

DNA-vermittelter Ladungstransfer

Reduktiver Elektronentransfer und Transport von Überschusselektronen in DNA

Hans-Achim Wagenknecht*

Stichwörter:

DNA · Elektronentransfer · Ladungstransfer · Nucleoside

DNA-vermittelte Ladungstransferprozesse lassen sich prinzipiell in oxidative Lochtransferprozesse und reduktive Elektronentransferprozesse einteilen. Im Hinblick auf die Entstehung von DNA-Schäden lag das Hauptaugenmerk bisheriger Forschung auf der Untersuchung des oxidativen Lochtransfers oder -transports. Daraus wurden wichtige Informationen beispielsweise über den Mechanismus erhalten. Dagegen hat der Transport oder Transfer von Überschusselektronen ein großes Potenzial für biomedizinische Anwendungen, hauptsächlich in der DNA-Chiptechnologie. Zur Untersuchung der mechanistischen Details wurden in γ -Puls-Radiolyse-Studien Elektronenacceptoren eingesetzt, die nicht kovalent an DNA gebunden sind. Der entscheidende Nachteil dieses experimentellen Aufbaus liegt darin, dass sowohl die Injektion als auch das Abfangen der Elektronen nicht regiospezifisch erfolgen kann. Kürzlich wurden neue photochemische DNA-Systeme publiziert, die eine chemische und spektroskopische Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers sowie der Wanderung von Überschusselektronen in der DNA erlauben. Basierend auf diesen Resultaten wurde ein Elektronen-Hopping-Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die Pyrimidin-Radikalanionen als intermediäre Elektronenträger auftreten.

1. Mechanismen des DNA-vermittelten Lochtransfers und des Loch-Hoppings

Vor über 40 Jahren wurde erstmals vorgeschlagen, dass die Bewegung von Ladung entlang der π -Stapel der Basenpaare von DNA, die in der B-Form vorliegt, erfolgen könnte.^[1] Barton et al. leisteten die Pionierarbeit auf diesem Gebiet und veröffentlichten zahlreiche Arbeiten über den photoaktivierten Ladungstransfer in der DNA.^[2,3] Seither wurde die fundamentale Frage, ob DNA ein geeignetes Medium für den Ladungstransfer über große Entfernungen

ist, sehr kontrovers diskutiert.^[4] Das große Interesse am DNA-vermittelten Ladungstransfer wurde angetrieben durch dessen Relevanz bei der Entstehung oxidativer DNA-Schäden, die Apoptose, Mutationen oder Krebs auslösen können.^[5] Im Zentrum des Interesses der meisten Forschungsgruppen^[6] stand deshalb die photochemisch oder photophysikalisch induzierte Oxidation der DNA, bei der der DNA oder dem endgültigen Acceptor (Ac) ein Elektron entzogen und auf den photoangeregten Ladungsdonor (D) übertragen wird. Diese Prozesse können als oxidativer Lochtransfer oder Lochtransport beschrieben werden.

Die meisten Experimente wurden nach der folgenden Strategie durchgeführt:^[7]

1. Markierung der DNA mit redoxaktiven Sonden durch Interkalation und/oder kovalente Verknüpfung
2. Auslösen des Ladungstransfers mit photochemischen oder elektrochemischen Methoden
3. Nachweis der Ladungstransferprozesse.

Die DNA-vermittelten Lochtransfer- oder Lochtransportprozesse wurden mit verschiedenen Techniken untersucht, z.B. spektroskopisch oder durch biochemische Analyse der oxidativen DNA-Schäden.^[6,7] Der Superaustausch- und der Hopping-Mechanismus sind die beiden Hauptmechanismen, die zur Beschreibung oxidativer Lochtransfer- und Lochtransportprozesse in der DNA geeignet sind.^[8] Die Grund-

[*] Dr. H.-A. Wagenknecht
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-mail: wagenknecht@ch.tum.de

lagen des Ladungstransfers durch die DNA sind weitgehend verstanden, und die Diskussion dreht sich jetzt um deren biologische Relevanz.^[9]

Anfänglich wurden die Ladungstransferprozesse entsprechend der Marcus-Theorie als Superaustausch-Mechanismus (Abbildung 1 a) beschrieben. Die Geschwindigkeitskonstante k_{CT} eines solchen einstufigen Tunnelprozesses hängt expo-

3. Typische β -Werte DNA-vermittelter Ladungstransferprozesse liegen im Bereich zwischen 0.6 und 0.8 Å⁻¹.
4. Die Interkalation von D und Ac ist kritisch für einen schnellen und effizienten Ladungstransferprozess.

Andere Experimente und Daten dagegen zeigten deutlich,^[6,7] dass der DNA-vermittelte Lochtransport auch Reaktionen über große Entfernungen bewirken kann (bis zu 200 Å),^[11] was auf eine sehr geringe Abstandsabhängigkeit hinweist. Dies führte zur Formulierung eines alternativen Mechanismus, dem Hopping-Modell (Abbildung 1 b).^[8,12] Unter den vier verschiedenen DNA-Basen ist Guanin (G) am leichtesten oxidierbar.^[13,14] Beim Hopping ist deswegen das G-Radikalkation (G⁺) der intermediäre Ladungsträger. Die positive Ladung hüpfst, nachdem sie in den DNA-Basenstapel injiziert wurde, von G zu G und kann durch einen geeigneten Acceptor abgefangen werden. Jeder Hopping-Schritt ist jeweils ein Tunnelprozess durch die dazwischen liegenden Adenin(A)-Thymin(T)-Basenpaare.^[8,15] Die Gesamtgeschwindigkeit des Lochtransports entsprechend dem Hopping-Modell hängt von der Zahl der Hopping-Schritte (N) ab, $k_{CT} \propto N^{-n}$ (n ist eine Konstante).^[8] Lewis et al. bestimmten die Geschwindigkeit eines einzelnen Hopping-Schrittes von G nach GG auf $k_{HOP} = 10^7$ s⁻¹.^[16] Giese et al. schlugen außerdem vor, dass auch A als intermediärer Ladungsträger fungieren kann, wenn G in der Basensequenz nicht vorkommt.^[17]

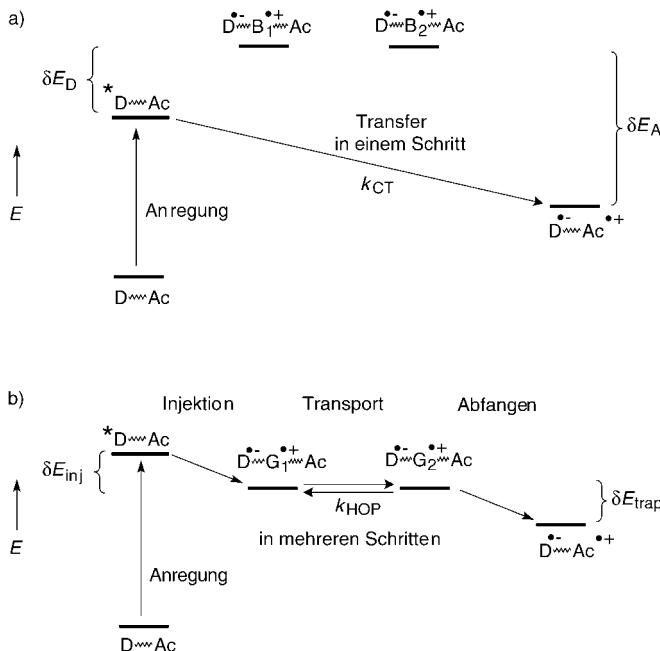


Abbildung 1. Superaustausch-Mechanismus des photoinduzierten DNA-vermittelten Lochtransfers (a) und Hopping-Mechanismus des photoinduzierten Lochtransports in der DNA (b). D = Donor, Ac = Acceptor, B = Base, inj = Injektion, trap = Auffangen, CT = Ladungstransfer.

nentiell von der Distanz R zwischen dem Donor (D) und dem Acceptor (Ac) ab, $k_{CT} \propto e^{-\beta R}$.^[10] Vier wichtige Beobachtungen wurden bei dieser Interpretation gemacht:

1. Der Lochtransfer über den Superaustausch-Mechanismus ist auf kleine Entfernungen beschränkt (< 10 Å).
2. Ladungstransferreaktionen über kurze Distanzen verlaufen sehr schnell ($k_{CT} = 10^9$ – 10^{12} s⁻¹).



H.-A. Wagenknecht, geboren 1968, beendete das Studium der Chemie an der Universität Freiburg mit einer Diplomarbeit über Glycosidase-Inhibitoren (Prof. J. Lehmann). Nach Abschluss der Doktorarbeit über synthetische Modelle der Chlorperoxidase in der Gruppe von Prof. W.-D. Woggon (Basel) erhielt er Stipendien des Schweizer NSF, der Novartis und der DFG, um als Postdoktorand am California Institute of Technology (Pasadena) in der Gruppe von Prof. J. K. Barton zu forschen. Seit 2000 leitet er eine unabhängige Nachwuchsgruppe an der Technischen Universität München, die an Modifikationen von DNA und Kohlenhydraten arbeitet.

Technische Universität München, die an Modifikationen von DNA und Kohlenhydraten arbeitet.

2. Reduktiver Elektronentransfer und Transport von Überschusselektronen

Ein reduktiver Elektronentransfer oder -transport tritt auf, wenn ein Elektron aus dem photoangeregten Donor in die DNA injiziert oder auf den Acceptor übertragen wird. Anders als beim oxidativen Lochtransfer und dem Loch-Hopping in der DNA (siehe vorheriger Abschnitt) sind die mechanistischen Details des Transfers oder des Transportes von Überschusselektronen noch unklar. Diese Wissenslücke wurde in den letzten zwei bis drei Jahren gefüllt, auch wenn ein wohldefiniertes und geeignetes Donor-Acceptor-System für zeitaufgelöste Messungen bisher nicht entwickelt wurde. Die Mechanismen des Lochtransfers und Lochtransportes wurden auf das Problem des reduktiven Elektronentransfers und der Wanderung von Überschusselektronen übertragen.

Trotz der Ungenauigkeit der experimentell bestimmten Potentiale wurde folgender Trend für die Reduzierbarkeit von DNA-Basen abgeleitet: T, U \approx C > A > G (C = Cytosin).^[14,18] Dieser Trend wurde kürzlich durch theoretische Untersuchungen bestätigt.^[19] Detaillierte Berechnungen der Elektronenaffinitäten der DNA-Basen in Oligonucleotiden verschiedener Basensequenz von Rösch et al.^[20] deuten darauf hin, dass 5'-XCY-3' und 5'-XTY-3' die stärksten Elektronenacceptoren sind, wenn X und Y die Pyrimidine C oder T sind. Sowohl aus theoretischer als auch aus experimenteller Sicht sind demnach T und C die am leichtesten zu reduzierenden Basen, deren Reduktionspotentiale sehr ähnlich sind.

Für den DNA-vermittelten Transport von Überschusselektronen über große Entfernungen wurde ein Hopping-

Mechanismus vorgeschlagen, der alle Basenpaare (T-A und C-G) mit einbezieht und bei dem die beiden Pyrimidin-Radikalanionen $C^{\cdot-}$ und $T^{\cdot-}$ als intermediäre Elektronenträger auftreten.^[12] Nach Steenken et al. haben $C^{\cdot-}$ und $T^{\cdot-}$ jedoch eine stark unterschiedliche Basizität.^[21] Deswegen kann die Protonierung von $C^{\cdot-}$ und $T^{\cdot-}$ durch die komplementären DNA-Basen oder die Wassermoleküle aus der Umgebung möglicherweise den Elektronentransfer oder das Elektronen-Hopping behindern.^[21]

2.1. γ -Puls-Radiolyse-Studien

Das meiste Wissen über den reduktiven Elektronentransfer und über das Verhalten von Überschusselektronen in der DNA stammt aus γ -Puls-Radiolyse-Studien.^[22-26] Viele dieser Studien wurden in Eis oder glasartigen, wässrigen LiBr-Lösungen mit Duplex-DNA durchgeführt. Zur Herstellung solvatisierter Elektronen, die in der Lage sind, die DNA zu reduzieren und so den DNA-vermittelten Elektronentransfer oder -transport auszulösen, wurden die Proben mit γ -Strahlung bestrahlt und die DNA mit Elektronenacceptoren dotiert, z.B. Mitoxantron (MX, Abbildung 2). Diese interkalieren in

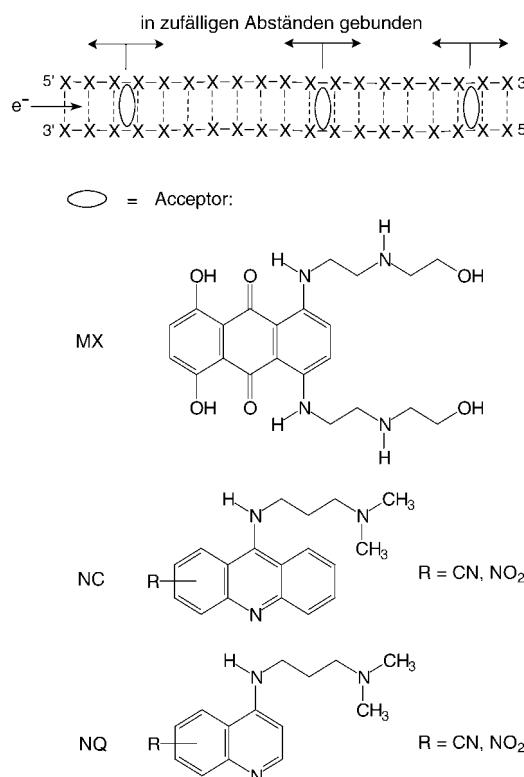


Abbildung 2. Mitoxantron (MX), Acridin(NC)- und Chinolinderivat (NQ) als Elektronenacceptoren in den γ -Puls-Radiolyse-Experimenten zur Untersuchung des Elektronentransfers und -transportes in der DNA.

die DNA in zufälligen Abständen. Die intermediär auftretenden Radikale der DNA-Basen sowie des Acceptors wurden durch ESR-Spektroskopie nachgewiesen. Der Haupt-

nachteil dieses experimentellen Aufbaus ist, dass sowohl die Injektion als auch das Abfangen der Elektronen nicht regiospezifisch erfolgt. Trotzdem können einige bemerkenswerte und prinzipielle Aussagen und Hinweise aus diesen Untersuchungen, die hauptsächlich von Sevilla et al. durchgeführt wurden,^[22] erhalten werden.

Unterhalb von 77 K erfolgt der Elektronentransfer in der DNA als Superaustausch. Die Abstandsabhängigkeit des Elektronentransfers wurde zu einem Durchschnittswert von $\beta = 0.9 \text{ \AA}^{-1}$ bestimmt und ist nicht temperaturabhängig. DNA bei 77 K ist demnach kein besonders gutes Medium für den Transfer von Überschusselektronen. Dieses Resultat ist in Einklang sowohl mit dem oxidativen Lochtransfer über den Superaustausch-Mechanismus (siehe Abschnitt 1) als auch mit einstufigen Elektronen-Tunnelprozessen in Proteinen.^[27]

Die Abstandsabhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransfers variiert in den synthetischen Duplexen beträchtlich.^[23] Der β -Wert für das Tunneln von Elektronen beträgt 0.75 \AA^{-1} in poly(dA-dT)-poly(dA-dT) und 1.4 \AA^{-1} in poly(dI-dC)-poly(dI-dC), jeweils gemessen in D₂O. Der β -Wert für DNA mit einer gemischten Sequenz (DNA aus Kalbsthymus) liegt mit 0.92 \AA^{-1} in D₂O zwischen diesen Werten. Vergleichbare Messungen in H₂O ergaben einen β -Wert von 0.83 \AA^{-1} , was auf einen moderaten Isotopeneffekt hinweist. Der Deuteronen- oder Protonentransfer von Inosin (I) oder G nach $C^{\cdot-}$ verlangsamt demnach den Elektronentransfer deutlich, unterbricht ihn aber nicht.

Oberhalb von 130 K tritt als Konkurrenzprozess zum Tunneln der Elektronen die irreversible Deuterierung von $T^{\cdot-}$ in D₂O auf, die das irreversible Abfangen des Elektrons bewirken kann. Der Elektronentransfer von dem mit einem Elektron reduzierten Cytosin ($C^{\cdot-}$) ist unterhalb von 170 K offensichtlich zu langsam, um beobachtet zu werden. Oberhalb von 170 K verläuft der Elektronentransfer nach einem anderen Mechanismus als thermisch aktiverter Prozess, bei dem auch $C^{\cdot-}$ als intermediärer Elektronenträger auftritt. Wie bereits erwähnt, wird $C^{\cdot-}$ vermutlich durch die komplementäre Base G protoniert, weil dabei eine hohe Stabilisierungsenergie frei wird.^[21,24] Dieser Protonentransfer verläuft reversibel und thermisch aktiviert, was darauf hindeutet, dass der Protonentransfer in einem C-G-Radikalanion-Basenpaar die Reichweite des Elektronen-Hoppings in der DNA nicht limitiert.

Anderson et al. verwendeten in ihren γ -Puls-Radiolyse-Studien Nitroacridine und Nitrochinoline als in zufälligen Abständen nicht kovalent an die DNA gebundene Elektronenacceptoren (NC und NQ, Abbildung 2).^[25] Diese Untersuchungen zeigten in Übereinstimmung mit den zuvor diskutierten Resultaten, dass die Wanderung von Elektronen in der DNA ein Prozess ist, der deutlich durch die Aktivierungsenergie kontrolliert wird. Bernhard et al. bestimmten die Ausbeute der abgefangenen Radikale in kristalliner DNA bei 4 K zu 60 % (bezogen auf die Menge anfänglich gebildeter Radikale).^[26] Interessanterweise stimmten die qualitativen Aspekte der aufgenommenen Spektren gut mit einer Radikalpopulation überein, die von dem mit einem Elektron reduzierten C ($C^{\cdot-}$) dominiert wird.

2.2. Photochemische Studien

Die photochemischen Untersuchungen zur Injektion und zum Transport von Elektronen in der DNA wurden mit dem gleichen experimentellen Aufbau durchgeführt, der bereits in Abschnitt 1 vorgestellt und zur Untersuchung des oxidativen Lochtransfers verwendet wurde.^[7] Als photoaktivierbare Elektronendonoren wurden Flavin-, Stilbendiether- und Pyriderivate eingesetzt, die kovalent mit den jeweiligen Oligonucleotiden verknüpft wurden und sich deutlich in ihrer Struktur und ihren Redoxeigenschaften unterscheiden.

Basierend auf der Kenntnis des Reparaturmechanismus der DNA-Photolyase^[28] entwickelten Carell et al. einen DNA-Assay zur Untersuchung der Wanderung von Überschusselektronen (Abbildung 3),^[29] der aus den folgenden zwei DNA-Modifikationen besteht: 1) Ein Flavinderivat wurde synthetisch als künstliche Nucleobase in Oligonucleo-

tide eingebaut.^[30] Dieses Flavin hat im reduzierten, deprotonierten und photoangeregten Zustand ein Redoxpotential von -2.8 V und ist dadurch in der Lage, alle vier DNA-Basen zu reduzieren.^[31] 2) In die Oligonucleotide wurde zusätzlich ein spezielles T-T-Dimer ohne verbindende Phosphodiesterbrücke zwischen der 3'- und der 5'-Hydroxygruppe der beiden Ribofuranosid-Einheiten eingebaut.^[32] Die Cycloreversion des T-T-Dimers, die durch eine Ein-Elektronen-Reduktion ausgelöst wird, bewirkt einen Strangbruch des Oligonucleotids, der durch HPLC-Analyse quantifiziert werden kann.

Die Spaltung des T-T-Dimers ist die chemische Konsequenz eines Elektronentransportes durch den DNA-Basenstapel. Diese Interpretation basiert hauptsächlich auf den gut charakterisierten Redoxeigenschaften des Flavin-Interkallators im reduzierten und deprotonierten Zustand und darauf, dass eine für das Loch-Hopping typische Basensequenz-Abhängigkeit nicht beobachtet wurde. Auf der Basis konstanter Bedingungen bei der Bestrahlung und unter der Annahme, dass die Effizienz der Elektroneninjektion in allen DNA-Duplexen identisch ist, kann die beobachtete Menge an T-T-Dimer-Spaltung der jeweiligen Effizienz des Elektronentransportes zugeordnet werden. Die Menge an gespaltenem T-T-Dimer hängt nur schwach von dessen Abstand zum Flavinderivat ab, was auf einen thermisch aktivierten Elektronen-Hopping-Prozess hindeutet. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit den zuvor diskutierten γ -Puls-Radiolyse-Studien (siehe Abschnitt 2.1).

Lewis und Wasieleski et al. untersuchten die Energetik und Kinetik der photoinduzierten Elektroneninjektion in DNA-Haarnadeln, die synthetisch mit einem Stilbendiether-derivat als Kopfgruppe versehen wurden (Abbildung 4).^[33] Mithilfe der Potentiale der Nucleobasen^[14,18,20] sowie des entsprechenden Oxidationspotentiale (1.16 V gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE)) und der Singulettenergie des Stilbendiethers ($E_{00}=3.45$ eV)^[33] wurde vorhergesagt, dass die Reduktion von C und T exergonisch und die von A und G endergonisch verlaufen sollte. Hinsichtlich der Triebkraft des Elektronentransfers unterscheidet sich dieses System daher deutlich von dem zuvor beschriebenen Flavin-System.

In der aktuellen Studie dienten der Stilbendiether als Elektronendonator und die Nucleobasen T und C als Elektronenacceptoren.^[33] Die Dynamik der Elektroneninjektion wurde mithilfe von Pikosekunden-zeitaufgelöster Laserspektroskopie untersucht. Es ist bemerkenswert, dass die Elektroneninjektionsgeschwindigkeiten mit T als Elektronenacceptor ($>2 \times 10^{12}$ s $^{-1}$) größer sind als mit C (3.3 $\times 10^{11}$ s $^{-1}$). Das deutet darauf hin, dass das Reduktionspotential von T in Doppelhelix-DNA, die in der B-Form vorliegt, kleiner sein muss als das von C. Dieses Resultat ist wiederum in Einklang sowohl mit Femtosekunden-zeitaufgelösten Untersuchungen der Reduktion von C und T durch photoangeregtes 2-Aminopurin^[34] als auch mit kürzlich durchgeführten Berechnungen der Elektronenaffinitäten einzelner Nucleobasen,^[19] aber nicht mit den Berechnungen von Rösch et al.^[20]

Interessanterweise beobachteten Lewis et al. einen kleinen Unterschied der Elektroneninjektionsgeschwindigkeiten, wenn C als Elektronenacceptor in unterschiedlichen Basenpaaren (C-G gegen C-I) verwendet wurde. Das C-G-Basen-

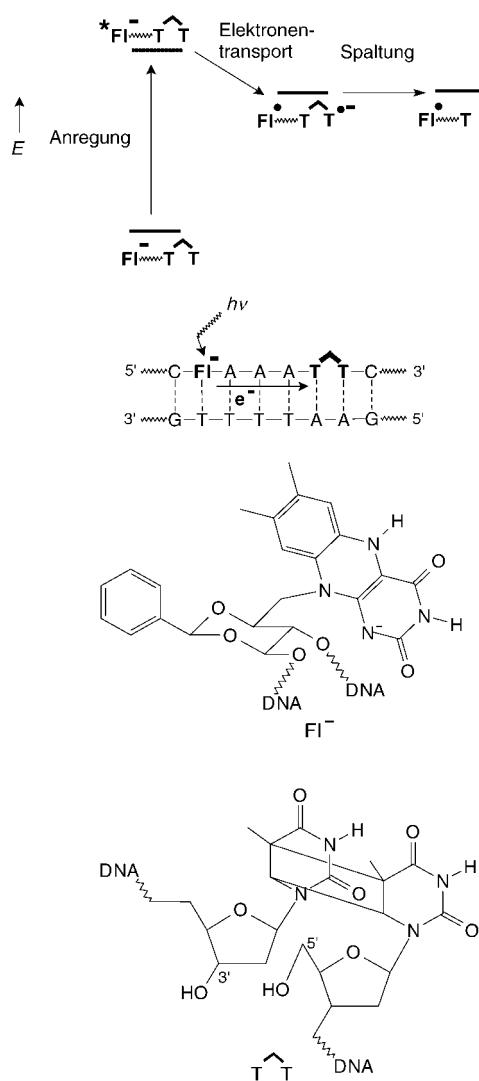


Abbildung 3. Chemischer Assay zur Untersuchung der Wanderung von Überschusselektronen in der DNA. Der photoinduzierte Elektronen-transport von einem Flavinderivat (Fl $^-$) als Ladungsdonor führt zur Spaltung des T-T-Dimers (T-T).

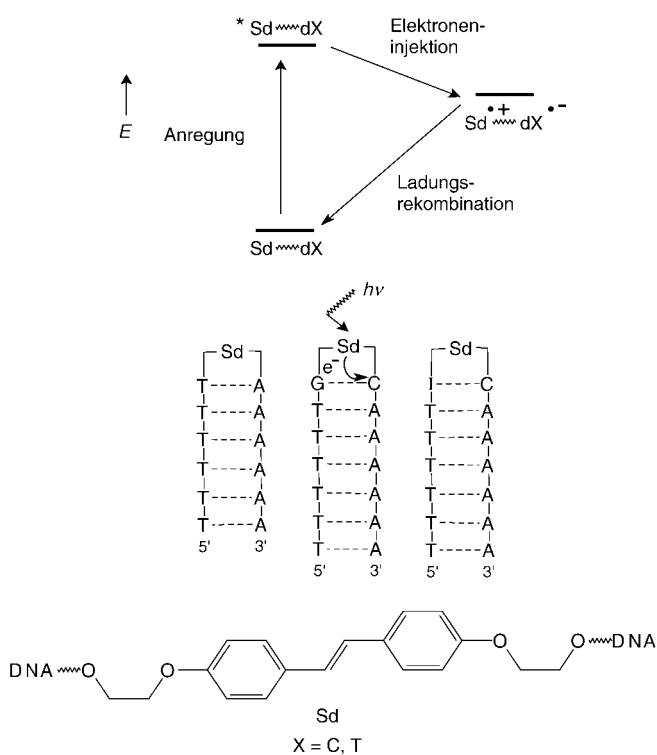


Abbildung 4. Elektroneninjektion in DNA-Haarnadeln, die mit einem Stilbendieetherderivat (Sd) als Kopfgruppe versehen wurden, das als Elektronendonator fungiert.

paar hat ein stärkeres Wasserstoffbrücken-Netzwerk als das C-I-Basenpaar. Deswegen verläuft die beobachtete Elektroneninjektion in ein C-G-Basenpaar langsamer ($3.3 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$) als die in ein C-I-Basenpaar ($1.4 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$). Dies deutet auf einen kleinen Unterschied des Reduktionspotentials von C hin, der aus den unterschiedlichen Wasserstoffbrückenbindungen resultiert.

Der lokal angeregte Zustand von Pyren (Py^*) kann als Vorstufe eines Elektronentransfers auf die DNA-Basen dienen, wenn die Energetik der Reaktion stimmt. Dabei wird ein ladungsgesetzter Zustand erzeugt, der aus dem Pyrenyl-Radikalkation Py^+ und dem entsprechenden Basen-Radikalanion besteht. Basierend auf dem Redoxpotential (1.5 V gegen NHE) und der Singulettenergie von Pyren ($E_{00} = 3.25 \text{ eV}$)^[35] wird die Triebkraft des Elektronentransfers zu -0.5 bis -0.6 eV bestimmt, wenn man die berichteten Reduktionspotentiale von -1.1 und -1.2 V für U bzw. C^[18] in die Rechnung mit einbezieht. Kürzlich berichteten Fiebig et al. über zeitaufgelöste Untersuchungen der Reduktion von T und C durch photoangeregtes 2-Aminopurin, die Reduktionspotentiale von -1.8 und -1.9 V (gegen NHE) für die nichtprotonierten Paare C⁻/C bzw. T⁻/T ergaben.^[36] Diese deutliche pH-Abhängigkeit der elektrochemischen Redoxpotentiale weist darauf hin, dass der Protonentransfer den reduktiven Elektronentransport in der DNA wesentlich beeinflusst und daher als protonengekoppelter Prozess verstanden werden muss.

Netzel et al.^[37] verwendeten bei der Untersuchung der Löscheffizienzen der photoangeregten Pyren-Emission in

Abhängigkeit von den benachbarten Nucleobasen Pyrenmarkierte Oligonucleotide und erhielten dabei folgenden Trend: A < G < T < C. Durch Fluoreszenzspektroskopie und Messungen der Lebensdauer konnte ein Elektronentransfer nachgewiesen werden, der von Py^* auf die Pyrimidinbasen C oder T stattfindet. Diese Zuordnung des Ladungstransfers wurde zuvor durch Nanosekunden-zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzlebensdauer von 5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin (Py-dU) überprüft.^[38]

Kürzlich wurden von unserer Gruppe Py-dU und 5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxycytidin (Py-dC) über Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktionen hergestellt^[39] und die Eigenschaften und die Dynamik des intramolekularen Elektronentransfers in Py-dU und Py-dC durch stationäre Fluoreszenzspektroskopie und Femtosekunden-zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie in Wasser bei unterschiedlichen pH-Werten charakterisiert (Abbildung 5).^[40] Der Vergleich von Py-dU mit Py-dC als Nucleosid-Modelle für den Elektronentransfer in der DNA zeigt, dass ein kleiner Energieunterschied zwischen U⁻ und C⁻ existiert, was in Einklang ist mit den in den vorherigen Abschnitten vorgestellten Rechnungen

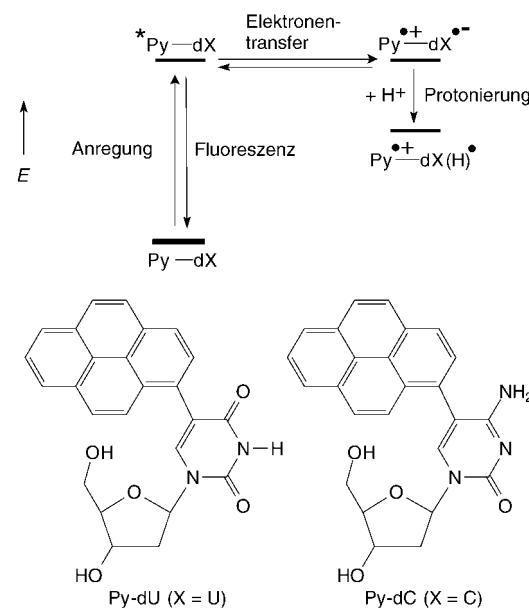


Abbildung 5. Pyren-modifizierte Nucleoside als Modelle für spektroskopische Untersuchungen zum Elektronentransport in der DNA. Wenn Py-dX (X = U oder C) bei 340 nm angeregt wird, findet ein intramolekularer Elektronentransfer unter Bildung der ladungsgesetzten Spezies $\text{Py}^+ \cdot \text{dX}^-$ statt. Durch Protonierung von $\text{Py}^+ \cdot \text{dX}^-$ entsteht das Diradikal $\text{Py}^+ \cdot \text{dX}(\text{H})^{\bullet}$.

und Experimenten. Es ist wichtig hervorzuheben, dass wir einen Unterschied der Basizität der erzeugten Pyrimidin-Radikalanionen nachgewiesen haben, der – wie zuvor von Steenken vorgeschlagen^[21] – für das Verständnis der Wanderung von Elektronen in der DNA von Bedeutung sein könnte. Das nichtprotonierte Radikalanion von C (C⁻) konnte in wässrigen Lösungen nicht beobachtet werden. Obwohl die Situation in Wasser, in dem mehrere Wasserstoffbrückenbindungsarten strukturell und energetisch begünstigt sein kön-

nen, nicht direkt mit der bei der DNA verglichen werden kann, weisen unsere Resultate darauf hin, dass die Protonierung von C^+ durch die komplementäre DNA-Base G oder die umgebenden Wassermoleküle schnell stattfindet. Nach den zeitaufgelösten Daten bei $pH = 5$ sind die Zeiten für den intramolekularen Elektronentransfer und die Protonierung in Py-dU weniger als 4.7 und in Py-dC weniger als 40 ps. Während dieser Zeit kann sich das Wasserstoffbrücken-Netzwerk dahingehend verändern, dass Spin und Ladung des Überschusselektrons separiert werden. Obwohl solche Prozesse prinzipiell mikroskopisch reversibel ablaufen, können sie trotzdem den Elektronentransport in der DNA limitieren oder gar beenden. Wir nehmen daher an, dass C^+ keine bedeutende Rolle als intermediärer Ladungsträger spielt. Im Gegensatz dazu kann U^- oder T^- als Ladungsträger beim Elektronen-Hopping in der DNA fungieren, da eine Protonierung dieser Radikal-anionen nicht stattfindet.

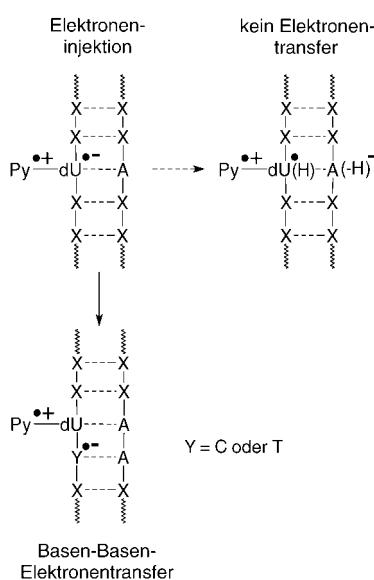


Abbildung 6. Elektroneninjektion in Pyren-modifizierte DNA-Duplexe. Die Anregung der Py-dU-Gruppe führt durch Ladungsseparation zum Diradikal Py^+-dU^- , was der Injektion eines Überschusselektrons in die DNA entspricht. Ein effizienter Elektronentransport findet nur auf benachbarte Pyrimidine statt (C oder T).

Mit dem Nucleosid Py-dU stellten wir eine Serie von Pyren-modifizierten Duplexen über die Phosphoramidit-Methode her.^[41] Die kovalent angehängte Pyrengruppe befindet sich außerhalb des DNA-Basenstapels. Der durch die Photoanregung ausgelöste intramolekulare Elektronentransfer in der Py-dU-Einheit repräsentiert die Injektion eines zusätzlichen Elektrons in den DNA-Basenstapel. Der entscheidende Unterschied der hergestellten DNA-Duplexe bestand in der Base, die der Py-dU-Gruppe direkt benachbart ist. Im Hinblick auf den Trend der Reduzierbarkeit der Nucleobasen^[14,18] erwarteten wir, dass U^- , das durch die Photoanregung gebildet wurde, nur benachbarte Pyrimidinbasen C oder T reduzieren sollte (Abbildung 6). In Einklang mit dieser Annahme beobachteten wir eine deutliche Lösung der Py*-Emission nur in denjenigen Duplexen, bei

denen ein T oder C der Py-dU-Gruppe benachbart war. Diese Beobachtung spricht für einen Elektronentransportprozess von der Py-dU-Gruppe auf die benachbarte Base, was durch Femtosekunden-zeitaufgelöste Pump-Probe-Laserspektroskopie-Messungen gestützt wird.

3. Zusammenfassung und Ausblick

Sowohl aus den γ -Puls-Radiolyse-Studien als auch aus den Arbeiten mit den verschiedenen photochemischen DNA-Systemen können die folgenden wichtigen Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Unterhalb von 77 K erfolgt der Transfer von Überschuselektronen durch den Superaustausch-Mechanismus mit einer starken Distanzabhängigkeit ($\beta = 0.9 \text{ \AA}^{-1}$), die der des oxidativen Lochtransfers ähnlich ist ($\beta = 0.7 \text{ \AA}^{-1}$).
2. Oberhalb von 170 K erfolgt die Wanderung von Elektronen in der DNA durch einen thermisch aktivierten Hopping-Prozess.
3. Beide Pyrimidin-Radikal-anionen, T^- und C^- , können als intermediäre Ladungsträger fungieren. Das Elektronen-Hopping über T^- erscheint etwas günstiger, weil das Reduktionspotential von T in Doppelhelix-B-DNA etwas niedriger ist als das von C.
4. Der Protonentransfer beeinflusst den Elektronentransport in C-G-Basenpaaren, aber nicht in T-A-Basenpaaren. Dadurch vermindert die Protonierung von C^- in C-G-Basenpaaren zwar die Effizienz und die Geschwindigkeit des Elektronentransportes, unterbricht aber nicht die Wanderung von Elektronen in der DNA.

Trotz dieser Bemühungen um das Verständnis des reduktiven Elektronentransportes in der DNA fehlt derzeit noch ein wohldefiniertes D-Ac-DNA-System für zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen. Mit einem solchen System könnten die Geschwindigkeiten des Elektronentransportes direkt gemessen werden. Zukünftige Experimente sollten sich auf die folgenden Punkte richten: 1) eine noch detailliertere Untersuchung der Dynamik der Elektroneninjektionsprozesse, 2) die Abhängigkeit des Elektronentransportes von Abstand und Basensequenz, 3) die Geschwindigkeit des Elektronentransportes von Base zu Base im Hinblick auf das Hopping-Modell und 4) die chemische Reaktivität der Radikal-anionen in der DNA, bei der biologisch oder physiologisch relevante DNA-Schäden auftreten können.

Die Chemie des Elektronentransfers in der DNA hat auch ein großes Potenzial für biomedizinische Anwendungen, hauptsächlich in der DNA-Chiptechnologie. Die hohe Effizienz des Elektronentransportes durch die DNA und die starke Empfindlichkeit gegenüber strukturellen Störungen, wie sie beispielsweise durch Einzelbasenmutationen oder DNA-Schäden hervorgerufen werden, bieten einen neuen Zugang zu hochempfindlichen elektrochemischen Ausleseverfahren.^[42,43]

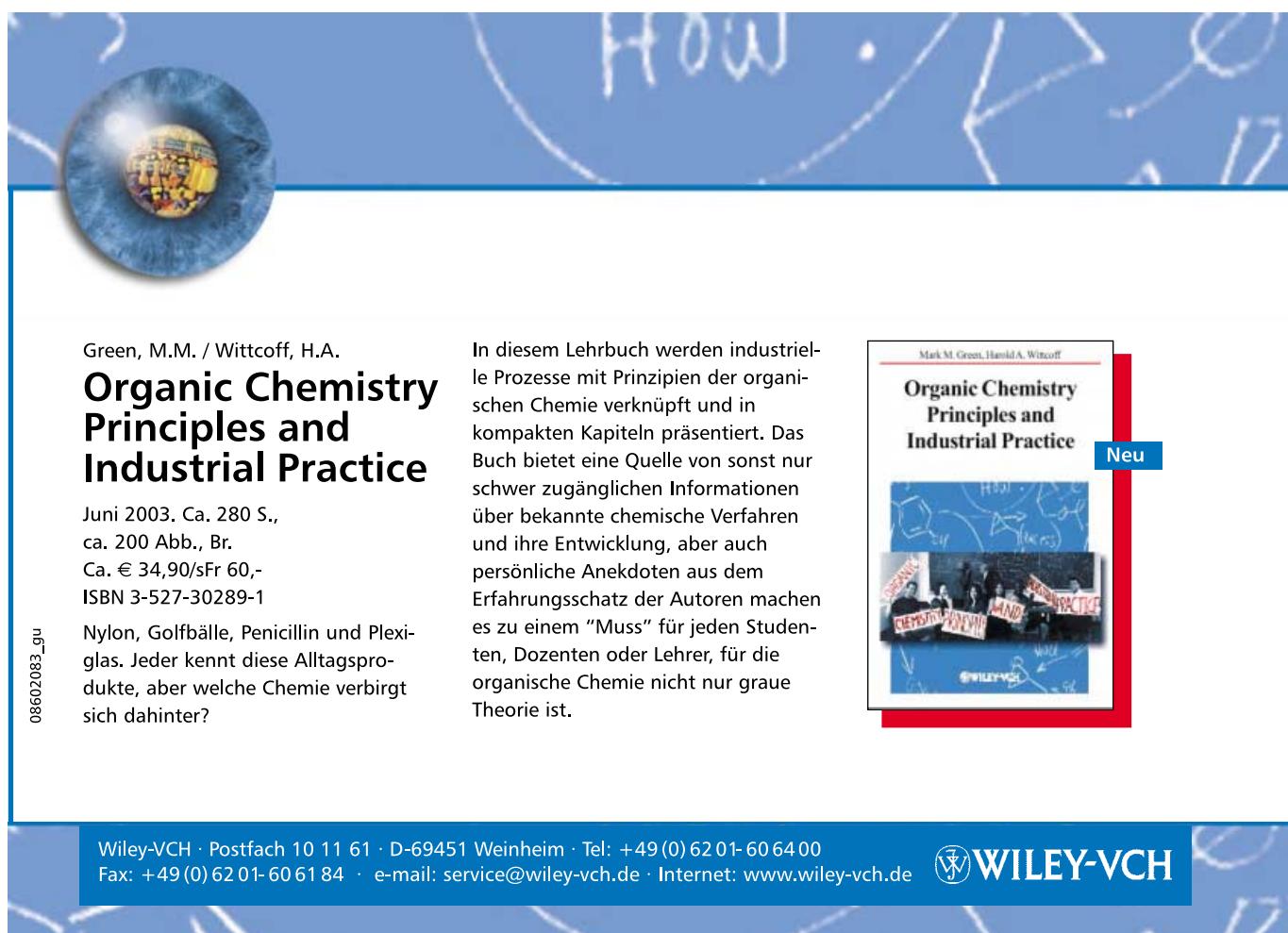
Unsere Arbeit wird durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, die Volkswagen-Stiftung und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Ich bin meinen Mitarbeitern Nicole Amann, Robert Huber, Peter Kaden, Elke Mayer, Stefan

Mitschke, Manuela Rist, Linda Valis und Clemens Wagner sehr dankbar für ihre experimentellen Arbeiten. Ich möchte mich auch bei Dr. Torsten Fiebig, Technische Universität München, sowie seinen Mitarbeitern für die erfolgreiche Kooperation und die wertvollen Diskussionen bedanken. Des Weiteren bin ich Prof. Horst Kessler, Technische Universität München, für die großzügige Unterstützung sehr dankbar.

Eingegangen am 14. Januar 2003 [M1629]

- [1] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411–415.
- [2] 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.
- [3] Neuester Übersichtsartikel: E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320–329.
- [4] a) S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17678–17682; b) N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 201–209; c) Y. A. Berlin, A. L. Burin, M. A. Ratner, *Superlattices Microstruct.* **2000**, *28*, 241–252.
- [5] a) P. O'Neill, E. M. Frieden, *Adv. Radiat. Biol.* **1993**, *17*, 53–120; b) B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171–1200; c) C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109–1151; d) D. Wang, D. A. Kreutzer, J. M. Essigmann, *Mutat. Res.* **1998**, *400*, 99–115; e) S. Kawanashi, Y. Hiraku, S. Oikawa, *Mutat. Res.* **2001**, *488*, 65–76.
- [6] Kürzlich erschienene Übersichtsartikel und Originalveröffentlichungen: a) C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 409–428; b) B. Giese, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 612–618; c) F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3485–3487; d) M. Bixon, J. Jortner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12556–12567; e) W. B. Davies, S. Hess, I. Naydnova, R. Haselberger, A. Ogronik, M. D. Newton, M. E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2422–2423; f) Y. A. Berlin, A. L. Burin, M. A. Ratner, *Chem. Phys.* **2002**, *275*, 61–74; g) U. Santhosh, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10986–10987; h) V. Shafirovich, A. Dourandin, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8431–8435; i) C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14052–14055.
- [7] M. W. Grinstaff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3845–3851; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3629–3635.
- [8] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759–12765.
- [9] a) A. Heller, *Faraday Discuss.* **2000**, *116*, 1–13; b) S. R. Rajski, B. A. Jackson, J. K. Barton, *Mutat. Res.* **2000**, *447*, 49–72; c) M. E. Núñez, G. Holmquist, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12465–12471; d) M. E. Núñez, K. T. Noyes, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 403–415.
- [10] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265–322.
- [11] a) M. E. Núñez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85–97; b) P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampkian, Y. Kan, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8353–8358.
- [12] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51–70.
- [13] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617–618.
- [14] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541–5553.
- [15] J. Jortner, M. Bixon, A. V. Voityuk, N. Rösch, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 7599–7606.
- [16] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, *406*, 51–53.
- [17] a) B. Giese, M. Spichty, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 195–198; b) B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318–320.
- [18] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701–4709.
- [19] a) S. S. Wesołowski, M. L. Leininger, P. N. Pentchev, H. F. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4023–4028; b) X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 1596–1603.
- [20] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *342*, 231–238.
- [21] S. Steenken, *Free Radical Res. Commun.* **1992**, *16*, 349–379.
- [22] a) Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1460–1467; b) A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1128–1136; c) Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10406–10411; d) Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6942–6949.
- [23] Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2755–2762.
- [24] X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10115–10123.
- [25] R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 4827–4831.
- [26] M. G. Debije, M. T. Milano, W. A. Bernhard, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2926–2930; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2752–2756.
- [27] a) J. R. Winkler, H. B. Gray, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 369–379; b) S. S. Isied, M. Y. Ogawa, J. F. Wishart, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 381–394; c) M. R. Wasielewski, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 435–461.
- [28] a) J.-S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76–82; b) A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2–9; c) D. B. Sanders, O. Wiest, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5127–5134; d) T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 491–498; e) H. Komori, R. Masui, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, T. Shibata, Y. Inoue, K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13560–13565.
- [29] a) A. Schwögl, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4082–4085; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3918–3920; b) C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögl, T. Carell, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1841–1844; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1763–1766; c) C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *3281*–3289.
- [30] A. Schwögl, T. Carell, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1415–1418.
- [31] M. P. Scannell, D. J. Fenick, S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1971–1977.
- [32] L. M. Kundu, L. T. Burgdorf, O. Kleiner, A. Batschauer, T. Carell, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1053–1060.
- [33] a) F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, R. L. Letsinger, R. Sanishvili, A. Joachimiak, V. Tereshko, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9905–9906; b) F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280–11281.
- [34] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14052–14055.
- [35] T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865–3877.
- [36] T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 781–788.
- [37] M. Manoharan, K. L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. Netzel, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17461–17472.
- [38] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119–9128.
- [39] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687–691.
- [40] a) N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3084–3087; *Angew. Chem. Int. Ed.*

- 2002, 41, 2978–2980; b) M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [41] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4877–4883.
- [42] a) S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4830–4837; b) E. M. Boon, D. M. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1096–1100; c) E. M. Boon, J. E. Salas, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 282–286.
- [43] G. Hartwich, D. J. Caruana, T. de Lumley-Woodyear, Y. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10803–10812.



08602083_gu

Green, M.M. / Wittcoff, H.A.
**Organic Chemistry
Principles and
Industrial Practice**

Juni 2003. Ca. 280 S.,
ca. 200 Abb., Br.
Ca. € 34,90/sFr 60,-
ISBN 3-527-30289-1

Nylon, Golfbälle, Penicillin und Plexiglas. Jeder kennt diese Alltagsprodukte, aber welche Chemie verbirgt sich dahinter?

In diesem Lehrbuch werden industrielle Prozesse mit Prinzipien der organischen Chemie verknüpft und in kompakten Kapiteln präsentiert. Das Buch bietet eine Quelle von sonst nur schwer zugänglichen Informationen über bekannte chemische Verfahren und ihre Entwicklung, aber auch persönliche Anekdoten aus dem Erfahrungsschatz der Autoren machen es zu einem "Muss" für jeden Studenten, Dozenten oder Lehrer, für die organische Chemie nicht nur graue Theorie ist.

Mark M. Green, Harold A. Wittcoff
**Organic Chemistry
Principles and
Industrial Practice**
Neu

Wiley-VCH · Postfach 10 11 61 · D-69451 Weinheim · Tel: +49 (0) 62 01-60 64 00
Fax: +49 (0) 62 01-60 61 84 · e-mail: service@wiley-vch.de · Internet: www.wiley-vch.de

WILEY-VCH