

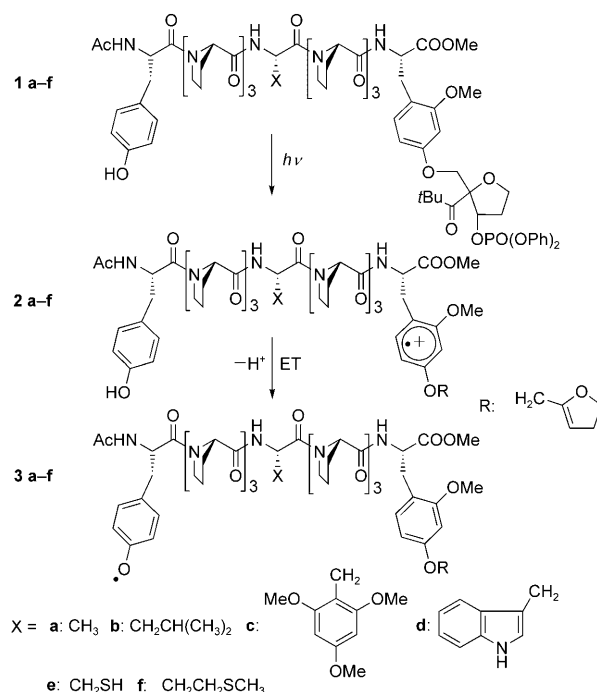
Elektronentransfer entlang Peptiden mit Cystein und Methionin als Relais-Aminosäuren**

Min Wang, Jian Gao, Pavel Müller und Bernd Giese*

Vor kurzem haben wir ein Peptidsystem entwickelt, mit dem mehrstufige Hopping-Prozesse für den Elektronentransfer (ET) durch Peptide nachgewiesen werden können.^[1] Weil einstufige ET-Reaktionen zwischen dem Elektronendonator (D) und -akzeptor (A) exponentiell mit dem Abstand langsamer werden,^[2] muss ein ET über große Distanzen in einer mehrstufigen Reaktion erfolgen.^[3] Gemäß diesem Mechanismus wird die Gesamtdistanz zwischen D und A in kürzere und deswegen schnellere ET-Schritte aufgeteilt, wobei als Relaisstationen Aminosäuren auftreten, die kurzfristig die Ladung tragen.^[1] Bislang wurden nur aromatische Aminosäuren wie Tyrosin^[4] und Tryptophan^[5,6] als Relais-Aminosäuren diskutiert. Wir haben nun gezeigt, dass die aliphatischen Aminosäuren Cystein und Methionin ebenfalls die Funktionen von Relais-Aminosäuren übernehmen können.

In unserem Peptidsystem **1** ist Tyrosin am N-terminalen Ende der Elektronendonator, ein Dialkoxyphenylalanin am C-terminalen Ende die Vorstufe des Elektronenakzeptors und die zwischen D und A eingefügte Aminosäure mit einer Gruppe X als Seitenkette die mögliche Relaisstation. Diese funktionellen Aminosäuren sind voneinander durch Triprolinsequenzen getrennt, die eine starre PPII-Helix bilden und einen Abstand von 20 Å zwischen D und A legen.^[1] Durch Laserphotolyse von **1** wird das aktive Peptid **2** erzeugt, wobei die ET-Effizienz durch die Konzentration des Tyrosylradikals bestimmt wird, das binnen 40 ns nach dem Laserblitz in einer intramolekularen Reaktion gebildet wird (Schema 1).^[7] Die hier angegebenen Prozentwerte für das Tyrosylradikal beziehen sich immer auf diese Konzentration.

Letztes Jahr konnten wir zeigen, dass die aliphatischen Aminosäuren Alanin und Homoleucin keine mehrstufigen Reaktionen ermöglichen, während Trimethoxyphenylalanin eine perfekte Relais-Aminosäure ist, deren Radikalkation als kurzlebige Zwischenstufe während des ET-Prozesses gebildet wird.^[1] Aus der Konzentration der Tyrosylradikale **3a–c** 40 ns nach Bestrahlen der Peptide **1a–c** mit dem Laserblitz (Tabelle 1) konnte geschlossen werden, dass der zweistufige ET über etwa 20 Å ungefähr 30-mal schneller als die Einstufenreaktion verläuft (Tabelle 1, Nr. 1–3).



Schema 1. Injektion einer positiven Ladung in die C-terminale Aminosäure und nachfolgender ET vom N-terminalen Tyrosin entlang dem Oligopeptid.

Tabelle 1: Konzentration der durch intramolekularen ET gebildeten Tyrosylradikale **3a–f** nach 40 ns.^[7]

Nr.	Molekül	zentrale Aminosäure	Tyrosylradikal [%] ^[a]
1	1a	Alanin	≤ 1
2	1b	Homoleucin	≤ 1
3	1c	Trimethoxyphenylalanin	30
4	1d	Tryptophan	≤ 2 ^[b]
5	1e	Cystein	15 ^[c]
6	1f	Methionin	20 ^[c]

[a] Prozentanteil in Bezug auf die Menge der Radikale und Radikationen.

[b] Ungefähr 30% an oxidierten Tryptophanzwischenstufen traten auf.

[c] Es konnten keine oxidierten S-haltigen Zwischenstufen nachgewiesen werden.

Weil Tryptophan ein niedrigeres Redoxpotential (1.0 V gegen NHE)^[8] als die Relais-Aminosäure Trimethoxyphenylalanin (1.3 V gegen NHE)^[9] hat, sollte Tryptophan als Relais-Aminosäure fungieren können, wie es auch schon von Brettel,^[5] Stubbe,^[4] Gray et al.^[6] beschrieben wurde. Deswegen führten wir Tryptophan in unser Peptid ein und starteten den ET durch Laserphotolyse von **1d**. Wie jedoch die geringe Konzentration an gebildetem Tyrosylradikal **3d** (Tabelle 1, Nr. 4) zeigt, ist die aromatische Aminosäure Tryptophan in

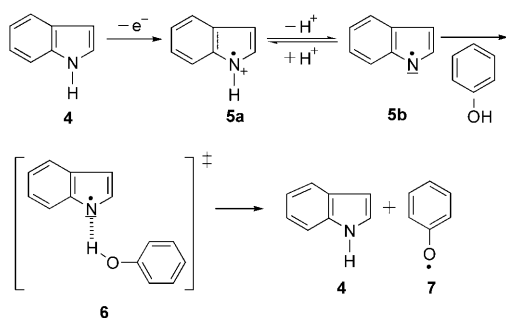
[*] Dr. M. Wang, Dr. J. Gao, Dr. P. Müller, Prof. Dr. B. Giese
 Departement Chemie, Universität Basel
 St. Johannis-Ring 19, 4056 Basel (Schweiz)
 Fax: (+41) 612-671-105
 E-Mail: bernd.giese@unibas.ch

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900827> zu finden.

unserem Peptid ähnlich unwirksam als Relais-Aminosäure wie die aliphatischen Aminosäuren Alanin und Homoleucin (Tabelle 1, Nr. 1 und 2). Anders als im Fall der aliphatischen Aminosäuren erschienen im Tryptophan-Experiment allerdings neue Signale.^[10] Der Vergleich mit den UV-Spektren von Jovanovic und Simic^[11] belegt, dass diese neuen Signale die Bildung des oxidierten Tryptophanyl-Radikalkations **5a** sowie des deprotonierten Radikals **5b** anzeigen. Im pH-7.0-Puffer (5 mM Triethylammoniumacetat) überwog nach 40 ns **5b** gegenüber **5a** im Verhältnis 10:1. Dies ist überraschend, weil die Deprotonierung von **5a** in der DNA-Photolyase laut Brettel et al. 300 ns benötigt.^[5] Ein pH-7-Puffer ist ein effizienter Protonenfänger, weswegen wir die Laserexperimente mit **1d** auch in Abwesenheit des Puffers durchführten (in CH₃CN/H₂O = 3:1). Unter diesen Bedingungen wurde ein **5a**/**5b**-Verhältnis von 1:1 erhalten.^[10] Die Enzymumgebung scheint demnach ein weniger effizienter Protonenfänger zu sein als das homogene Medium CH₃CN/H₂O.

Die Konzentration der beiden oxidierten Tryptophanzwischenstufen betrug nach 40 ns etwa 30%.^[12] Tryptophan ist demnach ein effizienter Elektronendonator, aber der nächste ET-Schritt vom Tyrosin auf das Tryptophanylradikal verläuft langsam. Harriman et al.^[13] bestimmten die Geschwindigkeit des bimolekularen ET von Tyrosin zum Tryptophanylradikal bei pH 7.5 (H₂O, 20°C) zu $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und erklärten diese langsame Reaktion durch den Übergangszustand **6**, in dem sich beide Reaktanten in enger Nachbarschaft befinden und bei dem der ET mit einem Protontransfer gekoppelt ist (Schema 2). Im Peptid **1d** sind Tyrosin und Tryptophan



Schema 2. PCET zwischen einem Indolylradikal und Phenol.

tophan allerdings durch die Triprolingruppierung voneinander getrennt, sodass kein Übergangszustand wie **6** in einer intramolekularen Reaktion gebildet werden kann. Brettel et al.^[5] hatten vorgeschlagen, dass Tryptophan nur dann als Relais-Aminosäure wirken kann, wenn das Proton des Tryptophanyl-Radikalkations durch H-Brücken im Peptid festgehalten wird, sodass es beim nächsten protonengekoppelten ET (PCET) wieder auf das Tryptophan übertragen werden kann.^[14] Dies erinnert an ET-Prozesse über große Distanzen entlang doppelsträngiger DNA, wobei das Proton des oxidierten Purin-Radikalkations in der DNA verbleibt, weil es von der gegenüberliegenden Watson-Crick-Base durch eine H-Brücke festgehalten wird.^[15]

Cystein, dessen Oxidationspotential von 0.92 V gegen NHE geeignet für einen Hopping-Prozess wäre,^[16] sollte

ebenfalls keine effiziente Relais-Aminosäure sein, weil es bei der Oxidation ähnlich wie Tryptophan deprotoniert wird. Experimente mit **1e** haben allerdings gezeigt, dass Cystein dennoch als Relais-Aminosäure fungieren kann, denn nach 40 ns wurde ein Anteil von 15 % an Tyrosylradikal registriert (Tabelle 1, Nr. 5). Wir vermuten, dass der Protonentransfer während des ET-Prozesses durch das umgebende Wasser vermittelt wird (Abbildung 1). Wenn dies der Fall ist, sollte

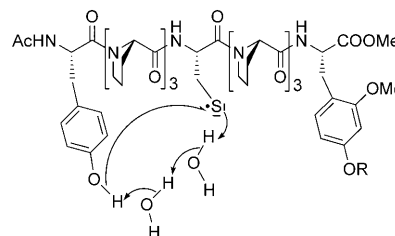
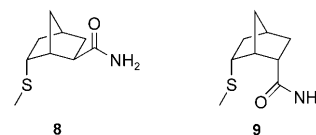


Abbildung 1. Durch Wasser vermittelter PCET zwischen Tyrosin und dem Cysteinylnradikal.

ein ET in D₂O wegen des H/D-Isotopeneffektes verlangsamt sein, weshalb wir Experimente mit **1e** in D₂O durchführten (CH₃CN/D₂O = 3:1). Unter diesen Bedingungen verringerte sich die Ausbeute an Tyrosylradikal von 15 auf 7–8%. Dieser Isotopeneffekt von ungefähr 2 ist in Einklang mit einem durch Wasser unterstützten PCET (Abbildung 1). Für das hydrophobere Tryptophan sollte dieser wasservermittelte Prozess schwieriger sein. Auch lässt die Anordnung der freien Elektronenpaare für das Thiylradikal mehr Reaktionswege zu als für das Indolylradikal (siehe z. B. **6**).

Auch mit dem ebenfalls S-haltigen Methionin wurden überraschende Resultate erzielt. Angesichts des hohen Redoxpotentials von Thioethern wie Diethylsulfid (1.66 V gegen NHE)^[16] sollte der erste ET-Schritt in **2f** endergon sein, weil das Redoxpotential des Elektronenakzeptors (C-terminale Aminosäure) nur 1.3 V gegen NHE beträgt.^[9] Dennoch erwies sich Methionin^[17] als effiziente Relais-Aminosäure, da nach 40 ns eine Konzentration von 20 % an Tyrosylradikal **3f** gemessen wurde (Tabelle 1, Nr. 6). Dieser Befund lässt sich durch den Nachbargruppeneffekt der Amidfunktion erklären, wie es am Beispiel der Norbornensysteme **8** und **9** demonstriert wurde: Die *endo*-Amidgruppe von **9** verringert dessen Redoxpotential gegenüber jenem von **8** um 0.55 V.^[18] Schöneich et al.^[16] haben diesen Effekt am Methionin im Detail studiert und vermuten, dass Methionin wegen dieses Nachbargruppeneffekts ein Angriffsort für den oxidativen Stress ist.



Eingegangen am 11. Februar 2009
Online veröffentlicht am 7. Mai 2009

Stichwörter: Cystein · Elektronentransfer · Peptide · Protonentransfer · Relais-Aminosäuren

- [1] a) M. Cordes, A. Köttgen, C. Jasper, O. Jacques, H. Boudebous, B. Giese, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3511; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3461; b) M. Cordes, O. Jacques, A. Köttgen, C. Jasper, H. Boudebous, B. Giese, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1053.
- [2] a) R. A. Marcus, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1161; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1111; b) J. J. Hopfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 3640.
- [3] a) C. C. Page, C. C. Moser, X. X. Chen, P. L. Dutton, *Nature* **1999**, *402*, 47; b) H. B. Gray, J. R. Winkler, *Q. Rev. Biophys.* **2003**, *36*, 341; c) B. Giese, M. Graber, M. Cordes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 755.
- [4] J. Stubbe, D. G. Nocera, C. S. Yee, M. C. Y. Chang, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2167.
- [5] a) C. Aubert, P. Mathis, A. P. M. Erker, K. Brettel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5423; b) C. Auber, M. H. Voss, P. Mathis, A. P. M. Erker, K. Brettel, *Nature* **2000**, *405*, 586.
- [6] C. Shih, A. K. Museth, M. Abrahamsson, A. M. Blanco-Rodriguez, A. J. Di Bilio, J. Sudhamsu, B. R. Crane, K. L. Ronayne, M. Towrie, A. Vlcek, J. H. Richards, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Science* **2008**, *320*, 1760.
- [7] Die experimentellen Bedingungen sind in Lit. [1] und die Spektren in den Hintergrundinformationen beschrieben. Weil innerhalb von 40 ns nach dem Laserblitz schon 6% an Tyrosylradikal durch eine intermolekulare Reaktion entstanden, wurde dieser Prozentwert abgezogen, um allein die Menge an Tyrosylradikal zu erhalten, die infolge eines intramolekularen ET entstanden ist.
- [8] A. Harriman, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6102.
- [9] In Lit. [1] haben wir die Redoxpotentiale der geschützten Dimethoxy- und Trimethoxyphenylalanine in Acetonitril zu etwa 0.93 V gegen Ferrocen/Ferrocenium bestimmt. Um aus diesen Daten die Redoxpotentiale gegen NHE in Wasser zu erhalten, wurde ein Betrag von 0.40 V addiert, wie beschrieben in: P. R. Gagne, C. A. Koval, G. C. Lisensky, *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 2854.
- [10] Die Spektren sind in den Hintergrundinformationen einzusehen.
- [11] S. V. Jovanovic, M. G. Simic, *J. Free Radicals Biol. Med.* **1985**, *1*, 125.
- [12] Nach 40 ns ist noch keine Oxidation der zentralen Relais-Aminosäure durch intermolekulare ETs sichtbar.^[1]
- [13] S. V. Jovanovic, A. Harriman, M. G. Simic, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 1935.
- [14] Unter sauren Bedingungen (das Indolylradikal ist protoniert) ist der ET zum Tyrosin verlangsamt, weil das Oxidationspotential von Tyrosin mit abnehmendem pH-Wert steigt, während das von Tryptophan konstant bleibt.^[8]
- [15] B. Giese, S. Wessely, *Chem. Commun.* **2001**, 2108.
- [16] P. Brunelle, C. Schöneich, A. Rauk, *Can. J. Chem.* **2006**, *84*, 893.
- [17] Das Redoxpotential von Methionin wird in Lit. [16] diskutiert. Siehe auch: E. Madej, P. Wardman, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *462*, 94.
- [18] R. S. Glass, A. Petsom, M. Hojjatie, B. R. Coleman, J. R. Ducheck, J. Klug, G. S. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4772.