

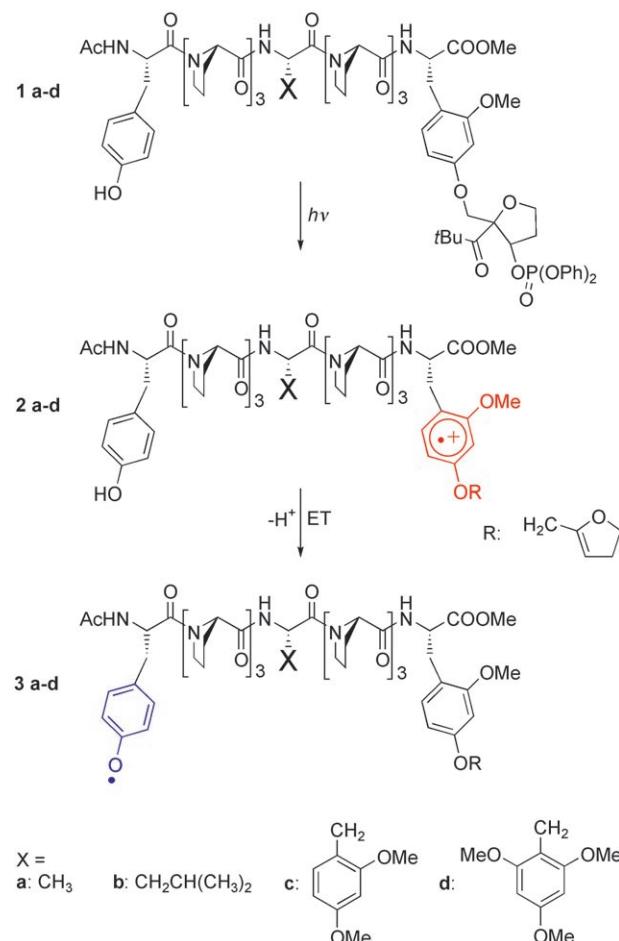
Der Einfluss von Aminosäureseitenketten auf weitreichenden Elektronentransfer in Peptiden: Elektronenhopping mit Zwischenstationen**

Meike Cordes, Angnieszka Kötgen, Christian Jasper, Olivier Jacques, Hassen Boudebous und Bernd Giese*

Professor Andreas Pfaltz zum 60. Geburtstag gewidmet

Elektronentransfer(ET)-Prozesse durch Proteine sind von entscheidender Bedeutung für eine Vielzahl von biologischen Reaktionen. Bahnbrechende Arbeiten von Gray und Winkler an Ru-modifizierten Proteinen, wie Cytochromen und Azurinen, haben gezeigt, dass weitreichender ET über Distanzen von mehr als 20 Å möglich ist.^[1,2] Beratan und Onuchic entwickelten ein Tunnel-Pfad-Modell, das den ET durch diese Proteine über einen einstufigen Superaustauschmechanismus erklärt.^[3] Nach diesem Mechanismus kann eine Gruppe von ET-Pfaden, bestehend aus σ -Bindungen, Wasserstoffbrücken und „Durch-den-Raum“-Kontakten, zum ET beitragen.^[4] Stubbe und Nocera hingegen erklären den weitreichenden ET durch das Enzym Ribonucleotid-Reduktase mit einem mehrstufigen Hopping-Mechanismus, in dessen Verlauf die Elektronen zwischen aromatischen Aminosäureseitenketten „hüpfen“.^[5,6] Diese Aminosäuren, auf denen die Ladung für kurze Zeit verweilt, agieren als Zwischenstationen (Relais) für den weitreichenden ET vom Elektronendonator zum Akzeptor.^[7] In Folgereaktionen dieser Art^[8] sollten die oxidierten Formen von Donor, Akzeptor und Relais während des ET-Prozesses gleichzeitig vorliegen. Wir haben ein Peptidmodell entwickelt, mit dem der gleichzeitige spektroskopische Nachweis aller oxidierten Zwischenstufen (oxidierte Aminosäureseitenketten) zum ersten Mal möglich war.

Um den Einfluss aromatischer Aminosäuren auf den weitreichenden Elektronentransfer (ET) in Peptiden zu untersuchen, haben wir die Peptidmodelle **1a-d** synthetisiert,^[9] in denen drei Aminosäuren voneinander jeweils durch Triprolinsequenzen getrennt sind (Schema 1). In die aromatische Seitenkette der C-terminalen Aminosäure ließ sich selektiv eine positive Ladung injizieren (**1→2**), um einen Elektronenakzeptor zu erzeugen. Am etwa 20 Å entfernten N-Terminus^[10] stand Tyrosin als Elektronendonator zur Verfügung. Mittig zwischen Donor und Akzeptor platzierten wir eine Aminosäure mit aliphatischer oder aromatischer Seitenkette X (Schema 1).

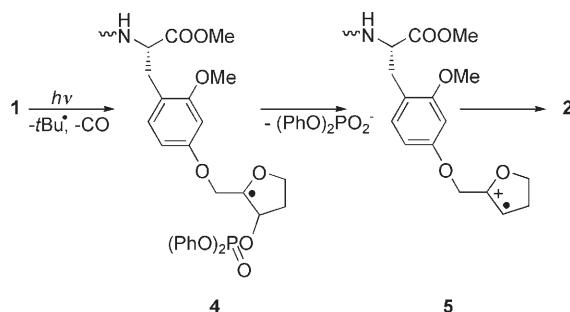


Schema 1. Injektion einer positiven Ladung in die C-terminale Aminosäure eines Oligopeptids und anschließender ET vom N-terminalen Tyrosin.

[*] M. Cordes, Dr. A. Kötgen, Dr. C. Jasper, Dr. O. Jacques, Dr. H. Boudebous, Prof. Dr. B. Giese
Departement of Chemistry, University of Basel
St. Johanns-Ring 19, 4056 Basel (Schweiz)
Fax: (+41) 612-671-105
E-Mail: bernd.giese@unibas.ch

[**] Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds unterstützt. C.J. dankt der Leopoldina für ein Stipendium.

Die Funktionsweise des Injektionssystems an der C-terminalen Aminosäure der Peptide **1a-d** ist in Schema 2 dargestellt. Photolyse des Ketons führt dabei zu Radikal **4**, das in einer heterolytischen β -Fragmentierung (**4→5**) zum Radikalkation **5** zerfällt,^[11] welches anschließend selektiv den angrenzenden aromatischen Ring oxidiert (**5→2**). Das Transienten-Absorptionsspektrum des Elektronenakzeptors in **2** weist ein Maximum bei 450 nm auf (Abbildung 1).



Schema 2. Erzeugung eines Radikalkations durch Laserblitzphotolyse (LFP).

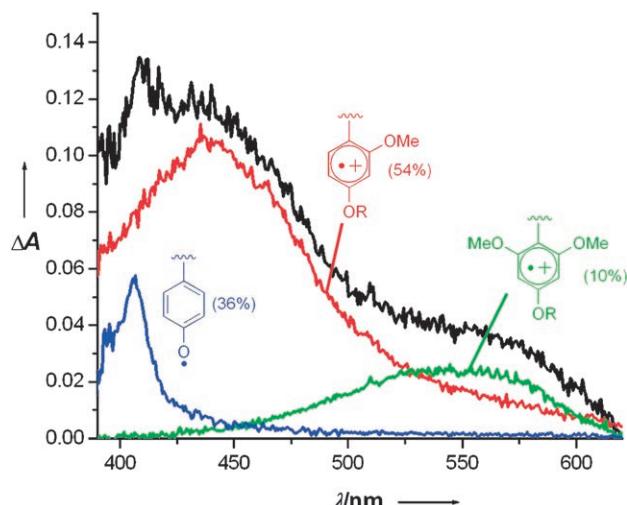
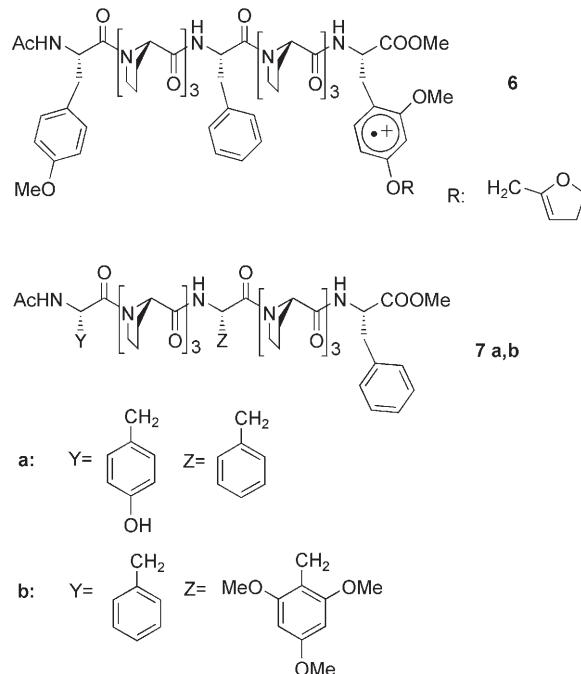


Abbildung 1. Transienten-Absorptionsspektren des Oligopeptids **1d** 40 ns nach dem Laserblitz (schwarz), des Tyrosylradikals (blau),^[14] des 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin-Radikalkations (grün)^[17] und des Dialkoxyphenylalanin-Radikalkations **6** (rot). Die Anteile der Transienten, die durch LFP von **1d** gebildet wurden, wurden durch Anpassung der farbigen Spektren an die gemessene Absorptionskurve ermittelt. Die Summe aller Transienten wurde auf 100% gesetzt.

Das Signal des Moleküls **2** sinkt durch den Elektronentransfer von Tyrosin (**2**→**3**), das bei der Oxidation zum Tyrosylradikal deprotoniert (Abbildung 1). Die Akzeptor-Radikalkationen **2a–d** wurden durch Laserblitzphotolyse (LFP) der Vorstufen **1a–d** generiert,^[12] und die Transienten-Absorptionsspektren wurden 40 ns nach dem Laserblitz gemessen.^[13] Um zu überprüfen, ob innerhalb dieses Zeitraums *intermolekularer* ET bereits mit dem *intramolekularen* ET konkurriert, wurde Radikalkation **6** erzeugt, in dem kein Tyrosin vorliegt.

Experimente mit Mischungen von **6** und Oligopeptid **7a**, das nur Tyrosin aber keinen Injektor enthält (Schema 3), ergaben, dass geringe Mengen Tyrosylradikal (6.1% aller Transienten) bereits 40 ns nach dem Laserblitz durch intermolekulare Reaktion gebildet wurden (Tabelle 1).

Daraus folgt, dass in LFP-Experimenten mit Peptiden **1a–d** nur Ausbeuten an Tyrosylradikalen von mehr als 6% intramolekularen ET-Prozessen (**2**→**3**) zugerechnet werden können. Mit Alanin und Leucin in zentraler Position (**1a** bzw. **1b**) wurden innerhalb von 40 ns nach der Bestrahlung **6** bis



Schema 3. Peptide für Kontrollexperimente zur Untersuchung des intermolekularen Elektronentransfers.

Tabelle 1: Ausbeute an Tyrosylradikalen 40 ns nach LFP der Verbindungen **1a–d**.^[a]

Molekül	Tyrosylradikal (nachgewiesen) ^[b]	Tyrosylradikal (korrigiert) ^[c]
6 + 7a	6.1%	–
1a	6.9%	≤ 1%
1b	6.1%	≤ 1%
1c	27%	21%
1d	36%	30%

[a] Relativer Fehler für alle Werte: 10%. Die Summe aller oxidierten aromatischen Seitenketten wurde auf 100% gesetzt. Die Menge an Tyrosylradikal, die bei der intermolekularen Reaktion von **6** und **7b** gebildet wird, ist als Vergleichsgröße angegeben. [b] Korrigiert anhand der Extinktionskoeffizienten des Tyrosylradikals ($3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),^[14] des 1,3-Dimethoxybenzol-Radikalkations ($4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),^[15] und des 1,3,5-Tri-methoxybenzol-Radikalkations ($4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[15,16] [c] Korrigiert um den Anteil an Tyrosin, der durch intermolekulare Reaktionen oxidiert wird, abgeschätzt anhand der Reaktion von **6** und **7a**.

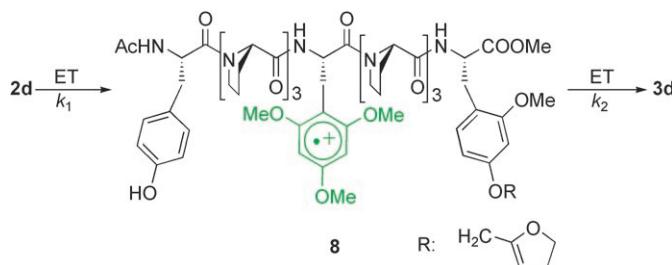
7% Tyrosylradikale gebildet (Tabelle 1). Maximal 1% Tyrosin wurde somit durch intramolekularen ET oxidiert. Wurden die aliphatischen Seitenketten X jedoch durch aromatische Seitenketten ersetzt (**1c** und **1d**), so konnten wir Tyrosylradikale in Ausbeuten von 27 bzw. 36% nachweisen (Tabelle 1). Somit konnten wir zeigen, dass aromatische Seitenketten X, die intramolekularen ET-Geschwindigkeiten (**2**→**3**) mindestens um das 20- bis 30fache erhöhen.

Ob die Beschleunigung des intramolekularen Elektronentransfers auf eine verbesserte elektronische Kopplung zwischen Donor und Akzeptor gemäß des einstufigen Superaustauschmechanismus zurückzuführen ist, oder ob ein mechanistischer Übergang zu einem mehrstufigen Hopping-

Prozess die Geschwindigkeiten erhöht, konnte in Experimenten mit Peptid **1d** aufgeklärt werden.

Das Transienten-Absorptionsspektrum von **1d**, 40 ns nach dem Laserblitz (Abbildung 1), zeigt nicht nur das gleichzeitige Vorliegen von verbleibendem Elektronenakzeptor (**2d**, 54 %) und oxidiertem Elektronendonator (**3d**, 36 %), sondern auch das Signal der oxidierten Aminosäure, die mittig zwischen Akzeptor und Donor platziert ist (**8**, 10 %, $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$).^[17] Das als Zwischenstufe auftretende Radikalkation **8** wurde durch intramolekularen ET erzeugt, da in Experimenten mit Peptid **7b** kein intermolekularer ET vom zentralen Trimethoxyphenylalanin zu einem Elektronenakzeptor, wie in Peptid **6**, nachgewiesen werden konnte.

Weitreichender ET vom Donor zum Akzeptor (**2d** → **3d**) verläuft somit in einem zweistufigen Hopping-Mechanismus über die zentrale aromatische Aminosäure als oxidierbare Zwischenstufe (Schema 4). Der mehrstufige Prozess ist bevorzugt, da das Oxidationspotential der „Relais“-Aminosäure dem des C-terminalen Elektronenakzeptors gleicht.^[18] Die Einführung des Relais führt zu einem 20- bis 30fachen Anstieg der ET-Geschwindigkeit.



Schema 4. In **2d** verläuft der ET über die Zwischenstufe **8**.

Aus der kinetischen Analyse von Folgereaktionen^[8] und den Ausbeuten an oxidierten N-terminalen, C-terminalen und „Relais“-Aminosäuren, lässt sich ableiten, dass der erste ET-Schritt (k_1) fünf- bis sechsmal langsamer erfolgt als der zweite ET Schritt (k_2). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den unterschiedlichen Oxidationspotentialen der beteiligten Aminosäureseitenketten.^[18] Die Geschwindigkeit für den Donor → Akzeptor-ET kann mit etwa 10^6 s^{-1} abgeschätzt werden, da diese Reaktion erfolgreich mit der intermolekularen ET-Reaktion konkurriert, die, bei etwa 5 mm Peptidkonzentrationen in den LFP-Experimenten, mit einer Geschwindigkeitskonstante von $3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ abläuft.^[17]

Wir konnten nachweisen, dass der ET in den Peptiden **2c** und **2d** in einem zweistufigen Hopping-Prozess abläuft, in dem die aromatischen Seitenketten als Zwischenstationen dienen. Dieses Elektronenhopping über 20 Å führt zu einem 20- bis 30fachen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, verglichen mit dem Superaustausch-ET in den Peptiden **2a** und **2b**.

Eingegangen am 6. Dezember 2007

Stichwörter: Aromatische Aminosäuren · Elektronenhopping · Elektronentransfer · Peptide

- [1] H. B. Gray, J. R. Winkler, *Q. Rev. Biophys.* **2003**, *36*, 341.
- [2] H. B. Gray, J. R. Winkler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3534.
- [3] D. N. Beratan, J. N. Onuchic, *Photosynth. Res.* **1989**, *22*, 173.
- [4] Eine Erweiterung des Modells um die Effekte der Proteindynamik führte zu guten Übereinstimmungen mit den experimentellen Daten (Lit. [1,2]): T. R. Prytkova, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, *Science* **2007**, *315*, 622; S. S. Skourtis, I. A. Balabin, T. Kawatsu, D. N. Beratan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3552. Weitere neuere Beiträge zum Einfluss der Konformation des Peptidrückgrats auf die elektronische Kopplung: E. W. Schlag, S.-Y. Sheu, D.-Y. Yang, H. L. Selzle, S. H. Lin, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3258; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3196.
- [5] J. Stubbe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 183.
- [6] J. Stubbe, D. G. Nocera, C. S. Yee, C. Y. Chang, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2167.
- [7] Weitere Experimente, in denen mehrstufiger Ladungstransfer durch Seitenketten oder Peptidbindungen diskutiert wird: K. Yanagisawa, T. Morita, S. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12780; T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 491; C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Nature* **2000**, *405*, 586; E. W. Schlag, D.-Y. Yang, S.-Y. Sheu, H. L. Selzle, S. H. Lin, P. M. Rentzepis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9849; C. C. Page, C. C. Moser, X. X. Chen, P. L. Dutton, *Nature* **1999**, *402*, 47.
- [8] R. Huisgen in *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, Vol. 3 (Hrsg.: E. Müller), Thieme, Stuttgart, **1955**, S. 139.
- [9] Die enantioselektiven Synthesen der neuen aromatischen Aminosäuren folgen der Erlenmeyer-Azlaconsynthese und werden beschrieben in: M. Cordes, O. Jacques, A. Köttgen, C. Jasper, H. Boudebous, B. Giese, *Adv. Synth. Catal.*, im Druck.
- [10] Die CD-Spektren der Verbindungen **1a-d**, **6** und **7** zeigen eine negative Bande bei 206 nm und eine positive Bande bei 229 nm, wie für eine PPII-Helix charakteristisch. Beim Erhitzen auf 80°C schmelzen die Helices nicht. Die PPII-Helix weist eine Wiederholungseinheit von drei Prolinmolekülen mit einer Ganghöhe von 3.2 Å pro Monomer auf, siehe z. B. S. Kakinoki, Y. Hirano, M. Oka, *Polym. Bull.* **2005**, *53*, 109. In einer idealen PPII-Helix stehen die Seitenketten der Donor-, Akzeptor- und „Relais“-Aminosäuren jeweils im 120°-Winkel zueinander.
- [11] Wir haben ein vergleichbares System bereit für die Injektion einer positiven Ladung in die heterocyclischen Basen der DNA genutzt und untersucht: E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950; E. Meggers, D. Kusch, M. Spichty, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 473; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 460.
- [12] Entgaste Lösungen von **1a-d**, **6** und **7** (5 mM in Acetonitril/Wasser 3:1) wurden in einer Quarz-Küvette von 4.5 cm Länge mit einem Lambda-Physik-COMPex-205-Laser bei einer Wellenlänge von 308 nm (Pulsbreite: 25 ns, 100–150 mJ pro Puls) bei Raumtemperatur bestrahlt. Eine iStar-720-ICCD-Kamera (Andor) wurde für die Aufnahme der Transienten-Absorptionspektren 40 ns nach der Bestrahlung benutzt. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden die Signale von fünf aufeinander folgenden Messungen akkumuliert.
- [13] Durch Konkurrenzexperimente ermittelten wir die Geschwindigkeit der β-Fragmentierung (**4** → **5**) zu $2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Aus diesem Grund ist die UV-Detektion der Zwischenstufen vor dem Ablauf von 40 ns nicht sinnvoll.
- [14] R. H. Schuler, P. Neta, H. Zemel, R. W. Fessenden, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3825.
- [15] P. O'Neill, S. Steenken, D. Schulte-Frohlinde, *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 2773.
- [16] N. Ichinose, T. Tanaka, S. Kawanishi, T. Suzuki, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 7923.

- [17] B. Giese, M. Napp, O. Jacques, H. Boudebous, A. M. Taylor, J. Wirz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4141; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4073.
- [18] Die Oxidationspotentiale der aromatischen Aminosäuren wurden durch Differentialpulsvoltammetrie in Acetonitril mit

Ferrocen als internem Standard gemessen (Arbeitselektrode: Glaskohlenstoff, (TBA)PF₆ als Elektrolyt, Scan-Geschwindigkeit 100 mV s⁻¹): *N*-Ac-2,4-Dimethoxyphenylalaninmethylester 0.95 V; *N*-Ac-2,4,6-Trimethoxyphenylalaninmethylester 0.94 V; *N*-Ac-Tyrosinmethylester 0.85 V (vs. Fc/Fc⁺).
