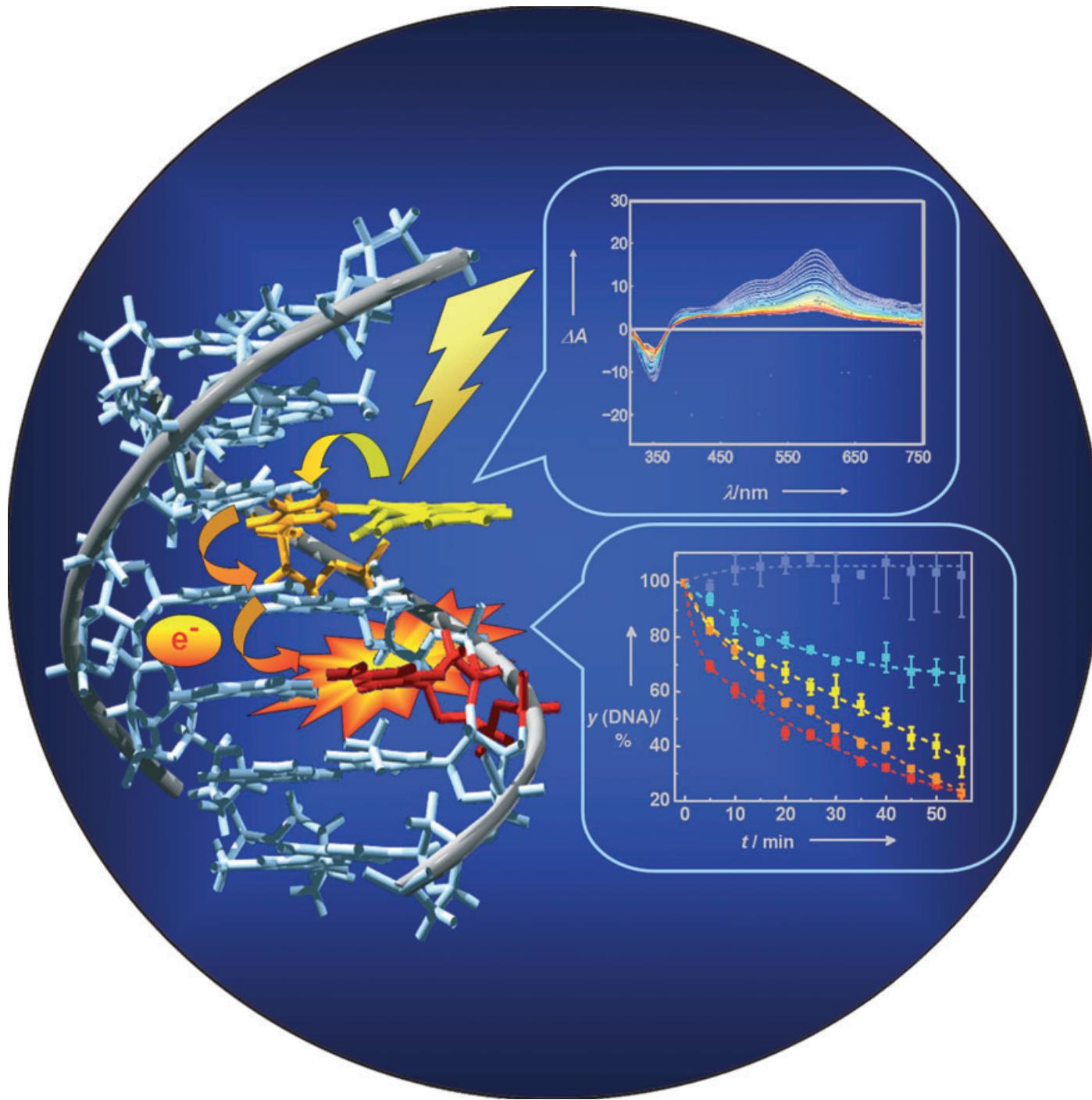


Zuschriften



Der Elektronentransfer (ET) in DNA wurde von H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig et al. mit Ultrakurzzeit-Spektroskopie und Strangbruchexperimenten untersucht. Wegen der vielfältigen Konformationen, in denen die DNA vorliegt, wurde dabei eine Verteilung von Reaktivitäten und ET-Geschwindigkeiten festgestellt. Mehr dazu erfahren Sie in der Zuschrift auf den folgenden Seiten.

Elektronenübertragung in DNA**Echtzeit-spektroskopische und chemische Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA****

Peter Kaden, Elke Mayer-Enhart, Anton Trifonov,
Torsten Fiebig* und Hans-Achim Wagenknecht*

Beim reduktiven Elektronentransfer (ET) durch die DNA^[1] initiiert die Injektion eines Überschusselektrons in die DNA einen Ladungstransfer, der sich komplementär zu dem sehr intensiv studierten oxidativen Lochtransfer verhält.^[1,2] Kürzlich erschienene Arbeiten^[1,3–11] lassen es möglich erscheinen, dass die reduktive Art des Ladungstransfers Anwendung bei neuartigen Nanodrähten finden wird, die auf DNA oder DNA-inspirierten Architekturen basieren.

Bis vor fünf Jahren wurden die meisten Informationen zu Überschusselektronen in der DNA durch γ -Puls-Radiolyse-Studien erhalten;^[3] demgegenüber konzentrieren sich die kürzlich publizierten photochemischen Ansätze auf die Untersuchung des ET mithilfe chemischer Methoden:

- 1) Carell et al. zeigten, dass die Menge der T-T-Dimer-Spaltung nur schwach von der Distanz zum Elektronendonator abhängt.^[4]
- 2) Giese et al. demonstrierten, dass ein einzelnes injiziertes Elektron mehr als nur ein einzelnes T-T-Dimer spalten kann.^[5]
- 3) Rokita et al. wiesen eine deutliche Abhängigkeit der ET-Effizienz von der Basensequenz nach.^[6]

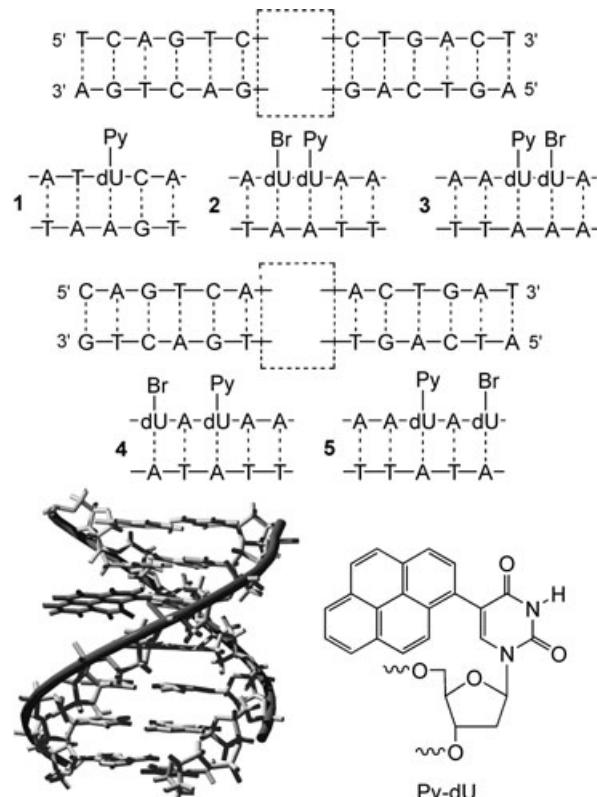
Bis heute haben sich nur Lewis et al.^[7] und unsere Arbeitsgruppen^[8] auf die Dynamik der ET-Prozesse konzentriert. In allen entsprechenden Arbeiten^[1,3–8] wurde ein thermisch aktivierter Elektronen-Hopping-Mechanismus vorgeschlagen, bei dem C⁺ und T⁺ als intermediäre Ladungsträger auftreten.^[9] Wir konnten allerdings zeigen, dass der Protonentransfer den Elektronentransfer beeinflusst, was

darauf schließen lässt, dass T⁺ gegenüber C⁺ eine größere Bedeutung als Elektronenüberträger hat.^[10,11]

Während der letzten Jahre wurde offensichtlich, dass ET-Phänomene in der DNA nur verstanden werden können, wenn dabei die Vielfalt der konformativen Zustände der DNA berücksichtigt wird:^[12] Da die ET-Geschwindigkeiten stark von der mikroskopischen Umgebung abhängen, beobachtet man möglicherweise nicht einzelne Geschwindigkeitskonstanten für den DNA-vermittelten ET, sondern vielmehr eine Verteilung von Geschwindigkeiten.

Hier stellen wir Untersuchungen zum Mechanismus der Elektroneninjektion und der nachfolgenden Elektronenverschiebung vor, durchgeführt mithilfe einer Kombination von zeitaufgelösten Ultrakurzzeit-spektroskopischen Messungen und chemisch analysierten Strangbruchexperimenten, bei denen 5-Brom-2'-desoxyuridin (Br-dU) als Elektronenacceptor eingesetzt wurde.^[13] Als Elektronendonator fungierte Pyren-1-yl-2'-desoxyuridin (Py-dU),^[14] da das photoangeregte Py* die Reduktion von C und T ermöglicht.^[15] Über unsere bereits veröffentlichten Synthesewege stellen wir die Py-dU-modifizierten DNA-Duplexe **1–5** her (Schema 1).^[8,16] DNA **1** ist ein Kontrollduplex, der nur den Py-dU-Chromophor enthält und dessen Nachbarn C und T als Acceptoren für die nachfolgende Elektronenverschiebung von dU⁺ fungieren. Die DNA-Duplexe **2–5** enthalten zusätzlich die Br-dU-Gruppe, die entweder in Nachbarstellung zu Py-dU steht oder durch ein A-T-Basenpaar von diesem separiert ist.

Wir haben mithilfe Femtosekunden-zeitaufgelöster Pump-Probe-Laserspektroskopie-Messungen^[17] die Dynamik



Schema 1. Pyren-modifizierte DNA-Duplexe **1–5** und Kraftfeld-minimierte (AMBER-)Struktur eines Py-dU-modifizierten DNA-Duplexes.

[*] P. Kaden, E. Mayer-Enhart, Dr. H.-A. Wagenknecht

Department Chemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-mail: wagenknecht@ch.tum.de

A. Trifonov, Prof. Dr. T. Fiebig
Eugene F. Merkert Chemistry Center
Boston College
Chestnut Hill, MA 02467 (USA)
Fax: (+1) 617-552-2201
E-mail: fiebig@bc.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Volkswagen-Stiftung, dem Boston College und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. P.K., E.M.-E. und H.-A.W. sind Prof. Horst Kessler, Technische Universität München, dankbar für die großzügige Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

der frühen Prozesse in DNA **1–5** in einem breiten spektralen Fenster untersucht. Nach der Anregung bei 350 nm wird ein Pyren-ähnlicher angeregter Zustand (Py-dU^*) gebildet, der über einen ET zum Kontaktionenpaar (CIP) $\text{Py}^+ \cdot \text{dU}^-$ führt. Da der letztgenannte Prozess formal der Injektion eines Elektrons in den Basenstapel entspricht, kann die Injektionsgeschwindigkeit anhand des Zerfalls der transienten Absorptionsbande von (Py-dU^*) bei 385 nm beobachtet werden.^[10b] Im CIP-Zustand sind das Radikalkation (Py^+) und das Radikal-anion (dU^-) wegen der direkten Überlappung der π -Orbitale elektronisch gekoppelt und weisen starke Absorptionsbanden zwischen 450 und 750 nm auf. Abbildung 1

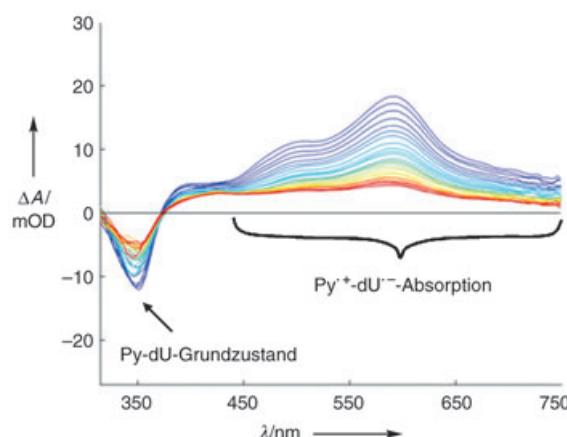


Abbildung 1. Zeitaufgelöste Veränderung des Pump-Probe-Spektrums von DNA **1** (350 μM) in Puffer (10 mM Na-P, 250 mM NaCl, pH 7) im Zeitbereich von 150 ps (blau) bis 1500 ps (rot) nach der Anregung.

zeigt repräsentativ den zeitaufgelösten Zerfall der DNA **1** im Zeitbereich von 150–1500 ps nach der Anregung. Während die Anstiegszeiten der transienten Absorptionssignale in diesem spektralen Bereich für alle fünf Duplexe bei 2–3 ps liegen, variieren die Zerfallszeiten von 100 bis 600 ps in Abhängigkeit von der untersuchten Wellenlänge.^[18] Diese große Verteilung der Lebenszeiten des CIP-Zustandes ist im Einklang mit den vielfältigen konformativen Zuständen in einem deutlich ungeordneten Medium wie der DNA.^[12c]

Um festzustellen, ob ausgehend vom CIP-Zustand der Transfer des Elektrons in den Basenstapel mit der Ladungsrekombination konkurriert, wurde die Dynamik der Wiederbevölkerung des Py-dU-Grundzustandes gemessen. Die beobachtete Dynamik ist in allen Duplexen **1–5** sehr ähnlich. Wie repräsentativ für DNA **3** dargestellt (Abbildung 2), korreliert die Dynamik der Rückbildung des Grundzustandes (530 ps (64 %), >2 ns (36 %) bei 364 nm) nicht mit der Lebenszeit des elektroneninjizierten CIP-Zustandes (250 ps (55 %), >2 ns (45 %); Anstiegszeit 3 ps bei 485 nm). Das lässt darauf schließen, dass ein zusätzlicher Zerfallsweg des CIP-Zustandes (der sich von der Ladungsrekombination unterscheidet!) existieren muss, d.h., nur ein Teil des gebildeten CIP-Zustandes kehrt in den Grundzustand zurück, und der Rest reagiert über einen anderen Weg.

Zur Identifizierung dieses alternativen, vielstufigen DNA-vermittelten ET-Prozesses haben wir sein Reaktions-

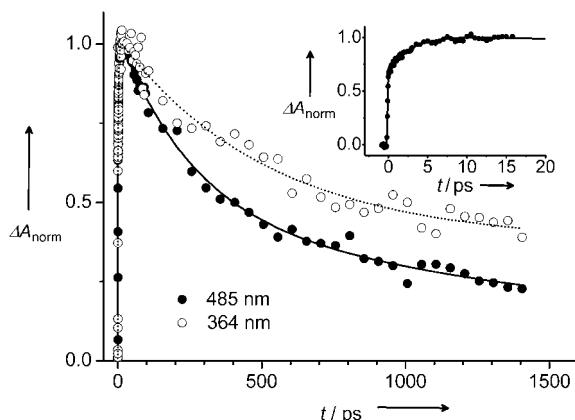
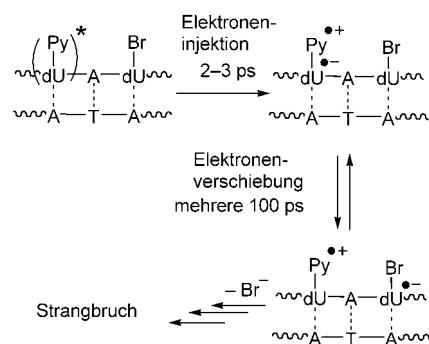


Abbildung 2. Transiente Pump-Probe-Spektren von DNA **3** (350 μM) in Puffer (10 mM Na-P, 250 mM NaCl, pH 7) bei zwei untersuchten Wellenlängen. Das Signal der Rückbildung des Grundzustandes (○, 364 nm) ist negativ, wurde aber invertiert, um es visuell der (positiven) transienten Absorption des CIP-Zustandes anzugeleichen (●, 485 nm). Der Einschub zeigt den Anstieg der transienten Absorption bei 485 nm innerhalb von 3 ps, der die Geschwindigkeit der Elektroneninjektion wiedergibt.

produkt chemisch untersucht. Es ist bekannt, dass sich Br-dU nach der Ein-Elektronen-Reduktion chemisch verändert, was mithilfe des Piperidin-induzierten DNA-Strangbruchs analysiert werden kann.^[13] Diese Reaktion wurde bereits angewendet, um die Effizienz des DNA-vermittelten ET-Prozesses zu quantifizieren.^[6,11] Basierend auf den Reduktionspotentialen ist Br-dU kein deutlich besserer Elektronenacceptor als die natürlichen Basen C oder T,^[19] weshalb sehr ähnliche Lebenszeiten des CIP-Zustandes der DNAs **1–3**, in denen T oder Br-dU der Py-dU-Gruppe direkt benachbart ist, gemessen wurden – d.h., Br-dU ist eine *kinetische* Elektronenfalle (Schema 2).



Schema 2. Elektroneninjektion und Elektronenverschiebung in Py-dU-/Br-dU-modifizierten Duplexen.

Beim Kontrollexperiment, der Bestrahlung von DNA **1**, wurde kein Strangbruch beobachtet – dies bedeutet, dass die Strangbrüche in den DNAs **2–5** der Gegenwart der Br-dU-Gruppe zuzuschreiben sind (Abbildung 3). Interessanterweise zeigen **2** und **3** eine deutlich höhere Strangbrucheffizienz als **4** und **5**. Bedenkt man, dass der Abbau des Oligonucleotids das Resultat des DNA-vermittelten ET-Prozesses ist, ist

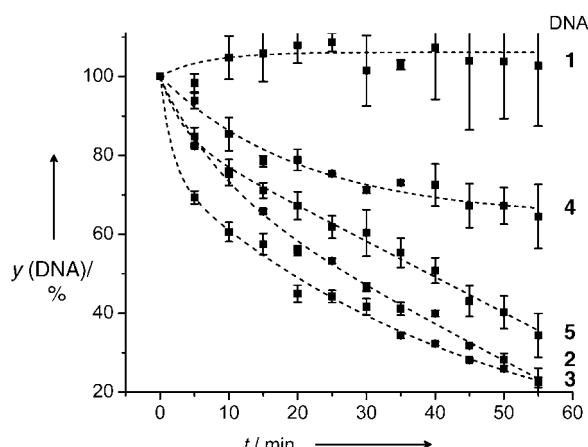


Abbildung 3. Analyse der Strangbruchexperimente mit den DNA-Duplexen 1–5 (4 μ M) in Puffer (10 mM Na-P_i, 250 mM NaCl, pH 7). Während der Bestrahlung wurden alle 5 min. Aliquots (30 μ L) entnommen, die danach mit Piperidin (3 μ L) bei erhöhter Temperatur (90 °C für 30 min) behandelt und schließlich durch HPLC analysiert wurden. Für die Bestrahlung wurde eine Xe-Lampe (75 W) mit einem Ausschlussfilter (> 305 nm) verwendet.

es bemerkenswert, dass die Effizienz des Elektronentransfers von Py-dU nach Br-dU bereits durch ein einzelnes dazwischen liegendes A-T-Basenpaar so deutlich herabgesetzt wird. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die konformative Kontrolle des ET in DNA mit größer werdender Distanz dominiert, was vollständig im Einklang mit der beobachteten Verteilung der CIP-Lebenszeiten ist.

Aus dieser kombinierten Studie ergeben sich einige wichtige Resultate:

- 1) DNA ist ein flexibles Medium mit vielfältigen konformativen Zuständen, die zu einem breiten Bereich von ET-Reaktivitäten und -Geschwindigkeitskonstanten führen.
- 2) Wie erwartet zeigt der Prozess der Elektroneninjektion in unseren funktionalisierten Duplexen nur kleinere Variabilitäten, hervorgerufen durch strukturelle Inhomogenitäten. Das liegt daran, dass die Elektroneninjektion zwischen den kovalent verknüpften Py- und dU-Gruppen erfolgt. Die nachfolgende Elektronenverschiebung ist dagegen viel empfindlicher gegen strukturelle Parameter; dementsprechend kann sie nur durch eine Verteilung von Geschwindigkeitskonstanten und Strangbrucheffizienzen charakterisiert werden.
- 3) Unsere Resultate zeigen, wie wichtig es ist, sowohl die frühen Prozesse als auch die Produktzustände zu untersuchen, um auf diese Weise eine umfassende mechanistische Beschreibung zu erhalten. Weil der DNA-vermittelte ET ein mehrstufiger Prozess ist, korrelieren die Geschwindigkeiten der Elektroneninjektion nicht notwendigerweise mit dem Strangabbau als chemischem Resultat des DNA-vermittelten ET.
- 4) Abschließend zeigen unsere Ergebnisse, dass die Elektronenverschiebung auf einer Zeitskala von mehreren hundert Picosekunden auftritt und dadurch mit der Ladungsrekombination in unseren Duplexen konkurriert. Es ist eine sinnvolle Annahme, dass die nachfolgenden Schritte der Elektronenwanderung schneller erfolgen,

weil die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen dem Überschusselektron und Py⁺ mit der Distanz deutlich abnehmen. Aus diesem Grund entsprechen unsere Ergebnisse einer unteren Grenze für die Geschwindigkeit des reduktiven ET zwischen einzelnen Basen in der DNA.

Eingegangen am 12. November 2004,
veränderte Fassung am 11. Januar 2005

Stichwörter: DNA · Elektronentransfer · Laserspektroskopie · Pyren

- [1] Übersicht: H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2558–2565; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2454–2460.
- [2] Übersichten: *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236 und 237 (gesamte Ausgaben).
- [3] Übersicht: Z. Cai, M. D. Sevilla, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 237, 103–128.
- [4] C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1878–1880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1842–1844.
- [5] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1884–1887; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848–1851.
- [6] Aktuellste Veröffentlichung: T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1875–1878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1839–1842.
- [7] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280–11281.
- [8] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4877–4883.
- [9] Dies wurde zuerst vorgeschlagen in: B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51–70.
- [10] a) R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, 1878–1879; b) M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 706–712.
- [11] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871–1876.
- [12] a) C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. R. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6014–6019; b) Y. A. Berlin, A. L. Burin, L. D. A. Siebbeles, M. A. Ratner, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 5666–5678; c) T. Renger, R. A. Marcus, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 8404–8419; d) M. A. O'Neill, H. C. Becker, C. Z. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6076–6080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5896–5900; e) M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11471–11483; f) M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13234–13235.
- [13] a) E. Rivera, R. H. Schuler, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 3966–3971; b) H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6720–6721; c) G. P. Cook, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10025–10030; d) R. Tashiro, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15282–15283.
- [14] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119–9128.
- [15] $E(\text{Py}^+/\text{Py}) = 1.5 \text{ V}$ (gegen NHE) und $E_{\text{red}} = 3.25 \text{ eV}$; T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865–3877 liefert $E(\text{Py}^+/\text{Py}^*) = 1.85 \text{ V}$; für die Reduktionspotentiale von C und T siehe: S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701–4709.
- [16] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335–2340.

- [17] Der Laseraufbau wurde an anderer Stelle beschrieben: M. Raytchev, E. Pandurski, I. Buchvarov, C. Modrakowski, T. Fiebig, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 4592–4600.
- [18] Das Verschwinden des transienten Absorptionssignals von Py⁺dU⁻ zwischen 440 und 600 nm kann adäquat mithilfe biexponentieller Anpassungsfunktionen beschrieben werden. Zusätzlich zum Zerfall im Picosekunden-Bereich tritt auch ein langsamerer Zerfall auf (ca. 3 ns), der 20–40 % des Gesamtzerfalls ausmacht (in Abhängigkeit der untersuchten Wellenlänge).
- [19] Das Reduktionspotential ist nur 0.06 eV niedriger als das von T, siehe Lit. [18] in Lit. [7]: V. P. Kadysh, Y. L. Kaminskii, L. N. Rumyantseva, V. L. Efimova, J. P. Strandish, *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1992**, *10*, 1404–1408.