

Bis(hydroperoxy)naphthalimid als „Photo-Fenton-Reagens“: sequenzspezifische photochemische DNA-Spaltung

Von Seiichi Matsugo, Shosuke Kawanishi, Koji Yamamoto, Hiroshi Sugiyama, Teruo Matsuura und Isao Saito*

Professor Kurt Schaffner zum 60. Geburtstag gewidmet

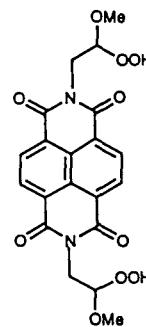
Die Rolle des Hydroxylradikals HO[·] in biologischen Systemen stößt auf großes Interesse^[1]. Daher wurden mehrere Versuche unternommen, leistungsfähige Methoden für die Erzeugung von Hydroxylradikalen zu entwickeln, die ohne Übergangsmetalle und Wasserstoffperoxid auskommen^[2, 3]. Unser Ziel ist die Entwicklung eines organischen Hydroxylradikal-Vorläufers, der nach niedrigerenergetischer Bestrahlung, etwa im langwelligen UV- (> 350 nm) oder im sichtbaren Bereich, Hydroxylradikale in reiner Form liefert. Solche Verbindungen, sogenannte Photo-Fenton-Reagentien, sind als steuerbare und mechanistisch weniger komplizierte HO[·]-Quellen für Anwendungen in einer Reihe von biologisch wichtigen Reaktionen wie Vernetzung von Biopolymen^[4] sowie DNA- und Proteinspaltungen^[5, 6] besonders interessant. Der Ansforderungskatalog beinhaltet einfache Synthese, Stabilität bei Raumtemperatur, Löslichkeit in wässrigen Solventien und Fähigkeit zur Freisetzung von Hydroxylradikalen nach Bestrahlung mit langwelligem Licht.

Erste Untersuchungen hatten gezeigt, daß man aus Hydroperoxyphthalimiden durch Bestrahlung mit $\lambda > 280$ nm photochemisch Hydroxylradikale erzeugen kann^[3]. In der vorliegenden Arbeit wird ein Naphthalimid-Derivat mit einer symmetrischen Bis(hydroperoxy)-Gruppierung vorgestellt, das in der Hoffnung auf eine höhere HO[·]-Ausbeute pro Molekül und eine intensivere Absorption bei größeren Wellenlängen synthetisiert wurde, und seine Eignung als photochemische HO[·]-Quelle sowie zur sequenzspezifischen Spaltung von doppelsträngiger DNA an der 5'-Position von 5'-GG-3'-Sequenzen belegt.

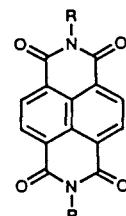
Das Bis(hydroperoxid) **1** wurde in Dichlormethan bei 0 °C aus dem entsprechenden Diacetal **2** durch Behandlung mit etherischem Wasserstoffperoxid im Überschuß in Gegenwart von Trifluormethansulfonsäure (1 Äquivalent) und anschließendes Umkristallisieren hergestellt (Ausbeute: 67%). Das thermisch stabile Hydroperoxid **1**^[7] ist in wässrigen organischen Solventien löslich (bis zu 0.25 mM in Acetonitril/Wasser 8/92) und weist eine starke Absorptionsbande bei 377 nm auf ($\lg \epsilon = 4.45$).

Die Photolyse von **1** bei 366 nm in Acetonitril unter Stickstoff verlief zügig und lieferte quantitativ den Ester **3** (Quantenausbeute $\phi = 0.18$ ^[8]). In Gegenwart von Adamantan (5 Äquivalente) als HO[·]-Acceptor wurden 1-Adamantanol, 2-Adamantanol und Adamantanone in Ausbeuten von 30, 15 bzw. 6% bezogen auf **1** erhalten; durch Zugabe eines HO[·]-Fängers wie Dimethylsulfoxid wurde die Bildung dieser Verbindungen unterdrückt. Das Auftreten von Hydroxylradikalen bei der photochemischen Zersetzung von **1** wurde ESR-spektroskopisch durch Spineinfang mit 4,5-Dihydro-5,5-dimethyl-3H-pyrrrol-N-oxid (DMPO) bestätigt^[3]. Kurze Bestrahlung einer Lösung von **1** (100 µM) und DMPO (1.5 mM)

in Natriumcacodylat-Puffer (Me₂AsONa, pH 7.0) bei 366 nm führte zu intensiven, für das Hydroxylradikal-DMPO-Addukt charakteristischen ESR-Signalen^[9] (Quartett (1:2:2:1), $a_N = a_H = 14.8$ G, $g = 2.0058$). Die ausschließliche Bildung von **3** bei gleichzeitiger Erzeugung von HO-Radikalen ist in Einklang mit einer Übertragung des Acetal-H-Atoms auf die Carbonylgruppe des Naphthalimids und der anschließenden Spaltung der labilen O-O-Bindung des Diradikals **4**^[10] und kann nicht mit einer direkten, durch intramolekulare Energieübertragung vom angeregten Naphthalimid-Chromophor eingeleiteten Homolyse der O-O-Bindung erklärt werden^[3].



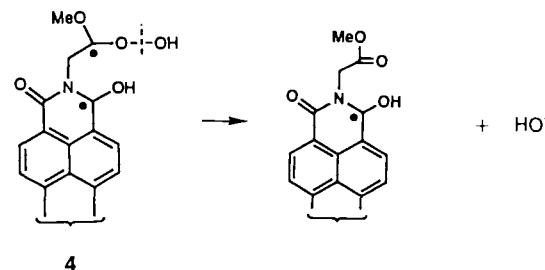
1



2; R = CH₂CH(OMe)₂

3; R = CH₂CO₂Me

5; R = CH₂CH(CH₃)₂



Wir haben dann die Spaltung von DNA-Strängen in Gegenwart von **1** an circulärer Supercoil- ϕ X174-RFI-DNA (Form I) untersucht. Die Bildung von DNA der Formen II und III belegt die Spaltung von Einzelstrang- bzw. zu einem geringen Anteil von Doppelstrang-DNA bei höherem Umsatz (Tabelle 1). Zugabe von Natriumbenzoat als HO[·]-Fänger verminderte die DNA-Spaltung beträchtlich^[11]. Die Basen- und Sequenzspezifität der DNA-Spaltung wurde mit ³²P-endmarkierten DNA-Fragmenten aus dem c-Ha-ras-1-Humanprotooncogen^[12] untersucht (Abb. 1). Das Hydroperoxid **1** induziert die Spaltung von DNA-Strängen durch

Tabelle 1. Spaltung von circulärer Supercoil- ϕ X-174-RFI-DNA (Form I) in gefurchte circuläre (Form II) und lineare DNA (Form III) durch Bestrahlung von **1** [a].

| Konz. von 1 (µM) | % Form I [b] | % Form II [b] | % Form III [b] |
|-------------------------|--------------|---------------|----------------|
| 100 | | 88.0 | 12.0 |
| 10 | 23.8 | 72.4 | 3.8 |
| 1 | 69.5 | 28.4 | 2.1 |
| 0 [c] | 83.1 | 16.9 | |

[a] Die Reaktionsmischung mit 25 µM DNA (Form I) und unterschiedlichen Konzentrationen an **1** in 50 mM Natriumcacodylat-Puffer (pH 7.0) wurden 20 min bei 0 °C bestrahlt (Abstand von der Lichtquelle: 10 cm) und gelektrophoretisch an Agarose analysiert. [b] Die Werte wurden durch Densitometrie nach Anfärbung mit Ethidiumbromid ermittelt. [c] Die verwendete DNA enthielt eine geringe Menge DNA der Form II.

[*] Prof. Dr. I. Saito, Dr. H. Sugiyama, Prof. T. Matsuura
Department of Synthetic Chemistry, Faculty of Engineering
Kyoto University
Kyoto 606 (Japan)

Dr. S. Matsugo
Kobe University of Mercantile Marine
Kobe 658 (Japan)

Dr. S. Kawanishi, K. Yamamoto
Department of Public Health, Faculty of Medicine
Kyoto University
Kyoto 606 (Japan)

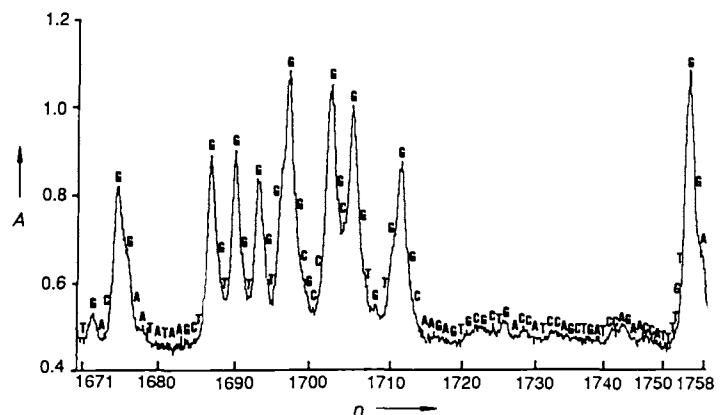


Abb. 1. Positionsspezifität bei der DNA-Spaltung durch Bestrahlung von 1. Eine Lösung mit ^{32}P -5'-endmarkierten 261-bp-Fragment (Avail *1645-XbaI 1905) des c-Ha-ras-1-Humanprotooncogens [12] und $10 \mu\text{M}$ 1 in 50 mM Natriumacrydat-Puffer (pH 7.0) wurde 20 min unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen bestrahlt. Nach Behandlung mit Piperidin (1 M, 90 °C, 20 min) wurden die DNA-Fragmente gelektrophoretisch getrennt (8% Polyacrylamid/8 M Harnstoff). Die durch die photochemische Reaktion und nachfolgende Behandlung mit Piperidin gebildeten relativen Mengen an Oligonukleotiden wurden mit einem Laser-Densitometer bestimmt. n = Nukleotid-Zahl des DNA-Fragments (von links nach rechts: 5' → 3'); A = Absorption.

nach der Bestrahlung zugegebenes Piperidin bevorzugt an der 5'-Position von 5'-GG-3'-Sequenzen. An anderen Positionen, auch an einzelnen G-Resten, trat keine Spaltung auf. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu der durch Singulett-Sauerstoff induzierten DNA-Photospaltung, bei der die Spaltung nach Behandlung mit Piperidin in gleicher Weise an allen G-Positionen eintritt^[13]. Bei Kontrollexperimenten führte die Bestrahlung der zu 1 verwandten Naphthalimid-Derivate 2 und 5 in keinem Fall zu DNA-Spaltung, auch nach Behandlung mit Piperidin nicht. Diese Ergebnisse zeigen die entscheidende Rolle der Hydroperoxy-Gruppierung in 1 bei der spezifischen photochemischen DNA-Spaltung und widerlegen klar eine oxidative DNA-Spaltung mit aus dem angeregten Naphthalimid gebildeten Singulett-Sauerstoff.

Die DNA-Spaltung wurde durch Behandlung mit Piperidin bei 90 °C etwa zehnmal stärker; dies spricht dafür, daß das Hydroxylradikal bevorzugt mit der DNA-Base reagiert, vor allem mit Guanin, und nicht mit dem Kohlenhydrat-Rückgrat^[5c, d, e, 14]. Doppelsträngige DNA wird von Hydroxylradikalen bei Behandlung mit Piperidin normalerweise an jedem Nucleotid, allerdings mit einer gewissen Bevorzugung der G- und T-Positionen, gespalten^[5c, 15b]. Nach unserer Meinung ist daher die Spezifität der Spaltung mit 1 eine Folge der selektiven Bindung von 1 an 5'-GG-3'-Sequenzen^[16].

Diese sehr wirkungsvolle Methode zur Erzeugung von Hydroxylradikalen bietet sich auch für Anwendungen in einer Anzahl anderer biologischer Systeme an, bei denen Hydroxylradikale benötigt werden.

Eingegangen am 5. März 1991 [Z 4472]

CAS-Registry-Nummern:

1, 133803-07-8; 2, 136144-94-0; 3, 136144-95-1; 5, 136144-96-2; HO⁺, 3352-57-6.

[1] a) B. H. Bielski, J. M. Gehicki, *Free Radicals Biol.* 1 (1977) 1; b) W. A. Pryor (Hrsg.): *Free Radicals in Biology*, Vol. 1–4, Academic Press, Orlando, FL, USA 1976–1978; c) B. Halliwell, M. C. Gunteridge, *Biochem. J.* 279 (1984) 1; d) H. Sies: *Oxidative Stress*, Academic Press, New York 1985; e) D. Shulte-Frohlinde, K. Hildenbrand in F. Minisci (Hrsg.): *Free Radicals in Synthesis and Biology*, Kluwer, Dordrecht 1989, S. 335.

[2] Zur Photolyse oder Radiolyse von Wasser siehe [1].

[3] I. Saito, M. Takayama, T. Matsuura, S. Matsugo, S. Kawanishi, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 883.

[4] a) S. A. Lesko, J. L. Drocourt, Y. Shu Uin, *Biochemistry* 21 (1982) 5010; b) K. J. A. Davis, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9895; c) T. M. Rana, C. F. Meares, *Bioconjugate Chem.* 1 (1990) 357.

- [5] a) R. P. Herberg, P. B. Dervan, *Biochemistry* 23 (1984) 3934; b) J. D. Tullius, B. A. Dombroski, *Science* 230 (1985); c) S. Inoue, S. Kawanishi, *Cancer Res.* 47 (1987) 6522; d) C. von Sonntag: *The Chemical Bases of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London 1987, S. 221; e) R. Prigodich, C. T. Martin, *Biochemistry* 29 (1990) 8017; f) D. P. Mack, J. P. Sluka, J. A. Shin, J. H. Griffin, M. I. Simon, P. B. Dervan, *ibid.* 29 (1990) 6561.
- [6] a) T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 2457; b) A. Schepartz, B. Cuenoud, *ibid.* 112 (1990) 3247; c) D. Hoyer, H. Cho, P. G. Schultz, *ibid.* 112 (1990) 3249.
- [7] $F_p = 142$ –145 °C (Zers.); UV (CH_3CN): λ_{max} [nm] = 340 ($\lg \epsilon = 4.20$), 357 (4.38), 377 (4.45); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 3.59 (s, 6 H), 4.40 (dd, $J = 2.8, 14$ Hz, 2 H), 4.67 (dd, $J = 8.2, 14$ Hz, 2 H), 4.91 (dd, $J = 2.8, 8.2$ Hz, 2 H), 8.85 (s, 4 H), 9.56 (s, 2 H, OOH); MS: m/z 446 (M^+), 410.
- [8] Die Quantenausbeute wurde mit Phenylglyoxalsäure ($\phi = 0.72$ bei 365 nm) als Actinometer bestimmt.
- [9] E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman, *Arch. Biochem. Biophys.* 20 (1980) 1.
- [10] Intramolekulare Elektronenübertragung von der Methoxygruppe der Seitenkette würde ein ähnliches Diradikal 4 liefern; siehe a) P. H. Mazzochi, *Org. Photochem.* 5 (1981) 421; b) W. M. Horspool in J. D. Coyle (Hrsg.): *Photochemistry in Organic Synthesis*, Royal Society of Chemistry, London 1986, S. 61.
- [11] Zugabe von Natriumbenzoat (1 mM) in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ 1 führte zu vollständiger Hemmung der Bildung von DNA der Form III und einer verminderten Ausbeute an DNA der Form II.
- [12] K. Yamamoto, S. Kawanishi, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 15435.
- [13] a) T. Friedman, D. M. Brown, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 615; b) S. Kawanishi, S. Inoue, S. Sano, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 6090; c) W. Blau, D. T. Croke, J. M. Kelly, D. J. McConnell, C. OhUigin, W. J. M. Van der Putten, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 751.
- [14] Die zur direkten DNA-Spaltung führende Reaktivität von Hydroxylradikalen gegenüber Ribose-Einheiten ist bekanntlich deutlich geringer als die gegenüber Purin- und Pyrimidin-Basen [15].
- [15] a) S. Steeken, *Chem. Rev.* 89 (1989) 503; b) M. Dizdaroglu, O. I. Aruoma, B. Halliwell, *Biochemistry* 29 (1990) 8447, zit. Lit.
- [16] Die durch Gleichgewichtsdialyse bestimmte Bindungskonstante von 1 an Kälberthymus-DNA betrug 1.50×10^4 .

Erzeugung von kolloiden Übergangsmetallen in organischer Phase und ihre Anwendung in der Katalyse**

Von Helmut Bönnemann*, Werner Brijoux,
Rainer Brinkmann, Eckard Dinjus, Thomas Joußen,
Barbara Korall

Professor Kurt Schaffner zum 60. Geburtstag gewidmet

Kolloide Übergangsmetalle mit enger Partikelgrößenverteilung sind von großem Interesse für die Katalyse, denn sie ermöglichen, katalytische Prozesse in homogener und heterogener Phase an weitgehend einheitlichen Metallpartikeln zu studieren^[1]. Die Erzeugung und Stabilisierung kolloider Edelmetalle in Wasser ist gut bekannt^[2] und wurde kürzlich durch spezielle Komplexliganden wesentlich verbessert^[3]. Hier berichten wir über eine allgemeine Herstellungsmethode für Metallkolloide von Elementen der Gruppen 6–11 in organischer Phase. Die Metallsalze werden in THF suspendiert und mit Tetraalkylammoniumhydrotriorganoboraten umgesetzt

[*] Prof. Dr. H. Bönnemann, Dr.-Ing. W. Brijoux,
Dipl.-Ing. R. Brinkmann, Dr. T. Joußen, Dipl.-Chem. B. Korall
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Postfach 101353, W-4330 Mülheim an der Ruhr
Dr. E. Dinjus
Chemische Fakultät, Universität Jena

[**] Dr. G. Block und E. Schauf (Krupp Industrietechnik GmbH, Essen) danken wir für TEM-Aufnahmen mit Hitachi H 600/2 bei 100 kV. Dr. B. Tesche (Fritz-Haber-Institut, Berlin) danken wir für TEM-Aufnahmen mit dem Siemens Elmiskop 102 bei 100 kV und DEEKO 100 bei 100 kV. Drs. R. Brand, B. M. Desperryroux, A. Freund, U. Ohlrogge (Degussa AG, Hanau) danken wir für die Überlassung der Katalysator-Testvorschriften und für Edelmetallchemikalien.