

Das Flavoprotein Dodecin als redoxaktive Sonde für Elektronentransfer durch DNA**

Yaming Yu, Björn Heidel, Tamara Lourdes Parapugna, Sabine Wenderhold-Reeb, Bo Song, Holger Schönherr, Martin Grininger und Gilbert Nöll*

Professor Bernhard Dick zum 60. Geburtstag gewidmet

Photochemisch induzierter Elektronentransfer (ET) durch DNA in Lösung ist auf relativ kleine Abstände beschränkt und konnte meist nur über eine Distanz von weniger als 10 Basenpaaren (bp; 3.4 nm) beobachtet werden.^[1] In Abhängigkeit von der Basensequenz ist photochemisch induzierter ET auch bei kleineren Abständen (< 5 bp) nicht sehr effizient.^[1h,i,m] Dagegen wurde elektrochemisch induzierter ET durch (mit Redoxzentren modifizierte) DNA-Monolagen auf Goldoberflächen über Entfernungen von bis zu 100 bp (34 nm) beobachtet, was auf ein Verhalten der DNA als molekularer Draht schließen lässt.^[2] Da in diesen Studien davon ausgegangen wird, dass der ET nur entlang des Basenstapels vollständig hybridisierter doppelsträngiger DNA (ds-DNA) stattfindet, könnten Anwendungen in Biosensoren zum Auffinden einzelner DNA-Basenfehlpaarungen möglich sein.^[2,3] Meistens stützen sich die experimentellen Daten jedoch einzig auf Cyclovoltammetrie, und häufig wird mithilfe der Kurvenform der Cyclovoltammogramme sogar auf die ET-Rate geschlossen.^[2–4] Daher ist die Entwicklung alternativer experimenteller Methoden zur Untersuchung von ET durch DNA-Monolagen von besonderem Interesse.

In der hier vorgestellten Arbeit wird das Riboflavin-bindende Protein Dodecin als redoxaktive Sonde zur Untersuchung von ET durch DNA-Monolagen verwendet. Das ET-Ereignis wird hierbei in eine Änderung der auf der Oberfläche gebundenen Masse übersetzt. Dadurch kann ET mithilfe weiterer analytischer Methoden, wie Oberflächenplasmo-

nenresonanz (SPR) oder Messungen mit einer Quarzmikrowaage, nachgewiesen werden. Dodecin, isoliert aus *Halo-bacterium salinarum*, ist ein kugelförmiges dodekames Protein, das mit hoher Affinität oxidierte Flavine bindet. Dagegen führt eine Reduktion der Flavine zur Dissoziation des Holoproteins in Apoprotein und freie Flavinliganden.^[5] Zur Untersuchung von ET-Prozessen durch DNA kann Dodecin auf Flavin-terminierter ds-DNA rekonstituiert werden, die auf Goldelektroden adsorbiert wurde. Wenn ET durch DNA möglich ist, sollte das Anlegen eines negativen Potentials zur Reduktion der Flavine mit nachfolgender Freisetzung von Apododecin führen. In ersten Studien schien ET durch DNA mit 20 bp jedoch nicht möglich zu sein.^[5b,f] Da in jenen Studien relativ lange gesättigte Ketten zur Anbindung der DNA an die Goldelektrode verwendet wurden, wodurch die ET-Wahrscheinlichkeit entscheidend verringert werden könnte, wurde die Länge dieser Verknüpfungen minimiert. Schema 1 zeigt den experimentellen Aufbau zur Untersuchung von ET durch ds-DNA mit 20 bp (experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen).

Für die Adsorption der Disulfid-modifizierten einzelsträngigen DNA (ss-DNA) wurden drei 1,2-Dithianringe verwendet (Schema 2), was eine besonders stabile Anbindung der DNA auf Gold^[6] über eine kürzere Distanz als bei der Verwendung einer üblichen Hexylthiolgruppe ermöglicht.^[2,3,5b] Die DNA-Sequenz wurde so gewählt, dass ein eindeutiges Hybridisierungsprodukt erhalten wurde. Für den

[*] Dr. Y. Yu, Dr. B. Heidel, T. L. Parapugna, S. Wenderhold-Reeb, Dr. G. Nöll
NRW Nachwuchsforschergruppe für Nanotechnologie, Organische Chemie, Fakultät IV, Department für Chemie und Biologie, Universität Siegen Adolf-Reichwein-Straße 2, 57076 Siegen (Deutschland)
E-Mail: noell@chemie.uni-siegen.de
Homepage: http://www.chemie-biologie.uni-siegen.de/oc/oc1/gruppe_noell/index.html

Dr. B. Song, Prof. Dr. H. Schönherr
Physikalische Chemie I, Fakultät IV, Department für Chemie und Biologie Universität Siegen (Deutschland)

Dr. Y. Yu
Aktuelle Adresse: College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen (V.R. China)

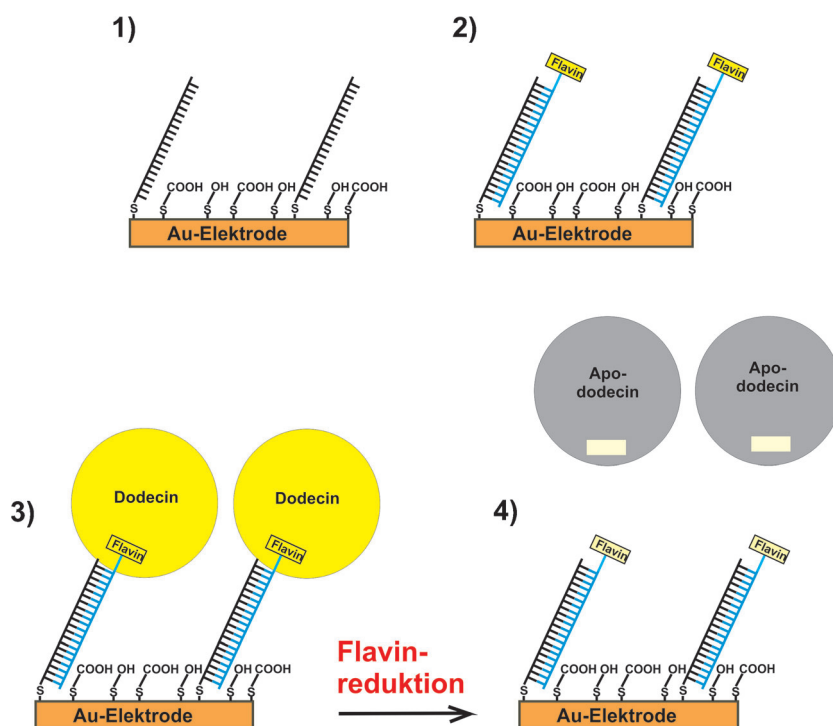
Dr. B. Song
Aktuelle Adresse: Department of Polymer Science and Engineering, College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Soochow University (V.R. China)

Prof. Dr. M. Grininger
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Buchmann Institut für Molekulare Lebenswissenschaften, Cluster of Excellence „Macromolecular Complexes“, Goethe Universität Frankfurt (Deutschland)

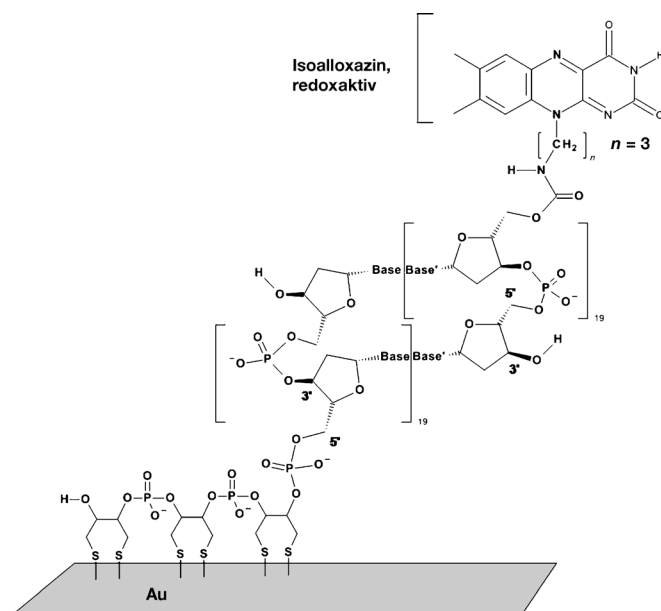
[**] Diese Arbeit wurde vom Europäischen Forschungsrat (ERC) im 7. EU-Forschungsrahmenprogramm (FP7/2007-2013)/ERC Grant agreement no. 240544, vom Land Nordrhein-Westfalen, der Alexander von Humboldt-Stiftung (Humboldt-Forschungsstipendium für Postdoktoranden an B.S.) und der DFG (Fördernr. INST 221/87-1 FUGG) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208987> zu finden.

Die Wiederverwertung dieses Beitrags ist gestattet in Übereinstimmung mit den Geschäftsbedingungen, die unter <http://angewandte.de/open> aufgeführt sind.



Schema 1. Oberflächenmodifikation zur Untersuchung von ET durch DNA. 1) Adsorption Disulfid-modifizierter ss-DNA auf Gold mit anschließender Adsorption einer 1:1-Mischung aus 4-Mercapto-1-butanol (MCB) und Mercaptopropionsäure (MPA), um unspezifisch adsorbierte DNA zu verdrängen. 2) Hybridisierung mit komplementärer, Flavin-modifizierter ss-DNA. 3) Rekonstitution von Dodecin. 4) Anlegen eines negativen Potentials. ET durch DNA führt zur Flavinderuktion, gefolgt von der Freisetzung von Apododecin (gezeigt wird nur eine der sechs Flavinbindungstaschen von Dodecin).



DNA-Sequenzen: (1,2-Dithian)₃ 5' AAC TAC TGG GCC ATC GTG AC 3'
3' TTG ATG ACC CGG TAG CAC TG 5' Flavin

Schema 2. Struktur und Sequenz der Flavin- und Disulfid-modifizierten DNA.

Nachweis, dass Dodecin spezifisch über die Flavinliganden gebunden wird, wurde vor der Proteinrekonstitution eine nichtbindende Apododecinvariante dA als Negativkontrolle zugegeben.^[5b] Auch der Abstand zwischen Flavin (oder Isoalloxazin) und DNA sollte minimiert werden. Hierfür wurden Flavin-DNA-Liganden (lediglich fünf Basen lang) aus unterschiedlich langen Flavinen (CofCn) und DNA (Oligo5, O5) synthetisiert. Nachdem Dodecin mit diesen Liganden rekonstituiert worden war, konnten Röntgenkristallstrukturen gemessen werden. In Abbildung 1A sind die Strukturen der Flavin-DNA-Liganden CofCn_O5 mit Hexyl-, Butyl-, Propyl- und Ethylgruppe ($n=6, 4, 3$ bzw. 2) an N(10) des Isoalloxazins gezeigt. Für alle Flavin-DNA-Liganden wurde Elektronendichte für die Isoalloxazinuntereinheit (samt der ersten beiden CH_2 -Gruppen) gefunden. Für den CofC4_O5-Liganden konnte zusätzliche Elektronendichte gefunden werden, die wahrscheinlich auf eine schwache Bindung der Kette sowie der ersten DNA-Base zurückzuführen ist. Für den CofC2_O5-Liganden wurde weitere Elektronendichte gefunden, die auf eine bindende Wechselwirkung zwischen Apoprotein und der Kette samt den ersten beiden DNA-Basen schließen lässt. Wie aus der Überlagerung der Liganden in Abbildung 1B ersichtlich ist, nimmt der

Isoalloxazinring von CofC2_O5 eine relativ tiefe Position in der Bindungstasche ein, ähnlich der von Lumiflavin, wohingegen die anderen Flavin-DNA-Liganden etwa dieselbe Position wie Riboflavin haben. Dies ist erstaunlich, weil CofC2_O5 etwa 25-mal schwächer bindet als CofC4_O5 ($K_d = 10 \mu\text{M}$ bzw. 400 nM), aber gleichzeitig eine tiefere Position einnimmt, was zuvor mit einer höheren Bindungsaffinität korreliert wurde.^[5e] Wie allerdings aus der Seitenansicht in Abbildung 1B hervorgeht, ist der Isoalloxazinring von CofC2_O5 seitlich abgekippt, wodurch sich die geringere Bindungsaffinität erklären lassen könnte.

Für elektrochemische Messungen schien ein Ligand mit $n=3$, gebunden nur über seine oxidierte Isoalloxazinstruktur, als der beste Kompromiss zwischen hoher Bindungsaffinität und kurzer ET-Distanz. Dodecin wurde in einer Durchflusszelle, die geeignet für SPR-Messungen in Kombination mit Elektrochemie war, rekonstituiert. Die während der schrittweisen Rekonstitution von Dodecin auf einer Flavin-terminierten DNA-Monolage und anschließenden elektrochemischen Messungen aufgenommenen SPR-Kinetiken sind in Abbildung 2 gezeigt. Nach Bildung einer DNA-Monolage gemäß Schema 1 (1–3) wurde zu Argon-gesättigtem Puffer gewechselt und ein negatives Potential angelegt (bis zu -650 mV gegen Ag/AgCl). Hierbei konnte keine Freisetzung von Apododecin (tE) erzielt werden. Zusätzlich wurden Cyclovoltammogramme (CVs) bei verschiedenen Vorschubge-

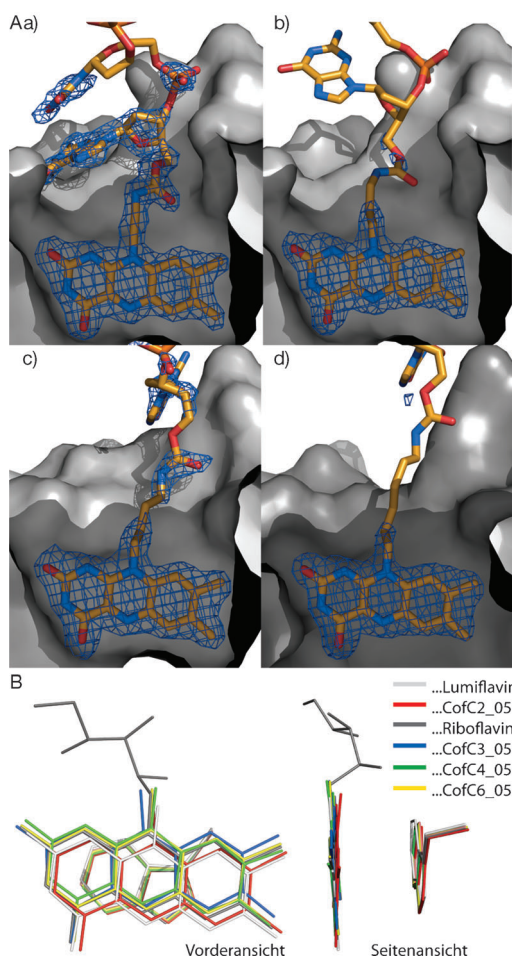


Abbildung 1. Röntgenkristallstrukturen der CofCn_O5 Flavin-DNA-Liganden in der Dodecin-tE-Bindungstasche. Dodecin ist als Apoprotein in Oberflächendarstellung (grau) mit eingebauten Liganden in Stabdarstellung gezeigt (orange C, blau N, rot O). Dodecin hat sechs Bindungstaschen für den Einbau von jeweils Dimeren von Flavinen in C₂-symmetrischer Weise. Zur vereinfachten Darstellung ist nur ein C₂-symmetrischer Teil einer Bindungstasche gezeigt. In der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>) hinterlegte Strukturen der Kennziffern 2vkg, 2vkl und 4b2h wurden für diese Abbildungen verwendet. A) tE-Dodecin mit gebundenem Liganden CofCn_O5 mit unterschiedlicher Länge der Isoalloxazin-DNA-verknüpfenden Alkylkette. CofC2_O5 (a) trägt eine Ethylkette, CofC3_O5 (b) Propyl, CofC4_O5 (c) Butyl und CofC6_O5 (d) Hexyl. Die Elektronendichte aus Strukturrechnungen ohne Ligand (so genannte Omit-Dichte) ist bei $\sigma = 1.5$ als blaues Netz gezeigt und für die Liganden hervorgehoben. Ungebundene Bereiche des Liganden, die nicht durch Elektronendichte bestimmt werden konnten, sind in einer möglichen Konformation dargestellt. B) Darstellung der Cα-Ketten-überlagerten tE-Dodecine mit CofCn_O5-Liganden (und Tryptophan, das Teil der Tasche ist) in Vorder- und Seitenansicht. Liganden sind nur durch ihre Isoalloxazinuntereinheit dargestellt. Wildtyp-Dodecin mit Riboflavin- und Lumiflavinliganden sind zum Vergleich gezeigt.

schwindigkeiten vor und nach Dodecinrekonstitution aufgenommen, aber in keinem der CVs konnte eine Flavinreduktion beobachtet werden. Um zu belegen, dass die Freisetzung von tE durch Reduktion dennoch möglich ist, wurde eine chemische Reduktion unter Verwendung einer Natriumdithionitlösung durchgeführt (Abbildung 2B). Durch chemi-

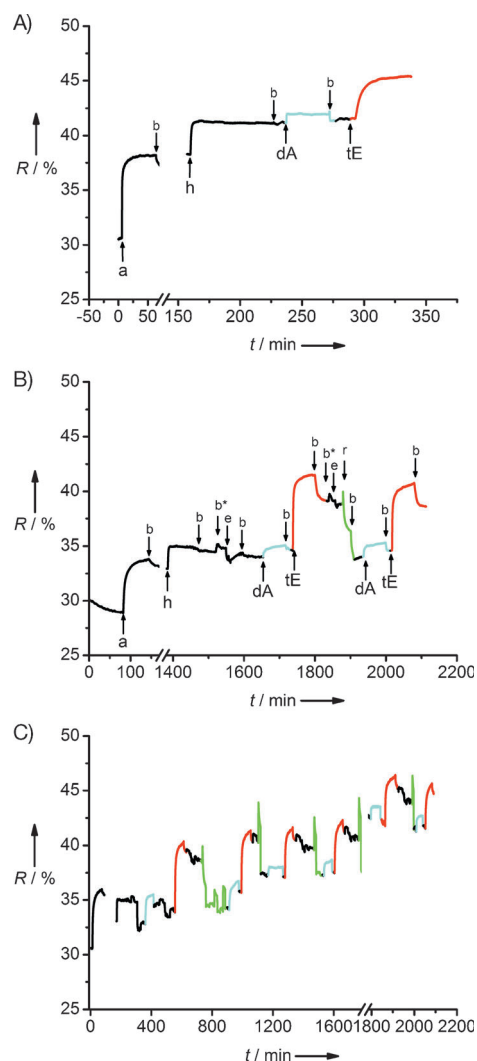


Abbildung 2. Kinetische SPR-Messkurven: A) Adsorption von Disulfid-modifizierter ss-DNA (a), Spülen mit Puffer (b), Hybridisierung mit Flavin-modifizierter ss-DNA (h), Inkubation von nichtbindendem Apododecin als Negativkontrolle (dA), Rekonstitution von Dodecin (tE). Während der Zugabe von MCB/MPA in Wasser nahm die Reflektivität R wegen der unterschiedlichen Brechungsindizes von Wasser und Puffer Werte von $< 10\%$ an (nicht gezeigt). B) Die experimentelle Vorgehensweise wurde um folgende Schritte erweitert: Spülen mit Argon-gesättigtem Puffer (b*), Elektrochemie (d. h. Anlegen eines Potentials von -550 mV gegen Ag/AgCl für 5 min, gefolgt von Cyclovoltammetrie (e)), chemische Reduktion mit Argon-gesättigter Natriumdithionitlösung (r). C) Langzeitmessung; Inkubation von dA/tE und anschließendes Spülen mit Puffer sind jeweils in Cyan/Rot gezeigt, chemische Reduktion und Spülen in Grün.

sche Reduktion und anschließendes Spülen mit Pufferlösung konnte Apododecin (tE) nahezu quantitativ freigesetzt werden. Anschließend wurde zunächst mit nichtbindendem (dA) und danach mit bindendem Apododecin (tE) versetzt. Zugabe von tE führte zur Rekonstitution von Dodecin, wodurch die Unversehrtheit der Flavin-terminierten DNA-Monolage nachgewiesen werden konnte. Das gesamte Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden konnten. Zur Überprüfung der Langzeitstabilität des Systems wurde eine ausgedehnte

Messreihe durchgeführt (gezeigt in Abbildung 2C und Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Nachdem Apododecin (tE) viermal spezifisch gebunden und durch chemische Reduktion wieder freigesetzt werden können, wurde die Durchflusszelle fünf Tage lang im Kühlschrank bei 8 °C aufbewahrt. Anschließend war es nach wie vor möglich, Apododecin anzubinden und wieder freizusetzen.

Zusätzlich untersuchten wir die Dodecinmonolage auf Gold mit Rasterkraftmikroskopie (AFM). Hierfür rekonstituierten wir Dodecin auf einer praktisch atomar ebenen „template stripped“-Goldoberfläche adsorbiert wurde, wie zuvor beschrieben. Die AFM-Bilder sind in Abbildung 3 gezeigt.

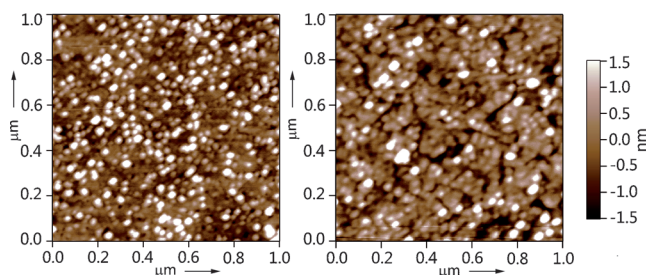


Abbildung 3. AFM-Bilder (aufgenommen an Luft) von Dodecin, rekonstituiert auf einer Flavin-terminierten ds-DNA-Monolage, die auf einer ebenen „template-stripped“-Goldoberfläche adsorbiert wurde. Links wurden dieselben DNA-Konzentrationen während Adsorption und Hybridisierung verwendet wie bei den SPR-Messungen, dagegen waren sie rechts um den Faktor 10 geringer.

Nach Rekonstitution von Dodecin war die Oberfläche mit dicht gepackten kreisförmigen Strukturen mit einer durchschnittlichen lateralen Ausdehnung von (12.5 ± 4) nm überzogen (Abbildung 3, links). Dabei wurde die Größe von Dodecin ohne Korrektur für den durch die AFM-Spitze verursachten Verbreiterungseffekt gemessen. Die wahre Größe nach Korrektur sollte höchstens die Hälfte der (12.5 ± 4) nm betragen. Dieser Wert stimmt mit dem Durchmesser von Dodecin (6–7 nm) überein. Daher gehen wir davon aus, dass es sich bei den kreisförmigen Strukturen um einzelne Dodecinmoleküle handelt. Um zu zeigen, dass wir die Oberflächenkonzentration von Dodecin kontrollieren können und es sich bei den kreisförmigen Strukturen zweifelsfrei um einzelne Dodecinmoleküle handelt, verringerten wir die Belegungsdichte der Flavine (indem wir die Konzentration der Disulfid- und Flavin-modifizierten ss-DNA während des Adsorptionsvorgangs um einen Faktor von 10 reduzierten). Wie in Abbildung 3, rechts, gezeigt, führte dies zu einer geringeren Belegungsdichte für Dodecin. Wegen des häufig beobachteten Spitzenverbreiterungseffekts erscheinen die kreisförmigen Strukturen in Abbildung 3 rechts etwas größer als links, es ist aber in beiden Fällen davon auszugehen, dass sie einzelnen Dodecinmolekülen entsprechen.

Während man davon ausgeht, dass DNA-vermittelter Ladungstransfer zwischen Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, über große Distanzen stattfindet, auch um dadurch Schädigungen des Genoms aufzuspüren,^[8] war in der vorliegenden Studie die zwischen Flavin/Flavoprotein und Goldelektrode kovalent verknüpfte ds-DNA nicht in der

Lage, ET-Prozesse zu ermöglichen, obwohl die Abstände Elektrode-DNA und DNA-Redoxzentrum minimiert wurden. Effizienter ET konnte sogar über größere Abstände zwischen Isoalloxazin und „molekularem Draht“ beobachtet werden, als das Flavoenzym Glucoseoxidase auf Goldelektroden rekonstituiert wurde, allerdings wurden hierbei statt DNA andere Moleküle (z.B. einwandige Kohlenstoffnanoröhren) als molekularer Draht eingesetzt.^[5f,9] In der Röntgenkristallstruktur fanden wir keine Elektronendichte für weite Bereiche der Verknüpfung zwischen Isoalloxazin und DNA, woraus sich schließen lässt, dass (auch nach Proteinrekonstitution) verschiedene Orientierungen von Redoxzentrum und DNA zueinander möglich sind. Dennoch konnte kein ET durch DNA beobachtet werden, woraus sich schließen lässt, dass ds-DNA (mit 20 oder mehr Basenpaaren) für eine Anwendung als molekularer Draht nicht geeignet ist. Dies ist im Widerspruch zu jüngsten Berichten, die ausschließlich auf cyclovoltammetrischen Messungen beruhen.^[2,3] Allerdings bedeutet die Tatsache, dass sich für ein an DNA gebundenes Redoxzentrum im Cyclovoltammogramm eine Reduktion beobachten lässt, nicht notwendigerweise, dass ET entlang des DNA-Basenstapels verläuft.^[5b,10] In weiteren Arbeiten an Dodecin-DNA werden wir untersuchen, ob ET bei verringerter Zahl an Basenpaaren und/oder geänderter Sequenz möglich ist.

Eingegangen am 9. November 2012
Online veröffentlicht am 26. März 2013

Stichwörter: DNA · Dodecin · Elektronentransfer · Flavin · Oberflächenplasmonenresonanz

- [1] a) T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1875–1878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1839–1842; b) T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480–11481; c) D. Fazio, C. Trindler, K. Heil, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 206–212; d) C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwogler, T. Carell, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1841–1844; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1763–1766; e) C. Behrens, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 1632–1633; f) C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3281–3289; g) B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1884–1887; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848–1851; h) A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 325–328; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 318–321; i) C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871–1876; j) N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4877–4883; k) H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2558–2565; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2454–2460; l) H.-A. Wagenknecht, *Funct. Org. Mater.* **2007**, 441–464; m) J. Joseph, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6070–6074.
- [2] J. D. Slinker, N. B. Muren, S. E. Renfrew, J. K. Barton, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 228–233.
- [3] J. D. Slinker, N. B. Muren, A. A. Gorodetsky, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2769–2774.
- [4] a) T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15010–15011; b) S. O. Kelley, N. M. Jackson, M. G. Hill, J. K. Barton, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 991–996; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 941–945; c) C. G. Pheaney, J. K. Barton, *Langmuir* **2012**, *28*, 7063–7070.

- [5] a) B. Bieger, L. O. Essen, D. Oesterhelt, *Structure* **2003**, *11*, 375–385; b) M. Grininger, G. Nöll, S. Trawöger, E.-K. Sinner, D. Oesterhelt, *Biointerphases* **2008**, *3*, 51–58; c) M. Grininger, H. Staudt, P. Johansson, J. Wachtveitl, D. Oesterhelt, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13068–13076; d) G. Nöll, S. Trawöger, M. von Sanden-Flohe, B. Dick, M. Grininger, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 834–837; e) M. Grininger, K. Zeth, D. Oesterhelt, *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 842–857; f) T. Nöll, G. Nöll, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3564–3576.
- [6] P. Liepold, T. Kratzmueller, N. Persike, M. Bandilla, M. Hinz, H. Wieder, H. Hillebrandt, E. Ferrer, G. Hartwich, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1759–1772.
- [7] R. Naumann, S. M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K. B. Hartman, I. Kaercher, I. Koepfer, J. Luebben, K. Vasilev, W. Knoll, *Langmuir* **2003**, *19*, 5435–5443.
- [8] a) A. K. Boal, J. C. Genereux, P. A. Sontz, J. A. Gralnick, D. K. Newman, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15237–15242; b) E. Yavin, E. D. A. Stemp, V. L. O'Shea, S. S. David, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3610–3614.
- [9] a) F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2165–2169; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2113–2117; b) Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner, *Science* **2003**, *299*, 1877–1881.
- [10] a) A. Anne, C. Demaille, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 542–557; b) A. Anne, C. Demaille, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9812–9823.