

Polyamid-Stützen für DNA-Architekturen**

Thorsten L. Schmidt, Chayan K. Nandi, Goran Rasched, Partha P. Parui, Bernd Brutschy,* Michael Famulok* und Alexander Heckel*

Aufgrund der bestens etablierten Synthese, der gut erforschten Struktureigenschaften und ihrer Größe ist DNA ein interessantes Material für den Aufbau von Nanoarchitekturen nach dem „Bottom-up“-Prinzip, was bereits in zahlreichen Studien belegt wurde.^[1] Es gelang beispielsweise, Würfel,^[1a] Oktaeder,^[2a] Borromäische Ringe^[2b] sowie Röhren^[2c] (Nanodrähte) aus DNA zu konstruieren. Dabei wirkt DNA im Nanometermaßstab nicht nur als Gerüst, sondern auch als Funktionsmaterial, um z. B. Temperaturen^[3a] oder Kräfte^[3b] zu messen. Allerdings ist es schwierig, stabile verzweigte, dreidimensionale Architekturen zu erzeugen, da es sich bei DNA um ein lineares Polymer handelt.^[1a] Verzweigte DNA-Doppelstränge bieten eine mögliche Lösung, erfordern aber den Einsatz komplexer Kachelkonstruktionen zur Bildung stabiler Strukturen.^[4a] Andere Ansätze nutzen synthetische DNA-Derivate, um beispielsweise Trisoligonucleotidyl-Verzweigungen zu erzeugen.^[4b]

Polyamide aus nichtproteinogenen Aminosäuren mit *N*-Methylpyrrol-, *N*-Methylimidazol- oder *N*-Methylhydroxypyrrrol-Einheiten binden als Haarnadelschleife in die kleine Furche doppelsträngiger DNA.^[5] Die Sequenz der beiden antiparallelen Stränge des Polyamids bestimmt dabei, welche DNA-Basensequenz mit hoher Selektivität und Affinität gebunden wird. Es existieren Paarungsregeln für eine direkte molekulare Erkennung der meisten DNA-Sequenzen durch ein spezifisches Polyamid. DNA-bindende Polyamide dieses Typs können für eine Reihe von Anwendungen, z. B. zur Genregulierung^[6a] oder zum sequenzspezifischen Anfärben

von DNA,^[6b] verwendet werden. Da die meisten Bezeichnungen für diese Verbindungsklasse entweder umständlich lang oder ungenau sind, schlagen wir in Anerkennung des großen Beitrags von P. B. Dervan auf diesem Gebiet den allgemeinen Begriff „Dervan-Polyamid“ vor.

In dieser Studie berichten wir über die Verwendung von Dervan-Polyamiden als ein mögliches zweites Strukturelement zum Aufbau von DNA-Architekturen, das orthogonal zur Watson-Crick-Basenpaarung ist. Unser Grundgedanke ist die Herstellung einer DNA-Stütze (DNA strut) durch Verknüpfen zweier Haarnadelpolyamide über einen langen flexiblen Linker. Jede Seite der Stütze lagert sich an einen bestimmten DNA-Doppelstrang an, sodass die Stütze als „sequenzspezifischer Klebstoff“ den Aufbau stabiler komplexer Architekturen erleichtert. Bisher existiert nur ein Beispiel, in dem ein Dervan-Polyamid zwei DNA-Doppelstränge verbindet. Allerdings waren in diesem Fall die beiden Doppelstränge bereits in einem Nucleosom in nächster Nähe zueinander angeordnet.^[7]

Um zu untersuchen, ob Dervan-Polyamide allein in der Lage sind, DNA-Objekte stabil zu verknüpfen, wurde die in Abbildung 1 gezeigte heterobifunktionale Stütze **S-AB** synthetisiert. Sie besteht aus zwei Dervan-Polyamiden, **PA-A** und **PA-B**, die über einen Ethylenglycol-Linker verbunden sind. Details der Synthese und Charakterisierung können den Hintergrundinformationen entnommen werden.

Bei der Untersuchung unserer Hypothese der Verbindung zweier DNA-Doppelstränge durch DNA-Stützen wurden die

[*] Dr. C. K. Nandi, Dr. P. P. Parui, Prof. B. Brutschy

Universität Frankfurt

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Marie-Curie-Straße 11, 60439 Frankfurt (Deutschland)

Fax: (+49) 69-798-29587

E-Mail: brutschy@chemie.uni-frankfurt.de

T. L. Schmidt, G. Rasched, Prof. M. Famulok, Dr. A. Heckel
Universität Bonn

LIMES—Life and Medical Sciences
c/o Kekulé-Institut

Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)

Fax: (+49) 228-73-4809

E-Mail: m.famulok@uni-bonn.de

heckel@uni-bonn.de

[**] Diese Arbeit wurde durch Drittmittel für A.H. und M.F. ermöglicht (SFB 624, „Template – Vom Design chemischer Schablonen zur Reaktionssteuerung“). Die großzügige Förderung der DFG für A.H. im Rahmen des Emmy-Noether-Programmes sei dankend erwähnt. Bei Frau Dr. Marion Ritzl bedanken wir uns für hilfreiche Diskussionen.

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

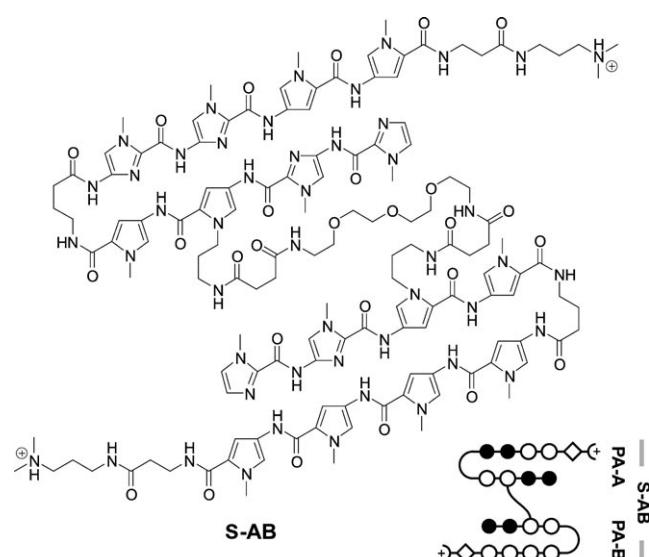


Abbildung 1. Die heterobifunktionale Stütze **S-AB** mit ihren zwei DNA-bindenden Subdomänen **PA-A** und **PA-B**.

in Abbildung 2 gezeigten Haarnadel-DNAs eingesetzt. Die Haarnadeln **H-A** und **H-B** enthalten jeweils passende Bindungsstellen für **PA-A** bzw. **PA-B**. Jede Polyamiddomäne könnte nur mit einer doppelten Fehlpaarung an die jeweils andere DNA binden, und die Haarnadel **H-C** enthält keine Bindungsstelle für die beiden Polyamiddomänen.

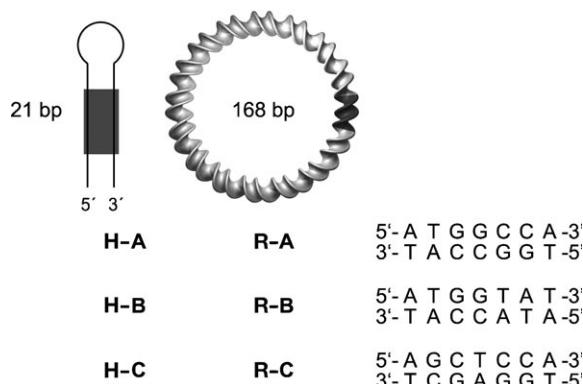


Abbildung 2. Übersicht der DNA-Haarnadeln und DNA-Ringe, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden. Die Positionen der Bindungsstellen sind dunkelgrau markiert, die entsprechenden Sequenzen sind rechts aufgeführt.

Gewöhnlich wird das Bindungsverhalten von Dervan-Polyamiden über „Footprinting“-Methoden untersucht.^[8] Während dieses etablierte Verfahren effizient ist, um die Bindung in binären Polyamid/DNA-Komplexen zu studieren, ist es zum Nachweis von ternären Komplexen, wie den hier betrachteten Komplexen aus zwei DNA-Doppelsträngen und der Stütze **S-AB**, ungeeignet. Daher wurde auf die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FKS) als Analysenmethode zurückgegriffen.^[9]

Bei diesem Verfahren werden zwei Wechselwirkungspartner mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Gemessen werden die zeitaufgelösten Fluoreszenzfluktuationen innerhalb eines sehr kleinen fokalen Volumenelements (ca. 1 fL), erzeugt und begrenzt durch zwei Laserstrahlen, die auf die beiden Fluoreszenzmarker abgestimmt sind. Um nur wenige Moleküle zu detektieren, werden Konzentrationen im nanomolaren Bereich verwendet. Die zeitaufgelöste Fluoreszenz eines jeden Fluorophors wird separat ermittelt. Die aufgenommenen Intensitätsfluktuationen werden durch die Korrelationshardware verarbeitet und die resultierenden Autokorrelations- und Kreuzkorrelationskurven analysiert.

Daraus erhält man Informationen über die Diffusionskoeffizienten und die Konzentrationen der fluoreszierenden Moleküle in der Lösung. Bilden zwei markierte Wechselwirkungspartner einen Komplex, so entsteht eine neue fluoreszierende Spezies, die mit zwei Farbstoffen versehen ist. Auf diese Weise können die Konzentrationen der beiden fluoreszierenden Spezies und ihres doppelt markierten Reaktionsproduktes parallel bestimmt werden, ohne dass man sie voneinander trennen muss.

Ausgehend von der Konzentration der freien und gebundenen Reaktionspartner kann der K_D -Wert berechnet werden. (Details dieser Analysenmethode wurden an anderer

Stelle beschrieben;^[9c] zu experimentellen Details siehe die Hintergrundinformationen.) Zuerst wurden die Dissoziationskonstanten von Komplexen aus den einzelnen Dervan-Polyamiden **PA-A** und **PA-B** und den drei DNA-Haarnadeln mit FKS bestimmt (Tabelle 1). Dabei bindet **PA-A** hoch

Tabelle 1: Durch FKS ermittelte Dissoziationskonstanten K_D von DNA-Komplexen.

Cy5 ^[a]	RG ^[b]	unmarkiert	K_D [nM] ^[c]	Bemerkung
H-A	PA-A	–	5 ± 1	Paarung
H-A	PA-B	–	n.d.	Fehlpaarung
H-B	PA-A	–	n.d.	Fehlpaarung
H-B	PA-B	–	2 ± 1	Paarung
H-C	PA-A	–	n.d.	Fehlpaarung
H-C	PA-B	–	n.d.	Fehlpaarung
H-A	H-B	S-AB	20 ± 5	Paarung
H-C	H-B	S-AB	n.d.	Fehlpaarung
H-A	H-B	–	n.d.	–
R-A	R-B	S-AB	30 ± 5	Paarung
R-C	R-B	S-AB	n.d.	Fehlpaarung
R-A	R-B	–	n.d.	–

[a] Dieser Wechselwirkungspartner ist mit Cy5 markiert [b] Dieser Wechselwirkungspartner ist mit Rhodamingrün markiert. [c] n.d. = nicht detektiert.

spezifisch an **H-A**, und **PA-B** in gleicher Weise an **H-B**, da sie jeweils über passende Bindungsstellen verfügen. Alle anderen Kombinationen weisen wenigstens doppelte Fehlpaarungen auf, und wie erwartet wurde durch FKS keine Bindung detektiert. Die K_D -Werte der Bindungsergebnisse im unteren nanomolaren Bereich sind im Einklang mit den Werten für lineare DNA-Doppelstränge und **PA-A** respektive **PA-B**.^[10,11]

Um zur Konstruktion komplexer dreidimensionaler Architekturen beizutragen, müssen die DNA-Stützen in der Lage sein, zwei DNA-Doppelstränge stabil zu verbinden. Zum Nachweis wurde die Stütze **S-AB** mit den fluorophor-markierten Haarnadeln **H-A** und **H-B**, welche die passenden Bindungsstellen enthalten, zusammengegeben, und der erwartete ternäre Komplex konnte eindeutig detektiert werden (Tabelle 1). Der wichtige Beweis, dass die Sequenzspezifität der Polyamiddomänen erhalten bleibt, wurde dadurch erbracht, dass keine Bindung detektiert wurde, wenn **H-A** durch **H-C** – ohne passende Bindungsstelle für die Polyamiddomänen von **S-AB** – ersetzt wird, was somit das gleiche Ergebnis liefert wie das Negativ-Kontrollexperiment ohne **S-AB**.

Nach diesen ermutigenden Resultaten sollte das Konzept auf größere DNA-Objekte erweitert werden. Dazu wurden DNA-Ringe aus 168 Basenpaaren mit einer Masse von 104 kDa synthetisiert. Jeder Ring besteht aus drei gleich langen synthetischen DNA-Segmenten, die in einer Eintopfreaktion zugänglich sind, was die einfache Herstellung unterschiedlicher Ringe ermöglicht. Der Ringschluss gelang durch das Einführen von Poly-A-Sequenzen, die eine Krümmung der DNA bewirken^[12] (siehe die Hintergrundinformationen). Nichtzirkuläre DNA wurde durch die Behandlung mit Exonuclease entfernt. Bei der Ligation wurde eine Sequenz intern fluoreszenzmarkiert, um FKS-Messungen zu

ermöglichen. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der FKS-Messungen der DNA-Ringe mit **S-AB**, und in Abbildung 3 ist der zeitliche Verlauf der Kreuzkorrelationsfunktion wiedergegeben. Diese Resultate bestätigen wiederum eindeutig die spezifische Bildung eines ternären Komplexes zwischen den Ringen **R-A** und **R-B** und **S-AB**, nicht aber mit **R-C**, der keine passende Bindungsstelle enthält. Ohne **S-AB** bilden **R-A** und **R-B** keinen Komplex!

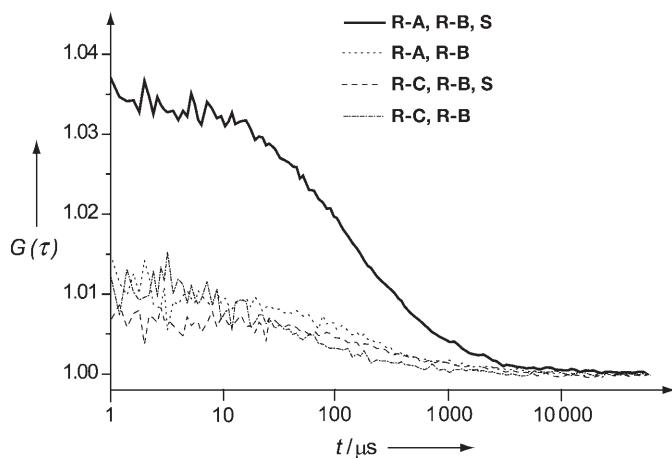


Abbildung 3. Durch FKS-Messungen erhaltene zeitliche Verläufe der Kreuzkorrelationsfunktionen der angegebenen Wechselwirkungspartner.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das heterobifunktionale Dervan-Polyamid **S-AB** sequenzspezifisch und hoch affin bindet und somit zum kontrollierten Aufbau von DNA-Architekturen dienen kann. Bedenkt man die Tatsache, dass **S-AB** im Falle der Ringe **R-A** und **R-B** mit nur 1 % zu der absoluten Masse des ternären Komplexes beiträgt, ist die hohe Affinität, mit der die beiden Ringe zusammengehalten werden, recht beeindruckend. Auch die Sequenzspezifität ist bemerkenswert, da **S-AB** zuverlässig zwischen zwei 100 kDa schweren DNA-Objekten, **R-A** und **R-C**, differenziert, die sich lediglich um drei Basenpaare unterscheiden. Mit diesen Eigenschaften ist das Ziel des einfachen Aufbaus stabiler Strukturen aus kleineren DNA-Objekten, die durch mehrere Stützen zusammengehalten werden, in greifbare Nähe gerückt.

Eingegangen am 2. Februar 2007
Online veröffentlicht am 25. April 2007

Stichwörter: Dervan-Polyamide · DNA-Erkennung · Nanostrukturen

- [1] a) N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431; b) U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856–1876.
- [2] a) W. M. Smith, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618–621; b) C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *Nature* **1997**, *386*, 137–138; c) D. Liu, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 717–722.
- [3] a) R. Tashiro, H. Sugiyama, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6200–6202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 6018–6020; b) C. Albrecht, K. Blank, M. Lalic-Mülthaler, S. Hirler, T. Mai, I. Gilbert, S. Schiffmann, T. Bayer, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, *Science* **2003**, *301*, 367–370.
- [4] a) T. Fu, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3211–3220; b) G. von Kiedrowski, L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Reimold, M. Rein, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 609–619.
- [5] P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215–2235.
- [6] a) P. B. Dervan, A. T. Poulin-Kerstien, E. J. Fechter, B. S. Edelson, *Top. Curr. Chem.* **2005**, *253*, 1–31; b) V. C. Rucker, S. Foister, C. M. Melander, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1195–1202.
- [7] a) R. S. Edayathumangalam, P. Weyermann, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, K. Luger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6864–6869; b) R. S. Edayathumangalam, P. Weyermann, P. B. Dervan, J. M. Gottesfeld, K. Luger, *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 103–114.
- [8] J. W. Trauger, P. B. Dervan, *Methods Enzymol.* **2001**, *340*, 450–466.
- [9] a) A. Koltermann, U. Kettling, J. Bieschke, T. Winkler, M. Eigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1421–1426; b) P. Schwille, J. Bieschke, F. Oehlenschläger, *Biophys. Chem.* **1997**, *66*, 211–228; c) Application Manual, *LSM 510—Confocor 2 Fluorescence-Correlation Spectroscopy*, Carl Zeiss, Jena.
- [10] Für das unmarkierte **PA-A** und die zugehörige Bindungsstelle wurde ein K_D -Wert von 0.1 nm bestimmt (analog 0.2 nm für **PA-B**),^[11] und es ist bekannt, dass der K_D -Wert nach Konjugation mit einem Fluorophor ungefähr um eine Größenordnung höher ist.
- [11] S. E. Swalley, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6953–6961.
- [12] a) D. MacDonald, K. Herbert, X. Zhang, T. Polgruto, P. Lu, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 1081–1098; b) L. Ulanovsky, M. Bodner, E. N. Trifonov, M. Choder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 862–866.