

DNA-Ringe mit Einzelstrangdomänen zur vielseitigen Funktionalisierung**

Goran Rasched, Damian Ackermann, Thorsten L. Schmidt, Peter Broekmann, Alexander Heckel und Michael Famulok*

Die programmierbare Selbstorganisation molekularer Einheiten zu höher geordneten Architekturen spielt eine Schlüsselrolle beim Aufbau von Nanomaterialien nach dem „Bottom-up“-Prinzip.^[1] Dabei ist die Auswahl einer geeigneten funktionellen molekularen Einheit von entscheidender Bedeutung für den erfolgreichen supramolekularen Aufbau von Nanoobjekten. Nucleinsäuren haben sich aufgrund ihrer bemerkenswerten Eigenschaften in der molekularen Erkennung als eine hervorragend geeignete Stoffklasse für diese Zwecke erwiesen, zumal sie einen einfachen Zugang zu Oligonucleotiden ermöglichen.^[2,3] Die Konstruktion von Nanoobjekten definierter zwei- oder dreidimensionaler Struktur benötigt allerdings starre Oligonucleotiduntereinheiten, wie sie in Double-Crossover(DX)- oder Paramecic-Crossover(PX)-Elementen^[3] oder inhärent starren trigonalen Formen wie Tetraedern oder trigonalen Bipyramiden vorkommen.^[4]

In struktureller Hinsicht sind kleine DNA-Ringe (minicircles; MCs) vermutlich die einfachsten starren Nucleinsäure-Objekte im Nanometermaßstab. Die ersten DNA-Miniringe wurden durch Hybridisierung und anschließende Ligation zweier komplementärer 21 Basen langer Oligonucleotidvorläufersequenzen hergestellt, die ein statistisches Produktgemisch von DNA-Miniringen der Längen 105, 126, 147 und 168 bp (Basenpaare) ergaben.^[5a] Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von 168 bp großen DNA-Miniringen bestätigen ihre gleichmäßige Ringform ohne jegliches Supercoiling oder Deformation.^[6,7] Dies prädestiniert sie als Bausteine zur Konstruktion von Objekten im Nanometermaßstab. Allerdings ist die unverzweigte und fortlaufend doppelsträngige (ds) Topologie der DNA-Miniringe ein entscheidender Nachteil beim Aufbau höher geordneter Architekturen, da sich keine Möglichkeit zur gerichteten Aggregation der Ringe untereinander bietet. Hinzu kommt, dass die bisher übliche Strategie^[5,7] der statistischen Anordnung kurzer Oligonucleotidvorläufersequenzen zur Herstellung von DNA-Miniringen keine Möglichkeit bietet, kontrolliert maßgeschneiderte Sequenzmotive in die Ringe einzubringen, die als definierte Ankerstellen zur Selbstorganisation mehrerer Ringe miteinander dienen könnten.

Wir beschrieben kürzlich die Verknüpfung zweier unterschiedlicher DNA-Ringe über einer „Stütze“ aus Dervan-Polyamiden, die sequenzspezifisch zwei unterschiedliche ds-7-mer-Sequenzmotive, die sich auf zwei unterschiedlichen 168-bp-Ringen befinden, selektiv binden.^[8] Hier berichten wir über den Entwurf und die Synthese von DNA-Miniringen, die ein maßgeschneidertes Sequenzmotiv als einzelsträngige Lücke an definierter Position enthalten. Solch eine Lücke ist eine vielseitig modifizierbare Position für DNA-Miniringe, über die, beispielsweise durch Hybridisierung mit synthetischen Oligonucleotiden, funktionelle Gruppen sequenzspezifisch eingebracht werden können.

Der Schlüsselschritt zur Erzeugung sequenzspezifisch funktionalisierter DNA-Miniringe liegt in der Herstellung unvollständiger Miniringe (MC_{gap}) mit einer 21 Nucleotide umfassenden Einzelstrangregion (ss) (Abbildung 1). Über die Hybridisierung und Ligation der Einzelstrangregion des DNA-Rings mit beliebigen komplementären 21-mer-Oligonucleotiden ON_{func} kann eine Vielzahl unterschiedlichst funktionalisierter DNA-Ringe (MC_{func}) in einfacher Weise hergestellt werden.

Eine Vorbedingung beim Entwurf von DNA-Miniringen ist die periodische Wiederholung von A-Tracts in den Vorfärtssträngen (αf , βf und γf ; Abbildung 1), da diese für die Krümmung entlang der Helix-Achse verantwortlich sind.^[9] Um ringförmig gebogene DNA-Doppelstränge zu erhalten, ist eine kooperative Krümmung aller A-Tracts nötig, was durch periodische Wiederholung von d(A)5- und d(A)6-A-Tracts, die durch Regionen beliebiger Basenpaare d(N)5 separiert sind, erzielt wird.^[5] Die Strategie des Aufbaus von DNA-Miniringen aus 21-mer-Vorläufersequenzen ist zur Einführung einer Einzelstrangregion nicht geeignet.

Dieses kann erreicht werden durch die Konstruktion von 168 bp langen DNA-Ringen aus drei DNA Segmenten α , β und γ (Abbildung 1). Diese Segmente bestehen aus 51 bp langen DNA-Doppelsträngen mit 5 bp langen Überhängen an ihren 5'-Enden (Abbildung 1B). Um selektiv DNA-Ringe einer Größe von 168 bp zu bilden, ist die Wahl geeigneter Überhangsequenzen von entscheidender Bedeutung. Diese wurden deshalb so gestaltet, dass die Segmente nur in einer definierten zyklischen Reihenfolge miteinander hybridisieren ($\alpha \rightarrow \beta \rightarrow \gamma \rightarrow \alpha$). Um darüber hinaus einen Einbau belie-

[*] G. Rasched, Dr. D. Ackermann, T. L. Schmidt, Dr. A. Heckel, Prof. Dr. M. Famulok
Universität Bonn, LIMES-Life and Medical Science
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-73-4809
E-Mail: m.famulok@uni-bonn.de

Dr. P. Broekmann
Universität Bonn
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Wegelerstraße 12, 53115 Bonn (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch Fördermittel des Sonderforschungsbereichs 624 (Vom Design chemischer Schablonen zur Reaktionsteuerung) an M.F. unterstützt.

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

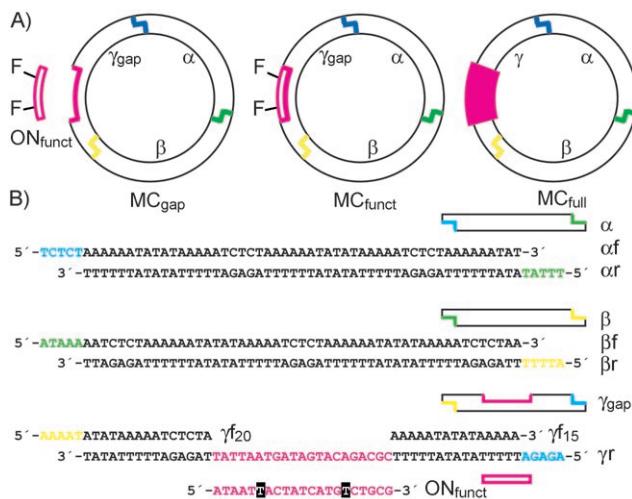


Abbildung 1. Entwurf des DNA-Minirings mit Einzelstrangregion. A) MC_{gap} (links): DNA-Ring mit Einzelstranglücke zur sequenzspezifischen Hybridisierung mit einem komplementären funktionalisierten (F) Oligonukleotid (ON_{funct}). MC_{funct} (Mitte): funktionalisierter DNA-Miniring, gebildet durch Hybridisierung oder durch direkte Ligation mit ON_{funct}. MC_{full} (rechts): Vollständiger ds-DNA-Miniring mit einem maßgeschneiderten 21-bp-Sequenzmotiv (rot). B) Vorfärwärtsstrang- (f) und Gegenstrangsequenzen (r) der dsDNA-Segmente (α , β , γ) mit individuellen 5'-Überhängen (farbkodiert) gewährleisten die Bildung von 168-bp-Ringen und entsprechenden Vielfachen. Die 21-bp-Region in Segment γ (rot) enthält das individuelle Sequenzmotiv. Die modifizierten Nucleobasen in ON_{funct} sind schwarz hinterlegt.

biger Sequenzmotive zu ermöglichen, richtet sich die 21-mer-Einzelstrangregion nicht mehr an die Sequenzanforderungen eines A-Tracts.

Nach den erforderlichen Ligationsschritten (siehe Hintergrundinformationen) wurden die DNA-Miniringe durch native zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) analysiert und gereinigt.^[10] In der ersten Dimension werden die Ligationsprodukte nach ihrer Länge getrennt (Abbildung 2A). Die Spur 3 zeigt das Rohproduktgemisch der DNA-Miniringe, MC_{full}. Neben der Produktbande (Bande 4) sind, vermutlich aufgrund unvollständiger Phosphorylierung, auch monomere (Bande 1) und dimere DNA-Fragmente (Bande 2) sichtbar. Um die C-förmigen (offener Ring) DNA-Nebenprodukte von den geschlossenen DNA-Miniringen zu trennen, wurde die Spur 3 komplett ausgeschnitten und, nach Zusatz von Chlorochindiphosphat, einer weiteren Gelelektrophorese in der zweiten Dimension unterzogen.^[10] Abbildung 2B zeigt, dass ausschließlich Produktbande 4 in zwei Banden aufspaltet. Der Befund, dass die Bande höherer elektrophoretischer Mobilität gegen die Nuclease Bal31 anfällig ist (im Unterschied zur geringeren mobilen Bande der 168 bp langen DNA-Miniringe), untermauert die offenkettige Natur dieses Produkts. Dies belegt, dass der geschlossene 168 bp lange DNA-Miniring eine 21 bp lange Region ohne A-Tract-Motiv toleriert. Auf diese Weise gelang auch die Herstellung von DNA-Miniringen mit Einzelstrangregion, MC_{gap}. Allerdings wurde im Vergleich zur Synthese von MC_{full} eine geringe Zunahme von Nebenprodukten verzeichnet (nicht gezeigte Daten), was wahrscheinlich auf eine geringere Doppelstrangstabilität der kürzeren

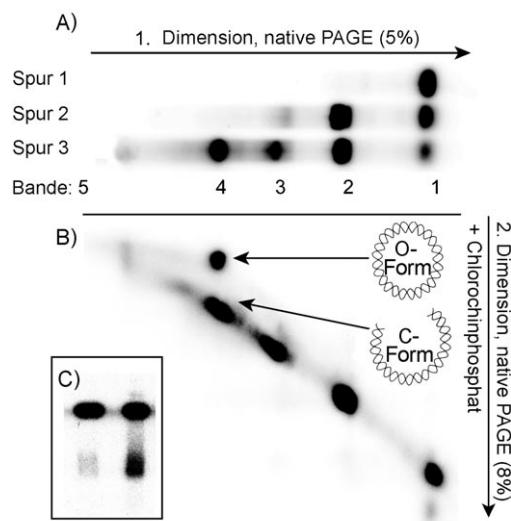


Abbildung 2. Synthese der 168-mer-DNA-Miniringe durch 2D-PAGE. A) In der ersten Dimension werden die Ligationsprodukte nach der Basenpaarzahl getrennt. Spur 1: Segment α ; Spur 2: Ligationsprodukt der Segmente $\alpha + \beta$; Spur 3: Produkte der Ligation von α , β und γ . Produktbande 1: Segment-Monomer; Bande 2: Segment-Dimer-Ligationsprodukte; Bande 3: nicht näher bestimmte Nebenprodukt- oder Sekundärstrukturbande; Bande 4: trimeres Ligationsprodukt (168 bp). B) Die Gelelektrophorese von Spur 3 in der zweiten Dimension trennt ringförmige (O-Form) von gekrümmter, aber offener (C-Form) DNA. C) Zwei Produktproben der Bande 4 von Spur 3 (Gel A) werden einmal mit (links) und einmal ohne Behandlung mit Nuclease Bal31 (rechts) in der zweiten Dimension aufgetrennt.

Vorläufersequenzen $\gamma f 20$ und $\gamma f 15$ zurückzuführen ist. In allen Ligationsexperimenten wurde eine eindeutige Produktbande für MC_{full} oder den Miniring MC_{gap} mit Einzelstrangregion erhalten.

Die Ringform der Miniringe MC_{full} und MC_{gap} wurde durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) bestätigt. Obwohl der vollständig doppelsträngige DNA-Ring MC_{full} eine 21 bp lange Region mit individuellem Sequenzmotiv enthält, das deutlich vom Poly(A)-Tract-Motiv abweicht, sind in Abbildung 3A ausschließlich Ringe von gleichmäßiger, nicht-deformierter Form zu erkennen. Der Durchmesser der Ringe beträgt ungefähr 20 nm, in Übereinstimmung mit dem zu erwartenden theoretischen Wert von 18.2 nm für 168 bp lange Miniringe (siehe Hintergrundinformationen).

Die Miniringe mit Einzelstrangregion, MC_{gap}, zeigen deutliche topologische Unterschiede zu MC_{full} (Abbildung 3B). Vermutlich führt die gegenüber MC_{full} höhere Flexibilität der 21 bp langen Einzelstrangregion zu den deutlich zu erkennenden Verformungen. Interessanterweise zeigen die Ringe auch jeweils eine kleine Region mit dünnerer Ringkontur, ein Phänomen, das sehr wahrscheinlich auf die Einzelstrangregion zurückzuführen ist und für MC_{full} nicht beobachtet wird. Neben den beschriebenen Ringstrukturen werden auch gekrümmte lineare Fragmente beobachtet, die vermutlich durch mechanische Verletzungen durch die Kraftsensorspitze oder durch Scherkraftbelastungen während der Reinigung und Probenvorbereitung entstehen. Über ähnliche Effekte bei der Rasterkraftmikroskopie von ds-DNA ist bereits berichtet worden.^[7,11,12]

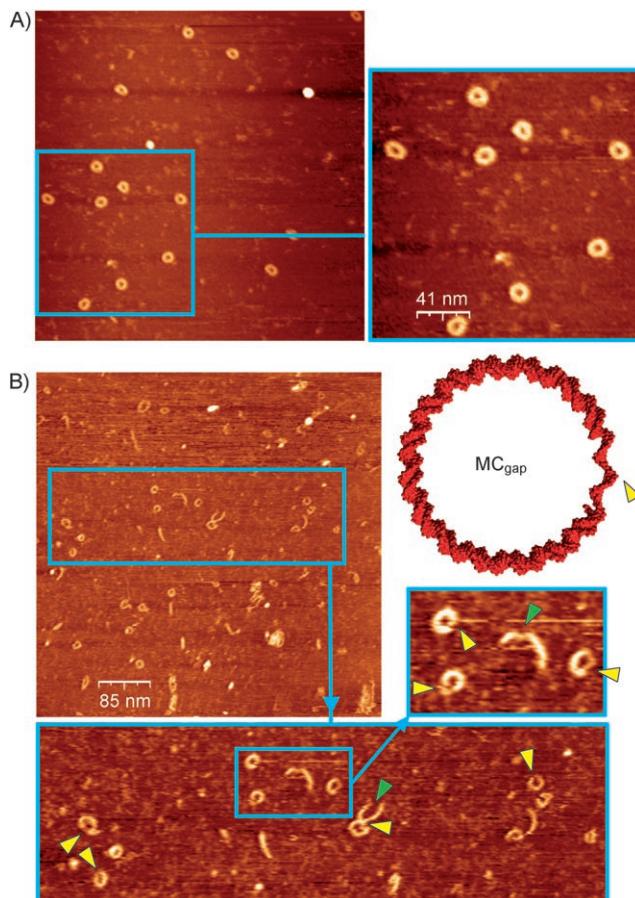


Abbildung 3. In-situ-AFM-Aufnahmen von DNA-Miniringen. A) Aufnahme im MAC-Modus^[11] von MC_{full}-Ringen auf Glimmer in Gegenwart von 10 mM NiCl₂. Die vollständig doppelsträngigen DNA-Miniringe, die ein individuelles Sequenzmotiv enthalten, haben eine einheitliche Ringform und -größe ohne Deformation. B) Das gleiche Experiment mit MC_{gap}-Ringen. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen Regionen schmälerer Ringkontur (gelbe Pfeile). Das Modell eines MC_{gap} (rechts oben) verdeutlicht die Größenordnung der Einzelstrangregion im Verhältnis zum Ring. Grüne Pfeile markieren gekrümmte lineare DNA-Fragmente.

Das nächste Ziel war es, die MC_{gap}-Ringe durch Hybridisierung mit chemisch funktionalsierten Oligonucleotiden mit zusätzlichen funktionellen Gruppen auszustatten. In einer ersten Studie wurde ein zur Einzelstrangregion komplementäres 21-mer-Oligonucleotid synthetisiert, das an zwei definierten Positionen Anthracen-Reste enthielt, die über einen Linker an die C5-Position von Desoxyuridinen geknüpft waren (Abbildung 4). Das Anthracen und die Nucleobase wurden aus präparativen Gründen gewählt und weil die räumliche Anordnung der Modifikation die Substituenten aus der Helix herausragen lässt, ohne die DNA-Struktur zu beeinträchtigen.^[13] Zusätzlich erfährt der DNA-Doppelstrang eine Stabilisierung durch den Aminopropargyl-Rest des an die Pyrimidinbase geknüpften Linkers.^[14] Diese Überlegungen und der Umstand, dass Anthracen als DNA-Interkalator fungieren kann, führten zur Verwendung von ON_{funct} (Abbildung 1B) als erstes Modell-Oligonucleotid zur Funktionalisierung von DNA-Miniringen.

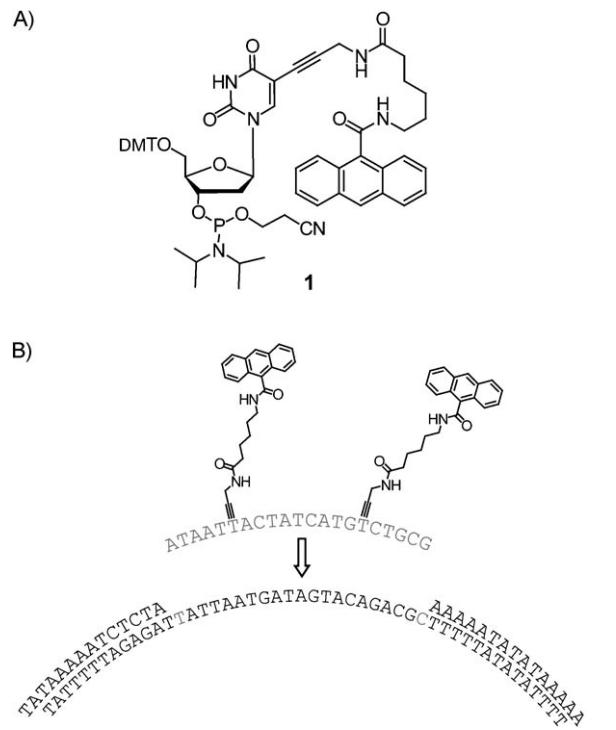


Abbildung 4. Das Anthracen-funktionalisierte Monomer und ON_{funct}. A) Phosphoramidit 1; DMT = 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl. B) Das funktionalierte Oligonucleotid ON_{funct}, hybridisiert mit der komplementären Einzelstrangregion des DNA-Rings MC_{gap}.

Die Synthese des Phosphoramidits 1 (Abbildung 4 A) beginnt mit der Derivatisierung der C5-Position von 5-Iod-desoxyuridin durch eine Sonogashira-Kupplung mit N-Prop-2-inyl-trifluoracetamid (siehe Hintergrundinformationen).^[13] Nach einem Schutzgruppenwechsel wird Anthracen-9-carbamido-e-aminocapronsäure mit TSTU (*N,N,N',N'*-Tetramethyl-O-(*N*-succinimidyl)uronium-tetrafluoroborat als Kupplungsreagens an die Aminogruppe geknüpft.^[15] Das so erhaltene funktionalierte Nucleosid wird unter Standardbedingungen in das Phosphoramidit 1 überführt.

Das Phosphoramidit 1 wurde durch automatisierte Festphasensynthese an den Positionen 6 und 16 des 21 bp langen Oligonucleotids ON_{funct} angebracht, mit Kupplungseffizienzen zwischen 96 und 98 % (laut photometrischem Trityl-Monitoring). Nach Abspaltung von der festen Phase und Entfernung aller basenlabilen Schutzgruppen wurde ON_{funct} durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt. ESI-MS-Studien bestätigten den Einbau der beiden Anthracen-modifizierten Uridine in ON_{funct}.

Aus der Hybridisierung von ON_{funct} mit dem DNA-Ring MC_{gap} resultiert schließlich der sequenzspezifisch funktionalierte DNA-Ring MC_{funct} (Abbildung 4 B). Bei der Untersuchung der elektrophoretischen Gelmobilität der gereinigten DNA-Ringspezies MC_{full}, MC_{gap} und MC_{funct} (Abbildung 5) zeigten alle drei Ringe das für DNA-Miniringe charakteristische langsame Migrationsverhalten.^[5] Wie erwartet, zeigt MC_{gap} eine höhere Migrationsgeschwindigkeit als die vollständig hybridisierten Ringe MC_{full} und MC_{funct}. Aber obwohl MC_{full} und MC_{funct} die gleiche Nucleobasensequenz

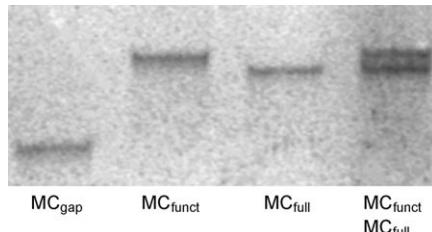


Abbildung 5. Analyse der DNA-Ringe MC_{gap}, MC_{funct} und MC_{full} durch native PAGE.

und Ladung aufweisen, sind sie aufgrund der in MC_{funct} vorhandenen Anthracenreste trennbar.

Zusammenfassend haben wir eine auf einer chemischen Synthese beruhende Methode zur programmierbaren Selbstorganisation von DNA-Oligonucleotiden und zur enzymatischen Ligation entwickelt, mit der in einfacher Weise sequenzspezifisch funktionalisierte DNA-Ringe herstellbar sind. Entscheidend ist dabei der Entwurf der Oligonucleotidvorläufersequenzen in einer ringförmigen Anordnung ($\alpha \rightarrow \beta \rightarrow \gamma \rightarrow \alpha$), die neben der Herstellung vollständig doppelsträngiger DNA-Ringe (MC_{full}) auch die Synthese der eine Einzelstrangregion enthaltenden Spezies MC_{gap} ermöglicht, die als vielseitiges Intermediat in einfacher Weise funktionalisierte DNA-Ringe zugänglich macht. DNA-Ringe mit Einzelstrangregion können prinzipiell mit beliebig funktionalisierten Oligonucleotiden hybridisiert werden, um so DNA-Ringe mit spezifischen Eigenschaften zu erzeugen. Die bezüglich der Sequenz positionsspezifische Modifikation der DNA-Ringe eröffnet ganz neue Möglichkeiten zur Konstruktion höher geordneter DNA-Objekte aus molekularen Bausteinen ringförmiger Geometrie.

Eingegangen am 30. August 2007
Online veröffentlicht am 3. Dezember 2007

Stichwörter: DNA · DNA-Strukturen · Funktionalisierte DNA · Nanostrukturen · Rastersondenverfahren

- [1] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science* **1991**, *254*, 1312.
- [2] a) J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277; b) N. C. Seeman, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 437; c) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128; d) N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427.
- [3] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, *394*, 539.
- [4] a) R. P. Goodman, I. A. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2005**, *310*, 1661; b) C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6992.
- [5] a) L. Ulanovsky, M. Bodner, E. N. Trifonov, M. Choder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 862; b) Y. Lyubchenko, L. Shlyakhtenko, B. Chernov, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5331.
- [6] W. Han, M. Dlakic, Y. J. Zhu, S. M. Lindsay, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10565.
- [7] W. Han, S. M. Lindsay, M. Dlakic, R. E. Harrington, *Nature* **1997**, *386*, 563.
- [8] T. L. Schmidt, C. K. Nandi, G. Rasched, P. P. Parui, B. Brutschy, M. Famulok, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4460; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4382.
- [9] a) A. Maki, F. E. Brownwell, D. Liu, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *21*, 1059; b) A. S. Maki, T. Kim, E. T. Kool, *Biochemistry* **2004**, *43*, 1102; c) D. Crothers, T. E. Haran, J. G. Nadeau, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7093.
- [10] M. Dlakic, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3847.
- [11] W. Han, S. M. Lindsay, T. Jing, *Appl. Phys. Lett.* **1996**, *69*, 4111.
- [12] H. G. Hansma, M. Bezanilla, F. Zenhausern, M. Adrian, R. L. Sinsheimer, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 505.
- [13] a) S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071; b) O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4112; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3990; c) S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3337; d) W. Frank, J. Hobbs, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3420.
- [14] M. Ahmadian, P. Zhang, D. E. Bergstrom, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3127.
- [15] a) W. Bannwarth, D. Schmidt, R. L. Stallard, C. Hornung, R. Knorr, F. Mueller, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 2085; b) W. Bannwarth, R. Knorr, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1157.