

- [3] Für Beispiele siehe E. N. Jacobsen in *Comprehensive Organometallic Chemistry II, Vol. 12* (Hrsg.: G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel, L. S. Hegedus), Pergamon, New York, 1995, S. 1097, zit. Lit.
- [4] Experimentelle Einzelheiten zur Synthese der Bibliothek sind in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [5] Für jede hergestellte Metallbibliothek wurde das Lösungsvolumen so gewählt, daß zumindest zwei Äquivalente der Metallionenquelle für die Komplexbildung zur Verfügung standen.
- [6] Ein jüngster Fortschritt im Screening von Katalysatorbibliotheken ist der Einsatz von thermographischen Methoden zur Abbildung der Wärmetönung, die durch exotherme Reaktionen an den reaktiven Zentren freigesetzt wird; dadurch wird es möglich, polymergebundene Katalysatoren von Gruppen inaktiver Strukturen zu unterscheiden. S. J. Taylor, J. P. Morken, *Science* **1998**, *280*, 267–270; siehe auch M. T. Reetz, M. H. Becker, K. M. Kühling, A. Holzwarth, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2792–2795; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2647–2650.
- [7] Da die Aktivität der Metallbibliothek sowohl von der Effizienz als auch von der Zahl der enthaltenen Katalysatoren herrührren könnte, wurden alle Oxidationsmittel, die eine nachweisbare Epoxidierungsaktivität aufwiesen, dem hier beschriebenen Dekonvolutionsprozeß unterzogen. Neben H_2O_2 (aq) erwies sich auch wasserfreies *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) als effektiv, obwohl ein vollkommen anderer Satz an aktiven Metallen erhalten wurde (worüber an anderer Stelle berichtet werden wird). Keine Epoxidierungsaktivität wurde für Oxidantien wie O_2 , $NaIO_4$, 4-Phenylpyridin-N-oxid (4-PPNO) und *N*-Methylmorpholin-N-oxid (NMO) festgestellt.
- [8] Nichtsdestotrotz wurde über einige Beispiele berichtet: a) C. Bolm, D. Kadereit, M. Valacchi, *Synlett*, **1997**, *6*, 687–688; b) D. E. De Vos, B. F. Sels, M. Reynaers, Y. V. Subba Rao, P. A. Jacobs, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3221–3224; c) W. A. Herrmann, R. W. Fischer, D. W. Marz, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1706–1708; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1638–1641; d) A. M. Al-Ajlouni, J. H. Espenson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9243–9250; e) J. Rudolph, K. Reddy, J. P. Chiang, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6189–6190; f) K. Sato, M. Aoki, M. Ogawa, T. Hashimoto, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8310–8311; g) T. G. Traylor, S. Tsuchiya, Y. S. Byun, C. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2775–2781; h) P. Pietikainen, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4319–4326; i) T. Schwenkreis, A. Berkessel, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *30*, 4785–4788.
- [9] 1 mg einer Bibliotheksprobe (entspricht zehn kompletten Liganden-sätzen) wurden untersucht.
- [10] Viele andere Metall-Ligand-Bibliotheken geben eine Vielfalt von Nichteoxidprodukten oder katalysierten die unproduktive Disproportionierung von H_2O_2 zu O_2 und Wasser.
- [11] Die einfache Synthese von parallelen Ligandbibliotheken wurde mit einem IRORI-gesteuerten Synthesesystem durchgeführt.
- [12] Siehe Hintergrundinformationen.
- [13] Wie erwartet weisen fast alle 96 $FeCl_2$ -Komplexe gute Epoxidierungsaktivität auf, was bestätigt, daß **18** und **19** Katalysatorleitstrukturen sind. Liganden, die mit der Endgruppe **32** hergestellt worden waren, sind generell weniger reaktiv, was darauf schließen lässt, daß die richtige Anordnung des Pyridinrings zur Peptidkette von entscheidender Bedeutung ist.
- [14] Da die Immobilisierung dieser Katalysatoren an einen polymeren Träger die Aktivität beeinflussen dürfte, werden gegenwärtig lösliche Varianten untersucht, worüber an anderer Stelle berichtet werden wird.

Weitreichender Elektronentransfer durch DNA-Filme*

Shana O. Kelley, Nicole M. Jackson, Michael G. Hill* und Jacqueline K. Barton*

Seit der Entdeckung der DNA-Doppelhelix wird über die Effizienz des Ladungstransports durch die DNA diskutiert.^[1–2] Der photoinduzierte Elektronentransfer zwischen Reaktionspartnern, die an die DNA gebunden sind, oder zwischen Basen, die im π -Stapel der DNA enthalten sind, hat zu kontroversen Ansichten darüber geführt, ob die DNA als Medium für einen weitreichenden Ladungstransport dienen kann.^[3–5] Bei Spezies mit einer perfekten π -Stapelung der Basenpaare innerhalb der Helix ist übereinstimmend ein bemerkenswert schneller Elektronentransfer über große Entfernungen möglich.^[3] Die Integrität des Basenstapels scheint eine notwendige Voraussetzung für einen effizienten Elektronentransfer zu sein, denn Störungen des π -Stapels durch Fehlpaarungen oder ungepaarte Basen verringern die Geschwindigkeit des DNA-vermittelten Ladungstransportes erheblich.^[3, 6]

Um die Kinetik des Elektronentransfers durch selbstorganisierte Monoschichten auf festen Oberflächen zu untersuchen, wurden etliche elektrochemische Experimente durchgeführt.^[7] Systeme mit redoxaktiven Endgruppen, die durch aliphatische Alkanthiole oder angeknüpfte Linker in variablen Abständen fixiert sind, haben zu wichtigen Erkenntnissen darüber geführt, ob bestimmte Medien die elektronische Kopplung über weite Entfernungen unterstützen. Wir haben diese Methoden angewendet, um redoxaktive Intercalatoren zu studieren, die an definierten Stellen einzelner DNA-Helices gebunden sind. Die DNA war dabei als Monoschicht auf Gold angeordnet. Ziel der Untersuchungen war es, den DNA-vermittelten Elektronentransfer mit Reaktionspartnern, die sich im Grundzustand befinden, zu untersuchen.

Zuvor hatten wir Methoden entwickelt, um DNA-Duplexe, die am 5'-Ende mit einer thiolhaltigen Verbindung derivatisiert worden sind, auf einer Goldoberfläche anzuordnen.^[8, 9] Elektrochemische Versuche, Experimente mit radioaktiven Markierungen und Kraftmikroskopie(AFM)-Untersuchungen ergaben, daß die Duplexe dicht gepackte Monoschichten auf Gold bilden und dabei in einer aufrechten Position

[*] Prof. Dr. M. G. Hill, N. M. Jackson
Department of Chemistry
Occidental College
Los Angeles, CA 90041 (USA)
Fax: (+1) 323-341-4912
E-mail: mgh@oxy.edu

Prof. Dr. J. K. Barton, Dr. S. O. Kelley
Beckman Institute and
Division of Chemistry and Chemical Engineering
California Institute of Technology
Pasadena, CA 91125 (USA)
Fax: (+1) 626-577-4976
E-mail: jkbarton@cco.caltech.edu

[**] Wir danken der Camille and Henry Dreyfus Foundation (Faculty Start-up Grant für M.G.H.), der Research Cooperation (M.G.H.) und den NIH (GM49216 für J.K.B., Doktorandenstipendium für S.O.K.). Ferner danken wir Dr. M. J. Allen für die Hilfe bei den AFM-Messungen und Prof. F. C. Anson für hilfreiche Diskussionen.

angeordnet sind.^[9, 10] Ganz anders verhält es sich dagegen mit Monoschichten aus einzelsträngiger DNA, denn in diesem Fall liegen die Oligonukleotidstränge flach auf der Goldoberfläche.^[11]

Elektroden, die mit Duplexen modifiziert worden sind, haben eine sehr hohe Affinität zu DNA-bindenden Substanzen und unterstützen außerdem den effizienten Elektronentransfer zwischen der Elektrode und Intercalatoren, die nichtkovalent an die Helix gebunden sind.^[8] Weil die exakte Bindungsstelle der Intercalatoren nicht eindeutig festgelegt wurde, ermöglichen vorherige Untersuchungen keine exakte Bestimmung der Entfernungsabhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransfers durch die DNA.

Wir haben an definierten Stellen einen redoxaktiven Intercalator, Daunomycin (DM),^[12] in DNA-Filme eingebaut, um den Ladungstransport durch die DNA in Abhängigkeit von der Entfernung zu untersuchen (Abbildung 1). DM kann innerhalb der Potentialgrenzen der Monoschicht^[8] reversibel reduziert werden.^[13] Kovalente Addukte, bei denen intercaliertes DM mit der 2'-Aminogruppe von Guanin^[14a] quervernetzt ist, wurden kristallographisch charakterisiert.^[14b] Durch den Einbau von einzelnen G-C-Basenpaaren in Stränge, die sonst nur A-T- oder Inosin(I)-C-Sequenzen enthielten, wurde die Intercalationsstelle festgelegt. Die Bindung von DM wird genau an diesen Stellen erzwungen, weil das N2-Atom von Guanin für ein erfolgreiches kovalentes Quervernetzen unbedingt notwendig ist. Durch Verschiebung der Einbaustelle des G-C-Basenpaares innerhalb der Duplexsequenz wird die Grundlage für die systematische Variation des Abstandes der Daunomycin-Bindungsstelle zum thiolhaltigen Terminus geschaffen. Nachdem DM in Lösung an die DNA geknüpft worden war, wurden die markierten Duplexe einer Goldoberfläche ausgesetzt. Dadurch wurde eine Reihe von Filmen erhalten, in denen der Intercalator vollständig in einer bekannten Entfernung von der Elektrodenoberfläche angeschlossen ist (Abbildung 2).

Die AFM-Bilder von Filmen aus Duplexen, die 15 Basenpaare enthielten und mit DM markiert waren, erwiesen sich als identisch mit denen von unmarkierter DNA.^[9] Diese Bilder ließen bei unterbrochenem Stromkreislauf eine dicht gepackte Monoschicht mit einer Höhe >45 Å erkennen. Zyklovoltammetrische Experimente mit diesen Elektroden ergaben einerseits die reversible Reduktion von DM bei -0.65 V gegen die gesättigte Kalomelektrode (SCE)^[12] und andererseits die typischen elektrochemischen Merkmale einer Oberflächengebundenen Spezies, z.B. den linearen

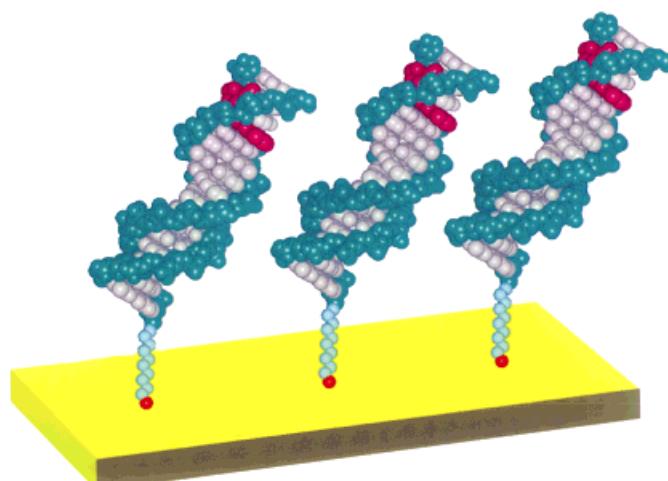


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Goldoberfläche mit den thiolmodifizierten Duplexen, die 15 Basenpaare sowie die Daunomycin-Guanin-Quervernetzung enthalten. Die Größen aller Komponenten (DNA-Basenstapel: grau, Zuckerphosphat-Rückgrat: grün, Daunomycin: magenta, Linker: blau, terminales Thiol: rot) sind in den korrekten Proportionen abgebildet. Die dargestellten Helices sind mit einem Winkel von ca. 70° zur Goldoberfläche geneigt; dies ergibt einen direkten Abstand von ca. 50 Å zwischen DM (zentrale Molekülebene) und der Elektrode.

Zusammenhang zwischen Spannung und Durchlaufgeschwindigkeit.^[15] Die Integration der elektrochemischen Signale ergab eine mittlere Bedeckung der Oberfläche (Γ) durch elektroaktives DM zwischen 60 und 75 pmol cm⁻². Diese Werte stimmen gut mit den Bedeckungsdichten überein, die zuvor mit ³²P-markierter DNA, die 15 Basenpaare enthielt, gemessen wurden.^[8, 16, 17] Ausgehend von einer 1:1-Zusammensetzung zwischen DM und DNA, die durch UV/Vis-Spektroskopie bestätigt wurde, deuten diese Daten darauf

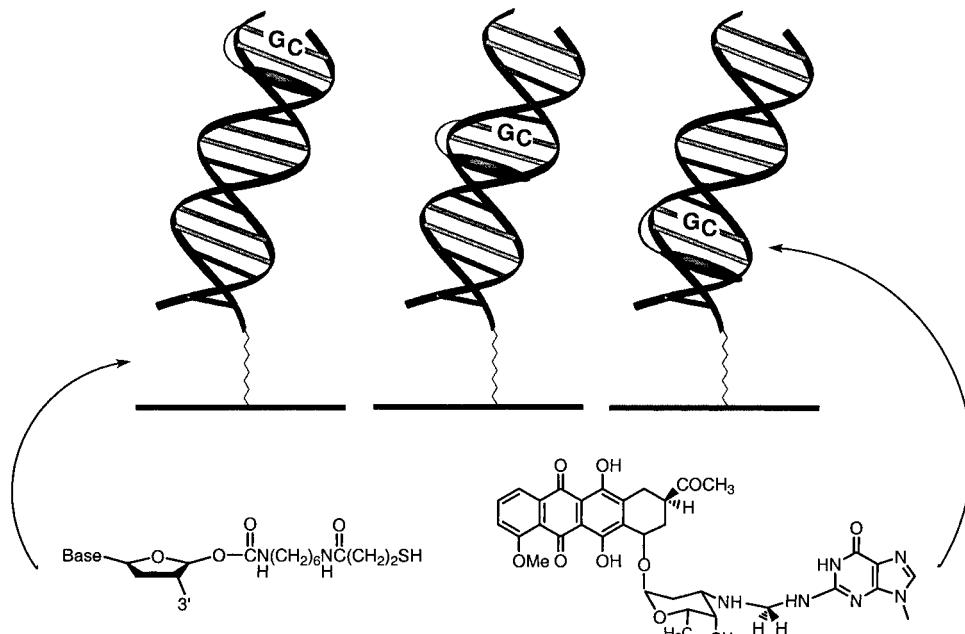


Abbildung 2. Schematische Darstellung der DNA-Duplexe, die für die entfernungsabhängigen Untersuchungen verwendet wurden. Unten ist die Daunomycin-Guanin-Quervernetzung dargestellt (rechts) und der Thiollinker, der den Duplex an die Elektrodenoberfläche bindet (links). Dieser Linker enthält 16 σ -Bindungen zwischen der Elektrode und dem Basenstapel.

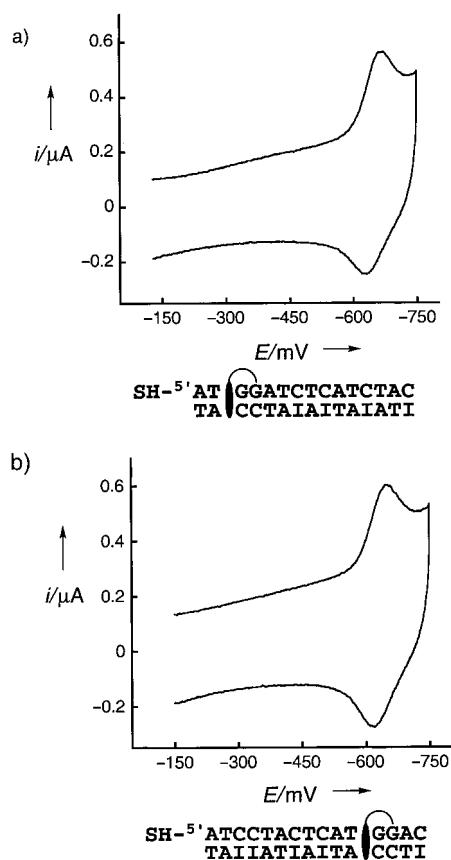


Abbildung 3. Zyklovoltammogramme, aufgenommen mit den Goldelektroden, die mit den DM-quervernetzten und thiolterminierten Duplexen modifiziert waren: a) SH-5'ATGGATCTCATCTAC + Inosin enthaltender Komplementärstrang und b) SH-5'ATCCTACTCATGGAC + Inosin enthaltender Komplementärstrang; **G** kennzeichnet die Stelle der Quervernetzung. Für diese beiden Duplexe wurde die Bedeckungsdichte der Oberfläche durch die Integration der Spannung der Voltammogramme bestimmt: 0.65×10^{-10} bzw. $0.75 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Das Verhältnis DM:DNA, das durch Absorptionsspektroskopie ermittelt wurde, betrug 0.9:1 bzw. 1.1:1. Folglich hängt die Ladung nicht von der Entfernung ab, repräsentiert aber die Ausbeute der Quervernetzung.

hin, daß alle der gebundenen DM-Moleküle auf der modifizierten Oberfläche elektrochemisch reduziert wurden. Wenn die Filme mit einem steigenden prozentualen Gehalt an DM-freien Duplexen präpariert wurden, wurde eine lineare Abschwächung des elektrochemischen Signals festgestellt. Das bedeutet, daß jedes gebundene Molekül des Intercalators einzeln elektrochemisch aktiv ist.

Bemerkenswerterweise fand die effiziente Reduktion von DM unabhängig von dessen Position in der 15 Basenpaare enthaltenden Sequenz statt (Abbildung 3).^[18] Nicht nur die Intensitäten des DM-Signals waren bei allen untersuchten Duplexen innerhalb der Reihe gleich, sondern darüber hinaus auch die charakteristischen Aufspaltungen zwischen den kathodischen und anodischen Signalen in Abhängigkeit von der Durchlaufgeschwindigkeit (Abbildung 4). Es wird unter Berücksichtigung der Auflösung innerhalb dieses Experiments deutlich, daß eine größere Entfernung zwischen DM, das an die DNA-Helix gebunden ist, und der Goldoberfläche die Geschwindigkeit des Elektronentransfers nicht signifikant verändert.

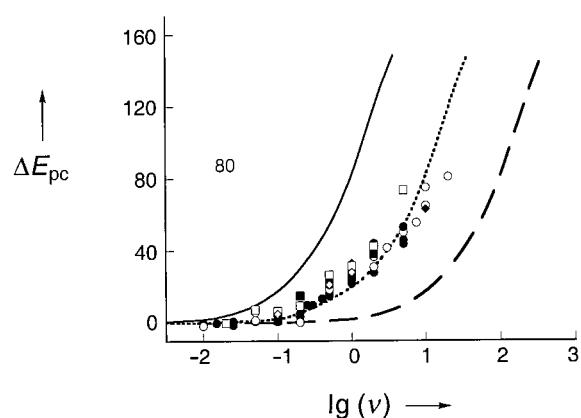


Abbildung 4. Auftragung der Signalaufspaltung ($\Delta E_{pc} = E_{pc} - E^0$) gegen $\lg(v)$ (v = Durchlaufgeschwindigkeit). Die Messungen wurden mit den folgenden Duplexen durchgeführt: (●) SH-5'ATGGATCTCATCTAC (+ Inosin enthaltender Komplementärstrang), (○) SH-5'ATCCTACTCATGGAC (+ Inosin enthaltender Komplementärstrang), (▲) SH-5'GCATTATATAATTAA (+ Komplementärstrang), (□) SH-5'ATATGC-TATAATTAA (+ Komplementärstrang), (◆) SH-5'ATTATATAATTGCT (+ Komplementärstrang), (■) SH-5'ATTATATAATTGCT (+ Komplementärstrang). Zum Vergleich sind die simulierten Kurven^[34] für unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten gezeigt ($k \approx 10^1 \text{ s}^{-1}$ (—), 10^2 s^{-1} (•••), 10^3 s^{-1} (---)). IR-Kompensierung wurde bei Durchlaufgeschwindigkeiten $> 1 \text{ V s}^{-1}$ angewendet.

Vorausgesetzt, der Elektronentransfer erfolgt durch die Doppelhelix, deuten diese Resultate auf einen außergewöhnlich effizienten Ladungstransport durch die DNA hin. Daraus läßt sich außerdem schließen, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt das Tunneln durch den σ -gebundenen Thiolinker ist. Einerseits würde eine schwache Entfernungsabhängigkeit durch den π -Stapel im Einklang mit den Resultaten des photoinduzierten Elektronentransfers zwischen Intercalatoren und anderen perfekt gestapelten Spezies^[3] sein. Andererseits würde sich dieses Resultat deutlich von den Ergebnissen analoger Untersuchungen unterscheiden, bei denen die Reaktionspartner kaum oder überhaupt nicht in den Basenstapel intercaliert waren;^[4] dabei werden für β (die Abnahme der elektronischen Kopplung in Abhängigkeit von der Entfernung)^[19] Werte von $0.6\text{--}1.4 \text{ \AA}^{-1}$ angegeben. Wir weisen darauf hin, daß β nur ein empirischer Wert für die Entfernungsabhängigkeit ist. In unserem System würde ein β -Wert von 1.4 \AA^{-1} bedeuten, daß die Geschwindigkeit des Elektronentransfers zwischen den beiden Sequenzen, die in Abbildung 3 dargestellt sind, um 15 Größenordnungen vermindert sein sollte. Entsprechend sollten sich bei einem β -Wert von 0.6 \AA^{-1} die erwähnten Geschwindigkeiten um mehr als 6 Größenordnungen unterscheiden. Solche großen Veränderungen sind nicht im Einklang mit unseren Daten; ein β -Wert von 0.1 \AA^{-1} würde einen Unterschied von nur einer Größenordnung für die beiden erwähnten Duplexe ergeben. Diese Differenz ist mit unserer Analytik kaum nachweisbar.

Könnte ein alternativer „Gating“-Mechanismus für die fehlende Entfernungsabhängigkeit, die in diesen Experimenten beobachtet wurde, verantwortlich sein? Wir zogen sowohl dynamische Prozesse^[21] in Betracht, die das intercalierte DM in direkten Kontakt mit der Metallooberfläche bringen könnten, als auch Diffusionsmechanismen, bei denen sich die

Ladung, ausgehend von lokalen Anziehungspunkten (z.B. Defektstellen), an denen das DM-Molekül in engem Kontakt zur Elektrode steht, lateral durch den Film bewegt. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, stellten wir eine Reihe von Filmen her, die zwar wirksame Störungen im Basenstapel der einzelnen Helices enthielten, sonst aber die Überstruktur der DNA-Monoschicht behielten. Ein Transferpfad durch die DNA würde in signifikant verlangsamten Geschwindigkeiten des Elektronentransfers zum DM-Molekül resultieren. In diesem Fall würden dynamische Mechanismen oder Diffusionsprozesse dagegen weitgehend unveränderte Geschwindigkeiten zur Folge haben.

Für diese Untersuchungen wurde eine einzelne Stelle innerhalb des 15 Basenpaare enthaltenden Duplex mutiert, so daß eine C-A-Fehlpaarung zwischen dem intercalierten DM und der Elektrodenoberfläche entstand. Es ist bekannt, daß C-A-Fehlpaarungen nur lokale Störungen des DNA-Basenstapels verursachen – die Basen bleiben intrahelical^[22] –, doch wurde bereits gezeigt, daß die Anwesenheit von dazwischenliegenden Fehlpaarungen die Geschwindigkeit des photoinduzierten Elektronentransfers durch die DNA verringert.^[3, 23] Tatsächlich schaltete diese Veränderung einer Base das elektrochemische Ansprechen vollständig aus (Abbildung 5).^[24] Bemerkenswerterweise wurde bei Sequenzen,

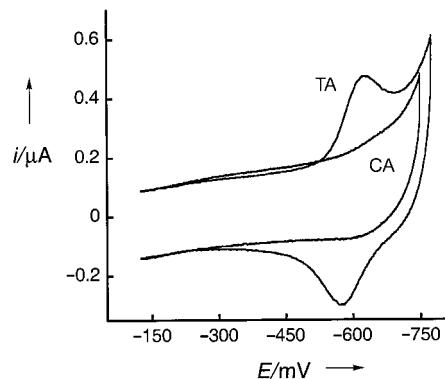


Abbildung 5. Zyklovoltammogramme, aufgenommen mit den Goldelektroden, die mit DM-quervernetzten und thiolterminierten Duplexen mit T-A- und C-A-Basenpaaren modifiziert waren. Sequenz: SH-⁵ATTATA-TAATTGCT, wobei der Komplementärstrang entweder T oder G gegenüber dem kursiv gesetzten A enthält.

in denen die Position von DM und die C-A-Fehlpaarung umgekehrt wurde (d. h., die Fehlpaarung lag relativ zur Goldoberfläche oberhalb des DM-Moleküls), keine Veränderung des elektrochemischen Ansprechens festgestellt. Darüber hinaus waren AFM-Bilder der C-A-mutierten Sequenzen von denen der korrekt gepaarten Analoga nicht unterscheidbar. Dies bedeutet, daß die Grobstruktur des DNA-Films durch die Anwesenheit der Fehlpaarung nicht signifikant verändert wurde.^[25]

Zur Untersuchung einer eventuellen lateralen Ladungsbewegung wurde eine Reihe von Monoschichten mit einem zunehmenden Anteil von Helices versetzt, die C-A-Fehlpaarungen enthielten: In allen Fällen nahm das elektrochemische Signal linear mit ansteigendem prozentualen Gehalt der mutierten Duplex ab. Dieser lineare Zusammenhang deutet

darauf hin, daß elektroinaktive Intercalatoren (vermutlich diejenigen Moleküle, die an Duplexe mit Fehlpaarungen gebunden waren) durch elektroaktive Spezies nicht reduziert werden. Offensichtlich ist die laterale Ladungsdiffusion ziemlich langsam.

Die Beobachtung eines verlangsamten elektrochemischen Ansprechens in Anwesenheit einer Punktmutation bedeutet, daß der Elektronentransfer durch die Basenstapel erfolgt. Die Möglichkeit, solche Mutationen zu detektieren, wäre vielversprechend für die Entwicklung von Biosensoren auf DNA-Basis. Es wurden schon viele elektrochemische Sensoren entwickelt, die auf Signalen in Abhängigkeit von der Hybridisierung basierten.^[26] Dagegen bietet die beschriebene Empfindlichkeit im Hinblick auf Fehlpaarungen einzelner Basen einen alternativen Ansatz, um Mutationen in DNA-Sequenzen zu entdecken. Die Anwendung unter Verwendung von nicht quervernetzten Systemen wird gegenwärtig untersucht.^[27]

Die DNA als ein Medium für Elektronentransfer war Gegenstand intensiver Diskussionen,^[3-6, 28] und das Ausmaß der Ladungsdelokalisierung innerhalb der DNA hat grundlegende biologische Bedeutungen.^[1] Wir haben hier einen weitreichenden Ladungstransport durch DNA-modifizierte Filme in einer Reihe strukturell charakterisierter Anordnungen beschrieben. Die kürzlich entdeckte Leitfähigkeit entlang der Richtung des Basenstapels in orientierten DNA-Filmen^[29] liefert zusammen mit der neuen Beobachtung des weitreichenden Elektronentransfers zu einer intercalierten Spezies im Grundzustand deutliche Hinweise darauf, daß sich der DNA-Basenstapel wie ein Leitungsdräht verhält.

Experimentelles

Herstellung der DNA-modifizierten Oberflächen: Die Goldoberflächen wurden, wie zuvor beschrieben,^[8] derivatisiert. Oligonukleotide aus 15 Basenpaaren, die auf einer Festphase (controlled pore glass) immobilisiert waren, wurden vor der Abspaltung von der Festphase am 5'-Ende nacheinander mit Carboxyldiimidazol und 1,6-Diaminohexan (1 g pro 10 mL Dioxan, jeweils 30 min) behandelt.^[30] Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurde das freie Amin mit 2-Pyridylthiopropionsäure-N-succinimidester umgesetzt, um das Disulfid zu erhalten.^[31] Die Sequenzen wurden durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt, mit Dithiothreit in die freien Thiole überführt und vor der Hybridisierung mit den komplementären Strängen nochmals gereinigt. Die derivatisierten Oligonukleotide wurden durch matrixunterstützte Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) und ihre HPLC-Retentionszeiten charakterisiert. Vor der Anlagerung an die Goldoberfläche wurde die Anwesenheit des freien Thiols durch einen spektroskopischen Test basierend auf Disulfanylnitrobenzol bestätigt.^[32]

Die thiolterminierten Duplexe (0.1 mM), die ein benachbartes Guaninpaar enthielten, wurden hybridisiert, in 0.2proz. Formalin und 0.2 mM DM in 100 mM Phosphat (pH 7) 1 h inkubiert und danach mit Phenol extrahiert, um den Überschuß an DM zu entfernen. Die Proben wurden durch Gelfiltration gereinigt und in Gegenwart von 100 mM MgCl₂ 12–24 h einer Goldoberfläche ausgesetzt. Vor der Anlagerung wurde die Elektrodenoberfläche durch mechanisches Polieren mit Aluminiumoxid, durch Ultraschall und durch oxidatives Ätzen in einer sauren Lösung präpariert. Die Stöchiometrie der DM-Quervernetzung wurde durch den Vergleich der Absorption der DNA und des intercalierten DM verfolgt; für alle Sequenzen wurde ein Molekül DM pro Duplex festgestellt.^[33] Die Oberflächenstruktur der DM-markierten Filme wurde, wie bereits beschrieben,^[19] durch Kraftmikroskopie bestimmt.

Elektrochemische Messungen: Zyklovoltammetrische Messungen wurden auf einer 0.02 cm² großen polykristallinen Goldelektrode bei 20 ± 2 °C in

100 mM Phosphatpuffer (pH 7) durchgeführt (Gerät: Model CV-50W, Bioanalytical Systems). Es wurde eine Drei-Elektroden-Anordnung verwendet, bestehend aus einer modifizierten Goldarbeitselektrode (ca. 0.03 cm²), einer SCE-Referenzelektrode (Fisher Scientific) und einer Platindraht-Hilfselektrode. Der Bereich der Arbeitselektrode innerhalb der elektrochemischen Zelle wurde durch eine modifizierte Luggin-Kapillare vom Bereich der Referenzelektrode getrennt. Alle Potentiale sind gegen SCE angegeben. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden wie zuvor beschrieben ermittelt.^[8, 34] Außerdem wurden Messungen mit einer modifizierten Gold(111)-Oberfläche durchgeführt, die entweder durch Aufdampfen von Gold auf Glimmer oder durch Schmelzen (mit einer Wasserstoffflamme) einer Goldspitze in eine kleine Kugel (Ø ca. 2 mm) präpariert wurde. Außer einer kleinen Verringerung der voltammetrischen Peakbreiten (ca. 5–10 mV) waren die Signale für beide Elektroden (polykristallin oder Au(111)) ähnlich.

Ein eingegangen am 15. Oktober 1998 [Z 12531]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 941–945

Stichwörter: Biosensoren · DNA · Dünne Filme · Elektronentransfer · Monoschichten · Cyclovoltammetrie

- [1] A. Szent-Györgyi, *Nature* **1941**, *148*, 157.
 [2] R. S. Snart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1960**, *6*, 1444.
 [3] a) R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2830; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2714; b) S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861; c) S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 413; d) S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, *283*, 375.
 [4] a) F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673; b) K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 167; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 158; c) T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 358; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 352.
 [5] a) E. Meggers, D. Kusch, M. Spichty, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 474; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 460; b) E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950.
 [6] a) D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, *382*, 731; b) P. J. Dandliker, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Science* **1997**, *275*, 1465; c) D. B. Hall, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5045; d) M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 389.
 [7] a) T. T. Li, M. J. Weaver, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6107; b) C. E. D. Chidsey, C. R. Bertozzi, T. M. Putvinski, A. M. Muisce, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4301; c) H. O. Finkle, D. D. Hanshew, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3173; d) K. Weber, S. E. Creager, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3164; e) S. B. Sachs, S. P. Dudek, R. P. Hsung, L. R. Sita, J. F. Smalley, M. D. Newton, S. W. Feldberg, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10563.
 [8] S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 31.
 [9] S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, L. McPherson, A. Potter, E. M. Spain, M. J. Allen, M. G. Hill, *Langmuir* **1998**, *14*, 6781.
 [10] Die AFM-Untersuchungen^[9] wurden unter elektrochemischer Kontrolle durchgeführt und ergaben, daß sich die Struktur der DNA-Filme in Abhängigkeit vom Potential verändert. Bei unterbrochenem Stromkreislauf beträgt die Höhe des Filmes 45(3) Å. Unter Berücksichtigung der anisotropen Dimensionen der 15 Basenpaare enthaltenden Duplexe (20 Å Durchmesser, 60 Å Länge) deutet die gemessene Dicke des Filmes darauf hin, daß die Helixachse um etwa 45° zur Goldoberfläche geneigt ist. Bei angelegter negativer Spannung in Höhe des Potentials der Nullladung wurde eine Filmdicke von ca. 60 Å beobachtet; positivere Potentiale verursachen bei geringen Bedeckungsgraden der Oberfläche einen Verlust der Filmdicke bis zu einem Grenzwert von 20 Å.
 [11] R. Leviky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, S. K. Satija, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9787.
 [12] F. Arcamone, *Doxorubicin: Anticancer Antibiotics*, Academic Press, New York, **1981**.
 [13] a) C. Molinier-Jumel, B. Malfoy, J. A. Reynaud, G. Aubel-Sadron, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *84*, 441; b) H. Berg, G. Horn, U. Luthardt, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, *8*, 537.
 [14] a) F. Leng, R. Savkur, I. Fokt, T. Przewloka, W. Priebe, J. B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4732; b) A. H.-J. Wang, Y.-G. Gao, Y.-C. Liaw, Y.-K. Li, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3812.
 [15] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, Wiley, New York, **1980**.
 [16] Basierend auf der Querschnittsfläche der DNA (ca. 3 nm²) und der Fläche der Goldoberfläche (0.03 cm²) wurde die maximale Bedeckungsdichte der Oberfläche mit DNA zu etwa 6×10^{-11} mol cm⁻² bestimmt. Der Γ -Wert für DM ist etwas größer als der theoretisch zu erwartende Γ -Wert für DNA, was wahrscheinlich eine Folge von Unebenheiten der Elektrodenoberfläche ist.
 [17] Um routinemäßig die Bedeckungsdichte der Oberfläche durch DM-derivatisierte DNA auf Gold zu bestimmen, wurde das elektrochemische Ansprechen von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (2 mM) untersucht. Dieses Anion wird von der modifizierten Elektrodenoberfläche durch die polyanionische DNA abgestoßen und ergibt daher kein Signal, wenn die Oberfläche durchgehend bedeckt ist. Zwar stellt diese Methode keine direkte Messung der Bedeckungsdichte der Oberfläche dar, doch ermöglicht dieser Versuch die Untersuchung im Hinblick auf eine adäquate Modifizierung. Weil die Prozedur der Modifizierung der Elektrode nicht immer zu einer einheitlichen Bedeckungsdichte der Oberfläche führt, wurden die Elektroden anhand der Integration der Spannung für die DM-Reduktion und des Ferrocyanid-Tests untersucht, und nur diejenigen wurden verwendet, die gleichmäßig bedeckt erschienen.
 [18] Unter Berücksichtigung der Annahme, daß DM an demjenigen Ende der Duplexe gebunden ist, das der Elektrode am nächsten liegt (Abbildung 3a), und basierend auf Molecular-Modeling-Studien beträgt der Abstand zwischen DM-Molekül und der Elektrode durch die DNA-Helix hindurch > 10 Å; wenn der Intercalator an demjenigen Ende der DNA gebunden ist, das am weitesten von der Elektrode entfernt ist, beträgt der Abstand > 35 Å (Abbildung 3b).
 [19] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265.
 [20] Diskussion möglicher Mechanismen: a) A. K. Felts, W. T. Pollard, R. A. Freisner, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 2929; b) S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 196; c) J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759; d) A. Okada, V. Chernyak, S. Mukamel, *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 1241; e) E. S. Chen, E. C. M. Chen, *Bioelect. Bioenerg.* **1998**, *46*, 15.
 [21] Siehe z.B.: Z. Q. Feng, S. Imabayashi, T. Kakiuchi, K. Niki, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *408*, 15.
 [22] a) D. J. Patel, S. A. Kozlowski, S. Ikuta, K. Itakura, *FASEB J.* **1984**, *11*, 2664; b) F. Aboul-ela, D. Koh, I. Tinoco, F. H. Martin, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 4811.
 [23] T. Ihara, J. Takata, H. Takagi, *Anal. Chim. Acta* **1998**, *365*, 49.
 [24] Die Coulometrie von DM an Elektroden, die mit Duplexen modifiziert waren, die C-A-Basenpaare enthielten, variierte bis zu einem gewissen Grad aufgrund der Abhängigkeit von der Bedeckungsdichte. Bei hohen Bedeckungsdichten (die durch den Ferrocyanid-Versuch bestimmt wurden) wurde konsequenterweise kein Signal mit den Duplexen erhalten, die Fehlpaarungen enthielten. Bei mäßiger Bedeckungsdichte jedoch wurden geringe Signale gemessen, die sich auf die entsprechende Reduktion von DM zurückführen ließen. Diese Signale überschritten üblicherweise nie 30 % der Signalthöhe, die mit Duplexen erhalten wurden, die T-A-Paarungen enthielten. Die Morphologie der partiellen DNA-Monoschichten ist unbekannt.
 [25] Bei unterbrochenem Stromkreislauf ergaben AFM-Messungen sowohl für Duplexe, die C-A-Paarungen enthielten, als auch für solche, die T-A-Paarungen enthielten, eine Dicke der Monoschichten von ca. 40 Å. Ferner war die Oxidation des Ferrocyanids auf beiden Oberflächen verringert. Durch Massenspektrometrie wurden die erwarteten Massen der Duplexe erhalten, bei denen eine Base verändert war und die mit DM quervernetzt waren. Spektroskopischen Tests zufolge war die Ausbeute der Quervernetzung für die vollständig gepaarten Duplexe und solche, die die Fehlpaarung enthielten, identisch.
 [26] a) K. M. Millan, S. R. Mikkelsen, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2317; b) K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3830; c) X.-H. Xu, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2627; d) J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2629.

- [27] S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Chem. Biol.*, eingereicht.
- [28] a) S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17678; b) J. M. Warman, M. P. de Haas, A. Rupprecht, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *249*, 319; c) D. N. Beratan, S. Priyadarshy, S. M. Risser, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 3; d) T. L. Netzel, *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 646; e) E. S. Krider, T. J. Meade, *J. Biol. Chem.* **1998**, *3*, 222.
- [29] Y. Okahata, T. Kobayashi, K. Tanaka, M. Shimomura, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6165.
- [30] L. Wachter, J. A. Jablonski, K. L. Ramachandran, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 7985.
- [31] J. G. Harrison, S. Balasubramanian, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1041.
- [32] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zerner, *Anal. Biochem.* **1979**, *94*, 75.
- [33] Z. B. wurde SH(CH₂)CONH(CH₂)₆NHCO₂⁻⁵ATCCTACTCATGGAC, hybridisiert mit dem Komplementärstrang, mit DM modifiziert und durch MALDI-TOF-MS analysiert; *m/z* (gef./ber.): 5284/5282 (DM + SH-enthaltender Strang), 4541/4540 (Komplementärstrang), 4742/4742 (SH-enthaltender Strang). Diese Werte sind in Einklang mit den berechneten Massen der Fragmente, die von diesem Duplex erwartet wurden. Auch UV/Vis-spektroskopisch ergab sich bei Vergleich der Absorption des Duplex bei 260 nm und der des intercalierten DM bei 480 nm ($\epsilon = 7.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) eine 1:1-Zusammensetzung. Untersuchungen zur thermischen Denaturierung bei 260 nm in Anwesenheit von 100 mM Phosphat und 100 mM MgCl₂ (pH 7) ergaben Schmelztemperaturen von 48 und 50 °C für die nativen bzw. die mit DM quervernetzten Duplexe. Ein ähnliches Schmelzprofil wurde durch Beobachtung der Hypochromie bei 482 nm im Falle des DM enthaltenden Duplex beobachtet.
- [34] L. Tender, M. T. Carter, R. W. Murray, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3173.

Basenpaare beschränkt ist. Andere Forscher suchten vergebens nach Soliton-Effekten.^[8] In neuerer Zeit beschrieben Barton et al. mehrere Beispiele für ein Tunneln von Elektronen zwischen intercalierten Reagentien, die bis zu 40 Å voneinander getrennt waren, und gaben an, daß die Geschwindigkeit der Elektronenübertragung bemerkenswert wenig von der Zahl der zwischen den Reagentien liegenden Basenpaare abhing.^[9-13] Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu allen anderen experimentellen Beobachtungen bezüglich der Elektronenübertragung in DNA.^[14-21] Weiterhin weisen Röntgenstrukturdaten darauf hin, daß Reparatur-Photoenzyme nur über kurze Abstände arbeiten;^[22] es gibt also keinen naheliegenden biologischen Grund dafür, daß DNA ein effektiver Leiter für das Tunneln von Elektronen über große Entfernungen sein muß.

Die Zahl der Experimente, die sich mit der Elektronenübertragung in DNA befassen, ist allerdings beschränkt, und theoretische Bewertungen^[23-25] sind widersprüchlich. Anders als bei Proteinen^[23] ist beim DNA-Doppelstrang über die Fähigkeit zur Elektronenübertragung nur wenig bekannt, und insbesondere der Wert der Reorganisationsenergie λ , die mit der Elektronenübertragung einhergeht, ist unbekannt. Dieser Parameter, der für ein besseres theoretisches Verständnis des Tunnelns von Elektronen über große Entfernungen entscheidend ist, ist ein wichtiges Merkmal von nichtadiabatischen Elektronenübertragungsreaktionen^[26] und liegt in einem Bereich von ca. 0 eV in glasartigen Matrices bis fast 2 eV in polaren Lösungsmitteln.^[27] Besonders bedeutsam wird dieser Parameter, wenn die thermodynamische Triebkraft für die Elektronenübertragung (ΔG^0) klein ist, da das Wechselspiel zwischen λ und ΔG^0 die Aktivierungsenergie für das Elektronenübertragungsereignis bestimmt.^[26] Im folgenden stellen wir Bestimmungen von λ sowohl für die interfaciale als auch für die durch den Strang erfolgende Elektronenübertragung vor und zeigen, daß der ermittelte Wert ähnlich dem für Proteinmatrices gefundenen^[28] ist.

Das Tunneln von Elektronen in DNA kann anhand der gegenseitigen Lage der Redoxpartner klassifiziert werden. Der einfachste Fall ist die interfaciale Elektronenübertragung von einem intercalierten Farbstoffmolekül auf einen positiv geladenen Elektronenacceptor, der an die außenliegende Phosphatkette gebunden ist. Ein entsprechendes Redoxpaar ist das zuerst von Fromherz und Rieger untersuchte,^[29] aus intercaliertem Ethidiumbromid (EB⁺) als Donor und *N,N*-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid (MV²⁺) als oberflächengebundenem Acceptor bestehende. Die Elektronenübertragung vom angeregten Singulettzustand des intercalierten EB⁺ auf MV²⁺ ($\Delta G^0 \approx -0.08 \text{ eV}$) kann mit stationärer und zeit-aufgelöster Fluoreszenzspektroskopie beobachtet werden.^[15] Das Löschen der EB⁺-Fluoreszenz nimmt mit wachsender Konzentration an MV²⁺ zu, bis die Phosphatkette mit gebundenem MV²⁺ gesättigt ist; danach haben weitere Erhöhungen der MV²⁺-Konzentration keine Wirkung mehr (Abbildung 1 A). Im Sättigungszustand ist die Lage von MV²⁺ auf der Zeitskala der Elektronenübertragung eingefroren, wobei der kürzeste Abstand der Reagentien von Rand zu Rand ($R \approx 4 \text{ \AA}$) durch deren Besetzungszahlen festgelegt ist. Unter diesen Bedingungen konnte die Geschwindigkeitskonstante für die interfaciale Elektronenübertragung zwischen

Das Tunneln von Elektronen in DNA**

Anthony Harriman*

Der Gedanke, daß DNA ein effektives Medium für das Tunneln von Elektronen über große Entfernungen sei, ist keineswegs neu.^[1] Strahlenbiologen führten dieses Konzept vor fast vierzig Jahren ein, um die ungewöhnlich hohe Leitfähigkeit von fester DNA zu erklären.^[2] Später stellte sich jedoch heraus, daß die Leitfähigkeit durch Eispartikel verursacht wurde.^[3] Alternativ wurde versucht, die Leitfähigkeit mit einer hohen Ladungsmobilität entlang dem Außenbereich des Doppelstrangs zu erklären.^[4] Ergebnisse sowohl von EPR-^[5] als auch von Lumineszenzversuchen^[6] wurden mit einem Tunneln von Elektronen über große Entfernungen erklärt, während Pulsradiolyse-Untersuchungen^[7] darauf hinstießen, daß das Tunneln von Elektronen auf weniger als fünf

[*] Prof. A. Harriman

Laboratoire de Chimie, d'Electronique et Photonique Moléculaires
Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux (ECPM)
Université Louis Pasteur
25, rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex (Frankreich)
Fax: (+33) 494-99-92-56
E-mail: harriman@chimie.u-strasbg.fr

[**] Diese Arbeit wurde von der Royal Society of London gefördert.