

Ein durch Wasserstoffbrücken und Metallionenbindung vermitteltes, künstliches Basenpaar**

Fabian-Alexander Polonius und Jens Müller*

In den vergangenen Jahren wurde über zahlreiche Nucleinsäuren berichtet, bei denen künstliche Nucleobasen neuartige Basenpaarungsmuster bilden. Viele dieser Basenpaare beruhen nicht auf der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Nucleobasen, ihre Stabilisierung erfolgt vielmehr durch Einbindung eines Metallions in das Basenpaar.^[1–6] Kürzlich erschienene Arbeiten berichten von Nucleinsäuren mit bis zu zehn aufeinander folgenden metallionenvermittelten Basenpaaren.^[1a,d] Selbst die definierte Anordnung von zwei unterschiedlichen Metallionen ist möglich.^[1a] Der Einbau von Metallionen in Oligonucleotide kann zu interessanten chemischen und physikalischen Eigenschaften führen und sie so für Anwendungen als molekulare Drähte in selbstorganisierten elektronischen Schaltkreisen interessant machen.^[7] Die künstliche Nucleobase fungiert typischerweise als zwei- oder dreizähniger Ligand, was zu einer großen thermischen Stabilisierung der DNA-Doppelhelix in Gegenwart geeigneter Metallionen führt. Mit der Stabilitätszunahme des Basenpaars geht möglicherweise eine Abnahme der Fähigkeit der DNA-Stränge zur reversiblen Selbstorganisation einher.^[7c] Es ist daher wünschenswert, ein Basenpaar zu entwickeln, das nur geringfügig stabiler ist als ein natürliches Paar, das aber dennoch ein Metallion enthält.

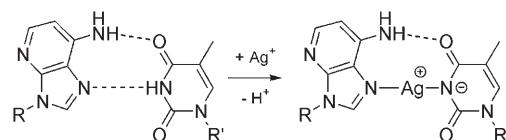
Wir berichten hier über ein Basenpaar, das über Wasserstoffbrücken und Metallionenbindung vermittelt wird. Dieser Ansatz verbindet die zuverlässige Selbsterkennung komplementärer Strände über Wasserstoffbrücken mit einer erhöhten Stabilität durch die Bildung koordinativer Bindungen.^[8] Zu diesem Zweck wählten wir Thymin (T) und das künstliche 1-Desazaadenin (D) als komplementäre Basen. Wegen der Substitution der N1-Position des Adenins durch eine CH-Einheit kann kein Watson-Crick-Basenpaar zwischen D und T gebildet werden. Stattdessen war bereits gezeigt worden, dass d(T₂₀) und d(D₂₀) über die Hoogsteen-Seite von 1-Desazaadenin assoziieren und so eine Doppelhelix bilden.^[10]

[*] Dr. F.-A. Polonius, Dr. J. Müller
Fachbereich Chemie, Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-3797
E-Mail: jens.mueller@uni-dortmund.de
Homepage: <http://www.muellerlab.org/>

[**] Wir danken der DFG (J.M.; Emmy-Noether-Programm), dem FCI und dem Fachbereich Chemie der Universität Dortmund für finanzielle Unterstützung sowie T. van der Wijst für die Durchführung der DFT-Rechnungen. J.M. dankt Prof. Dr. Bernhard Lippert für seine stetige Unterstützung.

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

Unsere Idee war der Austausch des Amidprotons des Thymins durch ein Metallion (Schema 1). Es ist nicht zu erwarten, dass ein solcher Austausch zur Störung der verbleibenden



Schema 1. Vorgeschlagene Bildung eines durch Ag⁺ und durch eine Wasserstoffbrücke vermittelten Basenpaares (R, R' = 2'-Desoxyribose eines DNA-Rückgrats).

Wasserstoffbrücke führt. Im verwandten Komplex *trans*-[Pt(NH₃)₂(9-MeA-N7)(1-MeT-N3)]⁺, bestehend aus 9-Methyladenin (9-MeA) und 1-Methylthymin (1-MeTH), wird eben diese Wasserstoffbrücke noch beobachtet.^[11] Die mit DFT-Methoden durchgeführte Geometrieoptimierung eines Systems aus 9-Methyl-1-desazaadenin, 1-Methylthyminat und Ag⁺ deutet auf die Bildung der Wasserstoffbrücke auch in unserem System hin (siehe Hintergrundinformationen). In unseren Experimenten wurden Ag⁺-Ionen verwendet, weil diese eine lineare Koordinationsgeometrie bevorzugen und mit Stickstoffdonorliganden stabile Komplexe bilden. Des Weiteren sind mehrere Beispiele von Ag⁺ enthaltenden Koordinationsverbindungen mit kleinen Metall-Metall-Abständen bekannt, die auf stabilisierende argentophile Wechselwirkungen zurückzuführen sind.^[12] Diese Abstände entsprechen dem Abstand zwischen benachbarten Basenpaaren der DNA.

Erste Experimente mit einem äquimolaren Gemisch der Oligonucleotide d(ADADADADA) und d(T₉)^[13] lieferten vielversprechende Ergebnisse: In Abwesenheit von Ag⁺ zeigt die temperaturabhängige Auftragung der Absorption bei 260 nm kein kooperatives Schmelzverhalten. Nach der Zugabe von Ag⁺ hingegen werden deutliche Schmelzkurven mit einer Schmelztemperatur *T_m* von 18°C erhalten (Hintergrundinformationen). Das Aussehen der Schmelzkurven ändert sich, bis etwa ein Äquivalent Ag⁺ vorhanden ist, d.h., bis sämtliche D-T-Basenpaare durch Ag⁺-Ionen vermittelt werden.^[14] Die individuellen Einzelstränge zeigen unter identischen Bedingungen kein kooperatives Schmelzverhalten. Interessanterweise scheinen die Ag⁺-Ionen nicht in A-T, sondern ausschließlich in D-T-Basenpaare eingebaut zu werden. Die relativ geringe Schmelztemperatur dieses Systems erschwert jedoch eine aussagekräftige Charakterisierung. Wir haben daher für weitere Untersuchungen den aus d(D₁₉A) und d(T₂₀) gebildeten, stabileren Duplex gewählt. Auch hier konnte in Abwesenheit von Ag⁺ kein kooperatives

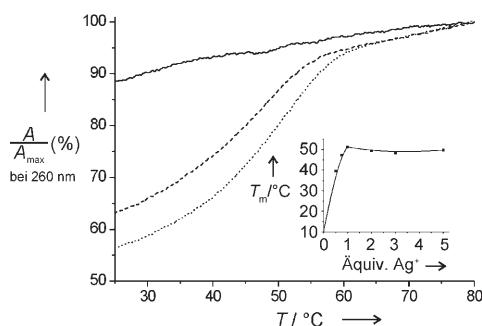


Abbildung 1. Schmelzverhalten von $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ in Abwesenheit (—) und Gegenwart unterschiedlicher Mengen an AgNO_3 (----: 0.75 Äquiv.,: 1 Äquiv.). Die Hyperchromie ändert sich bei Zugabe von 1 Äquiv. Ag^+ von 11% auf 44%. Messbedingungen: 1 μM $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$, 1 M NaClO_4 , 5 mM MOPS-Puffer (pH 6.8). Einschub: Schmelzpunkte von $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ in Gegenwart unterschiedlicher Mengen AgNO_3 ; der Schmelzpunkt in Abwesenheit von Ag^+ ist nach Lit. [10] abgeschätzt.

Schmelzverhalten beobachtet werden (Abbildung 1). Frühere Untersuchungen mit $d(D_{20}) \cdot d(T_{20})$ hatten eine Schmelztemperatur T_m von 15°C ergeben.^[10] Jedoch wurden dort höhere Salz- und Oligonucleotidkonzentrationen verwendet,^[15] sodass für das System $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ unter den hier gewählten Bedingungen eine Schmelztemperatur T_m unterhalb von 15°C nicht unerwartet ist. Bei Zugabe steigender Mengen AgNO_3 lassen sich deutliche Schmelzkurven beobachten. Die Schmelztemperatur steigt bis zum Vorliegen von einem Äquivalent Ag^+ stetig an. Hier erreicht T_m einen Wert von 51.2°C, was einem Anstieg von mehr als 36 K entspricht, bzw. etwa 2 K pro Basenpaar. Ein Überschuss an Ag^+ führt zu keiner weiteren Stabilisierung (Abbildung 1). Offensichtlich erreicht der Duplex seine maximale Stabilität bei dem stöchiometrischen Verhältnis, bei dem jedes Amidproton durch ein Ag^+ substituiert werden kann. Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich das UV-Spektrum von $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ so lange ändert, bis ein Äquivalent Ag^+ vorhanden ist (Abbildung 2). Ein Überschuss an Ag^+ führt zu keinen weiteren Änderungen. Die Änderung in gerade diesem Bereich des UV-Spektrums nach Zugabe von Ag^+ belegt eindeutig, dass das Metallion an die Nucleobase

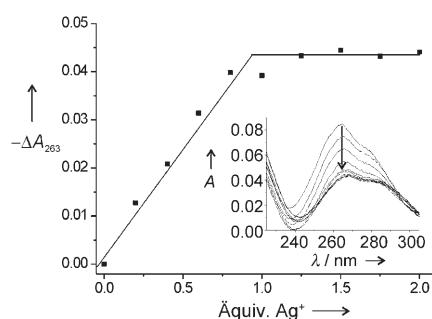


Abbildung 2. Änderung der UV-Absorption von $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ bei 263 nm bei Zugabe von AgNO_3 . Einschub: UV-Spektrum von $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ mit unterschiedlichen Mengen AgNO_3 . Der Pfeil gibt die Richtung der Änderung an.

koordiniert und dass nicht ein Binden an das Rückgrat zum Anstieg von T_m führt.

In einer Reihe von Kontrollexperimenten wurde das Schmelzverhalten der individuellen Einzelstränge untersucht (Hintergrundinformationen). Der Purinstrang zeigt unabhängig von der Ag^+ -Konzentration keinerlei kooperatives Schmelzverhalten. Der Pyrimidinstrang hingegen bildet in Gegenwart von Ag^+ reversibel einige hoch schmelzende Spezies. Da bekannt ist, dass Thymin Quecksilber(II)-vermittelte Homobasenpaare bildet,^[6] führen wir diese Beobachtung auf die Bildung analoger Silber(I)-vermittelter Basenpaare zurück. Die für $d(T_{20})$ ermittelten Schmelzpunkte stimmen nicht mit denen des $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ -Systems überein, und ebensowenig pendelt T_m beim Erreichen einer gewissen Ag^+ -Konzentration auf einen bestimmten Wert ein. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die bei Zugabe von Ag^+ zu $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ gebildete, wohldefinierte Spezies nicht mit denen übereinstimmt, die sich ausschließlich aus $d(T_{20})$ und Ag^+ bilden.

Um einen Einblick in die Konformation des Duplex $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ zu bekommen, wurden CD-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Das CD-Spektrum von $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ unterscheidet sich deutlich von der Summe der CD-Spektren seiner Komponenten $d(D_{19}A)$ und $d(T_{20})$ (Abbildung 3). Dies belegt, dass unter den Bedingungen der

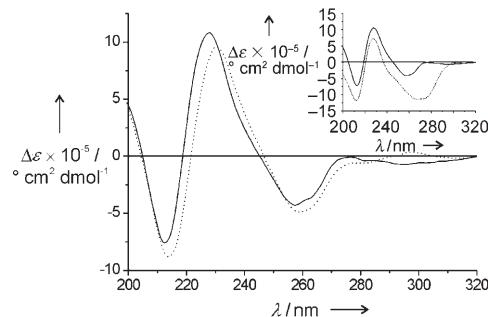


Abbildung 3. CD-Spektren von $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ in Abwesenheit (—) und Gegenwart von 1 Äquiv. AgNO_3 (.....). Einschub: CD-Spektrum von $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$ (—) und Summe der CD-Spektren der individuellen Stränge $d(D_{19}A)$ und $d(T_{20})$ (.....). Messbedingungen: 3 μM $d(D_{19}A) \cdot d(T_{20})$, 1 M NaClO_4 , 5 mM MOPS-Puffer (pH 6.8), 25°C.

CD-Experimente (dreifache Oligonucleotidkonzentration gegenüber den UV-Denaturierungsexperimenten) der Duplex bei Raumtemperatur stabil ist.^[16] Die Zugabe des ersten Äquivalents AgNO_3 führt zu geringen, aber signifikanten Änderungen im CD-Spektrum (Abbildung 3). Die Minima bei 213 und 256 nm sowie das Maximum bei 226 nm erfahren eine bathochrome Verschiebung um etwa 3 nm. Des Weiteren kommt es zur Ausbildung eines breiten Minimums bei 299 nm. Dieser Bereich des CD-Spektrums wird vorwiegend durch die Basenpaare und Wechselwirkungen zwischen den Strängen beeinflusst.^[17] Dies deutet auf eine geringfügige strukturelle Änderung innerhalb des Duplex hin, wie etwa die Substitution eines Protons durch Ag^+ . Das Szenario wird durch die Tatsache gestützt, dass sich das Gesamtbild des CD-Spektrums kaum ändert, weil eine Substitution von H^+ durch

Ag^+ keine größeren Konformationsänderungen bewirken sollte. Zugabe eines Überschusses an Ag^+ zu $d(\text{D}_{19}\text{A})\cdot d(\text{T}_{20})$ führt zu keinen weiteren spektroskopischen Veränderungen (Hintergrundinformationen). Diese Beobachtung ist ebenfalls ein starkes Indiz für das spezifische Binden von einem Ag^+ pro Basenpaar.

Interessanterweise überlagern sich die während der Schmelzexperimente aufgenommenen De- und Renaturierungsprofile bis zu einem Äquivalent AgNO_3 , wohingegen die aus den Renaturierungsprofilen ermittelten Schmelztemperaturen bei einem Überschuss an Ag^+ -Ionen reproduzierbar höher sind (Hintergrundinformationen). Wir führen dies auf die kinetisch bevorzugte Bildung einer intermediären Haarnadelstruktur von $d(\text{T}_{20})$ mit metallvermittelten $\text{T}\cdots\text{Ag}^+\cdots\text{T}$ -Basenpaaren zurück, die durch langsames Abkühlen von $d(\text{D}_{19}\text{A})$, $d(\text{T}_{20})$ und Ag^+ gebildet wird, im Einklang mit der Bildung solcher Basenpaare ausschließlich aus $d(\text{T}_{20})$ und Ag^+ (siehe oben). Diese Annahme stimmt mit der lang bekannten Tatsache überein, dass Ag^+ in der Lage ist, Uridin und Poly(U) sogar unter leicht sauren Bedingungen zu deprotonieren.^[18,19] Diese Haarnadelstrukturen dissoziieren anschließend wieder bei tieferen Temperaturen unter Bildung des Hetero-Duplex $d(\text{D}_{19}\text{A})\cdot d(\text{T}_{20})\cdot\text{Ag}^+$, wie aus der Ähnlichkeit der CD-Spektren von $d(\text{D}_{19}\text{A})\cdot d(\text{T}_{20})$ in Gegenwart und Abwesenheit von Ag^+ ersichtlich ist.

Wir haben hier Beweise präsentiert für die Bildung metallvermittelter Basenpaare, die zusätzlich eine Wasserstoffbrücke enthalten. Das spezifische Binden von einem Ag^+ pro Basenpaar führt zur Bildung von $d(\text{D}_{19}\text{A})\cdot d(\text{T}_{20})\cdot\text{Ag}^+$, begleitet von einem Anstieg der Schmelztemperatur um über 36 K. Basenpaare dieser Art vereinen die zuverlässige Selbsterkennung komplementärer Stränge durch Wasserstoffbrücken mit der erhöhten Stabilität koordinativer Bindungen. Die entsprechenden Oligonucleotide erweitern somit das Repertoire von Strukturelementen zum Aufbau von DNA-Strukturen in der DNA-Nanotechnologie.

Experimentelles

Das für die automatisierte DNA-Synthese benötigte Derivat von 1-Desaza-2'-desoxyadenosin wurde wie in der Literatur beschrieben synthetisiert.^[10] Die 1-Desaza-2'-desoxyadenosin enthaltenden Oligonucleotide wurden an einem Synthesizer Beckman Oligo 1000 M synthetisiert, mit HPLC auf einer Nucleogen-60-7-DEAE-Säule aufgereinigt und über NAP-10-Säulen entsalzt. Ihre Identität wurde mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt ($d(\text{ADADADA-DA})$: ber. für $[M+\text{H}]^+$: 2754, gef.: 2756; $d(\text{D}_{19}\text{A})$: ber. für $[M+\text{H}]^+$: 6184; gef.: 6191). Die Oligonucleotide $d(\text{T}_{20})$ und $d(\text{T}_9)$ wurden von Eurogentec bezogen. Die aufgeführten Schmelztemperaturen T_m entsprechen der Lage der Maxima der ersten Ableitungen der Schmelzkurven.

Eingegangen am 23. Januar 2007,
veränderte Fassung am 2. Mai 2007
Online veröffentlicht am 22. Juni 2007

Stichwörter: Bioanorganische Chemie · DNA · Hoogsteen-Paare · Nucleobasen · Wasserstoffbrücken

- [1] a) K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 190–194; b) K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, *299*, 1212–1213; c) K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12494–12498; d) G. H. Clever, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 254–257; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 250–253; e) G. H. Clever, Y. Söltl, H. Burks, W. Spahl, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8708–8718.
- [2] a) L. Zhang, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 74–75; b) N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 13–25; c) N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13684–13685; d) S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12364–12367; e) E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715.
- [3] a) H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375–3376; b) C. Brotschi, C. J. Leumann, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1195–1197; c) C. Switzer, S. Sinha, P. H. Kim, B. D. Heuberger, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1553–1556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1529–1532.
- [4] a) R. M. Franzini, R. M. Watson, G. K. Patra, R. M. Breece, D. L. Tierney, M. P. Hendrich, C. Achim, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9798–9811; b) R. M. Watson, Y. A. Skorik, G. K. Patra, C. Achim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14628–14639; c) A. Küsel, J. Zhang, M. Alvariño Gil, A. C. Stückl, W. Meyer-Klaucke, F. Meyer, U. Diedrichsen, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 4317–4324; d) B. P. Gilmartin, K. Ohr, R. L. McLaughlin, R. Koerner, M. E. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9546–9555.
- [5] a) J. Müller, D. Böhme, N. Düpre, M. Mehring, F.-A. Polonius, *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 470–476; b) J. Müller, D. Böhme, P. Lax, M. Morell Cerdà, M. Roitzsch, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6246–6253; c) J. Müller, F.-A. Polonius, M. Roitzsch, *Inorg. Chim. Acta* **2005**, *358*, 1225–1230.
- [6] a) Y. Tanaka, S. Oda, H. Yamaguchi, Y. Kondo, C. Kojima, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 244–245; b) Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, T. Machinami, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2172–2173; c) A. Ono, H. Togashi, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4400–4402; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4300–4302.
- [7] a) M. Shionoya, K. Tanaka, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 592–597; b) T. Carell, C. Behrens, J. Gierlich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2221–2228; c) J. Müller, *Nature* **2006**, *444*, 698.
- [8] Ein ähnliches Basenpaarungsmuster wurde für die M-DNA vorgeschlagen, eine DNA-Konformation, die bei erhöhtem pH-Wert in Gegenwart geeigneter Metallionen gebildet wird.^[9a] Die genaue Struktur von M-DNA ist jedoch umstritten.^[9b]
- [9] a) P. Aich, S. L. Labiu, L. W. Tari, L. J. T. Delbaere, W. J. Roesler, K. J. Falk, R. P. Steer, J. S. Lee, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 477–485; b) M. Fuentes-Cabrera, B. G. Sumpter, J. E. Šponer, J. Šponer, L. Petit, J. C. Wells, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 870–879.
- [10] F. Seela, T. Wenzel, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1485–1499.
- [11] R. K. O. Sigel, S. M. Thompson, E. Freisinger, F. Glahé, B. Lipper, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1968–1980.
- [12] M. A. Rawashdeh-Omary, M. A. Omary, H. H. Patterson, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10371–10380.
- [13] Für die Bildung eines Hoogsteen-Basenpaares zwischen Guanin und Cytosin ist ein niedriger pH-Wert nötig, um die Protonierung von Cytosin zu gewährleisten. Da ein niedriger pH-Wert die Deprotonierung von Thymidin erschwert, welche Voraussetzung für die Substitution des Amidprotons durch ein Metallion ist, werden hier nur Oligonucleotide mit Adenin, 1-Desazaadenin und Thymin diskutiert.

- [14] 1 Äquivalent Ag^+ entspricht einem Ag^+ pro D-T-Basenpaar.
- [15] Wir konnten die Bedingungen der Originalmessungen nicht anwenden, weil der dort verwendete Puffer nicht mit Silber(I) kompatibel ist.
- [16] Das CD-Spektrum von $d(\text{D}_{19}\text{A})\cdot d(\text{T}_{20})$ in Gegenwart von 3 Äquiv. Ag^+ wurde bei 25°C und 10°C aufgenommen. Die Tatsache, dass beide Spektren identisch sind (Hintergrundinformationen), belegt, dass ein Abkühlen der Probe auf unter 25°C keine strukturellen Änderungen induziert.
-
- [17] D. M. Gray, R. L. Ratliff, M. R. Vaughan, *Methods Enzymol.* **1992**, *211*, 389–406.
- [18] G. L. Eichhorn, J. J. Butzow, P. Clark, E. Tarien, *Biopolymers* **1967**, *5*, 283–296.
- [19] Das Absinken des pH-Werts nach Zugabe von 1 Äquivalent Ag^+ zu einer ungepufferten Lösung von $d(\text{T}_{20})$ zeigt, dass dies auch für $d(\text{T}_{20})$ gilt.