

einem Hopping-Mechanismus folgt, in dem die Pyrimidinbasen dC und dT als „Trittsteine“ fungieren.^[17]

Zwar ist das Hopping negativer Ladungen durch DNA ein allgemein akzeptiertes Modell, allerdings wurden sehr widersprüchliche Daten zur Sequenzabhängigkeit dieses Prozesses erhalten. Untersuchungen des Ladungstransfers in modifizierter DNA, die entweder Arylamine,^[14–16] Pyrene oder Phenothiazine^[18, 19] als Elektronendonoren und 5-Bromuracil als Elektronenacceptor enthielt, ergaben, dass der Elektronentransfer im Strang durch GC-Basenpaare deutlich weniger effizient verläuft als durch AT-Basenpaare. In unseren Studien mit einem reduzierten Flavin als Elektronendonator und einem Thymindimer als Elektronenacceptor – einem System, das die Reparatur UV-lichtinduzierter Thymindimerschäden durch Photolyasen nachahmt^[20, 21] – zeigte sich dagegen keine Sequenzabhängigkeit.^[13] Die reduktive Öffnung von Thymindimeren läuft vermutlich mit einer Geschwindigkeit von nur ca. 10^6 s^{-1} ab,^[22] wogegen die Geschwindigkeit des Elektronen-Hoppings zwischen 10^8 und 10^9 s^{-1} liegen dürfte – daraus folgerten wir, dass die Dimeröffnung hier der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein könnte. Anhand von DNA-Duplexen, die zwei Thymindimere nacheinander enthielten, konnten wir vor kurzem nachweisen, dass das Elektron in der Lage ist, über ein Dimer zu springen, ohne es zu öffnen. Dies stützt die Annahme, dass die Dimeröffnung langsamer als das Hopping ist.^[23]

Inwieweit beeinflusst die Geschwindigkeit der Reaktion des Acceptors mit dem Überschusselektron die beobachtete Sequenzabhängigkeit des Ladungstransports in DNA? Zur Beantwortung dieser Frage haben wir 15 DNA-Haarnadeln **1–5** hergestellt (Abbildung 1). Diese enthalten den lichtabhängigen Flavin-Elektroneninjektor **6** ($E_{\text{flav-red}}^* = -2.6 \text{ V}$ gegen NWE)^[24] in der Schleife der Haarnadel und einen der drei Elektronenacceptoren (5-Bromuracil^[14–16] = Serie **a**, 8-Bromadenin = Serie **b**, 8-Bromguanin^[25] = Serie **c**) in der gepaarten Region der Haarnadel; der Donor-Acceptor-Abstand beträgt ca. 17.5 Å.

Die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion des solvatisierten Elektrons mit den drei Acceptoren (BrdA, BrdG und BrdU) sind bekannt und liegen allesamt im diffusionskontrollierten Bereich^[26] mit ungefähr $1 \times 10^{10} - 2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^[27–29] Dem primären Reduktionsschritt folgt die Freisetzung von Br^- .^[27, 30–32] Zwar sind die Redoxpotentiale der Br-substituierten Basen nicht alle bekannt, wir können jedoch basierend auf den Redoxpotentialen der unmodifizierten Basen eine Abstufung $\text{BrdU} > \text{BrdA} \geq \text{BrdG}$ annehmen, wobei BrdU am leichtesten zu reduzieren ist, gefolgt von BrdA und BrdG.^[33] Alle in Abbildung 1 dargestellten DNA-Haarnadeln haben Schmelzpunkte über Raumtemperatur. Nach Cirkulardichroismus(CD)-Messungen der Haarnadeln **1–5** liegt in allen Fällen eine B-DNA-Konformation vor. Alle DNA-Haarnadeln wurden nach Standardvorschriften für die automatisierte Festphasensynthese (Phosphoramiditmethode) synthetisiert und gereinigt.

In vorangegangenen Studien hatten wir Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) zur Reduktion des Flavins verwendet.^[10–12] Rokita^[15] und wir beobachteten jedoch vor kurzem, dass Dithionit nach einer gewissen Zeitspanne zu einer Hemmung des Elektronentransfers führt. Daher setzten wir in der hier

Elektronentransfer

DOI: 10.1002/ange.200502551

Komplexe Sequenzabhängigkeit beim Transport von Überschusselektronen durch DNA mit verschiedenen starken Acceptoren**

Antonio Manetto, Sascha Breeger,
Chrysostomos Chatgilialoglu und Thomas Carell*

Zahlreiche Untersuchungen zum Lochtransfer über weite Entfernungen in DNA-Doppelsträngen haben detaillierte Einblicke in die Abstands- und Sequenzabhängigkeit des Ladungstransports geliefert.^[1–4] Im Unterschied zur Fülle an Informationen, die zum Lochtransfer zur Verfügung stehen,^[5–9] ist nur wenig über den Transport von Überschusselektronen durch DNA bekannt, bei dem sich nicht ein Kation, sondern ein Anion durch den Duplex bewegt. Sowohl wir^[10–13] als auch andere Arbeitsgruppen^[14–19] konnten zeigen, dass der Transfer von Überschusselektronen durch DNA

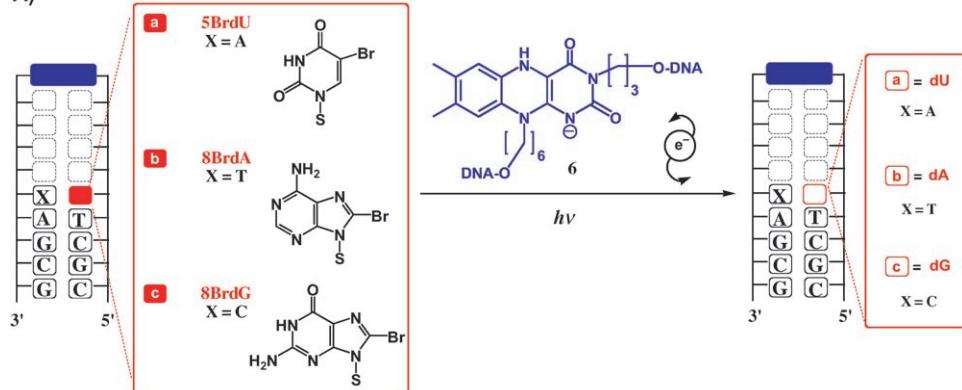
[*] Dipl.-Chem. A. Manetto, Dipl.-Chem. S. Breeger, Prof. Dr. T. Carell

Department Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2189-77756
E-mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

Dr. C. Chatgilialoglu
ISOF
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Via P. Gobetti 101, 40129 Bologna (Italien)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Volkswagen-Stiftung und dem „EU Marie Curie training and mobility program“, Projekt-Nr. MRTN-CT-2003-505086 [CLUSTOXDNA] für finanzielle Unterstützung. S.B. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Doktorandenstipendium.

A)



B)

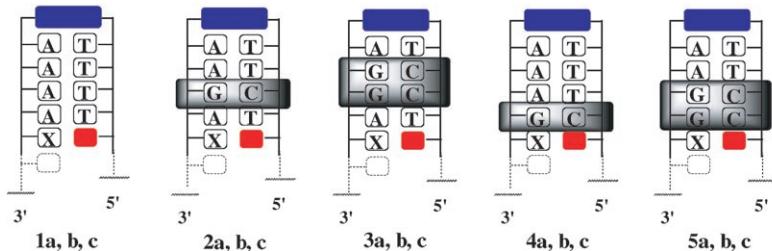


Abbildung 1. DNA-Haarnadelmodelle (1–5) für Studien des Überschusselektronentransfers durch DNA in Abhängigkeit von der Acceptorstärke. A) ■: reduziertes und deprotoniertes Flavin 6; ■: Elektronenacceptoren (a = 5BrdU, b = 8BrdA, c = 8BrdG); □: debromierte Acceptor (a = dU, b = dA, c = dG); X: Gegenbasen zum Acceptor. B) Sequenzen der DNA-Haarnadeln 1–5 für die drei verwendeten Acceptor (a–c). ■: Flavin 6; ■: Elektronenacceptor; ■■: GC-Basenpaare.

vorgestellten Untersuchung eine stabilere, EDTA-basierte Photoreduktion ein.^[34] Die Anfangsgeschwindigkeiten bei Verwendung von Dithionit und EDTA waren sehr ähnlich, mit der EDTA-Methode konnten wir allerdings ein stabiles, voll reduziertes System mehr als eine Stunde lang aufrecht erhalten.

In einem typischen Belichtungsexperiment wurden 0.02 M EDTA zu einer Lösung von DNA gegeben ($c_{DNA} = 20 \mu\text{M}$, 0.01 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), pH 7.4, 0.15 M NaCl) und in Fluoreszenzküvetten unter anaeroben Bedingungen für die Photoreduktion von Flavin eine Minute lang mit weißem Licht bestrahlt. (Der Reduktionsvorgang wurde fluoreszenzspektroskopisch verfolgt.) Nach der Photoreduktion wurden die Proben mit einer 1000-W-Xe-Lampe, ausgestattet mit einem gekühlten 340-nm-Cut-off-Filter, belichtet. Zur Analyse wurden nach definierten Zeitintervallen 10- μL -Proben entnommen, für 30 Minuten reoxidiert, entsalzt und analysiert. Die Probenanalyse erfolgte mittels Kapillarelektrophorese. In der Vergangenheit wurde die Auswertung des Überschusselektronentransfers durch DNA mit 5-BrdU als Acceptor durchgeführt, indem man das Ausmaß der Spaltung der DNA-Stränge bestimmte, die vom neutralen dU-Radikal nach Erhitzen mit Piperidin verursacht worden war.^[35] Kapillarelektrophorese (CE) ermöglichte uns nun, direkt den Verlust des Br-Anions aus der 19-mer-Haarnadel nach Elektronenaufnahme zu detektieren. Als Beispiel für eine CE-Analyse ist in Abbildung 2 ein typisches Belichtungsexperiment mit der DNA-Haarnadel 1a dargestellt.

Die den Peaks entsprechenden Fraktionen wurden aufgefangen und durch MALDI-TOF-MS untersucht, um die Bildung der erwarteten Produktstränge zu belegen. Die Ausbeuten für alle 15 DNA-Haarnadeln sind in Abbildung 3 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Dieses zeigt die zeitabhängige Entstehung der debromierten 19-mer-Haarnadel als Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen. Wir vermuten, dass das zur Reduktion der gebildeten Nucleobasenradikale erforderliche H-Atom von EDTA übertragen wird, das in unserem Experiment in großer Menge vorhanden ist.

Zunächst untersuchten wir, inwie weit die Art des verwendeten Acceptors die Debromierungsgeschwindigkeit in der Haarnadel-Serie 1a–c beeinflusste, in der nur AT-Basenpaare zwischen Flavindonor und Acceptor liegen. Die Daten zeigen, dass die Debromierungsausbeuten sehr stark vom jeweiligen Elektronenacceptor abhängen. Die schnellste Debromierung wurde bei BrdU (1a) gefunden, gefolgt von BrdA (1b) und BrdG (1c), in Einklang mit der unterschiedlichen Reduzierbarkeit dieser Acceptor.

Dies zeigt, dass im Elektronentransferprozess, der die Schritte Ladungsinjektion, Elektronenwanderung und Re-

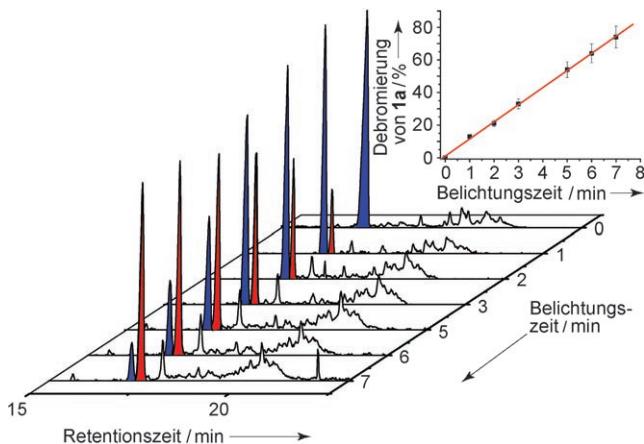


Abbildung 2. Zeitabhängige Debromierung des Acceptors in der Haarnadel 1a bei Belichtung. Der Ursprungsstrang und der debromierte Strang sind in Blau bzw. Rot hervorgehoben; ihre Identität wurde durch MALDI-MS-Analyse der gereinigten Proben bestätigt. Der Einsetz zeigt die Debromierungsgeschwindigkeit (10.5 min^{-1}), berechnet durch Integration der Peakflächen und lineare Näherung der Daten (Beckman-Coulter-P/ACE-MDQ-DNA-System, UV-Detektion bei 254 nm, 30 cm Quarzkapillare, gefüllt mit einem 6-proz. unvernetzten Polyacrylamidgel in 0.1 M Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8.4, elektrokinetische Injektion durch Anlegen von 10 kV für 2–10 s, Trennung der Proben bei 9 kV für 45 min).^[36]

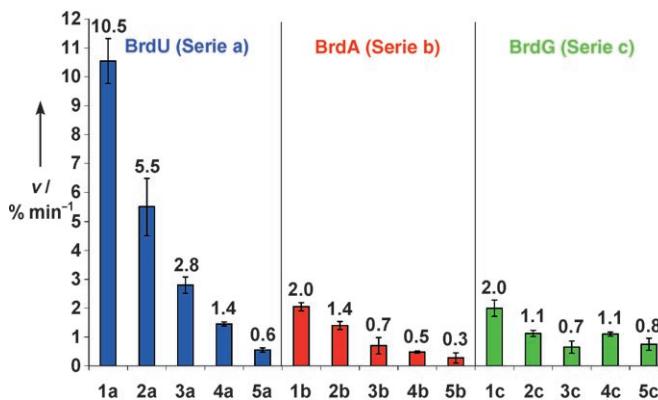


Abbildung 3. Debromierungsgeschwindigkeiten v für die DNA-Haarnadeln (1–5)a,b,c. Die berechneten Reparaturgeschwindigkeiten sind als Prozent Br-Anionenabspaltung pro Minute gegeben. Die Analyse der Daten erfolgte durch CE aus mindestens drei unabhängigen Messungen pro DNA-Strang. Zur Berechnung wurden nur die Daten bis 5 min Belichtungszeit verwendet, hier wurden die Peakflächen integriert und anschließend linear angenähert (für ein Beispiel siehe den Einschub in Abbildung 2).

duktion des Acceptors umfasst, in der Tat die Reaktion des Elektrons mit dem Acceptor der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein kann!

Anschließend untersuchten wir für die Serien **2a–c** und **3a–c**, wie das System reagiert, wenn wir ein oder zwei AT-Basenpaare durch GC-Basenpaare ersetzen. Im Falle der BrdU-Acceptorstränge **2a** und **3a** fällt die Ausbeute mit jedem GC-Basenpaar um 50 %. Für die schwächeren Purinacceptoren BrdA und BrdG hat der Austausch gegen GC-Basenpaare einen wesentlich kleineren Einfluss, was anzeigt, dass in diesen Systemen der Acceptor nicht stark genug ist, um deutliche Sequenzeffekte hervorzurufen. Unsere Erklärung ist, dass in diesen Fällen die Reduktion des Acceptors zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Noch wichtiger ist allerdings die Beobachtung, dass die Position des GC-Basenpaares relativ zum Acceptor wesentlich wichtiger als die Zahl der GC-Basenpaares ist. Bringen wir ein oder zwei GC-Paare in eine Position direkt über dem Acceptor, so registrieren wir eine dramatische Verringerung der Debromierungsausbeuten. In der BrdU-Serie (**a**) fällt die Ausbeute von $10.5\% \text{ min}^{-1}$ auf ca. $1.4\% \text{ min}^{-1}$ (**4a**) mit einem GC-Basenpaar und auf $0.6\% \text{ min}^{-1}$ mit zwei GC-Basenpaaren (**5a**). Derselbe Effekt konnte bei Verwendung von BrdA oder BrdG als Acceptor festgestellt werden, obwohl er hier wesentlich schwächer ausgeprägt war (Serien **b** und **c**). Auch dies ist in Übereinstimmung mit unserer Überlegung, dass im Falle der schwächeren Br-Purinacceptoren die Reduktion des Acceptors geschwindigkeitsbestimmend wird.

In dieser Studie wurde klar, dass ein GC-Basenpaar zwischen Donor und Acceptor die Effizienz des Transports von Überschusselektronen um einen Faktor von ca. zwei reduziert. Dieser Effekt ist allerdings nur bei Verwendung eines sehr effizienten Acceptors wie BrdU zu beobachten. Schwächere Acceptoren liefern Systeme, in denen die Reduktion des Acceptors geschwindigkeitsbestimmend wird. Noch wichtiger ist unsere Beobachtung, dass die Lage der GC-Basenpaares zwischen Donor und Acceptor eine größere Rolle

spielt als ihre Zahl. Dies ist nur schwer zu erklären, allerdings kann man hier mit einer Modulation der Redoxpotentiale des Acceptors argumentieren, ähnlich zu den Beobachtungen beim Lochtransfer, wo die Stapelung von Guaninen zu einer leichteren Oxidierbarkeit von Nucleobasen führt.

Eingegangen am 21. Juli 2005
Online veröffentlicht am 29. November 2005

Stichwörter: DNA-Schäden · Elektronentransfer · Nucleobasen · Redoxpotentiale

- [1] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10046–10055.
- [2] B. Giese, M. Spichty, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 195–198.
- [3] M. Bixon, J. Jortner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12556–12567.
- [4] M. B. J. Jortner, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759–12765.
- [5] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673–676.
- [6] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 159–170.
- [7] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 253–260.
- [8] 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.
- [9] M. Nunez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85–97.
- [10] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögl, T. Carell, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1841–1844; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1763–1766.
- [11] C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3281–3289.
- [12] C. Behrens, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 1632–1633.
- [13] S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1302–1303.
- [14] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480–11481.
- [15] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1875–1878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1839–1842.
- [16] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15552–15559.
- [17] H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2558–2565; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2454–2460.
- [18] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871–1876.
- [19] P. Kaden, E. Mayer-Enhart, A. Trifonov, T. Fiebing, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1662–1666; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1636–1639.
- [20] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203–2238.
- [21] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. M. Eker, T. Carell, L. O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789–1793.
- [22] S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8557–8558.
- [23] 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**, *14*, 1848–1851.
- [24] S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7313–7314.
- [25] T. Kimura, K. Kawai, S. Tojo, T. Majima, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1169–1173.
- [26] K. H. Schmidt, P. Han, D. M. Bartels, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 10530–10539.
- [27] C. Chatgilialoglu, M. Guerra, Q. G. Mulazzani, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3839–3848.
- [28] M. Iole, R. Bazzanini, C. Chatgilialoglu, Q. G. Mulazzani, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1900–1907.
- [29] L. K. Patterson, K. M. Bansal, *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 2392–2399.
- [30] E. Rivera, R. H. Schuler, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 3966–3971.

- [31] G. P. Cook, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10025–10030.
- [32] C. Chatgilialoglu, C. Caminal, M. Guerra, Q. G. Mulazzani, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6184–6186; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6030–6032.
- [33] Die Redoxpotentiale der Nucleobasen betragen $E_{\text{T}}^0 = 1.7 \text{ V}$, $E_{\text{C}}^0 = 1.6 \text{ V}$, $E_{\text{A}}^0 = 1.4 \text{ V}$, $E_{\text{G}}^0 = 1.3 \text{ V}$ gegen NWE [C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541–5553], die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion mit solvatisierten Elektronen (dT, dC, dA und dG) liegen im diffusionskontrollierten Bereich von $0.6\text{--}1.8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513–886]. BrdU ist um 40–50 mV leichter zu reduzieren als dT [S. T. Gaballah, G. Collier, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 12175–12181].
- [34] R. Traber, H. E. A. Kramer, P. Hemmerich, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1687–1693.
- [35] T. Chen, G. P. Cook, A. T. Koppisch, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3861–3866.
- [36] Die Debromierungsausbeuten sind im Falle von BrdA und BrdG 100%. Für BrdU werden bis zu 10% zusätzliche Abbauprodukte beobachtet.