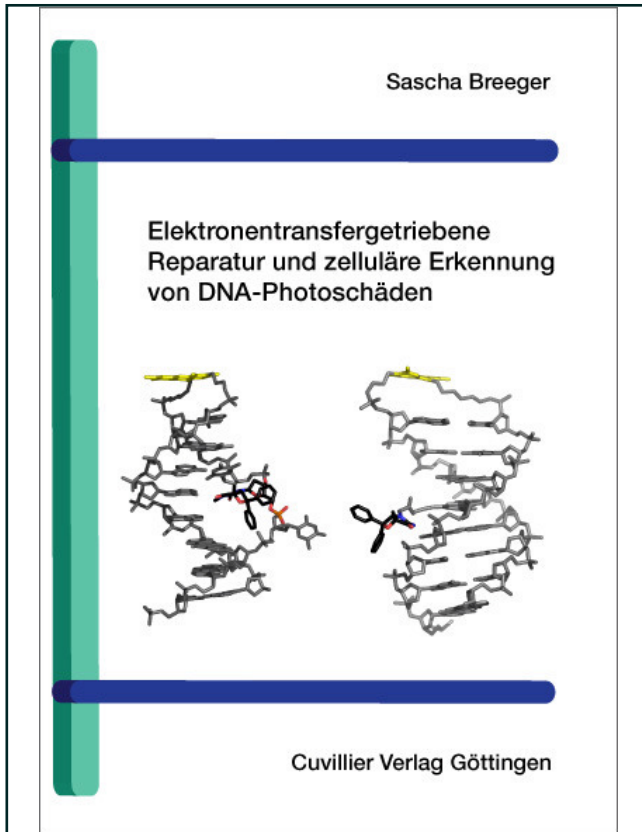




Sascha Breeger (Autor)

## **Elektronentransfergetriebene Reparatur und zelluläre Erkennung von DNA-Photoschäden**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1813>

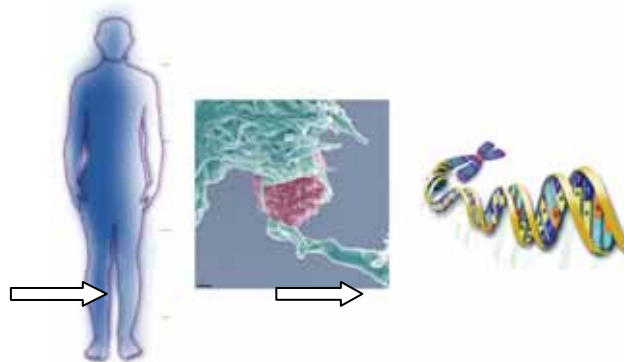
Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# 1 Einführung

Welche Faktoren bestimmen über unser Aussehen? Warum erkranken wir an dem, was wir heute als Erbkrankheiten kennen? Auf welche Weise gehen Eigenschaften von den Eltern auf die Nachkommen über? Diese und ähnliche Fragen beschäftigten die Menschheit bereits seit Jahrtausenden – fast ebensoviel Zeit verging allerdings, ehe man begann, diese Sachverhalte wissenschaftlich systematisch zu untersuchen und sie nicht nur als sichtbare Ausprägung der göttlichen Vorsehung anzusehen. So entdeckte zum Beispiel der Mönch *Gregor Mendel* erst im 19. Jh. die grundlegenden Regeln der Vererbung und die Unterscheidung dominanter und rezessiver Merkmale.<sup>[1]</sup> Eine wichtige Weiterentwicklung dieser einfachen Vorstellung war die Entdeckung der Blutgruppen durch *Landsteiner* in 1927, ein eindrucksvolles Beispiel für das Wechselspiel zwischen Genotyp (die im Erbgut vorhandenen Anlagen) und Phänotyp (das tatsächlich körperlich ausgeprägten Merkmal).<sup>[2]</sup> In diese Zeit des wissenschaftlichen Aufbruchs fiel die erstmalige Isolierung der heute als DNA (Desoxyribonukleinsäure) bekannten Substanz durch *Miescher* im Jahr 1872.<sup>[3]</sup> Erst die bahnbrechenden Experimente von *Griffiths* und der *Avery*-Pneumokokkenversuch zeigten aber schließlich, dass diese DNA, der man zunächst keine große Bedeutung beigemessen hatte, der Träger der Erbsubstanz in jeder pflanzlichen und tierischen Zelle ist (Viren verwenden zu diesem Zweck meist eine Ribonukleinsäure RNA).<sup>[4]</sup> Jede menschliche Körperzelle enthält zwei Kopien der Erbsubstanz in Form von in Chromosomen verpackter DNA, lediglich die Gameten (Spermien bzw. Eizellen) enthalten nur eine Kopie (Abb. 1).



**Abb. 1.** Vom kompletten menschlichen Körper zum einzelnen DNA-Molekül. Das in der Mitte dargestellte Bild zeigt eine menschliche Leukozyte.

DNA besteht aus den vier Nukleobasen Adenin (A) 1, Guanin (G) 2, Cytosin (C) 3 und Thymin (T) 4. Diese sind jeweils an die 1-Position des Zuckers 2-Desoxyribofuranose geknüpft, wodurch die Nucleoside Desoxyadenosin (dA) 5, Thyminidin (dT) 6, Desoxycytidin (dC) 7 und Desoxyguanosin (dG) 8 gebildet werden. Diese wiederum sind untereinander über

Phosphordiesterbindungen zwischen den 3'- und 5'-Positionen der Zuckereinheiten verbrückt. Es war die Leistung von *Watson* und *Crick*, die aus der Beobachtung *Chargaffs*,<sup>[5]</sup> dass G und C, bzw. A und T immer in gleichen Mengenverhältnissen auftreten, sowie aus den zuvor nicht auswertbaren Röntgendiffraktogrammen von *Rosalind Franklin*<sup>[6]</sup> die Struktur der DNA als Doppelhelix aus zwei langen antiparallelen Strängen herleiteten.<sup>[7]</sup> In diesen werden die inwärts gerichteten Basen durch *H*-Brücken und  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen (hydrophobe Kräfte) zusammengehalten, während Zucker und Phosphate das nach außen gerichtete Rückgrat bilden (Abb. 2).

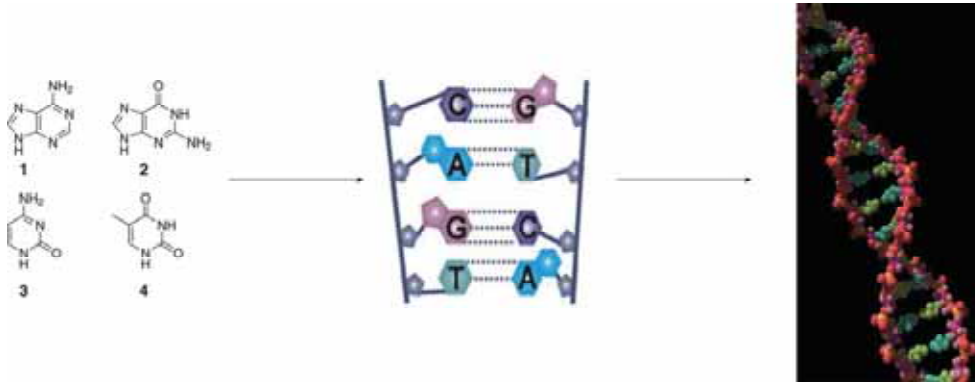
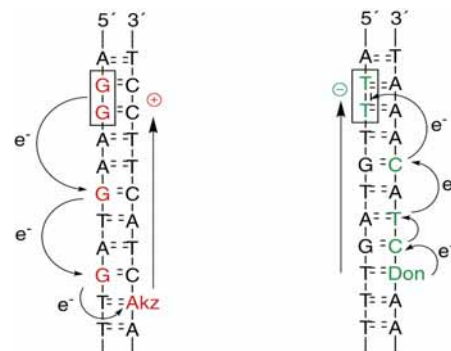


Abb. 2: Von der einzelnen Nucleobase zum DNA-Doppelstrang.

Neben der Rolle als Trägerin der Erbinformation, welche zu Beginn der Forschung im Fokus des wissenschaftlichen Interesses stand (und immer noch eine unerschöpfliche Quelle neuer Erkenntnisse darstellt), entstand relativ früh bereits der Gedanke, die einzigartige Architektur der DNA als Gerüst zum Aufbau nanoskaliger Strukturen zu verwenden. Besonders interessant war hierbei, dass die DNA aufgrund der  $\pi$ -Basenstapelung eine Art ausgedehntes, delokalisiertes System darstellen könnte, durch das Ladungstransport möglich wäre.<sup>[8]</sup> Dadurch könnten sogar leitfähige Strukturen auf DNA-Basis zugänglich sein.<sup>[9]</sup> In der Tat war es möglich, sowohl positive als auch negative Ladungen in DNA zu erzeugen, die sich nachfolgend durch den Strang bewegten. Man spricht hier von reduktivem Elektronentransfer (negative Ladung, Transport eines Überschusselektrons) und oxidativem bzw. Lochtransfer (positive Ladung). In beiden Fällen sind Elektronen die beweglichen Teilchen (Schema 1).

Schema 1. links) oxidativer Ladungstransfer in DNA (Akz = Elektronenakzeptor); rechts) reduktiver Ladungstransfer in DNA (Don = Elektronendonator).



Die Theorien und Mechanismen, die diesen Transportvorgängen zugrunde liegen, sind Gegenstand großer Teile dieser Arbeit und sollen nachfolgend eingehender erläutert werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit geht es um die DNA als Trägerin der genetischen Information, bzw. ihre Schädigung durch sowohl endogene als auch äußere Einflüsse, z. B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS), UV-Licht oder elektrophile Agenzien. Da die von den genannten Quellen verursachten Schäden, von denen einige noch vorgestellt werden, unrepariert zu Mutationen (→ Krebserkrankungen), Zellalterung und ultimativ zum Tod der Zelle führen können, verfügen alle Lebewesen über ein hocheffizientes Arsenal an Reparaturenzymen, welche die Integrität der DNA wiederherstellen. So kann über die Aufrechterhaltung der DNA-Replikation (Replikation = templatdirigierte Synthese einer neuen DNA-Kopie) und der Transkriptionsfähigkeit (Transkription = Übersetzung der DNA-Information in eine *messenger*RNA) das Weiterleben der Zelle gewährleistet werden. Die genaue Kenntnis dieser Proteine ist daher von enormem Interesse im Hinblick auf die Prozesse der Alterung und der Entstehung von Krebs.

Besonders vielversprechend erschien in diesem Zusammenhang der Ansatz des *photoaffinity labelings*. In dieser, für die Wechselwirkungen niedermolekularer Substrate mit Proteinen bereits sehr zahlreich angewendeten Methode wird ein photolabil modifiziertes Substrat zunächst mit dem auf bindende Proteine zu untersuchenden Gemisch inkubiert. Belichtung erzeugt aus dem photolabilen Vorläufer ein hochreaktives Intermediat, z. B. ein Nitren oder Carben, welches sich kovalent mit dem assoziierten Protein verknüpft. Nach Aufreinigung und Sichtbarmachung dieser *Crosslinks*, was beispielsweise über weitere Substratmodifikationen geschehen kann, können dann die „gefangenen“ Proteine über ihren Peptid-Massen-*fingerprint* (PMF) bzw. Immunoblotverfahren identifiziert werden. Der Einbau photolabiler Substrate in Schäden enthaltende DNA zum Zwecke solcher Experimente wurde bis jetzt nur in wenigen Fällen berichtet.

Daher sollten als eines der Hauptziele im Rahmen dieser Arbeit geeignete DNA-Bausteine auf Basis eines photolabilen Aryltrifluormethyldiazirins entwickelt, in geschädigte DNA eingebaut und nachfolgend *photoaffinity labeling*-Experimente mit bakteriellen und humanen Zellextrakten durchgeführt werden. Das Ziel war es, systematisch neue interessante DNA-Reparaturenzyme aufzuspüren und zu identifizieren. In der Einführung soll ein Überblick über die wichtigsten, zum *photoaffinity labeling* verwendeten Moleküle gegeben werden, wobei auch auf die mechanistischen Details der lichtinduzierten Spaltung eingegangen wird. Darüber hinaus werden für jede Stoffklasse verschiedene Anwendungsbeispiele vorgestellt, anhand derer die Vor- und Nachteile der jeweiligen Moleküle diskutiert werden.

## 1.1 Oxidativer Ladungstransfer in DNA

Obwohl im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit nur der reduktive Elektronentransfer in DNA untersucht wurde, muss an dieser Stelle doch eine kurze Einführung in den Transport positiver Ladungen gegeben werden, denn alle allgemein akzeptierten Theorien zur Beschreibung des Ladungstransports in DNA sind anhand der Untersuchung des Lochtransfers entwickelt worden. Der Grund hierfür mag in der größeren biologischen Relevanz liegen, denn eine positive Ladung auf einer DNA-Base ist häufig der Ausgangspunkt für oxidative DNA-Schäden, welche bei der Entstehung von Krebs und in zellulären Alterungsprozessen eine wichtige Rolle spielen.<sup>[10]</sup> Ursache der Oxidation sind neben äußeren Einflüssen sehr häufig sogenannte *reactive oxygen species* (ROS), Peroxide, Superoxide, OH-Radikale und andere hochreaktive Teilchen, die in verschiedenen Stoffwechselfvorgängen auftreten können und nicht immer von den zuständigen Abbauenzymen wie Katalasen, Superoxiddismutasen etc. vollständig zerstört werden. Betrachtet man die Verteilung oxidativer Schäden auf die verschiedenen Basen, so finden sich die meisten Schäden am Guanin, gefolgt von Adenin (Verhältnis ca. 3:1)<sup>[11]</sup> und, in weitem Abstand, den Pyrimidinbasen C und T. Diese Reihung spiegelt exakt die Abfolge der Redoxpotentiale der Nukleoside wider, welche experimentell bestimmt werden konnten (Tabelle 1).<sup>[12-15]</sup>

Base	E <sup>0</sup> [V] gegen NHE	pH -Wert
dG	1.29	7
dA	1.42	7
dC	1.6	7
dT	1.7	7

**Tabelle 1.** Redoxpotentiale der Standardnukleoside (NHE = Standardwasserstoffelektrode).

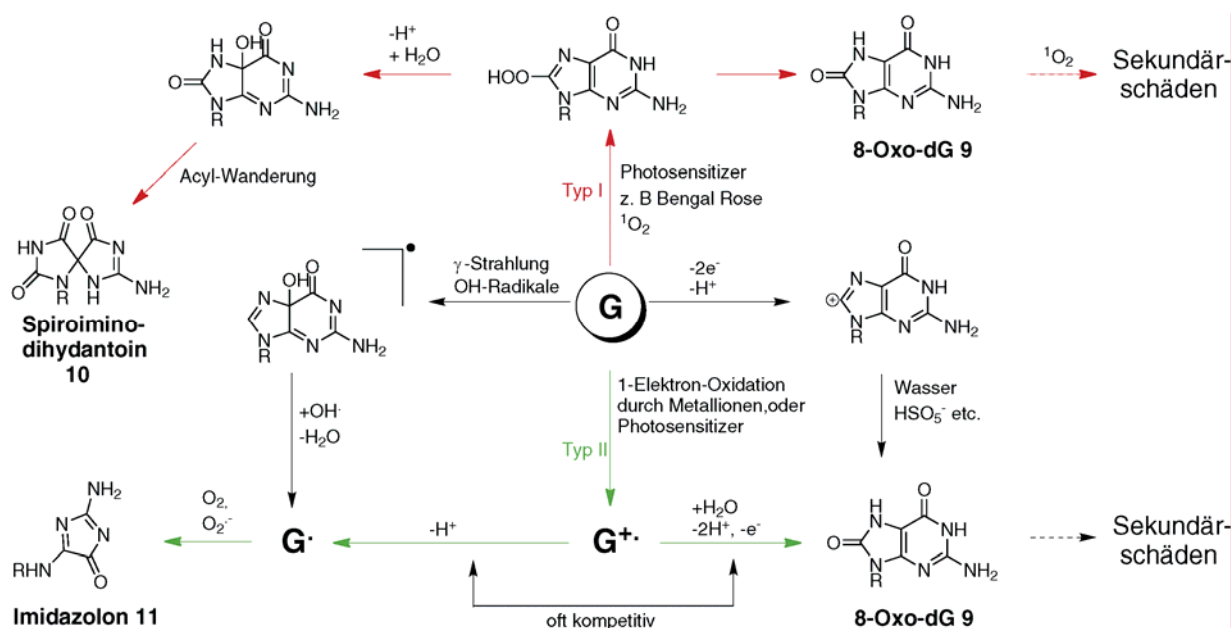
Aufgrund des  $\pi$ -stacking kann allerdings das Redoxpotential einer gegebenen Base im DNA-Strang nicht absolut betrachtet werden, es schwankt vielmehr abhängig von den flankierenden Basen.<sup>[16-18]</sup> Untersuchungen von *Saito* und anderen zeigen folgendes Bild (Tabelle 2).<sup>[19]</sup>

Basenabfolge	$E^0$ [V] gegen NHE
5'-GT-3'	1.16
5'-GC-3'	1.15
5'-GA-3'	1.00
5'-GG-3'	0.82
5'-GGG-3'	0.64

**Tabelle 2.** Redoxpotentiale des Guanins in unterschiedlichem Sequenzzusammenhang in DNA.

Tabelle 2 zeigt eine besonders große Absenkung des Normalpotentials bei  $\pi$ -Stapelung mit anderen Purinen, speziell Guanin. In einer Folge von Guaninen ist die Potentialabsenkung am 5'-ständigen Guanin am größten, was von *Saito* mit einer Erhöhung des HOMO-Koeffizienten an dieser Base erklärt wird.<sup>[20, 21]</sup> Darüber hinaus ist das Redoxpotential vom pH-Wert abhängig, generell führt eine Erhöhung des pH-Werts zu einer Absenkung des Standardpotentials.<sup>[10]</sup>

An die Einelektronenoxidation eines Guanins (eine ähnliche Folgechemie besteht auch bei Adenin) schließt sich eine Reihe von Folgereaktionen an, die zu einer Fülle an oxidativen DNA-Schäden führen.<sup>[22]</sup> Eine Auswahl ist in Schema 2 dargestellt.



**Schema 2.** Vereinfachte Übersicht über einige wichtige Oxidationswege und -produkte des Guanins.

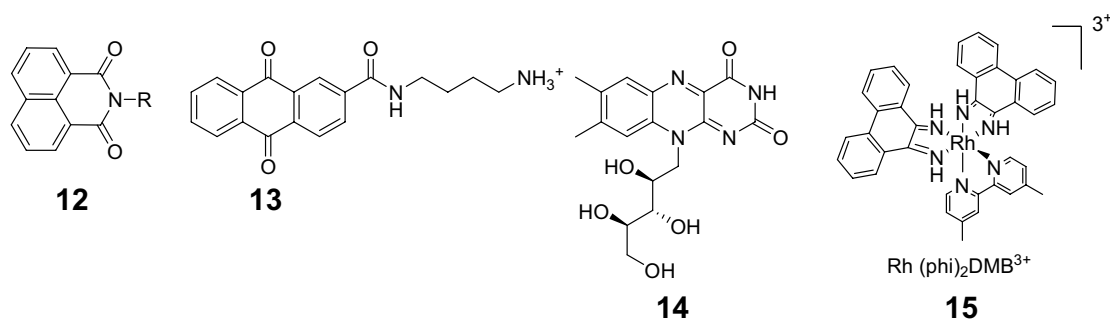
Wie aus Schema 2 hervorgeht, kann das  $G^{\bullet+}$ -Ion pH-Wert-abhängig auch als neutrales Radikal, bzw. Radikalanion vorliegen. Der Protonierungsgrad entscheidet hierbei über die Ver-

teilung der Produkte, welche durch Reaktion mit Wasser bzw. Sauerstoff zu verschiedenen Folgeprodukten führen können.<sup>[23]</sup> Manche der abgebildeten Spezies wie 8-Oxo-dG **9** oder das hier nicht gezeigte FaPydG, konnten mittlerweile synthetisch dargestellt werden und wurden vom Verfasser in biologischen Studien an geschädigter DNA verwendet (siehe Kapitel 4).<sup>[24-26]</sup> Aus vielen dargestellten Spezies können durch Weiterreaktionen aufgrund des stark erniedrigten Redoxpotentials Sekundärschäden wie z. B. das Spiroiminodihydantoin **10** oder das Imidazolone **11** entstehen.<sup>[27-31]</sup> Für eine detailliertere Betrachtung dieser komplexen Zusammenhänge sei aber hier auf den Übersichtsartikel von *Burrows* verwiesen.<sup>[10]</sup>

*Barton* führte im Jahr 1996 Experimente durch, in denen sie einen interkalierenden Rh-Komplex kovalent an das Ende eines DNA-Duplexes knüpfte, in dem in gewisser Entfernung zum Rh-Komplex GG-Dubletts als Elektronenlochfallen eingebaut waren.<sup>[32, 33]</sup> Photooxidation der DNA durch den Rhodiuminterkalator lieferte das erstaunliche Ergebnis, dass selbst in 37 Å noch oxidative Schädigung eines GG-Dubletts detektiert werden konnte. Die Erklärung hierfür konnte nur sein, dass sich die positive Ladung über diese Distanz durch den Strang bewegt hatte. Ausgehend von dieser Entdeckung wurde eine Vielzahl von Systemen entwickelt, um diese Ladungstransportprozesse zu untersuchen. Eine solche Strategie bestand meist aus den folgenden Schritten:

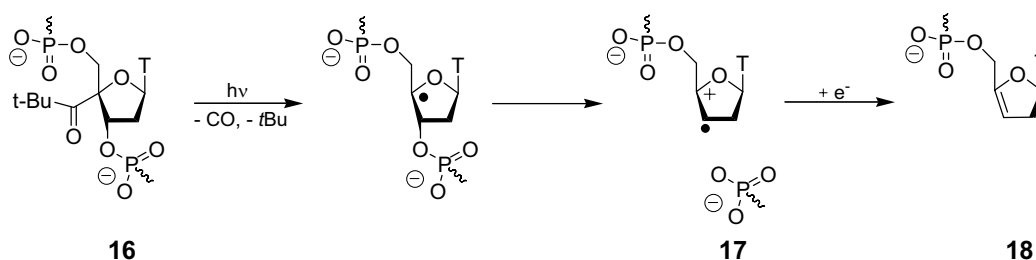
1. Einbringen redoxaktiver Sonden in DNA
2. Induktion des Ladungstransfers durch photochemische oder elektrochemische Methoden
3. Nachweis und kinetische Analyse der Ladungstransferprozesse

Zu diesen drei Punkten sind, hauptsächlich im vergangenen Jahrzehnt, eine nahezu unüberschaubare Anzahl intensiver Studien durchgeführt worden, in denen zur Erzeugung der positiven Ladung eine Fülle unterschiedlicher Elektronenakzeptoren eingesetzt worden sind. Zu den wichtigsten sind die Naphthalenimide **12**<sup>[34-36]</sup>, Anthrachinone **13**<sup>[37, 38]</sup>, Riboflavin **14**<sup>[19, 39, 40]</sup> und verschiedene Rhodium- bzw. Rutheniumkomplexe (z. B. **15**) zu zählen (Schema 3).<sup>[41-43]</sup> Außerdem wurden auch Moleküle wie 2-Aminopurin erfolgreich verwendet.<sup>[44-46]</sup>



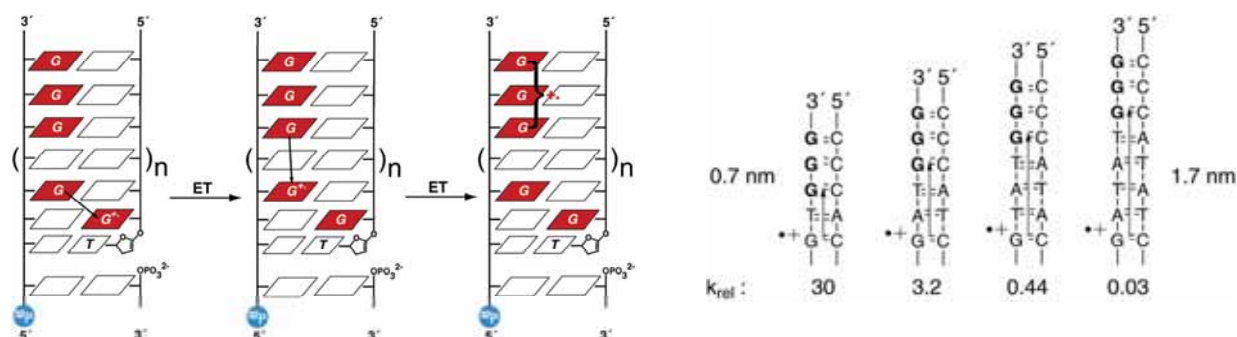
**Schema 3.** Zur Untersuchung des Lochtransfers eingesetzte Elektronenakzeptoren.

Mit Ausnahme der von der Gruppe um *Barton* eingeführten Rh-Komplexe waren die Akzeptoren zunächst nicht kovalent an den zu untersuchenden DNA-Strang gebunden, was zu einer sehr ortsunselektiven Erzeugung von Oxidationsstellen führte. *Giese* leistete hier wertvolle Pionierarbeit, indem er ein System vorstellte, mit dem sich DNA-Doppelstränge ortsspezifisch oxidieren ließen.<sup>[47]</sup> Als Elektronenakzeptor verwendete er das Thymidinderivat **16**, welches photoinduziert einer *Norrish Typ-I*-Spaltung unterliegt und so, nach Spaltung des Phosphatrückgrats, das Oxoniumradikalkation **17** bilden kann. Dieses ist in der Lage, ein Guanin in das Guaninradikalkation zu überführen, wobei es selber zum Enolether **18** reduziert wird (Schema 4).



**Schema 4.** Gieses Akzeptorsystem zur Erzeugung von G-Radikalkationen in DNA.

Das gebildete G-Radikalkation kann nun entweder unter Entstehung eines oxidativen Schadens mit dem umgebenden Wasser reagieren oder, da erstere Reaktion langsam verläuft ( $k \cong 10^4 \text{ s}^{-1}$ , pH-abhängig), per Elektronentransfer seine Ladung zu einer nahe gelegenen G-reichen Sequenz transportieren.<sup>[48]</sup> Solche G-reichen Sequenzen wirken, wie eingangs gesagt, aufgrund ihres abgesenkten Oxidationspotentials als „Fallen“ für positive Ladungen, wodurch die oxidative Schädigung bevorzugt in der GGG-Sequenz auftreten sollte.<sup>[49,50]</sup> An oxidativ geschädigten Positionen lässt sich durch Behandlung mit Piperidin unter erhöhter Temperatur ein Strangbruch erzeugen. Aus dem Verhältnis der Bruchstücke, welches sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung über die <sup>32</sup>P-Isotopenmarkierung quantifizieren ließ, konnte *Giese* die relativen Raten  $k_{\text{rel}}$  des Ladungstransfers bestimmen (Abb. 3).



**Abb. 3.** Schema des Ladungstransports zu einer GGG-Einheit unter Verwendung von Gieses Akzeptorsystem. rechts ) relative Geschwindigkeitskonstanten  $G^+$  vs.  $GGG^+$  für die dargestellten Doppelstränge.



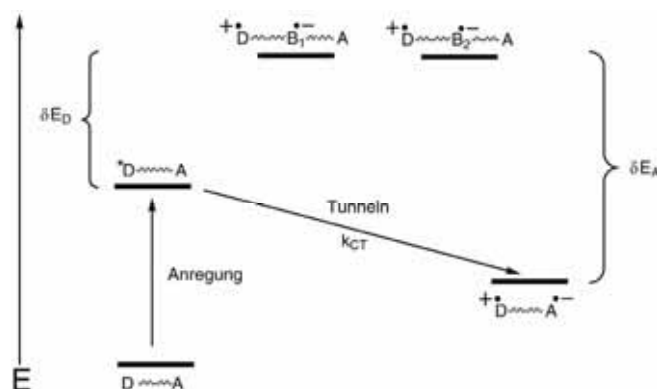
Es wurde festgestellt, dass die Elektronentransferrate mit jedem zusätzlichen AT-Basenpaar um den Faktor 10 absank. Dabei verringerte sich die Menge der Schädigung an der GGG-Einheit von 97 % bei 6.8 Å auf ca. 3 % bei 17 Å Abstand.

Zur Erklärung dieses Verhaltens wurde die *Marcus-Levich-Jortner*-Beziehung herangezogen, welche die Elektronentransferrate  $k$  in Abhängigkeit vom Donor-Akzeptor-Abstand  $r$  beschreibt (Gleichung 1-1).

$$k = (2\pi / \hbar) V_0^2 F e^{-\beta r} \quad (1-1)$$

( $V_0$  = Konstantenenergieterm der elektronischen Kopplung,  $F$  = thermischer *Franck-Condon*-Faktor).

Aus den Daten konnte experimentell ein  $\beta$ -Wert von  $0.7 \pm 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  ermittelt werden. Dieser Wert ist im Einklang mit einer Vielzahl anderer Daten von *Lewis* und *Wasielewski*<sup>[51]</sup>, *Zewail*<sup>[52]</sup> und *Marcus*, welche alle  $\beta$ -Werte zwischen  $0.6 \pm 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  gemessen bzw. berechnet haben.<sup>[53]</sup> Diese Werte wurden von *Giese* und anderen so interpretiert, dass in diesen Systemen (Donor-Akzeptorabstand  $r \leq 10 \text{ \AA}$ , ca. 2-3 Basenpaare) das Elektron in einem einstufigen Tunnelprozess vom Donor auf den Akzeptor übergeht, ohne auf den dazwischen liegenden Basenpaaren lokalisiert zu sein (Schema 5)

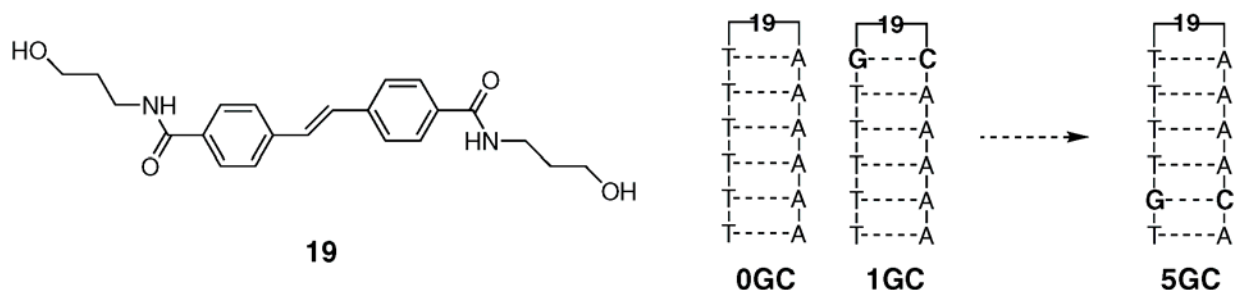


**Schema 5.** Schematische Darstellung eines Superaustauschprozesses.  $D$  = Donor,  $A$  = Akzeptor.

Für derartige Vorgänge wurde der Begriff **Superaustausch** geprägt, diese Theorie des Elektronentransfers in DNA, welche bei kleinen Donor-Akzeptor-Abständen maßgeblich ist, bezeichnet man daher als **Superaustausch-Mechanismus**. Er tritt auf, wenn die Überlappung der  $\pi$ -Elektronensysteme ausreichend ist, um ein „Hindurchtunneln“ des Elektrons zu erlauben.<sup>[54]</sup>

Zusätzliche Belege für diesen Mechanismus lieferten *Lewis* und *Wasielewski*. Ihnen gelang es erstmals, per Femtosekundenspektroskopie den Ladungstransfer von einem Guanin auf einen

lichtangeregten Elektronenakzeptor zu verfolgen.<sup>[51, 55, 56]</sup> Zu diesem Zweck konstruierten sie strukturell rigide DNA-Haarnadeln, welche im Kopf das Stilbendiamid **19** als Elektronenakzeptor enthielten und in denen das erste Guanin durch eine steigende Anzahl an AT-Basenpaaren vom Akzeptor separiert war (Schema 6).



**Schema 6.** Von Lewis und Wasielewski verwendetes Stilbenderivat **19**. rechts) Sequenz der untersuchten DNA-Haarnadeln.

Das Stilbendiamid **19** wurde durch Laserbestrahlung zur Fluoreszenz angeregt. Dabei beobachtete man eine Löschung der Fluoreszenz durch in der Nähe befindliche Guanine; je näher ein Guanin zum Akzeptor positioniert war, desto ausgeprägter war die Fluoreszenzlöschung.<sup>[57]</sup> Diese *Quenchung* konnte mit einem Elektronentransfer vom Guanin auf den angeregten Akzeptor **19** erklärt werden. Per Femtosekundenspektroskopie wurde nun zunächst in der kein GC-Basenpaar enthaltenden Haarnadel **0GC** die Lebensdauer des angeregten Singulettzustands  $\tau_n$  ermittelt. Per Vergleich mit den in den Haarnadeln **1GC-5GC** bestimmten  $\tau_n$ -Werten, sowie den transienten Absorptionsspektren des hier entstehenden **19**-Radikalanions konnten direkt Raten für den Elektronentransfer abgeleitet werden. Diese lagen im Bereich von  $k_{ET} = 10^9 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$ , es handelte sich hier folglich um sehr schnelle Prozesse. Auftragung der relativen Raten lieferte den bereits angesprochenen  $\beta$ -Wert von  $0.64 \pm 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ , welcher in vollem Einklang mit dem Superaustauschmechanismus steht.

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus Lewis und Wasielewskis Messungen konnte gewonnen werden, indem für verschiedene Donor-/Akzeptorpaare die freie Enthalpie  $\Delta G$  sowohl für den Ladungstrennung- als auch für den Ladungsrekombinationsprozess bestimmt und gegen die experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{CS}$  bzw.  $k_{CR}$  aufgetragen wurden. Es zeigte sich hierbei, dass die Raten  $k_{CS}$  mit ansteigendem  $\Delta G$  zunahm, wohingegen die Raten  $k_{CR}$  mit steigendem  $\Delta G$  wieder abfielen.<sup>[58]</sup> Daraus konnte gefolgert werden, dass der Ladungsrekombinationsprozess in der sogenannten „*Marcus inverted region*“ abläuft, in welcher trotz steigendem  $\Delta G$  ein Ansteigen der freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  auftritt und die Reaktionsgeschwindigkeit folglich wieder abnimmt.<sup>[53, 59]</sup>

Zusammenfassend lassen sich für den Superaustauschmechanismus des Elektronentransfers die folgenden Aussagen treffen: