

DISS. ETH Nr. 13946

Selbstreparierende DNA auf Basis neuer, kovalent gebundener Flavinnucleoside

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Anja Schwögl

Dipl. Chem., Universität Heidelberg

geboren am 19. August 1971

aus Mutterstadt (Deutschland)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. François Diederich, Referent

Prof. Dr. Thomas Carell, Korreferent

Zürich 2000

Zusammenfassung

Seit dem Beginn des Lebens auf der Erde ist DNA dem Sonnenlicht ausgesetzt. Die starke UV-Strahlung ist der Grund für eine schwerwiegende Schädigung des Genoms, die zur Bildung von *cis-syn*-Cyclobutan-Pyrimidindimeren in der DNA-Doppelhelix führt. Wird dieser Schaden nicht repariert, führt dieser Defekt der DNA zur Behinderung der Zellreplikation und ist der Auslöser für krebsartiges Zellwachstum (Krebs). Konsequenterweise hat die Natur unterschiedliche Mechanismen für die Reparatur dieser Schäden entwickelt. Im einigen Reparaturprozessen spielen Photolyasen eine wichtige Rolle. Sie wurden bis jetzt in Pflanzen und Tieren gefunden. Photolyasen sind Flavin- und Deazaflavin-abhängige Reparaturenzyme, die den Dimer-Schaden mit Hilfe von Sonnenlicht, mittels eines photoinduzierten Elektronentransfer-prozesses, wieder in die Monomere spalten und somit die Wiederherstellung der gesunden DNA ermöglichen. Das Ziel meiner Dissertation war die Synthese der ersten Flavin-Coenzym enthaltenden DNA-Stränge mit der Absicht, selbst-reparierende DNA zu generieren.

Für die Untersuchung der katalytischen Eigenschaften des Flavin-Coenzymes im Oligonucleotid (welches die Proteinumgebung in Coenzymen-abhängigen Enzymen ersetzen soll) wurden viele verschiedene Flavin- β -riboside synthetisiert und deren Konformationen mit Hilfe von Kraftfeldberechnungen (*MacroModel*, *Amber**-Kraftfeld) berechnet.

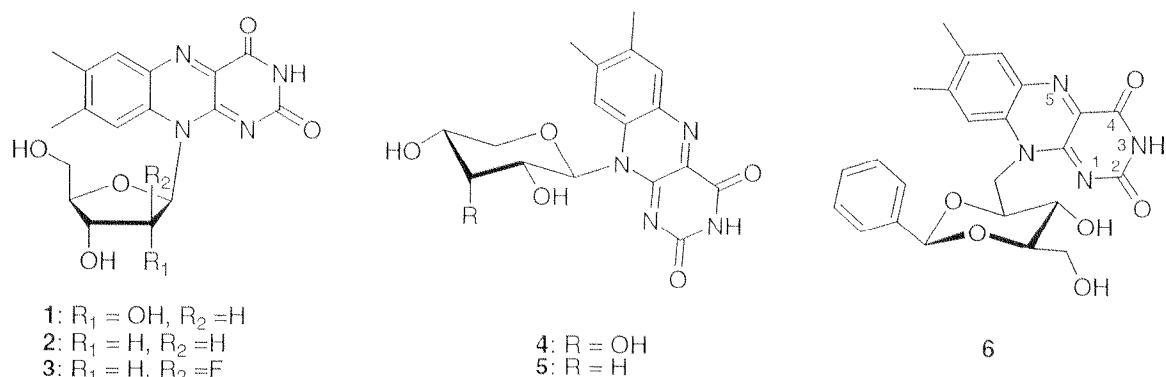


Abbildung 1 Flavinnucleoside.

Zusammenfassung

Die synthetisierten Nucleosidanaloge (**1-6**) bestehen aus einer Zucker-Einheit, die mit einem Flavin verknüpft ist (Abbildung 1). Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden alle Zielverbindungen (**1-6**) über mehrstufige organische Synthesen hergestellt. Eine grosse Herausforderung während der einzelnen Synthesen war die Kontrolle der Konstitution des Zuckerringes und der Konfiguration des anomeren Zentrums, welches β -konfiguriert sein musste. Das Flavinribosid **6** wurde im Rahmen der Dissertation für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. Das auffälligste Merkmal dieser Verbindung ist die Benzyliden-Schutzgruppe, die die sehr flexible Ribitylkette des Riboflavins in einen konformationell versteiften 1,3-Dioxansechsring überführt. Die Synthese von **6** wurde so optimiert, dass nur dasjenige Diastereoisomer erhalten wurde, bei dem sich alle grossen Substituenten des Dioxanrings in der thermodynamisch günstigen äquatorialen Position befinden. Diese Anordnung zwingt den Isoalloxazinring in eine Konformation, bei der das Flavin mit den Positionen O(4) und N(5) zur Helixachse des DNA-Doppelstranges zeigt.

Der Einbau dieses Flavinnucleotids in Oligonucleotide wurde mittels eines neu entwickelten Protokolls und eines DNA-Synthesizers erreicht. Dieses Protokoll ermöglicht es zum ersten Mal, Standard-Phosphoramidit- und H-Phosphonatchemie, die für den Einbau des Flavins unbedingt erforderlich war, zu verbinden. Mit Hilfe dieses Protokolls war es möglich, exzellente Einbauraten für den Flavin-Baustein in die DNA zu erhalten. Systematische Untersuchungen der Eigenschaften dieser modifizierten DNA-Stränge zeigten, dass die Flavinbase in die DNA-Doppelhelix inkorporiert ist und nicht-kovalente Wechselwirkungen mit der im Doppelstrang gegenüberliegenden Base eingeht. In der Oligonucleotid-Umgebung wurden starke Modulationen der Fluoreszenz- und Redoxeigenschaften des Flavin-Chromophors, vermutlich auf Grund von π - π -Stapel-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen, beobachtet. Diese Resultate zeigen, dass das Oligonucleotid in der Lage ist, die Eigenschaften des Coenzymbausteins, ähnlich wie in einem Proteinumfeld, zu beeinflussen.

Einbau der künstlichen Flavinnucleoside in Oligonucleotide, die auch einen Photodimerschaden enthalten, lieferten Flavin- und T=T-Dimer enthaltende DNA-Einzel- und -Doppelstränge (Abbildung 2). Es wurde ein genereller Assay für die

Untersuchung der Spaltungsreaktion des Photodimers (Cycloreversion des Cyclobutanrings des T=T-Dimers) durch die katalytisch aktiven Flavinnucleoside mit Hilfe von Sonnenlicht (bzw. monochromatischem Licht, $\lambda = 366$ nm) entwickelt. Es wurde beobachtet, dass die vollständige Cycloreversion der Pyrimidinschäden im DNA-Basenstapel durch den lichtinduzierten Elektronentransfer vom Flavin auf das T=T-Dimer in weniger als 35 min ablief. Hierbei muss das Elektron je nach Strang über 11 oder 17 Einfachbindungen übertragen werden.

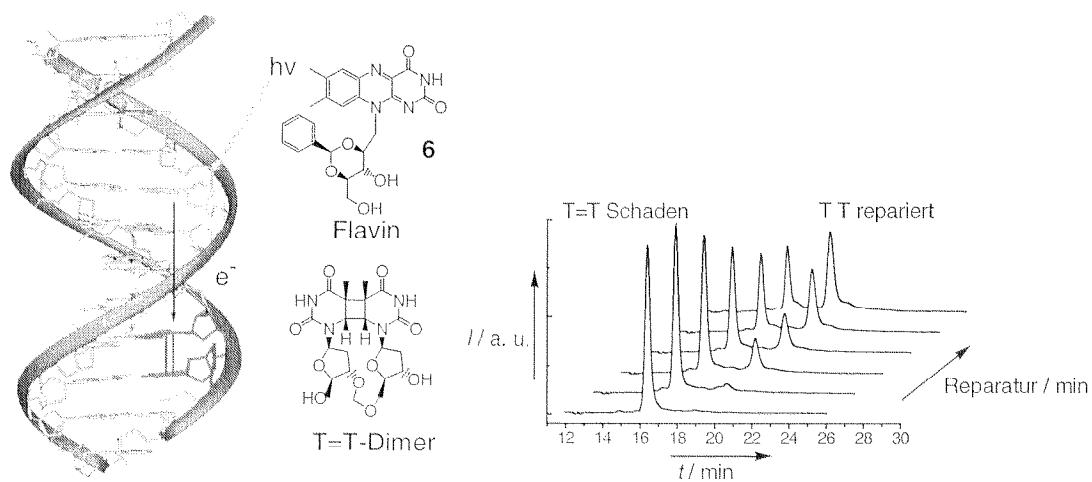


Abbildung 2 Modifizierte DNA-Doppelhelix und HPL-Chromatogramme der Aliquote, die während eines Bestrahlungsexperiments entnommen wurden. Sie zeigen eine saubere Umwandlung der T=T-Dimer-enthaltenden DNA in den reparierten Strang.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die ersten Coenzym-enthaltenden DNA-Stränge synthetisiert, die in der Lage sind, DNA-Schäden mit Hilfe von Licht als Energiequelle selbst zu reparieren. Diese Ergebnisse lieferten uns wichtige Informationen über die Funktion der Photolyase, und stellen die Basis für die Entwicklung von künstlichen Reparaturenzymen dar. Weiterhin ermöglichte diese Arbeit die Untersuchung des bisher nicht verstandenen reduktiven Elektronentransfer durch DNA.

Summary

Since the early beginnings of life on earth, DNA has been exposed to sunlight. The strong UV-irradiation causes severe genomic damage as a result of the formation of *cis-syn*-cyclobutane-pyrimidine-dimers within the DNA stack. If left unrepaired, these lesions can block cell replication and induce carcinogenic cell growth. Consequently, nature uses different mechanisms to repair these defects. In some repair processes, DNA-photolyases play an important role. They have been found both in plants and animals. These photolyases are flavin and deazaflavin dependent repair enzymes, which split the dimer lesions with the help of sunlight *via* a photoinduced electron transfer process, thus allowing the recovery of damaged DNA. The goal of my research was the synthesis of the first coenzyme containing DNA strands with the objective to create self-repairing DNA.

In order to investigate the catalytic properties of the flavin coenzyme inside oligonucleotides (which take the place of the protein environment in contemporary coenzyme depending enzymes) several flavin- β -D-ribosides have been designed using force field minimizations (AMBER* in MacroModel). These nucleoside analogs (**1-6**) are composed of a sugar moiety attached to a flavin coenzyme taking the place of the purine or pyrimidine bases (Figure 1). During my Ph. D. thesis, all target compounds **1-6** were synthesized using 12-17-step organic synthesis. A particular challenge of the multi-step synthesis was the control of the constitution of the sugar ring and the configuration at the anomeric center, which had to be β -configured.

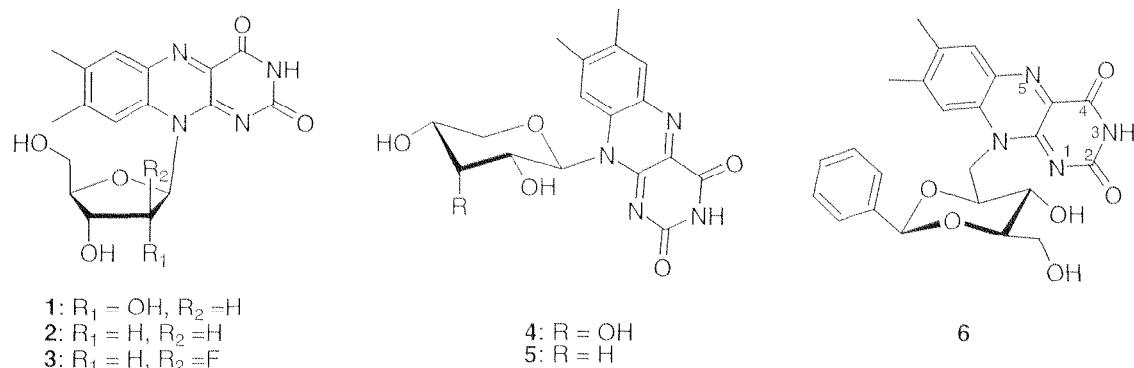


Figure 1 Flavin nucleosides.

After a screening process involving firstly a comparison of the distinct properties of the different structures, and secondly strategies for obtaining the target compound in high yields, the most promising flavinribosid **6** was chosen for further investigation. The crucial feature of this compound is the benzylidene protecting group, which forces the very flexible ribityl chain of the riboflavin into a conformationally rigid six membered 1,3-dioxane ring. The synthesis of **6** was designed to give only the diastereomer containing all large substituents of the six membered dioxane ring in the thermodynamically favored equatorial position. This arrangement also forces the isoalloxazine ring into a conformation where it points into the double stranded helix with the position O(4) and N(5) of the flavin **6** pointing towards the helical axis. Incorporation of flavin nucleotides into oligonucleotides was performed using machine assisted synthesis. The DNA-synthesizer was programmed to combine the standard phosphoramidite and H-phosphonate chemistry necessary for the incorporation of the flavin. The programmed procedure gave excellent yields for insertion of the building block into DNA. The DNA strands were purified using specially developed HPLC protocols. Systematic investigation of their properties show that the flavin nucleobase is incorporated in the DNA double helix. Within the oligonucleotide environment we also observe a strong modulation of the fluorescence and redox properties of the flavin coenzyme **6** possible due to π - π -stacking and hydrogen bonding interactions in the base stack. These results show that an oligonucleotide is able to modulate the properties of coenzymes in a similar way to a protein environment.

Incorporation of the artificial flavin nucleosides into oligonucleotides that also contain a photodimer-lesion furnishes flavin- and dimer lesion-containing DNA single and double strands (Figure 2). A general assay for the investigation of the reversion of the cyclobutane ring (splitting reaction) by catalytically competent flavin nucleosides using monochromatic light of defined wavelength (e.g. 366 nm) was developed. We observe a complete reversion of the pyrimidine lesion after less than 35 min, which suggests that the reduced and irradiated flavin nucleoside within the DNA stack is able to transfer electrons over at least 17 single bonds to the pyrimidine lesion.

Summary

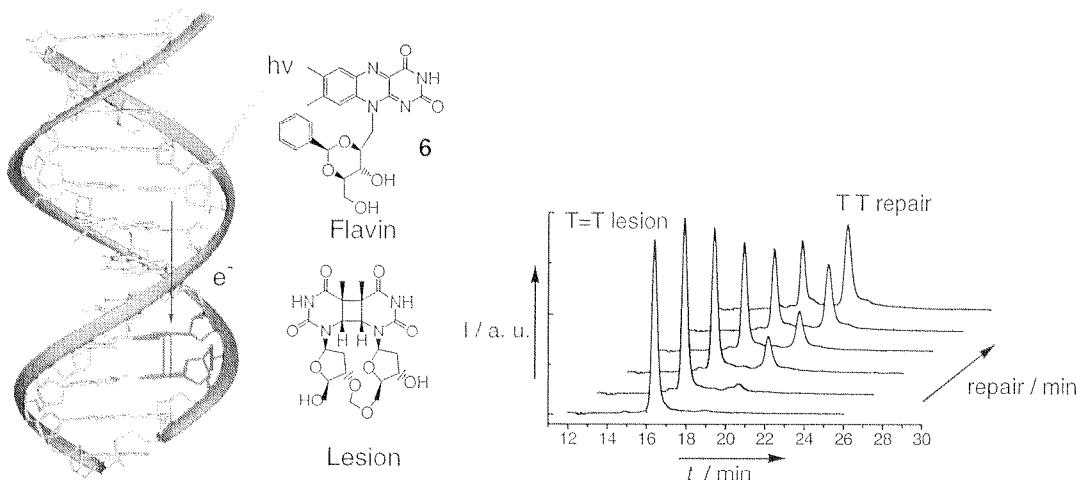


Figure 2 Modified DNA double helix and HPLC traces of the aliquots taken during an irradiation experiment showing the clean conversion of the damage containing DNA strand into the repaired strand.

We have synthesized the first coenzyme containing DNA able to self-repair DNA-lesions using sunlight as the energy source. This has provided not only important information about the function of DNA-photolyases, but in addition is the basis for the development of artificial repair enzymes. Furthermore, this research provides insights into the mechanism of reductive electron transfer within the DNA double helix.