

Zum Mechanismus des weitreichenden Elektronentransports durch DNA**

Bernd Giese,* Stephan Wessely, Martin Spormann, Ute Lindemann, Eric Meggers und Maria E. Michel-Beyerle

Die Diskussion über den Mechanismus des weitreichenden Ladungstransfers durch die DNA hat sich in den letzten Jahren an dem β -Wert der Beziehung (1) entzündet, der den rasanten exponentiellen Abfall der Geschwindigkeitskonstanten des Ladungstransfers mit zunehmendem Abstand beschreibt.^[1] Je nach Experiment werden β -Werte in der Nähe von 1.0 \AA^{-1} oder 0.1 \AA^{-1} angegeben.^[2, 3] Diese Unterschiede in den β -Werten würden sich drastisch auf die Geschwindigkeit auswirken. So wäre ein Ladungstransfer über 50 \AA bei einem β -Wert von 0.1 \AA^{-1} um nahezu zwanzig Größenordnungen schneller als bei einem β -Wert von 1.0 \AA^{-1} . Es ist unwahrscheinlich, daß für den weitreichenden Ladungstransport beide β -Werte in der DNA realisiert werden.

Kürzlich haben wir für den weitreichenden Ladungstransfer einen Hopping-Mechanismus vorgeschlagen,^[4] gemäß dem die Ladung zwischen jenen DNA-Basen tunnelt, die ähnliche Redoxpotentiale aufweisen. Damit setzt sich der weitreichende Ladungstransport über die DNA aus mehreren hintereinandergeschalteten Tunnelprozessen über jeweils kleinere Distanzen zusammen, die nach Beziehung (1) beschrieben werden können. Während die *positive* Ladung beim Lochtransfer in gemischten DNA-Sequenzen durch Oxidation der Guanin-Basen (G) transportiert wird, sollte nach dem Hopping-Mechanismus die *negative* Ladung durch Reduktion der Basen Thymin (T) und Cytosin (C) weitergeleitet werden. Dieses unterschiedliche Verhalten beruht auf den Redoxpotentialen, die für Guanin (G) und Adenin (A) unterschiedlich^[5, 6] und für Thymin (T) und Cytosin (C) ähnlich groß sind.^[6, 7] Für die Beschreibung des Falls, daß die einzelnen Hopping-Schritte über gleiche Distanzen ablaufen, haben wir ein Hopping-Modell gemäß Beziehung (2) zugrundegelegt.^[4a, b] Im Gegensatz zu Beziehung (1) resultiert aus Beziehung (2) eine schwache Abhängigkeit der relativen Geschwindigkeitskonstanten k von der Distanz.

$$\ln k \propto -\beta \Delta r \quad (1)$$

$$\ln k \propto -\eta \ln N \quad (2)$$

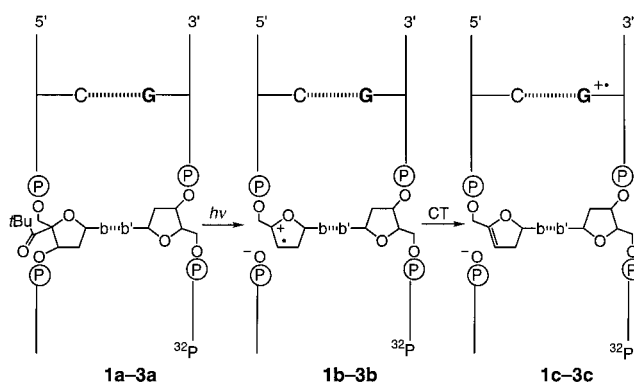
In Beziehung (2) ist η ein Proportionalitätsfaktor, der im einfachsten Fall bei etwa 2 liegen sollte, und N ist die Zahl der

Hopping-Schritte.^[4a, b] Wir haben nun durch Ladungstransfer über 10 bis 40 \AA in den DNA-Strängen **1a–3a** die Gültigkeit von Beziehung (2) experimentell belegt.

3'-CGCATTATATTATGGG X G₂CA TTATAATACGCTGCACGCA-32P
5'-GCGTAATATAATACCC Y C G*TAATATTATGCGACGTGCGT-3'

1a–3a	
	X Y
1a	TT AA
2a	TTGTT AACAA
3a	TTGTTGTTGTT AACAAACAACA

Die Experimente basieren auf einem Assay, bei dem ein 4'-Acynucleosid in doppelsträngige DNA eingebaut wird.^[4a] Durch Norrish-I-Spaltung und anschließende Heterolyse entstehen die Kohlenhydrat-Radikalkationen **1b–3b**, die die positive Ladung auf das benachbarte G des ³²P-markierten Gegenstranges übertragen (**1c–3c**; Schema 1). Von hier aus



Schema 1. Erzeugung eines Guanin-Radikalkations G^{+} in den ³²P-markierten Strängen **1c–3c** durch Photolyse der Ketoneinheit in den modifizierten Strängen **1a–3a**.

startet der Transport der positiven Ladung durch die DNA über die Nucleotidpaare **XY**, bis sie von einer GGG-Einheit irreversibel eingefangen wird. Mit diesem Ladungstransfer konkurriert die Abfangreaktion des Radikalkations G^{+} durch H_2O . Dies führt zu einer geschädigten G^{ox} -Position,^[4a] an der sich die DNA bei Behandlung mit Piperidin spaltet. Kürzlich hatten wir gezeigt, daß die relative Geschwindigkeit des Ladungstransfers (k_{rel}) von G^{+} über die G-Brücken auf die GGG-Einheit gleich dem Verhältnis der Spaltprodukte GGG/G ist.^[4a] Dabei wird die Spaltung an allen G-Positionen berücksichtigt.

Die Experimente wurden mit den doppelsträngigen 40–49meren Oligonucleotiden **1a–3a** durchgeführt, bei denen wiederkehrende AT,AT-Doppeleinheiten zwischen den G-Basen eingefügt sind.^[8] Gemäß Beziehung (2) nimmt die Laufzahl N die Werte 1, 2 und 4 für die Stränge **1a**, **2a** und **3a** an. Es wurden zwei unabhängige Meßreihen durchgeführt; die Mittelwerte sind in Tabelle 1 zusammengestellt.^[9]

[*] Prof. Dr. B. Giese, Dipl.-Chem. S. Wessely, Dipl.-Chem. M. Spormann, Dr. U. Lindemann, Dipl.-Chem. E. Meggers
Institut für Organische Chemie der Universität
St.-Johanns-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)
Fax: (+41) 61-267-1105
E-mail: giese@ubaclu.unibas.ch
Prof. Dr. M. E. Michel-Beyerle
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85748 Garching

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

Tabelle 1. Experimentelle Daten der Doppelstränge **1a–3a** und **4–6**. Die oxidativen Schädigungen an den G- und GGG-Einheiten wurden nach Piperidinbehandlung und Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem Phosphor-Imager quantifiziert.

DNA-Strang	<i>N</i>	Δr [Å]	GGG/G = k_{rel}
1a	1	10	8.9 ± 1.9
2a	2	20	2.8 ± 0.4
3a	4	40	0.88 ± 0.12
4	—	54	$2.3 \pm 0.7^{[4a]}$
5	—	54	0.04 ± 0.02
6	—	17	$0.03 \pm 0.015^{[4a]}$

Abbildung 1 zeigt, daß beim Auftragen von $\ln k_{\text{rel}}$ gegen $\ln N$ gemäß Beziehung (2) ein η -Wert von 1.7 ± 0.2 erhalten

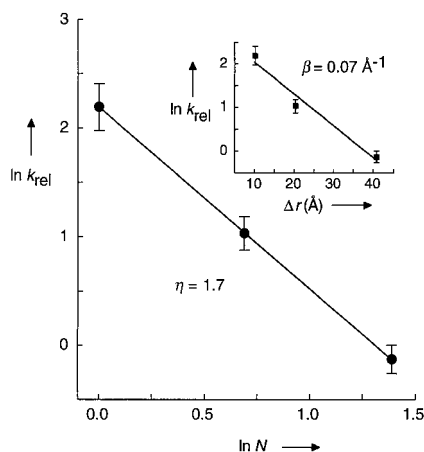
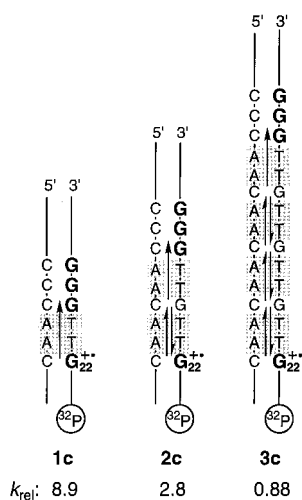


Abbildung 1. Abhängigkeit der relativen Geschwindigkeit des Ladungstransportes (k_{rel}) von der Zahl der Hopping-Schritte N sowie der gesamten Distanz Δr (kleines Diagramm).

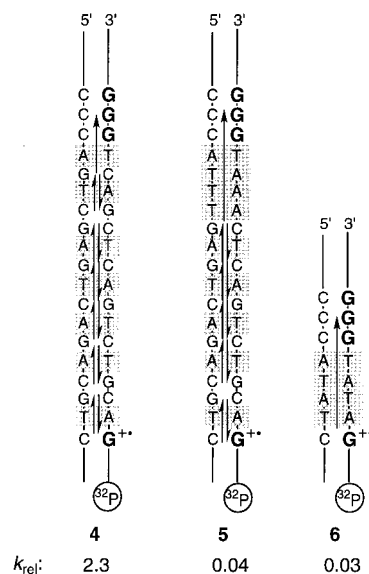
wurde. Der Lochtransfer über 10, 20 und 40 Å läßt sich demnach gut mit dem Hopping-Modell beschreiben.^[10] In Schema 2 ist mit Pfeilen angedeutet, wie die Ladung von G_{22}^{++} in mehreren Schritten zur GGG-Einheit gelangt.

Würde man die Daten der Tabelle 1 nach Beziehung (1) auswerten und eine Ausgleichsgerade durch die Meßpunkte



Schema 2. Ladungstransfer (angedeutet durch Pfeile) vom Radikalkation G_{22}^{++} zur GGG-Einheit in einem (**1c**), zwei (**2c**) oder vier (**3c**) Hopping-Schritten.

legen, dann würde ein β -Wert von $0.07 \pm 0.02 \text{ Å}^{-1}$ resultieren. Dieser hypothetische β -Wert impliziert einen Superaustausch-Mechanismus, bei dem die Distanzabhängigkeit sehr klein ist. Kürzlich hatten wir jedoch demonstriert, daß der Ladungstransfer in gemischten DNA-Sequenzen nicht durch den Superaustausch-Mechanismus beschrieben werden kann.^[4a] Diese Aussage wird gestützt durch Experimente mit den Oligonucleotiden **4** und **5**.^[11] In beiden Strängen wird die Ladung über 54 Å transportiert, in **4** erfolgt der Transfer aber 60mal schneller als in **5**. Gemäß dem Hopping-Mechanismus ist im Doppelstrang **5** das Tunneln über die Sequenz von vier AT-Basenpaaren geschwindigkeitsbestimmend. Der Ladungstransport über 54 Å in **5** erfolgt deswegen mit ähnlicher Geschwindigkeit wie der über 17 Å in **6** (Schema 3).^[4a]



Schema 3. Ladungstransfer (angedeutet durch Pfeile) vom Radikalkation G^{++} zur GGG-Einheit in den unterschiedlichen Doppelsträngen **4**, **5** und **6**.

Fazit: Unsere Untersuchungen zeigen, daß Ladungstransport durch DNA in Hopping-Schritten zwischen Basen ähnlichen Redoxpotentials stattfinden kann. Da Guanin (G) die am leichtesten oxidierbare Base in DNA ist, erfolgt der Transport positiver Ladung durch Tunneln zwischen Guaninbasen. Die Geschwindigkeit dieser Tunnelschritte hängt stark vom Abstand benachbarter Guaninbasen ab. Deswegen spielt die Basensequenz für den Lochtransfer eine entscheidende Rolle.

Gemäß dem Hopping-Mechanismus erfolgt der Transport negativer Ladung durch Reduktion von Thymin (T) und Cytosin (C), die ähnliche Redoxpotentiale aufweisen. Da diese Pyrimidinbasen in jedem Basenpaar vertreten sind, sollte man erwarten, daß der Elektronentransfer nicht von der Sequenz abhängt. Eine Modifikation der natürlichen DNA kann zu einer Änderung des Redoxpotentials einzelner Basen führen. Nach dem Hopping-Mechanismus sollte dies einen starken Einfluß auf die Effizienz des Ladungstransportes ausüben.

Eingegangen am 11. Februar 1999 [Z13021]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 996–998

Stichwörter: Bioorganische Chemie • DNA • DNA-Oxidation • Elektronentransfer • Radikale

-
- [1] Kommentare zu Ladungstransfer in DNA: 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) S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 196; f) N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 201; g) T. L. Netzel, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 210; h) F. D. Lewis, R. L. Letsinger, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 215; i) E. S. Krider, T. J. Meade, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 222.
- [2] a) A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3656; b) A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10383; c) S. J. Atherton, P. C. Beaumont, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 12025; d) F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673; e) K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 167; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 158; f) E. Meggers, D. Kusch, M. Spichty, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 474; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 460.
- [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) S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9861.
- [4] a) E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950; b) J. Jortner, M. Brixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759; siehe auch: c) T. Melvin, S. Botchway, A. W. Parker, P. O. Neill, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 653; d) S. M. Gasper, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12762.
- [5] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617.
- [6] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541.
- [7] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701.
- [8] Anders als bei dem von uns bislang verwendeten Assay^[4a] wurden die Experimente mit 4'-pivaloylsubstituiertem Guanosin durchgeführt. Die Synthese dieses Guanosinderivats erfolgte analog dem für Thymidinderivate beschriebenen Weg: A. Marx, P. Erdmann, M. Senn, S. Körner, T. Jungo, M. Petretta, P. Imwinkelried, A. Dussy, K. J. Kulicke, L. Macko, M. Zehnder, B. Giese, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1989. Die Photolyse des monomeren 4'-pivaloylsubstituierten Guanosins, das an 3'-OH phosphoryliert war, lieferte den Enolether in 85% Ausbeute. Dies zeigt, daß der Ladungstransfer vom Kohlenhydrat-Radikalkation zur Base G sehr schnell ist.
- [9] Die Doppelstränge **1a–3a**, bestehend aus 3 ± 0.5 pmol 4'-pivaloyl-modifizierten Strängen und 1 ± 0.2 pmol der dazugehörigen 5'-³²P-markierten Gegenstränge, wurden in 200 µL Phosphatpuffer (20 mM, 100 mM NaCl, pH 7.0) bei 15 °C unter Verwendung einer 500-W-Hg-Hochdrucklampe in Kombination mit einem 320-nm-Cut-off-Filter unter Ausschluß von Sauerstoff bestrahlt (15 min). Ein Teil der Lösung wurde 30 min mit 1M Piperidin bei 90 °C inkubiert, anschließend über Nacht lyophilisiert und mit denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (1500 V, 3.5 h) analysiert. In Kontrollexperimenten ersetzte man die modifizierten Stränge gegen unmodifizierte. Die getrockneten Gele wurden mit einem Phosphor-Imager autoradiographiert und mit dem Programm ImageQuant ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte durch Subtraktion der Intensitäten der Kontrollexperimente von den Intensitäten, die bei Bestrahlung der modifizierten Doppelstränge erhalten wurden.
- [10] Experimente mit weiteren DNA-Strängen sind in Arbeit.
- [11] Die Messungen wurden unter den in Lit. [4a] ausführlich beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Stränge entsprechen den dort angegebenen Sequenzen.
-