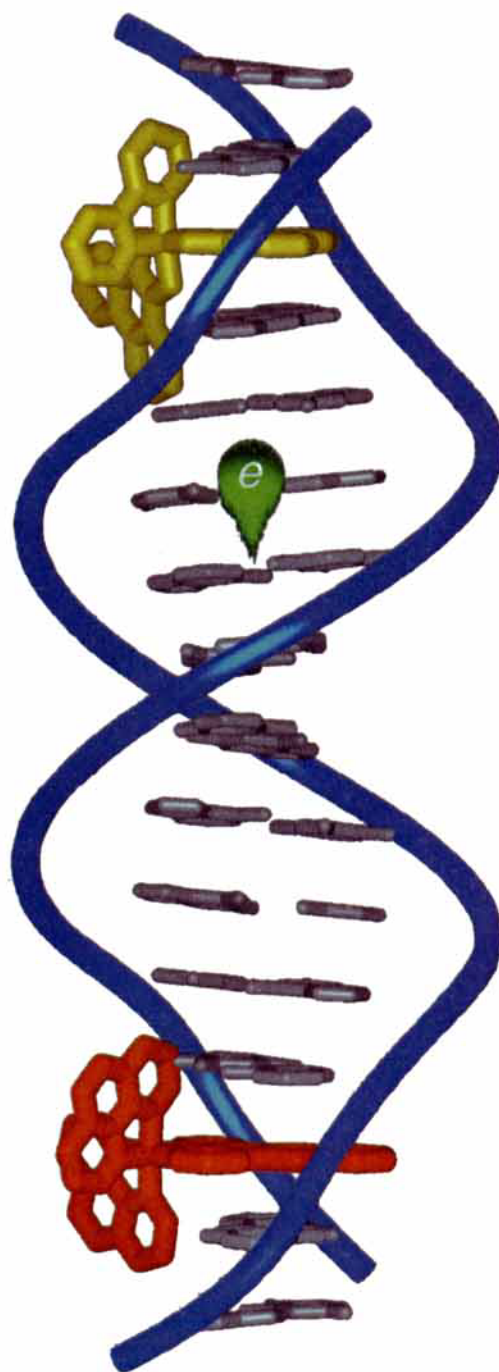


Hauptangriffspunkt oxidativer Nucleinsäureschädigungen in der Zelle ist Guanin (G). Metallkomplexe, die starke Photooxidantien sind und in definierter Entfernung von einem GG-Dublett an die DNA angeknüpft werden, können eine „Fernoxidation“ auslösen, die selektiv das 5'-Guanin schädigt.

Metallkomplexe, deren Liganden eine ausgedehnte „aromatische Oberfläche“ haben und die daher ausgezeichnet in die DNA intercalieren, können als Elektronendonoren (rot) und -acceptoren (gelb) für photoinduzierten Elektronentransfer durch den DNA-Basenstapel fungieren.



Ladungsübertragung durch den DNA-Basenstapel

R. Erik Holmlin, Peter J. Dandliker und Jacqueline K. Barton*

Seit dem ersten Strukturvorschlag für die DNA-Doppelhelix besteht eine Diskussion darüber, ob die Stapelung der DNA-Basen eine effiziente, weitreichende Ladungsübertragung ermöglicht. Die Konsequenzen einer solchen Radikalstellenwanderung durch die DNA sollten für das Verständnis von Carcinogenese und Mutagenese in Betracht gezogen werden. Die DNA zeichnet sich im Innern der Helix durch eine stapelförmige Anordnung von heterocyclischen, aromatischen Basenpaaren aus; sie ist ein einmaliges System zur Erforschung des Elektronentransfers. In unserer Arbeitsgruppe wurden Metallkomplexe entwickelt, die zwischen die Basenpaare der DNA-Helix intercalieren und die es ermöglichen, DNA-vermittelten Elek-

tronentransfer zu untersuchen. In diesem Aufsatz beschreiben wir einige von uns durchgeführte Elektronentransferreaktionen, die durch den DNA-Basenstapel vermittelt werden. In einigen dient die DNA als Brücke, und mit spektroskopischen Verfahren können wir untersuchen, wie der Basenstapel DNA-gebundene Donoren und Acceptoren koppelt. Die Untersuchungen deuten auf eine hohe Empfindlichkeit der Kopplung gegenüber der DNA-Intercalation hin. Wenn der DNA-Basenstapel Donoren und Acceptoren effektiv miteinander verbindet, kann er auch als ausgezeichnete Elektronentransferkanal der DNA selbst dienen, allerdings in Reaktionen, die von entfernten Positionen ausgelöst wurden. Wir haben auch viele

Versuche zur oxidativen DNA-Schädigung durchgeführt, die von einem in größerer Entfernung an der Helix fixierten Oxidationsmittel initiiert wird. Die Ladungsübertragungen hängen sehr von der DNA-Intercalation und von der Integrität des Basenstapels ab, aber nicht von der Entfernung. Auch die als DNA-Schädigung physiologisch bedeutsame Bildung von Thymin-dimeren kann in einer durch Elektronentransfer initiierten Reaktion rückgängig gemacht werden. Über größere Entfernungen vermittelte chemische Reaktionen werden also durch die DNA-Doppelhelix ermöglicht.

Stichwörter: Basenstapelung • DNA-Oxidation • DNA-Reparatur • Elektronentransfer • Intercalationen

1. Einleitung

Biochemiker untersuchen die DNA-Doppelhelix in erster Linie unter dem Aspekt der molekularen Erkennung. Als molekulare Bibliothek der Zelle muß sie die genetische Information über viele nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nucleinsäuren zugänglich machen und umsetzen.^[1] Das rationale Design von Wirkstoffen, die auf die DNA abzielen, wird erst möglich, wenn die grundlegenden Prinzipien aufgeklärt werden, nach denen Nucleinsäurepositionen erkannt werden.^[2] Um die bemerkenswerte Vielfalt der Funktionen der DNA-Doppelhelix in der Zelle wie das Reparieren von DNA-Schäden, das Koordinieren der Transkription oder das Überprüfen der Perfektion der DNA-Bibliothek im einzelnen zu verstehen, ist es wichtig, die reichhaltige DNA-Chemie zu berücksichtigen und zu erforschen.^[3] Wir haben uns auf die DNA als Medium für Ladungsübertragungen konzentriert. Unter diesem Aspekt kann das DNA-Polymer

in seiner doppelhelicalen Form als ausgedehnte Anordnung gestapelter, elektronisch gekoppelter, aromatischer Heterocyclen in einem polyanionischen helicalen Zucker-Phosphat-Rückgrat angesehen werden (Abb. 1). Ausgedehnte π -Elektronensysteme in fester Phase erleichtern den Ladungstransport und sind ein Hauptforschungsgebiet der Materialwissenschaften.^[4,5] Die DNA-Doppelhelix ist ein molekulares, gestapeltes π -Elektronensystem und als solches ein einzigartiger, strukturell wohldefinierter Forschungsgegenstand. Für uns stellt sich die Frage, ob die DNA die Ladungsübertragung über weite Strecken erleichtert und ob der Basenpaarstapel somit als Vermittler chemischer Reaktionen über größere Entfernungen wirken kann.

Während der über vierzig Jahre seit Watsons und Cricks Vorschlag für die DNA-Doppelhelixstruktur haben Wissenschaftler die Möglichkeit der Ladungsübertragung durch den Basenstapel diskutiert. In frühen theoretischen Modellen wurde vorhergesagt, daß Elektronen mit Geschwindigkeiten im Pikosekundenbereich von Base zu Base springen könnten.^[6] Mit Leitfähigkeitsmessungen an DNA wurde die Größenordnung einer „DNA-Bandlücke“ auf etwa 2 eV festgelegt.^[7] Die Frage, ob Radikalstellen, die durch hochenergetische Bestrahlung der DNA erzeugt wurden,

[*] Prof. J. K. Barton, R. E. Holmlin, Dr. P. J. Dandliker
Division of Chemistry and Chemical Engineering
California Institute of Technology
Pasadena, CA 91125 (USA)
Telefax: Int. + 818/577-4976
E-mail: jkbarton@cco.caltech.edu

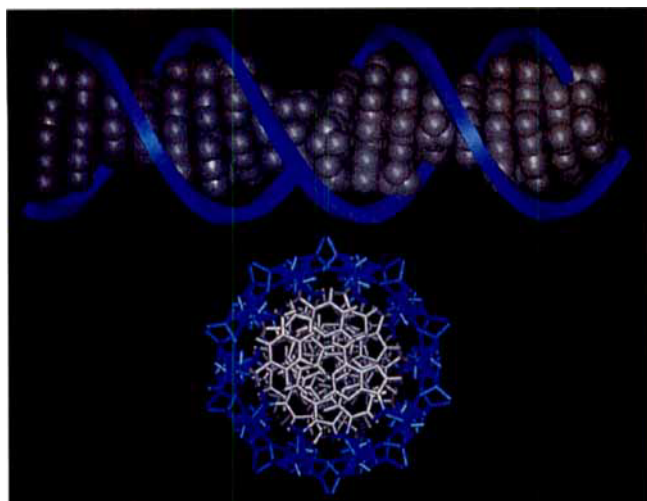


Abb. 1. Schematische Darstellung einer DNA-Doppelhelix; die lineare Anordnung der Basenstapel der aromatischen Heterocyclus ist grau, das Zucker-Phosphat-Rückgrat blau dargestellt. Oben: Blickrichtung senkrecht zur Helixachse, unten: Blickrichtung entlang der Helixachse.

über Entfernungen von 2 oder 200 Basenpaaren wandern, war Gegenstand intensiver Diskussionen unter Strahlungsbiologen.^[8] In den letzten zehn Jahren haben sich die Chemiker bei

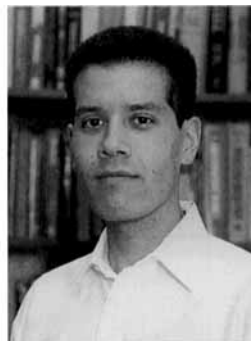
Experimenten mit DNA als Medium für Ladungsübertragungen auf photoinduzierten Elektronentransfer zwischen DNA-gebundenen Donoren und Acceptoren in Lösung konzentriert.^[9,10]

Wir haben kleine, koordinativ gesättigte Übergangsmetallkomplexe entwickelt, um die Nucleinsäurestruktur und -funktion zu untersuchen.^[11] Zum Studium DNA-vermittelter Ladungsübertragungen griffen wir auf die in ihren chemischen und photophysikalischen Eigenschaften gut charakterisierten Polypyridyl-Metallkomplexe zurück.^[9,12] Unsere ersten Experimente ergaben, daß die Gegenwart des DNA-Polymers die Effizienz des photoinduzierten Elektronentransfers zwischen schwach an die DNA gebundenen Komplexen steigert;^[13] die Lumineszenzlöschung von angeregtem $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ durch Tris(phenanthrolin)-Komplexe von Co^{III} und Rh^{III} wird durch die DNA um zwei Größenordnungen verstärkt (phen = 1,10-Phenanthrolin). Außerdem kann die Elektronentransferreaktion enantioselektiv sein: bei Δ - $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ist der Elektronentransfer effizienter als beim Λ -Isomer, das weniger fest an die DNA bindet. Diese ersten Versuche demonstrierten bereits den Nutzen chiraler, oktaedrischer Metallkomplexe als Sonden für den Elektronentransfer durch den DNA-Basenstapel. Da Tris(phenanthrolin)-Metallkomplexe nicht nur durch Intercalation binden,

R. Erik Holmlin, geboren 1967, erwarb den Grad eines Bachelor of Arts in Chemie am Occidental College in Los Angeles. Seine Dissertationsarbeit begann er 1993 als National Science Foundation Graduate Research Fellow bei Professor Jacqueline K. Barton am California Institute of Technology mit Forschungen über Anwendungen von Metallintercalatoren bei DNA-vermittelten Ladungsübertragungen.



R. E. Holmlin



P. Dandliker



J. K. Barton

Peter Dandliker, geboren 1967, erwarb 1990 den Bachelor-Grad in Chemie an der University of California in Berkeley. 1995 promovierte er in Organischer Chemie bei François Diederich (UCLA) und schloß sich 1995 der Arbeitsgruppe von Jacqueline Barton als Stipendiat des Damon Runyon-Walter Winchell Cancer Fund an. Dort beschäftigt er sich mit der photochemischen Reparatur von Pyrimidindinukleotiden in DNA mit Intercalatoren.

Jacqueline K. Barton ist Hanisch Memorial Professor für Chemie am California Institute of Technology (Caltech). Sie erwarb ihren Dokortitel in Anorganischer Chemie 1979 bei S. J. Lippard an der Columbia University. Als Postdoktorandin arbeitete sie in den Bell Laboratories und an der Yale University und wurde anschließend Assistant Professor am Hunter College der City University von New York. 1983 kehrte sie an die Columbia University zurück und wurde dort 1985 Associate Professor für Chemie und Biowissenschaften und 1986 Professor. Im Herbst 1989 trat sie ihre gegenwärtige Position am Caltech an. Barton ist eine Wegbereiterin bei der Anwendung von Übergangsmetallkomplexen für die Untersuchung von Erkennung und Reaktionen der DNA-Doppelhelix. Sie hat oktaedrische Metallkomplexe entwickelt, die Nucleinsäurepositionen mit hoher Affinität und Spezifität erkennen. Diese synthetischen Übergangsmetallkomplexe wurden erfolgreich angewendet, um die chemischen Prinzipien der Erkennung von Nucleinsäuren aufzuklären, und um lumineszierende und photochemische Reagentien als neue diagnostische Werkzeuge zu entwickeln. Mit diesen Übergangsmetallkomplexen als Sonden wurden auch Untersuchungen durchgeführt, um die Chemie des durch die DNA-Doppelhelix vermittelten Elektronentransfers aufzuklären. Barton ist Autorin von mehr als 100 Veröffentlichungen und hat zahlreiche Auszeichnungen erhalten, darunter 1996 die Paul-Karrer-Medaille.

könnten mehrere Faktoren zu der gesteigerten Reaktivität in Gegenwart von DNA beitragen: a) die erhöhte lokale Konzentration von Reaktanten in der Nähe der Helix, b) die erleichterte Diffusion der Moleküle längs des Polymers und c) (vielleicht am interessantesten) ein weitreichender Elektronentransfer durch den Stapel.

Seit diesen ersten Untersuchungen haben wir uns auf Metallintercalatoren konzentriert, also Komplexe, die durch klassische Intercalation an die DNA binden, um die Chemie der Ladungsübertragung durch den DNA-Basestapel zu untersuchen.^[9] Die feste Bindung und starre Assoziation der Komplexe an die Helix schränkt die Diffusion längs des DNA-Polymers im Verlauf der Reaktion stark ein. Darüber hinaus ermöglicht die Einbettung der Donoren und Acceptoren durch Intercalation in die DNA-Helix einen direkten Einblick in den Basenstapel. Wir stellten in allen Fällen fest, daß die DNA-vermittelten Ladungsübertragungen vor allem dadurch beeinflusst werden, wie die Donoren und Acceptoren in den DNA-Basenstapel eingebaut sind. Hier beschreiben wir unsere jüngsten Untersuchungen zur Chemie des DNA-vermittelten Elektronentransfers mit Metallintercalatoren. Wir geben keinen erschöpfenden Überblick über die Literatur, sondern diskutieren eigene Experimente, die die von uns erkannten Prinzipien und die strittigen Punkte, die wir zur Beschreibung dieser Chemie noch besser verstehen müssen, verdeutlichen sollen. Die Untersuchungen des DNA-vermittelten Elektronentransfers sind methodisch herausfordernd, denn sie erfordern eine Kombination der Bioanorganischen Chemie, der Photophysik schneller Prozesse und der Chemie zur Modifizierung von Nucleinsäuren. Es lohnt sich aber, sich dieser Herausforderung zu stellen, denn die DNA-Doppelhelix ist nicht bloß eine passive Oberfläche für Reaktionen, sondern ist vielmehr ein bemerkenswertes Medium, das auch chemische Reaktionen über größere Entfernungen vermittelt.

2. Metallintercalatoren als Sonden für DNA-vermittelten Elektronentransfer

Zur Untersuchung des DNA-vermittelten Elektronentransfers haben wir uns auf oktaedrische Metallkomplexe als Sonden beschränkt, die durch Intercalation fest an die DNA binden. Zur Untersuchung der nichtkovalenten Assoziation dieser Metallkomplexe mit der DNA-Doppelhelix haben sich NMR-Messungen bewährt, während die Positionen und die Faktoren, die die Assoziation der Komplexe am helicalen Polymer beeinflussen, mit photophysikalischen und photochemischen Methoden bestimmt wurden. Solche kombinierten Experimente haben sich als sehr leistungsfähig erwie-

sen, um die Chemie der Ladungsübertragungen aufzuklären. In Abbildung 2 und 3 sind einige der Komplexe gezeigt, die als Donoren und Acceptoren für photoinduzierten Elektronentransfer verwendet werden können.

2.1. Dipyridylphenazin-Ruthenium- und -Osmium-Komplexe

Die Gruppe der Metallkomplexe vom Typ $[M(L)_2(dppz)]^{2+}$ ($M = Ru, Os$; $L = phen, bpy$), die den dppz-Liganden und weitere Liganden enthalten, sind eine konsequente Weiterentwicklung der Tris(phenanthrolin)-Metallkomplexe; die „aromatische Oberfläche“ des dppz-Liganden ist ausgezeichnet für eine Intercalation geeignet (Abb. 2). Bei den dppz-Komplexen von Ruthenium und Osmium sowie kürzlich auch bei denen von Cobalt, Nickel und Rhenium konnte gezeigt werden, daß sie tatsächlich an die DNA bevorzugt durch Intercalation des dppz-Liganden in den helicalen Basenstapel binden.^[14–17] Die Bindungsaffinitäten der dppz-Komplexe für die Duplex-DNA sind mit $\geq 10^7 M^{-1}$ um etwa drei Zehnerpotenzen größer als die der einfachen Tris(phenanthrolin)-Metallkomplexe. NMR-Untersuchungen selektiv deuterierter, an ein DNA-Hexamer gebundener $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$ -Isomere sprachen für eine Intercalation von der Seite der großen Furche der Helix aus, wobei eine Reihe verschiedener Orientierungen bei der Intercalation vorkamen.^[18] NMR-spektroskopischen Untersuchungen zufolge werden zwar einige Sequenzen bei der Bindung der Komplexe an die DNA bevorzugt, doch ist die Sequenzspezifität nicht groß. Dies stimmt mit den Ergebnis-

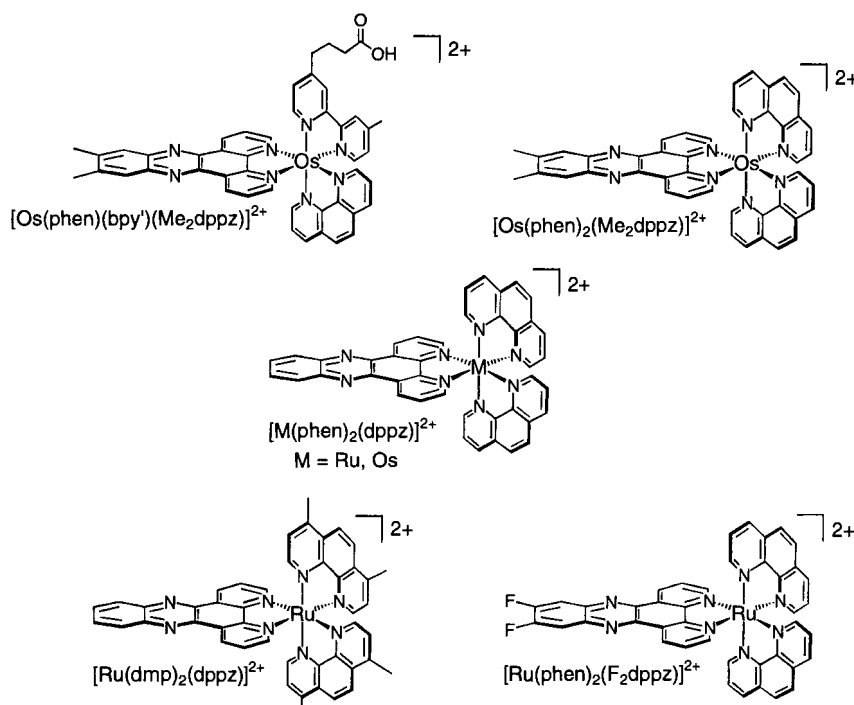


Abb. 2. Derivate von $4-[M(phen)_2(dppz)]^{2+}$, die an die DNA bevorzugt durch Einbau des dppz-Liganden zwischen benachbarte DNA-Basenpaare binden (bpy' = 2,2'-Bipyridinderivat, dppz = Dipyrido[2,3-a:2',3'-c]phenazin, dmp = 4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin). Im MLCT-angeregten Zustand übertragen diese Komplexe ein Elektron in den Basenstapel der DNA.

sen biophysikalischer Untersuchungen überein, nach denen die klassische Intercalation im wesentlichen willkürlich längs des helicalen Polymers erfolgt. Wegen der geringen Sequenzspezifität ist jedoch eine genaue Untersuchung, wie diese Komplexe in die Helix eingefügt sind, unmöglich.

Die dppz-Komplexe sind nicht nur wegen ihrer festen Bindung durch Intercalation, sondern auch wegen ihrer einmaligen photophysikalischen Eigenschaften für unsere Untersuchungen gut geeignet. Die Bestrahlung solcher Komplexe mit sichtbarem Licht führt zur effizienten Population eines angeregten Metall \rightarrow Ligand-Charge-Transfer (MLCT)-Zustandes am dppz-Liganden.^[14,19,20] Während die Lumineszenz bei Anregung in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen werden kann, wird sie in wässriger Lösung durch Protonenübertragung vom Lösungsmittel auf die Phenazinstickstoffatome gelöscht.^[19,20] Der DNA-Basenstapel bietet einen Schutz vor dieser Lumineszenzlöschung. Wenn der dppz-Ligand also zwischen die Basenpaare intercaliert, sind die Phenazinstickstoffatome vor Wasser geschützt, und die Lumineszenz des Komplexes tritt wieder ein. Dieser Effekt hat sich als empfindlicher Nachweis für Nucleinsäuren erwiesen, und der Ausdruck „molekularer Lichtschalter“ wurde eingeführt, um dieses interessante Lumineszenzphänomen zu beschreiben. Mit den dppz-Komplexen lassen sich auch andere hydrophobe Matrices charakterisieren, z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Micellen^[21] und Nafion-Filme.^[22]

Wegen der Lichtschaltereigenschaft von $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{dppz})]^{2+}$ -Komplexen sind die Steady-state- und die zeitaufgelösten Emissionsprofile besonders empfindlich gegenüber der Orientierung des Metallkomplexes innerhalb des DNA-Basenstapels.^[14] Wird $\text{rac}-[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ an eine Mischsequenz-B-Helix (Nucleotid:Ru = 100:1) gebunden, so nimmt die Emission biexponentiell mit $\tau_1 = 130$ ns (80 %) und $\tau_2 = 730$ ns (20 %) ab. Bei den enantiomerenreinen Komplexen Δ - und Λ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ wurde nach Bindung an die DNA ebenfalls ein biexponentielles Abklingen der Lumineszenz beobachtet,^[23] das wahrscheinlich die NMR-spektroskopisch festgestellten unterschiedlichen Ligandenorientierungen widerspiegelt.^[18] Bei DNA-gebundenem Δ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ nimmt die Emission mit $\tau_1 = 150$ ns (80 %) und $\tau_2 = 800$ ns (20 %) ab, während bei Λ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$, gebunden an eine Mischsequenz-DNA, die Lumineszenz mit $\tau_1 = 30$ ns (80 %) und $\tau_2 = 160$ ns (20 %) abfällt. Dieser Unterschied der Emissionsprofile, der sich in der Zunahme der Steady-State-Emissionsausbeute des DNA-gebundenen Δ -Enantiomers äußert, spiegelt die größere Abschirmung des intercalierten Liganden gegen das Lösungsmittel wider. Die Neigung zu einer so engen Assoziation zwischen Δ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ und der Duplex-DNA ist auf die passenden Symmetrien der Komponenten zurückzuführen, die beide rechtsgängig sind.^[24] Es ist ferner bemerkenswert, daß die Lebensdauer des angeregten Zustandes und die relative Verteilung mit der Konzentration der gebundenen Spezies variieren. Dies könnte daran liegen, daß die Abklingparameter empfindlich von der Starrheit der Helix abhängen, die mit steigender Beladung mit Intercalatoren zunimmt.

Ersetzt man im Komplex $[\text{M}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ Ruthenium durch Osmium, so ändern sich die Lichtschaltereigenschaften

und die DNA-Bindungseigenschaften des Komplexes nicht; man erhält vielmehr ein isostrukturelles Analogon des Komplexes mit deutlich unterschiedlichen photophysikalischen und elektrochemischen Eigenschaften. Wie beim Rutheniumkomplex läßt sich auch bei $[\text{Os}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ in Abwesenheit von DNA bei Bestrahlung in wässriger Lösung keine Photolumineszenz nachweisen.^[15,25] In Gegenwart von DNA kommt es dagegen nach Anregung zu einer deutlichen Emission von langwelligem Licht ($\lambda_{\text{max}} = 738$ nm). Bei DNA-gebundenem Δ - $[\text{Os}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ tritt ein biexponentieller Zerfall der Emission mit Lebensdauern der angeregten Zustände von unter 10 ns auf. Das Osmiumion ist gegenüber dem Rutheniumion in der Oxidationsstufe +3 um ≈ 500 mV stabilisiert, so daß die Oxidation des angeregten Zustandes ($E_{1/2}(*\text{Os}^{\text{II}}/\text{Os}^{\text{III}}) = 0.78$ V gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE)) um ≈ 200 mV begünstigt ist ($E_{1/2}(*\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}) = 0.60$ V). Wir können auch phen- und bpy-Analoga mit elektronenschiebenden oder elektronenziehenden Substituenten einsetzen, um die elektrochemischen Eigenschaften dieser Komplexe über einen weiten Potentialbereich einzustellen. Die Einführung von Methylgruppen in den Positionen 7 und 8 des dppz-Liganden verlängert die Lebensdauer der angeregten Zustände der DNA-gebundenen Osmium- und Rutheniumderivate ($\text{M} = \text{Ru}$: $\tau_1 = 370$ ns (65 %), $\tau_2 = 1170$ ns (35 %); $\text{M} = \text{Os}$: $\tau_1 = 2.18$ ns (50 %), $\tau_2 = 10.1$ ns (50 %)). Die bevorzugte Ladungsübertragung auf den dppz-Liganden ist eine wichtige Eigenschaft, die wir in unseren Untersuchungen des DNA-vermittelten Elektronentransfers nutzten, da beim intercalierten Komplex nach der Anregung die Ladung direkt in den Basenstapel übertragen wird. Die dppz-Komplexe sind daher besonders gut geeignet, um die Chemie der DNA-vermittelten Ladungsübertragung zu untersuchen.

2.2. Phenanthrenchinondiimin-Rh^{III}-Komplexe

Alle von uns eingesetzten Rhodiumintercalatoren enthalten als Liganden Phenanthrenchinondiimin (phi). Einige der Rh^{III}-Komplexe, die wir entwickelt haben, sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Auch in diesen Komplexen weist ein Ligand eine ausgedehnte „aromatische Oberfläche“ für die Intercalation auf. Tatsächlich binden alle von uns bislang synthetisierten phi-Rhodiumkomplexe fest an die DNA, und zwar bevorzugt durch Intercalation des phi-Liganden. Die Affinitäten reichen von 10^6 M^{-1} bis 10^8 M^{-1} , und die Erkennung bestimmter Stellen kann selektiv durch Variation der Substituenten an den nicht intercalierenden Liganden eingestellt werden.^[26,27] Einige dieser Komplexe erreichen Affinitäten und Spezifitäten für die DNA, die denen DNA-bindender Proteine nahekommen.^[27]

NMR-Messungen haben sich als besonders geeignet erwiesen, um die Strukturaspekte der Assoziation der Komplexe mit der DNA zu beschreiben.^[28,29] Alle Komplexe binden an die DNA offensichtlich in der großen Furche. Wenn der Komplex durch Intercalation verankert ist, können funktionelle Gruppen an den übrigen Liganden mit Positionen in der großen Furche interagieren und so die Selektivität für die Bindungsstelle bestimmen.^[26,27] Tatsäch-

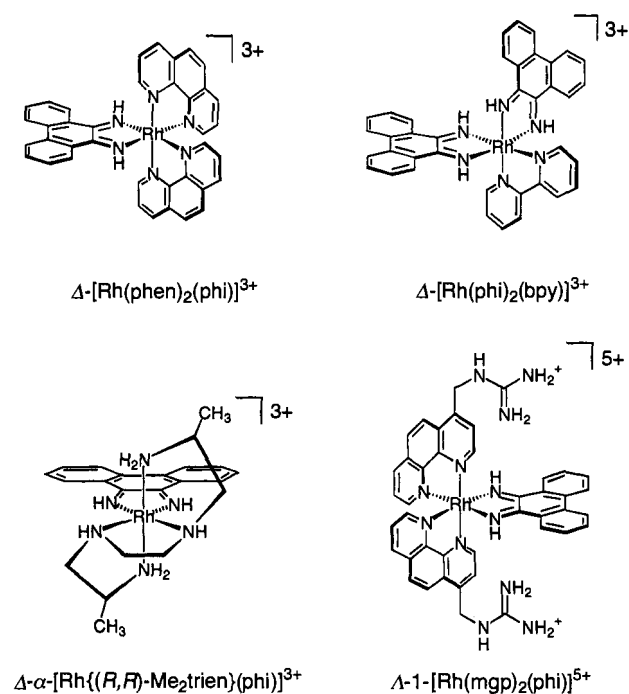


Abb. 3. Die phi-Komplexe von Rhodium(III), die durch Intercalation an die DNA binden (phi = 9,10-Phenanthrenchinondiimin, trien = Triethylenetetraamin, mgp = 4-Guanidiniummethyl-1,10-phenanthroline). Die Gemeinsamkeit dieser Gruppe von Metallintercalatoren ist der phi-Ligand, der zur Verankerung des Komplexes in der großen DNA-Furche dient. Durch systematische Variation der übrigen Liganden lassen sich Bindungsaffinität und Ortsspezifität einstellen.

lich haben wir im Fall von $\Delta\text{-[Rh((R,R)\text{-Me}_2\text{trien})(phi)]}^{3+}$ einen Komplex so entwickelt, daß er über eine Anordnung nichtkovalenter Bindungen in der großen Furche an die Sequenz 5'-TGCA-3' andocken sollte. Kürzlich wurde auf der Grundlage von NMR-Messungen ein hochaufgelöstes Strukturmodell dieses Komplexes, ortsspezifisch gebunden an ein Dekamer, ermittelt:^[29] Der Metallkomplex ist tief in den Basenstapel eingebettet und symmetrisch an die Doppelhelix gebunden, wobei die nichtkovalenten Bindungen zwischen den übrigen Liganden und der Sequenz 5'-TGCA-3' der großen Furche deutlich sind. Wichtig ist hierbei, daß die Doppelhelix zwar partiell entwunden wird, damit der Intercalator eingebettet werden kann, aber außer an dieser Stelle die Basenstapelung der DNA nur wenig gestört wird.^[29]

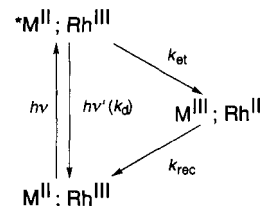
Bei der Untersuchung des DNA-vermittelten Elektronentransfers zwischen Metallintercalatoren haben wir oft $[\text{Rh(phi)}_2\text{(L)}]^{3+}$ -Komplexe als Elektronenacceptoren im Grundzustand verwendet. Diese Komplexe sind bei der Assoziation mit DNA nicht sequenzspezifisch, sondern binden willkürlich an die Duplex-DNA.^[30] Cyclovoltammetrisch wurde ermittelt, daß bei $[\text{Rh(phi)}_2\text{(L)}]^{3+}$ in DMF die formale Reduktion $\text{Rh}^{\text{III}} \rightarrow \text{Rh}^{\text{II}}$ bei ≈ 0 V (gegen NHE) stattfindet.^[31] Daher ist der Elektronentransfer von angeregtem $[\text{M(phen)}_2\text{(dppz)}]^{2+}$ auf DNA-gebundenes $[\text{Rh(phi)}_2\text{(L)}]^{3+}$ thermodynamisch günstig (M = Ru: $\Delta G^\circ = 0.56$ V; M = Os: $\Delta G^\circ = 0.73$ V).

Die Photochemie dieser phi-Rhodium-Komplexe hat sich in zweifacher Hinsicht als wertvoll herausgestellt: Erstens ließ sich aufklären, an welcher Stelle des helicalen Polymers der Metallkomplex bei einer Elektronentransferreaktion gebun-

den ist, und zweitens sind sie starke Photooxidantien, die in die DNA intercalieren. Dank der vielfältigen Photochemie dieser Komplexe können wir mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge selektiv verschiedene chemische Reaktionen auslösen.^[30,32] Eine Bestrahlung der DNA-gebundenen Komplexe mit UV-Licht ($\lambda = 313$ nm) verursacht einen direkten Bruch des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA, vermutlich, indem durch aktiviertes phi ein C3'-Wasserstoffatom vom Desoxyribose-Residuum an der Intercalationsstelle abstrahiert wird.^[30] Der Strangbruch markiert die Intercalationsstelle. Mit dieser photochemischen Reaktion wurde erfolgreich die Ortsspezifität einer Reihe von Komplexen nachgewiesen. Wenn die $[\text{Rh(phi)}_2\text{(L)}]^{3+}$ -Komplexe stattdessen mit sichtbarem Licht ($\lambda \geq 365$ nm) angeregt werden, so wird ein stark oxidierender angeregter Zustand des Liganden populiert.^[32] Auf der Grundlage von Untersuchungen zur Lumineszenzlöschung in Lösung ohne DNA wurde das Reduktionspotential $E_{1/2}(*\text{Rh}^{\text{III}}/\text{Rh}^{\text{II}})$ des angeregten Zustandes von $[\text{Rh(phi)}_2\text{(phen)}]^{3+}$ auf ≈ 2 V gegen NHE geschätzt. Man kann also diese Rhodiumintercalatoren nicht nur im Grundzustand, sondern auch im angeregten Zustand als Elektronenacceptoren verwenden.

3. DNA als Brücke für Elektronentransfer

In Schema 1 ist der Cyclus der Elektronentransferreaktionen zwischen DNA-gebundenen Metallintercalatoren dargestellt. Bei Bestrahlung des M^{II} -Komplexes mit sichtbarem Licht wird der angeregte Donor gebildet, der ohne einen Acceptor unter Emission eines Photons zum Grundzustand zurückkehren kann. In Gegenwart eines Acceptors mit geeignetem Reduktionspotential kann der angeregte Donor mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{et} ein Elektron auf den Acceptor im Grundzustand übertragen, so daß die Emission unterdrückt wird. Die Produkte dieser Hinreaktion gehen dann eine thermische Rekombination mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{rec} zum Molekülpaar im Grundzustand ein. Innerhalb dieses Schemas können wir daher die Elektronentransferreaktionen zwischen den Metallintercalatoren und dem DNA-Basenstapel als dazwischenliegende Brücke verfolgen.



Schema 1. Cyclus der Elektronentransferreaktionen zwischen DNA-gebundenen Metallintercalatoren.

3.1. Kopplung mit dem Basenstapel durch Intercalation

Zunächst untersuchten wir die Emissionslöschung von DNA-gebundenem, angeregtem $[\text{Ru(phen)}_2\text{(dppz)}]^{2+}$ durch zwei Acceptoren, nämlich $[\text{Rh(phi)}_2\text{(phen)}]^{3+}$, das in die DNA intercaliert, und $[\text{Ru(NH}_3)_6]^{3+}$, das an die Oberfläche der Doppelhelix bindet (Abb. 4).^[31] Weil das ($\text{Rh}^{\text{III}}/\text{Rh}^{\text{II}}$)-

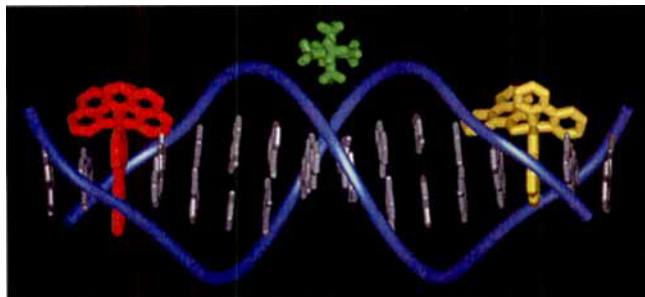


Abb. 4. Schematische Darstellung von DNA-gebundenen Übergangsmetallkomplexen. Gezeigt sind Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ (rot), Δ -[Rh(phen)₂(bpy)]³⁺ (gelb) und [Ru(NH₃)₆]³⁺ (grün). Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ und Δ -[Rh(phen)₂(bpy)]³⁺ sind Metallintercalatoren, mit denen sich die DNA-Basenstapelung direkt untersuchen läßt. [Ru(NH₃)₆]³⁺, das kein geeignetes Ligandengerüst hat, um in die DNA zu intercalieren, assoziiert nur an der DNA-Oberfläche und hat daher keinen Zugang zum Basenstapel.

Reduktionspotential von [Rh(phen)₂(phen)]³⁺ ($E_{1/2}(\text{Rh}^{\text{III}}/\text{Rh}^{\text{II}}) = -0.03 \text{ V}$ gegen NHE) fast identisch ist mit dem von [Ru(NH₃)₆]³⁺ (0.01 V), unterscheidet sich die treibende Kraft der beiden Donor/Acceptorpaare für die Reaktion nur wenig. Wenn der Intercalator [Rh(phen)₂(phen)]³⁺ oder [Rh(phen)₂(bpy)]³⁺ zu einer Lösung von DNA-gebundenem [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ titriert wird, findet eine effiziente und schnelle (unterhalb des Nanosekundenbereichs) Löschung der Rutheniumemission statt. In einem ähnlichen Konzentrationsbereich unterdrückt auch [Ru(NH₃)₆]³⁺ die Lumineszenz von DNA-gebundenem [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺, allerdings weniger effizient und im Nanosekundenbereich. Im Unterschied zum intercalierenden Acceptor weist [Ru(NH₃)₆]³⁺ bei der Lumineszenzlöschung ein Profil auf, das für eine diffusionsabhängige Reaktion spricht. Der Elektronentransfer verläuft hier nicht durch die DNA, vielmehr erleichtert die DNA lediglich die Diffusion des Acceptors.

Die Unterscheidung von Elektronentransferreaktionen zwischen intercalierten Donoren und Acceptoren und solchen, bei denen die Reaktanten in der Furche der Helix liegen, läßt sich auch aus den Daten anderer Arbeitsgruppen ableiten.^[10] Einerseits läuft z. B. die Lumineszenzlöschung von intercaliertem Ethidium durch ebenfalls intercaliertes *N,N'*-Dimethyl-2,7-diazapyreniumdichlorid (DAP) schneller ab als ohne DNA.^[10] Andererseits wird die Lumineszenz von Ethidium durch in der Furche gebundenes Methylviologen oder durch Palladiumporphyrine nicht so bemerkenswert effizient und schnell gelöscht wie durch Metallintercalatoren.^[10] Wenn die Lumineszenz von DNA-gebundenem, lichtangeregtem [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ mit Methylviologen gelöscht wird, ist die Löschung auch langsam im Vergleich zu Reaktionen zwischen Molekülen, die den Basenstapel durch Intercalation direkt erreichen können.^[10]

Tatsächlich ist das Einbetten in den Basenstapel so wichtig, daß sogar bei Molekülen, die in die DNA intercalieren, die Art der Stapelwechselwirkung anscheinend die Reaktivität durch Elektronentransfer beeinflusst. Wenn z. B. [Rh(phen)₂(phen)]³⁺ zu Lösungen von DNA-gebundenem [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ titriert wird, gibt es keine Löschung der Rutheniumphotolumineszenz, obwohl die treibende Kraft für die Reaktion ausreichend groß ist.^[33] Nach Versuchen mit photoinduzierter Spaltung intercaliert [Rh(phen)₂(phen)]³⁺

hauptsächlich formselektiv an Stellen mit einer offenen großen Furche und ist damit sequenzselektiver bei der DNA-Bindung als [Rh(phen)₂(L)]³⁺-Komplexe.^[33] Der Komplex bindet zwar durch Intercalation, doch ist seine Eindringtiefe in den Basenstapel der DNA durch sterische Wechselwirkungen der übrigen Phenanthrolin-Liganden mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA begrenzt. [Rh(phen)₂(phen)]³⁺ läßt sich also nicht effektiv genug mit dem DNA-Basenstapel koppeln, um die Rutheniumemission zu unterdrücken.

Der Einfluß der Stapelung auf die Effizienz der Lumineszenzlöschung ist auch für den Elektronendonator von Bedeutung. Wegen der passenden Symmetrie der rechtsgängigen oktaedrischen Metallkomplexe und der rechtsgängigen Duplex-DNA^[24] ist das Δ -Enantiomer tiefer in die DNA-Basen eingebettet. Daher ist es auch nicht überraschend, daß die Emission von Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ stärker von [Rh(phen)₂(bpy)]³⁺ unterdrückt wird als die von Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺.^[33,34] Wir haben auch signifikante Unterschiede in der Effizienz der Lumineszenzlöschung bei photoinduzierten Reaktionen mit [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ gegenüber Ethidium als Donor festgestellt, wenn Donoren und Acceptoren vollständig gebunden waren. Auch hier bestehen keine Unterschiede in der treibenden Kraft für die Reaktion zwischen den beiden Redoxpaaren; die intercalierenden Gruppen sind anscheinend nur unterschiedlich in die DNA-Doppelhelix eingebettet, und dies beeinflusst den Elektronentransfer. Eine effektive Stapelung ist also eine Voraussetzung für eine Kopplung der Reaktion mit der Duplex-DNA. Es ist für uns eine Herausforderung, ein genaues Verständnis dafür zu entwickeln, wie eine effektive Stapelung bewirkt wird, und Meßgrößen zu erarbeiten, anhand derer wir diese Stapelung und ihre Wirkung auf die Kopplung beurteilen können.

In Versuchen mit [Os(phen)₂(dppz)]²⁺ als lichtangeregtem Donor wurde die schnelle, statische Lumineszenzlöschung untersucht; anhand dieser Versuche konnten Energieübertragung und Diffusion der Metallkomplexe als Mechanismen für die effiziente Emissionslöschung zwischen den Metallintercalatoren ausgeschlossen werden.^[25] Wie beim Rutheniumkomplex wird auch die Osmiumemission durch [Rh(phen)₂(bpy)]³⁺ effizient gelöscht. Über einen größeren Konzentrationsbereich von Acceptoren sind die Emissionslöschungsprofile von Osmium und Ruthenium sehr ähnlich. Dies ist durch einen diffusionsabhängigen Mechanismus nicht erklärbar. Wenn die Diffusion hierfür wichtig wäre, würde man eine weniger effiziente Löschung der Emission des Osmiumdonors erwarten, da sein angeregter Zustand erheblich kurzlebiger ist als der des Rutheniumdonors. Außerdem überlappt das rotverschobene Emissionsspektrum des Osmiumkomplexes nicht mit dem Absorptionsspektrum des Acceptors, so daß auch eine Energieübertragung als Mechanismus für die Lumineszenzlöschung auszuschließen ist. Auch die Ähnlichkeit der Reaktionsprofile von Ruthenium und Osmium spricht gegen die Beteiligung einer Energieübertragung an der Lumineszenzlöschung der Osmium- oder Rutheniumkomplexe durch [Rh(phen)₂(bpy)]³⁺.

Ein Vergleich der Emissionsunterdrückung von Rutheniumdonoren durch Rhodiumacceptoren, die entweder an DNA oder in SDS-Micellen gebunden sind, unterstreicht ebenfalls die Bedeutung der DNA-Basenstapel für die Ver-

mittlung eines schnellen und effizienten Elektronentransfers (Abb. 5).^[33] Sowohl die DNA-Doppelhelix als auch die Micelle stellen anionische Oberflächen zur Verfügung, an die unsere kationischen Donoren und Acceptoren binden, sowie einen hydrophoben Innenraum, in den die großen,

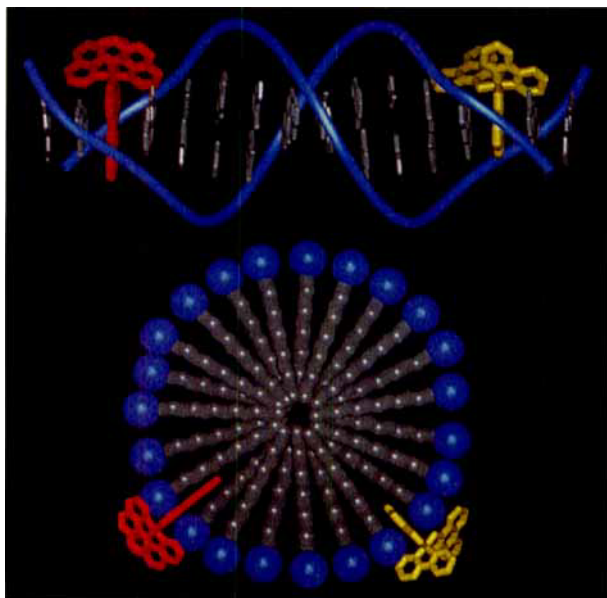


Abb. 5. Darstellung des Elektronendonors Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ (rot) und des Elektronenacceptors Δ -[Rh(phi)₂(bpy)]³⁺ (gelb), gebunden an eine DNA-Doppelhelix (oben) und eine SDS-Micelle (unten).

intercalierenden Liganden eingebettet werden können. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden mikroheterogenen Milieus ist, daß die SDS-Micelle keinen strukturierten Weg für einen Elektronentransfer wie die DNA aufweist. Folglich unterdrücken die Rhodiumkomplexe im micellaren System zwar die Rutheniumlumineszenz, aber der Elektronentransfer ist weitaus weniger effektiv als die DNA-vermittelte Reaktion und läuft im Nanosekundenbereich ab. Die Lumineszenzlöschung in der Micelle ist diffusionsabhängig und erfordert einen Stoß zwischen Donor und Acceptor; im Unterschied dazu ist bei DNA-vermittelter Elektronentransfer zwischen Metallintercalatoren die Lumineszenzlöschung diffusionsunabhängig.

3.2. Geschwindigkeit des DNA-vermittelten Elektronentransfers

Um unser Verständnis des Elektronentransfers zwischen Metallintercalatoren zu vertiefen, verfolgten wir die Reaktion mit ultraschneller Laserspektroskopie mit einer Auflösung im Pikosekundenbereich und hofften, so die Geschwindigkeit der schnellen photoinduzierten Lumineszenzlöschung bestimmen zu können.^[34] Für die Hinreaktion des Elektronentransfers (k_{et} , siehe Schema 1) setzten wir zeitkorrelierte Einzelphotonenmessung (TCSPC; Auflösung ≈ 50 ps) ein, mit der der Zerfall des lichtangeregten Zustandes des Donors [M(phen)₂(dppz)]²⁺ detektiert werden konnte. Wenn die

Lumineszenzunterdrückung von lichtangeregtem [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ durch DNA-gebundenes [Rh(phi)₂(bpy)]³⁺ mit ultraschneller TCSPC verfolgt wurde, wurde trotz einer signifikanten Emissionslöschung keine Änderung in der Zerfallskinetik des angeregten Zustandes in Abhängigkeit vom eingesetzten Acceptor festgestellt. Vielmehr äußerte sich die Reaktion in erster Linie in einem Verlust an Lumineszenzintensität, der mit steigender Konzentration an [Rh(phi)₂(bpy)]³⁺ zunahm, zum Zeitpunkt Null. Das Gleiche wurde mit dem isostrukturellen Analogon [Os(phen)₂(dppz)]²⁺ beobachtet. Daraus läßt sich schließen, daß die Emissionslöschung durch Elektronentransfer schneller verläuft, als mit dem Meßinstrument nachgewiesen kann. So haben wir als unteren Grenzwert für die Geschwindigkeitskonstante k_{et} dieser sehr schnellen Reaktion $3 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

Den Elektronentransfer in umgekehrter Richtung haben wir mit ultraschneller transientser Absorptionsspektroskopie gemessen. Nach der Anregung von [M(phen)₂(dppz)]²⁺-Komplexen bei 390 nm verfolgten wir die Änderung der Absorption der Probe bei 420 nm in Abhängigkeit von der Zeit. Ohne Acceptor stimmt die Kinetik, nach der der Grundzustand wieder besetzt wird, mit der Lumineszenzlebensdauer der DNA-gebundenen Donoren überein. Wird [Rh(phi)₂(bpy)]³⁺ zu Lösungen von DNA-gebundenen Donoren titriert, detektiert man eine weitere Komponente, deren Intensität mit steigender Menge an Rhodium zunimmt. Eine Analyse der Kinetik der transienten Absorption ergibt, daß sich die schnelle Phase gut mit $k_{rec} = 9.0 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ bei M = Ru und $1.1 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$ bei M = Os beschreiben läßt. Weil eine solche Geschwindigkeitskonstante bei der Kinetik des Lumineszenzzerfalls nicht ermittelt werden konnte, sind wir zuversichtlich, daß die Konstante der Rekombination zugeordnet werden kann.

Die Daten für sieben Donor-Acceptor-Paare, aufgelöst im Pikosekundenbereich, sind in Tabelle 1 zusammengestellt.^[34] Für die entsprechenden Versuche wurden bei den Donoren die intercalierenden Liganden, die übrigen Liganden, die relative Hydrophobie, die absolute Konfiguration und das Metallzentrum variiert. Obwohl somit ein weiterer Bereich an chemischen Eigenschaften abgedeckt wurde, betragen die aus den Messungen der transienten Absorption ermittelten Ge-

Tabelle 1. Geschwindigkeitskonstanten für die Rekombination im Grundzustand nach dem Elektronentransfer von angeregten, DNA-gebundenen Donoren auf Δ -[Rh(phi)₂(bpy)]³⁺ [a, b].

Donor	DNA	k_{rec} [c] [10 ⁹ s ⁻¹]	$-\Delta G^\circ$ [d] [V]
Δ -[Ru(phen) ₂ (dppz)] ²⁺	Kalbsthymus	9.2	1.66
<i>rac</i> -[Ru(bpy) ₂ (dppz)] ²⁺	Kalbsthymus	7.1	1.69
Δ -[Ru(dmp) ₂ (dppz)] ²⁺	Kalbsthymus	11	1.59
Δ -[Ru(phen) ₂ (F ₂ dppz)] ²⁺	Kalbsthymus	7.7	1.68
<i>rac</i> -[Ru(phen) ₂ (Me ₂ dppz)] ²⁺	Kalbsthymus	9.2	1.67
Δ -[Os(phen) ₂ (dppz)] ²⁺	Kalbsthymus	11	1.21
Δ -[Ru(phen) ₂ (dppz)] ²⁺	Kalbsthymus	4.5	
Δ -[Ru(phen) ₂ (dppz)] ²⁺	poly-d(AT)	7.4	
Δ -[Ru(phen) ₂ (dppz)] ²⁺	poly-d(GC)	0.21	

[a] Nach Lit. [34]. Die Daten wurden mit transientser Absorptionsspektroskopie ermittelt. [b] Experimentelle Bedingungen: [Ru], [Os] = 20 μM , [DNA] = 2 mM Nucleotide (M:Nuc = 1:100), 5 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 50 mM NaCl, pH 8.5. [c] Der Fehler von k_{rec} wurde auf $\pm 10\%$ geschätzt. [d] $-\Delta G^\circ = [E_{1/2}(\text{M}^{\text{III}}/\text{M}^{\text{II}}) - E_{1/2}(\text{Rh}^{\text{III}}/\text{Rh}^{\text{II}})]$. Der Fehler von ΔG° wurde auf ± 50 mV geschätzt.

schwindigkeitskonstanten $\approx 10^{10} \text{ s}^{-1}$. Sogar beim Osmiumkomplex, dessen Oxidationsstufe +3 im Vergleich zu der des Rutheniumkomplexes um $\approx 500 \text{ mV}$ stabilisiert ist, ist die Geschwindigkeit der Rekombination nicht wesentlich beeinflusst. Wird jedoch die absolute Konfiguration des Donors verändert, so ändert sich die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich. Während beim rechtsgängigen Enantiomer $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ $k_{\text{rec}} = 9.0 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ beträgt, liegt k_{rec} des linksgängigen Enantiomers um den Faktor 2.5 niedriger. Der schnellere Elektronentransfer, der bei $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ festgestellt wurde, ist in Einklang mit der tieferen Einbettung dieses Enantiomers in die Doppelhelix. Besonders interessant ist, daß die Rekombinationen relativ unempfindlich gegenüber der Beladung der Helix mit Acceptormolekülen sind. Wenn die Acceptorkonzentration während einer Titration ansteigt, erwartet man (eine zufällige Verteilung der Helixbelegung vorausgesetzt), daß im Mittel der Abstand von Donoren und Acceptoren abnimmt. Dennoch stellten wir bei diesen Experimenten fest, daß die Zahl der Rekombinationen im Pikosekundenbereich zwar mit zunehmenden Äquivalenten an Acceptor ansteigt, daß sich die Geschwindigkeitskonstante aber nicht als Funktion der Acceptorkonzentration ändert. Ein solcher Befund deutet möglicherweise auf eine nur geringe Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der zu überbrückenden Entfernung hin.

Die hohen Reaktionsgeschwindigkeiten und die Unempfindlichkeit der schnellen Rekombination gegenüber der Beladung der Helix könnten auch durch ein Modell erklärt werden, nach dem Donor und Acceptor kooperativ an die DNA-Helix binden.^[34–36] Bei einem solchen Clustermodell wären die Abstände zwischen den Metallkomplexen klein; die Reaktionsgeschwindigkeiten wären daher hoch und scheinbar unabhängig von der Beladung. Auf die Titration von DNA-gebundenem $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ mit dem Rhodiumkomplex als Acceptor könnte ein solches Clustermodell zwar zutreffen, doch wäre eine Bindungskoopereativität von mehr als 1 kcal notwendig.^[35] Eine Störung der Circular dichroismus (CD)-Spektren von $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ und $\Delta\text{-}[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{bpy})]^{3+}$, die mit hoher Beladung an poly-d(AT) gebunden wurden, wurde als Hinweis dafür gewertet, daß der Rhodiumkomplex bevorzugt in der Nähe von $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ bindet.^[36] Es ist allerdings schwierig, eine solche Clusterbildung mit einigen anderen Fakten in Einklang zu bringen: a) Die schnelle Emissionslöschung findet in Micellen nicht statt, obwohl dort eine Clusterbildung gefördert werden sollte; b) bei allen untersuchten Donoren wurde eine beladungsunabhängige Kinetik nachgewiesen; c) Donoren und Acceptoren binden willkürlich und unabhängig voneinander an die DNA, ohne deren Konformation zu verzerren. Außerdem gibt es bezüglich der Struktur keine offensichtlich erkennbare Grundlage für die kooperative Bindung zwischen dem Ruthenium- und dem Rhodiumzentrum, die dem Modell genügen würde.

Bemerkenswert ist auch, daß wir die größte Änderung des Elektronentransfers in Abhängigkeit von der Sequenz der DNA-Brücke feststellten.^[34,37] Auffällig ist in Tabelle 1 die Geschwindigkeitskonstante k_{rec} der Rekombination vom reduzierten Acceptor zum oxidierten Donor mit poly-d(AT)

und poly-d(GC): Sie ist mit poly-d(AT) 30mal höher als mit poly-d(GC). Darüber hinaus hängt auch die Elektronentransferausbeute von angeregtem $[\text{M}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ auf DNA-gebundenen $[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{bpy})]^{3+}$ stark von der Nucleinsäuresequenz ab. Der Anteil der poly-d(AT)-gebundenen angeregten Donor-Metallkomplexe ($\text{M} = \text{Os}$ oder Ru), die ein Elektron übertragen, entspricht etwa der Elektronentransferausbeute bei der Bindung an eine gemischte Sequenz von Kalbsthymus(CT)-DNA. Binden die gleichen Donoren dagegen an poly-d(GC), sinkt der entsprechende Anteil signifikant. Während allerdings die Ausbeute des photoinduzierten Elektronentransfers bei poly-d(GC)-gebundenem $[\text{M}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ gegenüber Kalbsthymus-DNA- und poly-d(AT)-gebundenem abnimmt, bleibt die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion k_{et} größer als $3 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$.^[34] Dies ist ebenfalls kaum mit dem Clustermodell vereinbar, weil offenbar sowohl die Rekombinationsgeschwindigkeit als auch die Ausbeute beim Elektronentransfer von der DNA-Sequenz zwischen Donor und Acceptor abhängen.

Wegen dieser Diskrepanzen haben wir den Circular dichroismus von $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ und $\Delta\text{-}[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{bpy})]^{3+}$, gebunden an verschiedene DNA-Polymere, noch einmal in Abhängigkeit von der Konzentration geprüft, um so die Parameter, die eine mögliche Clusterbildung beeinflussen, möglichst vollständig zu erfassen.^[38] Wir stellten allerdings keine systematische Veränderung der CD-Spektren fest, weder in Abhängigkeit von der Beladung der Helix noch in Abhängigkeit von der Polymersequenz. Der induzierte Circular dichroismus, der bei jedem Intercalator nach Zugabe von DNA auftritt, entsteht unabhängig davon, ob die Verbindungen zusammen oder getrennt an die DNA gebunden sind; er hängt ab von der Bindung an die chirale Position zwischen den Basenpaaren und wird auch bei achiralen Intercalatoren beobachtet.

Wir überprüften das Clustermodell auch durch NMR-Messungen. Dabei untersuchten wir die Ortsspezifität der Intercalation in die DNA, indem wir die Störungen im Spektrum der austauschbaren Iminoprotonen eines jeden Basenpaares in einem DNA-Dekamer verfolgten, wie sie durch die Intercalation der Rhodium- und/oder der Rutheniumverbindung entstehen. Die NMR-Daten widerlegen nicht nur das Clustermodell, sondern deuten auf eine antikooperative Bindung der Komplexe an das Dekamer hin, wobei die Intercalatoren in erster Linie an Stellen in der Helix binden, die vier Basenpaare voneinander entfernt sind.

Aus der gesamten Diskussion über kooperative versus antikooperative Bindung lassen sich jedoch einige Lehren ziehen: Für alle derartigen Untersuchungen des Elektronentransfers ist ein grundlegendes Verständnis der Struktur und der Art, wie Donoren und Acceptoren an die Helix assoziiert sind, Voraussetzung. Um die Abstandsabhängigkeit des Elektronentransfers im einzelnen zu untersuchen, ist es ferner wichtig, Versuche durchzuführen, bei denen Donoren und Acceptoren einen definierten Abstand voneinander haben und durch eine festgelegte DNA-Sequenz voneinander getrennt sind. Bei Molekülen, die nichtkovalent an die DNA gebunden sind, kommt es zu einer statistischen Verteilung von Abständen und Bindungsstellen, und es wird schwierig, die verschiedenen Parameter voneinander zu trennen.

3.3. Charakterisierung der Produkte des Elektronentransfers

Gibt es weitere Hinweise, daß die schnelle Lumineszenzlöschung tatsächlich die Folge eines Elektronentransfers ist? Der Anteil der Rekombinationen, die im Pikosekundenbereich ablaufen, repräsentiert den Großteil der angeregten Zustände, die durch Elektronentransfer abreagieren. Anscheinend rekombiniert ein kleiner Anteil reduzierter Acceptoren und oxidierten Donoren aber erst nach längerer Zeit. Um alle langlebigen Zwischenprodukte des Elektronentransfers bei der Reaktion zwischen Metallintercalatoren zu identifizieren und zu charakterisieren, verfolgten wir die photoinduzierten Elektronentransferreaktionen mit transients Absorptionsspektroskopie im Mikrosekundenbereich. Bei den Donoren $[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{dppz})]^{2+}$ und $[\text{Os}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ wiesen wir tatsächlich rhodiuminduzierte Intermediate nach, die mehrere Mikrosekunden stabil waren.^[25,39] Dank der Stabilität des Osmiumkomplexes in der Oxidationsstufe +3 konnten wir die Wellenlängenabhängigkeit der Absorption des langlebigen Intermediats messen: Das resultierende Differenzspektrum ($\text{Os}^{\text{III}} - \text{Os}^{\text{II}}$) ist nahezu identisch mit dem, das man entweder bei chemischer Oxidation von $[\text{Os}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ in Lösung oder bei photochemischer Oxidation von DNA-gebundenem, angeregtem $[\text{Os}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ erhält. So wurde das langlebige Zwischenprodukt unzweifelhaft als oxidierten Donor identifiziert und damit der Mechanismus des Elektronentransfers eindeutig bestätigt.

3.4. Elektronentransfer über einen festgelegten Donor-Acceptor-Abstand

Experimente mit nichtkovalent an die Duplex-DNA gebundenen Donoren und Acceptoren wurden stets bei niedriger Beladung der DNA mit Reaktanten durchgeführt, um einen größtmöglichen Donor-Acceptor-Abstand zu erhalten. In einem typischen Experiment entspricht ein 1:1-Verhältnis zwischen Donor und Acceptor einem durchschnittlichen Abstand von 25 Basenpaaren. Bemerkenswerterweise reagieren 50% der angeregten Zustände von $\Delta-[\text{M}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ via Elektronentransfer, was darauf hindeutet, daß die Reaktion auch bei niedriger Beladung sehr effizient abläuft. Unter diesen Bedingungen liegt allerdings immer eine statistische Verteilung von Donor-Acceptor-Abständen vor. Außerdem können wir die bereits diskutierte Möglichkeit der Clusterbildung mit nichtkovalent an die Helix gebundenen Metallkomplexen nicht ausschließen. Um definitiv nachzuweisen, daß der photoinduzierte Elektronentransfer über einen gewissen Abstand möglich ist, mußten wir die intercalierenden Donoren und Acceptoren an gegenüberliegenden Enden der Doppelhelix anbringen und erhielten so ein Konjugat, in dem der Abstand zwischen Donor und Acceptor fixiert werden kann.

Wir konstruierten eine Duplex-DNA, in der $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ - und $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{phen})]^{3+}$ -Derivate über flexible Linker kovalent an gegenüberliegende Enden eines 15 Basenpaare langen Oligonucleotids gebunden waren (Abb. 6).^[40] Die Komplexe konnten intercalieren, waren

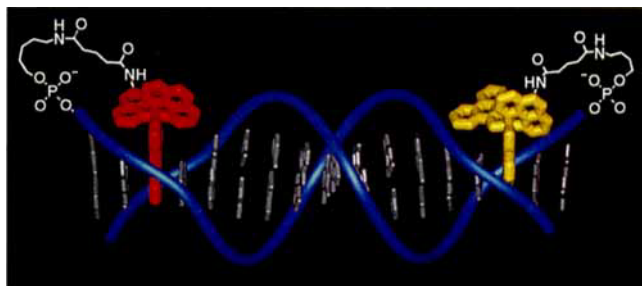


Abb. 6. Schematische Darstellung einer 15 Basenpaare langen DNA-Doppelhelix mit $\Delta-[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (rot) als Elektronendonator und $\Delta-[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{phen})]^{3+}$ (gelb) als Elektronenacceptor, fixiert an gegenüberliegenden Enden des Konjugats, so daß die Komplexe zwar intercalieren, aber einen festen Abstand zueinander haben. Gezeigt ist der wahrscheinlichste Abstand von 11 Basenpaaren (41 Å).

dann jedoch ≈ 40 Å voneinander entfernt. Zusätzliche Experimente mit Doppelhelices, die entweder einen kovalent gebundenen Ruthenium- oder Rhodiumkomplex (aber nicht beide gleichzeitig) trugen, ermöglichten es, die Integrität der metallkomplexmodifizierten Duplex-DNA und der Intercalationsstellen zu untersuchen. Wegen der Empfindlichkeit, mit der die Rutheniumlumineszenz auf die unmittelbare Umgebung reagiert, konnten wir die Intercalation des angehenden Rutheniumkomplexes in der Helix charakterisieren. In dem Konjugat, das nur den Rhodiumkomplex enthielt, wurde die Intercalationsstelle bestimmt durch photoinduzierte Spaltung. In dem gezeigten, 15 Basenpaare langen Molekülverbund können die Metallkomplexe eine oder zwei Basenpaare vom Ende der Duplex-DNA entfernt intercalieren, so daß ein Abstand von 41 Å zwischen Donor und Acceptor am wahrscheinlichsten ist.^[40] Bemerkenswerterweise wurde bei Anregung des Rh/Ru-Nucleinsäure-Konjugats mit zwei unterschiedlichen Metallen keine Rutheniumlumineszenz festgestellt. Wie bereits nach Experimenten mit nichtkovalent gebundenen Donoren und Acceptoren vermutet, kann der photoinduzierte Elektronentransfer zwischen intercalierenden Metallkomplexen durch die Doppelhelix effizient über eine größere molekulare Entfernung ablaufen. Als Mindestwert für die Geschwindigkeitskonstante der photoinduzierten Reaktion wurde $3 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die DNA-Doppelhelix ist also tatsächlich eine Brücke für weitreichenden Elektronentransfer.

Vor dem Hintergrund klassischer Untersuchungen über Elektronentransfer durch σ -Bindungsnetze^[41] war eine solche Reichweite für die Übertragung von Elektronen durch die DNA erstaunlich. Daher beginnen Chemiker nun, die theoretischen Grundlagen der Ladungsübertragung zu erarbeiten, die durch den DNA-Basenstapel vermittelt wird.^[42] Unsere Untersuchungen deuten auf die Basenstapelung als kritisches Element bei der Bestimmung der Effizienz der Reaktion hin. Für eine effiziente, durch den DNA-Basenstapel vermittelte Reaktion müssen Donoren und Acceptoren vollständig intercaliert sein. Tatsächlich bestehen größere Unterschiede im Elektronentransfer nicht nur zwischen Redoxpaaren, die in der Furche der DNA gebunden sind, und solchen, die intercaliert sind, sondern auch zwischen Intercalatoren, die unterschiedlich tief in die Helix eingebettet sind. Unsere Ergebnisse verdeutlichen, wie wichtig es ist, diesen „Stapel-

parameter“ explizit zu betrachten, wenn man theoretische Modelle der DNA-vermittelten Ladungsübertragung entwickeln will.

In anderen Arbeitsgruppen wurden inzwischen mehrere DNA-Konjugate mit kovalent gebundenen Donoren und Acceptoren synthetisiert. Auf den ersten Blick scheinen die mit diesen Konjugaten erhaltenen Ergebnisse ziemlich uneinheitlich zu sein. Meade und Kayem haben ein System entwickelt, bei dem ein nichtintercalierender Rutheniumkomplex kovalent an Aminosucker an der terminalen Position von Oligonucleotiden gebunden ist.^[43] Sie stellten fest, daß der Elektronentransfer in diesem System ähnlich wie in Proteinen abläuft. Erst kürzlich bestimmten Lewis et al.^[44] die Geschwindigkeit der Photooxidation eines Guanins in einer DNA-Haarnadelschleife durch Stilben, das an der Spitze dieser Schleife gebunden war. Durch systematische Veränderung der Guaninposition innerhalb der Haarnadelschleife konnten sie die Geschwindigkeit des Elektronentransfers messen und daraus den elektronischen Kopplungsparameter $\beta = 0.64 \text{ \AA}^{-1}$ bestimmen. Dieser Wert liegt zwischen dem, der sich bei einem σ -Bindungssystem in Proteinen ergibt und dem, den man für ein hochgekoppeltes π -Elektronensystem erwarten würde.

Vor kurzem haben wir damit begonnen, den Rahmen unserer Versuche zu erweitern und organische Intercalatoren wie Ethidium einzubeziehen.^[45] Auch mit kovalent gebundenem Ethidium, das an einem Ende eines DNA-Oligonucleotids intercaliert ist, und einem $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ -Derivat, das am entgegengesetzten Ende kovalent gebunden und intercaliert ist, stellten wir einen schnellen ($\geq 10^{10} \text{ s}^{-1}$) photoinduzierten Elektronentransfer fest. Interessanterweise ist trotz ähnlicher treibender Kraft die Effizienz von angeregtem Ethidium als Donor sowohl bei kovalenter als auch bei nichtkovalenter Bindung geringer als die von Ruthenium. Dies könnte von Unterschieden bei der Einbettung der Donoren in die DNA herrühren. Die Distanz zwischen Donor und Acceptor wurde zwischen 17 und 36 \AA variiert. In jedem Fall trat Fluoreszenzlöschung auf, deren Ausbeute nur geringfügig vom Abstand abhängt. Experimente mit variierender Temperatur und mit Fehlpaarungen in der Doppelhelix unterstreichen aber die außergewöhnliche Empfindlichkeit der Reaktionen gegenüber der Art der Einbettung der Donoren und Acceptoren in die Helix unterschätzt. Photoinduzierte Lumineszenzlöschung läßt sich nämlich in einer 11 Basenpaare langen Duplex-DNA mit fixiertem Ethidium und Rhodium nachweisen (Tabelle 2), doch wird die weitreichende Ladungsübertragung durch eine einzige dazwischenliegende C-A-Fehlpaarung unterbunden. Eine G-A-Fehlpaarung jedoch, die sich gut in eine B-Helix-DNA einfügt, kann die Emissionslöschung noch verstärken. Nach diesen Ergebnissen sind wir zuversichtlich, daß die Chemie des weitreichenden Elektronentransfers bei der Entwicklung neuer Biosensoren, die empfindlich auf den Zustand der DNA-Brücke reagieren, eine Anwendung finden kann.

Wir können nun damit beginnen, unsere eigenen Untersuchungen über DNA-vermittelten Elektronentransfer in kovalent gebundenen Konjugaten mit denen anderer Arbeitsgruppen in Einklang zu bringen, indem wir uns auf den

Tabelle 2. Fluoreszenzlöschung in Et-DNA-Rh-Doppelhelices mit Fehlpaarungen [a].

Konjugat	<i>F</i> [b]
$\begin{array}{c} \text{Et}'\text{-5'-C-T-A-T-C-T-A-T-C-G-T} \\ \text{G-A-T-A-G-A-T-A-G-C-A-5'-\Lambda\text{-Rh} \end{array}$	0.21
$\begin{array}{c} \text{Et}'\text{-5'-C-T-A-T-C-C-A-T-C-G-T} \\ \text{G-A-T-A-G-A-T-A-G-C-A-5'-\Lambda\text{-Rh} \end{array}$	0.04
$\begin{array}{c} \text{Et}'\text{-5'-C-T-A-T-C-G-A-T-C-G-T} \\ \text{G-A-T-A-G-A-T-A-G-C-A-5'-\Lambda\text{-Rh} \end{array}$	0.26

[a] Nach Lit. [45]. [b] *F* = Relative Fluoreszenzlöschung: Fluoreszenz der mit Ethidium (Et) und Rh doppelt modifizierten Helices im Vergleich zu solchen, die nur Ethidium enthalten.

Aspekt der Basenstapelung konzentrieren. Nach unseren Ergebnissen reagiert der Elektronentransfer sehr empfindlich auf die Stapelung der zwischen Donor und Acceptor liegenden Basen. Wie Donor und Acceptor in diesen Stapel eingebettet sind, ist in jedem System anders. In Proteinen findet die elektronische Kopplung über σ -Bindungen statt. Kleine energetische Unterschiede zwischen verschiedenen Systemen haben daher keine großen Unterschiede in der elektronischen Kopplung zur Folge. In der DNA-Doppelhelix hingegen, in der die elektronische Kopplung durch die Basenstapelung vermittelt wird, können kleine Energiedifferenzen zu großen Unterschieden in der Kopplungseffizienz führen. Daher könnte mit Donoren und Acceptoren, die an Zuckerreste gebunden sind, der Beginn der Ladungsübertragung, der über ein Netz von σ -Bindungen verläuft, geschwindigkeitsbestimmend sein. Im Fall der stilbenmodifizierten DNA-Haarnadelschleife ist der Stilbenrest zwar eng an die DNA-Basenpaare assoziiert, aber nicht in die Basenstapelung einbezogen, so daß man eine mittlere Kopplungseffizienz erwarten sollte. Mit gut intercalierten Donoren und Acceptoren sollte die Kopplung über die Basenpaare optimal sein.

4. DNA-vermittelter Elektronentransfer unter Einbeziehung der DNA-Basen

In unseren Versuchen mit DNA als einer Brücke für den Elektronentransfer haben wir uns anfangs auf die Chemie der DNA konzentriert und ihre Bedeutung als biologisch wichtige Komponente nicht in Betracht gezogen. Mit Metallintercalatoren als Donoren und Acceptoren haben wir nachgewiesen, daß der DNA-Basenstapel photoinduzierten Elektronentransfer über weite Entfernungen begünstigen kann. Aber kann die DNA-Helix außer als Leiter für den Elektronentransfer auch als Reaktant dienen? Gibt es Reaktionen in der Zelle, bei denen Radikalstellen durch den DNA-Basenstapel wandern und so die DNA schädigen? Die Chemie des Basenstapels könnte bei der Carcinogenese und Mutagenese von Bedeutung sein. Könnte diese „weitreichende“ Chemie in der Natur sogar dazu dienen, um Schäden in der DNA aufzuspüren und zu reparieren oder noch allgemeiner, um Informationen, die durch den Basenstapel moduliert werden, über größere molekulare Entfernungen zu übertragen? Diese

spannenden Fragen wurden durch unsere Untersuchungen an der DNA als Brücke für Elektronentransfer aufgeworfen, und einige davon sollten sich mit den chemischen Methoden, die wir entwickelt haben, beantworten lassen. Am wichtigsten erschien es uns, daß die Empfindlichkeit des Elektronentransfers gegenüber Änderungen der Basenstapel eine Möglichkeit eröffnet, die DNA-Chemie über größere Abstände zu erforschen und zu nutzen.

4.1. Oxidative DNA-Schädigung durch weitreichende Ladungsübertragung

Der Hauptangriffspunkt oxidativer Nucleinsäureschädigungen in der Zelle ist Guanin (G):^[46] Experimente und Berechnungen zeigen, daß Guanin die am leichtesten oxidierbare Nucleobase ist.^[47,48] Von vielen an DNA bindenden Chemikalien, darunter Riboflavin, Anthrachinonderivate und Naphthylimide, ist bekannt, daß sie nach Lichtaktivierung spezifisch am 5'-G von 5'-GG-3'-Dubletts Oxidationsschäden induzieren.^[48] Wir erkannten, daß die intercalierenden Metallkomplexe $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{L})]^{3+}$, die bei Bestrahlung mit niederenergetischem Licht ($\lambda \geq 365 \text{ nm}$) starke Photooxidantien sind ($E_{1/2}(*\text{Rh}^{\text{III}}/\text{Rh}^{\text{II}}) > 2.0 \text{ eV}$ gegen NHE), nützlich für die Untersuchung von Oxidationsschäden der DNA sein könnten, die über größere Abstände durch die DNA vermittelt werden.^[32]

Bei unseren Experimenten verfolgten wir die in Schema 2 skizzierte Strategie.^[49] Wir synthetisierten DNA-Doppelhelices mit 5'-GG-3'-Dubletts und einem an einem Ende der DNA fixierten Rhodiumintercalator als Photooxidanten. In diesem

DNA-Basenstapel hervor und bewirkt so eine Oxidation, durch die eine modifizierte Basenstelle erhalten wird. Position und Ausbeute der Schädigungsreaktion werden anschließend durch Spaltung der modifizierten DNA an der geschädigten Stelle mit Piperidin bestimmt. Ein solches rhodiummodifiziertes Konjugat mit mehreren 5'-GG-3'-Dubletts ist in Abbildung 7 gezeigt.^[49] Bei dieser modifizierten Duplex-

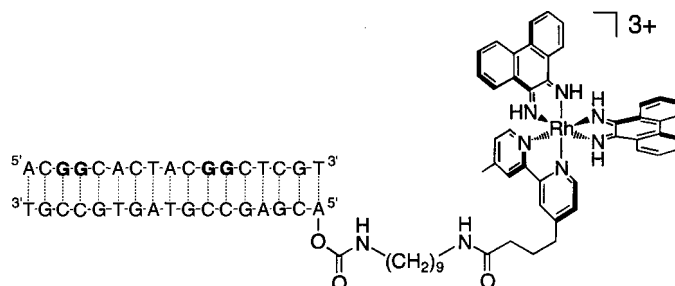
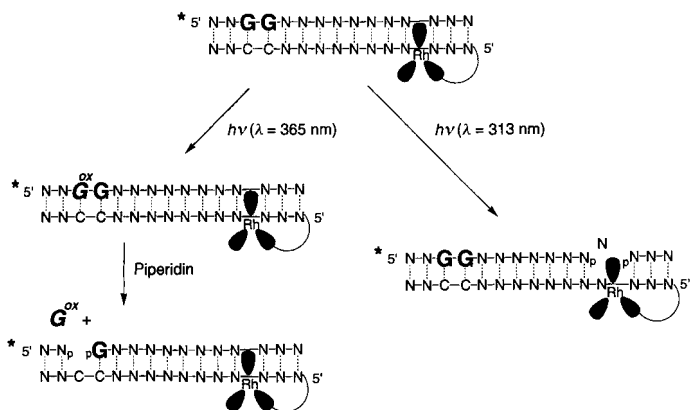


Abb. 7. Rhodiummodifiziertes DNA-Duplex-Konjugat, das für die Untersuchung von oxidativer DNA-Schädigung über größere Entfernungen synthetisiert wurde. Die gezeigte Sequenz enthält zwei 5'-GG-3'-Dubletts (fettgedruckt), die potentiell oxidierbar sind und die von dem intercalierten Rhodiumkomplex 17 und 34 Å entfernt sind^[49]. Zur besseren Übersicht ist der Rhodiumkomplex nicht intercaliert dargestellt.

DNA stellten wir nach Bestrahlung bei 365 nm signifikante DNA-Oxidationsschäden spezifisch am 5'-G der 5'-GG-3'-Dubletts fest. Bemerkenswerterweise müssen diese Schädigungen aus einer größeren molekularen Entfernung ausgelöst worden sein. Wenn der Rhodiumkomplex am 5'-Ende fixiert ist, läßt sich aus der photoinduzierten Spaltung der DNA bei 313 nm auf eine drei Basenpaare vom modifizierten Terminus entfernte Intercalation schließen. Bei der in Abbildung 7 gezeigten Duplex-DNA treten Schäden an den beiden 17 und 34 Å vom intercalierten Rhodiumkomplex entfernten 5'-GG-3'-Dubletts auf. Das Ausmaß der Schädigung an dem vom Rhodiumkomplex weiter entfernten Dublett ist ähnlich wie (oder sogar größer als) an dem näherliegenden, hängt also kaum von der Entfernung ab. Wenn wir eine modifizierte DNA untersuchen, die nur das weiter entfernte 5'-GG-3'-Dublett enthält, stellen wir eine ähnlich große Schädigung fest; die „Fernoxidation“ hängt also nicht von der dazwischenliegenden oxidierbaren Position ab.

Während das Ausmaß des Oxidationsschadens nicht spürbar mit der Entfernung variiert, hängt es sehr stark von der DNA-Sequenz ab, von der wir wissen, daß sie das Oxidationspotential der Basen beeinflusst.^[48b,e] Auch eine rhodiummodifizierte Duplex-DNA mit einem 5'-GGG-3'-Tripletts wurde synthetisiert.^[49] MO-Berechnungen des Ionisationspotentials der DNA-Basen ergaben, daß das 5'-G eines 5'-GGG-3'-Tripletts noch leichter oxidierbar ist als das 5'-G eines 5'-GG-3'-Dubletts.^[48] Bei dieser Anordnung wurde die selektive Oxidation des 5'- und des mittleren Guanins festgestellt, wobei die Ausbeute in Übereinstimmung mit den berechneten Ionisationspotentialen am 5'-G am größten war.

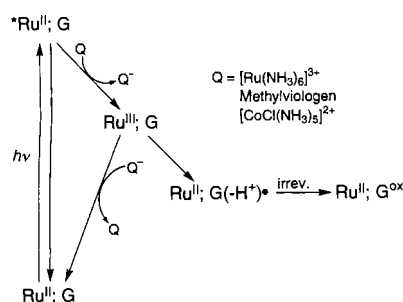
Nach enzymatischem Abbau der geschädigten Duplex-DNA isolierten wir als Oxidationsprodukt 8-Oxoguanin, das als Primärprodukt der zellulären oxidativen DNA-Schädigung bekannt ist. Wir haben festgestellt, daß die Bildung



Schema 2. Bestrahlung einer Duplex-DNA, an die ein Rhodiumkomplex fixiert ist, mit UV-Licht unterschiedlicher Wellenlänge (Näheres siehe Text).

Konjugat ist der Rhodiumkomplex räumlich wohldefiniert von der potentiellen Oxidationsstelle entfernt. Die direkte Spaltung des DNA-Strangs, die durch die Bestrahlung der rhodiummodifizierten Duplex-DNA bei 313 nm ausgelöst wird, dient dazu, die Stelle der Intercalation festzulegen, und ermöglicht die Bestimmung des Abstandes zwischen dem Rhodiumkomplex und den potentiellen geschädigten Stellen. Die Bestrahlung des Konjugats mit Licht niedrigerer Energie (365 nm) ruft dagegen ortsspezifisch eine Elektronenlücke im

dieses Produkts O_2 erfordert. Während wir uns für die Oxidation in unserem künstlichen System der Rhodiumphotochemie bedienten, sollte man daneben auch andere, eventuell physiologisch relevantere Mittel in Betracht ziehen, um eine Elektronenlücke in den Basenstapel einzuführen. Nach unseren Ergebnissen kann man annehmen, daß unabhängig vom Oxidationsmittel eine solche Elektronenlücke, wenn sie einmal in das gestapelte π -Elektronensystem der DNA eingeführt wurde, wandern und so auch über größere Entfernungen effektiv zu oxidativer Schädigung der DNA führen kann. Dieses Charakteristikum der DNA-Doppelhelix, die ausgedehnte Stapelung der Basenpaare, die einen weitreichenden Ladungstransport erleichtert, ist nicht bloß eine chemisch neue Eigenschaft. Sie ist vielmehr eine Eigenschaft mit wichtigen Folgen für die DNA-Mutagenese und die Carcinogenese in der Zelle. Viele Arbeitsgruppen haben tatsächlich gezeigt, daß eine ganze Reihe von Reagentien geeignet sind, um Guanin in der DNA zu oxidieren; ob sie auch eine „Fernschädigung“ begünstigen können, muß noch untersucht werden.^[48] Wir haben kürzlich nachgewiesen, daß auch intercalierende Rutheniumkomplexe solche Fernoxidationsschäden in der DNA verursachen können.^[50] In Schema 3 ist das Flash-Quench-Experiment erläutert, mit dem Guanin in der DNA mit in situ erzeugtem Ru^{III} im Grundzustand oxidiert werden. Eine analoge Methode wurde in klassischen Untersuchungen des proteinvermittelten Elektronentransfers angewendet.^[51]



Schema 3. Flash-Quench-Experiment, bei dem Guanine in der DNA mit in situ erzeugtem Ru^{III} im Grundzustand oxidiert werden.

Die Flash-Quench-Experimente waren für uns sehr aufregend, weil sie uns eine weitere Möglichkeit boten, Fernoxidationen in der DNA zu untersuchen. Außerdem ist die Verwendung von Rhodium als Oxidationsmittel im angeregten Zustand ungewöhnlich ineffizient. Mit in situ erzeugtem Ruthenium(III), einem Oxidationsmittel im Grundzustand, steigt die Quantenausbeute um mehr als das Tausendfache an. Darüber hinaus ist die Methode besonders gut für spektroskopische Untersuchungen geeignet. So konnte das Transienabsorptionsspektrum des Guaninradikals in der DNA erhalten werden^[50a]. Auch mit Ruthenium, das an eine Duplex-DNA fixiert ist, findet eine oxidative Fernschädigung der DNA statt.^[50b] Eine besonders interessante Beobachtung ist in Abbildung 8 verdeutlicht: Wie bei der Photooxidation mit Rhodiumkomplexen wird bevorzugt das 5'-GG-3'-Dublett angegriffen. Was abgesehen, wenn dieses Dublett durch Mutation entfernt wird? In diesem Fall

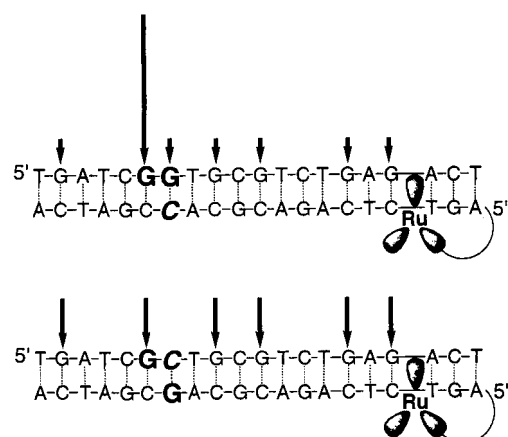


Abb. 8. Oxidative Fernschädigung von Guaninen durch fixiertes Ru^{III} in modifizierten DNA-Doppelhelices mit (oben) und ohne 5'-GG-3'-Dublett (unten). Bei Vorliegen der 5'-GG-3'-Dubletts wird bevorzugt deren 5'-G angegriffen. Im anderen Fall entstehen die Oxidationsschäden in etwa gleichem Ausmaß an allen Guaninen entlang der Duplex-DNA (Ausbeute angedeutet durch die Länge der Pfeile).

stellten wir bei allen Guaninen ungefähr das gleiche Ausmaß oxidativer Schädigungen fest. Diese Ergebnisse veranschaulichen, daß die Wanderung und die Gleichgewichtseinstellung der oxidierenden Elektronenlücke über die Duplex-DNA schnell verläuft im Vergleich zur Abfangreaktion. Daß wir in diesem System Fernschädigungen der DNA feststellen konnten, betont außerdem die vermutete Allgemeingültigkeit des Reaktionsmechanismus. Wir halten dieses System für besonders spannend, weil wir durch diese Art der Chemie die Kinetik der Reaktionen durch Spektroskopie und die Produktausbeuten durch biochemische Methoden in detaillierten mechanistischen Untersuchungen zusammenführen können.

4.2. Die Abhängigkeit der oxidativen DNA-Schädigung vom Basenstapel

Ebenso wie der Elektronentransfer zwischen Metallintercalatoren hängt nach unseren Resultaten auch die oxidative Fernschädigung der DNA sehr von der Basenstapelung ab. Bei rhodiummodifizierten Oligonucleotiden mit angeknüpftem Δ -[Rh(phi)₂(bpy)]³⁺ ist die Ausbeute an oxidiertem Produkt z.B. durchgehend höher als bei Konjugaten mit einem Λ -konfigurierten Rhodiumzentrum.^[49] Die tiefere Einbettung des rechtsgängigen Metallkomplexes in die DNA steigert offensichtlich die Effizienz der Schädigung. Wir wollten die Empfindlichkeit der DNA-vermittelten Reaktion gegenüber der Stapelung allgemeiner dahingehend untersuchen, ob Störungen in dem zwischen Donor und Acceptor liegenden Basenstapel auch die Oxidation beeinflussen.^[52] Die Konjugate in Abbildung 9 stehen stellvertretend für eine ganze Familie solcher Konjugate, die alle einen Rhodiumkomplex als Oxidationsmittel und zwei durch eine ausgewölbte Basenregion getrennte 5'-GG-3'-Dubletts enthalten. Indem wir das Ausmaß der Schädigung am distalen und proximalen 5'-GG-3'-Dublett mit und ohne dazwischenliegender Ausbuchtung bestimmten, konnten wir den Effekt

dieser Unterbrechung der Basenstapelung auf den weitreichenden Elektronentransfer bestimmen.

Abbildung 9 zeigt das Konjugat mit der ATA-Ausbuchtung, die eine der wenigen durch Hochauflösungs-NMR-Spektro-

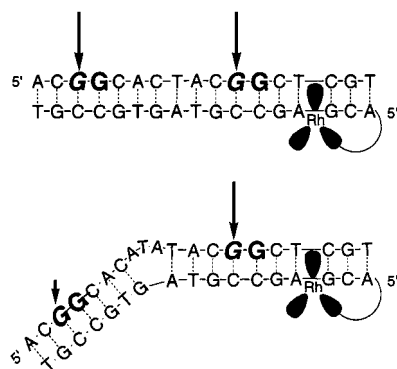


Abb. 9. Oxidative Fernschädigung in rhodiummodifizierten Doppelhelices mit zwei 5'-GG-3'-Dubletts als potentiellen Oxidationsstellen, die entweder durch vollständig gepaarte und gestapelte Basen (oben) oder durch eine Region mit einer ungepaarten 5'-ATA-3'-Ausbuchtung (unten) getrennt sind. Bei der vollständig gestapelten Duplex-DNA ist das Ausmaß der Schädigung (angedeutet durch die Länge der Pfeile) an beiden Oxidationsstellen nahezu identisch. Wird die Basenstapelung zwischen dem distalen 5'-GG-3'-Dublett und dem intercalierten Rhodiumkomplex durch das ungepaarte 5'-ATA-3' unterbrochen, so wird die distale Oxidationsstelle erheblich weniger geschädigt als die proximale [52].

skopie charakterisierten Ausbuchtungen ist.^[53] Diese Strukturuntersuchungen ergaben, daß die Ausbuchtung zu einer wesentlichen, aber unvollständigen Unterbrechung der Basenstapelung führt. In Übereinstimmung damit ergab unser Experiment, daß das distale 5'-GG-3'-Dublett um ca. 75 % weniger oxidiert wird als das proximale. Störungen im dazwischenliegenden Basenstapel beeinträchtigen somit tatsächlich den DNA-vermittelten Elektronentransfer. Die Ergebnisse weisen direkt auf eine Übertragung der Elektronenlücken über große Entfernungen durch den Basenstapel hin; sie unterstreichen auch eine neuartige Anwendung für diese Art von Chemie: Durch Fernoxidationen kann man die Integrität der Basenstapelung in Lösung untersuchen, was mit anderen Techniken nur schwer möglich ist.

Welche Auswirkungen auf die Oxidation würde man erwarten bei DNA-Schädigung an kovalenten Bindungen, wenn eine der Basen aus dem Stapel herausgeglitten ist oder wenn ein DNA-bindendes Protein assoziiert ist wie das TATA-Box-bindende Protein, das die Duplex-DNA erheblich verzerrt? Entsprechende Versuche werden gegenwärtig durchgeführt. Letztlich verdeutlichen unsere Resultate nicht nur die Auslösung von Fernoxidationen in der DNA, sondern bieten auch mögliche Strategien für den Schutz von DNA-Sequenzen in der Zelle vor Fernschädigungen durch Radikalstellen. Die oxidative Fernschädigung der DNA kann durch den dazwischenliegenden Basenstapel verändert werden. Zum Beispiel könnten Unterbrechungen im Basenstapel – entweder durch vorübergehende Öffnung der Duplex-DNA, die durch bestimmte Sequenzen kodiert wurde, oder durch Verzerrung aufgrund von Proteinbindung – eine Möglichkeit zum Schutz der DNA bieten.

4.3. Fernreparatur von Thymindimeren

Die Chemie des Elektronentransfers kann nicht nur zur Schädigung der DNA eingesetzt werden, sondern sie kann auch die Reparatur einer häufig vorkommenden photoinduzierten DNA-Schädigung, der Bildung von Thymindimeren, initiieren.^[54] Bakterien wie *E. coli* verwenden Photolyasen, um das Thymindimer photochemisch zu reparieren.^[55] Im Schlüsselschritt dieser Reaktion induziert sichtbares Licht (350–450 nm) die Übertragung eines Elektrons von einem enzymgebundenen Flavin auf das Dimer und leitet damit die Reparatur ein. In Modellstudien mit lichtangeregten Reduktionsmitteln wurde in Duplex-DNA die Reparatur von Thymindimeren nach UV-Bestrahlung ($\lambda \leq 300$ nm) festgestellt.^[56] Oxidationsmittel in angeregtem Zustand, die ein Elektron vom Dimer abspalten, konnten Pyrimidindimere als Modellverbindungen reparieren, wenn der Prozeß mit ultravioletttem Licht (≤ 300 nm) eingeleitet wurde.^[57] Daher erwarteten wir, daß angeregte Rhodiumintercalatoren als starke Oxidationsmittel die Reparatur von Thymindimeren in Duplex-DNA auslösen können, indem sie eine photoinduzierte Elektronenlücke direkt in den DNA-Basenstapel einbringen. Darüber hinaus bieten Thymindimere und ihre Reparatur, die durch Elektronentransfer eingeleitet wird, eine attraktive Abfangreaktion, um Parameter der DNA-vermittelten Chemie zu charakterisieren.

Wir fanden zunächst heraus, daß $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{dmb})]^{3+}$ ($\text{dmb} = 4,4'$ -Dimethyl-2,2'-bipyridin) nach Anregung bei 400 nm die Reparatur eines Thymindimers initiierte, das ortsspezifisch in der Mitte eines synthetischen, 16 Basenpaare langen Duplex-Oligonucleotids eingeführt worden war (Duplex:Rh = 1:1).^[54] Wahrscheinlich verläuft der Reparaturmechanismus über die Oxidation des Dimers ($E_{1/2}(\text{TT}) \approx 2.0$ V gegen NHE)^[55] durch den angeregten Zustand des gebundenen Rhodiumkomplexes, bei dem eine Elektronenlücke am intercalierten Liganden phi lokalisiert ist.^[32] Eine vollständige Reparatur wurde auch mit sehr niedrigen Konzentrationen des Rhodiumkomplexes (500 nM) und einem 16fachen Überschuß an Duplex-DNA (6.25 Mol-% $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{dmb})]^{3+}$) festgestellt; für den Prozeß sind also nur katalytische Rhodiummengen notwendig. Eine Reaktion der geschädigten DNA mit dem Rhodiumkatalysator im Sonnenlicht machte den Schaden ebenfalls vollständig rückgängig. In diesen Versuchen kann sich der nichtkovalent gebundene Rhodiumintercalator an allen Intercalationsstellen über die gesamte Länge der Duplex-DNA einlagern, wobei der Abstand zwischen dem Komplex und dem Thymindimer unbekannt ist.

Als nächstes untersuchten wir, ob die DNA-Helix eine oxidative Fernreparatur erleichtern kann. Wir synthetisierten eine Thymindimere enthaltende Duplex-DNA mit einem fixierten Rh^{III} -Komplex an einem Ende, um die Fernreparatur von Thymindimeren zu untersuchen (Abb. 10). Durch photoinduzierte Spaltung dieser rhodiummodifizierten Duplex-DNA mit Licht von 313 nm belegten wir eine Intercalation bis zu vier Basenpaare vom Ende der Duplex-DNA entfernt; Metallzentrum und Thymindimer sind also durch einen 19–26 Å langen Basenstapel getrennt. Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht ($\lambda = 400$ nm) leitete auch in Konjugaten mit fixiertem

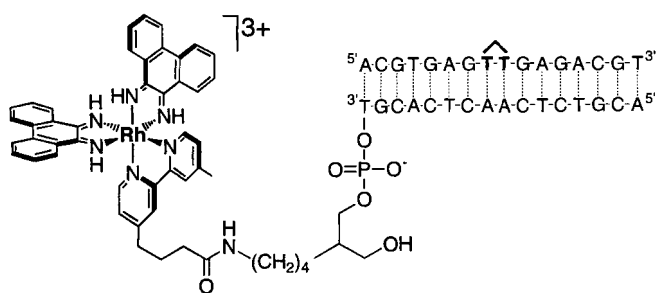


Abb. 10. Rhodiummodifizierte Duplex-DNA mit einem Thymindimer (TT)[54]. Im abgebildeten Konjugat ist der Rhodiumkomplex an das 3'-Ende des modifizierten Oligonucleotids gebunden; dadurch wird das Oxidationsmittel auf die 5'-Seite des Dimers plaziert. Mit Oligonucleotiden, die das Rhodium-Photooxidationsmittel entweder am 3'- oder am 5'-Ende enthalten, kann man herausfinden, wie wichtig die Richtung des Elektronentransfers ist.

Oxidationsmittel die Reparatur ein (Tabelle 3). Außerdem konnte mit Verdünnungs- und Mischungsexperimenten bestätigt werden, daß die Fernreparaturen intramolekular ablaufen und daß sie nicht durch einen Rhodiumkomplex katalysiert werden, der an ein anderes Konjugat fixiert ist.

Wie ändert sich nun die Reparatureffizienz in Abhängigkeit von der Entfernung und der Basenstapelung? Bei einer Zunahme des Abstandes des Katalysators zum Thymindimer von 19 auf 26 Å ändert sich die Reparatureffizienz nur wenig (Tabelle 3). Wie bei der Guaninoxidation hängt die Effizienz der Reparaturreaktion (im hier untersuchten Entfernungsbereich) kaum vom Abstand ab, ist aber empfindlich gegenüber Änderungen bei der Stapelung. Dabei ist nicht nur die Einbettung des Katalysators in den Basenstapel von Bedeutung, sondern auch die des Dimers und der zwischen Katalysator und Dimer liegenden Basenpaare. Wir stellten zuerst in

Tabelle 3. Fernreparatur von Thymindimeren in Δ -rhodiummodifizierten DNA-Doppelhelices[a].

Konjugat	Abstand [Å][b]	Reparatur [%][c]
	19	67
	19	79
	22	91
	26	100
	47	

[a] Nach Lit.[54]. [b] Die Abstände zwischen Katalysator und Thymindimeren wurden aufgrund der markierten Intercalationsstellen ermittelt. Dabei wurde ein Abstand von 3,4 Å sowohl zwischen benachbarten Basenpaaren als auch zwischen dem intercalierten phi-Liganden und dem ersten Basenpaar zugrundegelegt. [c] Die Reparaturausbeute ist als Prozentsatz der Thymindimere ausgedrückt, die nach sechs Stunden Bestrahlung bei $\lambda = 400$ nm repariert waren.

Übereinstimmung mit den übrigen Ergebnissen eine größere Effizienz bei den Δ -Isomeren als bei den Λ -Isomeren fest, weil der rechtsgängige Metallkomplex tiefer in der ebenfalls rechtsgängigen DNA-Helix eingebettet ist. Ähnliche Reparaturausbeuten erhält man unabhängig davon, ob der Rhodiumkomplex am 3'- oder am 5'-Ende des Dimers fixiert ist. Wir nehmen deshalb an, daß die Einbettung der 3'- und der 5'-Seite des Thymindimers sich nicht wesentlich unterscheiden. Wichtig ist, daß die Reparatureffizienz sehr von der Stapelung der Basenpaare zwischen Katalysator und Dimer abhängt, wie von einer durch einen Basenstapel vermittelten Reaktion zu erwarten ist. Die Abnahme der Effizienz bei dazwischenliegenden Ausbuchtungen in der DNA verdeutlicht diese Empfindlichkeit drastisch und bestätigt gleichzeitig, daß der Basenstapel die Reaktion vermittelt (Tabelle 3).

Nach diesen Messungen ist es interessant, die Reparatureffizienz von kovalent und nichtkovalent gebundenen Rhodiumkomplexen zu vergleichen. Es stellte sich heraus, daß die Reparatureffizienz des kovalent gebundenen Komplexes im Vergleich zu der des nichtkovalent gebundenen auf etwa ein Dreißigstel verringert ist. Vorausgesetzt, daß die Effizienz nur unwesentlich von der Distanz zwischen Dimer und Katalysator abhängt, spiegelt dieser Unterschied wider, wie das Thymindimer in die Duplex-DNA eingebettet ist und vielleicht auch, wie der fixierte Rhodiumkomplex in die Helix intercaliert. Die niedrigere Reparatureffizienz der rhodiummodifizierten Doppelhelices zeigt möglicherweise an, daß das Thymindimer entweder auf der 3'- oder der 5'-Seite nicht vollständig in die Helix eingefügt ist. Unsere Untersuchungen zeigen zwar, daß eine oxidative Fernreparatur durch die DNA möglich ist, doch läßt die geringere Effizienz von helixvermittelten Reparaturen mit fixierten Rhodiumkomplexen vermuten, daß es für die enzymatische Reparatur vorteilhaft ist, wenn das Thymindimer vollständig aus der Helix herausragt, wie es bereits auf der Grundlage der Kristallstruktur der DNA-Photolyase vorgeschlagen wurde.[55] Die Ergebnisse zeigen, wie eine physiologisch wichtige Reaktion der DNA mit Hilfe des Elektronentransfers ablaufen kann und, sofern sie durch den DNA-Basenstapel vermittelt wird, wie ihre Initiierung aus größerer Entfernung möglich ist. Solche Reaktionen an der DNA, die von entfernten Stellen her ausgelöst und durch die Basenstapelung moduliert werden, müssen in Betracht gezogen werden, um die Bedeutung der Ladungsübertragungen für die DNA in der Zelle zu bewerten und sinnvoll zu nutzen.

5. Diskussion der DNA-vermittelten Ladungsübertragung

Obwohl das Konzept einer weitreichenden Ladungsübertragung durch die DNA schon von vielen Wissenschaftlern akzeptiert worden ist, wird die DNA nicht von allen als wichtiges Medium für Elektronentransfer angesehen. Für manche ist es überraschend, daß sich die Ergebnisse der Versuche zu photoinduzierter Übertragung von Elektronen auf die DNA so sehr von entsprechenden Ergebnissen bei Proteinen unterscheiden. Im Grunde sind solche Unterschiede bei den chemischen Verschiedenheiten der aus Basen-

stapeln aufgebauten DNA-Helix einerseits und den hauptsächlich über ein Netz von σ -Bindungen aufgebauten Proteinen andererseits zu erwarten. Momentan ist unser Verständnis des DNA-vermittelten Elektronentransfers sicherlich noch nicht so gut entwickelt wie das des Elektronentransfers in Proteinen.

Wie bei Experimenten an Proteinen wurden auch bei solchen an DNA zunächst nichtkovalent gebundene Donoren und Acceptoren verwendet.^[58] und je nach Verbindung gab es sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während wir mit den fixierten Metallintercalatoren oft schnelle, effiziente Lumineszenzlöschung nachweisen konnten,^[9,25,31,33,34,38,40] wurde dies mit einigen organischen, an DNA bindenden Agentien, zumal mit Ethidium als photoinduziertem Donor und DAP als Acceptor, nicht beobachtet.^[10] Wir haben die Unterschiede in der Geschwindigkeit und der Effizienz darauf zurückgeführt, wie wirksam Donoren und Acceptoren mit dem Basenstapel gekoppelt wurden. Ein deutliches Beispiel dafür ist der Vergleich der photoinduzierten Lumineszenzlöschung von $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ durch $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$, einen starken Intercalator, mit der Lumineszenzlöschung durch $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, einen in der DNA-Furche bindenden Komplex.^[31] Die photoinduzierte Lumineszenzlöschung durch $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ verläuft schneller, als nach einem Stoßmechanismus zu erwarten wäre, während die dynamische Lumineszenzlöschung durch $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ mit diesem Mechanismus konsistent ist.

Es gibt auch Unterschiede in der Geschwindigkeit des Elektronentransfers zwischen enantiomeren DNA-gebundenen Metallkomplexen,^[9,34] die die Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber geringen Änderungen der Stapelung zeigen. Es lassen sich allerdings nicht alle Beobachtungen so gut einordnen. Zum Beispiel stellen wir keine wesentliche Lumineszenzauslöschung mit $[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$ fest und schreiben das Ausbleiben einer schnellen Auslöschung der geringen Überlappung des formselektiven, an DNA bindenden Komplexes mit dem Basenstapel zu.^[33] Auch Brun und Harriman zeigten mit einem Metalloporphyrin als Donor, daß die Kinetik des DNA-vermittelten Elektronentransfers nicht schnell sein muß.^[10h] Hier kann man ebenfalls das Ausbleiben einer schnellen Reaktion auf die geringe Überlappung zwischen Metallkomplex und DNA-Basenstapel zurückführen, zumal die kristallographische Analyse eines DNA-gebundenen Metalloporphyrins zeigt, daß eine Base aus der Helix herausgedrängt wird und der Komplex nicht in die Basenstapelung einbezogen wird.^[59] Aus den bisher erzielten, weitgestreuten Ergebnissen hat sich noch kein deutlicher Parameter ergeben, anhand dessen sich quantitativ beurteilen läßt, ob ein schneller DNA-vermittelter Elektronentransfer stattfindet.

Einige Arbeitsgruppen haben darauf hingewiesen, daß die schnelle Lumineszenzlöschung, die wir beobachtet haben, problemlos durch die Bildung von Clustern erklärt werden kann.^[35,36] Eine einfache Erklärung für die statische, im Vergleich zur Diffusion schnelle Emissionslöschung ist, daß keine Diffusion erforderlich ist; würden die Metallkomplexe kooperativ an die Helix binden, wären sie so positioniert, daß ein rascher Elektronentransfer erleichtert würde. Barbara et al.^[35] haben in einer umfangreichen Analyse von Daten der

ultraschnellen Emissionslöschung von Kalbsthymus-DNA-gebundenem Δ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ und Δ - $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ gezeigt, daß eine Erklärung durch kooperative Clusterbildung möglich ist. Nicht in die Analyse einbezogen wurde allerdings Δ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$, das ein anderes, wenngleich schnelles Reaktionsprofil aufweist; außerdem wurden keine anderen Metallkomplexe betrachtet, die sich in der Hydrophobie der nicht intercalierenden Liganden unterscheiden und daher vermutlich auch in ihrer Kooperativität.

Es gibt, wie erwähnt, viele andere Fragen, die dieses Modell aufwirft: Woher kommen die Unterschiede in den Rekombinationsgeschwindigkeiten bei gleichem Donor und Acceptor, aber bei verschiedenen DNA-Sequenzen? Warum sollte die kooperative Clusterbildung zwischen Ruthenium- und Rhodiumkomplexen stattfinden, nicht aber bei jedem Metallkomplex für sich? Wieso findet eine Clusterbildung zwischen Ethidium, dem nicht intercalierende großflächige Liganden fehlen, und dem Rhodiumkomplex statt (denn eine solche muß man auch hier annehmen, um die schnelle Emissionslöschung zu erklären)? Was ist die strukturelle Basis für die vermutete kooperative Assoziation? Tatsächlich ist die einzige experimentelle Beobachtung, die das Clustermodell stützt, eine schlecht definierte Störung in den CD-Spektren von Δ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ und Δ - $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$, die auftritt, wenn die Komplexe mit großer Beladungsdichte an poly-d(AT) gebunden sind.^[36] In unseren jüngsten Untersuchungen des Circular dichroismus konnten wir zeigen, daß die früheren Experimente unvollständig waren. Eine umfassendere Untersuchung des Circular dichroismus und NMR-spektroskopische Messungen zur DNA-Bindung ergaben, daß die Metallintercalatoren nichtkooperativ, vielleicht sogar antikooperativ an die Duplex-DNA binden. All diese Untersuchungen unterstreichen aber die Bedeutung der vollständigen Untersuchung der Bindung von Donoren und Acceptoren an die DNA. Unsere Ergebnisse betonen, wie außergewöhnlich empfindlich der DNA-vermittelte Elektronentransfer darauf reagiert, wie Donoren und Acceptoren an die Helix gebunden sind.

Gewiß kann die Clusterbildung bei unterschiedlichen Verbindungen, die nichtkovalent an die DNA gebunden sind, nie definitiv ausgeschlossen werden, doch Clustermodelle sind nicht geeignet, um Daten von Systemen zu erklären, in denen Elektronendonoren und -acceptoren in bekannten Positionen an der Duplex-DNA fixiert sind. Mit fixierten Intercalatoren haben wir bisher den Elektronentransfer zwischen Metallintercalatoren, die an eine 15 Basenpaare lange Duplex-DNA gebunden waren,^[40] sowie zwischen Ethidium und $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$, die an eine ganze Reihe von Doppelhelices gebunden waren, untersucht.^[43] Die damit erhaltenen Daten stützen deutlich die Lumineszenzlöschung durch weitreichenden Elektronentransfer und sind auch mit den Beobachtungen an nichtkovalent gebundenen Komplexen konsistent. In diesen Untersuchungen konnten wir allerdings nur die Löschung (das Fehlen) von Lumineszenz messen, so daß man einwenden könnte, die Interpretation des überraschenden weitreichenden Elektronentransfers beruhe im wesentlichen auf Negativergebnissen. Es ist also wichtig, ultraschnelle transiente Absorptionsmessungen an diesen fixierten DNA-Konjugaten durchzuführen, um Geschwindig-

keiten des Elektronentransfers zu bestimmen. Diese Untersuchungen sind jedoch sehr schwierig, da große zeitliche Auflösungen und niedrige Konzentrationen (um eine intramolekulare Reaktion sicherzustellen) notwendig sind. Daher sind die Experimente mit nichtkovalent gebundenen intercalierenden Verbindungen eine wertvolle Grundlage.

Gerade wegen der möglichen Mehrdeutigkeit bei der Interpretation der Lumineszenzlöschung wandten wir uns der DNA als Reaktant zu.^[48–50,52,54] Wenn wir das Produkt eines Elektronentransfers in einer gewissen Entfernung von der Quelle des Ladungstransports nachweisen können, so können wir damit unabhängig von der Reaktionsgeschwindigkeit definitiv einen Distanzeffekt bestätigen. Daher waren unsere Untersuchungen zur oxidativen Fernschädigung der DNA, die mit fixierten Oxidationsmitteln ausgelöst wurde, sowohl aus dem geschilderten Grund als auch in biologischem Zusammenhang wichtig. Kritiker weisen hier auf die geringe Effizienz der Reaktion hin. Die Quantenausbeute Φ für die oxidative Schädigung der DNA beträgt bei den Rhodiumkomplexen 10^{-7} . Bei diesen Komplexen ist allerdings jede Art von Photochemie ineffizient ($\Phi(\text{Photoaquation}) = 10^{-4}$), was zum Teil durch andere überlappende Übergänge bedingt ist. Mit Ruthenium(III) als Oxidationsmittel haben wir mit der Flash-Quench-Methode^[50] bei einer Schädigung über eine Entfernung von $> 30 \text{ \AA}$ mit Methylviologen als emissionslöschender Substanz eine Quantenausbeute von 0.002 gemessen. Dies scheint eine vernünftige Größenordnung zu sein, wenn man alle anderen möglichen Reaktionswege von Ruthenium berücksichtigt. Bei dieser erhöhten Quantenausbeute und den im übrigen analogen Beobachtungen bei der Ruthenium- und der Rhodium-Photochemie fällt es schwer, unsere Resultate lediglich als das Ergebnis von statistischen Schwankungen oder „Leckagen“ zu bewerten. Wie bei den spektroskopischen Studien hängen die Reaktionen über größere Entfernungen offenbar sehr von der Einbettung von Donor und Acceptor und von strukturellen Störungen in der dazwischenliegenden Helix ab. Außerdem ist im Fall der oxidativen Fernreparatur von Thymindimeren in der DNA^[54] die Umwandlung zum reparierten Produkt quantitativ und wird lediglich durch den Elektronentransfer ausgelöst, ohne daß eine weitere, diffundierende Spezies benötigt wird. Auch wenn mit Nachdruck darauf hingewiesen wird, daß mit diesen Experimenten die Geschwindigkeit des weitreichenden Elektronentransfers nicht gemessen werden konnte, so sichern sie doch unzweifelhaft eine Chemie über größere Entfernung ab.

Es gibt nur wenige theoretische Arbeiten, die sich mit DNA als Medium für Elektronentransfer befassen, und auch bei diesen gibt es vieles zu diskutieren. Beratan et al.^[42c,d] geben an, daß sich die DNA Berechnungen zufolge proteinähnlich verhält und als Isolator dient. Dieses Ergebnis stimmt mit einigen Kinetikdaten von Meade^[39] und Harriman^[10] überein und unterscheidet sich um mehrere Größenordnungen von unseren Messungen der Emissionslöschung durch Elektronentransfer mit kovalent gebundenen Metallintercalatoren. Die Berechnungen berücksichtigen jedoch keine Kopplung, die durch die Stapelung zustandekommt, weder durch die Basen noch durch Intercalatoren; auch wurde die Sequenz oder die Basenstruktur nicht variiert, um die Empfindlichkeit der Parameter gegenüber solchen Änderungen zu bestätigen,

die experimentell festgestellt wurde. Nach Berechnungen, die sich auf die Redfield-Theorie stützen, haben Friesner et al.^[42a] vorgeschlagen, wie durch die Basenstapelung ein delokalisiertes „Leitungsband“ entstehen kann, das eine weitreichende Ladungsübertragung ohne signifikante Abhängigkeit von der Entfernung erleichtert. Aus dieser Arbeit läßt sich die Voraussage ableiten (der experimentell nachgegangen werden sollte), daß vor allem bei niedrigen Temperaturen der Zugang zu diesem Band thermisch nicht möglich ist und damit der Elektronentransfer unterbrochen wird. Auch Berechnungen, die vor mehr als zwanzig Jahren durchgeführt wurden,^[6] lösten eine ausführliche Diskussion über die Energetik und die Mechanismen des weitreichenden Elektronentransfers aus. Nach unserer Auffassung sind noch weitere experimentelle Daten notwendig, um eine sichere Grundlage für die Entwicklung von Theorien zu bieten. Gegenwärtig bieten Sprungmodelle, Ladungsdelokalisierung und die Leitungsbandhypothese interessante Gesichtspunkte, unter denen unsere Experimente gesehen werden können, doch es gibt noch keine Versuche, mit denen zwischen den Modellen unterschieden werden kann.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Wir haben in diesem Aufsatz eine Reihe von Reaktionen beschrieben, in denen eine Ladungsübertragung durch die gestapelten Basen der DNA vermittelt wird. Diese Reaktionen laufen schnell und effizient zwischen Donoren und Acceptoren ab, die gut in den Basenstapel eingepaßt sind. Sie hängen nur unwesentlich von den Abständen zwischen den Reaktanten ab, sind aber sehr empfindlich gegenüber Änderungen in der Stapelung, sowohl von Donor und Acceptor als auch von den dazwischenliegenden Basen. Diese Ergebnisse werfen viele Fragen auf und machen weitere Versuche notwendig. Über welche molekulare Entfernung hinweg kann eine Ladung effektiv durch die DNA transportiert werden? Wir müssen Tests entwickeln, um Reaktionen über 50–100 statt wie bisher 10–20 Basenpaare hinweg zu untersuchen. Wie schnell laufen diese Reaktionen ab? Bislang erlaubten uns die zur Verfügung stehenden Instrumente nur, die Größenordnung der Geschwindigkeiten der photoinduzierten Emissionslöschung zu ermitteln, es konnte jedoch noch nicht systematisch bestimmt werden, wie sich diese Geschwindigkeiten mit dem Abstand und der Basensequenz ändern. Solche Daten sind unabdingbar für ein theoretisches Fundament dieser Chemie. Ferner müssen wir besser verstehen, wie diese Reaktionen von der Temperatur und von Änderungen der Nucleinsäurekonformation abhängen. Wir müssen des weiteren quantitative Meßgrößen entwickeln, um die Stapelung in der Duplex-DNA und ihren Einfluß auf die elektronische Kopplung zu beschreiben.

Vielleicht am spannendsten ist es aber, einige der biologischen Konsequenzen dieser Chemie zu betrachten. Wird die Fernschädigung der DNA durch Radikalstellen innerhalb der Zelle ausgelöst? Gibt es in der Zelle Mechanismen, durch die Sequenzen vor solchen Schäden geschützt werden oder durch die die Position des Schadens kontrolliert wird? Läßt sich diese Chemie über größere Entfernungen für den Ent-

wurf neuer Chemotherapeutica oder neuer Sensoren auf Nucleinsäurebasis ausnutzen? Wird der weitreichende Ladungstransport durch die DNA in der Zelle genutzt, um Informationen über die DNA-Bibliothek über größere Entfernungen weiterzugeben? Diese Fragen sind sicherlich provokativ. Sie sind aber auch wichtige Herausforderungen für die zukünftigen Arbeiten, und deren Ergebnisse sollten Bestandteil unseres Verständnisses der DNA-Chemie werden.

Wir danken den National Institutes of Health (NIH) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Außerdem sind wir unseren Mitarbeitern und Kollegen für ihre Bemühungen, diese Chemie zu untersuchen, zu großem Dank verpflichtet. Ihre wissenschaftlichen Beiträge sind in diesem Aufsatz zitiert. Diese Arbeit begann als Zusammenarbeit mit C. V. Kumar und N. J. Turro, und der Weg ausgehend von den ersten Versuchen hat sich als sehr lohnend herausgestellt.

Eingegangen am 27. Februar 1997 [A213]
Übersetzt von Dr. Burkard Neub, Jülich

- [1] a) B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 463–493; b) R. Schleif, *Science* **1988**, 241, 1182–1187; c) D. L. Ollis, S. W. White, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 981–995; d) A. A. Travers, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 427–452; e) C. O. Pabo, R. T. Sauer, *ibid.* **1992**, 61, 1053–1095; f) P. H. von Hippel, J. D. McGhee, *ibid.* **1972**, 41, 231–300.
- [2] a) T. W. Johann, J. K. Barton, *Philos. Trans. R. Soc. London. A* **1996**, 354, 299–324; b) P. B. Dervan, *Science* **1986**, 232, 464–471; c) J. C. Quada, Jr., M. J. Levy, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12171–12172; d) D. S. Sigman, T. W. Bruice, A. Mazumder, C. L. Sutton, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 98–104; e) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1453–1481; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1387–1416.
- [3] W. Saenger in *Principles of Nucleic Acid Structure* (Hrsg.: C. R. Cantor), Springer, New York, **1984**.
- [4] a) J. S. Miller, A. J. Epstein, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 399–432; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 385–415; b) M. A. Fox, *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 569–574; c) T. J. Marks, *Science* **1985**, 227, 881–889; d) M. Hanack, M. Lang, *Adv. Mater.* **1994**, 6, 819–833.
- [5] a) P. G. Schouten, J. M. Warman, M. P. de Haas, M. A. Fox, H.-L. Pan, *Nature* **1991**, 353, 736–737; b) P. G. Schouten, J. M. Warman, M. P. de Haas, J. F. van der Pol, J. W. Zwikker, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9028–9034; c) P. G. Schouten, J. M. Warman, M. P. de Haas, C. F. van Nostrum, G. H. Gelinck, R. J. M. Nolte, M. J. Copyn, J. W. Zwikker, M. K. Engel, M. Hanack, Y. H. Chang, W. T. Ford, *ibid.* **1994**, 116, 6880–6894.
- [6] D. Dee, M. E. Baur, *J. Chem. Phys.* **1974**, 60, 541–560.
- [7] a) R. S. Snavely, *Trans. Faraday Soc.* **1963**, 59, 754–760; b) D. D. Eley, D. I. Spivey, *ibid.* **1962**, 58, 411–415.
- [8] P. O'Neill, E. M. Fielden, *Adv. Radiat. Biol.* **1993**, 17, 53–120.
- [9] a) E. D. A. Stemp, J. K. Barton in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 33 (Hrsg.: A. Sigel, H. Sigel), Marcel Dekker, New York, **1996**, S. 325; b) M. R. Arkin, Y. Jenkins, C. J. Murphy, N. J. Turro, J. K. Barton, *Adv. Chem. Ser.* **1995**, 246, 449–469.
- [10] a) T. J. Meade in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 32 (Hrsg.: A. Sigel, H. Sigel), Marcel Dekker, New York, **1996**, S. 453; b) B. Nordén, P. Lincoln, B. Akerman, E. Tuite in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 32 (Hrsg.: A. Sigel, H. Sigel), Marcel Dekker, New York, **1996**, S. 177; c) B. C. Baguley, M. Le Bret, *Biochemistry* **1984**, 23, 937–943; d) L. M. Davis, J. D. Harvey, B. C. Baguley, *Chem. Biol. Interact.* **1987**, 62, 45–58; e) S. J. Atherton, P. C. Beaumont, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 12025–12029; f) M. Manoharan, K. L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. L. Netzel, *ibid.* **1995**, 99, 17461–17472; g) P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5361–5362; h) A. M. Brun, A. Harriman, *ibid.* **1994**, 116, 10383–10393; i) *ibid.* **1992**, 114, 3656–3660; j) *ibid.* **1991**, 113, 8153–8159; k) S. O. Kelley, G. Orellana, J. K. Barton, *J. Phys. Chem.*, eingereicht.
- [11] a) C. Dupureur, J. K. Barton in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 5 (Hrsg.: J.-M. Lehn), Pergamon, **1996**, S. 295; b) A. Sitlani, J. K. Barton in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, Vol. 1 (Hrsg.: G. Berthoin), Marcel Dekker, New York, **1995**, S. 466; c) C. J. Murphy, J. K. Barton, *Methods Enzymol.* **1993**, C226, 576–594.
- [12] a) T. J. Meyer, *Acc. Chem. Res.* **1989**, 22, 163–170; b) A. Juris, V. Balzani, F. Barigelli, S. Campagna, P. Belser, A. von Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.* **1988**, 84, 85–277; c) J.-P. Sauvage, J.-P. Collin, J.-C. Chambron, S. Guillerez, C. Coudret, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 993–1019; d) M. T. Indelli, C. A. Bignozzi, A. Harriman, J. R. Schoonover, F. Scandola, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3768–3779.
- [13] a) J. K. Barton, C. V. Kumar, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6391–6393; b) M. D. Purugganan, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1988**, 241, 1645–1649.
- [14] a) A. E. Friedman, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4960–4962; b) A. E. Friedman, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 2595–2602; c) Y. Jenkins, A. E. Friedman, J. K. Barton, *Biochemistry* **1992**, 31, 10809–10816.
- [15] E. Holmlin, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 7–8.
- [16] S. Arounaguirri, B. G. Maiya, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 4267–4270.
- [17] a) H. D. Stoeffler, N. B. Thornton, S. L. Temkin, K. S. Schanze, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7119–7128; b) V. W.-W. Yam, K. K.-W. Lo, K.-K. Cheung, R. Y.-C. Kong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1191–1193.
- [18] a) C. M. Dupureur, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 33–43; b) *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10286–10287; c) R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, im Druck.
- [19] E. Amouyal, A. Homs, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1990**, 1841–1845.
- [20] C. Turro, S. H. Bossmann, Y. Jenkins, J. K. Barton, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9026–9032.
- [21] J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, *Chem. Phys. Lett.* **1991**, 182, 603–607.
- [22] E. Sabatani, H. D. Nikol, H. B. Gray, F. C. Anson, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1158–1163.
- [23] C. Hiort, P. Lincoln, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3448–3454.
- [24] J. K. Barton, *Science* **1986**, 233, 727–734.
- [25] R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5236–5244.
- [26] a) A. Sitlani, C. M. Dupureur, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12589–12590; b) A. Sitlani, J. K. Barton, *Biochemistry* **1994**, 33, 12100–12108; c) R. H. Terbruggen, J. K. Barton, *ibid.* **1995**, 34, 8227–8234.
- [27] a) A. H. Krotz, L. Y. Kuo, T. P. Shields, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3877–3882; b) A. H. Krotz, B. P. Hudson, J. K. Barton, *ibid.* **1993**, 115, 12577–12578.
- [28] S. S. David, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2984–2985.
- [29] B. P. Hudson, C. M. Dupureur, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9379–9380.
- [30] A. Sitlani, E. C. Long, A. M. Pyle, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2303–2312.
- [31] C. J. Murphy, M. R. Arkin, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5315–5319.
- [32] C. Turro, A. Evenzahav, S. H. Bossmann, J. K. Barton, N. J. Turro, *Inorg. Chim. Acta* **1996**, 243, 101–108.
- [33] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, C. Turro, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2267–2274.
- [34] 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, 475–480.
- [35] E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hörmann, P. F. Barbara, *J. Phys. Chem.* **1997**, 101, 299–303.
- [36] P. Lincoln, E. Tuite, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1454–1455.
- [37] E. D. A. Stemp, R. E. Holmlin, M. R. Arkin, J. K. Barton, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [38] S. J. Franklin, C. R. Treadway, J. K. Barton, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [39] E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2375–2376.
- [40] 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.
- [41] a) R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 265–322; b) D. N. Beratan, J. N. Onuchic, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Science* **1992**, 258, 1740–1741; c) G. L. Closs, J. R. Miller, *ibid.* **1988**, 240, 440–447.
- [42] a) A. K. Felts, W. T. Pollard, R. A. Friesner, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 2929–2940; b) S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *ibid.* **1996**, 100, 17678–17682; c) S. M. Risser, D. N. Beratan, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2508–2510; d) D. N. Beratan, S. Priyadarshy, S. M. Risser, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 3–8.
- [43] T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 358–360; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 352–354.
- [44] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, 277, 673–676.
- [45] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9861–9870.
- [46] J. Retèl, B. Hoebee, J. E. F. Braun, J. T. Lutgerink, E. van den Akker, A. H. Wanamarta, H. Joenje, M. V. M. Laflaur, *Mutat. Res.* **1993**, 299, 165–182.
- [47] L. Kittler, G. Löber, F. A. Gollmick, H. Berg, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1980**, 7, 503–511.
- [48] a) D. T. Breslin, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2311–2319; b) I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, *ibid.* **1995**, 117, 6406–6407; c) H. Kasai, Z. Yamaizumi, M. Berger, J. Cadet, *ibid.* **1992**, 114,

- 9692–9694; d) K. Ito, S. Inoue, K. Yamamoto, S. Kawanishi, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 13221–13227; e) H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7063–7068.
- [49] D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, 382, 731–735.
- [50] a) E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2921–2925; b) M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. C. Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 389–400.
- [51] a) I.-J. Chang, H. B. Gray, J. R. Winkler, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7056–7057; b) N. Liang, A. G. Mauk, G. J. Pielak, J. A. Johnson, M. Smith, B. M. Hoffman, *Science* **1988**, 240, 311–313; c) D. A. Dunn, V. H. Lin, I. E. Kochevar, *Biochemistry* **1992**, 31, 11620–11625.
- [52] D. B. Hall, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5045–5046.
- [53] M. A. Rosen, L. Shapiro, D. J. Patel, *Biochemistry* **1992**, 31, 4015–4026.
- [54] P. J. Dandliker, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Science* **1997**, 274, 1465–1468.
- [55] a) A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, 33, 2–9; b) S.-T. Kim, A. Sancar, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 57, 895–904; c) T. P. Begley, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 394–401; d) J.-S. Taylor, *ibid.* **1994**, 27, 76–82; e) P. F. Heelis, R. F. Hartman, S. D. Rose, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 289–297; f) P. F. Heelis, D. J. Deeble, S.-T. Kim, A. Sancar, *Int. J. Radiat. Biol.* **1992**, 62, 137–143.
- [56] C. Hélène, M. Charlier, *Photochem. Photobiol.* **1977**, 25, 429–434.
- [57] a) T. Young, R. Nieman, S. D. Rose, *Photochem. Photobiol.* **1990**, 52, 661–668; b) C. Pac, I. Miyamoto, Y. Masaki, S. Furusho, S. Yanagida, T. Ohno, A. Yoshimura, *ibid.* **1990**, 52, 973–979.
- [58] B. E. Bowler, A. L. Raphael, H. B. Gray, *Prog. Inorg. Chem.* **1990**, 38, 259–322.
- [59] L. A. Lipscomb, F. X. Zhou, S. R. Presnell, R. J. Woo, M. E. Peek, R. R. Plaskon, L. D. Williams, *Biochemistry* **1996**, 35, 2818–2823.