

DNA og metalioner:

Molekylærbiologi og nanoteknologi

Metal-DNA-nanoteknologi baner vejen for nye produkter inden for biomedicin, biosensorer og diagnostik.

Af Pratik Shah¹, Peter W. Thulstrup² og Morten J. Bjerrum²

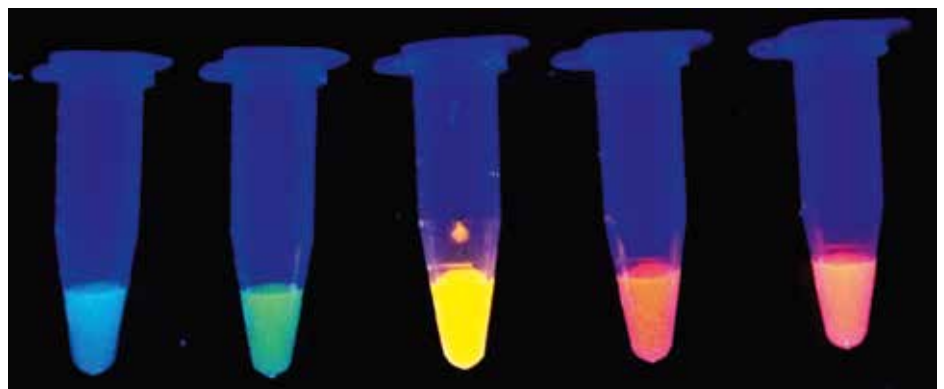
¹ Institut for Naturvidenskab og Miljø, Roskilde Universitetscenter

² Kemisk Institut, Københavns Universitet

DNA-komplekser af ædelmetaller repræsenterer en type unikke forbindelser med en lang række fascinerende og interessante egenskaber. Metalholdige DNA-forbindelser kan anvendes inden for biologiske målemetoder (biosensorer, billeddannelse, diagnostik) samt til udvikling af innovativ medicin og målrettet lægemiddellostgelse.

Et tværfagligt kig på DNA's rolle og potentiale

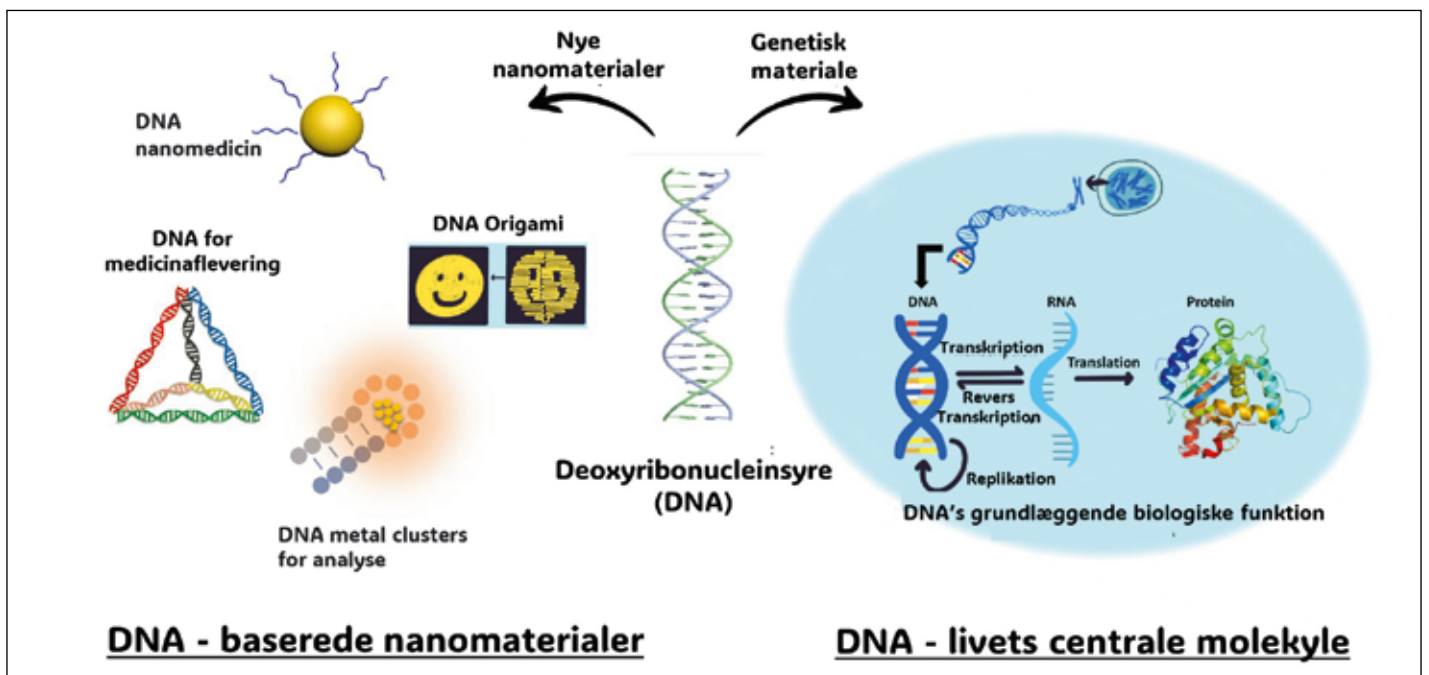
Nukleinsyrer (DNA og RNA, se faktaboks, side 12) er fascinerende molekyler for både biologer, kemikere og fysikere.



Figur 2. Eksempler på fluorescerende sølv nanoclusters bundet til DNA under UV-belysning i vandig opløsning, hvor der kan ske elektronisk excitation via DNA-baserne.

For biologer er DNA og RNA essentielle kernekomponenter og livets kode som bærere af genetisk information på tværs af generationer. For kemikere er DNA og RNA spændende makromolekyler,

der via kemisk syntese kan udstyres med nye egenskaber. For fysikere er DNA en byggesten til at designe nye materialer, der kan samle sig selv til komplekse geometriske strukturer på nanoskala,



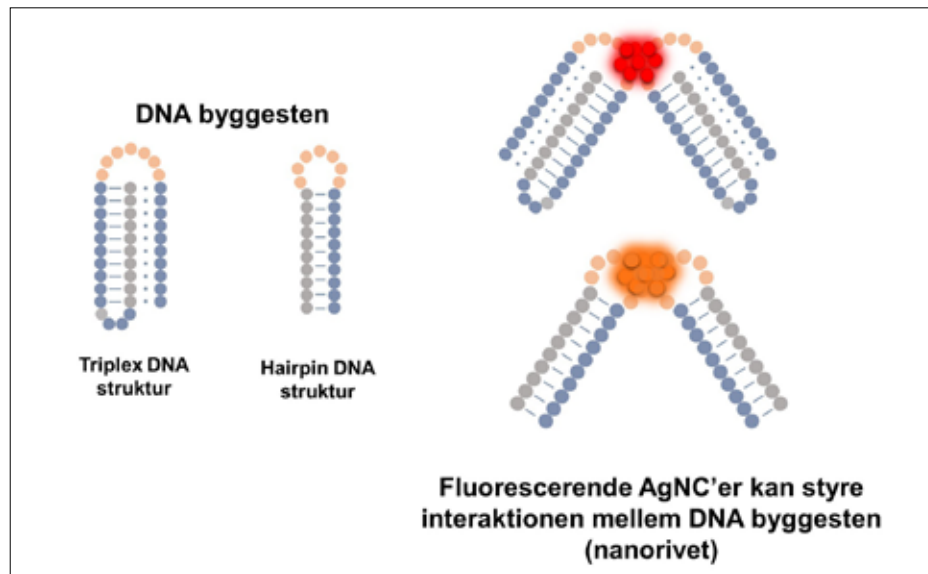
Figur 1. DNA - et molekyle med flere roller i og uden for biologien. DNA udgør en kernekomponent i biologi i form af genetisk materiale, der lagrer den information, der kræves for cellernes funktion. Når det tages ud af biologien, er det et nyt nanomateriale med mange forskellige anvendelser.

hvilket tiltrækker yderligere interesse fra områder inden for materiale- og ingeniørvidenskab. DNA-nanoteknologi er således opstået på en tværfaglig platform, der integrerer viden, ideer og visioner fra flere discipliner for at udvikle nye DNA-baserede nanomaterialer (figur 1). DNA er blandt andet interessant på grund af den forudsigelige måde, hvorpå DNA opfører sig, hvilket er centralt for dets biologiske rolle og dets replikation. I de senere år er det imidlertid erkendt, at den naturlige DNA-kemi er langt mere varieret end først antaget, hvilket vi vender tilbage til senere i artiklen.

Alternativ DNA-kemi: Metalioners unikke samspil med nukleinsyrer

Gennem årene har kemikere udforsket mange forskellige alternativer til den naturligt forekommende DNA-kemi. Den kemiske struktur af DNA er ideel til metalbinding via fosfatgrupperne i DNA-molekylets ryggrad og via de heteroaromatiske nukleobaser. Når DNA tages ud af det biologiske miljø og ned i reagensglasset, udvides mulighederne for at udnytte samspillet mellem DNA og metalioner drastisk. Metalioner interagerer fundamentalt med nukleinsyrer på én af tre måder. For det første danner metalioner såsom magnesium, natrium og kalium elektrostatiske interaktioner med fosfatgrupperne. For det andet interagerer en række overgangsmetalioner, herunder også en række lanthanider, med både fosfat og baser. For det tredje interagerer blandt andet metalioner af Ag, Au og Cu med nitrogenholdige baser, hvor de i det væsentlige kan erstatte hydrogenbinding med metalmedieret baseparring.

I laboratoriet kan DNA via selvansamling antage bestemte 3-dimensionelle strukturer via valg af sekvenskomplementaritet og kemiske additiver. Interaktioner mellem DNA og metalioner åbner nye muligheder for at bruge DNA til at danne nanomaterialer med en kontrolleret morfologi og unikke egenskaber. DNA-strukturer kan også udnyttes til at fungere som skabelon til at organisere metalliske nanomaterialer, nemlig de såkaldte metal-nanoclusters. Metal-nanoclusters (dansk: nanoklynger) er mindre end 2 nm i størrelse og er en særlig gruppe af nanopartikler, idet disse nanoclusters for et givent metal består af en blanding af positive metalioner og neutrale metalatomer. Mange ædle grundstoffer såsom Cu, Au og Ag har vist sig at danne nanoclusters med attraktive optiske egenskaber. Sølv nanoclusters (AgNC) har fået særlig op-



Figur 3. Metalmedieret baseparring af DNA med indkapslede AgNC genererer usædvanlige strukturer og nyttige fluorescerende farver. Strukturen af DNA'et kan bruges til at ændre de fotofysiske egenskaber af den bundne AgNC ved at binde DNA-byggesten sammen med såkaldte nanonagler (engelsk: nanorivets).

mærksomhed på grund af deres stærke og justerbare fluorescens, fotostabiliteten og den store forskydning mellem excitation- og emissionsbølglængden (figur 2). Man kan betragte et DNA-kompleks af et AgNC som et multi-atom fluorescerende nanomateriale.

DNA-indkapslede fluorescerende sølv nanoclusters

De attraktive egenskaber ved AgNC'er blev først undersøgt i gasfase [1], men blev bragt tættere på bioteknologiske og biomedicinske anvendelser af en vigtig opdagelse i 2004. Her viste Petty *et al.*, at DNA kan bruges som skabelon til syntese af fluorescerende AgNC'er i en vandig opløsning [2]. Brugen af biokompatibelt DNA som skabelon og syntese under fysiologisk relevante forhold åbnede nye muligheder for praktiske biomedicinske anvendelser af DNA-indkapslede fluorescerende sølv nanoclusters (DNA/AgNC'er). Sølvioner foretrækker at binde til N3 fra cytosiner samt N7 og O6 i guanin-baser. Cytosinrige DNA'er er nogle af de mest brugte skabeloner til binding af Ag^0/Ag^+ . Der har således inden for de sidste 10 år været en eksplosion i antallet af DNA-sekvenser, der har vist sig at indkapsle fluorescerende AgNCs rettet mod anvendelse af DNA/AgNCs fluorescens i biosensorer, billeddannelse og i diagnostik.

I starten betragtedes DNA som en rigid skabelon, der fungerer som et passivt templat bindingssted for den fluorescerende Ag^0/Ag^+ nanoclusterstruktur. Nye undersøgelser har imidler-

tid godtgjort, at DNA også er en aktiv del af systemet, så DNA-sekvensen og strukturen kan bruges til at modulere fluorescensen af AgNC'er. Vi viste allerede i 2012 [3], at den sekundære struktur af DNA kan spille en vigtig rolle i syntesen af fluorescerende AgNC'er. I 2018 viste vi endvidere [4], at den tertiære struktur af DNA også kan spille en vigtig rolle i at modulere de fluorescerende egenskaber af AgNC'er. I dette system gav den syntetiske AgNCs anledning til en dimerstruktur af DNA med orange fluorescens, mens AgNC'er i den monomere DNA-hårnålestruktur udsendte rød fluorescens.

DNA-dimerisering via interagerende hårnåle

Vores første antagelse var, at den orange AgNC dimerstruktur var en dimer dannet via Watson-Crick-baseparring af dobbeltstrenget DNA, hvor AgNC'er er bundet til cytosiner i den dobbeltstregede DNA-struktur. Denne antagelse blev tilsyneladende understøttet af den første rapporterede krystalstruktur af grøn-emissive AgNC'er. Vores fortsatte studier af den dimere DNA-struktur viste dog utvetydigt til vores overraskelse, at den dimeriserede DNA-struktur involverede metal-medierede baseparinteraktioner mellem to DNA-molekyler. De orange fluorescerende AgNC'er forbinder DNA via non-konventionel baseparring, der involverer Cytosin-Ag-Ag-Cytosin-binding. Flere komplementære tilgange viste endegyldigt, at den baseparring, der identificeres her, er unik og involverer basepar-metal og metal-metal-interaktioner, ligesom dette

fremgår af den første krystalstruktur af et nærinfrarødt fluorescerende DNA-AgNC kompleks [5].

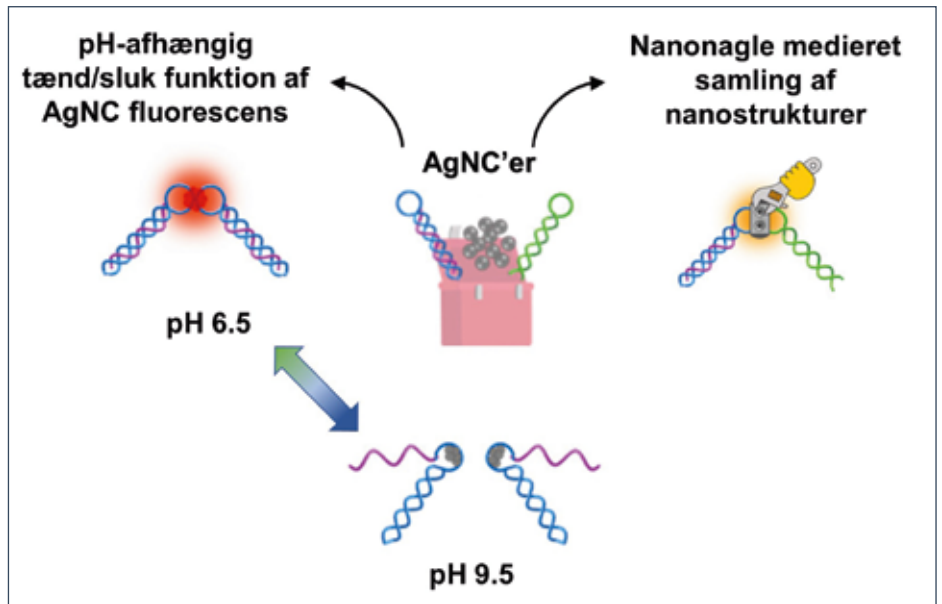
Vi betragter vores observation af sammenkædning af to DNA-hårnåle som en meget vigtig fundamentel egenskab ved AgNC'er (figur 3, side 11). Denne vekselvirkning repræsenterer en ny type bindingsinteraktion mellem naturligt genetisk materiale, der er fuldstændig styret af det syntetiske nanomateriale, og som ikke kan findes i naturen. Forståelsen af de kræfter, der driver vekselvirkningen, kræver nærmere undersøgelser, så man på sigt kan forudsige og modulere fluorescensen af DNA-AgNC systemer.

Hoogsteen baseparring som alternativt template

Efter at have påvist betydningen af den sekundære struktur for DNA i forhold til de fluorescerende egenskaber af AgNC'erne, undersøgte vi, om DNA kan forsyne de indkapslede AgNC'er med nye egenskaber ved at erstatte hårnåle-DNA-strukturen med den mindre kendte triplex-DNA-struktur (figur 4).

I de seneste år har Hoogsteen baseparret triplex-DNA-struktur fået meget opmærksomhed på grund af dets potentiale i oligo-baserede terapeutika, der

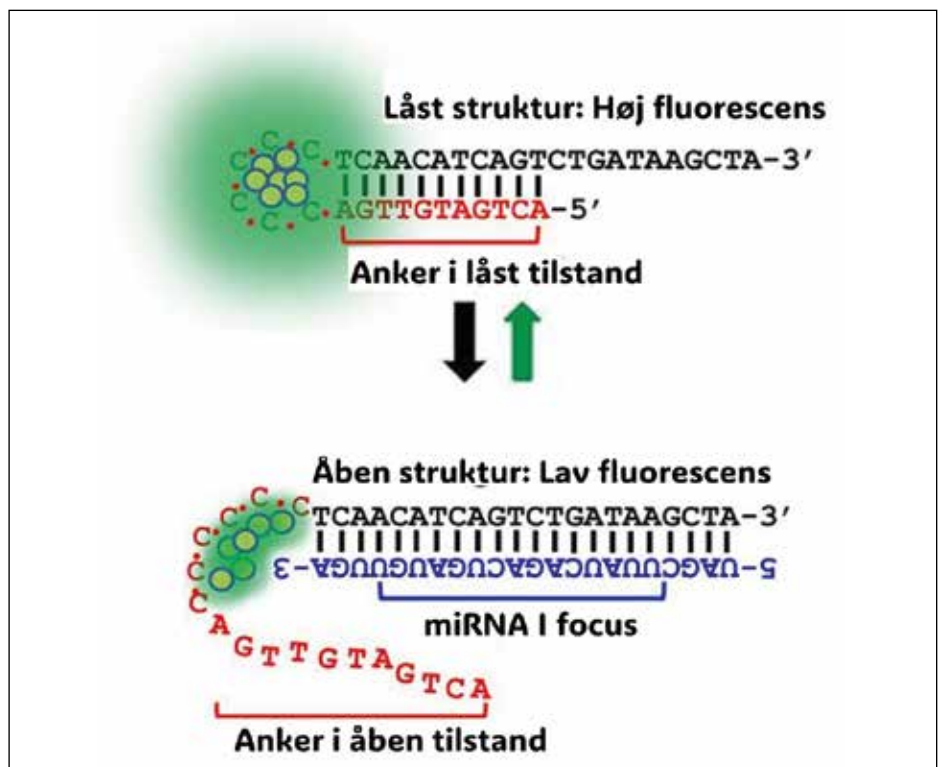
■ DNA er bygget op af nukleotider. Hvert nukleotid består af en nitrogenholdig nukleobase, enten cytosin (C), guanin (G), adenin (A) eller thymin (T), såvel som en sukker kaldet deoxyribose og en fosfatgruppe. Nukleotiderne forbindes med hinanden i en kæde af kovalente bindinger mellem deoxyribose fra det ene nukleotid og fosfat fra det andet, hvilket resulterer i en alternerende deoxyribose-fosfat-rygrad. Mest kendt er den klassiske struktur afdækket af Francis Crick, Rosalind Franklin, James Watson og Maurice Wilkins. Dette er en såkaldt B-form, dobbeltspiralformet struktur sammensat af to antiparallelle DNA-streng, der holdes sammen af Watson-Crick-basepar, hvorved fire nitrogenholdige baser interagerer via hydrogenbindinger på en specifik måde, nemlig Adenin-parring med Thymin og Guanin-parring med, Cytosin. Ribonukleinsyre (RNA) består ligesom DNA af kæder af nukleotider, men i RNA indgår ribose i de kovalente bindinger og nukleobasen thymin er erstattet med uracil (U).



Figur 4. Hoogsteen-Triplex-baseret DNA nanoenhed, der modulerer den fluorescerende egenskab af sølv nanoclusters. Som reaktion på pH kan fluorescensen af sølv nanoclusters tændes og slukkes reversibelt. En nanorivet, der kan åbnes og lukkes som reaktion på pH.

kan hæmme molekylære processer som transkription, translation og protein-DNA-interaktion. Et andet vigtigt aspekt af triplex-DNA er evnen til reversibelt at ændre dets struktur som reaktion på pH. Hoogsteen basepar destabiliseres ved basisk pH, mens det kan gendanne strukturen ved sur pH. Ved at erstatte hårnåle-DNA-struktur med Hoogsteen-baseparret triplex-DNA-struktur fandt vi ud af, at fluorescerende AgNC'er

blev dynamisk pH-responsive [6]. Dette var et interessant casestudie, som viste, at et DNA-biomolekyle kan regulere egenskaberne af et nanomateriale. DNA-molekylet vil "forneemme" ændringerne i pH og vil reversibelt ændre konformation som reaktion på pH, hvilket vil ændre den fluorescerende egenskab af AgNC'er. Dette gjorde det muligt for os at udvikle en pH-følsom DNA-AgNC, der potentielt kan vise pH-variationer



Figur 5. Nye teknologier til sygdomsdiagnose. Fluorescens af sølv nanoclusters kan for eksempel bruges til at detektere mikroRNA-biomarkører på en hurtig og enkel måde.

i cellulære eller subcellulære miljøer, og dermed give indsigt i pH-afhængige processer og interaktioner via ændret AgNC emission.

Desuden forventer vi, at vores resultater inspirerer til udvikling af pH-responsive DNA-systemer, der selektivt kan frigive associerede molekyler, såsom lægemidler eller kontraststoffer, via reaktion på specifikke pH-betingelser med henblik på målrettet levering og forbedret terapeutisk effektivitet. Som et kuriosum mener vi, det er bemærkelsesværdigt, at vi har udviklet et DNA-baseret nanomateriale, der involverer tre forskellige typer af baseparringssystemer i en enkelt samling: Watson-Crick hydrogenbaseparring, Hoogsteen baseparring og syntetisk metal nanocluster-medieret baseparring [6].

Nye muligheder med RNA

Inden for det sidste årti har man identificeret en række RNA-molekyler i cellerne, som er med til at styre cellernes funktion på måder, man ikke var klar over tidligere. Disse RNA-typer kan ofte fungere som indikatorer for specielle tilstande, blandt andet i forbindelse med

sygdom. Variationer i niveauerne af bestemte såkaldte mikroRNA-biomarkører (miRNA) er blevet identificeret i flere sygdomme som cancer, diabetes, neurodegenerative og hjerte-kar-sygdomme. Imidlertid er fraværet af egnede metoder til påvisning af miRNA'er et af de begrænsende trin, der forhindrer brugen af miRNA'er som biomarkører til diagnose i klinisk sammenhæng. Ved at bruge den fluorescerende egenskab af DNA/AgNC'er har vi undersøgt mulighederne for at udvikle nye biosensorer rettet mod miRNA'er til tidlig sygdomsdiagnostik ved for eksempel cancer (figur 5). Vi har således demonstreret en hurtig, enkel, billig og effektiv brug af DNA/AgNC'er til effektiv måling af mikroRNA-biomarkører [7]. Vi forudser, at der kommer reelle medicinske og diagnostiske gennembrud på forskellige områder via denne teknologi.

Anvendelserne af metal-DNA-nanoteknologi er enorme, og kan også komme til at omfatte områder såsom avanceret nanoelektronik og miljøovervågning, og vi ser frem til en spændende fremtid for disse ekstraordinære hybridstrukturer.

E-mail:

Morten J. Bjerrum: mobj@chem.ku.dk

Peter W. Thulstrup: pwt@chem.ku.dk

Pratik Shah: shah@ruc.dk

Referencer

1. Felix, C., *et al.*, Ag⁸ fluorescence in argon. *Phys Rev Lett* 86, 2001, 2992-5.
2. Petty, J.T., *et al.*, DNA-templated Ag nanocluster formation. *Journal of the American Chemical Society* 126, 2004, 5207-12.
3. Shah, P., *et al.*, Design aspects of bright red emissive silver nanoclusters/DNA probes for microRNA detection. *ACS Nano* 6, 2012, 8803-14.
4. Shah, P., *et al.*, The structural shift of a DNA template between a hairpin and a dimer tunes the emission color of DNA-templated AgNCs. *Nanoscale* 10, 2018, 20717-22.
5. Cerretani, C., *et al.*, Crystal structure of a NIR-Emitting DNA-Stabilized Ag(16) Nanocluster. *Angew Chem Int Ed Engl* 58, 2019, 17153-57.
6. Nagda, R., *et al.*, Silver Nanoclusters Serve as Fluorescent Rivets Linking Hoogsteen Triplex DNA and DNA Structures. *ACS Nano* 16, 2022, 13211-22.
7. Shah, P., *et al.*, Locking-to-unlocking system is an efficient strategy to design DNA/silver nanoclusters (AgNCs) probe for human miRNAs. *Nucleic Acids Res* 44, 2016, e57.

VISIONS IN CHEMISTRY

THE TORKIL HOLM SYMPOSIUM 2024

Copenhagen, Jan. 26-27, 2024

World Class Speakers
(in first name alphabetical order)

Exec. Director	Blair Wood	Merck, USA
Professor	Emily Balskus	Harvard University, USA
Professor	Franziska Schönebeck	Aachen University, Ger.
Professor	Hendrik Dietz	Technical University München
Professor	Laura Kiessling	MIT, USA
Professor	Mogens Brøndsted Nielsen	University of Copenhagen
Professor & Nobel Laureate	Morten Meldal	University of Copenhagen
Professor	Omar Yaghi	UC Berkeley, USA
Professor	Paolo Melchiorre	University of Bologna, Italy
Professor	Varinder Aggarwal	University of Bristol, UK

The Sponsor

The Torkil Holm Symposium "Visions in Chemistry" will take place in Copenhagen thanks to a generous donation from the Torkil Holm Foundation.

The late Dr. Phil. Torkil Holm (1924-2021) was a distinguished researcher in organic chemistry at the Technical University of Denmark.



ATV

The Symposium Themes

Topics to be presented include: molecular nanotechnology, chemical biology, drug discovery and delivery, organometallic catalysis, molecular bioscience, organic functional systems, and total synthesis of complex target molecules.

The Aim

The aim of the symposium is to bring together world-leading experts from both academia and industry to present a broad range of topics within the field of chemical science.

Learn more at



For further information please see atv.dk or contact Symposium Coordinator Mette Gad at thsymposium@atv.dk or at +4551965955