

Nucleinsäurebinder, die durch Licht wählbarer Wellenlänge aktiviert werden können**

Alexandru Rotaru und Andriy Mokhir*

In der Zelle binden Oligonukleotide und deren Analoga so an natürliche RNA, dass – in einigen Fällen – eine RNase-H-katalysierte Spaltung folgt. Dieser Prozess („antisense effect“) beeinflusst die Genexpression, z.B. durch Inhibition der mRNA-Reifung oder -Translation. Ein alternativer indirekter Mechanismus sieht die Bindung und Blockierung von MikroRNAs vor, die natürliche Regulatoren der Genexpression sind.^[1] Antisense-Oligonukleotide werden in der Biologie zur Bestimmung von Genfunktionen und in der Medizin zur Unterdrückung von Krankheitsgenen verwendet.

Photoaktivierbare („caged“) Oligonukleotide sind chemisch modifizierte Verbindungen, die RNA nur mäßig binden, bis sie durch Licht aktiviert werden.^[2] Sie können zur örtlichen oder zeitlichen Photoregulation der Genexpression angewendet werden. Über viele Syntheseansätze für photoaktivierbare Antisense-DNAs wurde bereits berichtet.^[2] Komiyama und Mitarbeiter bauten beispielsweise einige nicht-natürliche Fragmente mit *trans*-Azobenzol-Einheiten mitten in DNA-Strände ein.^[3] Diese Konjugate binden fest an Antisense-DNAs und deaktivieren diese. Bei Bestrahlung mit UV-Licht isomerisieren die *trans*-Azobenzol-Gruppen zu den Duplex-destabilisierenden *cis*-Derivaten; daraus resultiert die Freisetzung und Reaktivierung der Antisense-DNAs. Tang und Dmochowski ersetzten ein Nukleotid in der Schleife einer Haarnadel-DNA durch einen Carbamat-Linker. Diese photoaktivierbare DNA fördert die RNase-H-katalysierte Hydrolyse komplementärer RNAs erst, wenn der Linker durch UV-Licht gespalten wird.^[4] Kürzlich wurde über weitere Rückgrat-Modifikationen berichtet, die durch UV-Licht zu spalten sind.^[2] Photoaktivierbare DNAs wurden auch durch Modifizieren der Phosphodiestergruppen^[5] und Nukleobasen^[6] erhalten.

Die Photoaktivierung von Antisense-DNAs in Zellen gelang bisher nicht, doch biologische Effekte für entsprechende mRNAs, Plasmide und siRNAs (small interfering RNAs) konnten bereits nachgewiesen werden. Beispielsweise findet bei mRNA-codiertem Gfp, das mit 6-Brom-7-hydroxycumarinen konjugiert ist, bei Zebrafischembryos im Dun-

keln eine schwache Translation statt. Bei Anregung durch Licht (350–365 nm) werden die chemischen Modifikationen abgespalten, und die natürliche mRNA wird gebildet. Die Translation der resultierenden mRNA ist deutlich stärker ausgeprägt, was durch erhöhte Gfp-Konzentrationen verdeutlicht wird.^[7] In einer weiteren Untersuchung wurde Plasmid-codiertes Gfp mit (4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)diacazomethan modifiziert. Das photoaktivierbare Plasmid zeigt im Dunkeln 25.8 % der Expression des natürlichen Plasmids in HeLa-Zellen. Durch Bestrahlung mit Licht (355 nm) erhöht sich die Expression um 50 % gegenüber der Kontrollsubstanz.^[8] Friedman und Mitarbeiter nutzten eine ähnliche Strategie, um photoaktivierbare siRNA zu erhalten.^[9] In praktisch allen bekannten Beispielen dient UV-Licht zur Aktivierung,^[2] doch Licht dieser Wellenlänge wird durch Zellkomponenten stark absorbiert und schädigt die Zellen.^[10] UV-Licht selbst kann die Genexpression beeinflussen: Haselton und Mitarbeiter haben herausgefunden, dass UV-Licht ($> 0.5 \text{ J cm}^{-2}$) die Expression von pEGFP-C1-Plasmiden in HeLa-Zellen inhibiert.^[8] Dies schränkt die Anwendungsmöglichkeiten von photoaktivierbaren Antisense-Reagentien ein.

Hier beschreiben wir DNAs, die durch Licht eines frei wählbaren Wellenlängenbereichs aktiviert werden können, Rotlicht eingeschlossen. Rotlicht ist deutlich weniger schädlich als UV-Licht und kann tief in Gewebe eindringen.^[11] Unser Konzept der photoaktivierbaren Oligonukleotide ist in Schema 1 dargestellt.

Die photoaktivierbare DNA **I** bindet nicht an einsträngige Nucleinsäuren, die zu ihrer Erkennungssequenz (grau) komplementär sind, da letztere durch einen kurzen DNA-Strang (schwarz) blockiert ist. Die Schleife von **I** enthält eine elektronenreiche C=C-Bindung. Bei der Einstrahlung von Licht in Gegenwart eines Photosensibilisators (PS) wird Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gebildet,^[12] der die Spaltung der C=C-Bindung induziert und so zur Bildung des intermolekularen DNA-Duplex **II·III** führt. Dieser Duplex ist wesentlich weniger stabil als die anfangs vorliegende Haarnadelstruktur. Der Strang **II** kann gegen komplementäre DNA (oder RNA) ausgetauscht werden; dabei bildet sich über die gesamte Länge der Duplex **III·c_DNA** (bzw. **III·c_RNA**). Folglich wird der Hybridisierungsprozess durch Licht ausgelöst.

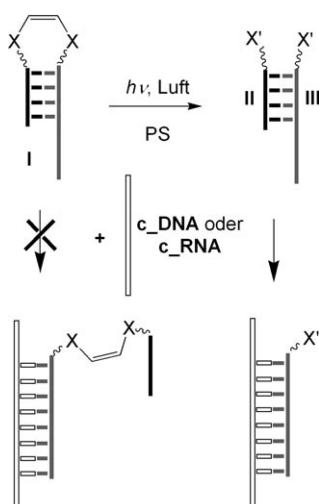
Zur Modifizierung wählten wir die SCH=CHS-Gruppe, da Breslow und Mitarbeiter berichtet hatten, dass die C=C-Bindung in diesem Fragment durch Singulett-Sauerstoff in wässriger Lösung schnell und glatt gespalten wird.^[13]

Die SCH=CHS enthaltende DNA (**I**, Schema 2) wurde durch Standardfestphasensynthese hergestellt. Bis auf das Phosphoramidit **3**, das in einer dreistufigen Synthese erhalten wurde, waren alle Ausgangsmaterialien käuflich zu erwerben.

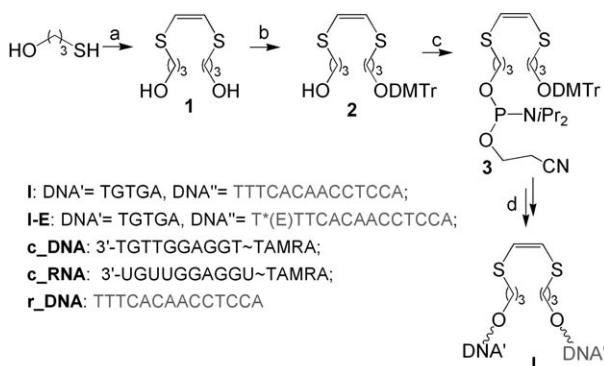
[*] Dr. A. Rotaru, Dr. A. Mokhir
Anorganisch-Chemisches Institut
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 270, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-548-439
E-Mail: andriy.mokhir@urz.uni-heidelberg.de

[**] Wir danken der Ruprecht-Karls-Universität für die finanzielle Unterstützung und Claudia Dienemann für die technische Unterstützung bei den DNA-Synthesen.

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



Schema 1. Das Konzept eines Antisense-Reagens (**I**), das durch Licht einer beliebigen Wellenlänge aktiviert werden kann. PS – Photosensibilisator; **c_DNA** – zur grauen Sequenz von **I** komplementäre DNA; **c_RNA** – zur grauen Sequenz von **I** komplementäre RNA; **X** – Elektronendonorgruppe oder -atom (z. B. S); $h\nu$ – Licht, das durch PS absorbiert wird.



Schema 2. Synthese der photoaktivierbaren DNA **I**: a) *cis*-1,2-Dichloroethen, NaOH, b) DMTr-Cl, NEt₃, DMAP, c) NC(CH₂)₂OP(Cl)NiPr₂, Tetrazol, d) automatische DNA-Synthese. T* ist ein modifiziertes T: 2'-Desoxyuridin mit einem 10-Amino-3-oxo-4-azadecen-1-yl-Rest in der 5-Position; in T*(E) sind die Aminogruppen an Eosin konjugiert. DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin; DMTr-Cl = 4,4'-Dimethoxytritylchlorid; TAMRA = 5-/6-Carboxytetramethylrhodamin.

Unter Standardbedingungen der DNA-Synthese betrug die Kupplungseffizienz über 95 %.

Als erstes wurde Eosin als PS getestet ($\lambda_{\text{max}} \approx 525$ nm in luftgesättigter wässriger Lösung von MOPS (3-Morpholino-propansulfonsäure), pH 7). Durch Bestrahlung mit grünem Licht wird der angeregte Triplett-Zustand von Eosin besetzt, der unter Energietransfer auf Triplett-Sauerstoff in den Grundzustand zurückkehrt.^[14] Die Bildung von Singulett-Sauerstoff (¹O₂) wurde anhand des Zerfalls des Sauerstoff-Abfangreagens 1,3-Diphenyliosbenzofuran verfolgt (Abnahme der Absorption bei 415 nm).^[15] In Gegenwart der DNA **I** reagierte dieser Singulett-Sauerstoff mit der C=C-Bindung in der DNA-Schleife zum [2 + 2]-Additionsprodukt. Diese Verbindung wurde dann in zwei Fragmente gespalten, die endständige Thioestergruppen enthalten: DNA'~SC(=O)H und DNA''~SC(=O)H. In wässriger Lösung wurden die

Thioester zum Teil zu DNA'~SH (**II**) bzw. DNA''~SH (**III**) hydrolysiert. Die Thiol-DNAs wurden unter Bildung unsymmetrischer Disulfide (DNA'~S-S~DNA'') oxidiert; symmetrische Disulfide wurden nicht erhalten. Dies weist darauf hin, dass eine Vororganisation der SH-Gruppen im Duplex **II-III**, der aus der Spaltung von DNA **I** resultiert, für die Disulfidbildung erforderlich ist. DNA'~S-S~DNA'' wird selbst dann gebildet, wenn ein zweifacher Überschuss an **c_DNA** vorhanden ist. Offensichtlich verläuft die Oxidation deutlich schneller als die Duplexdissoziation. Sowohl die Disulfid-DNA als auch SC(=O)H enthaltende DNAs können mit 10 mM Dithioothreitol (DTT) in HS~DNAs überführt werden (Abbildung 1). Eine geringe Menge Nebenprodukt

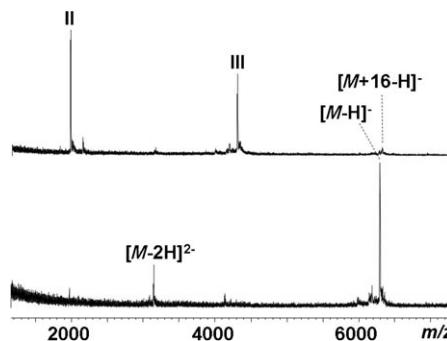


Abbildung 1. MALDI-TOF-Massenspektren von DNA **I** (5 μ M) in NH₄OAc-Puffer (100 mM, pH 7) mit 1 Äquiv. Eosin. Unten: Spektrum einer Lösung, die 90 min im Dunkeln gelagert wurde; oben: Spektrum einer Lösung, die 90 min mit grünem Licht bestrahlt wurde (15-W-Halogenglampe mit Grünlichtfilter). Anschließend wurden beide Lösungen 24 h mit DTT (10 mM) behandelt, um Thioester und Disulfide in Thiole zu überführen. [M] – Molekülpeak von DNA **I**; die DNAs **II** und **III** sind Fragmente aus der Spaltung von **I** (siehe Schema 1).

mit $[M+16]$ (M entspricht der Molekülmasse von DNA **I**) resultiert ebenfalls aus der Spaltung. Dieses Produkt ist unempfindlich gegen DTT und wird nur mit DNAs gebildet, die SCH=CHS-Fragmente enthalten. Wir vermuten, dass es sich um ein Sulfoxid handelt, das durch Sauerstoffaddition an eines der Schwefelatome von SCH=CHS entsteht. Der Sauerstoff könnte aus Peroxospezies stammen, die bei der Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit reduzierenden Substanzen, z. B. Wasser, gebildet werden.

Die C=C-Bindung in DNA **I** wird ebenso gespalten, wenn Chlorin-e6 ($\lambda_{\text{max}} \approx 410$ und 650 nm) anstelle von Eosin und Rotlicht anstelle von grünem Licht verwendet wird. Dies deutet darauf hin, dass die Spaltung nicht vom PS und von der Wellenlänge abhängt, sondern mit der Bildung von ¹O₂ korreliert. Durch Änderungen des PS könnte das System schnell für spezielle Anwendungen angepasst werden, die Modifizierungsmöglichkeiten für die bekannten photoaktivierbaren Oligonukleotide sind hingegen eher begrenzt.^[2]

In der Zelle liegen Thiole in hohen Konzentrationen vor. Sie sind wichtige Antioxidantien, die unter anderem Singulett-Sauerstoff absangen können. Um die Bedingungen in einer Zelle nachzuahmen, haben wir der Reaktionslösung große Mengen DTT (10 mM) zugegeben. Die Spaltung von DNA **I** wurde unter diesen Bedingungen nicht vollständig

inhibiert (Tabelle 1). Außerdem wurde die Bildung von Disulfiden und Thioestern unterdrückt und folglich die Ausbeute an den SH-haltigen Fragmenten **II** und **III** erhöht.

Tabelle 1: HPLC-Analyse der Spaltung photoaktivierbarer DNAs.

Nr.	Reaktionsmischung ^[a]	DNA-Spaltung [%] ^[b] im Dunkeln	DNA-Spaltung [%] ^[b] bei Bestrahlung
1	DNA I , Eosin	8	92
2	DNA I , Eosin, DTT	11	46
3	DNA I , Chlorin-e6	9	67
4	DNA I , Chlorin-e6, DTT	2	28
5	DNA I-E , DTT	7	91

[a] $[DNA]=5 \mu\text{M}$; $[PS]=5 \mu\text{M}$; NH_4OAc -Puffer 100 mM, pH 7. Die Proben 1–4 wurden 90 min bestrahlt, Probe 5 hingegen 150 min; nach der Bestrahlung wurden Probe 1 und 3 für 24 h mit DTT (10 mM) behandelt. [b] $100\%[\text{II}]/[\text{DNA}]_{t=0}$.

Dies deutet darauf hin, dass **I** in Zellen möglicherweise durch Licht aktiviert werden kann. Allerdings wurde auch eine Konkurrenzreaktion, die Bildung des Produkts $[M+16]$, in DTT-haltigem Puffer wesentlich beschleunigt. Das stimmt mit unserer Identifizierung dieser Verbindung überein. Vor allem bei hohen DTT-Konzentrationen und entsprechend stärker reduzierenden Bedingungen kann $^1\text{O}_2$ leichter unter Bildung von Peroxospezies abgefangen werden, und die Ausbeute an Sulfoxid sollte steigen.

Obwohl DNA (Desoxyribose, Nucleobasen) in der Lage ist, mit Singulett-Sauerstoff oder dessen Abbauprodukten zu reagieren, beobachteten wir unter unseren Reaktionsbedingungen keinerlei unspezifische DNA-Modifikationen oder -Spaltungen.

Die Sequenz der DNA **I** wurde so gewählt, dass diese in wässriger Lösung spontan in die Haarnadel-Konformation übergeht (Schema 1). Diese Haarnadel-DNA bindet schlecht an komplementäre einsträngige Nucleinsäuren. In gepufferter wässriger Lösung bei pH 7 liegen nur ca. 40 % der DNA **I** in hybridisierter Form mit **c-DNA** vor (Spur 2 und 4 in Abbildung 2). Unter denselben Bedingungen binden 100 % des DNA-Kontrollstrangs **r-DNA** an **c-DNA** (Spur 5). Bei Bestrahlung der DNA **I** und anschließender Behandlung mit DTT werden 67 % (Chlorin-e6) oder 92 % (Eosin) der DNA **I** zu den DNAs **II** und **III** umgesetzt. Letztere bildet mit **c-DNA** einen stabilen Duplex, was durch die Elektrophoresedaten belegt wird (Abbildung 2).

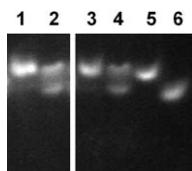


Abbildung 2: Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen. In allen Spuren: **c-DNA** (4 μM), Acetatpuffer (10 mM), pH 7, DTT (7 mM), NaCl (1 M). Spur 1: DNA **I** (5 μM), Eosin (1 Äquiv.), grünes Licht (90 min) – Spur 2: wie 1, aber ohne Licht – Spur 3: DNA **I** (5 μM); Chlorin-e6 (1 Äquiv.), Rotlicht (90 min) – Spur 4: wie 3, aber ohne Licht – Spur 5: **r-DNA** (Positivkontrolle) – Spur 6: ohne DNA oder RNA außer **c-DNA** (Negativkontrolle). Vor der Analyse wurden die Lösungen 24 h mit DTT (10 mM) behandelt.

Die biologischen Zielstrukturen von Antisense-Reagenzien sind natürliche RNAs. Daher wurden die gleichen Experimente mit komplementärer RNA (**c-RNA**) durchgeführt. Wie bereits mit der DNA-Zielstruktur konnte die Bindung der DNA **I** an die **c-RNA** durch Bestrahlung mit grünem (PS = Eosin) oder mit rotem Licht (PS = Chlorin-e6) ausgelöst werden. Bei der Reaktion in DTT-haltigem Puffer sinkt die Ausbeute von DNA **III** und **II** auf die Hälfte (Tabelle 1). Als Nebenprodukt wird hauptsächlich das Sulfoxid der DNA **I** ($[M+16]$) gebildet. Wie DNA **I** bindet auch das Sulfoxid nur mäßig fest an einsträngige Nucleinsäuren. Um die Effizienz der Aktivierung von DNA **I** unter physiologischen Bedingungen zu erhöhen, wurde ein Analogon synthetisiert, das in der Nähe der SCH=CHS-Gruppe einen kovalent an die DNA gebundenen PS enthält (DNA **I-E**). Diese Verbindung wurde wie DNA **I** synthetisiert, nur dass der aminomodifizierte Rest C6dt (Glen Research) anstelle von T1 in die DNA" eingeführt wurde und die so erhaltene aminomodifizierte DNA mit Eosinisothiocyanat konjugiert war (Schema 2).^[14] Die DNA **I-E** wurde auch in DTT-haltigem Puffer durch grünes Licht effizient aktiviert. Die Ausbeute der Photospaltprodukte der DNA **I-E** beträgt 91 %. Diese beachtliche Verbesserung gegenüber DNA **I** kann mit der räumlichen Nähe der $^1\text{O}_2$ -erzeugenden Eosin-Gruppe zur SCH=CHS-Gruppe erklärt werden. Dies erleichtert die direkte Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit der Doppelbindung, während der Abbau von $^1\text{O}_2$ durch DTT weniger beeinflusst ist.

Mitochondrien produzieren in Zellen eine Reihe von Spezies mit aktivem Sauerstoff (ROS), Singulett-Sauerstoff eingeschlossen. Die ROS-Konzentration in normalen Zellen wird durch Antioxidantien niedrig gehalten. Dennoch kann die örtliche Konzentration an $^1\text{O}_2$ in der Nähe der Mitochondrien hoch sein. Dieses Phänomen kann eine Ursache der spontanen Aktivierung unserer DNAs im Dunkeln sein. Laufende Tests mit den photoaktivierbaren DNAs in Zellen werden zeigen, ob dies ein ernstes Problem darstellt.

Wir haben DNA-Derivate hergestellt, deren Bindungsvermögen effizient durch Bestrahlung mit grünem oder rotem Licht herbeigeführt werden kann. Dies ist zunächst ein allgemeiner Ansatz. Im Besonderen sollte es auch möglich sein, Licht jedes anderen Spektralbereichs für die Aktivierung dieser Nucleinsäurebinder zu nutzen, vorausgesetzt es wird ein geeigneter Photosensibilisator verwendet. Die Konjugation mit dem Photosensibilisator verbessert das Verhalten der photoaktivierbaren DNAs erheblich.

Experimentelles

Die Synthesen von **3** sowie der DNAs **I** und **I-E** sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Eingegangen am 12. Februar 2007,
veränderte Fassung am 10. April 2007
Online veröffentlicht am 10. Juli 2007

Stichwörter: Nucleinsäurebinder · Photoaktivierung · Photosensibilisatoren · Singuletsauerstoff

-
- [1] a) *Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA: Novel Pharmacological and Therapeutic Agents* (Hrsg.: B. Weiss), CRC Press, Boca Raton, FL, **1997**; b) C. Arenz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5170; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5048.
- [2] Aktuelle Übersichten: a) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900; b) „Light reversible suppression of DNA bioactivity with cage compounds“: W. T. Monroe, F. R. Haselton in *Dynamic Studies in Biology Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* (Hrsg.: M. Goeldner, R. Givens), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 513–531.
- [3] a) M. Liu, H. Asanuma, M. Komiya, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1009; b) D. Matsunaga, H. Asanuma, M. Komiya, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11452.
- [4] X.-J. Tang, I. J. Dmochowski, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3603; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3523.
- [5] B. Ghosh, F. R. Haselton, K. R. Gee, W. T. Monroe, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 953.
- [6] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 475; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471.
- [7] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genetics* **2001**, *28*, 317.
- [8] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895.
- [9] S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1352; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1328.
- [10] a) J.-R. Meunier, A. Sarasin, L. Marrot, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 437; b) um den Einsatz schädlichen UV-Lichts zu umgehen, wurde auch die Zweiphotonenanregung zur Spaltung UV-empfindlicher Schutzgruppen angewendet. Diese Technik ist aber noch nicht sehr weit entwickelt. T. M. Dore in *Dynamic Studies in Biology Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* (Hrsg.: M. Goeldner, R. Givens), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 435–459.
- [11] J. Eichler, J. Knof, H. Lenz, *Radiat. Environ. Biophys.* **1977**, *14*, 239.
- [12] K. Szacilowski, W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek, M. Brindell, G. Stochel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2647.
- [13] S. D. P. Baugh, Z. Yang, D. K. Leung, D. M. Wilson, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12488.
- [14] R. J. Cherry, A. Cogoli, M. Oppliger, G. Schneider, G. Semenza, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3653.
- [15] H. J. Guiraud, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1984.
-