

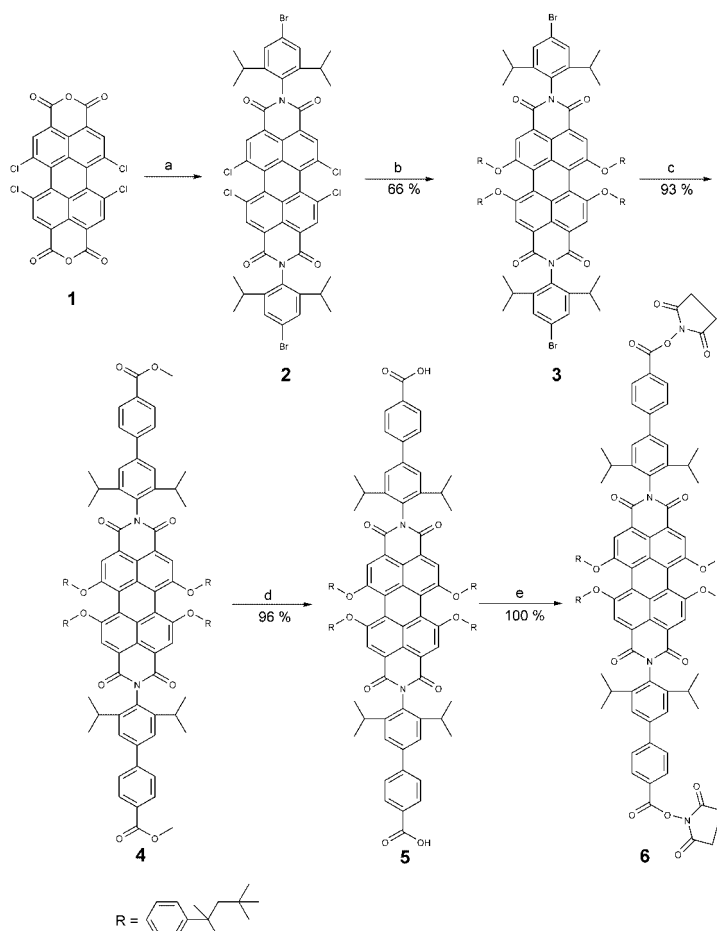
Farbstoffmarkierte Nucleotide

Synthese und Selbstorganisation von
Perylendiimid-Oligonucleotid-Konjugaten**

Moustafa A. Abdalla, Johannes Bayer,
Joachim O. Rüdler* und Klaus Müllen*

In den letzten Jahren hat die durch Oligodesoxyribonucleotide (ODNs) vermittelte Selbstorganisation von nanoskaligen Objekten wie Goldpartikeln,^[1] Kohlenstoffnanoröhren^[2] oder auf DNA basierenden Strukturen^[3] ein großes Interesse gefunden. Die Synthese von ODN-modifizierten organischen Molekülen wie ODN-Cyclobutadien^[4] und Trisoligonucleotidyliden^[5] wurde bereits beschrieben, und ihre Selbstorganisation wurde untersucht. Im Zusammenhang mit neueren Untersuchungen in der Einzelmolekülspektroskopie (SMS) ist besonders die Kupplung von ODN mit Farbstoffmolekülen interessant.^[6] Es wurden SMS-Studien des Fluoreszenzresonanzenergietransfers zwischen Donor- und Acceptorfarbstoffen durchgeführt,^[7] wobei diese Farbstoffe durch kurze DNA-Moleküle verknüpft waren. Für solche Studien ist es wichtig, organische Farbstoffe zu supramolekularen Strukturen anordnen zu können und an spezifischen Stellen eines Festkörper-Bauelements gezielt zu immobilisieren.^[8]

Hier beschreiben wir die Flüssigphasensynthese und die Charakterisierung von Perylendiimid-Bis(oligonucleotid)-Konjugaten (PONs), bestehend aus einer Farbstoffeinheit (Schema 1) und zwei an der Imid-Seite des Perylendiimids kovalent verknüpften einzelsträngigen (ss) ODNs von je 16 Basen Länge (Abbildung 1). Perylendiimide wurden wegen ihrer hohen Photostabilität, chemischen Inertheit und hohen Fluoreszenzquantenausbeute ausgewählt.^[8] Die Konjugate sind wasserlöslich und können mit einem komplementären 16mer-ss-ODN hybridisieren.



Schema 1. Synthese des Perylendiimids **6**: a) 4-Brom-2,6-diisopropylphenylamin, Propionsäure, Rückfluss, 20 h; b) 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol, K_2CO_3 , *N*-Methyl-2-pyrrolidinon (NMP), 90 °C, 12 h, Ausbeute 66 %; c) 4-Methoxycarbonylphenylboronsäure, Pd-Kat., K_2CO_3 , Toluol, Methanol, 75 °C, 15 h, Ausbeute 93 %; d) KOH, THF, 80 °C, 24 h, Ausbeute 96 %; e) *N*-Hydroxysuccinimid, Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), DMF, RT, 48 h, Ausbeute 100 %.

[*] J. Bayer, Prof. Dr. J. O. Rüdler
Center for NanoScience, Sektion Physik
Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschwister-Scholl-Platz 1, 80539 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-3182
E-mail: joachim.raedler@physik.uni.muenchen.de
M. A. Abdalla, Prof. Dr. K. Müllen
Arbeitsgruppe für Synthetische Chemie
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-379-350
E-mail: muellen@mpip-mainz.mpg.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die European Research Foundation innerhalb des Projekts Bionics (Eurocore) und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt. Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch das Bayerische Staatsministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst im Rahmen des Programms „Neue Werkstoffe“. J.B. wurde durch die Bischöfliche Studienförderung Cusanuswerk mit einem Graduiertenstipendium unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Wir weisen hier zum ersten Mal die reversible DNA-vermittelte Konjugation von komplementären PONs zu linearen Farbstoffketten nach. Die physikochemischen Eigenschaften der linearen Farbstoff-DNA-Polymere wurden durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), UV/Vis-Spektroskopie und Gelelektrophorese untersucht. Die ODNs wurden mithilfe von Standard-Festphasenchemie unter Verwendung der Phosphoramidit-Methode auf einer Polystyrol/Divinylbenzol-Oberfläche synthetisiert und anschließend mit Ionenaustausch-HPLC gereinigt. Zwei ODNs wurden hergestellt: ODN1 (5'-H₂N-(CH₂)₆-p-TAG TTG TGAT GTACAT-3') und das komplementäre ODN2 (5'-H₂N-(CH₂)₆-p-ATG-TACATCACA ACTA-3'). Im jeweiligen MALDI-TOF-Massenspektrum tritt lediglich ein Maximum auf, das dem Molekulargewicht von ODN1 (5106 g mol⁻¹) und ODN2 (5013 g mol⁻¹) entspricht. Das Disäurederivat des Perylendiimids, **6**, wurde gemäß Schema 1 synthetisiert (Details siehe Hintergrundinformationen).

ODN1 und ODN2 wurden in Natriumtetraborat (pH 8.5) an **6** gekuppelt. Die erhaltenen Konjugate, PON1 (Abbildung 1) und PON2, wurden durch präparative Polyacrylamid-

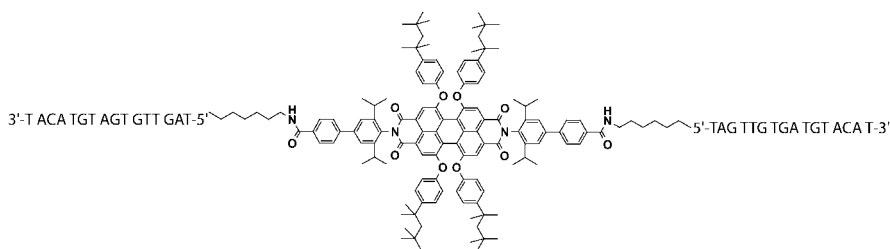


Abbildung 1. Perylen-Bis(oligonucleotid)-Konjugat PON1, bestehend aus zwei unterschiedlichen Komponenten: einem Farbstoffkern und zwei an beiden Seiten kovalent angeknüpften Oligonucleotiden. Dieser Aufbau lässt einen amphiphilen Charakter des Moleküls vermuten.

Gelelektrophorese (PAGE) im TBE-Puffer (Tris-HCl, Borat, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8.3) gereinigt, aus dem Gel ausgeschnitten und in Wasser extrahiert.

Ein Vergleich der Fluoreszenzabsorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren von PON1 und PON2 in Wasser mit den Spektren von **6** in Tetrahydrofuran (THF) belegt, dass die Perylenkomponente ihre optischen Eigenschaften beibehalten hat. Das Absorptionsmaximum von PON1 ist gegenüber dem von Perylen **6** bathochrom verschoben ($\lambda_{\max} = 595$ nm) (Abbildung 2).

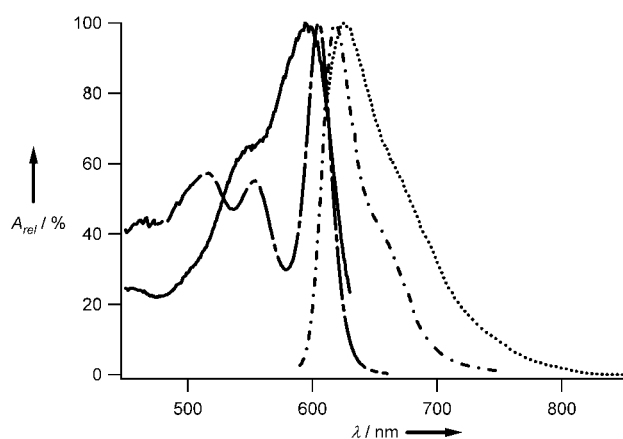


Abbildung 2. UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 590$ nm) von PON1 und **6**. PON1 (in Phosphatpuffer, pH 7): UV/Vis —, Fluoreszenz; **6** (in THF): UV/Vis ----, Fluoreszenz ----.

Das Löslichkeits- und das Aggregationsverhalten der PONs in wässriger Lösung wurde mit FCS untersucht. Diese Technik analysiert Fluktuationen der Fluoreszenzintensität, die durch Diffusion der Farbstoffe entstehen, in einem kleinen konfokalen Volumen (< 1 fL) eines Lasers (Details zur FCS-Methode siehe Hintergrundinformationen).^[9] Die Autokorrelationsfunktionen von PON1 (≈ 1 μm) bezüglich der Zeit wurden in Reinstwasser (ddH₂O) gemessen. Die experimentelle Kurve kann sehr gut durch eine theoretische Autokorrelationsfunktion für frei diffundierende monodisperse Teilchen beschrieben werden (Abbildung siehe Hintergrund-

informationen). Hierbei bestimmten wir eine mittlere Diffusionszeit τ_D von 41.4 ± 5.0 μs , die einem Diffusionskoeffizienten D_t von 257 ± 35 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ entspricht. Unter der Annahme, dass sich PON1 als kugelförmiges Teilchen beschreiben lässt, ergibt sich ein hydrodynamischer Radius von 0.85 ± 0.12 nm, der sehr gut dem erwarteten Wert entspricht. Unsere Messdaten zeigen keinerlei Hinweise auf größere Aggregate.

PON1 wurde mithilfe von Lipidmischungen aus kationischem 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) und neutralem 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) ($m(\text{DOPC})/[m(\text{DOPC}) + m(\text{DOTAP})] = 0.86$) in das Lösungsmittel *n*-Decan überführt. Hierbei wurde das Ladungsverhältnis zwischen den Phosphatgruppen von PON1 und den kationischen Lipiden auf 1:1 eingestellt. Die Lipide wurden zusammen mit PON1 in Wasser vermischt, anschließend wurde *n*-Decan zugegeben und über Nacht vorsichtig geschüttelt. Der Transfer der PON1-Lipid-Komplexe konnte mit bloßem Auge wahrgenommen werden, da sich die wässrige Phase nach dem Schütteln aufklärte. Die gemessenen FCS-Autokorrelationskurven entsprechen sehr gut einem Einkomponentenangleich mit einer Diffusionszeit von 270 ± 29 μs (Abbildung siehe Hintergrundinformationen). Berechnungen des Diffusionskoeffizienten für stäbchenförmige Partikel,^[10] die den PON1-Lipid-Komplex als einen Zylinder mit der Länge von 18 nm und einem Durchmesser von 6 nm annehmen (Abbildung 3), ergeben einen Wert von 41.9 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Dieser stimmt sehr gut mit dem experimentellen mittleren Diffusionskoeffizienten von 39.0 ± 5.1 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ überein.

Es wurde eine zweite Methode angewendet, um PON1 aus der wässrigen Lösung in *n*-Decan zu überführen. Hierbei wurde das Detergens zuerst in *n*-Decan gelöst und dann zu einer wässrigen PON1-Lösung gegeben. Laut FCS-Messungen stimmen die Teilchenzahlen in der unpolaren Phase in den unterschiedlich präparierten Proben weitgehend überein. Mithilfe eines Cy5-markierten 30mer-ss-ODN (Cy5-GCCGCTCTGACTGCTGACTACTATCG) konnte ein Transfergrad für den Übergang aus der wässrigen Lösung in *n*-Decan von ca. 80 % ermittelt werden.

Die Hybridisierungsexperimente wurden in unterschiedlichen wässrigen Lösungen durchgeführt: ddH₂O, TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5), TE + 0.1 M NaCl, TE + 0.8 M NaCl und 0.1 M NaCl. PON1 und das komplemen-

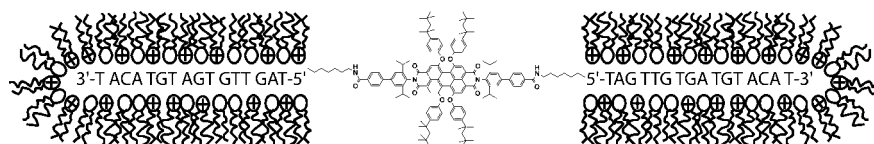


Abbildung 3. Schematische Darstellung des PON1-Lipid-Komplexes in *n*-Decan; die Kopfgruppen der Lipide sind in Richtung der hydrophilen ODN1-Ketten ausgerichtet, während die unpolaren Schwanzgruppen in das Lösungsmittel *n*-Decan ragen.

täre ODN2 wurden im stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 gemischt, wobei die Konzentration von PON1 auf ca. $1 \mu\text{M}$ eingestellt wurde. UV-Absorptionsexperimente bei 260 nm belegen, dass die Hybridisierung in allen Lösungsmitteln außer in ddH_2O stattfindet (unveröffentlichte Daten). Genauerer Aufschluss über die Hybridisierungseigenschaften der PONs lieferten temperaturabhängige Absorptionsmessungen in $\text{TE} + 60 \text{ mM NaCl}$. Absorptionsspektren unmittelbar nach dem Vermischen von PON1 und ODN2 wurden sowohl bei 90°C als auch bei 0°C aufgenommen. Demnach tritt bei höheren Temperaturen eine stärkere Absorption auf, und es kommt zu einer leichten Blauverschiebung des Absorptionsmaximums. Schmelzkurven bei 260 nm bestätigen die Ergebnisse und weisen einen einzigen scharfen Übergang bei einer Schmelztemperatur von 45°C auf.

Da PON1 und PON2 an beiden Bindungsstellen symmetrisch mit komplementären ODNs funktionalisiert sind, sollten Mischungen der beiden PONs zu kettenförmigen supramolekularen Strukturen hybridisieren. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden analoge Schmelzexperimente mit Mischungen aus PON1 und PON2 durchgeführt, wobei in diesem Fall das stöchiometrische Verhältnis von PON1 zu PON2 auf 1:1 eingestellt wurde. Die Schmelzkurven der PON-Mischungen und der PON/ODN-Proben zeigen übereinstimmende Merkmale, lediglich die Schmelztemperatur der PON-Mischungen ist leicht erhöht (47°C) (Abbildung 4). Dies weist stark darauf hin, dass der Perylendiimidkern die Hybridisierungseigenschaften der angebondenen ODNs nicht wesentlich beeinflusst.

PAGE-Experimente wurden zur Unterscheidung der einfachen Hybridisierung zwischen einem PON und dem komplementären ODN (Abbildung 5a) und der Polymerkettenbildung zwischen PON1 und PON2 herangezogen (Abbildung 5b). Die Proben wurden jeweils in $\text{TE} + 60 \text{ mM NaCl}$ gelöst und gut durchmischt, auf 70°C erhitzt und langsam über Nacht auf eine Endtemperatur von 4°C abgekühlt. Die Produkte wurden durch Gelelektrophorese analysiert, wobei SYBR-Gold zur direkten Färbung der PON1-PON2-Hybride verwendet wurde.

Gegenüber Proben aus einem PON und dem nichtkomplementären ODN (Ia, IVa) weisen Mischungen aus einem PON und dem komplementären ODN im Verhältnis 1:2 (IIa, IIIa) zwei zusätzliche Banden bei höherem Molekulargewicht auf, während die ODN-Bande (IIa, IIIa) und die PON-Bande (IIa) verschwinden. Die zusätzlichen Banden entsprechen mono- und dihybridisierten PONs. Deren Bildung wird durch das stöchiometrische Verhältnis von PON zum komplementären ODN beeinflusst, was sich erkennen lässt, wenn man das Verhältnis

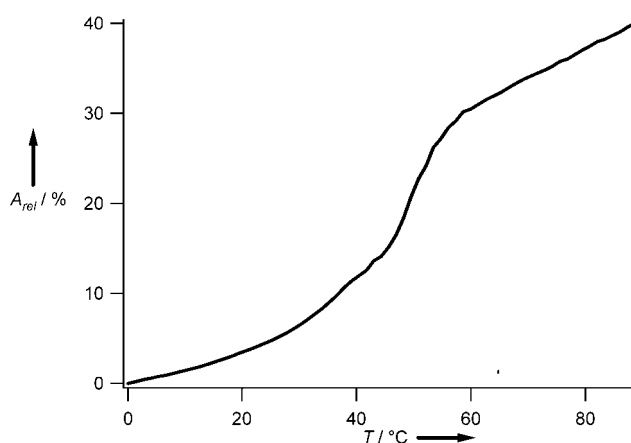


Abbildung 4. Schmelzkurve einer äquimolaren Mischung aus PON1 und PON2. Die Schmelztemperatur beträgt 47°C .

von PON zu ODN von 1:2 (IIa, IIIa) auf 1:1 (VIa, VIIa) ändert. In diesen Fällen wird die Bande des dihybridisierten Produkts zugunsten des monohybridisierten Produkts abgeschwächt.

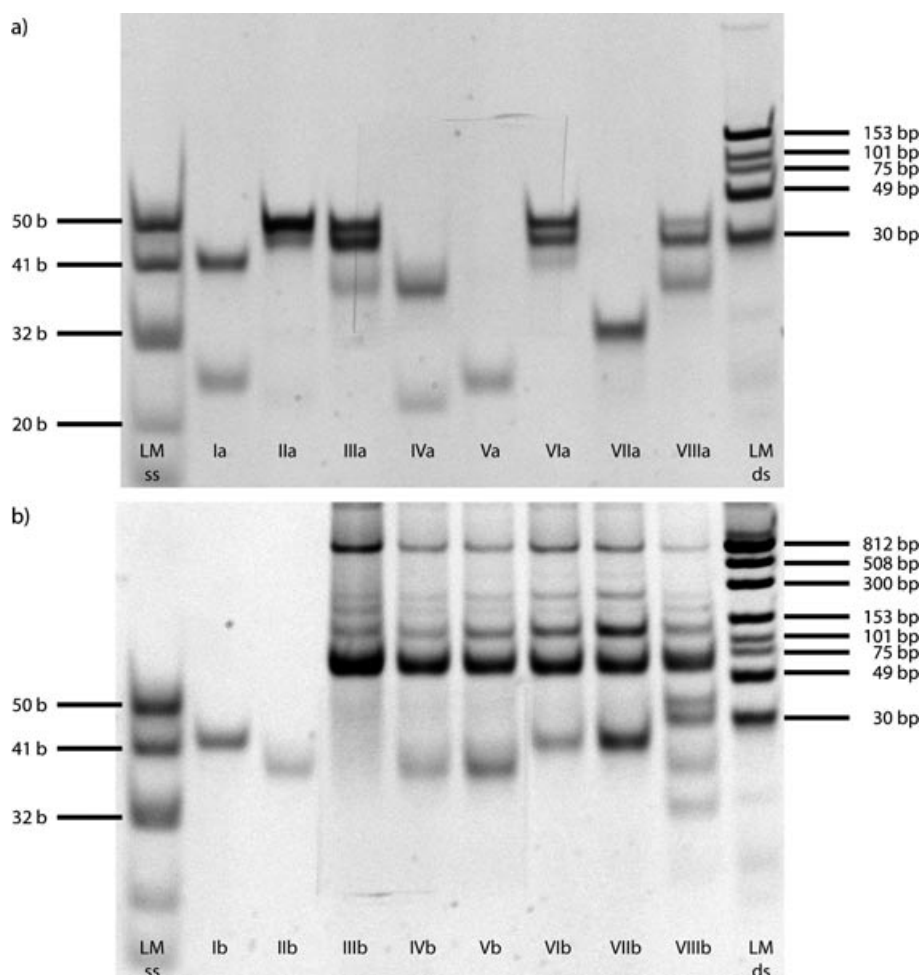


Abbildung 5. a) PAGE (TBE-Puffer, pH 8.3): Ia PON1/ODN1, IIa PON1/ODN2 (1:2), IIIa PON2/ODN1 (1:2), IVa PON2/ODN2, Va ODN1, VIa PON1/ODN2 (1:1), VIIa ODN1/ODN2 (1:1), VIIIa PON2/ODN1 (1:1); b) Polyacrylamidgel der PON1/PON2-Hybride: Ib PON1, IIb PON2, IIIb PON1/PON2 (1:1), IVb PON1/PON2 (1:2), Vb PON1/PON2 (1:3), VIb PON1/PON2 (2:1), VIIb PON1/PON2 (3:1), VIIIb PON1/PON2/ODN1/ODN2 (1:1:1:1).

Bei Mischungen aus PON1 und PON2 treten leiterförmige Bandenstrukturen bei höheren Molekulargewichten auf. Diese Banden können kettenförmigen Polymerstrukturen unterschiedlicher Länge zugeordnet werden (IIIb–VIIb); nachgewiesen wurden PON-Dimere, -Trimere, -Tetramere und -Pentamere. Die Bande bei ca. 800 bp könnte einer ringförmigen Struktur entsprechen. Eine solche Kettenbildung tritt bei Proben aus PON und komplementärem ODN nicht auf. Das PON1/PON2-Verhältnis hat kaum einen Einfluss auf die Entstehung von Poly-PONs bestimmter Länge, was im symmetrischen Charakter der PONs begründet liegt. Des Weiteren weist eine Mischung aus beiden PONs und beiden ODNs Banden auf, die ODN1-ODN2-Hybriden, PON, PON-ODN-Hybriden und PON-Ketten unterschiedlicher Länge entsprechen (VIIIb). Dies deutet darauf hin, dass der Perylendiimidkern die Hybridisierung der angebotenen ODNs nicht beeinträchtigt. Weiterführende Experimente zeigen, dass die Ionenstärke die Kettenbildung nicht signifikant beeinflusst.

Zusammengefasst haben wir die Synthese von Perylendiimid-Bis(oligonucleotiden) (PONs) und ihre DNA-vermittelte Aggregation zu Polyperylendiimiden beschrieben. Die verwendeten Bausteine waren jeweils mit zwei identischen Sequenzen funktionalisiert und bildeten Strukturen vom Typ ABAB... Prinzipiell könnte eine beliebige Basensequenz als Verkettungselement für den Aufbau polymerer Strukturen verwendet werden, wodurch eine seitenspezifische Positionierung auf festen Oberflächen möglich sein könnte. Mit diesen Merkmalen, und wegen der einstellbaren chromophoren Eigenschaften von Perylenen, könnten diese Perylen-DNA-Hybride Anwendung als molekulare elektronische Bauelemente finden. Der Aufbau von supramolekularen Energietransfersystemen aus elementaren Bausteinen ist in greifbare Nähe gerückt. In diesem Zusammenhang kann Terylendiimid, ein höheres lineares Homologe von Perylendiimid, als Energieacceptor für Perylendiimid fungieren.^[11]

Darüber hinaus konnten wir zeigen, wie durch Verwendung von Detergentien, speziell von kationischen Lipiden, Oligonucleotid-funktionalisierte Farbstoffe in eine in organischen Lösungsmitteln lösliche Form überführt werden können. Die Hybridisierung der PONs wurde in wässriger Lösung vorgenommen und das Produkt in ein organisches Lösungsmittel überführt, was die Möglichkeit eröffnet, DNA-basierte Strukturen mit nicht wasserlöslichen organischen Makromolekülen zu kombinieren.

Eingegangen am 29. Dezember 2003,
veränderte Fassung am 21. April 2004 [Z53621]

Stichwörter: Fluoreszenzspektroskopie · Molekulare Erkennung · Nanostrukturen · Perylendiimide · Selbstorganisation

- d) R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12674–12675.
- [2] K. A. Williams, P. T. M. Veenhuizen, B. G. de la Torre, R. Eritja, C. Dekker, *Nature* **2002**, *420*, 761.
- [3] a) J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631–633; b) Y. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1661–1669; c) J. Shi, D. E. Linkers, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 70–72; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 111–113; d) C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, M. Noyong, U. Simon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 995–999; e) C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Gao, L. F. Chi, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2002**, *20*, 223–230; f) C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933–3937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779–3783; g) C. M. Niemeyer, *Science* **2002**, *297*, 62–63.
- [4] a) S. M. Waybright, C. P. Singleton, J. M. Tour, C. J. Murphy, U. H. F. Bunz, *Organometallics* **2000**, *19*, 368–370; b) S. M. Waybright, C. P. Singleton, K. Wachter, C. J. Murphy, U. H. F. Bunz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1828–1833.
- [5] a) M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3514–3518; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3312–3315; b) L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, *420*, 286–286; c) L. H. Eckardt, K. Nauman, W. M. Pankau, M. Reimold, M. Rein, G. von Kiedrowski, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 609–619.
- [6] a) S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676–1683; b) L. Q. Li, L. M. Davis, *Appl. Opt.* **1995**, *34*, 3208–3217; c) S. Nie, R. N. Zare, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 567–596; d) J. Hofkens, T. Vosh, S. De Feyter, F. C. De Schryver, *Macromol. Symp.* **2002**, *178*, 1–10; e) G. Jung, J. Wiehler, B. Steipe, C. Bräuchle, A. Zumbusch, *ChemPhysChem* **2001**, *2*, 392–396.
- [7] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6264–6268.
- [8] F. Würthner, C. Thalacker, A. Sautter, W. Schärfl, W. Ibach, O. Hollricher, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3871–3886.
- [9] a) D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705–708; b) R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22*, 169–175; c) O. Krichevsky, G. Bonnet, *Rep. Prog. Phys.* **2002**, *65*, 251–297; d) D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Biopolymers* **1974**, *13*, 29–61.
- [10] J. Garcia de la Torre, M. C. Lopez Martinez, M. M. Tirado, *Biopolymers* **1984**, *23*, 611–615.
- [11] G. Schweitzer, R. Gronheid, S. Jordens, M. Lor, G. De Belder, T. Weil, E. Reuther, K. Müllen, F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 3199–3207.

[1] a) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607–609; b) R. Elighanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, *277*, 1078–1081; c) J. J. Storhoff, R. Elighanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959–1964;