

Ulf Diederichsen

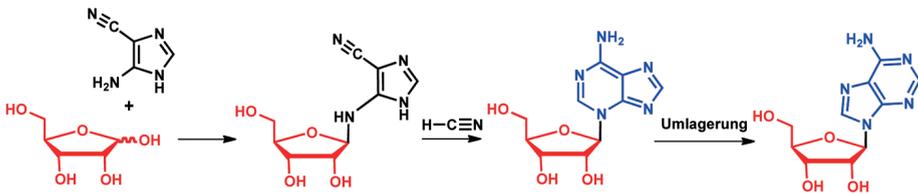
## **Chemie mit DNA und Peptiden: von präbiotischer Chemie zu Mechanismen in der Biochemie**

Die synthetische organische Chemie erlaubt den Aufbau von Molekülen oder deren gezielte Veränderung. Die Anwendung der organischen Synthesechemie auf die Herstellung von Biomolekülen wie DNA oder RNA Oligonucleotide, Peptide oder Proteine, Saccharide sowie Lipidmembranen hat einen ganz neuen Zugang zu den zentralen Biomolekülen in biologischen Prozessen eröffnet. Neben der chemischen Synthese von Biomolekülen, die in identischer Form biologisch zugänglich sind, erlaubt die präparative Synthese auch den Zugang zu unnatürlichen Modifikationen. Der Fortschritt in der Synthese von Biooligomeren basiert wesentlich auf der Synthese von Sequenzen durch wiederholte Operationen am festen Träger sowie auf neuen Techniken in der Reinigung und der Analytik der hergestellten Oligomere. Derartige Syntheseoptionen in der Generierung natürlicher und spezifisch modifizierter Oligomere bilden die Grundlage für unsere Arbeiten zum mechanistischen Verständnis biochemisch relevanter Vorgänge oder zur Steuerung und Schaltung derartiger Prozesse sowie zur Diagnostik und der Visualisierung von Biooligomeren.

Bevor exemplarisch Anwendungen der synthetisch modifizierten Oligomere vorgestellt werden, soll auf Arbeiten zur präbiotischen Chemie eingegangen werden, die hinsichtlich der Synthesebedingungen keinesfalls das gesamte Methodenarsenal der organischen Chemie zur Herstellung von Molekülen zulässt, sondern beschränkt ist auf Reagenzien und Bedingungen, die in der Frühphase der Erdgeschichte vorgeherrscht haben könnten. Zu den präbiotischen Reaktionsbedingungen zählen die anorganischen, abiotischen Ausgangsmoleküle wie z. B. Methan, Ammoniak, Wasserstoff, Wasser, Blausäure, Stickstoff sowie Temperatur, UV- oder ionisierende Strahlung als Energiequellen. Ausgehend von diesen Vorläufermolekülen lassen sich präbiotisch plausibel kleine Moleküle herleiten, aus denen wiederum die Grundbausteine der Biomoleküle wie Nucleobasen oder Zuckerbausteine der Oligonucleotide, oder Aminosäuren der Peptide/Proteine aufgebaut werden können. Ein schwieri-



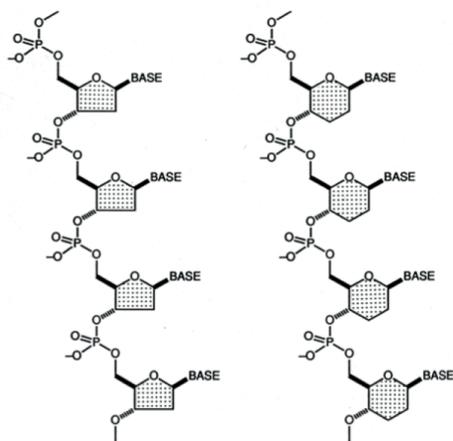
Ulf Diederichsen, Professor für Organische Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen, O. Mitglied der Göttinger Akademie seit 2012



**Abb. 1.** Hypothese eines präbiotischen Zugangs zu Nucleotiden durch Umsetzung des HCN-Tetramers (schwarz) mit Ribose (rot) gefolgt vom Aufbau des Purins (blau) und einer Umlagerungsreaktion.

ges Problem stellt dabei die präbiotische Verknüpfung der Nucleobasen mit den Zuckereinheiten zu den DNA/RNA Nucleosid-Bausteinen dar. Erst kürzlich berichtete Sutherland einen Ansatz, der den Aufbau des Zuckers frühzeitig mit in die Nucleotidsynthese einbezieht und als eine plausible Option für die präbiotische Verknüpfung von Zucker und Nucleobase gesehen werden kann [1]. Im Eschenmoser Laboratorium sind wir seinerzeit experimentell der Hypothese nachgegangen, ob die kovalente Bindung zwischen Nucleobase und Zucker auf dem Angriff eines für die Präbiotik zentralen Bausteins, dem Blausäure (HCN)-Tetramer Molekül, am Zucker basiert, die z. B. gefolgt ist von einer Zyklisierung mit einem weiteren Molekül Blausäure zur Nucleobase Adenin und einer abschließenden Umlagerung der Zucker-Stickstoff-Verknüpfung (Abbildung 1) [2]. Auch wenn für diesen Weg experimentell noch keine Evidenz gefunden werden konnte, bleibt dieser Ansatz eine präbiotisch interessante Option.

Anders verhält es sich mit der ebenfalls der präbiotischen Chemie entstammenden Frage nach der Ringgröße der Zucker in Nucleinsäuren. Danach hat Eschenmoser die Frage aufgeworfen „Warum hat die Natur sich für den Ribosyl-Fünfring entschieden und nicht auf Sechsringe zurückgegriffen, obwohl für letztere präbiotische Relevanz vermutet werden kann?“ [3]. In dieser Frage kann die organische Chemie über das Nachstellen plausibler Reaktionswege unter präbiotischen Bedingungen hinaus einen wertvollen Beitrag leisten, indem das künstliche DNA-Analogon mit den Sechsring-Zuckern hergestellt wird und aus dessen Eigenschaften Rückschlüsse auf die potentielle Verwendbarkeit als genetisches Material gezogen werden. Für DNA, die den Sechsring-Zucker enthält, der sich von der in DNA vorkommenden Deoxyribose lediglich durch die Ringerweiterung um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe ableitet (Abbildung 2), konnte gezeigt werden, dass sich die bevorzugte dreidimensionale Struktur eines Sechsringes derart auf die Struktur des DNA-Rückgrats auswirkt, dass die für DNA-Doppelstränge typische Doppelhelix nicht mehr ausgebildet wird, sondern derartige Hexose-DNA in nahezu linearen Doppelsträngen dimerisiert [4]. Die Linearität von Doppelsträngen, die durch die Erkennung von Nucleobasen gebildet werden, hat dramatische Konsequenzen für die Eindeutigkeit der Nucleobasen-Komplementarität. Während die helikale Rückgrat-Topologie natürlicher DNA-Doppelstränge eindeutig



**Abb. 2.** Struktureller Vergleich eines DNA-Stranges (links) mit der Sechsring-homologen HOMO-DNA (Mitte) und Konsequenzen für die Stabilität von hexameren Doppelsträngen in Abhängigkeit der Nucleobasen. Angegeben sind die Temperaturen (in °C) bei denen die Hälfte der Doppelstränge in Einzelstränge dissoziiert vorliegen (rechts) [4].

#### DNA

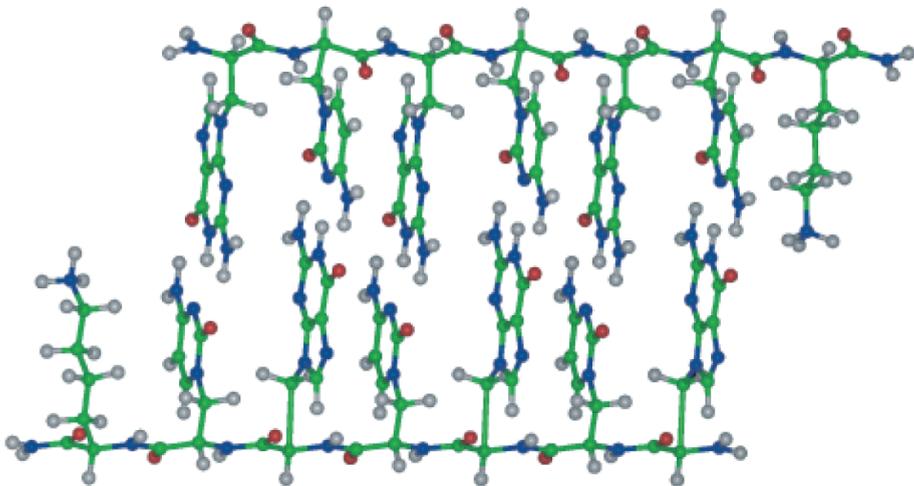
	A	G	T	C
Adenin (A)	-			
Guanin (G)	-	+		
Thymin (T)	< 5	-	-	
Cytosin (C)	-	48	-	-

#### HOMO-DNA

	A	G	T	C
Adenin (A)	47			
Guanin (G)	< 15	38		
Thymin (T)	20	-	-	
Cytosin (C)	< 15	58	-	-

festlegt, dass immer ein Purin (Guanin oder Adenin) mit einem Pyrimidin (Cytosin oder Thymin) im Watson-Crick Wasserstoffbrücken-Erkennungsmodus und damit in einheitlicher Orientierung der Nucleobasen zueinander Basenpaare ausbilden, ist diese geometrische Restriktion in linearen Paarungssystemen aufgehoben. Grundsätzlich erlaubt die lineare Doppelstrang-Topologie die Interaktion aller Nucleobasen unabhängig von Größe und relativer Orientierung. So ist es dann auch nicht verwunderlich, dass die Hexose-DNA eine viel größere Paarungsvielfalt erlaubt als reguläre DNA und damit die Eindeutigkeit des Informationstransfers beim Ablesen der Nucleobasen-Sequenz verloren geht [5]. Schon aus diesem Grund ist Hexose-DNA als Alternative zur DNA in der Verwendung als genetisches Molekül disqualifiziert. Die Synthesemöglichkeit von potentiellen Alternativen zu DNA-Oligomeren hat diesem Fall eine klare Antwort auf die topologischen Voraussetzungen für einen eindeutig ablesbaren Träger von Information geben können.

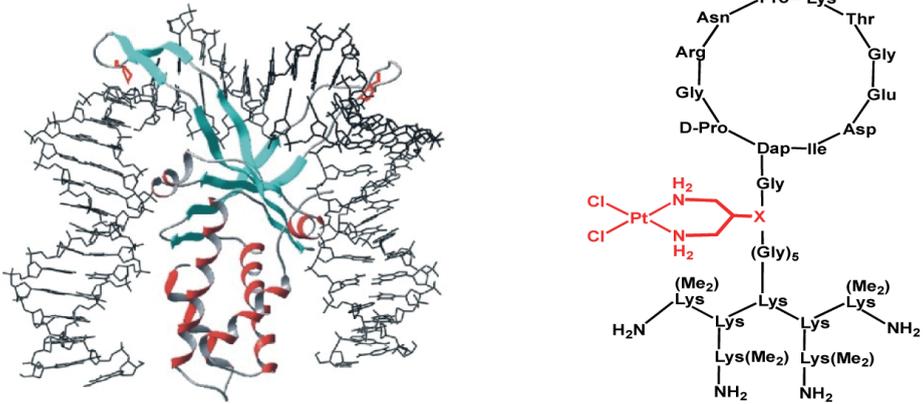
Im Rahmen unserer eigenen Arbeiten haben wir das topologische Motiv linearer basenpaarender Oligomere aufgenommen und sind dem gezielten Design für ein Oligomer mit linearer Doppelstrang-Topologie nachgegangen. Die definierte Topologie und speziell die rigide, sehr wohl definierte lineare Struktur sollte für verschiedene biochemisch begründete Anwendungen nutzbar gemacht werden. Im Doppelstrang-Design wurde auf ein peptidisches Rückgrat zurückgegriffen und ausgenutzt, dass der Abstand sequentiell aufeinander folgender Seitenketten dem idealen Abstand entspricht, den Nucleobasen in einem Basenstapel einnehmen, um einen größtmöglichen energetischen Beitrag zur Doppelstrangstabilisierung zu lie-



**Abb. 3.** Modell einer Alanyl-Peptidnucleinsäure als intrinsisch lineares Doppelstrangmotiv, das strukturell auf einem Peptidrückgrat und Nucleobasen-Erkennung basiert [6].

fern [6]. Somit ist eine Alanyl-Peptidnucleinsäure, in der jede Aminosäure-Seitenkette künstlich mit einer Nucleobase verknüpft ist, bei Ausbildung eines Doppelstranges intrinsisch linear (Abbildung 3). Eine derartige linear paarende Alanyl-PNA konnte tatsächlich erreicht werden, indem im Peptidstrang in ihrer Chiralität alternierende Nucleoaminosäure-Bausteine eingesetzt wurden. Diese künstliche Alanyl-PNA Doppelstrang-Topologie hat ihre Anwendung u. a. als Modell für verschiedene DNA-Basenstapel gefunden, in die gezielt Löcher eingefügt werden können, die mit katalytisch aktiven Metallzentren oder Interkalatoren gefüllt und mechanistisch für den Basenstapel-vermittelten Elektronentransfer verwendet werden können. Weitere Anwendungen sind der Einsatz als Hybridstrukturen in molekularen Leuchtkörpern zum spezifischen Nachweis von DNA-Einzelstrangsequenzen. Eingebaut in Proteine soll die im Einzelstrang mit unstrukturierter Rückgratstruktur vorliegende Alanyl-PNA durch Paarung mit einer komplementären Sequenz linear gestreckt werden, um auf diese Weise einen molekularen Schalter in Proteinen zum gestreckten Peptidrückgrat vorzusehen, das strukturell in Protein  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zu finden ist.

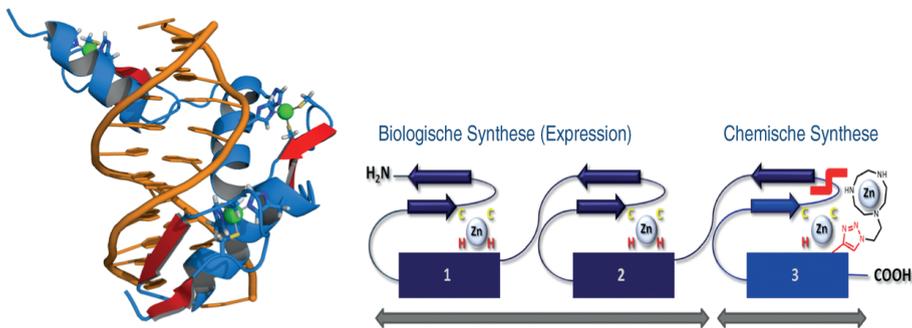
Im folgenden Teilprojekt wird der für die Streckung des Peptidstranges durch Basenpaarung im Alanyl-PNA-Doppelstrang beschriebene Ansatz übertragen auf die gezielte Änderung der dreidimensionalen Struktur einer DNA-Doppelhelix durch Interaktion mit einem peptidischen Binder. Für das Design des peptidischen Analogons kann Anleihe genommen werden bei der Wechselwirkung des IHF (*integration host factor*) Proteins mit DNA, das einen zweifachen Knick der Doppelhelix induziert und diese Biegung um nahezu  $180^\circ$  bei definierten DNA-Erkennungssequenzen bewirkt [7]. Für diese Erkennung mit Knickfunktion zeichnet zum einen ein positiv



**Abb. 4.** Integration host factor (IHF) im Komplex mit doppelsträngiger DNA unter Induktion eines Knicks der DNA von fast  $180^\circ$  [7] (links); peptidisches Analogon des IHF Proteins [8], das verknüpft ist mit einem Cisplatin-Derivat (rechts).

geladener Proteinkörper verantwortlich, um den sich die negativ geladene DNA-Doppelhelix herumwindet, zum anderen eine Peptidschleife, die in der kleinen Furche der DNA sequenzspezifisch erkannt wird. Durch Übertragung dieser beiden strukturellen Komponenten auf ein kleineres Peptid konnte ein Molekül erhalten werden, das sequenzspezifisch an DNA bindet und bei Erkennung einen Knick des Doppelstranges induziert [8]. Das Motiv einer geknickten DNA findet sich auch bei der Schädigung von DNA durch das Tumortherapeutikum Cisplatin wieder, dadurch, dass Nucleobasen durch kovalente Bindung überbrückt werden. Ein Problem bei der Behandlung mit dem kleinen Cisplatin  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$  besteht in der Selektivität für DNA in Tumorzellen. Von einer Verknüpfung des Cisplatin-Wirkstoffs mit dem spezifisch DNA bindenden und knickenden IHF-Peptidanalogen versprechen wir uns einerseits eine verbesserte Reaktivität, da es leichter sein sollte, Cisplatin an DNA zu binden, die bereits mit erforderlichem Knick für eine Bindung vororganisiert ist, als zusätzliche Energie aufbringen zu müssen, um Binden und Knicken in einem konzertierten Prozess zu realisieren. Andererseits könnte die Präferenz für spezifische DNA-Sequenzen ein geeignetes Werkzeug darstellen, um Cisplatin-Derivate bevorzugt an den Wirkort in Tumorzellen zu transportieren.

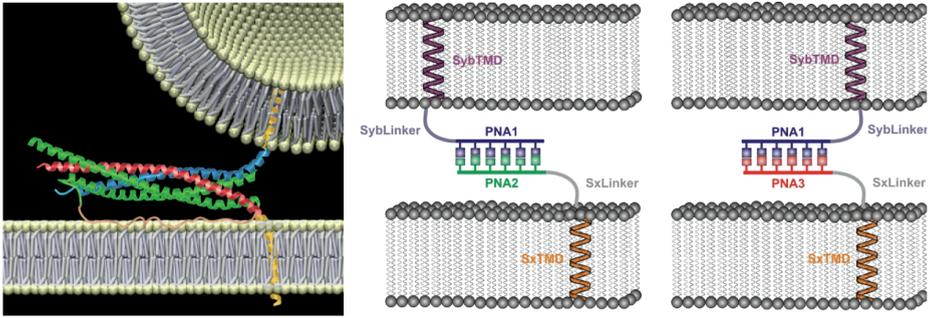
Ein weiteres sequenzspezifisch an doppelsträngige DNA bindendes Protein ist das Zinkfingermotiv, das aus drei Untereinheiten besteht, die aufgrund der Koordination von Zinkionen eine charakteristische Faltung einnehmen [9]. Ein Protein mit einer Folge von drei Zinkfinger-Untereinheiten ist geeignet, um eine DNA-Sequenz durch Wechselwirkungen in der großen Furche der DNA spezifisch auszulesen. Wir haben es uns zum Ziel gesetzt, derartige Zinkfinger-Proteine zu synthetisieren und über die strukturegebende Zinkkoordination hinaus zusätzlich mit weiteren künstlichen



**Abb. 5.** DNA bindendes Zinkfinger-Motiv; jede der drei Untereinheiten wird durch ein Zinkion (grün) strukturell organisiert (links); Synthese des Zinkfingers mit zusätzlicher Zinkbindungsstelle im dritten Zinkfinger (rechts); die Synthese wird realisiert durch Kombination von biologischer und chemischer Synthese und die Fragmente werden durch chemische Ligation verknüpft [10].

Metallbindungsstellen zu versehen, so dass diese funktional beispielsweise die Spaltung von DNA-Strängen katalysieren könnten [10]. Das funktionale Metallzentrum hat dabei das Potential, zum einen dirigiert durch das Zinkfingermotiv sequenzspezifisch DNA zu schneiden, zum anderen mechanistisch vom kooperativen Zusammenwirken mit dem strukturegebenden Zinkion zu profitieren. Die Einführung der vorgesehenen artifiziellen Metallbindungsstellen in Proteine erfordert den Aufbau der Proteine durch chemische Synthese. Andererseits sind die Zinkfinger mit etwa 90 Aminosäuren für die Peptidsynthese zu groß, so dass hier der Ansatz der chemischen Ligation zweier Proteinfragmente zum tragen kommt. Während das Fragment mit der unnatürlichen Metallbindungsstelle chemisch synthetisiert wird, lassen sich die verbleibenden zwei Zinkfinger motive durch Expression in *Escherichia coli* biologisch erhalten. Die chemische Ligation ermöglicht nun die Verknüpfung dieser beiden Proteinfragmente, in denen alle potentiell reaktiven Funktionalitäten ungeschützt vorliegen können. Entscheidend ist, dass für die Ligrationsreaktion eine zu den anderen Funktionalitäten orthogonale und besonders reaktive Verknüpfungsreaktion gefunden wurde. Wir konnten diese als native chemische Ligation beschriebene Verknüpfung für die Herstellung der Zinkfinger-Derivate anwenden und befassen uns auch methodisch mit der Weiterentwicklung der Ligrationsreaktion. Mit Hilfe von Auxiliar-Molekülen soll insbesondere erreicht werden, dass die Ligation in der Sequenz unabhängig von der Art der Aminosäuren wird, welche die Ligrationsstelle flankieren.

Abschließend soll ein Beispiel angeführt werden, bei dem es die organische Synthese erlaubt, zu Fragestellungen in komplexen biochemischen Vorgängen beizutragen. Bei der Signalübertragung in den Synapsen kommt der Fusion von Lipidmembranen eine zentrale Bedeutung zu [11]. Lipidmembranen sind Doppelschichten aus amphiphilen Lipidmolekülen, die ihre polaren Kopfgruppen der wässri-



**Abb. 6.** SNARE-Protein-vermittelte Membranfusion (links): Transmembranhelices (gelb) ankern in den jeweiligen Lipiddoppelschichten und werden durch Erkennung im Bündel von vier Helices zusammengeführt, so dass die Membranen in räumliche Nähe kommen und fusionieren können [12]. Künstliche Modellsysteme für SNARE-Proteine, in denen das Erkennungsmotiv durch Peptidnucleinsäuren (PNA) ersetzt ist. Erkennung erfolgt durch Basenpaarung, wobei durch sequentielle Abfolge der Basen definiert werden kann, ob die Transmembranhelices in antiparalleler (Mitte) oder paralleler Orientierung (rechts) angeordnet sind [13].

gen Phase zuwenden und die apolaren Lipidketten ins Innere orientieren. Durch Aggregation dieser Lipidmoleküle werden Doppelschicht-Membranen gebildet, die nahezu planaren Charakter haben können, oder kugelförmig als Vesikel Moleküle einschließen können. Signaltransfer in den Synapsen wird durch Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran erreicht und die im Vesikel durch die Lipiddoppelschicht kompartimentierten Botenstoffe übertragen. Dieser Fusionsprozess wird durch SNARE-Proteine vermittelt. Es handelt sich dabei um eine Gruppe von Proteinen, von denen zwei mit einer helicalen Domäne in den zu fusionierenden Membranen verankert sind; diese Transmembranhelices werden strukturell in Helices fortgesetzt, die als Erkennungseinheiten fungieren. Die Erkennungshelices der beiden Membran-ankernden Proteine finden sich zusammen mit zwei weiteren Proteinhelices zu einem tetrameren Helixbündel, dem SNARE-Komplex, für dessen Bildung ein Reißverschluss-artiger Erkennungsmechanismus gefolgt von einer Helicalisierung des Helixbündels angenommen wird (Abbildung 6, links) [12]. Durch diese Erkennung und Helicalisierung werden die zu fusionierenden Membranen zusammengezogen und bei ausreichender Annäherung kann es zur Umorganisation der Lipid-Moleküle und einer Membranfusion kommen.

Wir synthetisieren Analoga der SNARE-Proteine, die im Transmembransegment mit den natürlichen Proteinen identisch sind, jedoch in den Erkennungseinheiten künstliche und in der Stärke und Geometrie der Erkennung designbare Elemente enthalten, um anschließend das Fusionspotential derartiger SNARE-Analoga zu evaluieren. Es wird das Ziel verfolgt, Evidenz für die mechanistischen Vorstellungen der SNARE-vermittelten Membranfusion zu gewinnen sowie die Funktion und Bedeutung einzelner Proteinfragmente und Aminosäurereste für den Fusionsprozess zu

erkennen. Wird das natürliche Erkennungsmotiv eines tetrameren Helixbündels ersetzt durch einen DNA-ähnlichen Peptidnucleinsäure (PNA) Doppelstrang [13], so beruht die Erkennung der Membran-ankernden Proteine und damit die Annäherung der Lipidmembranen auf der Erkennung der Sequenz komplementärer Nucleobasen (Abbildung 6, rechts). PNA-Doppelstränge werden bereits mit kurzen Strängen und hoher Stabilität erhalten und erlauben zudem gesteuert über die Sequenz eine parallele oder antiparallele Anordnung der Stränge. Zudem konnten wir die PNA-Sequenzen mit den von den SNARE-Proteinen verwendeten, unterschiedlichen Transmembranhelices ausstatten oder artifiziell mit gleichen Helices verknüpfen. Im Ergebnis sind die künstlichen Konstrukte ebenso in der Lage, Membranfusion zu induzieren, jedoch ist die Fusogenizität für den SNARE-artigen Fall einer parallelen Orientierung der erkennenden Stränge und bei unterschiedlichen Helices größer als bei den entsprechenden artifiziellen Konstellationen. Dies ist ein Hinweis auf die Bedeutung der Orientierung der Erkennungseinheiten und der Beteiligung der Helices im Fusionsmechanismus. Derzeit verfolgen wir die Konstruktion von Erkennungseinheiten, die auch den Reißverschluss-artigen Prozess imitieren.

Die Möglichkeiten der organischen Synthesechemie werden in Hinblick auf die Beantwortung präbiotischer Fragestellungen aber auch hinsichtlich der Aufklärung biochemischer Mechanismen aufgezeigt. Die gezielte Modifikation von Molekülen und die Analyse der Eigenschaften und des Erkennungspotentials geben Aufschluss über die evolutorische Bevorzugung bestimmter Moleküle sowie die molekularen Erfordernisse im Rahmen biochemischer Prozesse. Darüber hinaus sind durch gezieltes Design von synthetisch zugänglichen und veränderbaren Biomolekülen Anwendungen in der Diagnostik und Medizinalchemie erreichbar.

## Literatur

- [1] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions, *Nature* 2009, 459, 239–242.
- [2] A. Eschenmoser, U. Diederichsen, unveröffentlichte Resultate; vergl. auch G. Wächtershäuser, An all-purine precursor of nucleic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1988, 85, 1134–1135.
- [3] A. Eschenmoser, M. Dobler, Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren? Teil I. Einleitung und Problemstellung, Konformationsanalyse für Oligonucleotid-Ketten aus 2',3'-Dideoxyglucopyranosyl-Bausteinen („Homo-DNS“) sowie Betrachtungen zur Konformation von A- und B-DNS, *Helv. Chim. Acta* 1992, 75, 218–259.
- [4] K. Groebke, J. Hunziker, W. Fraser, L. Peng, U. Diederichsen, K. Zimmermann, A. Holzner, C. Leumann, A. Eschenmoser, Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren? Teil V: (Purin-Purin-Basenpaarung in der homo-DNS-Reihe: Guanin, Isoguanin, 2,6-Diaminopurin und Xanthin, *Helv. Chim. Acta* 1998, 81, 375–474.
- [5] J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren? Teil III: Oligo(2',3'-dideoxy- $\beta$ -d-glucopyranosyl)nucleotide („HOMO-DNS“): Paarungseigenschaften, *Helv. Chim. Acta* 1993, 76, 259–352.

- [6] U. Diederichsen, Pairing Properties of Alanyl Peptide Nucleic Acids Containing an Amino Acid Backbone with Alternating Configuration, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35, 445–448.
- [7] P. A. Rice, Making DNA do a U-turn: IHF and related proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1994, 7, 86–93.
- [8] E. Liebler, U. Diederichsen, From the IHF protein to design and synthesis of a sequence-specific DNA bending peptide, *Org. Lett.* 2004, 6, 2893–2896.
- [9] J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity, *Current Opinion in Structural Biology* 2001, 11, 39–46.
- [10] F. Fehr, A. Nadler, F. Brodhun, I. Feussner, U. Diederichsen, Semi-Synthesis and Analysis of chemically modified Zif268 Zinc Finger Domains, *ChemistryOpen* 2012, 1, 26–32.
- [11] J. S. Bonifacino, B. S. Glick, The mechanisms of vesicle budding and fusion, *Cell* 2004, 116, 153–166.
- [12] R. Jahn, R. Scheller, SNAREs – engines for membrane fusion, *Nature Rev.* 2006, 7, 631–643.
- [13] A. S. Lygina, K. Meyenberg, R. Jahn, U. Diederichsen, Transmembrane domain peptide/peptide nucleic acid hybrids as SNARE protein model in vesicle fusion, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 8597–8601.