

Helicale Anordnung von Porphyrinen entlang der DNA: auf dem Weg zu DNA-Nanoarchitekturen**

Hans-Achim Wagenknecht*

Basenpaare · Chromophore · Energietransfer ·
Helicale Strukturen · Selbstorganisation

Bei dem Aufbau funktioneller π -Systeme ist ein Gerüst mit definierter Struktur notwendig, wenn die optischen Eigenschaften des Systems von der relativen Orientierung der einzelnen molekularen Komponenten zueinander abhängen. Die folgenden, einzigartigen Eigenschaften der Nucleinsäuren werden diesen Anforderungen gerecht:

- Selbstorganisation zweier Oligonucleotide entsprechend ihrer komplementären Sequenzen.
- Helicale Duplexstruktur als Topologie mit einem Basenpaarabstand von 3.4 Å entlang der Helix.
- Möglichkeit zur Modifizierung durch automatisierte Verfahren mit Bausteinen.
- Molekulare Erkennung durch Nucleinsäure bindende Verbindungen und Proteine.
- Bildung komplexer zwei- und dreidimensionaler Nanostrukturen.

Deswegen überrascht es nicht, dass der Aufbau funktionierter Nucleinsäuren immer größeres Interesse findet. Die zugrunde liegende Idee dabei ist, die selbstorganisierte Struktur der doppelsträngigen DNA oder RNA als supramolekulares Gerüst zu verwenden, um mehrere Chromophore so anzuordnen, dass sie in einer kontrollierbaren Weise miteinander wechselwirken. Es ist zu erwarten, dass solche Chromophorcluster Eigenschaften aufweisen, die von denen der Monomere deutlich abweichen und von großem Interesse für die Nano- und Biotechnologie sind. Grundsätzlich können solche Multichromophorstapel in Oligonucleotiden durch 1) Basenersatz, 2) Zuckermodifikationen oder 3) Basenmodifikationen verwirklicht werden. Für jeden Typus werden im ersten Teil dieses Highlights kurz einige repräsentative Multichromophorstrukturen vorgestellt, um dem Leser das nötige Hintergrundwissen zu vermitteln. Im Anschluss wird das Hauptthema diskutiert – die helicale Anordnung eines Multiporphyrinstapels auf Basis der DNA-Architektur.

Die Gruppe um Kool hat DNA entwickelt, in der die natürlichen Basen durch Fluorophore in Form von C-Nucleosiden, so genannte Fluoroside, ersetzt sind (**A**).^[1] Bemerkenswerterweise unterscheiden sich die optischen Eigenschaften der gestapelten Fluoroside im Inneren der DNA deutlich von denen der Monomere; sie zeigen vor allem größere molekulare Extinktionskoeffizienten und größere Stokes-Verschiebungen von bis zu 220 nm. Eine kombinatorische Bibliothek von Fluorosiden ergab interesserweise eine große Bandbreite verschiedener Emissionsfarben.^[2] In einer anderen Experimentreihe haben Leumann und Mitarbeiter eine reißverschlussähnliche Anordnung von Biphenylen und Bipyridinen in Form von C-Nucleosiden als Basenersatz präsentiert, die starke Wechselwirkungen zwischen den Strängen aufwies (**B**).^[3] Diese konnten als künstliche Basenpaare bei Elektronentransferexperimenten eingesetzt werden.^[4]

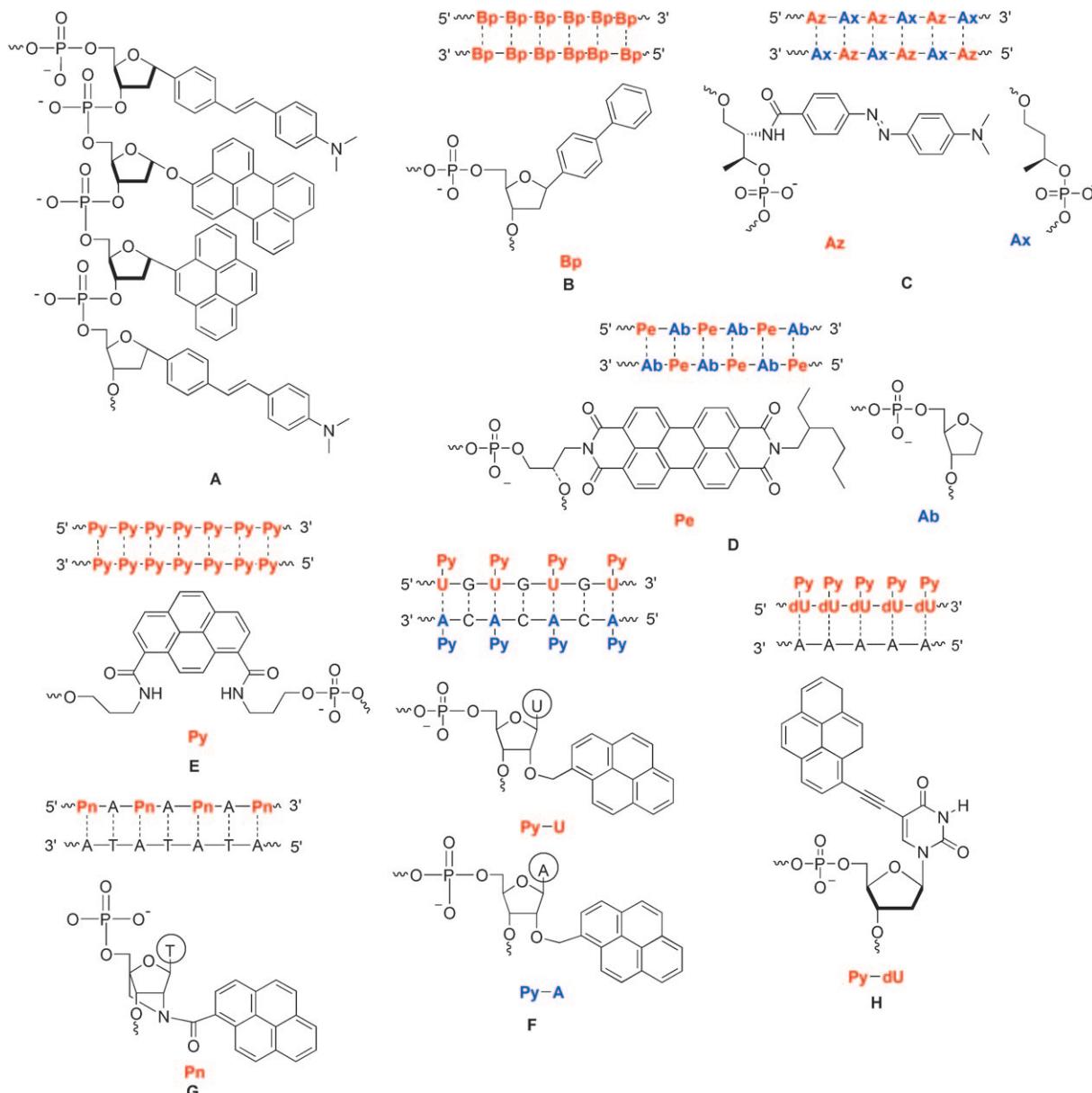
Für den Einbau von Chromophoren in Oligonucleotide können anstatt der natürlichen 2'-Desoxyribofuranoside auch acyclische Brückeneinheiten verwendet werden. Die Gruppe um Asanuma und Komiyama berichtete über Aggregate von Farbstoffen, die sich vom Azobenzol ableiten, die mithilfe von D- oder L-Threolinol als acyclische Brücken im Inneren der DNA eingebaut wurden (**C**).^[5] Die DNA-Hybridisierung konnte moduliert werden, indem mit Licht zwischen der *cis*- und der *trans*-Form der Azobrücke geschaltet wurde. Wir studierten kürzlich die Selbstorganisation von Perylenbisimiden in DNA, indem wir die Farbstoffe mithilfe von (S)-Aminopropandiol als acyclische Brückeneinheiten einbauten (**D**).^[6] Die hydrophobe Stapelung von bis zu sechs Perylenbisimiden im Inneren doppelsträngiger DNA ergab eine starke, rotverschobene und excimerähnliche Emission. Häner und Langenegger gelang es, mehrere Phenanthrene und Phenanthroline in die DNA einzubauen, wofür sie eine achirale, nichtnucleosidische Brücke verwendeten.^[7] Bemerkenswerterweise nimmt der eigentlich achirale Oligopyrenbereich als Chromophorstapel in der DNA die Anordnung einer rechtsgängigen Helix an, wie sie durch den helicalen DNA-Rahmen vorgegeben wird (**E**).^[8]

Alternativ zu den oben erwähnten Strategien hat die Gruppe um Nakamura und Yamana demonstriert, dass die Selbstorganisation mehrerer Pyrene, die an die 2'-Position von Uridin angeknüpft sind, die Stabilität des RNA-Duplexes nicht signifikant beeinflusst (**F**).^[9] Wegen der helicalen Anordnung dieser Chromophore wurde aber eine sehr starke

[*] Prof. Dr. H.-A. Wagenknecht

Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg
93053 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4802
E-Mail: achim.wagenknecht@chemie.uni-regensburg.de
Homepage:
<http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/wagenknecht>

[**] Für die finanzielle Unterstützung durch die DFG (GK 640) und die Universität Regensburg wird gedankt.



Excimerfluoreszenz erhalten. Ein Pyrenreißverschluss entlang der RNA konnte durch Hybridisierung zweier komplementärer Oligonucleotide realisiert werden, die Pyrene sowohl an der 2'-Position von Uridin als auch an der 2'-Position des gegenüber angeordneten, komplementären Adenins enthielten.^[10] LNA (Locked Nucleic Acid) ist eine modifizierte RNA-Struktur, bei der die Riboseeinheiten in der RNA-spezifischen 3'-endo-Konformation fixiert sind. Die Gruppe um Wengel studierte die Eignung des LNA-Rückgrates zur Steuerung der Organisation mehrerer Pyrene, indem sie die Pyrene mit der 2'-Funktion der LNA-Monomere verknüpfte (**G**).^[11]

Wir haben gezeigt, dass die Modifizierung mehrerer benachbarter 2'-Desoxyuridine mit Ethinylpyren nur dann die Stabilität doppelsträngiger DNA wegen der excitonischen Wechselwirkungen erhöht, wenn mehr als drei Chromophore in einer Reihe angeordnet sind (**H**).^[12] Außerdem erzeugte

die Wechselwirkung von fünf Pyrenen entlang der DNA-Helix eine dramatische Verstärkung der Fluoreszenzintensität (ca. 22fach) nach der DNA-Hybridisierung.^[13] Bemerkenswerterweise verhinderte der Einbau von Basenfehlpaarungen gegenüber den Pyrenen die beobachtete Fluoreszenzverstärkung, weil die Fehlpaarungen die Struktur des Chromophorstapels störten. Das Emissionsmaximum kann moduliert werden, wenn Pyrene und Phenothiazine in einem Multichromophor gemischt angeordnet werden.^[14]

Die genannten Beispiele machen deutlich, dass es wichtig ist, die Chromophore entlang der Helix so anzuordnen, dass die kanonische Basenpaarung nicht gestört wird. Eine Erhaltung der sequenzspezifischen Selbstorganisation der Oligonucleotide trotz des Einbaus von Multichromophoren ist von entscheidender Bedeutung sowohl für nanotechnologische Anwendungen als auch für Anwendungen in der molekularen Diagnostik, z.B. für den Nachweis von Einzelbasen-

variationen. Dieses Ziel kann erreicht werden, wenn die Chromophore kovalent direkt mit den DNA-Basen verknüpft werden. Dabei müssen die Chromophore entweder an die 5-Position von Pyrimidinen oder an die 7-Position von 7-Desazapurinen angehängt werden, andernfalls würde die Modifikation die *anti*-Konformation der modifizierten Nucleoside in die *syn*-Konformation umwandeln, die die Watson-Crick-Basenpaarung stört. Darüber hinaus scheint die Verknüpfung der Chromophore über kurze Phenyl- oder Acetylenbrücken – oder sogar über eine direkte C-C-Bindung – wichtig zu sein, um die geforderten elektronischen Wechselwirkungen im Stapel zu erhalten.

Seit einigen Jahren studieren Stulz und Mitarbeiter die Selbstorganisation von Porphyrinen, die über die Acetylenbrücke mit der 5-Position von 2'-Desoxyuridin verknüpft sind.^[15-18] Die gewählte Anknüpfung erfüllt alle oben beschriebenen Kriterien für die Beibehaltung der Basenpaarung wie auch für die Erzeugung starker Wechselwirkungen. Darüber hinaus haben Porphyrine gegenüber den oben diskutierten, rein organischen Chromophoren den Vorteil, dass Metallionen in den Chromophorstapel eingebaut werden können. Mithilfe dieses Ansatzes wurden bis zu elf tetraphenylsubstituierte Porphyrine in ein Oligonucleotid eingebaut.^[16] Die Schmelztemperaturen zeigten jedoch einen deutlichen Verlust der Duplexstabilität pro einzelnen Porphyrineinbau an ($\Delta T = 5-7$ K). Dabei verhielt sich der Beitrag jeder einzelnen Porphyrinmodifikation additiv bezüglich der destabilisierenden Wirkung auf den Duplex – das heißt, dass keinerlei Stabilisierung durch Wechselwirkung benachbarter Porphyrine zurückgewonnen wurde, so wie dies mit den Pyrenen und anderen organischen Chromophoren be-

obachtet worden war (siehe oben). Dieser Befund ist etwas überraschend, vor allem vor dem Hintergrund, dass sowohl Circulardichroismus(CD)-Studien als auch energieminimisierte Strukturen aus Kraftfeldrechnungen nahe legten, dass die Porphyrine in der großen Furche der DNA-Doppelhelix angeordnet sind und so die Duplexstruktur nur geringfügig stören. Die Situation wurde etwas besser, wenn diphenylsubstituierte Porphyrine an 2'-Desoxyuridine (dU) angeknüpft und anschließend in Oligonucleotide eingebaut wurden.^[17] Eine einzelne derartige Modifikation destabilisierte den Doppelstrang zwar immer noch drastisch ($\Delta T = -21$ K), die destabilisierende Wirkung mehrerer Diphenylporphyrine verhielt sich jedoch im Unterschied zu jener der Tetraphenylporphyrine nicht additiv. Dies bedeutet, dass in einer sechsfach markierten DNA die Destabilisierung pro Modifikation reduziert war ($\Delta T = 6-7$ K), besonders dann, wenn eine alternierende Porphyrin-dU/A-Sequenz in ein Oligonucleotid eingeführt wurde.

Letztlich bestand der entscheidende Trick für die Rückgewinnung der Duplexstabilität durch die Wechselwirkung von Porphyrinen darin, eine alternierende Sequenz aus Porphyrin-dU und A in *beide* komplementäre Stränge des DNA-Duplexes einzuführen. Das heißt, dass die Porphyrine weiterhin nebeneinander angeordnet sind, aber in einer zwischen den beiden komplementären Oligonucleotiden alternierenden Weise platziert sind. Mithilfe dieses Ansatzes konnte die Destabilisierung deutlich reduziert werden und letztlich in einen stabilisierenden Effekt von +0.5 K pro Modifikation verwandelt werden, wenn elf Tetraphenylporphyrine in einen Duplex eingebaut wurden (Abbildung 1). Sogar in einer gemischten, alternierenden Sequenz von fünf Tetraphenyl- und

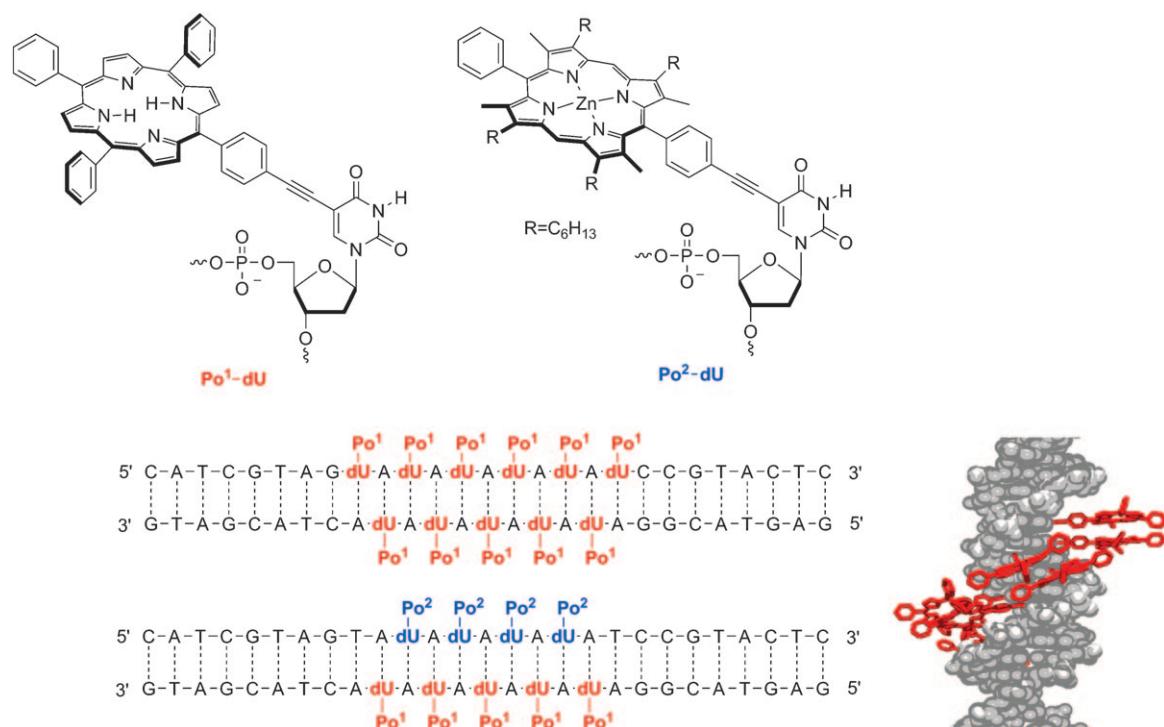


Abbildung 1. Helicaler Multiporphyrinstapel entlang doppelsträngiger DNA: Die alternierende Sequenz von Porphyrin-dU-Konjugaten und A in beiden komplementären Oligonucleotiden platziert die Porphyrine direkt nebeneinander im Hybrid.

vier Diphenylporphyrinen erwies sich die Destabilisierung als gering ($\Delta T = -0.1$ K pro Modifikation) und damit vernachlässigbar. Entsprechend diesen Beobachtungen zeigen die UV/Vis-Absorptions- und CD-Spektren dieser Doppelstränge starke Grundzustandswechselwirkungen zwischen den Porphyrinen entlang der DNA. Modellierungen ergaben, dass sich die Porphyrine anscheinend zickzack-artig anordnen und dabei in Paaren stapeln, die aus jeweils einem Porphyrin beider Stränge bestehen. Diese Anordnung könnte die Stabilisierungseffekte erklären und unterscheidet sich grundlegend von denjenigen Stapeln, in denen alle Porphyrine an denselben Strang angeknüpft wurden.

Hervorzuheben ist, dass die alternierende Anordnung der Chromophore entlang der DNA-Helix den zusätzlichen Vorteil bietet, dass Zink(II)-Ionen in ein Multiporphyrin-Oligonucleotid eingeführt werden können, das anschließend mit einem komplementären, aber zinkfreien Oligonucleotid hybridisiert wird. In einem solchen Duplex wird die Fluoreszenz der Zinkporphyrine durch die metallfreien Porphyrine über einen resonanten Fluoreszenzenergietransfer, der innerhalb der gemischten Sequenz auftritt, signifikant gelöscht.

Diese Resultate sind von großer Bedeutung, weil sie zeigen, dass es möglich ist, Metallionen als Zentralatome von Porphyrinen in einer definierten Weise entlang der DNA-Helix anzutragen, ohne die Basenpaarung und/oder die thermische Duplexstabilität zu beeinträchtigen. Das Potenzial der DNA als Gerüst für die helicale Anordnung von Porphyrinen mit Metallionen über mehrere Nanometer wird deutlich. Solche DNA-Multichromophorarchitekturen könnten zukünftig Anwendung als funktionelle Moleküle für photoaktive Nanomaterialien und photonische Nanostrukturen finden.

Online veröffentlicht am 3. März 2009

- [1] a) A. Cuppoletti, Y. Cho, J.-S. Park, C. Strässler, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 528–534; b) J. N. Wilson, J. Gao, E. T. Kool, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3427–3433.

- [2] a) J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11590–11591; b) J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12748–12749.
- [3] a) C. Brottschi, C. J. Leumann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1694–1697; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1655–1658; b) C. Brottschi, G. Mathis, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1911–1923.
- [4] N. A. Grigorenko, C. J. Leumann, *Chem. Commun.* **2008**, 5417–5419.
- [5] a) H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6684–6687; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6522–6525; b) H. Kashida, M. Tanaka, S. Baba, T. Sakamoto, G. Kawai, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 777–784.
- [6] a) D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2652–2654; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2612–2614; b) D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6640–6645.
- [7] a) S. M. Langenegger, R. Häner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 848–851; b) S. M. Langenegger, R. Häner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2149–2152.
- [8] V. L. Malinovskii, F. Samain, R. Häner, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4548–4551; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4464–4467.
- [9] a) M. Nakamura, Y. Ohtoshi, K. Yamana, *Chem. Commun.* **2005**, 5163–5165; b) M. Nakamura, Y. Shimomura, Y. Ohtoshi, K. Sasa, H. Hayashi, H. Nakano, K. Yamana, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1945–1951.
- [10] M. Nakamura, Y. Murakami, K. Sasa, H. Hayashi, K. Yamana, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6904–6905.
- [11] a) I. V. Astakhova, V. A. Korshun, J. Wengel, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11010–11026; b) T. S. Kumar, A. S. Madsen, M. E. Ostergaard, J. Wengel, P. J. Hrdlicka, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7060–7066.
- [12] J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2088–2090.
- [13] E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3451–3453; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3372–3375.
- [14] E. Mayer-Enthart, C. Wagner, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3434–3439.
- [15] a) I. Bouamaied, E. Stulz, *Synlett* **2004**, 1579–1583; b) I. Bouamaied, E. Stulz, *Chimia* **2005**, *59*, 101–104.
- [16] L.-A. Fendt, I. Bouamaied, S. Thöni, N. Amiot, E. Stulz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15319–15329.
- [17] I. Bouamaied, T. Nguyen, E. Stulz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3888–3891.
- [18] T. Nguyen, A. Brewer, E. Stulz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2008–2011; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1974–1977.