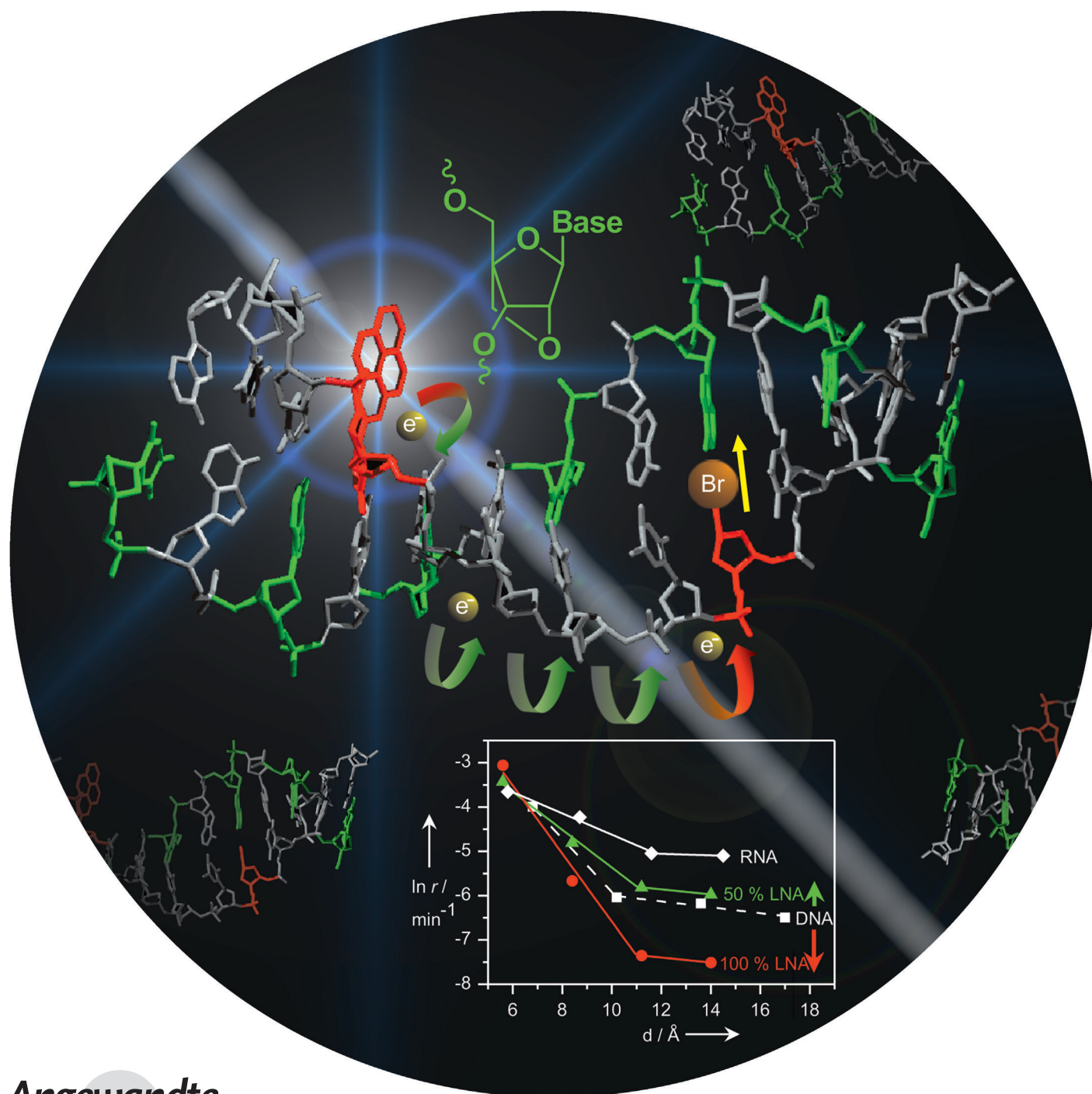


Photoinduzierter reduktiver Elektronentransfer in LNA:DNA-Hybriden: Kompromiss aus Konformation und Basenstapelung**

Ulrike Wenge, Jesper Wengel und Hans-Achim Wagenknecht*



Nucleinsäuren und ihre synthetischen Analoga stellen die faszinierendsten Architekturen für die molekulare Elektronik dar, weil durch ihre spontane Selbstorganisation Netzwerke und komplexe zwei- und dreidimensionale Strukturen gebildet werden können.^[1] Der photoinduzierte Ladungstransfer durch die DNA wurde bereits intensiv erforscht: der oxidative Modus vor allem in den 1990er Jahren^[2] und der reduktive Typ in der letzten Dekade.^[2,3-8] Hüpfmechanismen wurden identifiziert und experimentell^[2-6] über lange Distanzen sowie mit theoretischen Methoden^[9] auch über kürzere Reichweiten nachgewiesen. Der Lochtransfer verursacht oxidative Guanin-Schäden. Dieser entscheidende Nachteil macht den reduktiven Elektronentransfer (ET) deutlich vielversprechender für die Nanoelektronik.^[7,8] Tatsächlich sind die Geschwindigkeitskonstanten des Ladungs-Hüpfens über Thymin größer ($4 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$)^[10] als die entsprechenden Werte des Loch-Hüpfens (10^4 – 10^{10} s^{-1}).^[11,12] Allerdings geben Geschwindigkeiten nur an, wie schnell ein ET-Prozess stattfindet, jedoch nicht, wie effizient. Die Effizienz ist ein Maß, wieviel Ladung (im Vergleich) beim Akzeptor ankommt, und ist somit ein wichtiger Parameter für die molekulare Elektronik.

Die Effizienz des ET durch natürliche DNA ist zu gering, um ernsthaft für die Nanoelektronik in Betracht gezogen zu werden.^[7] Deswegen konzentriert sich die gegenwärtige Forschung darauf, wie der Elektronentransfer verbessert werden kann, ohne die spontane Selbstassoziation der Nucleinsäuren als attraktivste Eigenschaft solcher Architekturen zu verlieren. Es ist bekannt, dass der ET in DNA durch die Konformation der Doppelhelix kontrolliert wird.^[8,13,14] Doppelhelices des A-Typs bilden eine wichtige und vielversprechende Alternative. Es wurde bereits gezeigt, dass der Ladungstransfer in RNA effizienter ablaufen kann als in DNA.^[15] Andere Studien mit RNA,^[16] auch solche mit gegensätzlichen Ergebnissen^[17] (und mit LNA:DNA-Hybriden^[18]), geben Anlass zu Zweifeln, ob die flexiblere Struktur allein verantwortlich ist für die verbesserte ET-Effizienz. Die Helixkonformation des A-Typs könnte auch durch ihre geringere Distanz der Basenstapelung vorteilhaft sein. Andererseits verringert die chemische Instabilität der RNA ihr herausragendes Potential in der Elektronik beträchtlich. Um diese Problematik zu lösen, präsentieren wir hier ET-Experimente mit „locked“ (verbrückten) Nucleinsäuren (LNA) als Einheiten zwischen 5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (2PydU) und 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) als Elektronen-Donor-Akzeptor-Paar.^[19] In LNA ist die Zuckerkonformation in der

C3'-endo-Stellung fixiert, wodurch die Helix des A-Typs bei LNA:DNA-Hybriden stabilisiert wird. Bereits 40 % LNA-Nucleotide in einem Strang vermindern den mittleren Basenabstand entlang der Helixachse auf 2.8 Å und die helicale Verdrehung auf $32 \pm 1^\circ$.^[20] Zusätzliche Modifikationen führen zu einer noch schwächeren helicalen Verdrehung bei unverändertem Basenabstand.^[21] LNA:DNA-Hybride sind strukturell den DNA:RNA-Hybriden bezüglich ihrer Basenstapelung sehr ähnlich, ihre Flexibilität ist jedoch reduziert. Insbesondere wegen der Methylenbrücke ist das Phosphatrückgrat der LNA sehr steif.

Wir^[8,22] und andere^[23] haben bisher 5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin (1PydU) verwendet, um den reduktiven ET zu untersuchen. Die starke elektronische Kopplung zwischen den beiden aromatischen Teilen verursacht jedoch intramolekulare Exciplexe,^[22] die die Elektroneninjektion in die DNA behindern. 2PydU^[24] stellt einen besseren Elektroneninjektor dar, weil die Anknüpfung in der 2-Position das Pyren entkoppelt. Auf der Akzeptorseite fand BrdU sehr oft Anwendung, um den ET in DNA zu untersuchen.^[5,7,8,23] Das BrdU-Radikalanion reagiert chemisch ausreichend schnell ab, um unterschiedliche ET-Effizienzen aufzulösen.^[25]

Sowohl von uns^[26] als auch von anderen^[27] wurde zuvor angenommen, dass Thymin die wichtigsten Elektronenüberträger sind. Deswegen wurden bis zu vier T-A-Basenpaare zwischen Donor (2PydU) und Akzeptor (BrdU) in DNA III-0 bis III-4 (Abbildung 1) platziert. DNA II stellt die Referenz ohne BrdU dar, DNA I die Referenz ganz ohne Modifikation. Vier komplementäre Gegenstränge kamen zum Einsatz: DNA, RNA, 50 % LNA/50 % DNA (Ina) und 100 % LNA.

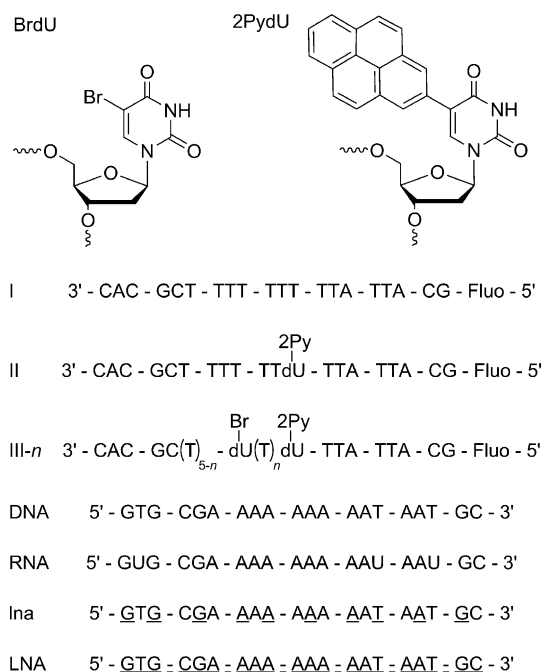


Abbildung 1. Struktur von 2PydU und BrdU und Sequenzen der Oligonucleotide. Unterstrichene Buchstaben sind LNA-Einheiten (Fluo = Fluorescein-Markierung, siehe Hintergrundinformationen).

[*] Dipl.-Chem. U. Wenge, Prof. H.-A. Wagenknecht
Institut für Organische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie
Fritz-Haber-Weg 6, Karlsruhe (Deutschland)
E-Mail: wagenknecht@kit.edu
Homepage: <http://www.ioc.kit.edu/Wagenknecht/>

Prof. J. Wengel
Nucleic Acid Center, Department of Physics, Chemistry and Pharmacy,
University of Southern Denmark
5230 Odense M (Dänemark)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG finanziell unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204901> zu finden.

Die Duplexe wurden zunächst durch ihre Schmelztemperaturen (T_m) charakterisiert. (Tabelle 1). Die Einführung der 2PydU-Modifikation verursacht eine Destabilisierung von ungefähr 5°C, unabhängig davon, ob es sich um reine DNA-Duplexe (I_DNA vs. II_DNA), RNA-Duplexe

Tabelle 1: Schmelztemperaturen (T_m) der Oligonucleotide; $\lambda = 260$ nm, 20–90°C, Geschwindigkeit: 0.7°C min⁻¹, 2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i-Puffer (pH 7.0), 250 mM NaCl.

| Duplex | T_m [°C] | Duplex | T_m [°C] | Duplex | T_m [°C] |
|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| I_DNA | 62.9 | I_RNA | 58.3 | I_Ina | 75.4 |
| II_DNA | 58.1 | II_RNA | 52.8 | II_Ina | 70.9 |
| III-0_DNA | 59.2 | III-0_RNA | 53.8 | III-0_Ina | 71.2 |
| III-1_DNA | 58.7 | III-1_RNA | 53.3 | III-1_Ina | 72.2 |
| III-2_DNA | 58.9 | III-2_RNA | 53.6 | III-2_Ina | 71.0 |
| III-3_DNA | 58.7 | III-3_RNA | 53.7 | III-3_Ina | 71.1 |
| III-4_DNA | 58.8 | III-4_RNA | 53.9 | III-4_Ina | 72.0 |

(I_RNA vs. II_RNA) oder Hybride mit 50% LNA (I_Ina vs. II_Ina) handelt. Das ist ein typischer Wert für eine Modifikation in der 5-Position von dU. Die zweite Veränderung BrdU bringt keine zusätzliche Destabilisierung. Alle doppelt modifizierten Duplexe in jedem Satz weisen vergleichbare Stabilitäten von ca. 58–59°C (III-0_DNA bis III-4_DNA), 53–54°C (III-0_RNA bis III-4_RNA) und 71–72°C (III-0_Ina bis III-4_Ina) auf. Alle Hybride mit vollständigem LNA-Gegenstrang zeigen Schmelztemperaturen, die höher als 90°C sind.^[28] Die großen Unterschiede zwischen den T_m -Bereichen reiner DNA und der DNA:LNA-Hybride sind durch die Vororganisation der LNA-Einzelstränge und durch die bessere Basenstapelung begründet. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die thermische Stabilität aller modifizierten Duplexe ausreicht, um die Belichtungen bei Raumtemperatur mit garantiert doppelsträngigen Proben durchzuführen.

Die Bestrahlungen wurden mit einer Hg/Xe-Lampe (200 W) und einem Cutoff-Filter bei 320 nm durchgeführt, um selektiv 2PydU anzuregen, dessen Absorptionsbereich außerhalb des von Nucleinsäuren und BrdU liegt. Alle Oligonucleotide zur Untersuchung des ET (III-0 bis III-4) wurden am 5'-Ende mit Fluorescein markiert, damit die Analyse durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) quantifizierbar wird. Auf der Basis früherer Berichte^[5,7,8,23,25] wurde erwartet, dass die PAGE-Analyse belichteter Proben, die mit Piperidin behandelt wurden, die Bildung von Strangbrüchen im Bereich der BrdU-Modifikation anzeigt. Diese wurden für die quantitative Analyse kombiniert (Tabelle 2). Unter diesen Bedingungen zeigten alle Oligonucleotid-Proben, in denen 2PydU und BrdU direkt benachbart sind (III-0_DNA, III-0_RNA, III-0_Ina, III-0_LNA) keinen ET-induzierten Strangbruch, wahrscheinlich wegen der sehr schnellen Ladungsrekombination. In den Doppelsträngen, in denen 2PydU und BrdU durch dazwischenliegende Basenpaare separiert sind, nimmt die Spaltungsreaktion mit zunehmender Distanz, unabhängig von der Art des Gegenstranges, ab. Mit vier dazwischenliegenden Basenpaaren zeigt nur das RNA:DNA-Hybrid einen Strangabbau von fast 20%. Hybride mit Gegensträngen, die aus 50% LNA-Einheiten bestehen (III-3_Ina/III-4_Ina), zeigen größere Mengen an

Tabelle 2: Relative Strangbruchmenge der Duplexe nach 30 min Bestrahlung.

| Gegenstrang | Strangbruch [%] | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|-------|
| | III-1 | III-2 | III-3 | III-4 |
| DNA | 44.6 | 7.3 | 6.1 | 4.7 |
| RNA | 58.4 | 40.5 | 19.2 | 18.7 |
| Ina | 67.4 | 24.2 | 8.3 | 7.4 |
| LNA | 76.5 | 9.7 | 1.9 | 1.9 |

Strangbruch als solche mit reinem LNA-Gegenstrang (III-3_LNA/III-4_LNA).

Monoexponentielles Anpassen des zeitlichen Verlaufs der Strangabbruch-Ausbeuten und anschließende lineare Anpassung der Anfangsphase ergibt eine halbquantitative Analyse (siehe Hintergrundinformationen). Diese rein chemischen Reaktionsgeschwindigkeiten können gegen die Distanz zwischen 2PydU und BrdU aufgetragen werden (Abbildung 2). Es ist wichtig, hier hervorzuheben, dass diese Werte keine ET-Geschwindigkeiten darstellen, sondern eine

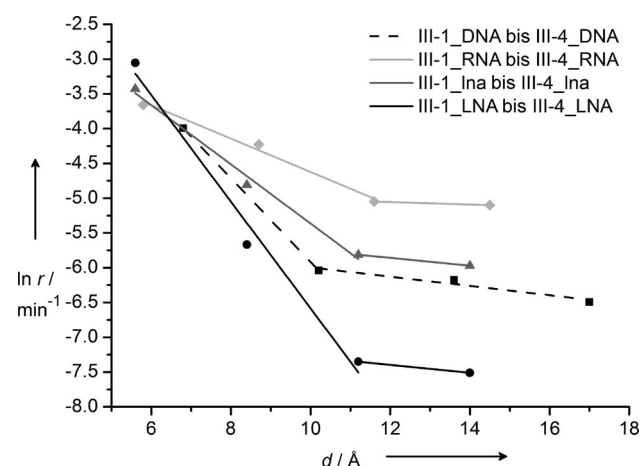


Abbildung 2. Analyse der Abhängigkeit der Strangbruchgeschwindigkeit r von der Distanz d . Basenabstand: 3.4 Å für DNA; 2.9 Å für DNA:RNA^[31] und 2.8 Å für DNA:LNA.^[32]

simple Analyse der ET-Effizienzen unserer Experimente repräsentieren. Zuerst lässt sich so feststellen, dass alle vier Hybrid-Sätze zunächst eine stärkere Distanzabhängigkeit zeigen, die in eine schwächere übergeht. Dieses duale Verhalten wurde zuvor sowohl für den oxidativen Lochtransfer^[29] als auch den reduktiven ET beobachtet.^[12] Die Distanzabhängigkeit der Strangbruchgeschwindigkeit in unseren RNA:DNA-Hybriden ist am schwächsten ausgeprägt. Aber noch bemerkenswerter ist die Beobachtung, dass der photoinduzierte Strangbruch an der BrdU-Stelle in solchen Hybriden, die 50%-LNA in den Gegensträngen enthalten, verstärkt ist, wogegen solche mit 100% LNA verringerten Strangbruch zeigen.^[30]

Vorherige Studien haben ergeben, dass die Elektroneninjektion über die einzelne C-C-Bindung in 1PydU sehr schnell abläuft (2 ps⁻¹)^[8] und daher in den verschiedenen Hybriden nicht variieren sollte. Zweitens ist unterdessen ak-

zeptiert, dass die Menge an Strangbruch die relative Effizienz des ET widerspiegelt.^[5,7,8,23,25] Auf der Basis dieser beiden Annahmen können die beobachteten Unterschiede allein den zwei Parametern zugeordnet werden, die eingangs diskutiert wurden: Der Helixtyp, A oder B, beeinflusst den ET durch verschiedenartige Basenstapelung, oder die unterschiedliche Flexibilität moduliert den ET. In der Literatur wurde der effiziente Ladungstransfer in DNA:RNA-Hybriden fast ausschließlich der flexibleren Struktur im Vergleich zur DNA zugeordnet.^[16] Unsere Ergebnisse zeigen klar, dass das nicht der einzige Grund sein kann. DNA:LNA-Hybride, unabhängig davon, ob sie 50 oder 100% LNA enthalten, sind steifer als DNA, aber insbesondere III-1_Lna bis III-4_Lna zeigen bessere ET-Effizienzen als III-1_DNA bis III-4_DNA. Demnach müssen diese Unterschiede den Schlüsseigenschaften der A-Helix zugeschrieben werden, welche der geringere Basenabstand und helicale Verdrehung darstellen,^[31] die zusammen eine bessere Basenstapelung ergeben.^[20,21,32] Diese Eigenschaft übt in solchen Doppelhelices, die 50% LNA-Einheiten enthalten, offensichtlich einen stärkeren Einfluss aus als der negative Effekt der gefestigten Zuckerkonformation, was letztlich zu besseren ET-Effizienzen als in reiner DNA des B-Typs führt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass LNA dazu beitrug, herauszufinden, welche Rolle die konformationelle Flexibilität und die Basenstapelung des A-Typs bei der ET-Effizienz spielen. Es ist nicht überraschend, dass die konformationelle Fixierung der LNA-Einheiten einen klar negativen Effekt auf die ET-Geschwindigkeit^[18] und -Effizienz ausübt (siehe Ergebnisse mit III-1_LNA bis III-4_LNA). Andererseits zwingt LNA die Nucleinsäurestruktur in den A-Typ sehr ähnlich zu dem der RNA, was zu besserer Basenstapelung führt und dadurch den ET positiv beeinflusst. Es wurde deutlich, dass ein guter Kompromiss aus Unterstützung der Doppelhelix des A-Typs und aus konformationeller Flexibilität die bestmögliche Architektur ergibt, um die ET-Effizienz zu verbessern. Dies ist ein wichtiges Resultat für das zukünftige Design von Nucleinsäuren für den ET und die molekulare Elektronik, weil LNA im Unterschied zu RNA chemisch sehr stabil ist. Clever angeordnete LNA-Einheiten sind in der Lage, die ET-Effizienz über kurze Reichweiten zu verbessern und wirken sich dadurch auch positiv über größere Distanzen aus. Die Verwendung von LNA zusammen mit Metallionen oder Chromophoren als künstliche Mediatoren für den langreichweitigen ET hat ein großes Potential für die Entwicklung nucleinsäurebasierter Architekturen für die molekulare Nanoelektronik.

Eingegangen am 22. Juni 2012

Online veröffentlicht am 3. September 2012

Stichwörter: Elektronentransfer · Konformation · LNA · Pyren · RNA

[1] E. Stulz, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 4456–4469.

[2] *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236* („Long-Range Charge Transfer in DNA I“); *Top. Curr. Chem.* **2004**, *237* („Long-Range Charge Transfer in DNA II“).

[3] B. Giese, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *14*, 6139–6143.

[4] a) C. Behrens, M. K. Cichon, F. Grolle, U. Hennecke, T. Carell, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236*, 187–204; b) A. Kumar, M. D. Sevilla, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 7002–7023.

[5] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15552–15559.

[6] J. C. Genereux, A. K. Boal, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 891–905.

[7] a) C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871–1876; b) A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 325–328; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 318–321; c) B. Elias, J. C. Genereux, J. K. Barton, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9207–9210; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9067–9070; d) T. Ito, A. Hayashi, A. Kondo, T. Uchida, K. Tanabe, H. Yamada, S.-i. Nishimoto, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 927–930; e) R. Tashiro, A. Ohtsuki, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14361–14363.

[8] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1662–1666; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1636–1639.

[9] a) E. Hatcher, A. Balaeff, S. Keinan, R. Venkatramani, D. N. Beratan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11752–11761; b) F. C. Grozema, S. Tonzani, Y. A. Berlin, G. C. Schatz, L. D. A. Siebbeles, M. A. Ratner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5157–5166; c) T. Kubař, U. Kleinekathöfer, M. Elstner, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 13107–13117.

[10] M. J. Park, M. Fujitsuka, K. Kawai, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15320–15323.

[11] a) F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, *406*, 51–53; b) P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Kan, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8353–8358; c) T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1125–1129; d) S. M. M. Conron, A. K. Thazhathveetil, M. R. Wasielewski, A. L. Burin, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14388–14390; e) C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6014–6019.

[12] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 791–800.

[13] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10192–10195.

[14] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11471–11483.

[15] T. Takada, Y. Otsuka, M. Nakamura, K. Yamana, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6881–6884.

[16] a) M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13053–13066; b) E. M. Boon, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1140–1147; c) D. T. Odom, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8727–8737.

[17] V. Sartor, P. T. Henderson, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11027–11033.

[18] K. Kawai, M. Hayashi, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9406–9409.

[19] Basierend auf dem Potential des angeregten Zustandes des Pyrens ($E^* = -1.9$ V) und von BrdU ($E = -1.8$ V) (gegen Normalwasserstoffelektrode).

[20] K. E. Nielsen, S. K. Singh, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 228–238.

[21] A. Eichert, K. Behling, C. Betzel, V. A. Erdmann, J. P. Fürste, C. Förster, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 6729–6736; Å. K. E. Nielsen, J. Rasmussen, R. Kumar, J. Wengel, J. P. Jacobsen, M. Petersen, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 449–457.

[22] a) M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 706–712; b) A. Trifonov, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *409*, 277–280.

- [23] S. T. Gaballah, J. D. Vaught, B. E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 5927–5934.
- [24] C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64–71.
- [25] D. Fazio, C. Trindler, K. Heil, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 206–212.
- [26] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51–70.
- [27] R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, 1878–1879.
- [28] M. A. Campbell, J. Wengel, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680–5689.
- [29] a) B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318–320; b) F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, B. Cohen, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8150–8153; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7982–7985.
- [30] Der kleine, aber umgekehrte Effekt der Strangbrucheffizienzen, der bei der kürzesten Distanz beobachtet wurde, muss der lokalen Strukturstörung durch das Pyren zugeschrieben werden.
- [31] G. L. Conn, T. Brown, G. A. Leonard, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 555–561.
- [32] a) Lit. [20]; b) Lit. [21].