

Ladungstransport in DNA: eine Kontroverse

Ulf Diederichsen*

Zunehmendes Interesse erlangt die Untersuchung der Leitfähigkeit linearer Makromoleküle, wobei verschiedene Modelle zur Ladungsausbreitung entwickelt wurden; z. B. das Konzept des molekularen Drahtes, nach welchem ein Elektron durch eine valenzgebundene, lineare, gesättigte Kohlenwasserstoffkette tunneln.^[1] Dabei ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Ladung in der Kette sehr klein. Ein neues Modell, das für den positiven Ladungstransfer in kleinen Peptiden in der Gasphase aufgestellt wurde, sieht eine schrittweise Ladungswanderung durch energetisch unterschiedliche Zwischenzustände vor.^[2] Verschiedene Aminosäuren im Peptidgerüst wirken dabei steuernd für die Ladung. In großen, komplex gefalteten Proteinen in Lösung wird der Elektronentransfer dagegen als ein Tunnelprozeß beschrieben, der längs der Peptidkette und durch den Raum erfolgen kann.^[3]

Eine besonders geordnete, lineare, repetitive Struktur liegt in einem DNA-Doppelstrang vor. Er besteht aus einem Stapel von Purin-Pyrimidin-Basenpaaren, der topologisch durch einen Ribosyl-Phosphorsäurediester-Doppelstrang stabilisiert wird. Die Wechselwirkung der 3.4 Å voneinander entfernten π -Elektronensysteme leistet einen erheblichen Beitrag zur DNA-Paarungs-Stabilität. Die Frage, ob DNA ein strukturimmanentes Potential zum Elektronentransport über größere Entfernungen hat, wird schon seit langem diskutiert.^[4] In einem frühen Experiment, das auf Elektronenwanderung in DNA hindeutet, wird die photoinduzierte Wechselwirkung zwischen intercalierenden Ethidiumdonoren mit unspezifisch am Rückgrat gebundenen Acceptor-Untereinheiten untersucht.^[5] In den letzten Jahren haben Experimente von Barton et al. Aufmerksamkeit erregt, nach denen sich die Hinweise auf eine effiziente Ladungswanderung im DNA-Duplex über Entfernungen bis etwa 40 Å verdichten.^[6] Dabei wurde zunächst ein schneller Hopping-Mechanismus durch den Stapel der Basenpaare (π -way) vorgeschlagen.^[6] Ein alternatives Modell beruht auf quantenmechanischem Tunneln, das durch die Valenzorbitale des π -Stapels unterstützt wird, doch werden nur moderate Elektronentransporteigenschaften vorausgesagt.^[7] Nach einem anderen Ansatz, der auf Leitfähigkeitsmessungen beruht, wird ein Elektronentransport über den äußeren Mantel aus dem Ribosyl-Phosphorsäurediester-Rückgrat und fest gebundenen Wassermolekülen vorgeschlagen.^[8]

[*] Dr. U. Diederichsen

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Telefax: Int. + 89/2891-3210
E-mail: ud@linda.org.chemie.tu-muenchen.de

Wegen der ursprünglichen Schwierigkeiten bei der Synthese von kovalent mit DNA-Strängen verknüpften Metallkomplex-intercalatoren (1 % Ausbeute) und der hohen Konzentration, die für die Bestimmung der Geschwindigkeit des Elektronentransports erforderlich ist, wurde ein Teil der Elektronentransportstudien an *nicht kovalent verknüpften Intercalatoren* durchgeführt (Abb. 1 a).^[9] Diese Studien sind in ihrem Informations-

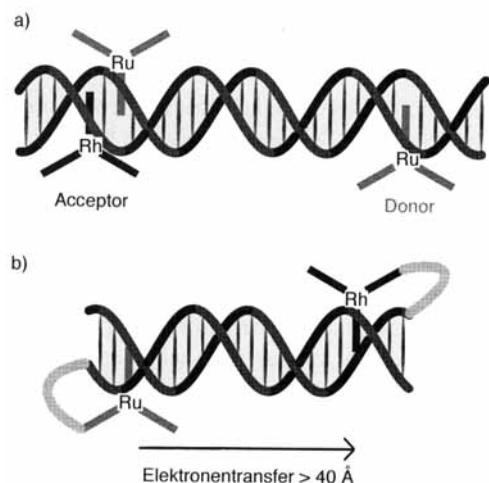


Abb. 1. a) Bei der Intercalation *nicht kovalent verknüpfter* Ruthenium- und Rhodiumkomplexe an DNA lassen sich keine Aussagen zum Abstand zwischen den Elektronendonoren und -acceptoren machen. Die hohen Elektronenübertragungsgeschwindigkeiten könnten auch durch kooperative Bindung der beiden Intercalatoren zustande kommen. b) Durch *kovalente Verknüpfung* der Metallintercalatoren an den jeweiligen 5'-Enden des DNA-Doppelstranges ist eine Elektronenübertragung räumlich getrennter Donor- und Acceptorkomplexe gewährleistet.

gehalt begrenzt, da angesichts einer unspezifischen Bindung der Intercalatoren die wirkliche Strecke des Elektronentransports nicht bekannt ist. Im Extremfall binden die Donor- und Acceptor-Intercalatoren kooperativ in benachbarten Positionen, was den schnellen Austausch von Elektronen erklären würde. Für eine kooperative Bindung der Intercalatoren sprechen Circular-dichroismus(CD)-Spektren, die auf den Einfluß der Intercalatoren nachbarschaft hinweisen.^[10] Ferner konnten durch Simulationen des Elektronentransports in Abhängigkeit vom Abstand der Metallkomplexe die Experimente mit *nicht kovalent verbrückten* Intercalatoren am besten mit paarweise gebundenen Donor-/Acceptor-Komplexen korreliert werden.^[11] Andererseits spricht gegen einen direkten Austausch zwischen Donor-

und Acceptor-Intercalatoren, daß sich die Stöchiometrie von DNA und Intercalatoren nicht auf die Kinetik auswirkt und die Geschwindigkeit der Elektronenübertragung deutlich sequenz-abhängig ist; so ist Elektronenaustausch an poly-d(AT) um den Faktor 30 schneller als bei poly-d(GC).^[16] Es ist schwierig, die für den Elektronentransport wichtigen Einflüsse auseinanderzuhalten, solange die Abstände der Intercalatoren nicht genau bekannt sind. Daher erscheint die *kovalente Fixierung der Intercalatoren* notwendig.

Wird ein DNA-Doppelstrang mit einer Länge von 15 Basenpaaren an den 5'-Enden mit dem Elektronendonator und Metall-intercalator $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ und gegenüberliegend mit dem Acceptor $[\text{Rh}(\text{phen})(\text{phi})_2]^{3+}$ ($\text{phen} = 1,10\text{-Phenanthrolin}$, $\text{dppz} = \text{Dipyrido}[2,3-\alpha:2',3'-c]\text{phenazin}$, $\text{phi} = 9,10\text{-Phenanthrenchinondiimin}$) kovalent verknüpft (Abb. 1 b), so daß Intercalation der Metallliganden im Abstand von etwa 40 Å möglich ist, dann wird bei photochemischer Anregung die sonst bei intercalierenden Rutheniumkomplexen übliche Lumineszenz nicht beobachtet.^[12] Diese Lumineszenzlösung wurde interpretiert als Elektronentransfer vom angeregten Ruthenium- zum Rhodiumkomplex und zurück mit einer Geschwindigkeit von mindestens $3 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$. Kontrollexperimente belegen anhand der photochemischen DNA-Spaltung am Ort der Intercalation, daß sie hauptsächlich zwei Basenpaare von den Enden entfernt zu erwarten ist. Ferner ist zu mindestens 85% mit intramolekularem Auslöschen der Rutheniumkomplex-Emission zu rechnen.^[12] Die Abhängigkeit des Elektronentransports vom Abstand zwischen Donor und Acceptor bleibt eine wichtige Frage.

Jüngste Experimente von Lewis et al. beschreiben photoinduzierten Elektronentransport zwischen einem Stilbenmolekül, durch das zwei als Doppelhelix paarende DNA-Stränge kovalent im Loop verbrückt werden, und dem Guanin eines G-C-Basenpaars.^[13] Es wird eine Abnahme der Fluoreszenzauslösung mit zunehmender Entfernung des G-C-Basepaars vom Stilbenmolekül festgestellt. Auch Tanaka et al. beobachten eine Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers, diesmal zwischen einem Acridinderivat, das kovalent an Stelle einer Nucleotideinheit in DNA eingebaut ist, und Guanin.^[14] Darüber hinaus sind Experimente zur Distanzabhängigkeit des Elektronentransports von Meade^[15] und Barton et al.^[6] zu erwarten. Letztere haben kovalent verankertes Ethidium an Stelle des Rutheniumdonors mit Donor-Acceptor-Abständen von 17–36 Å verwendet und eine vernachlässigbare Abhängigkeit der Fluoreszenzauslösung vom Donor-Acceptor-Abstand festgestellt.

Wegen der großen biologischen Bedeutung des Elektronentransfers hat die Entwicklung künstlicher Elektronentransfersysteme für die Simulation biologisch relevanter Funktionen großes Interesse hervorgerufen. Die Gruppe um Barton beschreibt DNA-Mutation in Form eines an C8 oxidierten Guanins^[16] und Reparatur eines aus einer [2 + 2]-Cycloaddition hervorgegangenen Thymindimer-DNA-Schadens beruhend auf Elektronentransfer.^[17] Diese Experimente stützen die Vorstellung von einem Elektronentransport durch den DNA-Basenstapel. Darüber hinaus deuten sie auf ein neues Prinzip der Entstehung und möglicher Behandlung von DNA-Schäden hin, da der Ort der Mutation im Gegensatz zum Initiatorort des Elektronentransfers streng lokalisiert ist: Ist ein DNA-Duplex am 5'-Ende kovalent mit dem Elektronenacceptor $[\text{Rh}(\text{bpy})(\text{phi})_2]^{3+}$ verknüpft (Abb. 2; $\text{bpy}' = 2,2'\text{-Bipyridinderivat}$), dann ruft eine

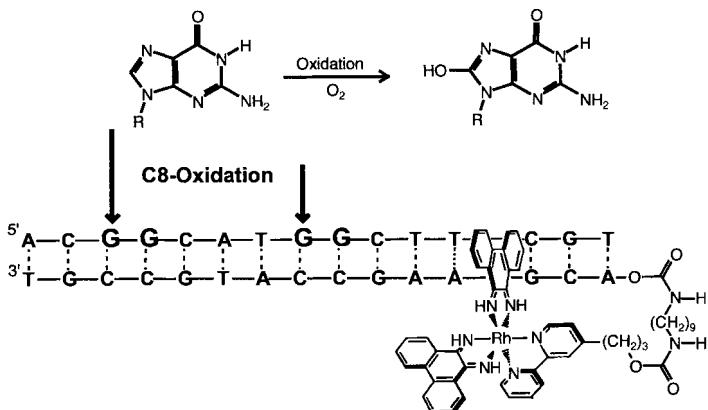


Abb. 2. Der durch photochemische Anregung des kovalent verknüpften Rhodiumkomplexintercalators ausgelöste Elektronentransport führt selektiv zur Oxidation des 5'-ständigen Guanins innerhalb eines G-G-Dimers.

photochemische Anregung (365 nm) des intercalierenden Metallkomplexes eine Elektronenlücke hervor, die im DNA-Basenstapel equilibrieren könnte. An Positionen, die wie GG- oder GGG-Sequenzen (aufgrund der Elektronendonoreigenschaften der benachbarten Guanin-basen) oxidationsempfindlich sind, wird Oxidation an C8 der 5'-ständigen Base mit einer geringen Quantenausbeute von 10^{-7} festgestellt. Sind mehrere GG-Sequenzen vorhanden, wird bevorzugt die entferntere oxidiert.^[16]

Die Reparatur eines Thymindimerschadens erfolgt quantitativ durch photochemische Anregung des statistisch intercalierenden Metallkomplexes $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{dmb})]^{3+}$ ($\text{dmb} = 5,5'\text{-Dimethyl-2,2'-bipyridin}$) und ist angesichts substöchiometrischer Verwendung des Intercalators katalytisch.^[17] Auch mit kovalent am DNA-5'-Ende verankertem $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{dmb})]^{3+}$ ist die Reparatur vollständig (Abb. 3). Die Ausbeuten hängen jedoch wiederum sensibel von der Stapelung der DNA-Basen und des Intercalators ab. So könnte die effektivere Reparatur des Schadens nicht ideal stapelnder Thymindimere durch einen freien Intercalator auf eine bevorzugte Reparatur im direkten Kontakt durch Herausklappen der Fehlstelle hinweisen. Kontrollexperimente zeigen, daß es sich bei der T-T-Dimer-Reparatur mit

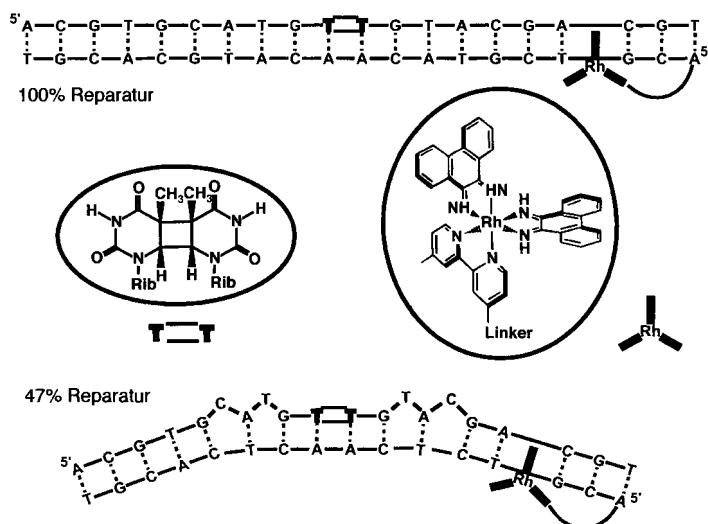


Abb. 3. Ein kovalent mit dem 5'-Ende der DNA verknüpfter Rhodiumkomplexintercalator bewirkt bei photochemischer Anregung die vollständige Reparatur eines Thymindimerschadens, sofern die Stapelwechselwirkungen nicht gestört sind.

kovalent verknüpftem Metallkomplex nicht um einen intermolekularen Vorgang zwischen DNA-Doppelsträngen handelt und es unerheblich ist, in welcher Entfernung oder auf welcher Seite des Schadens Intercalation stattfindet.^[17]

Die Untersuchungen an DNA-Elektronentransfersystemen sind widersprüchlich hinsichtlich der Distanzabhängigkeit des Elektronentransports. Während die Ergebnisse von Barton bei idealer DNA-Geometrie für distanzunabhängigen Ladungstransport sprechen,^[6, 16, 17] deuten andere Systeme auf eine klare Distanzabhängigkeit hin.^[13, 14] Die ideale Stapelung der am Transportprozeß beteiligten Arene (Intercalator, Basenpaare und Thymindimere) scheint eine Bedingung für ungestörte Elektronenübertragung zu sein. Mismatch-Basenpaare oder Störungen der Stranggeometrie durch Bulges wirken sich ebenso hindernd auf den Transport aus wie schlechter gebundene und damit geringer wechselwirkende Intercalatoren.^[6] Auch die Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers erscheint einleuchtend, da Nucleobasen unterschiedliche Beiträge zur Stabilisierung durch Stapelung liefern. Der Störung der Basenstapelung könnte entscheidende Bedeutung als Regulativ des sonst im DNA-Stapel weitgehend ungehinderten Elektronentransfers zu kommen.

Bereits auf der Grundlage der bisherigen Befunde wird an einer Anwendung des DNA-Elektronentransports in der Sensorik gearbeitet: Zur Detektion einer DNA-Sequenz kann man sich zu Nutze machen, daß der Einzelstrang geringe und der Doppelstrang erhebliche Leitfähigkeit aufweist. Die Anwesenheit der gesuchten DNA-Sequenz wäre anhand einer sprunghaften Zunahme der Leitfähigkeit ersichtlich, wenn sie mit dem komplementären, im elektrischen Feld fixierten Strang eine Doppelhelix bildet.^[18] Die Effizienz des Elektronentransports liefert ferner ein Maß für die strukturelle Störung einer DNA-Doppelhelix durch Mismatch-Paarungen, DNA-Schäden oder Bulges.

Die vorliegenden interessanten experimentellen Ansätze zum Elektronentransport in DNA werfen viele Fragen auf, deren Beantwortung ein mechanistisches Verständnis der elektronischen Eigenschaften von DNA verlangt. Die Entwicklung entsprechender Theorien und Prognosen erfordert das Zusammenwirken der Bioorganischen Chemie für das molekulare Design und die experimentelle Umsetzung geeigneter Testsysteme, der

Physikalischen Chemie für eine Diagnostik (Übertragungs geschwindigkeiten) sowie der Theoretischen Chemie für mechanistische Interpretationen.

Stichwörter: DNA-Oxidation · DNA-Reparatur · Elektronentransfer · Intercalationen

- [1] M. A. Ratner, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 4877–4883.
- [2] a) R. Weinkauf, P. Schanen, D. Yang, S. Soukara, E. W. Schlag, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 11255–11265; b) R. Weinkauf, P. Schanen, A. Metsala, E. W. Schlag, M. Bürgle, H. Kessler, *ibid.* **1996**, *100*, 18567–18585; c) R. Weinkauf, E. W. Schlag, R. Levine, *ibid.*, zur Publikation eingereicht.
- [3] a) J. N. Onuchic, D. N. Beratan, *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 722–733; b) D. N. Beratan, J. N. Onuchic, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Science* **1992**, *258*, 1740–1741.
- [4] a) D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411–415; b) T. A. Hoffmann, J. Ladik, *Adv. Chem. Phys.* **1964**, *7*, 84; c) R. S. Snart, *Biopolymers* **1968**, *6*, 293–297; d) S. Suhai, *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 5599–5603; e) D. Dee, M. E. Baur, *ibid.* **1974**, *60*, 541–560; f) P. M. Cullis, J. D. McClymont, M. C. R. Symons, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, *86*, 591–592.
- [5] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5361–5362.
- [6] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [7] a) A. K. Felts, W. T. Pollard, R. A. Friesner, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 2929–2940; b) D. N. Beratan, S. Priyadarshy, S. M. Risser, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 3–8; c) S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17678–17682; d) A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3656–3660.
- [8] J. M. Warman, M. P. de Haas, A. Rupprecht, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *249*, 319–322.
- [9] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R. E. Holmlin, J. K. Barton, A. Hörmann, E. J. C. Olson, P. F. Barbara, *Science* **1996**, *273*, 475–479.
- [10] P. Lincoln, E. Tuite, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1454–1455.
- [11] E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hörmann, P. F. Barbara, *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 299–303.
- [12] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025–1029. Für kovalent an den Enden eines DNA-Doppelstranges verknüpfte, aber nicht intercalierende Metallkomplexe siehe: T. J. Meade, J. F. Kayem, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 358–360; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 353–354; siehe auch Titelblatt, *ibid.* **1995**, *107*, Nr. 3 bzw. **1995**, *34*, No. 3.
- [13] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasilewski, *Science* **1997**, *277*, 673–676.
- [14] a) K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem.*, im Druck; b) K. Fukui, K. Iwane, T. Shimidzu, K. Tanaka, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4983–4986.
- [15] Siehe [7b]; persönliche Mitteilung von T. J. Meade an D. N. Beratan.
- [16] a) D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, *382*, 731–735; b) E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2921–2925; c) M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. Coates Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 389–400.
- [17] a) P. J. Dandliker, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Science* **1997**, *275*, 1465–1468; b) G. Taubes, *ibid.* **1997**, *275*, 1420–1421.
- [18] T. J. Meade, American Association for the Advancement of Science Meeting, Atlanta, USA, **1995**.