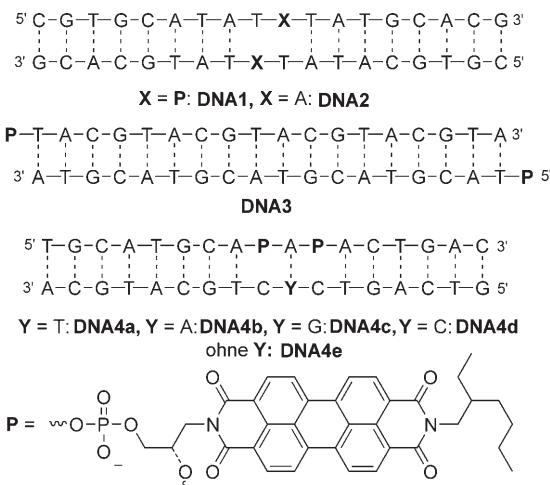


Perylenbisimid-Dimere als fluoreszenter „Klebstoff“ für DNA und zum Nachweis von Basenfehlpaarungen**

Daniela Baumstark und Hans-Achim Wagenknecht*

Perylen-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid (PB) und dessen Derivate werden aufgrund ihrer hervorragenden photochemischen Stabilität und der hohen Quantenausbeuten gerne als Fluoreszenzfarbstoffe in organischen Materialien eingesetzt.^[1,2] Die starken hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den einzelnen PB-Chromophoren machen diesen Farbstoff zu einem wichtigen Baustein für funktionelle supramolekulare Architekturen.^[1,3] Betrachtet man die Kombination dieser Eigenschaften, erscheint es interessant, PB in der dimeren Form auch als Sonde für die fluoreszente DNA- und RNA-Analytik einzusetzen. Die nicht-kovalente Bindung an DNA wurde mit PB-Derivaten untersucht, die mit Spermin^[4] oder anderen Aminen modifiziert wurden.^[5] Darüber hinaus erschien in den letzten Jahren eine zunehmende Zahl von Publikationen, die die kovalente Modifikation von Oligonukleotiden mit PB beschreiben.^[6–12] Kürzlich stellten wir eine einfache Syntheseroute für den Einbau von PB als artifizielle DNA-Base vor, um die Stapelungseigenschaften dieses Farbstoffes an spezifischen Stellen in Doppelstrang-DNA untersuchen zu können.^[13] Hier präsentieren wir nun die Evaluierung der optischen Funktionalisierung mit PB-Dimeren anhand dreier exemplarischer Doppelstränge (**DNA1**, **DNA3** und **DNA4a**). Für die synthetische Modifizierung der entsprechenden Oligonukleotide mit dem PB-Chromophor (Schema 1) wurde der 2-Desoxyribofuranosidteil durch ein acyclisches Linkersystem ersetzt, das über eines der beiden Imid-Stickstoffatome des PB-Farbstoffes angeknüpft wurde.^[13] Dieser Linker ermöglicht es dem Chromophor, in den Basenstapel zu interkalieren, und er weist die für die automatisierte Phosphoramiditchemie erforderliche hohe chemische Stabilität auf.^[13,14]

DNA1 enthält ein Interstrang-PB-Dimer, wohingegen **DNA3** je ein PB-Monomer außerhalb des Doppelstrangs an beiden 5'-Enden trägt. Beide Doppelstränge weisen palindromische Sequenzen auf. Die Fluoreszenzspektren beider Doppelstränge **DNA1** und **DNA3** (Anregung bei 505 nm) werden von einer breiten Bande bei 660 nm ohne Feinstruktur dominiert (Abbildung 1). Diese excimerartige Emission des PB-Dimers wurde auch in Nanoaggregaten von Perylenbisimid-Dimeren beobachtet.^[3,8,15] Die UV/Vis-Spektren von **DNA1**



Schema 1. PB-modifizierte Doppelstränge **DNA1–DNA3**, **DNA4a–DNA4e**.

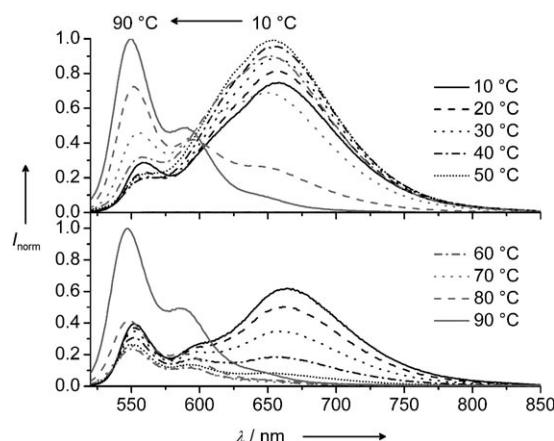


Abbildung 1. Temperaturabhängige Fluoreszenzspektren von **DNA1** (oben) und **DNA3** (unten), 1.25 μm DNA-Doppelstrang, 10 mM Na- P_i -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, Anregung bei 505 nm.

und **DNA3** (Abbildung 2) zeigen bei niedriger Temperatur zwei Hauptbanden, die im Vergleich zu den vibronischen Übergängen (0→1 und 0→0) des PB-Monomers hypsochrom (506 nm) bzw. bathochrom (545 nm) verschoben sind.^[16] Dieses Resultat belegt die starken excitonischen π-π-Wechselwirkungen zwischen den beiden PB-Chromophoren im Inneren des Doppelstrangs (**DNA1**) bzw. außen am Doppelstrang (**DNA3**).^[15]

Sowohl die excimerartige Fluoreszenzbande als auch die verschobenen Absorptionsbanden von **DNA1** verschwinden bei höheren Temperaturen. Besonders bemerkenswert ist

[*] D. Baumstark, Prof. H.-A. Wagenknecht
Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941–943–4617
E-Mail: achim.wagenknecht@chemie.uni-regensburg.de
Homepage: <http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/Wagenknecht/>

[**] Für die finanzielle Unterstützung wird der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Universität Regensburg gedankt.

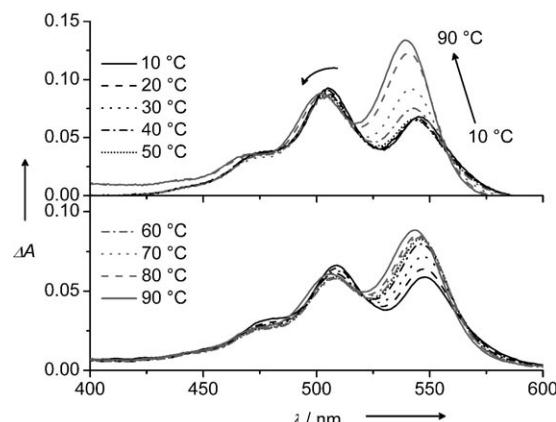


Abbildung 2. Temperaturabhängige UV/Vis-Absorptionspektren von **DNA1** (oben) und **DNA3** (unten), 1.25 μ M DNA-Doppelstrang, 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7.

dabei die Beobachtung, dass diese Veränderung kooperativ bei einer Temperatur beobachtet wird, die der kooperativen thermischen Dehybridisierung des ganzen DNA-Doppelstrangs entspricht, die typischerweise bei 260 nm gemessen wird ($T_m = 78.6^\circ\text{C}$). Offensichtlich ist nur der intakte helikale Doppelstrang als strukturelle Grundlage für die Bildung der PB-Dimere geeignet. Im Vergleich zur unmodifizierten **DNA2** ($T_m = 76.2^\circ\text{C}$) ist der Doppelstrang **DNA1** durch die hydrophoben Interstrang-Wechselwirkungen zwischen den zwei PB-Chromophoren um 2.4°C stabilisiert. Das ist ein bemerkenswertes Resultat, weil der Glycol-Linker als Ersatz des 2-Desoxyribofuranosids in einer einzelnen Modifikation die Doppelstrangstabilität typischerweise deutlich destabilisiert.^[14,17,18] Deswegen kann das PB-Dimer in DNA als hydrophob und diagonal wechselwirkendes Basenpaar angesehen werden, ähnlich denen von Leumann et al.^[20] und Häner et al.^[19] Im Unterschied zu diesen publizierten Beispielen weist das PB-Basenpaar ein charakteristisches Absorptions- und Fluoreszenzsignal auf, das die Baseninteraktion anzeigt.

Im Fall von **DNA3** kann die excimerartige Fluoreszenz nur dadurch erklärt werden, dass die Doppelstränge über die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den 5'-terminalen PB-Kappen, die wie ein fluoreszenter Klebstoff wirken, aggregieren. Anders als bei der **DNA1** verschwindet die Excimerbande von **DNA3** mit zunehmender Temperatur gleichmäßig und nicht kooperativ. Das weist darauf hin, dass die thermisch induzierte Unterbrechung der PB-Interaktion als separater Prozess verläuft und nicht an die thermische Dehybridisierung der DNA-Doppelstrang-Architektur bei $T_m = 50.7^\circ\text{C}$ gekoppelt ist.

Die Doppelstränge **DNA4a–DNA4e** (Schema 1) wurden entworfen, um die Anwendbarkeit der PB-Excimerfluoreszenz für den Nachweis von Fehlpaarungen oder Deletion einzelner Basen zu erproben. Die Doppelstränge enthalten ein Intrastrang-PB-Paar, das durch ein dazwischenliegendes Basenpaar separiert ist. Es ist sehr erstaunlich, dass nur in Gegenwart der korrekten Gegenbase (T in **DNA4a**) die beiden Chromophore so separiert werden, dass die excimerartige Fluoreszenz nicht mehr auftreten kann (Abbildung 3). In diesem Fall wird ausschließlich die Fluoreszenz des PB-

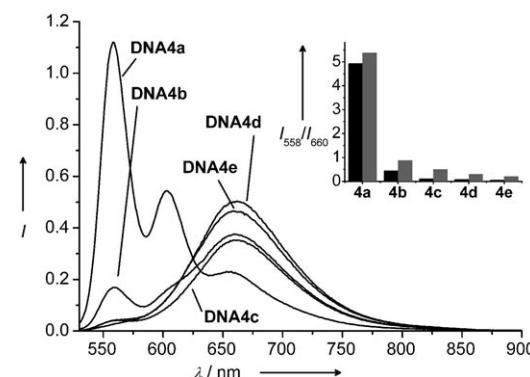


Abbildung 3. Fluoreszenzspektren von **DNA4a–DNA4e**, 2.5 μ M DNA-Doppelstrang in 10 mM Na-P_i-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 0 °C, Anregung bei 505 nm. Einfüllschub: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 558 nm und 660 nm mit 2.5 μ M DNA-Doppelstrang (schwarz) und 250 nm DNA-Doppelstrang (grau).

Monomers bei 558 nm beobachtet. In der Gegenwart von Oligonukleotiden mit den falschen Gegenbasen (A, G, C) bleibt die excimerartige Fluoreszenz erhalten, und keine (**DNA4c**, **DNA4d**) bzw. sehr geringe (**DNA4b**) PB-Monomer-Fluoreszenz wird beobachtet. Ein ähnliches Ergebnis wird auch mit **DNA4e** gemessen. Der komplementäre Strang in diesem Doppelstrang enthält eine Base weniger und repräsentiert daher die Basendeletionsmutante. Mithilfe des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten bei 558 nm und 660 nm kann der richtige Gegenstrang bei Konzentrationen unterhalb des μ -Bereiches klar nachgewiesen werden. Damit ist die Empfindlichkeit vergleichbar mit der anderer Fluoreszenzmethoden.^[21] Im Unterschied zu den zuvor publizierten Experimenten von Asanuma et al.^[22] verwendeten wir den PB-Chromophor als kleinste Vertreter der ausgesprochen photostabilen Rylenefarbstoffe.^[23] Die starke Wechselwirkung der beiden PB-Farbstoffe als Klammer um ein fragliches Basenpaar ermöglicht es nicht nur, den richtigen Gegenstrang von den falschen Gegensträngen zu unterscheiden, sondern auch zu quantifizieren, wieviel des richtigen Gegenstranges in einer Mischung vorhanden ist (Abbildung 4). Die PB-Monomer- (558/603 nm) und die PB-Excimer-Fluoreszenz (660 nm) sind um 100 nm deutlich voneinander separiert. Die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten bei 558/603 nm und 603/660 nm dienen als Kalibrierung für die Bestimmung des Anteils des richtigen Gegenstrangs in einer Mischung von Gegensträngen, die sich nur in einer einzelnen Base unterscheiden (Abbildung 4, Einfüllschub).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PB-Dimere als künstlicher DNA-Basenersatz im Inneren des DNA-Doppelstrangs oder außen an der DNA eine starke und charakteristische, excimerartige Fluoreszenz aufweisen. Die Interstrang-PB-Dimere können dabei als hydrophob wechselwirkende, diagonale Basenpaare angesehen werden, die ein Fluoreszenzsignal hervorrufen. Die Intrastrang-PB-Dimere, die als Klammer um eine fragile Stelle für Basenfehlpaarungen oder Basendeletionen einführt werden, ermöglichen den Nachweis und die Quantifizierung des richtigen Gegenstrangs. Die Anregungswellenlänge des PB-Dimers (505 nm) liegt innerhalb des typischen Anregungsbereichs der bioana-

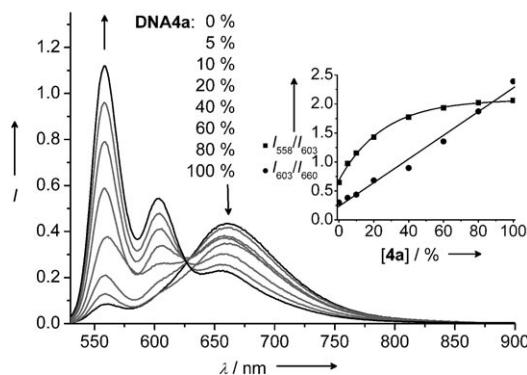


Abbildung 4. Fluoreszenzspektren der einzelsträngigen **DNA4**, hybridisiert mit zunehmendem Gehalt ($0 \rightarrow 100\%$) an richtig paarendem Gegenstrang und abnehmendem Gehalt ($100 \rightarrow 0\%$) einer äquimolaren Mischung falsch paarender Gegenstränge in 10 mM Na-P₂-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 0°C , Anregung bei 505 nm . Einschub: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 558 nm und 603 nm (■) sowie bei 603 nm und 660 nm (●).

lytischen Fluoreszenzlesegeräte. Darüber hinaus sind PB-Dimer-basierte Assays wegen der hohen Photostabilität von PB als kleinstes Vertreter der Rylen-Farbstoffe^[23] gegenüber Assays, die andere organische Chromophore wie Pyren, Perylen oder Cyaninfarbstoffe verwenden, deutlich überlegen.

Experimentelles

Die PB-modifizierten Oligonukleotide wurden entsprechend einer publizierten Methode hergestellt und gereinigt.^[12] Der einzige Unterschied besteht in der Reinigung des PB-DNA-Bausteins durch Säulenchromatographie (SiO_2 , CH_2Cl_2 /Aceton 10:1), die vor der Oligonukleotidsynthese erfolgte. Der synthetische PB-DNA-Baustein kuppelt mit vergleichbarer Effizienz wie die kommerziell erhältlichen Phosphoramidite von A, C, G und T. MS (ESI): einzelsträngige (ss-)**DNA1**: ber. 5821.5 , gef. $m/z: 1468 [\text{M}^4^-]$, $1945 [\text{M}^3^-]$. ss-**DNA2**: ber. 5496.0 , gef. $m/z: 1376 [\text{M}^4^-]$, $1834 [\text{M}^3^-]$. ss-**DNA3**: ber. 6134.6 , gef. $m/z: 1543 [\text{M}^4^-]$, $2047 [\text{M}^3^-]$. ss-**DNA4**: ber. 5836.1 , gef. $m/z: 1461 [\text{M}^4^-]$, $1947 [\text{M}^3^-]$. Die PB-modifizierten Oligonukleotide wurden über die Absorbanz in DMSO mit einem Varian-Cary-100-Spektrometer und $\varepsilon_{528} = 62500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für ss-**DNA1** und ss-**DNA3** sowie $\varepsilon_{500} = 79600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für ss-**DNA4** quantifiziert. Die Doppelstränge wurden durch Erhitzen auf 90°C (10 min) und anschließendes langsames Abkühlen gebildet. Die spektroskopischen Messungen wurden in Quarzglasküvetten (10 mm) durchgeführt. Die UV/Vis-Absorptionsspektren und die Schmelztemperaturen ($2.5 \mu\text{m}$ DNA, $10\text{--}90^\circ\text{C}$, $0.7^\circ\text{C min}^{-1}$, in Schritten von 0.5°C) wurden auf einem Varian-Cary-100-Spektrometer, das mit einer 6×6 -Wechseleinheit ausgestattet ist, aufgenommen. **DNA1**: $T_m = 78.6^\circ\text{C}$; **DNA2**: $T_m = 76.2^\circ\text{C}$; **DNA3**: $T_m = 50.7^\circ\text{C}$; **DNA4a**: $T_m = 56.5^\circ\text{C}$; **DNA4b**: $T_m = 54.8^\circ\text{C}$; **DNA4c**: $T_m = 54.1^\circ\text{C}$; **DNA4d**: $T_m = 55.8^\circ\text{C}$; **DNA4e**: $T_m = 57.9^\circ\text{C}$. Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Jobin-Yvon-Fluoromax-3-Fluorimeter durchgeführt. Die Spektren wurden in Schritten von 1 nm mit einer Integrationszeit von 0.2 s gemessen. Alle Spektren wurden mit einem Emissionsbandpass von 2 nm aufgenommen und wurden um die Raman-Emission der Pufferlösung korrigiert.

Eingegangen am 14. November 2007
Online veröffentlicht am 20. Februar 2008

Stichwörter: Basenfehlpaarung · DNA · Excimere · Fluoreszenz · Perylenbisimid

- [1] Übersichtsartikel: F. Würthner, *Chem. Commun.* **2004**, 1564–1579.
- [2] Siehe z. B.: a) H. Langhals, *Heterocycles* **1995**, *40*, 477–500; b) C. Kohl, T. Weil, J. Qu, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5297–5310; c) H. Langhals, H. Jaschke, H. Bastani-Oskoui, M. Speckbacher, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4313–4321; d) H. Langhals, O. Krotz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4555–4558; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4444–4447.
- [3] F. Würthner, Z. Chen, V. Dehm, V. Stepanenko, *Chem. Commun.* **2006**, 1188–1190.
- [4] S. Krauß, M. Lysetska, F. Würthner, *Lett. Org. Chem.* **2005**, *2*, 349–353.
- [5] a) J. T. Kern, S. M. Kerwin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3395–3398; b) L. Rossetti, M. Franceschin, S. Schirripa, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 413–420; c) R. Samudrala, X. Zhang, R. M. Wadkins, D. L. Mattern, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 186–193.
- [6] S. Bevers, S. Schutte, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5905–5915.
- [7] M. A. Abdalla, J. Bayer, J. Rädler, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4057–4060; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3967–3970.
- [8] W. Wang, W. Wan, H.-H. Zhou, S. Niu, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5248–5249.
- [9] N. Rahe, C. Rinn, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 2120–2121.
- [10] Y. Zheng, H. Long, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Chem. Commun.* **2005**, 4795–4797.
- [11] Y. Zheng, H. Long, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Chem. Commun.* **2006**, 3830–3832.
- [12] F. D. Lewis, L. Zhang, R. F. Kelley, D. McCamant, M. R. Waisieleski, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3457–3464.
- [13] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191–4194.
- [14] a) R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744–751; b) C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 2051–2054; c) C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 48–50.
- [15] J. Seibt, P. Marquetand, V. Engel, Z. Chen, V. Dehm, F. Würthner, *Chem. Phys.* **2006**, *328*, 354–362.
- [16] A. E. Clark, C. Qin, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7586–7595.
- [17] L. Zhang, A. E. Peritz, P. J. Carroll, E. Meggers, *Synthesis* **2006**, 645–653.
- [18] L. Valis, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2007**, 2111–2115.
- [19] a) C. Brotschi, G. Mathis, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1911–1923; b) A. Zahn, C. Brotschi, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2125–2129.
- [20] a) S. Langenegger, R. Häner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2149–2152; b) V. L. Malinovskii, F. Samain, R. Häner, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4548–4551; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4464–4467.
- [21] a) K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1623–1633; b) M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 8052–8060; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7842–7849.
- [22] a) H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2006**, 2768–2770; b) H. Kashida, T. Takatsu, H. Asanuma, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6759–6762.
- [23] Übersichtsartikel: A. C. Grimsdale, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5732–5772; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5592–5629.