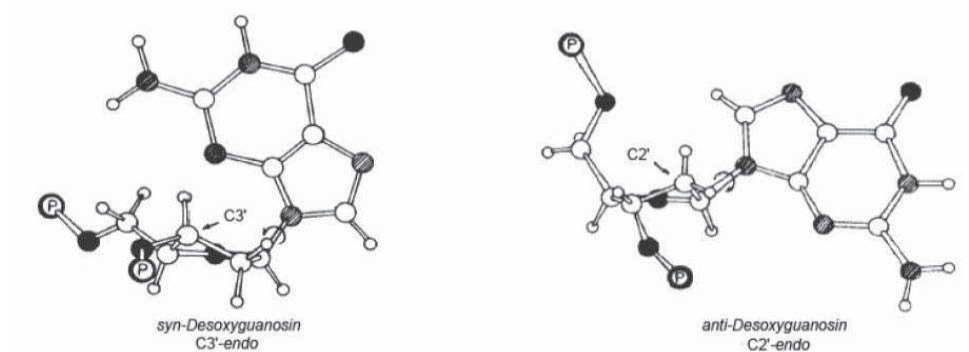


**Abbildung 1:** Vergleich von zwei unterschiedlichen DNA-Konformationen. links: B-DNA, rechts: Z-DNA.<sup>[15]</sup>

Die DNA ist in der Lage zahlreiche Sekundärstrukturen auszubilden und ist aufgrund dieser Fähigkeit an vielen regulatorischen Prozessen beteiligt.<sup>[16]</sup> Für diese Prozesse ist die DNA-Sequenz von ausschlaggebender Bedeutung. Viele Interaktionen von Proteinen und kleinen Molekülen mit der DNA finden dabei über lokale Änderungen der Konformation, wie Abknicken oder Biegen statt. Allerdings

kann auch eine Änderung der Helizität, von rechts- auf linksgängig, Ausgangspunkt für Interaktionen sein.<sup>[12,17]</sup> Dieser Übergang der Helizität ruft einige gravierende strukturelle Veränderungen hervor. Eine dieser Änderungen ist die Anordnung der Phosphatester-Gruppen auf der Außenseite der Helix, wodurch ein Zick-Zack-förmiges Erscheinungsbild entsteht, das dieser DNA-Konformation den Namen Z-DNA einbrachte (Abbildung 1, rechts).

Des Weiteren nehmen auch die monomeren Einheiten eine andere Konformation als in der rechtsgängigen B-DNA ein. Dabei liegen die Nucleobasen in Z-Konformation abwechselnd in *anti* beziehungsweise *syn*, bezogen auf den Zuckerring, vor. Die Purinbasen nehmen die energetisch ungünstige *syn*-Konformation ein, wobei die Pyrimidinbasen in der energetisch günstigeren *anti*-Konformation bleiben (Abbildung 2). Diese Alternanz von *syn* und *anti* ist dabei für die Ausbildung der Z-DNA-Konformation notwendig.<sup>[12,18]</sup>



**Abbildung 2:** *Syn*- beziehungsweise *anti*-Konformation des 2'-Desoxyguanosins. Zusätzlich sind die unterschiedlichen Zuckerkonformationen dargestellt.<sup>[18]</sup>

Ein zusätzlicher Unterschied liegt in der Konformation der Purin-Desoxyribose. In der Z-Konformation wechselt die Desoxyribose ihre übliche Konformation von C2'-*endo* nach C3'-*endo* (Abbildung 2). Durch diesen Konformationswechsel kommt es zu einer repulsiven Wechselwirkung zwischen dem Substituenten an Position C5' und der Nucleobase.<sup>[12,18,19]</sup> Die alternierende Nucleotid-Konformation und der Verlauf des Rückgrats haben zur Folge, dass im Fall der Z-DNA die Wiederholungseinheit ein Dinucleotid ist. Zusätzlich wird die große Furche durch eine vorgewölbte Fläche ersetzt. Diese wird aus den Hoogsteen-Flanken der Nucleobasen gebildet. Die kleine Furche ist im Vergleich zur B-DNA schmaler und





tiefer. In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die wichtigsten Unterschiede zwischen B-DNA und Z-DNA dargestellt.

Eigenschaften	B-DNA	Z-DNA
Helikaler Drehsinn	rechtsgängig	linksgängig
Durchmesser	20 Å	18 Å
Ganghöhe	34 Å	45 Å
Basenpaare pro Windung	10	12
Steighöhe pro Basenpaar	3.4 Å	3.7 Å
Drehwinkel pro Dinukleotid	72°	60°
Monomere Einheit	Mononukleotid	Dinukleotid
Zuckerkonformation	C2'-endo	C2'-endo/C3'-endo
Nukleosidkonformation	<i>anti</i>	<i>anti/syn</i>

**Tabelle 1:** Darstellung der unterschiedlichen Eigenschaften von B-DNA und Z-DNA.

Durch die strukturellen Eigenschaften der Z-Konformation können nur bestimmte Sequenzen diese spezielle Helixform annehmen. Dabei ist das wichtigste Kriterium die strenge Alternanz von Purin- und Pyrimidinbasen.<sup>[18]</sup> Eine Abweichung von dieser Regel kann durch die Arbeit mit Z-DNA bindenden Proteinen oder chemisch modifizierten Nukleotiden erreicht werden.<sup>[20]</sup> Experimente haben gezeigt, dass d(GC)<sub>n</sub>-Sequenzen oder d(CG)<sub>n</sub>-Sequenzen sehr viel einfacher die Z-Konformation einnehmen, als Sequenzen die A-T-Basenpaare enthalten.<sup>[18]</sup>

Die Z-Konformation kann *in vitro* durch verschiedene Möglichkeiten induziert werden, ohne dabei modifizierte Nukleotide zu verwenden. Die häufigste und einfachste Methode ist das Arbeiten bei hohen Salzkonzentrationen. Bei diesen Experimenten werden 4.5M Natriumchlorid- oder 0.7M Magnesiumchlorid-Lösungen verwendet.<sup>[18,20]</sup> Die Auswirkung hoher Salzkonzentrationen kann theoretisch einfach erklärt werden.<sup>[21]</sup> In Lösungsmitteln mit niedriger Ionenstärke, wie Wasser oder verdünnten Lösungen monovalenter Kationen, ist im Fall der B-DNA der elektrostatische Anteil der Freien Energie niedriger.<sup>[21]</sup> Das hängt damit



zusammen, dass die Phosphatgruppen der B-DNA weiter in das Lösungsmittel eintauchen können.<sup>[21]</sup> Zusätzlich tritt eine Verminderung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Phosphatgruppen des Rückgrats durch die Kationen auf. Dieser Effekt sollte aufgrund des geringeren Phosphat-Phosphat-Abstands in der Z-Form ausgeprägter sein als in der B-Form.

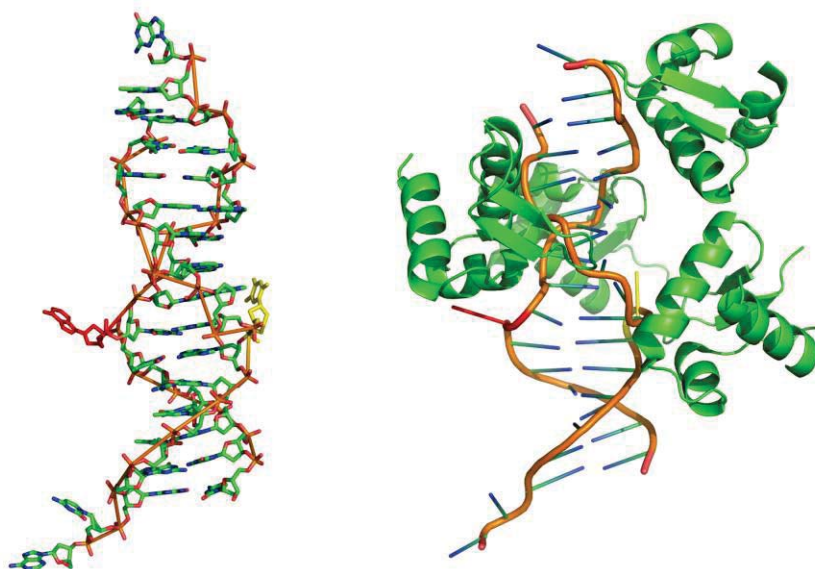
Eine weitere Möglichkeit die Z-Konformation zu induzieren, ist die Verwendung von Additiven, wie hochvalenten Übergangsmetallkationen (Cobalt (III), Zink (II), Kupfer (II), Mangan (II) und Mangan (III)) oder Polyaminen. Diese Additive führen schon in niedrigen Konzentrationen zur Ausbildung der Z-Form.<sup>[18,22]</sup> Auch dieser Befund kann erklärt werden. Die verwendeten Additive bilden im Gegensatz zu den Alkali- und Erdalkalimetallen in wässrigen Lösungsmitteln koordinative Bindungen zum  $N^7$ -Atom der Guaninbasen aus. Dieses Stickstoffatom hat eine deutlich einfachere Zugänglichkeit im Fall der Z-DNA als im Fall der B-DNA. Dadurch sind die Z-DNA-Komplexe mit den beschriebenen Übergangsmetallen stabiler als die B-DNA-Komplexe.<sup>[21]</sup>

### 1.1.2 Die Z-DNA und ihre biologische Relevanz

Während der Replikation und Transkription liegt die DNA-Doppelhelix als partiell entwundene Einzelstrang-Sequenz vor. Einige dieser entwundenen Einzelstrang-Sequenzen weisen repetitive DNA-Sequenzen auf. Unter bestimmten Umständen nehmen diese repetitiven DNA-Sequenzen besondere Strukturen ein. Die Sequenzen haben das Potential *non*-B-DNA-Strukturen einzunehmen, wie zum Beispiel die linksgängige Z-Form der DNA.<sup>[5]</sup> Dieser Zusammenhang zwischen der Ausbildung der linksgängigen Z-Form und der transkriptionellen Aktivität wurde schon früh angenommen, allerdings ist es schwer diese Hypothese abzusichern.<sup>[23-25]</sup> Für diese Theorie spricht die Lage der zur Ausbildung der Z-Form befähigten Sequenzabschnitte. Diese sind zu 80% nahe dem Transkriptionsstartpunkt in der Promoterregion lokalisiert.<sup>[23]</sup> Des Weiteren wurde beobachtet, dass DNA-Sequenzen, die einem helikalem Stress unterliegen, leichter in die Z-Form übergehen. Dieser Prozess des negativen *supercoiling* geht mit der Verringerung der Windungszahl einher. Durch diese Konformationsänderung wird eine Torsionsspannung in der DNA verursacht, welche den Übergang in die Z-Form verringert. Gleichzeitig wird Energie, die zur Stabilisierung der Z-DNA dient,

freigesetzt.<sup>[26,27]</sup> Ein weiterer Punkt erschwert die Aufklärung der biologischen Relevanz der Z-DNA. Bis heute sind nur wenige Moleküle oder Proteine bekannt, die selektiv an Z-DNA binden.<sup>[23]</sup>

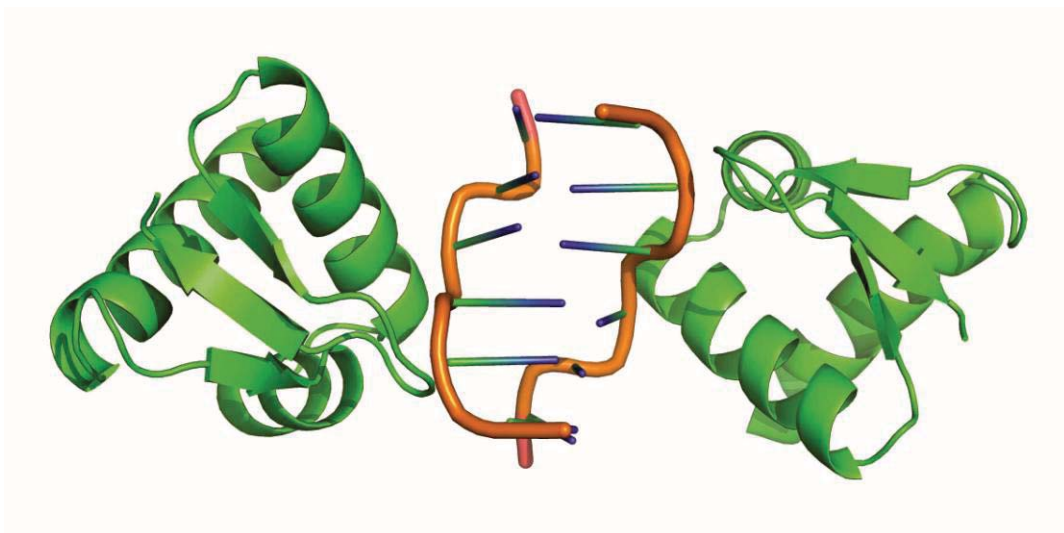
*Rich et al.* lieferten durch die Kristallisation einer B-Z-*junction* mit Hilfe eines Z-DNA induzierenden Proteins den Grundstein für ein detailliertes Modellsystem (Abbildung 3).<sup>[28]</sup> Dieses Modellsystem zeigt, dass durchgängig  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen den Nukelobasen, auch an den Übergängen, vorhanden sind. Zu Beginn wird von einem Bruch der Basenpaarung ausgegangen, gefolgt von einem Herausdrehen der entsprechenden Basen aus der Helix. In Folge des Herausdrehens kommt es zu einem Umklappen der Basen, indem die Purinbasen um die glykosidische Bindung in die *syn*-Konformation rotieren. Die Pyrimidinbasen hingegen drehen sich mit der entsprechenden 2'-Desoxyriboseeinheit, so dass die *anti*-Konformation erhalten bleibt. Durch diesen Vorgang wird eine konformelle Spannung aufgebaut. Die benachbarte Basenpaarung wird gebrochen und die Nukleobasen drehen sich heraus. Dieser Vorgang setzt sich nach dem Reißverschlussprinzip so lange in beide Richtungen fort, bis Sequenzen auftreten, die nicht in der Lage sind, die Z-Konformation auszubilden. An dieser Stelle bleiben die Nukleobasen aus dem Doppelstrang herausgedreht und es bildet sich eine B-Z-*junction* aus.<sup>[28]</sup>



**Abbildung 3:** Kristallstruktur einer B-Z-*junction*. links: B-Z-Übergang ohne Enzym. In rot und gelb sind die herausgedrehten Nukleobasen Adenin und Thymin dargestellt. rechts: B-Z-Übergang mit dem Enzym ADAR1 (PDB: 2ACJ).<sup>[28]</sup>



Das Enzym dsRNA-Adenosindeaminase (ADAR1) ist der älteste und am besten untersuchte Vertreter der Familie der Z-DNA bindenden Proteine und wurde erstmals aus Hühnerblut isoliert.<sup>[29]</sup> ADAR1 deaminiert in doppelsträngiger RNA Adenosin zu Inosin, welches dann als Guanosin transkribiert wird. Durch diesen Austausch nimmt ein Guanin die Stelle eines Thymins im komplementären Strang ein und hat somit einen Einfluss auf die transkribierte Aminosäuresequenz und auch auf die Struktur und Funktion des Proteins. Das Enzym besteht aus den zwei homologen Untereinheiten  $Z\alpha$  und  $Z\beta$ , die zusammen als  $Zab$  bezeichnet werden. Von den beiden Untereinheiten ist  $Z\alpha$  die Bindungsdomäne für Z-DNA/Z-RNA. Sie befindet sich am N-Terminus des Proteins und weist eine kompakte  $\alpha/\beta$ -Architektur auf. Diese besteht aus drei  $\alpha$ -Helices und drei flankierenden antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (Abbildung 4).<sup>[30]</sup>



**Abbildung 4:** Komplex aus einem Z-DNA Doppelstrang  $[d(CGCGCG)_2]$  und zwei  $Z\alpha$ -Domänen (ADAR1) (PDB: 1QBJ).<sup>[30]</sup>

Dieses Motiv der Untereinheit  $Z\alpha$  zählt somit zu der großen Familie der HTH-Proteine (*helix turn helix*). Jedes Mitglied dieser DNA bindenden Proteine weist eine einzigartige Orientierung der DNA-Erkennungshelix auf. HTH-Proteine sind damit in der Lage an rechtsgängige Konformationen sowie an geknickte DNA zu binden. ADAR1 stellt daher eine Besonderheit in der Familie der HTH-Proteine dar, da die Untereinheit  $Z\alpha$  eine Spezifität für Z-DNA hat.<sup>[31]</sup> HTH-Proteine nutzen für die DNA Erkennung die Nukleobasen in der großen Furche. Im Fall von ADAR1 findet die Erkennung allerdings ausschließlich mit der charakteristischen Rückgrat-



konformation der Z-DNA statt. Zusätzlich wird eine Wasserstoffbrücke zu einem C8-Atom eines Guanins in *syn*-Konformation ausgebildet. Durch die sehr hohe Spezifität ist die Untereinheit Z $\alpha$  in der Lage auch bei einem sehr viel höheren Überschuss an B-DNA selektiv an Z-DNA zu binden.<sup>[32,33]</sup>

Wie beschrieben findet die Z-DNA Erkennung bei ADAR1 hauptsächlich über ionische Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat statt. Durch diese Tatsache bindet die Untereinheit Z $\alpha$  auch an d(TA)<sub>n</sub>-Oligomere und ist in der Lage die Z-Konformation auch bei diesen Oligomeren zu induzieren. Die Induktion der Z-Konformation tritt in Anwesenheit der Untereinheit Z $\alpha$  schon bei niedrigen Salzkonzentrationen ein. Dies ist ein sehr bemerkenswerter Befund, da die Induktion der Z-Konformation der d(TA)<sub>n</sub>-Oligomere in Abwesenheit der Untereinheit Z $\alpha$  auch bei sehr hohen Salzkonzentrationen nur teilweise gelingt.<sup>[33]</sup>

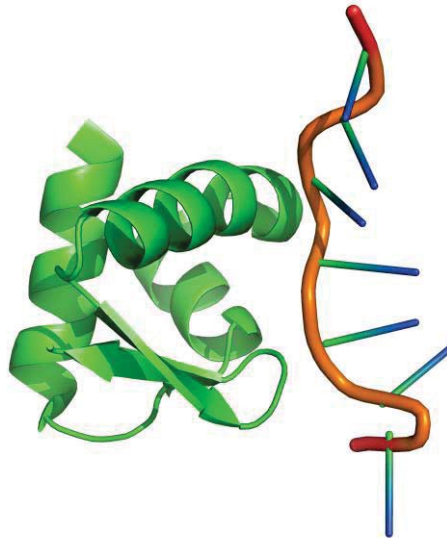
Der genaue Zusammenhang zwischen der Funktion des Enzyms ADAR1 und seinen Eigenschaften (Deaminierung von Adenosin und Bindung an Z-DNA-Sequenzen) ist bis heute noch nicht geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass durch die Bindung der zwei homologen Untereinheiten Z $\alpha$  und Z $\beta$  an die Z-DNA, die während der Transkription entsteht, ADAR1 in bestimmten Regionen eines Gens lokalisiert wird. Dadurch ist ein direkter Einfluss auf die Transkription eines Gens oder sogar dessen Blockade möglich.<sup>[34,35]</sup>

In den Folgejahren wurden weitere Proteine mit sehr ähnlichen Bindungsmodi und Erkennungseinheiten aus sehr unterschiedlichen Organismen identifiziert. Die Funktion der identifizierten Proteine ist dabei sehr unterschiedlich. Ein Vertreter ist das humane Protein DLM-1 (auch als ZBP1 — Z-DNA *binding protein* 1 — bezeichnet) (Abbildung 5). Diesem Protein werden Funktionen in der Interferonantwort zugeschrieben.<sup>[36,37]</sup> Untersuchungen haben gezeigt, dass es an cytosolische DNA bindet und für verschiedene Signalketten in der Immunantwort verantwortlich ist. Andere Vertreter sind zum Beispiel das aus Zebrafischen isolierte Protein PKZ, welches die Funktion der Proteinkinasen von Säugetieren übernimmt, oder das Protein E3L, welches von Pockenviren gebildet wird und von entscheidender Bedeutung für die Virulenz der verschiedenen Virenstämme ist.<sup>[38,39]</sup>

Die beschriebenen Proteine weisen alle eine Z $\alpha$ -Einheit auf. Durch diese Einheit sind die Proteine in der Lage an Oligomere mit unterschiedlicher Sequenz zu binden, aber auch DNA-Oligomere mit ungeeigneter Sequenz in die Z-Konformation zu überführen.<sup>[40]</sup> Ihre Funktion liegt daher nicht hauptsächlich in



der Erkennung von Z-DNA, sondern eher in der konformationellen Kontrolle von DNA-Sequenzen als Bestandteil von zellulären Signalkaskaden.<sup>[23]</sup>



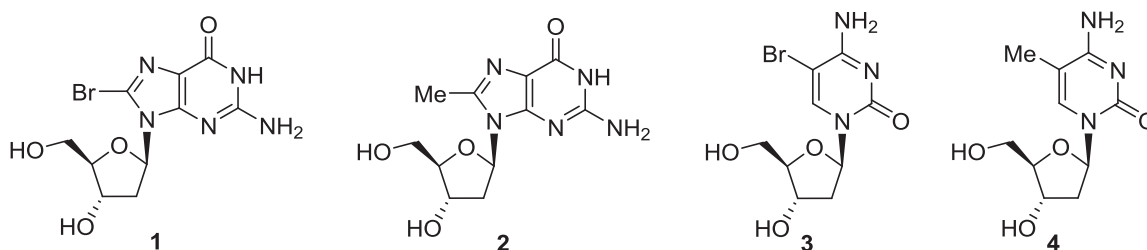
**Abbildung 5:** Komplex aus einem Z-DNA Einzelstrang [5'-d(TCGCGCG)] und einer  $\alpha$ -Domäne (DLM-1) (PDB: 1J75).<sup>[37]</sup>

### 1.1.3 Induktion der Z-Konformation durch modifizierte Nukleotide

Die Z-DNA weist einige spezifische Unterschiede, wie zum Beispiel die Zuckerkonformation oder die Orientierung der Nukleobase im Doppelstrang, zu der unter physiologischen Bedingungen stabilen B-DNA auf. Diese charakteristischen Merkmale können genutzt werden, um gezielte chemische Modifikationen vorzunehmen. Schon früh wurden systematisch modifizierte Nukleotide eingesetzt, um die DNA in die Z-Konformation zu überführen. Diese Methode bietet im Vergleich mit der Verwendung von hohen Salzkonzentrationen oder der Verwendung von Additiven die Möglichkeit, bestimmte DNA-Sequenzen unter physiologischen Bedingungen in Z-Konformation zu untersuchen.<sup>[18]</sup> Das bekannteste Beispiel ist die von *Rich et al.* vorgestellte Methode mehrfach bromierter Oligomere, um selektiv mit Hilfe der Affinitätschromatographie Z-DNA bindende Proteine aufzufinden.<sup>[41,42]</sup> Dabei wurden die Oligomere in Gegenwart von 4M Natriumchlorid-Lösung mit Brom versetzt. Durch die gezielte Umsetzung



werden die Position C8 der Guaninbase und die Position C5 der Cytosinbase bromiert.<sup>[41]</sup> Die Bromierung dieser Positionen stabilisiert sehr effektiv die Z-Konformation, so dass Oligomere des Typs d(CG)<sub>n</sub> selbst nach Entfernen des Salzes aus der Lösung in der Z-Konformation bleiben.<sup>[41]</sup> Auf Grundlage dieses Experiments wurden gezielt modifizierte Bausteine synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut. In erster Linie fanden bromierte und methylierte Guanin- und Cytosin-Derivate Verwendung (Abbildung 6). Diese wurden dann zielgerichtet auf ihre stabilisierende Wirkung der Z-Konformation untersucht.<sup>[43-46]</sup> Zur Stabilisierung der Z-Konformation müssen nicht zwingend alle Nucleobasen bromiert sein, jede dritte oder fünfte Nucleobase reicht aus um in Gegenwart von 150mM Natriumchlorid-Lösung die Z-Konformation zu induzieren.



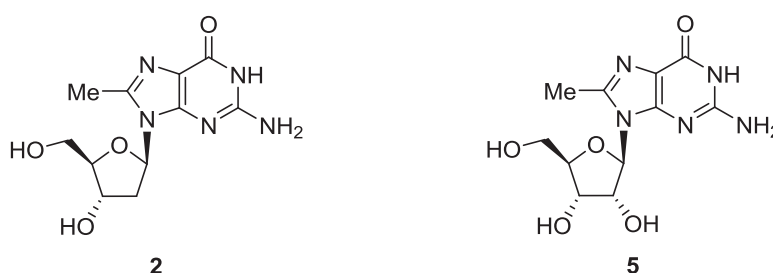
**Abbildung 6:** Bromierte oder methylierte Guanin- und Cytosin-Nucleobasen, die die Z-Konformation in einem Oligonucleotid induzieren können.

Der entscheidende Effekt zur Ausbildung der Z-Konformation kann bei den Cytosin-modifizierten Derivaten mit Hilfe des Hydratationseffektes erklärt werden. Dabei sind hydrophobe Substituenten an Position C5 der Nucleobase in der B-DNA stark exponiert, wohingegen in der Z-DNA Van-der-Waals Kontakte zu benachbarten Purinbasen ausgebildet werden können. Durch diese Eigenschaft wird die energetisch ungünstige Interaktion zwischen hydrophober Oberfläche und Wassermolekülen aus der Umgebung minimiert und die Ausbildung der Z-Konformation gleichzeitig begünstigt.<sup>[46]</sup>

Im Gegensatz zu den modifizierten Cytosin-Derivaten spielen bei den bromierten oder methylierten Guanin-Derivaten sterische Interaktionen innerhalb des Nucleotids die entscheidende Rolle.<sup>[44,47]</sup> Durch die Modifikation an Position C8 tritt eine repulsive Wechselwirkung zwischen dem Substituenten an dieser Position und dem Wasserstoffatom H2' auf. Das System weicht dieser Wechselwirkung durch Umwandlung in die *syn*-Konformation aus. Zusätzlich zu den 2'-Desoxy-



guanosin-Derivaten wurden auch die entsprechenden Riboguanosin-Derivate auf ihre Eigenschaft, die Z-Konformation zu induzieren, untersucht. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass das 8-Methylguanosin (**5**) einen stärkeren Einfluß auf die Induktion von Z-DNA hat als das entsprechende 2'-Desoxyguanosin-Derivat 8-Methyl-2'-desoxyguanosin (**2**) (Abbildung 7).<sup>[48]</sup> Dieser Befund kann, wie im Fall der Cytosin-Derivate, mit einem Hydratationseffekt erklärt werden, da 8-Methylguanosin (**5**) eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Position C2' aufweist.



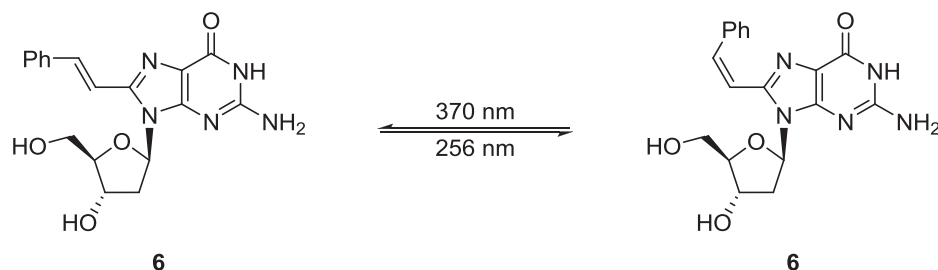
**Abbildung 7:** Vergleich von 8-Methyl-2'-desoxyguanosin (**2**) und 8-Methylguanosin (**5**). Beide Derivate können die Z-Konformation in einem Oligonukleotid induzieren. Bei Verbindung **5** handelt es sich um das zur Zeit effektivste Derivat zur Stabilisierung der Z-Konformation.

In kürzlich veröffentlichten Arbeiten wurde die Synthese von 8-Styryl-2'-desoxyguanosin (**6**) beschrieben (Abbildung 8).<sup>[49-52]</sup> Dabei unterliegt die Styryl-Gruppe an Position C8 einer *cis-trans*-Isomerisierung bei Bestrahlung mit UV-Licht. Die modifizierte Nukleobase konnte erfolgreich in Oligonukleotide eingebaut werden. Erste Untersuchungen zeigten, dass das *trans*-Isomer in der Lage ist B-DNA zu stabilisieren, wohingegen das *cis*-Isomer zu einer Destabilisierung des B-DNA Doppelstranges führt. Zusätzlich wurden die Konformationen der beiden Derivate untersucht. Dabei fiel auf, dass das *cis*-Isomer hauptsächlich in *syn*-Konformation vorliegt, während das *trans*-Isomer die *anti*-Konformation bevorzugt.<sup>[49]</sup> Somit könnte 8-Styryl-2'-desoxyguanosin (**6**) eine sehr interessante Verbindung sein, um reguläre B-DNA mittels UV-Licht in Z-DNA zu überführen. Allerdings wurden erste Experimente auf diesem Gebiet noch nicht unternommen.

Die bisher beschriebenen Derivate beinhalten ausschließlich Modifikationen der Nukleobasen. Eine weitere Möglichkeit ist die chemische Veränderung der Zuckereinheit. Durch Einführung einer Ethinyleinheit in *arabino*-Konfiguration an Position C2' der 2'-Desoxyribose kann die für die B-DNA typische C2'-*endo*-Konformation unterdrückt werden (Abbildung 9). Dabei richtet sich der

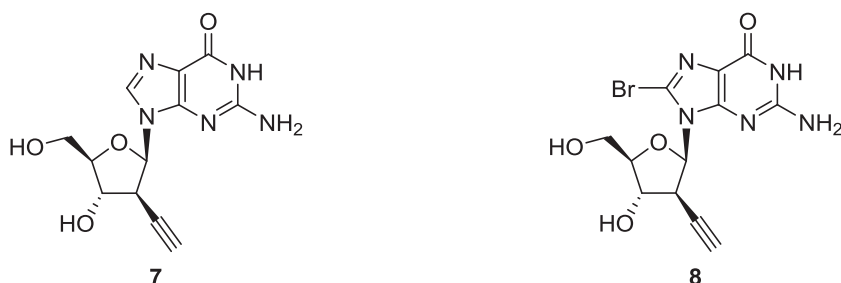


Ethynylsubstituent pseudoäquatorial aus. Diese Ausrichtung führt zur Ausbildung einer C2'-*exo*-Konformation, die der in Z-DNA vorliegenden C3'-*endo*-Konformation sehr ähnlich ist.<sup>[53,54]</sup>



**Abbildung 8:** 8-Styryl-2'-desoxyguanosin (6). Ein potientes Derivat um zwischen unterschiedlichen DNA-Konformationen zu schalten.

Unter den Gesichtspunkten der Basen- und Zucker-Modifikation sollte eine Kombination der beiden Modifikationen zu einer stärkeren Induktion der Z-Konformation führen. *Nadler et al.* konnten zeigen, dass die Kombination von 8-Brom und C2'-Ethynyl am selben Nukleosid einen stärkeren Einfluss auf die Induktion der Z-Konformation hat, als die Verwendung von modifizierten Derivaten, die nur Veränderungen der Nukleobase aufweisen (Abbildung 9).<sup>[55]</sup> Dieses Ergebnis lässt sich durch zwei Effekte erklären. Zum einen verstärkt der C8 Substituent die repulsive Wechselwirkung und zum anderen wird durch die C2'-Ethynyleinheit der Zucker in einer festen Konformation fixiert. Beide Effekte spiegeln sich in der stärkeren Induktion der Z-DNA Konformation wider.<sup>[55]</sup>



**Abbildung 9:** Zwei Möglichkeiten Z-DNA über Fixierung der Zucker-Konformation zu induzieren.