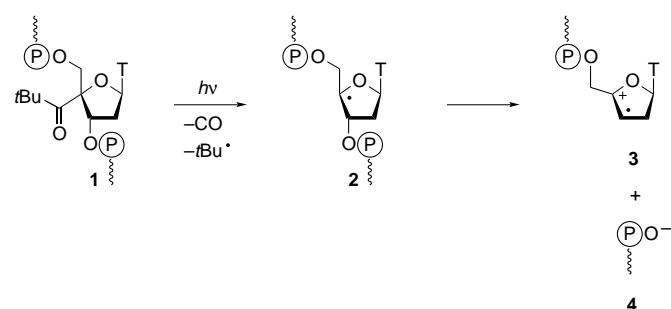


Elektronentransfer durch DNA beim radikalinduzierten Strangbruch**

Eric Meggers, Dirk Kusch, Martin Spichty, Uta Wille
und Bernd Giese*

Bei Elektronentransfer(ET)-Reaktionen in Proteinen nehmen die Transfargeschwindigkeiten um den Faktor 10 pro 1.5–2.5 Å ab.^[1] Im Gegensatz zu diesem allgemein akzeptierten Distanzeffekt ergaben Untersuchungen des Elektronentransfers durch die DNA widersprüchliche Ergebnisse und entfachten eine kontroverse Diskussion.^[2] Je nach experimenteller Anordnung hat man sowohl kleine^[3] als auch große^[4] Distanzeinflüsse auf die ET-Geschwindigkeit gefunden. In den meisten dieser Untersuchungen wurden die Geschwindigkeiten durch Fluoreszenzlöschung von photoaktiven Metallkomplexen oder aromatischen Verbindungen bestimmt, die an der DNA gebunden waren. In dieser Zuschrift stellen wir ein völlig anderes Testsystem vor, in dem die natürlichen Bedingungen von DNA-Reaktionen in der Zelle nachgeahmt und der ET durch die DNA anhand chemischer Ausbeuten eines Reduktionsschrittes gemessen wird. Die experimentelle Methode beruht auf der spontanen Spaltung des 4'-DNA-Radikals **2**, bei der das stark oxidierende Radikalkation **3** entsteht (Schema 1).^[5] Wir haben nun



Schema 1.

gefunden, daß Desoxyguanosin-Nucleotide dieses oxidierte DNA-Fragment **3** zum Enolether **5** durch ET reduzieren.^[6] Mechanistisch sollte dieser ET-Schritt als Lochtransfer-Prozess betrachtet werden.^[7] Die Wirksamkeit dieses Ladungstransfers hängt von der Distanz zwischen dem Radikalkation **3** und der Guanin-Base (G) ab. Im Gegensatz zu Untersuchungen, bei denen ein Photoelektronentransfer stattfindet, sind unsere Grundzustandsexperimente irreversibel: Es erfolgt kein Rücktransfer.

Die Experimente wurden mit DNA-Doppelsträngen durchgeführt, wobei einer der DNA-Stränge ein 4'-acyliertes Thymidin (T*) wie in **1** enthält. Norrish-Typ-I-Spaltung

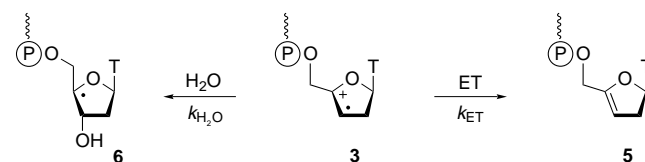
1→**2** und nachfolgende Heterolyse **2**→**3**+**4** liefern das Radikalkation **3**.^[5b] Das in gleichen Anteilen entstehende phosphorylierte Oligonucleotid **4** wurde in 71–89% Ausbeute gebildet. Wie die Daten in Tabelle 1 zeigen, wurde kein Enolether **5** detektiert, wenn der Doppelstrang kein G enthielt (Tabelle 1, Nr. 1 und 2); dagegen erreichten die

Tabelle 1. Distanzabhängigkeit der ET-Geschwindigkeiten in einzel- und doppelsträngiger DNA.

Nr.	Sequenz ^[a]	Δr [Å]	Ausb. an 5 [%] ^[b, c]	$k_{ET,rel} \times 10^2$ ^[c]	Ausb. an 4 [%] ^[b, c]
1	5'-dT ₅ T*T ₉	–	–	–	81
2	5'-dT ₂ A ₃ T*T ₉	–	–	–	78
3	5'-dG ₃ T ₂ T*T ₉	14.1	<0.2 (18)	<0.25 (31)	80 (77)
4	5'-dT ₅ T*T ₂ G ₃ T ₄	13.2	0.3	0.4	89
5	5'-dTG ₃ TT*T ₉	11.1	1.2 (22)	1.6 (41)	76 (77)
6	5'-dT ₅ T*T ₂ G ₃ T ₅	9.7	2.2	2.9	77
7	5'-dT ₂ C ₃ T*T ₉	9.6	7.0	10	77
8	5'-dT ₂ G ₃ T*T ₉	7.3	42 (30)	94 (45)	86 (96)
9	5'-dT ₅ T*T ₃ G ₃ T ₆	7.0	57	250	79
10	5'-dT ₂ G ₃ T*T ₃ G ₃ T ₆	–	67	310	89

[a] Die Spalte zeigt die Sequenzen der modifizierten Oligonucleotide; T* repräsentiert das 4'-acylierte Thymidin wie in **1**; Hybridisierung zu den Doppelsträngen wurde mit nichtmodifizierten Komplementärsträngen erreicht. [b] Ausbeuten wurden mit HPLC bestimmt. [c] Werte für Einzelstränge sind in Klammern angegeben.

Ausbeuten 67% bei jeweils drei direkt benachbarten G-Basen in 3'- und 5'-Richtung (Tabelle 1, Nr. 10).^[8] Mit Zunahme der Distanz Δr ^[9, 10] des ET-Schrittes von 7.0 auf 13.2 Å sank die Ausbeute an Enolether **5** von 57 auf 0.3% (Tabelle 1, Nr. 9 und 4). Bei einer Distanz von 14.1 Å ließ sich kein Reduktionsprodukt **5** mehr nachweisen, d.h. die ET-Reaktion konnte nicht mehr mit den anderen Abfangreaktionen des Radikalkations **3** konkurrieren. Die Hauptkonkurrenzreaktion ist die Addition von Wasser **3**→**6** (Schema 2), die zu weiterer Spaltung der DNA führt.^[11] Weil



Schema 2.

die Reaktionen nach erster oder pseudo-erster Ordnung (Überschuß an H₂O) ablaufen, ist das Geschwindigkeitsverhältnis zwischen der ET-Reaktion (k_{ET}) und den konkurrierenden Abfangreaktionen (k_{trap}) gleich dem Konzentrationsverhältnis $[5]/([3]-[5])$.^[12] Unter der Annahme, daß die Konkurrenzreaktionen, d.h. im wesentlichen der H₂O-Einfall, nicht von der Nucleotidsequenz abhängen, haben wir

[*] Prof. Dr. B. Giese, Dipl.-Chem. E. Meggers, Dr. D. Kusch, Dipl.-Chem. M. Spichty, Dr. U. Wille
Institut für Organische Chemie der Universität
St. Johanns-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)
Telefax: Int. + 61/267-1105
E-mail: giese@ubaclu.unibas.ch

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und von der Volkswagen-Stiftung gefördert.

das Verhältnis $k_{\text{ET}}/k_{\text{trap}}$ als relative Geschwindigkeit $k_{\text{ET,rel}}$ des ET-Schrittes benutzt (Tabelle 1). Diese relativen Geschwindigkeiten wurden gemäß Gleichung (1)^[1] gegen die Distanz des ET-Schrittes aufgetragen (Abb. 1).

$$k_{\text{ET,rel}} = A e^{-\beta \Delta r} \quad (1)$$

Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.97 wurde eine lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeit $\ln k_{\text{ET}}$ von der Distanz Δr des ET gefunden. Bemerkenswert ist, daß diese

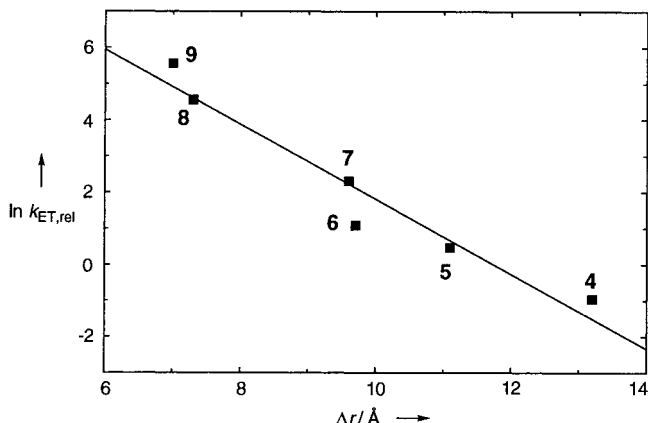


Abb. 1. Distanzabhängigkeit der ET-Geschwindigkeiten in DNA-Doppelsträngen. Die Zahlen an den Quadraten korrelieren mit den Nummern an den Pfeilen in Abbildung 2 und den Einträgen in Tabelle 1.

Korrelation auch gültig bleibt, wenn der ET vom komplementären Strang (Tabelle 1, Nr. 7) oder vom gespaltenen Strang (Tabelle 1, Nr. 4, 6 und 9) erfolgt (Abb. 2) oder wenn G zum Radikalkation benachbart oder durch T-Basen von diesem getrennt ist. Aus der Steigung ergibt sich ein β -Wert von $1.0 \pm 0.15 \text{ Å}^{-1}$. Dieser β -Wert bedeutet, daß die Geschwindigkeit des Elektronentransfers um den Faktor 10

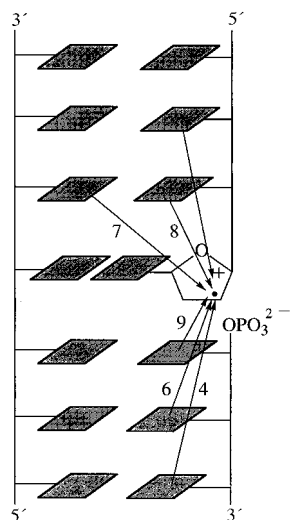


Abb. 2. Schematische Darstellung des ETs (Pfeile) zwischen G-Basen und dem Radikalkation im Zuckerphosphat-Rückgrat. Die Zahlen an den Pfeilen korrelieren mit den Zahlen in Abbildung 1 und den Einträgen in Tabelle 1.

abnimmt, wenn sich die Distanz um 2.5 Å vergrößert. Da diese Distanzabhängigkeit der von ET-Reaktionen in Proteinen ähnelt, kann gefolgert werden, daß der Ladungstransfer vom Radikalkation des Zuckerphosphat-Rückgrats zur G-Basis in DNA-Doppelsträngen nicht von der Stapelanordnung der Basen profitiert. Aus Konkurrenzexperimenten mit intermolekularen Elektronenüberträgern haben wir eine Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{H}_2\text{O}}$ von $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ abgeleitet.^[13] Damit ergibt sich für die Geschwindigkeitskonstante k_{ET} des Elektronentransfers von Guanin zu einem 7 Å entfernten Desoxyribose-Radikalkation **3** ein Wert von 10^8 s^{-1} (Tabelle 1, Nr. 8 und 9).^[14]

Der β -Wert von 1.0 Å^{-1} zeigt, daß ein im spontanen Strangbruch von 4'-DNA-Radikalen auftretendes Radikalkation **3** wirksam nur von direkt benachbarten G-Basen in DNA-Doppelsträngen abgefangen wird. Im Gegensatz dazu hat in einzelsträngiger DNA die Position von Desoxyguanosin im DNA-Strang nur einen geringen Einfluß auf die Geschwindigkeit des Elektronentransfers. Den Daten in Tabelle 1 (Nr. 3 und 8) ist zu entnehmen, daß die Trennung von G-Basis und Desoxyribose-Radikalkation **3** durch zwei Thyminreste eine Geschwindigkeitsabnahme um den Faktor 400 in doppelsträngiger DNA bewirkt, während die gleiche Variation der Basensequenz in einzelsträngiger DNA den ET nur um den Faktor 1.5 verlangsamt (Tabelle 1, Werte in Klammern). Offensichtlich sind Einzelstränge so flexibel, daß sie Konformationen einnehmen, in welchen die Distanz zwischen den G-Basen und dem Radikalkation **3** kurz genug für einen schnellen ET ist. Dieses Testsystem eröffnet somit neue Perspektiven zum Studium der Konformation und Flexibilität von DNA-Molekülen.

Experimentelles

Die Oligonucleotide wurden mit einem DNA-Synthesizer in $1 \mu\text{mol}$ -Ansätzen hergestellt. Dabei wurde eine Standardmethode für 2-Cyanethylphosphoramidite verwendet, wobei die Kupplungszeit des 4'-pivaloylmodifizierten Nucleosides auf 15 min verlängert wurde. Die Festphasen wurden in 1 mL konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung bei 55°C ca. 15 h inkubiert und anschließend zur Trockne lyophilisiert. Die extrahierten rohen Oligonucleotide wurden mit Anionenaustausch- und Umkehrphasen (RP)-HPLC gereinigt; zuletzt wurde das Oligonucleotid über eine kurze Sephadex-Säule gegeben. Die Circular dichroismus (CD)-Spektren der modifizierten Doppelstränge sind denen der unmodifizierten Doppelstränge sehr ähnlich und beweisen eine B-DNA-Konformation. Die Modifikation T^* erniedrigt die UV-Schmelztemperaturen (T_m) nur um $0-2 \text{ K}$. Bestrahlungsexperimente wurden in Polymethylmethacrylat-Küvetten bei 15°C unter Verwendung einer 500 W-Hg-Hochdrucklampe mit einem 320 nm -Cut-off-Filter durchgeführt. Eine Mischung aus 2.0 nmol modifiziertem Oligonucleotid und 2.4 nmol Gegenstrang wurde in $300 \mu\text{L}$ Puffer (20 mM Natriumcitrat pH 5.0 mit 100 mM NaCl) gelöst. Doppelstrangbildung wurde durch einminütiges Erhitzen auf 70°C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur gewährleistet. Vor der Photolyse wurden die Lösungen 30 min mit Argon gespült. Einzelstränge wurden 4 min und Doppelstränge 3 min bestrahlt. Die Analyse der Bestrahlungslösungen geschah mit RP-HPLC (Waters Symmetry C18, $3.5 \mu\text{m}$, $100 \times 4.6 \text{ mm}$) bei 260 nm . Eluent A: 0.1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) pH 7.0, Eluent B: Acetonitril. Ein typischer Gradient: 5% B für 2 min, dann in 60 min von 5% auf 13% B, Flußrate 1.5 mL min^{-1} , Säulentemperatur 30 oder 50°C . Die Peakflächen wurden durch die berechneten Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Oligonucleotide geteilt und mit externer Kalibrierung quantifiziert. Die Identität der Produkte wurde mit MALDI-ToF-Massenspektrometrie, enzymatischer Verdauung mit Analyse der Nucleotide und durch Vergleich von RP-HPLC-Retentionszeiten mit Referenzsubstanzen verifiziert.

Eingegangen am 25. September 1997 [Z10971]

Stichwörter: DNA-Spaltung • Elektronentransfer • Radikationen

- [1] a) R. J. P. Williams, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, 2, 373; b) S. S. Skourtis, D. N. Beratan, *ibid.* **1997**, 2, 378; c) O. Farver, I. Pecht, *ibid.* **1997**, 2, 387; d) C. C. Moser, C. C. Page, X. Chen, P. L. Dutton, *ibid.* **1997**, 2, 393; e) J. R. Winkler, H. B. Gray, *ibid.* **1997**, 2, 399, zit. Lit.

- [2] a) D. N. Beratan, S. Priyadarshy, S. M. Risser, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 3; b) E. K. Wilson, *Chem. Eng. News* **1997**, *75*(8), 33; c) T. L. Netzel, *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 646; d) G. Taubes, *Science* **1997**, *275*, 1420; e) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2411; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2317.
- [3] a) C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025; b) M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R. E. Holmlin, J. K. Barton, A. Hörmann, E. J. C. Olson, P. F. Barbara, *ibid.* **1996**, *273*, 475; c) D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, *382*, 731; d) M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. Coates-Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 389; e) P. J. Dandliker, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Science* **1997**, *275*, 1465; f) S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861; g) Übersicht: R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2830; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2715.
- [4] a) F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673; b) A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3656; c) A. M. Brun, A. Harriman, *ibid.* **1994**, *116*, 10383; d) T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 358; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 352.
- [5] a) C. von Sonntag, U. Hagen, A.-M. Schön-Bopp, D. Schulte-Frohlinde, *Adv. Radiat. Biol.* **1981**, *9*, 109; b) B. Giese, X. Beyrich-Graf, P. Erdmann, M. Petretta, U. Schwitter, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 367; c) A. Gugger, R. Batra, P. Rzaek, G. Rist, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8740.
- [6] GC-Basenpaare haben ein niedrigeres Oxidationspotential als AT-Basenpaare, siehe: H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7063; M. Hutter, T. Clark, *ibid.* **1996**, *118*, 7574. Beim oxidativen Angriff auf DNA werden hauptsächlich G-Basen oxidiert, siehe: D. T. Breslin, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2311; D. Ly, Y. Kan, B. Armitage, G. B. Schuster, *ibid.* **1996**, *118*, 8747; I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, *ibid.* **1995**, *117*, 6406; S. Steenken, S. V. Jovanovic, *ibid.* **1997**, *119*, 617.
- [7] G. L. Closs, J. R. Miller, *Science* **1988**, *240*, 440.
- [8] Im Zuge dieses ET-Schrittes muß G zum Radikalkation oxidiert werden. Es ist bekannt, daß dieses Radikalkation schnell zu einem wenig reaktiven, delokalisierten G-Radikal deprotoniert wird. Da wir keine Schädigung an G-Einheiten detektieren können, nehmen wir an, daß das G-Radikal unter anaeroben Bedingungen durch Wasserstoffabstraktion repariert wird. Zu Struktur, Reaktivität und Reparatur von Desoxyguanosin-Radikalkationen siehe: a) S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503; b) L. P. Candeias, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1094; c) S. V. Jovanovic, M. G. Simic, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1008*, 39.
- [9] Für die distanzabhängigen Experimente wurden GGG-Einheiten gewählt, da diese die stärksten Elektronendonatoren sind (siehe Lit.^[6]). Wir nehmen an, daß dasjenige G die anfänglich oxidierte Base ist, welches dem Radikalkation **3** am nächsten steht. Diese Annahme ist gerechtfertigt, da der Wechsel von einer G- zur GGG-Einheit sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung ungefähr den gleichen Beschleunigungseffekt (2.5 bzw. 1.8) auf die relative Elektronentransfergeschwindigkeit hat.
- [10] Zur Bestimmung der Distanzen Δr wurde der entsprechende DNA-Duplex mit dem Programm Macromodel V4.5 als B-Form konstruiert. Um das planare Radikalkation **3** nachzuahmen, haben wir den Enoether **5** mit dem implementierten AMBER*-Kraftfeld in die DNA hineinmodelliert. Distanzen Δr wurden zwischen dem Radikalkzentrum C3' des Radikalkations und dem Kohlenstoffatom 5 am G bestimmt, das die höchste Elektronendichte im HOMO hat.
- [11] Unabhängige Experimente mit Glutathiondiethylester als Abfänger für Radikal **6** haben gezeigt, daß unter anaeroben Bedingungen die Addition von Wasser an das Radikalkation **3** (**3** \rightarrow **6**) in G-freier DNA in ungefähr 70% Ausbeute erfolgt.
- [12] Wir haben das Verhältnis k_{ET}/k_{trap} aus den HPLC-Flächen (gewichtet mit den Extinktionskoeffizienten) von 5'-Phosphat **4** (A_4), dessen Menge gleich der Gesamtausbeute von Radikalkation **3** ist (Schema 1), und Enoether **5** (A_5) bestimmt. Das Verhältnis $A_5/(A_4 - A_5)$ entspricht k_{ET}/k_{trap} . Da diese Quotienten unabhängig vom Umsatz sind, sind die Reaktionen erster oder pseudo-erster Ordnung.
- [13] Wir haben Einelektronendonatoren wie Methionin, Selenomethionin, KI und $K_4[Fe(CN)_6]$ verwendet, um das Radikalkation **3** in Kon-

kurrenz zur Wasseraddition durch einen intermolekularen ET zu reduzieren. Es zeigte sich, daß KI der schnellste Abfänger für das Radikalkation **3** ist. Unter der Annahme, daß dieser Elektronentransfer nahezu diffusionskontrolliert geschieht, konnten wir in kinetischen Experimenten pseudo-erster Ordnung unter Verwendung unterschiedlicher Konzentration an KI einen Geschwindigkeitskoeffizienten k_{H_2O} von $10^6 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmen.

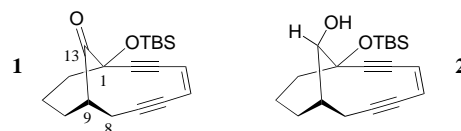
Anmerkung bei der Korrektur (2. Februar 1998): Ähnliche ET-Geschwindigkeiten bei einem Abstand von 7 Å wurden kürzlich berichtet: K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem.* **1988**, *110*, 167; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 158

Beschleunigte Cycloaromatisierung eines Bicyclo[7.3.1]-Endiins durch Anellierung: ungewöhnliche Abhängigkeit der Cyclisierung von der Hybridisierung des Brückenatoms**

Michael H. Nantz,* David K. Moss,
John D. Spence und Marilyn M. Olmstead

Endiine wie Calicheamicin und Esperamicin^[1] haben zu zahlreichen präparativen Arbeiten und mechanistischen Studien angeregt, die durchgeführt wurden, um die DNA-Spaltung durch diese Verbindungen zu verstehen.^[2] Neben natürlichem Calicheamicin γ_1 ^[3] wurden auch viele Mimetika synthetisiert, die ebenfalls die für die biologische Aktivität verantwortliche Schlüsselreaktion eingehen,^[4] die Bergman-Cycloaromatisierung^[5] der 1,5-Diin-3-en-Einheit.

Besonders faszinierte uns die Arbeit von Magnus et al., die erstmals die Reaktivität von Bicyclo[7.3.1]-Endiin-Analoga bestimmten:^[6] Das Bicyclo[7.3.1]-System von **1** geht bei Raumtemperatur keine Endiin-Cycloaromatisierung ein und reagiert erst bei 71 °C langsam^[7] zum entsprechenden C(2)-C(7)-Benzolderivat. Eine Änderung der Hybridisierung an



der C(13)-Brücke von sp^2 nach sp^3 (**1** \rightarrow **2**) hat aber einen drastischen Anstieg der Cyclisierungsgeschwindigkeit zur Folge.^[8] Die unterschiedliche Cyclisierungsneigung der beiden Verbindungen wurde einer Verringerung der Ringspannung zugeschrieben. Auf der Grundlage dieser Hypothese könnte man sich eine Bicyclo[7.3.1]-Modellverbindung vorstellen, bei der die Umhybridisierung an der C(13)-Brücke durch eine intramolekulare Reaktion erfolgt, in Analogie zum Aktivierungsmodus der natürlichen Endiine.^[9]

[*] Prof. Dr. M. H. Nantz, D. K. Moss, J. D. Spence,
Dr. M. M. Olmstead
Department of Chemistry, University of California
Davis, CA 95616 (USA)
Telefax: Int. +916/752-8995
E-mail: mhnantz@ucdavis.edu

[**] Wir danken dem Cancer Research Coordinating Committee der University of California für finanzielle Unterstützung.