

# Bis(hydroperoxy)naphthalindiimid 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

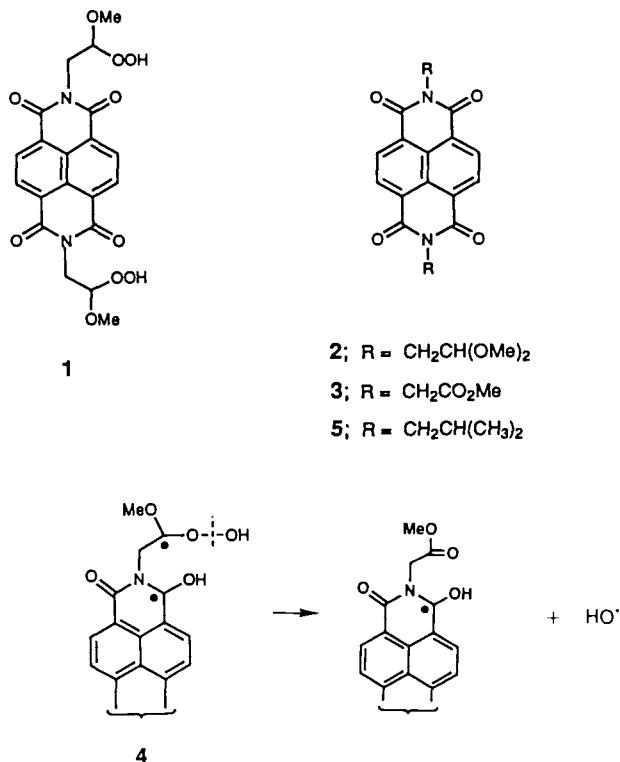
Die Rolle des Hydroxylradikals  $\text{HO}^\bullet$  in biologischen Systemen stößt auf großes Interesse<sup>[1]</sup>. Daher wurden mehrere Versuche unternommen, leistungsfähige Methoden für die Erzeugung von Hydroxylradikalen zu entwickeln, die ohne Übergangsmetalle und Wasserstoffperoxid auskommen<sup>[2, 3]</sup>. Unser Ziel ist die Entwicklung eines organischen Hydroxylradikal-Vorläufers, der nach niederenergetischer 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  $\text{HO}^\bullet$ -Quellen für Anwendungen in einer Reihe von biologisch wichtigen Reaktionen wie Vernetzung von Biopolymeren<sup>[4]</sup> sowie DNA- und Proteinspaltungen<sup>[5, 6]</sup> besonders interessant. Der Anforderungskatalog 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<sup>[3]</sup>. In der vorliegenden Arbeit wird ein Naphthalindiimid-Derivat mit einer symmetrischen Bis(hydroperoxy)-Gruppierung vorgestellt, das in der Hoffnung auf eine höhere  $\text{HO}^\bullet$ -Ausbeute pro Molekül und eine intensivere Absorption bei größeren Wellenlängen synthetisiert wurde, und seine Eignung als photochemische  $\text{HO}^\bullet$ -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**<sup>[7]</sup> 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<sup>[8]</sup>). In Gegenwart von Adamantan (5 Äquivalente) als  $\text{HO}^\bullet$ -Acceptor wurden 1-Adamantanol, 2-Adamantanol und Adamantanon in Ausbeuten von 30, 15 bzw. 6% bezogen auf **1** erhalten; durch Zugabe eines  $\text{HO}^\bullet$ -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<sup>[3]</sup>. Kurze Bestrahlung einer Lösung von **1** (100  $\mu\text{M}$ ) und DMPO (1.5 mM)

in Natriumcacodylat-Puffer ( $\text{Me}_2\text{AsONa}$ , pH 7.0) bei 366 nm führte zu intensiven, für das Hydroxylradikal-DMPO-Addukt charakteristischen ESR-Signalen<sup>[9]</sup> (Quartett (1:2:2:1),  $a_N = a_H = 14.8$  G,  $g = 2.0058$ ). Die abschließliche Bildung von **3** bei gleichzeitiger Erzeugung von  $\text{HO}^\bullet$ -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**<sup>[10]</sup> und kann nicht mit einer direkten, durch intramolekulare Energieübertragung vom angeregten Naphthalindiimid-Chromophor eingeleiteten Homolyse der O-O-Bindung erklärt werden<sup>[3]</sup>.



Wir haben dann die Spaltung von DNA-Strängen in Gegenwart von **1** an circularer Supercoil- $\phi\text{X174-RFI-DNA}$  (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  $\text{HO}^\bullet$ -Fänger verminderte die DNA-Spaltung beträchtlich<sup>[11]</sup>. Die Basen- und Sequenzspezifität der DNA-Spaltung wurde mit <sup>32</sup>P-endmarkierten DNA-Fragmenten aus dem c-Ha-ras-1-Humanprotooncogen<sup>[12]</sup> untersucht (Abb. 1). Das Hydroperoxid **1** induziert die Spaltung von DNA-Strängen durch

Tabelle 1. Spaltung von circularer Supercoil- $\phi\text{X174-RFI-DNA}$  (Form I) in gefurchte circular (Form II) und lineare DNA (Form III) durch Bestrahlung von **1** [a].

Konz. von <b>1</b> ( $\mu\text{M}$ )	% 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  $\mu\text{M}$  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 gelelektrophoretisch 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)

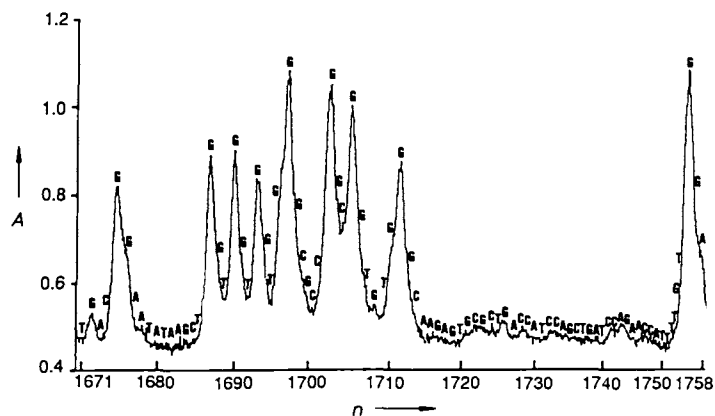


Abb. 1. Positionsspezifität bei der DNA-Spaltung durch Bestrahlung von 1. Eine Lösung mit dem  $^{32}\text{P}$ -5'-endmarkierten 261-bp-Fragment (*Ava*I \*1645-*Xba*I 1905) des c-Ha-ras-1-Humanprotooncogens [12] und 10  $\mu\text{M}$  1 in 50 mM Natriumcacodylat-Puffer (pH 7.0) wurde 20 min unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen bestrahlt. Nach Behandlung mit Piperidin (1 M, 90 °C, 20 min) wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch getrennt (8% Polyacrylamid/8 M Harnstoff). Die durch die photochemische Reaktion und nachfolgende Behandlung mit Piperidin gebildeten relativen Mengen an Oligonucleotiden wurden mit einem Laser-Densitometer bestimmt. n = Nucleotid-Zahl des DNA-Fragments (von links nach rechts: 5'  $\rightarrow$  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<sup>[13]</sup>. Bei Kontrollexperimenten führte die Bestrahlung der zu 1 verwandten Naphthalindiimid-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 Naphthalindiimid 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 Kohlenhydratrückgrat<sup>[5c, d, e, 14]</sup>. Doppelsträngige DNA wird von Hydroxylradikalen bei Behandlung mit Piperidin normalerweise an jedem Nucleotid, allerdings mit einer gewissen Bevorzugung der G- und T-Positionen, gespalten<sup>[5c, 15b]</sup>. Nach unserer Meinung ist daher die Spezifität der Spaltung mit 1 eine Folge der selektiven Bindung von 1 an 5'-GG-3'-Sequenzen<sup>[16]</sup>.

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 $^{\bullet}$ , 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.* 219 (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. Matsura, 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.* 26 (1987) 9895; c) T. M. Rana, C. F. Meares, *Bioconjugate Chem.* 1 (1990) 357.

- [5] a) R. P. Herzberg, 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 ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 340 ( $\lg \epsilon = 4.20$ ), 357 (4.38), 377 (4.45);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.59$  (s, 6H), 4.40 (dd,  $J = 2.8, 14$  Hz, 2H), 4.67 (dd,  $J = 8.2, 14$  Hz, 2H), 4.91 (dd,  $J = 2.8, 8.2$  Hz, 2H), 8.85 (s, 4H), 9.56 (s, 2H, 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. Dizdaroğlu, O. I. Aruoma, B. Halliwell, *Biochemistry* 29 (1990) 8447, zit. Lit.
- [16] Die durch Gleichgewichtsdialyse bestimmte Bindungskonstante von 1 an Kälberthymus-DNA betrug  $1.50 \times 10^4$ .

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

Von Helmut Bönemann\*, 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<sup>[1]</sup>. Die Erzeugung und Stabilisierung kolloider Edelmetalle in Wasser ist gut bekannt<sup>[2]</sup> und wurde kürzlich durch spezielle Komplexliganden wesentlich verbessert<sup>[3]</sup>. 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. Bönemann, Dr.-Ing. W. Brijoux, Dipl.-Ing. R. Brinkmann, Dr. T. Joußen, Dipl.-Chem. B. Korall  
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung  
Postfach 10 13 53, 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 DEKO 100 bei 100 kV. Drs. R. Brand, B. M. Desperoux, A. Freund, U. Ohlrogge (Degussa AG, Hannover) danken wir für die Überlassung der Katalysator-Testvorschriften und für Edelmetallchemikalien.