

vorliegen. Durch Isomerisierung zur *cis*-Form klärt das Zweiphasensystem in ein Einphasensystem.

Eingegangen am 22. Juni 1994 [Z 7061]

Stichworte: *trans-cis*-Isomerisierung · Phasentrennung · Tenside · Poly(acrylamide)

- [1] S. Tazuke, S. Kurihara, H. Yamaguchi, T. Ikeda, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 249–251.
 - [2] T. Saji, K. Hoshino, S. Aoyagi, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6865–6868.
 - [3] a) E. D. Goddard in *Surfactants in Solution*, Vol. 11 (Hrsg.: K. L. Mittal, D. O. Shah), Plenum, New York, **1991**, S. 219; b) *Polymers in Aqueous Media* (Hrsg.: J. E. Glass) (*Adv. Chem. Ser.* **1989**, 223).
 - [4] J. J. Effing, I. J. McLennan, J. C. T. Kwak, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 2499–2502.
 - [5] S. Shinkai, K. Matsuo, A. Harada, O. Manabe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1982**, 1261–1265.
 - [6] a) M. Irie, H. Tanaka, *Macromolecules* **1983**, *16*, 210–214; b) D. Kungwatchakun, M. Irie, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1988**, *9*, 243–246.
 - [7] Während der Polymerisation in *tert*-Butylalkohol fällt das Polymer aus. Nach einer Reaktionsdauer von 8 h wurden die Lösungen abgekühlt und das Polymer abfiltriert oder im Falle der Polymerisation in DMSO in Ethanol ausgefällt. Beide Präzipitate wurden dreimal je 12 h in Aceton gerührt, um restliches Monomer und Lösungsmittel zu entfernen und anschließend aus Wasser gefriergetrocknet.
 - [8] Zur Erstellung einer Eichkurve wurde 4-Propionamidoazobenzol, dessen UV/Vis-Spektrum identisch mit dem des Copolymeren ist, als Modellverbindung synthetisiert. Bei der Auswertung der Copolymerzusammensetzung wurde davon ausgegangen, daß die Modellverbindung und der polymergebundene Chromophor den gleichen Extinktionskoeffizienten haben.
 - [9] Als Lichtquelle wurde eine Stablampe „Spectroline Miniature UV Quartz Pencil Lamp“ (Typ 36-380) verwendet. Die Lampe emittiert Licht von 310 bis 410 nm und hat zwei Intensitätsmaxima bei 350 nm ($0.78 \mu\text{W}\text{cm}^{-2}\text{nm}^{-1}$) und 365 nm ($1 \mu\text{W}\text{cm}^{-2}\text{nm}^{-1}$).

Photosensibilisierte Bildung von 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin in Lachs-Testes-DNA durch Furocumarinhydroperoxide: ein neuartiges, intercalierendes „Photo-Fenton“-Reagens für oxidative DNA-Schädigung**

Waldemar Adam*, Jean Cadet, Francesco Dall'Acqua,
Bernd Epe, Danaboyina Ramaiah
und Chantu R. Saha-Möller

Die oxidative DNA-Schädigung^[11], bei der durch reaktive Sauerstoffspezies wie Hydroxyl- und Alkoxyradikale^[22], Singulett-Sauerstoff^[3] und Superoxid-Ionen^[2a] Oxidationsprodukte der DNA-Basen gebildet werden, spielt eine wesentliche Rolle in der Mutagenese und Carcinogenese^[11]. Das als mutagen ausge-

[*] Prof. Dr. W. Adam, Dr. D. Ramaiah, Dr. C. R. Saha-Möller
Institut für Organische Chemie der Universität
Am Hubland, D-97074 Würzburg
Telefax: Int. + 931/888-4606

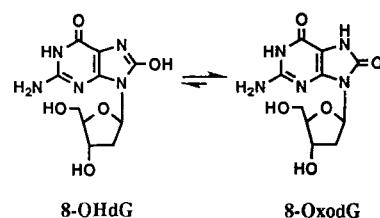
Dr. J. Cadet
CEA/Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée
SESAM/Lésions des Acides Nucléiques
Grenoble (Frankreich)

Prof. Dr. F. Dall'Aqua
Department of Pharmaceutical Sciences, University of Padova (Italien)

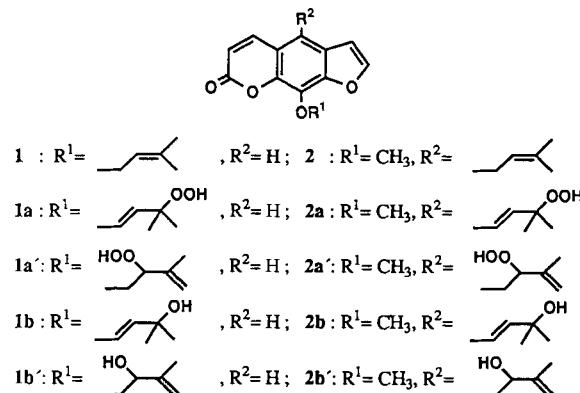
Prof. Dr. B. Epe
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

[**] Wir danken Herrn Dr. T. Linker für die Aufnahme der ESR-Spektren. Dr. D. Ramaiah dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für die Gewährung eines Forschungsstipendiums (1992/1993). Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 172 „Molekulare Mechanismen kanzerogener Primärveränderungen“) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

wiesene^[4-6] DNA-Oxidationsprodukt 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-OHdG)^[7] wurde in den vergangenen Jahren sehr intensiv untersucht^[21]. Da eine Beteiligung von Hydroxylradikalen als reaktive Spezies in der oxidativen DNA-Schädigung angenommen wird^[1], war es von Interesse, die eigentliche Rolle der Hydroxylradikale bei der Bildung von 8-OHdG zu untersuchen. Die herkömmlichen chemischen Hydroxylradikal-Quellen, z.B. $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Fenton-Reaktion)^[9] sind für diesen Zweck nur bedingt geeignet, da sie neben Hydroxylradikalen weitere reaktive Agentien wie Superoxid-Ionen oder Metall-Sauerstoff-Spezies erzeugen^[10]. Daher sind effiziente Methoden für die Erzeugung von Hydroxylradikalen erforderlich, die Übergangsmetalle vermeiden.



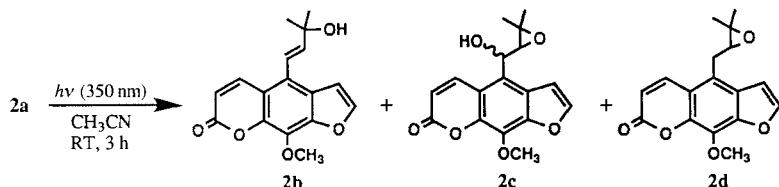
Vor kurzem haben wir darüber berichtet^[11], daß die Furocumarinhydroperoxide **1a** und **1a'** sowie **2a** und **2a'**, die durch Photooxygenierung^[12] von Imperatorin **1** oder des Alloimperatorin-Derivates **2** leicht zugänglich sind, bei der UV-A-Bestrahlung



lung ($\lambda = 360$ nm) in überhelicaler PM2-DNA Strangbrüche und Endonuclease-sensitive DNA-Modifikationen verursachen. Diese Schäden sind wahrscheinlich auf die oxidative Wirkung von Hydroxylradikalen zurückzuführen, da die verschiedenen Modifikationen im gleichen Verhältnis gebildet werden wie bei der γ -Bestrahlung verdünnter DNA-Lösungen^[11]. Hier präsentieren wir neue Ergebnisse, die eindeutig belegen, daß diese DNA-intercalierenden Furocumarinhydroperoxide in der Tat photochemische Quellen für Hydroxylradikale sind. Diese neuartigen Furocumarinhydroperoxide sind somit die ersten intercalierenden „Photo-Fenton“-Reagentien^[13] und erzeugen bei der UV-A-Bestrahlung ($\lambda = 350$ nm) in Lachs-Testes-DNA in beachtlichen Mengen 8-OHdG.

Unter den Furocumarinhydroperoxiden **1a**, **a'** und **2a**, **a'** hat sich **2a** als das effektivste DNA-schädigende Agens in Endonuklease-Untersuchungen erwiesen^[11]. Deshalb wurde beispielhaft die Photochemie von **2a** ausführlich untersucht, um die Erzeugung von Hydroxylradikalen bei der Photolyse des Hydroperoxids zu bestätigen und einen Einblick in den Bildungs-

mechanismus der Hydroxylradikale zu gewinnen. Die Bestrahlung des Hydroperoxides **2a** (105 mg, 330 μ mol) bei 350 nm (Rayonet Photoreaktor) unter Stickstoff in Acetonitril (70 mL) bei Raumtemperatur führte innerhalb 3 h zum vollständigen Umsatz des Hydroperoxides und lieferte nach der säulenchromatographischen Reinigung des Reaktionsgemisches den Alkohol **2b** (2%) und ein 80:20-Diestereomerengemisch des Hydroxyepoxids **2c** (40%) sowie das Epoxid **2d** (8%) (Schema 1);



Schema 1.

außerdem entstand in beachtlichen Mengen (25%) nicht näher charakterisiertes Material. Die Quantenausbeute der photolytischen Zersetzung von **2a** wurde durch Kaliumferrioxalat-Actinometrie^[14] zu $\phi = 0.85 \pm 0.04$ bestimmt. Die Entstehung der Photoprodukte lässt sich durch die Homolyse der Hydroperoxidgruppe erklären. Diese wird durch intramolekularen Energietransfer vom photoangeregten Furocumarin-Chromophor initiiert. Die Voraussetzung für einen effizienten Energietransfer ist, daß die Triplettenergie E_T des Furocumarin-Chromophors höher ist als die der Hydroperoxidgruppe^[15] (zum Vergleich: für 8-Methoxypsonal beträgt $E_T = 63 \text{ kcal mol}^{-1}$)^[16].

Die Bildung von Hydroxylradikalen bei der Photolyse^[17] des Hydroperoxides **2a** (3.16 mg, 10 μ mol) in Benzol (70 mL) unter Stickstoff wurde durch die Detektion von Phenol (1.6%, bezogen auf das Hydroperoxid) bestätigt. Die niedrige Ausbeute an Phenol ist dadurch zu erklären, daß Phenol mit Hydroxylradikalen zu höher oxidierten Produkten wie Catechol und 1,4-Hydrochinon weiterreagiert^[18].

Adamantan wird mit Hydroxylradikalen zu 1- und 2-Adamantanol sowie Adamantanon oxidiert^[13, 19]. Bei der Bestrahlung^[17] von **2a** (3.16 mg, 10 μ mol) in Anwesenheit von Adamantan (13.6 mg, 100 μ mol) in Acetonitril (70 mL, ent gast) konnten wir unter Stickstoff kein Adamantan-Oxidationsprodukt nachweisen; unter Atmosphärenbedingungen ergab die Photolyse jedoch 1- und 2-Adamantanol sowie Adamantanon in Ausbeuten von 3.3, 0.3 bzw. 1.7% (bezogen auf **2a**). Vermutlich sind die Adamantan-Oxidationsprodukte durch die Reaktion des primär gebildeten Adamantylradikals mit Sauerstoff entstanden^[18b].

Außer durch Hydroxylierung von Benzol wurden Hydroxylradikale in der Photolyse von Furocumarinhydroperoxiden durch ein Spinabfangexperiment mit 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxid (DMPO) ESR-spektroskopisch nachgewiesen. So wurde bei der Bestrahlung des Hydroperoxides **2a** in Anwesenheit von DMPO^[20] das charakteristische^[21] 1:2:2:1-Quartett ($a_N = a_H = 14.90 \text{ G}$ und $g = 2.0053$) des Nitroxylradikals im ESR-Spektrum beobachtet. Ein ähnliches Spektrum wurde bei der Photolyse des Hydroperoxids **2a'** erhalten.

Nachdem gezeigt worden war, daß die Furocumarinhydroperoxide eine ergiebige photochemische Quelle für Hydroxylradikale sind, wurde die Erzeugung von 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-OHdG) in isolierter DNA durch diese neuartigen Photo-Fenton-Reagentien untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) von Lachs-Testes-DNA (Testes = die Hoden) und Furocumarinhydroperoxid (20–50 μM) **1a'** oder

2a in 5 mM Phosphatpuffer (1 mL) bei 0 °C 15 bis 30 min (Tabelle 1) bestrahlt ($\lambda = 350 \text{ nm}$). Nach Beendigung der Bestrahlung wurde die modifizierte DNA mit Nuclease P1 und alkalischer Phosphatase verdaut und anschließend durch HPLC (amperometrische Detektion bei 650 mV)^[22] unter Anwendung eines 80:20-Gemisches aus 0.05 M Natriumcitratpuffer (pH 5) und Methanol als Eluent analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Das Hydroperoxid **2a** ist bei der Erzeugung von 8-OHdG wesentlich effizienter als **1a'**. In Anwesenheit von 2% *tert*-Butylalkohol, einem Abfänger von Hydroxylradikalen^[11], ist die Erzeugung von 8-OHdG um ca. 30% gehemmt (Tabelle 1, Einträge 3–5 und 9–12). Da bei der Photolyse in Gegenwart der Furocumarinalkohole **1b'** und **2b** nur eine geringe Menge 8-OHdG beobachtet wurde (Tabelle 1, Einträge 7 und 13) und die Furocumarinhydroperoxide **1a'** und **2a** ohne Bestrahlung kein 8-OHdG erzeugten, sollte das bei Photolyse von **1a'** und **2a** gebildete 8-OHdG hauptsächlich durch Hydroxylradikale aus der photosensibilisierten Homolyse der Hydroperoxidbindung verursacht werden.

Tabelle 1. Photoinduzierte Bildung von 8-OHdG durch Furocumarinhydroperoxide in Lachs-Testes-DNA [a].

Nr.	Struktur	Hydroperoxid [b]		Bestrahlungs-dauer [min]	8-OHdG-Ausbeute	
		Konz. [μM]	<i>t</i> BuOH [%] [c]		pmol pro 50 μg DNA [d]	[%] [e]
1	1a'	20	0.0	15	48 (0.15)	0.24
2	1a'	20	0.0	30	58 (0.18)	0.29
3	1a'	30	0.0	30	72 (0.23)	0.24
4	1a'	30	0.5	30	62 (0.19)	0.20
5	1a'	30	2.0	30	48 (0.15)	0.16
6	1a'	50	0.0	30	100 (0.32)	0.20
7	1b'	20	0.0	30	20 (0.06)	0.10
8	2a	20	0.0	15	328 (1.05)	1.64
9	2a	20	0.0	30	364 (1.16)	1.82
10	2a	20	0.5	30	300 (0.96)	1.50
11	2a	20	2.0	30	254 (0.81)	1.27
12	2a	50	0.0	30	420 (1.34)	0.84
13	2b	20	30	30	24 (0.07)	0.12

[a] DNA (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) wurde in 5 mM Phosphatpuffer (1 mL) mit Furocumarinhydroperoxid bei 0 °C bestrahlt. [b] Zum Vergleich wurden die Furocumarinalkohole **1b'** und **2b** untersucht. [c] Volumen der Reaktionslösung. [d] Blindwert beträgt 6 pmol pro 50 μg DNA; in Klammern sind die Ausbeuten in Prozent, bezogen auf Guanin angegeben (50 μg DNA enthält ca. 31.2 nmol Guanin). Fehlergrenze ca. $\pm 10\%$ der angegebenen Werte. [e] Ausbeute bezogen auf Furocumarinhydroperoxid.

Für das Furocumarinhydroperoxid **2a** wurde die maximale Ausbeute von 8-OHdG (1.8%, bezogen auf Hydroperoxid) bei einer Hydroperoxidkonzentration von 20 μM nach 30 min Bestrahlung erreicht (Tabelle 1, Eintrag 9). Eine Verlängerung der Bestrahlung (bis zu 90 min) führte zu keiner signifikanten Veränderung der 8-OHdG-Ausbeute. In der Tat konnte in der Reaktionslösung nach 30 min kein Peroxid durch KI-Test nachgewiesen werden. Die geringe Ausbeute an 8-OHdG kann dadurch erklärt werden, daß durch Hydroxylradikale weitere DNA-Modifikationen, wie Strangbrüche, basenfreie Stellen und zahlreiche Basenoxidationsprodukte, entstehen^[23, 24].

Vor kurzem wurde berichtet, daß bei der Bestrahlung von DNA (260 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mit γ -Strahlen (50 Gy) in Phosphatbuffer unter Sauerstoffatmosphäre 8-OHdG in 0.14% Ausbeute entsteht^[25]. Da die Photolyse des Furocumarinhydroperoxids **2a**

in Gegenwart von DNA unter Atmosphärenbedingungen zu höheren 8-OHdG-Ausbeuten (1.8 % für **2a**, bezogen auf Hydroperoxid) führt (Tabelle 1, Einträge 9 und 12), ist es möglich, daß ein Teil der Hydroxylradikale in der DNA-Matrix erzeugt wird und das Hydroperoxid **2a** in die DNA intercaliert. Die geringe Hemmung der 8-OHdG-Erzeugung (ca. 30 %) durch *tert*-Butylalkohol bei der Photolyse der Furocumarinhydroperoxide deutet auch auf diese Möglichkeit hin und steht in Einklang mit unseren früheren Befunden über DNA-Schädigung durch Furocumarinhydroperoxide. Unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen wurden die durch γ -Strahlung (freie Hydroxylradikale) erzeugten DNA-Schäden um ca. 70 % gehemmt^[11].

Daher wurde überprüft, ob die Furocumarinhydroperoxide wirklich in die DNA intercalieren, eine Voraussetzung für direkte photochemische Aktivität der Hydroperoxide in der DNA-Matrix^[26, 27]. In der Tat wurde die Bildung von molekularen Komplexen zwischen Lachs-Testes-DNA und den Furocumarinen **1a'** und **1b'** durch starke Fluoreszenzlösung^[28], wie sie früher mit anderen intercalierenden Furocumarinen beobachtet worden waren^[21], bestätigt. Aus den Fluoreszenzdaten wurden die Bindungsparameter der DNA-Komplexe nach McGhee und von Hippel^[29] berechnet (Tabelle 2).

Tabelle 2. Parameter der Bindung [a] von Furocumarinen an Lachs-Testes-DNA.

Furocumarin	$K [M^{-1}]$ [b]	n [c]	$1/n$ [d] 10^{-2}
1a'	6130	60	1.7
1b'	3900	45	2.2
2a	23900	22	4.5
8-MOP [e]	740	8	12.8

[a] Nach der Methode von McGhee und von Hippel [29] berechnet. [b] Bindungskonstante. [c] Anzahl der Nucleotide, die an einem gebundenen Furocumarinmolekül okkludiert sind. [d] Frequenz der gebundenen Stellen. [e] Entnommen aus der Lit. [27].

Die hier untersuchten Furocumarine sind bei der Bildung von molekularen Komplexen mit DNA mindestens so effektiv wie 8-Methoxysoralen (8-MOP). **2a** bindet an DNA wesentlich stärker als **1a'**. Die höhere Effizienz des Hydroperoxids **2a** (im Vergleich zu **1a'**) bei der Bildung von 8-OHdG (Tabelle 1, Einträge 2 und 9) hängt vermutlich mit ihrer höheren DNA-Bindungskonstante zusammen.

Um herauszufinden, ob diese Furocumarine wie Psoralen^[30] in die DNA-Matrix eindringen und nicht nur mit dem Makromolekül assoziieren, wurden Linear-Flow-Dichroismus(LD)-Messungen durchgeführt. Das LD-Spektrum^[31] einer wäßrigen Lösung des Furocumarinhydroperoxides **2a** weist in Anwesenheit von DNA einen charakteristisch negativen Dichroismus zwischen 310 und 360 nm auf. Dies deutet darauf hin, daß das komplexierte Hydroperoxid **2a** eine parallele Anordnung zu den DNA-Basen einnimmt^[30]. Ähnliche LD-Spektren wurden für die Furocumarine **1a'** und **1b'** beobachtet.

Die Ergebnisse zeigen, daß die bequem zugänglichen, intercalierenden Furocumarinhydroperoxide **1a'** und **2a** ergiebige photochemische Quellen zur Erzeugung von Hydroxylradikalen sind. Bei UV-A-Bestrahlung induzieren diese neuartigen Photo-Fenton-Reagentien sehr wirksam das mutagene DNA-Oxidationsprodukt 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-OHdG). Die wesentlichen Vorteile dieser Photo-Fenton-Reagentien bestehen darin, daß Hydroxylradikale direkt in der DNA-Matrix durch Photosensibilisierung gebildet werden und die konzentrations-

abhängige Erzeugung von 8-OHdG quantitativ bestimmt werden kann. Aufgrund dieser günstigen Eigenschaften bieten diese Furocumarinhydroperoxide, vor allem das 8-Methoxysoralen-Derivat **2a**, interessante Anwendungsmöglichkeiten als effektive Hydroxylradikal-Quellen zur Untersuchung von biologisch wichtigen Reaktionen wie DNA-Oxidation und -Spaltung^[23, 32], Proteinspaltung^[33], Vernetzung von Biopolymeren^[34] sowie Lipidperoxidation^[35]. Für die Entwicklung noch effizienterer photoaktiver Hydroxylradikal-Quellen wird die Optimierung der Photosensibilisierungs- und Intercalationseigenschaften solcher Reagentien erforderlich sein.

Einigegangen am 4. Mai,
veränderte Fassung am 20. August 1994 [Z 6895]

Stichworte: DNA-Oxidation · Furocumarine · Hydroperoxide · Hydroxylradikale · 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin

- [1] a) *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, London, 1991; b) D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag in *Oxidative Stress* (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, London, 1985, S. 11–40.
- [2] a) H. Kasai, S. Nishimura in Lit. [1a], S. 99–116; b) R. A. Floyd, *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 1447–1450.
- [3] T. P. A. Devasagayam, S. Steenken, M. S. W. Obendorf, W. A. Schulz, H. Sies, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6283–6289.
- [4] E. Gajewski, G. Rao, Z. Nackerdien, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7876–7882.
- [5] S. Shibusawa, M. Takeshita, A. P. Grollmann, *Nature (London)* **1991**, *349*, 431–434.
- [6] M. L. Wood, M. Dizdaroglu, E. Gajewski, J. M. Essigmann, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7024–7032.
- [7] In wäßriger Lösung liegt 8-OHdG hauptsächlich in der Ketoform 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-desoxyguanosin (8-OxodG) vor [8].
- [8] J. Tchou, H. Kasai, S. Shibusawa, M.-H. Chung, J. Laval, A. P. Grollmann, S. Nishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 4690–4694.
- [9] a) C. Walling, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 125–132; b) R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 313–315; c) B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Biochem. J.* **1984**, *219*, 1–14.
- [10] B. Halliwell, J. M. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2. Aufl., Oxford Univ. Press (Clarendon), New York, 1989.
- [11] B. Epe, M. Häring, D. Ramaiah, H. Stopper, M. M. Abou-Elzahab, W. Adam, C. R. Saha-Möller, *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 2271–2276.
- [12] M. M. Abou-Elzahab, W. Adam, C. R. Saha-Möller, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 967–970.
- [13] S. Matsugo, S. Kawanishi, K. Yamamoto, H. Sugiyama, T. Matsuura, I. Saito, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1343–1344; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1351–1353.
- [14] C. G. Hatchard, C. A. Parker, *Proc. R. Soc. London A* **1956**, *235*, 518–536.
- [15] Y. Sawaki, Y. Ogata, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7324–7327.
- [16] R. V. Bensasson, E. J. Land, C. Salet, *Photochem. Photobiol.* **1978**, *27*, 273–280.
- [17] Die Photolysen wurden bei Raumtemperatur 3 h durchgeführt und die Ausbeuten durch GC-Analyse bestimmt. Naphthalin und Dodecan wurden als interne Standards jeweils für Phenol und Oxidationsprodukte des Adamantans eingesetzt.
- [18] a) K. Omura, T. Matsuura, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 3475–3487; b) X.-M. Pan, M. N. Schuchmann, C. von Sonntag, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 289–297.
- [19] I. Saito, M. Takayama, T. Matsuura, S. Matsugo, S. Kawanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 883–884.
- [20] Eine Lösung des Furocumarinhydroperoxides (30–120 μ M) und DMPO (50 mM) in 2 mM Natriumcacodylatpuffer (1 mL) wurde bei 350 nm (Rayonet-Photoreaktor) bestrahlt und unmittelbar danach das Spektrum auf einem Bruker-ESP 300-Spektrometer gemessen.
- [21] E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *200*, 1–16.
- [22] a) R. A. Floyd, J. J. Watson, P. K. Wong, D. H. Altmiller, R. C. Rickard, *Free Radical Res. Commun.* **1986**, *6*, 163–172; b) M. Berger, C. Anselmino, J.-F. Mouret, J. Cadet, *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*, 929–941.
- [23] C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London, 1987.
- [24] a) A. F. Fuciarelli, B. J. Wegher, F. Gajewski, M. Dizdaroglu, W. F. Blankely, *Radiat. Res.* **1989**, *119*, 219–231; b) A. F. Fuciarelli, B. J. Wegher, W. F. Blankely, M. Dizdaroglu, *Int. J. Radiat. Biol.* **1990**, *58*, 397–415.
- [25] H. Kasai, Z. Yamaizumi, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9692–9694.

- [26] a) M. A. Pathak, T. B. Fitzpatrick, *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, *14*, 3–22; b) G. Rodighiero, F. Dall'Acqua, D. Averbeck in *Psoralen DNA Photobiology*, Vol. 1 (Hrsg.: F. P. Gasparro), CRC, Boca Raton, FL, USA, **1988**, S. 37–114.
- [27] F. Dall'Acqua, M. Terbojevich, S. Marciani, D. Vedaldi, M. Recher, *Chem. Biol. Interact.* **1978**, *21*, 103–115.
- [28] Fluoreszenzdaten: **1a'** ($\lambda_{\text{ex}} = 302 \text{ nm}$); $\lambda_{\text{em}} = 482 \text{ nm}$, **1b'** ($\lambda_{\text{ex}} = 304 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 502 \text{ nm}$), **2a** ($\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$).
- [29] J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 469–489.
- [30] F. Tjerneld, B. Nordén, B. Ljunggren, *Photochem. Photobiol.* **1979**, *29*, 1115–1118.
- [31] Die Spektren wurden auf einem Jasco-J500-Circulardichroismus-Spektrometer, das für LD umgerüstet worden war, gemessen.
- [32] R. V. Prigodich, C. T. Martin, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8017–8019.
- [33] T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2457–2458.
- [34] K. J. A. Davis, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9895–9901.
- [35] T. A. Dix, J. Aikens, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 218.

Eine vielseitige Festphasensynthese von N-verknüpften Glycopeptiden

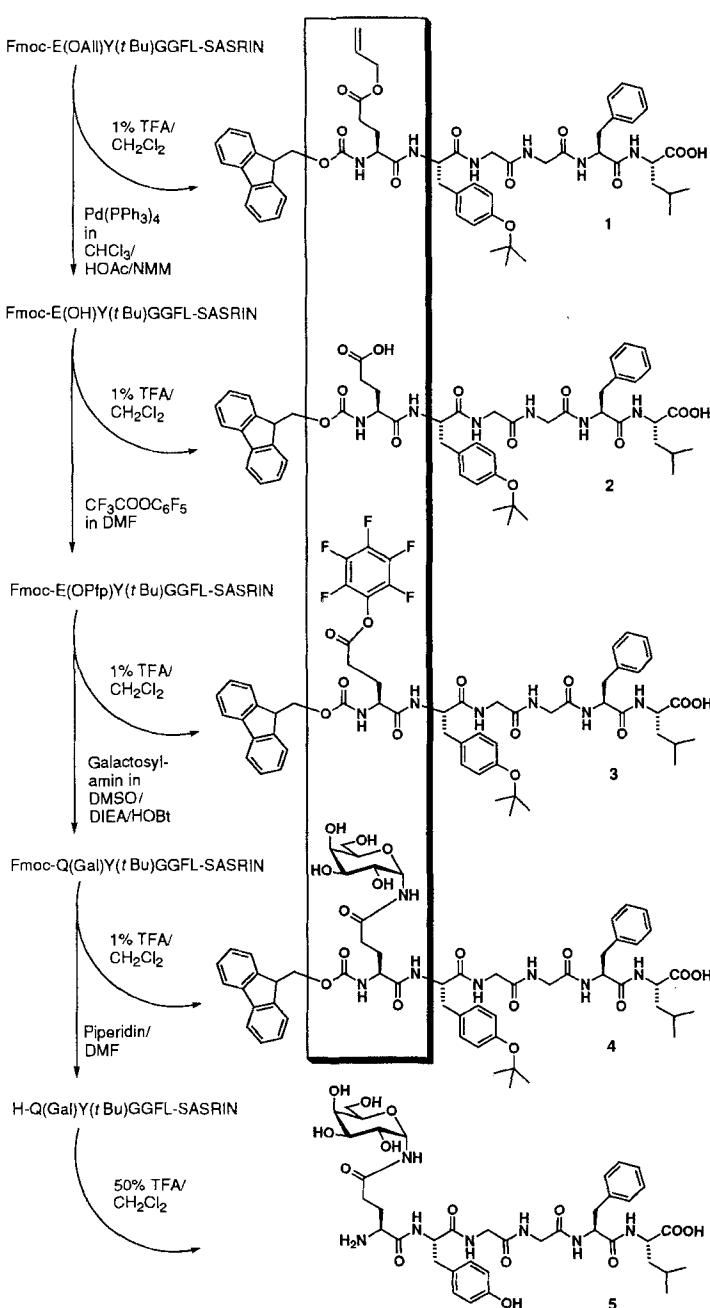
Dirk Vetter*, David Tumelty, Sunil K. Singh und Mark A. Gallop

Die Entdeckung neuer Glycopeptidliganden für wichtige biologische Rezeptoren wird dadurch erschwert, daß die Synthese von Glycopeptiden sehr aufwendig ist^[1, 2]. Eine konvergente Synthese würde einen vereinfachten Zugang zu Glycopeptiden ermöglichen, aber nur in wenigen Arbeiten wurde diese Strategie verfolgt. Zwar gelang die O-Glycosylierung von immobilisierten serinhaltigen Peptiden durch Umsetzung mit peracetyliertem Glucosazolin^[3], doch eine vollständige N-Glycosylierung wurde bislang nur in Lösung erreicht^[4, 5]. Ein Beispiel aus jüngerer Zeit ist die Synthese von Glycoproteinfragmenten durch Kupplung von N-Acetylglucosaminylamin und verwandten Oligosaccharidylaminen an Asparaginsäureseitenketten entsprechender Peptide^[6, 7].

Hier wird eine neue Methode zur Festphasensynthese von N-verknüpften Glycopeptiden vorgestellt. Ziel weiterführender Arbeiten ist es, mit diesem Ansatz auch Glycopeptidbibliotheken durch Anwendung kombinatorischer Methoden zu erhalten^[8].

Der Schlüsselschritt unserer Strategie ist die Verknüpfung eines ungeschützten Glycosylamins mit einem Pentafluorphenyl(Pfp)-Carbonsäureester der Seitenkette eines immobilisierten Peptids. Eine große Zahl von Glycosylaminen ist kommerziell erhältlich oder durch Umsetzung der freien Saccharide mit wäßrigem Ammoniak in einem Schritt leicht zugänglich^[9]. Die resultierenden 1-Amino-1-desoxyzucker sind β -Anomere; nur wenn eine axiale 2-Hydroxygruppe benachbart ist, wie in Mannose oder Lyxose, wird das α -Anomer erhalten^[10]. Für die Aktivierung der Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)- und *tert*-Butyl(*t*Bu)-geschützten immobilisierten Peptide werden Glutamin- oder Asparaginsäure eingebaut, die an der γ - bzw. β -Carboxygruppe als Allyl(All)-Ester geschützt wurden. Anschließend werden die Allylester hydrolysiert und die Pfp-Ester gebildet^[11]. Nach der Verknüpfung des Peptids mit einem Glycosylamin werden die restlichen Schutzgruppen entfernt und die freien Glycopeptide durch Abspalten von der Festphase erhalten.

Dieses Vorgehen wurde am Beispiel Gln(Gal)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu **5** optimiert^[12]. Durch Verwendung eines Polystyrolharzes, das mit einem sehr säurelabilen Linker modifiziert worden war (super acid sensitive resin, SASRIN), konnte das jeweilige Peptid auf jeder Stufe der Reaktionssequenz abgespalten (\rightarrow **1–5**) und dann charakterisiert werden^[13]. Schema 1 zeigt den Reaktionsverlauf, Abbildung 1 die entsprechenden HPL-Chromatogramme der Rohprodukte.



Schema 1. Beispiel für die Festphasensynthese N-verknüpfter Glycopeptide. Die Reaktionsfolge Desalylierung-Esteraktivierung-Glycosylamin-Kondensation (eingeklammter Bereich) wurde an den synthetisierten immobilisierten Peptid durchgeführt. Jeder Schritt, einschließlich der Pfp-Esterbildung, ließ sich durch Charakterisieren des jeweils abgespaltenen Peptids (1–5) verfolgen (siehe Abb. 1).

Die Synthese begann mit dem Aufbau des vollständig geschützten Peptids an der Festphase. Dann wurde der Allylester in einem Gemisch aus Chloroform, *N*-Methylmorpholin (NMM) und Essigsäure unter Erhaltung der *N*-terminalen

[*] Dr. D. Vetter, Dr. D. Tumelty, Dr. S. K. Singh, Dr. M. A. Gallop
Affymax Research Institute
4001 Miranda Avenue, Palo Alto, CA 94304 (USA)
Telefax: Int. + 415/424-9860