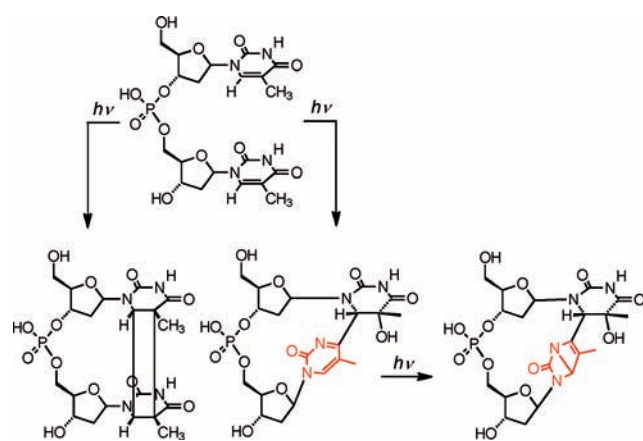


Mechanismus der UV-induzierten Bildung von Dewar-Schäden in DNA**

Karin Haiser, Benjamin P. Fingerhut, Korbinian Heil, Andreas Glas, Teja T. Herzog, Bert M. Pilles, Wolfgang J. Schreier, Wolfgang Zinth,* Regina de Vivie-Riedle* und Thomas Carell*

Lebende Organismen sind im Sonnenlicht dauerhaft der Gefahr UV-induzierter DNA-Schäden ausgesetzt, die zu Zelltod und Mutationen führen können.^[1] UV-Bestrahlung von TpT- und TpC-Sequenzen führt zur Bildung von zwei Primärschäden, nämlich dem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD)^[2] und dem (6-4)-Schaden,^[3] die in Schema 1 dargestellt sind. Der (6-4)-Schaden weist eine Absorptionsbande



Schema 1. Photochemische Reaktionen an TpT-Positionen (oben) in DNA, die zur Bildung des CPD- (unten links), des (6-4)- (unten Mitte) und des Dewar-Schadens (unten rechts) führen.

mit $\lambda_{\text{max}} = 320$ nm auf. Aus dem (6-4)-Schaden kann nach UV-Absorption das Dewar-Valenzisomer gebildet werden.^[4]

Während der Mechanismus, der zu CPD- und (6-4)-Bildung führt, vergleichsweise gut verstanden ist, ist über die Umlagerung des (6-4)- zum Dewar-Schaden nur wenig bekannt. Dewar-Schäden gehören zu den am häufigsten in genetischem Material durch UV-Licht induzierten Reaktionsprodukten. Die Aufklärung des Bildungsmechanismus ist von höchstem Interesse.^[5] Die Dewar-Schäden werden über eine photochemisch erlaubte 4π -Elektrocyclisierung erzeugt. Diese führt zu einer β -Lactam-Struktur verbunden mit einem zweiten viergliedrigen Ring. Aufgrund des Doppelbindungscharakters der Amid-Bindung innerhalb der β -Lactam-Struktur ist diese Verbindung die heterocyclische Version der von Dewar 1867 vorgeschlagenen bicyclischen Struktur von Benzol.^[6] Bedingt durch ihre komplexe Struktur sind diese Dewar-Verbindungen schwer reparierbar und zeichnen sich durch hohe eine Mutagenität aus.^[7] Als solche sind sie an einer Reihe von Mutationen, insbesondere an TpC-Positionen, beteiligt. Letztere gelten bei UV-Bestrahlung als karzinogene Hotspots.

Zur Aufklärung des Bildungsmechanismus der gespannten Dewar-Struktur wurden (6-4)-Dinukleotide synthetisiert, und die photochemische Umlagerung zum Dewar-Isomer wurde mithilfe von zeitaufgelöster UV-Anrege-IR-Abtast-Spektroskopie^[2a,8] untersucht. Diese Daten zusammen mit Ab-initio-Rechnungen angeregter Zustände zeigen, dass die 4π -Elektrocyclisierung eine relativ langsame Reaktion ist, dabei aber eine außergewöhnlich hohe Quantenausbeute hat. Interessanterweise hängt die Reaktion in sehr kritischem Maße von der Struktur des DNA-Rückgrats ab.

Für die Experimente wurden die zwei T-T-Dinukleotide **1** und **2** synthetisiert (Schema 2). Verbindung **1** enthält eine bioisostere Formacetal-Verbrückung^[9] anstatt des in der Natur vorkommenden Phosphodiesters. Verbindung **2** ist ein (6-4)-Schaden mit einer Silyl-Verbrückung, die gekappt werden kann.^[10] Beide Verbindungen sind in großen Mengen synthetisierbar (250 mg), wie es für die Untersuchungen benötigt wurde. **1** und **2** wurden mit UV-Licht (254 nm) unter anaeroben Bedingungen bestrahlt und bildeten die entsprechenden T(6-4)T-Dinukleotide **3** und **4**. Anschließend wurden die (6-4)-Verbindungen mittels Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt, und im Falle von **4** wurde die Silyl-Verbrückung entfernt, sodass die rückgratlose Verbindung **5** entstand.

Ein kleiner Anteil der T(6-4)T-Verbindung **3** mit der Formacetal-Verbrückung wurde unter Belichtung mit Weißlicht zum T(Dew)T-Schaden **6** umgewandelt. Die Reaktion

[*] K. Heil,^[‡] Dr. A. Glas, Prof. Dr. T. Carell
Fakultät für Chemie, Center for Integrative Protein Science
Ludwig Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

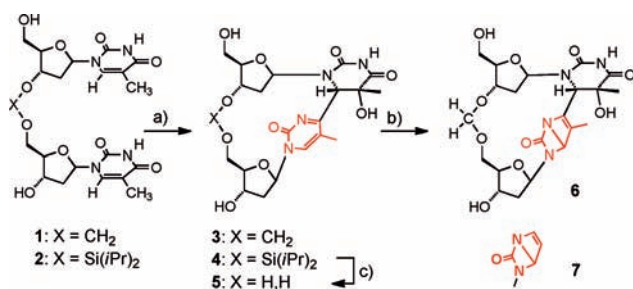
Dr. B. P. Fingerhut,^[‡] Prof. Dr. R. de Vivie-Riedle
Fakultät für Chemie, Ludwig Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: regina.de_vivie@cup.uni-muenchen.de

K. Haiser,^[‡] T. T. Herzog, B. M. Pilles, Dr. W. J. Schreier,
Prof. Dr. W. Zinth
Fakultät für Physik, Center for Integrative Protein Science
Ludwig Maximilians-Universität München
Oettingenstraße 67, 80538 München (Deutschland)
E-Mail: wolfgang.zinth@physik.uni-muenchen.de

[‡] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken der DFG (SFB 749) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106231> zu finden.



Scheme 2. Synthese der (6-4)-Verbindungen **3** und **5** für den Einsatz in den experimentellen Untersuchungen. a) 254 nm; b) 365 nm; c) NH₄OH.

von **3** zu **6** verläuft mit quantitativer Ausbeute ohne Nebenprodukte. Dies unterstreicht die Effizienz der Dewar-Bildung (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S1a). Zu unserer Überraschung stellten wir fest, dass die Belichtung des (6-4)-Schadens **5** (Absorptionsspektren hierzu siehe Abbildung S2), bei dem das Rückgrat durchtrennt war, der aber ansonsten mit Verbindung **3** identisch ist, kein Dewar-Isomer gebildet wurde. Dies geschah auch dann nicht, als die Belichtungszeit von Minuten zu Stunden und die Intensität der Lichtquelle erhöht wurden (Abbildung S1b). Auch 5-Methyl-2-pyrimidon **7** bildet bei Belichtung kein Dewar-Isomer. Bei der Analyse der Reaktionen wurden nur die Ausgangssubstanz und Zersetzung nachgewiesen. Diese Beobachtung belegt, dass die Reaktion des (6-4)- zum Dewar-Schaden keine einfache 4 π -Elektrocyclisierung innerhalb der Pyrimidon-Subgruppe des (6-4)-Schadens ist, sondern eine komplexere Reaktion beinhaltet.

Zur genaueren Untersuchung der Reaktion wurden zeitaufgelöste Messungen durchgeführt. Die gespannte Struktur des Dewar-Schadens legt die Vermutung nahe, dass zeitaufgelöste Experimente im Infraroten am besten geeignet sind, um Informationen über die Reaktionsdynamik zu erhalten. In der Tat wurden im Bereich der C=O-Streckschwingungsbanden ausgeprägte Unterschiede zwischen dem (6-4)-Schaden und dem Dewar-Isomer detektiert (Abbildung 1a). Der Dewar-Schaden T(Dew)T (Abbildung 1a, durchgezogene Linie) besitzt schwächere C=O-Banden im Vergleich zum T-(6-4)T-Schaden (Abbildung 1a, gestrichelte Linie). Zusätzlich zeigt sich eine charakteristische Marker-Bande bei 1780 cm⁻¹. Das Absorptionsdifferenzspektrum der Dewar-Bildung ist in Abbildung 1b gezeigt (grau schattiert). Im Folgenden wurde die ausgeprägte Dewar-Markerbande bei 1780 cm⁻¹ dazu verwendet, die Bildung des Dewar-Isomers zu beobachten.^[11]

In den zeitaufgelösten Messungen wurden Femtosekunden-Impulse im UV (323 nm) zur Anregung des T(6-4)T-Schadens verwendet. Die Absorptionsänderungen ΔA wurden mit dazu verzögerten breitbandigen IR-Impulsen aufgenommen. In Abbildung 1c sind die Differenzspektren zu einzelnen Verzögerungszeiten aufgetragen. Unmittelbar nach Anregung (z.B. nach 11 ps) wird eine Absorptionsabnahme an den spektralen Positionen der C=O-Streckschwingungsmoden (um 1660 cm⁻¹) des T(6-4)T-Schadens beobachtet. Bei 1780 cm⁻¹ ist keine Absorptionsänderung zu sehen. Mit zunehmender Verzögerungszeit erholt sich die

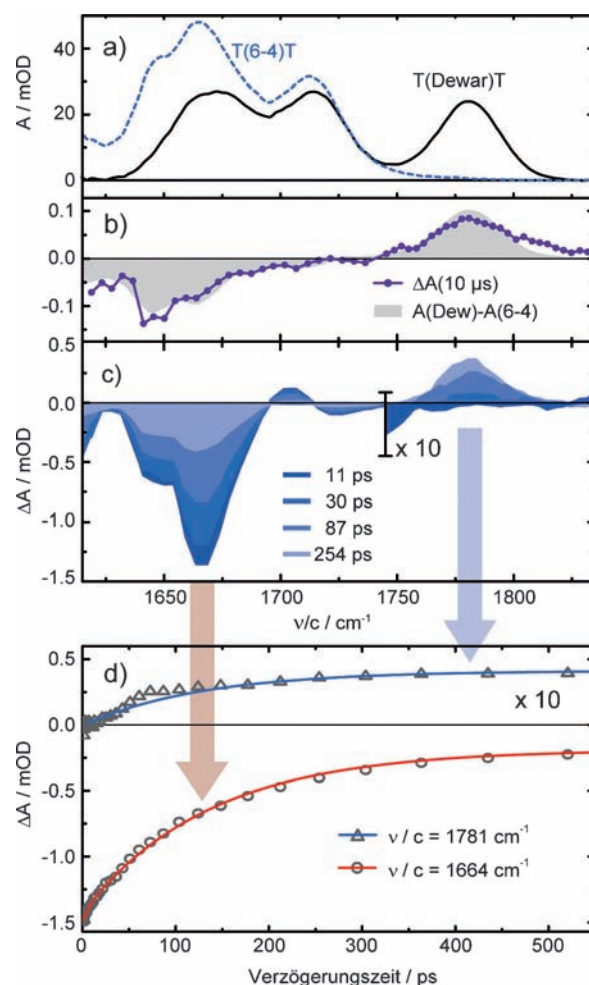


Abbildung 1. Zeitaufgelöste IR-Daten: a) Stationäre Spektren von T(6-4)T (gestrichelte Linie) und T(Dew)T (durchgezogene Linie). b) Stationäres Differenzspektrum zwischen T(Dew)T und T(6-4)T (grau schattiert) und transientes Spektrum zu einer späten Verzögerungszeit von 10 μ s (gepunktet). c) Transiente Absorptionsdifferenzspektren, aufgenommen in den ersten 254 ps. In den Spektren ist das Ausbleichen und das teilweise Erholen der Absorption der C=O-Banden um 1660 cm⁻¹ und die Bildung der Dewar-Markerbande bei 1780 cm⁻¹ zu sehen. d) Dynamik der Absorptionsänderung bei zwei spektralen Positionen $\nu/c = 1664$ cm⁻¹ und 1781 cm⁻¹. Die transienten Absorptionsdaten wurden bei Raumtemperatur aufgenommen und auf die Temperaturabhängigkeit des Lösungsmittels D₂O korrigiert (siehe Hintergrundinformationen). In den Pikosekunden- und Nanosekundenexperimenten wurden unterschiedliche Anregungsdichten verwendet.

Absorptionsabnahme bei 1664 cm⁻¹ (die Zeitkonstante von 130 ps ist in Abbildung 1d zu sehen), und es tritt eine zusätzliche Absorption an der Position der Dewar-Markerbande auf (siehe Abbildung 1c und d). Das spektrale Abtasten im UV und im sichtbaren Spektralbereich zeigt, dass die Absorptionszunahme auf der Pikosekunden-Zeitskala durch Absorptionen im angeregten Zustand verursacht wird. Ein Großteil der induzierten Absorption verschwindet mit einer Zeitkonstante von 130 ps, was auf den Zerfall des elektronisch angeregten Zustands des T(6-4)T-Schadens hinweist. (Eine genauere Diskussion der zeitaufgelösten Messungen im UV und Sichtbaren befindet sich in den Hintergrundinfor-

mationen.) Nach etwa 250 ps (Abbildung 1c) sind im IR-Differenzspektrum deutliche Anzeichen für Dewar-Isomere zu erkennen, das stationäre IR-Differenzspektrum ist jedoch noch nicht erreicht (siehe Abbildung 1b und c). Die restlichen Unterschiede, die vor allem im Bereich der C=O-Banden liegen und bei 1780 cm^{-1} vernachlässigbar sind, verschwinden auf der Zeitskala von Nanosekunden. Nach $10\text{ }\mu\text{s}$ stimmt schließlich das transiente Differenzspektrum (gepunktet in Abbildung 1b) mit dem Differenzspektrum aus dem stationären Belichtungsexperiment gut überein. Diese Beobachtungen erlauben die Schlussfolgerung, dass das Dewar-Valenzisomer direkt aus dem elektronisch angeregten Zustand mit einer Zeitkonstante von 130 ps gebildet wird.

Die ausgeprägte IR-Markerbande ermöglicht außerdem eine Quantifizierung der Photokonversionseffizienz η in zwei unabhängigen Experimenten (siehe Hintergrundinformationen). Dabei wurde eine bemerkenswert hohe Konversionseffizienz von $\eta = 8.2 \pm 2\%$ gemessen.^[12] Dies zeigt, dass die Dewar-Bildung eine der effizientesten lichtinduzierten Reaktionen in DNA ist. Zum Vergleich liegt die Quantenausbeute der Bildung des Cyclobutan-Pyrimidin-Dimers bei nur 1% ,^[12] und die Quantenausbeute der Bildung des T(6-4)T-DNA-Schadens ist sogar niedriger bei nur 0.1% (Schema 1).^[13]

Einen detaillierten Einblick in den Mechanismus der Dewar-Bildung ermöglichte die Theorie. Die theoretischen Untersuchungen erlaubten auch die Klärung der Frage, warum der (6-4)-Schaden **5** mit dem geöffnetem Rückgrat nicht zum Dewar-Schaden reagiert. Die Rechnungen basierten auf einem Hybridansatz,^[14] der die Eigenschaften der Chromophore mittels hochkorrelierter Ab-initio-Methoden analysiert, während die Kräfte des umgebenden Rückgrats auf niedrigerem quantenmechanischem (QM) Niveau behandelt wurden. Die Gleichungen der Kernbewegungen wurden mit dynamischen „on-the-fly“-Simulationen gelöst, die nicht-adiabatische Relaxationspfade einbeziehen (genauer in den Hintergrundinformationen).^[15] Zunächst wurden Rechnungen an T(6-4)T mit der Methylenverbrückung **3** durchgeführt und mit den Daten des freien 5-Methyl-2-pyrimidons **7** (5M2P) verglichen, welches als Modellsystem für das absorbierende Chromophor diente. Das Chromophor wurde auf dem Niveau von MS-CASPT2/CASSCF(12/9) berechnet.^[16] Die sterischen Effekte des gesamten Dinukleotids **3** wurden über die ONIOM-Methode in einem QM/QM-Ansatz eingebunden (siehe Hintergrundinformationen).^[17] Die Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen sind in Abbildung 2 dargestellt. Nach der $\pi\pi^*$ -Anregung relaxieren beide (6-4)-Systeme **3** und **5** in ein Minimum im angeregten Zustand S_1 . Der Weg zu den konischen Durchschneidungen (CoIn; conical intersection), welche einen schnellen Übergang in den elektronischen Grundzustand ermöglichen (siehe Abbildung 2), erfolgt über eine Energiebarriere,^[18] was die lange Lebensdauer des angeregten Zustands von 130 ps erklärt. Aus den Rechnungen für 5-Methyl-2-pyrimidon **7** geht hervor, dass in diesem Molekül im angeregten Zustand eine starke Bewegung des N3-Atoms aus der Ebene heraus stattfindet, während gleichzeitig das C4-Atom von sp^2 zu sp^3 hybridisiert wird. Dieser kombinierte Vorgang ermöglicht es dem Molekül, die $\text{CoIn}_{5\text{M2P}}$ zu erreichen, von wo es dann

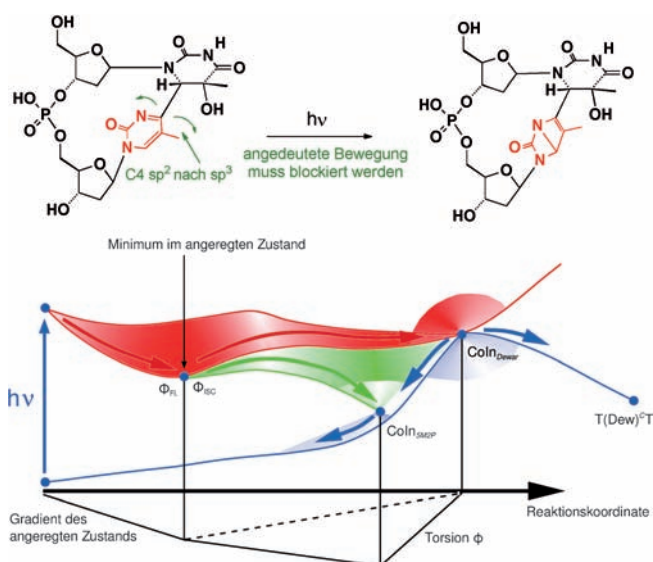


Abbildung 2. Reaktionsmechanismus: Der photochemische Reaktionsweg zum Dewar-Valenzisomer existiert nur für das (6-4)-Dinukleotid mit einer intakten Rückgratstruktur. Die Moleküle **3**, **5** und das Minimal-Chromophor **7** relaxieren zunächst entlang dem gleichen Gradienten in ein Minimum des angeregten Zustands. Die Bewegung des N3-Atoms aus der Ebene heraus in Kombination mit der Rehybridisierung von C4 (Torsion ϕ) erlaubt dem Chromophor **7** das Erreichen der konischen Durchschneidung (grüner Bereich), die das System zurück in die Ausgangsstruktur führt (interne Konversion). Genau diese Rehybridisierung wird bei einem intakten Phosphodiester- oder Formacetal-Rückgrat in **3** verhindert (roter Bereich). Hier bildet sich eine Diradikal-ähnliche $\text{CoIn}_{\text{Dewar}}$ durch die gleichphasige Bewegung von N3 und C3 aus der Ebene heraus, welche als Verzweigungspunkt für die interne Konversion einerseits oder die photochemische Dewar-Valenzisomerisierung andererseits dient. Dieser Reaktionsweg wird zur niedrigsten zugänglichen konischen Durchschneidung im (6-4)-Dinukleotid mit intaktem Rückgrat (Molekül **3**).

den Grundzustand erreichen kann (Abbildung 2).^[19] Die gleiche Bewegung ist auch im Dinukleotid **5** mit der geöffneten Verbrückung möglich.^[20] Die C4-Rehybridisierung, aktiviert durch die Bewegung von N3 im angeregten Zustand, erlaubt es beiden Verbindungen **5** und **7** nach der Anregung den elektronischen Grundzustand schnell zu erreichen. Dies verhindert die Bildung des Dewar-Isomers.

Bei dem über das Rückgrat verbundenen (6-4)-Schaden **3** zeigt sich, dass diese entscheidende Bewegung und somit auch die Rehybridisierung nicht auftreten kann. Das Rückgrat „umklammert“ die Struktur des absorbierenden Chromophors so, dass bei Photoanregung eine andere konische Durchschneidung ($\text{CoIn}_{\text{Dewar}}$) erreicht wird. Dieser Kreuzungspunkt zum Grundzustand befindet sich nur 0.226 eV unterhalb des Übergangszustandes der electrocyclischen Reaktion. Bei der $\text{CoIn}_{\text{Dewar}}$ nimmt der (6-4)-Schaden einen stark diradikalischen Charakter mit großer geometrischer und elektronischer Ähnlichkeit zum Dewar-Isomer an. Dies erklärt die hohe Quantenausbeute, mit der der Dewar-Schaden letztlich gebildet wird, wenn die Pyrimidin-Untergruppe innerhalb des (6-4)-Schadens über das Rückgrat verbunden ist.

Die wichtigste Entdeckung ist, dass das Rückgrat selbst die Bildung des Dewar-Isomers kontrolliert. Die Ringspannung innerhalb des starren cyclischen Moleküls verhindert die $sp^2 \rightarrow sp^3$ -Rehybridisierung des C4-Atoms, was den Zugang zu $CoIn_{5M2P}$ versperrt. Stattdessen bleibt das Molekül im angeregten Zustand, bis es die $CoIn_{Dewar}$ erreicht. An diesem Punkt nimmt es einen stark diradikalischen Charakter an, was eine effiziente Reaktion zum Dewar-Valenzisomer ermöglicht. Das Rückgrat in der DNA ist der wahre Grund, warum Dewar-Schäden entstehen können. Unsere Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die Basen zusammen mit der DNA-Konformation die Schadensbildung beeinflussen,^[13] sondern dass ebenso das DNA-Rückgrat selbst zur UV-induzierten Mutagenese beiträgt.

Eingegangen am 2. September 2011
Online veröffentlicht am 23. November 2011

Stichwörter: Ab-initio-Rechnungen · Dewar-Valenzisomer · DNA-Schäden · UV-Bestrahlung · Zeit aufgelöste IR-Spektroskopie

- [1] H. S. Black, F. R. deGrujil, P. D. Forbes, J. E. Cleaver, H. N. Ananthaswamy, E. C. deFabo, S. E. Ullrich, R. M. Tyrrell, *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *40*, 29–47.
- [2] a) W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, *315*, 625–629; b) W. J. Schreier, J. Kubon, N. Regner, K. Haiser, T. E. Schrader, W. Zinth, P. Clivio, P. Gilch, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5038–5039.
- [3] J. Cadet, P. Vigni, *Bioorganic Photochemistry, Vol. 1*, Wiley, New York, **1990**.
- [4] J. S. Taylor, D. S. Garrett, M. P. Cohrs, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7206–7215.
- [5] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, *571*, 3–17.
- [6] a) J. Dewar, *Proc. R. Soc. Edinburgh* **1866**, *84*, 82–86; b) C. K. Ingold, *J. Chem. Soc.* **1922**, *121*, 1133.
- [7] a) A. F. Glas, E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3254–3255; b) X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32580–32590; c) S. Hammes-Schiffer, J. C. Tully, *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 4657–4667; d) J. E. LeClerc, A. Borden, C. W. Lawrence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9685–9689; e) J.-H. Lee, B.-S. Choi, *BMB Rep.* **2000**, *33*, 268–275.
- [8] a) M. K. Kuimova, A. J. Cowan, P. Matousek, A. W. Parker, X. Z. Sun, M. Towrie, M. W. George, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2150–2153; b) K. Adamczyk, M. Premont-Schwarz, D. Pines, E. Pines, E. T. Nibbering, *Science* **2009**, *326*, 1690–1694.
- [9] J. Butenandt, P. M. A. Eker, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 642–654.
- [10] L. M. Kundu, L. T. Burgdorf, O. Kleiner, A. Batschauer, T. Carell, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1053–1060.
- [11] J. S. Taylor, M. P. Cohrs, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2834–2835.
- [12] D. G. Lemaire, B. P. Ruzsicska, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 755–769.
- [13] C. T. Middleton, K. de La Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernandez, B. Kohler, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217–239.
- [14] a) M. J. Bearpark, F. Ogliaro, T. Vreven, M. Boggio-Pasqua, M. J. Frisch, S. M. Larkin, M. Morrison, M. A. Robb, *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *190*, 207–227; b) T. Vreven, K. Morokuma, *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2969–2975.
- [15] M. Barbatti, G. Granucci, M. Persico, M. Ruckebauer, M. Vazdar, M. Eckert-Maksic, H. Lischka, *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *190*, 228–240.
- [16] a) P. Celani, H.-J. Werner, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 5044–5057; b) J. Finley, P.-Å. Malmqvist, B. O. Roos, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *288*, 299–306.
- [17] a) M. J. Bearpark, S. M. Larkin, T. Vreven, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 7286–7295; b) K. Morokuma, D. G. Musaev, T. Vreven, H. Basch, M. Torrent, D. V. Khoroshun, *IBM J. Res. Dev.* **2001**, *45*, 367–395.
- [18] K. A. Kistler, S. Matsika, *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 611–624.
- [19] K. A. Kistler, S. Matsika, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 215102–215114.
- [20] Y. J. Ai, R. Z. Liao, S. F. Chen, Y. Luo, W. H. Fang, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 14096–14102.