

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

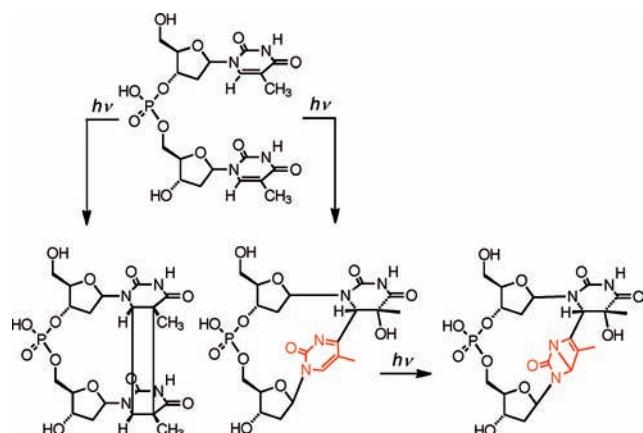
mit $\lambda_{\max} = 320 \text{ nm}$ auf. Aus dem (6-4)-Schaden kann nach UV-Absorption das Dewar-Valenzisomer gebildet werden.^[4]

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 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



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.

[*] K. Heil,^[4] 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

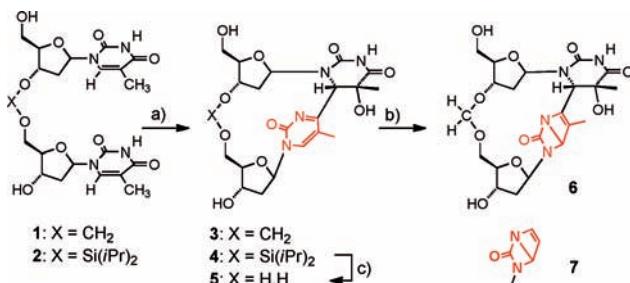
Dr. B. P. Fingerhut,^[4] Prof. Dr. R. de Vivie-Riedle
Fakultät für Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: regina.de_vivie@cup.uni-muenchen.de

K. Haiser,^[4] 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.



Schema 2. Synthese der (6-4)-Verbindungen 3 und 5 für den Einsatz in den experimentellen Untersuchungen. a) 254 nm; b) 365 nm; c) NH_4OH .

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 Ausgangsstoffe und Zersetzung nachgewiesen. Diese Beobachtung belegt, dass die Reaktion des (6-4)- zum Dewar-Schaden keine einfache 4π -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 $\text{C}=\text{O}$ -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 $\text{C}=\text{O}$ -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 $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingungsbändern (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

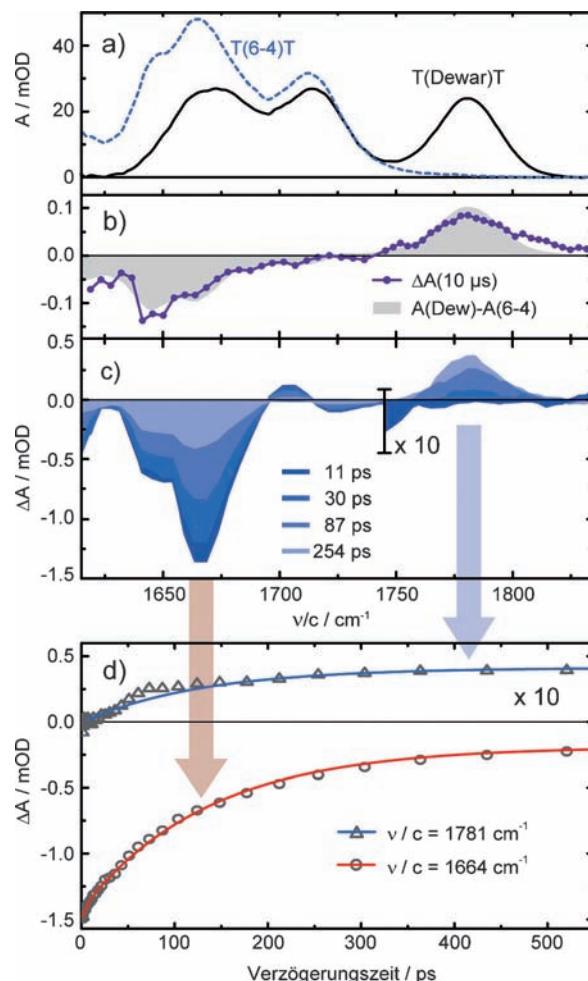


Abbildung 1. Zeitaufgelöste IR-Daten: a) Stationäre Spektren von T(6-4)T (gestrichelte Linie) und T(Dew)T (durchgezogene Linie). b) Stationäres Differenzspektrum zwischen T(Dew)T und T(6-4)T (grau schattiert) und transientes Spektrum zu einer späten Verzögerungszeit von 10 μs (gepunktet). c) Transiente Absorptionsdifferenzspektren, aufgenommen in den ersten 254 ps. In den Spektren ist das Ausbleichen und das teilweise Erholen der Absorption der $\text{C}=\text{O}$ -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 $\nu/\text{c} = 1664 \text{ cm}^{-1}$ und 1781 cm^{-1} . Die transienten Absorptionsdaten wurden bei Raumtemperatur aufgenommen und auf die Temperaturabhängigkeit des Lösungsmittels D_2O 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 elektro-nisch 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 μs stimmt schließlich das transiente Differenzspektrum (gepunktet in Abbildung 1b) mit dem Differenzspektrum aus dem stationären Belichtungsversuch 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 (genaueres 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 S₁. 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 CoIn_{5M2P} zu erreichen, von wo aus es dann

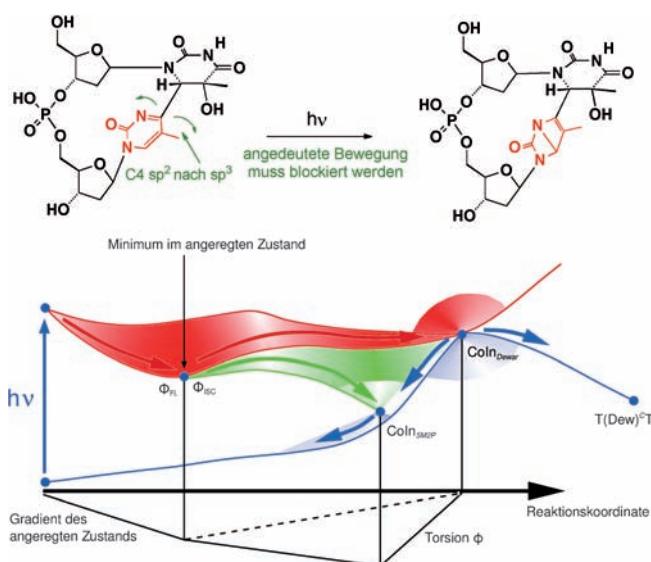


Abbildung 2. Reaktionsmechanismus: Der photochemische Reaktionsweg zum Dewar-Valenzisomer existiert nur für das (6-4)-Dinukleotid mit einer intakten Rückgratstruktur. Die Moleküle **3**, **5** und das Minimal-Chromophor **7** relaxieren zunächst entlang dem gleichen Gradienten in ein Minimum des angeregten 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 Diradikalähnliche CoIn_{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 (CoIn_{Dewar}) erreicht wird. Dieser Kreuzungspunkt zum Grundzustand befindet sich nur 0.226 eV unterhalb des Übergangszustandes der electrocyclischen Reaktion. Bei der CoIn_{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 Pyrimidon-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 $\text{sp}^2 \rightarrow \text{sp}^3$ -Rehybridisierung des C4-Atoms, was den Zugang zu $\text{CoIn}_{5\text{M}2\text{P}}$ versperrt. Stattdessen bleibt das Molekül im angeregten Zustand, bis es die $\text{CoIn}_{\text{Dewar}}$ 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 · Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie

-
- [1] H. S. Black, F. R. deGruijl, P. D. Forbes, J. E. Cleaver, H. N. Ananthaswamy, E. C. deFabio, 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. Ruckenbauer, 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.