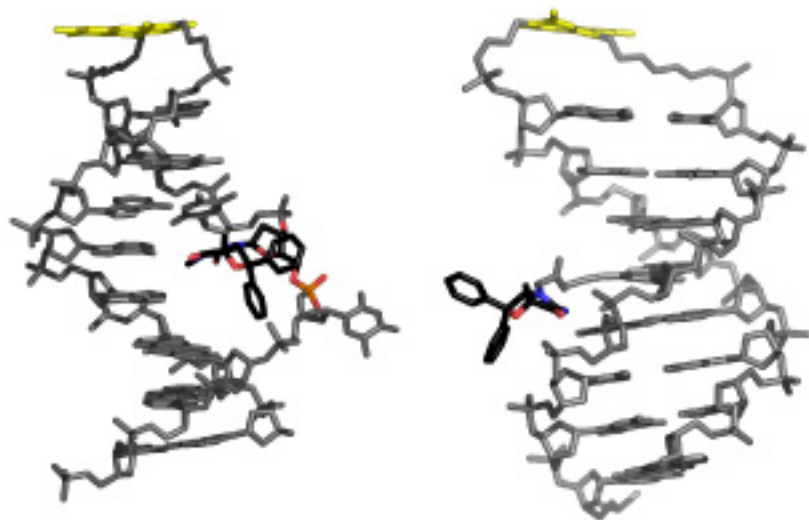


Sascha Breeger

Elektronentransfergetriebene  
Reparatur und zelluläre Erkennung  
von DNA-Photoschäden



Cuvillier Verlag Göttingen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

Sascha Breeger

aus

Fulda

2007

### **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2007  
Zugl.: München, Univ., Diss., 2007

978-3-86727-243-8

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2007  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2007  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-243-8

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 19.03.07

---

(Sascha Breeger)

Dissertation eingereicht am: 26.03.07

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. Heinz Langhals

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.07

Es mag sein, dass wir durch das Wissen anderer gelehrter  
werden, weiser werden wir nur durch uns selbst

*Michel de Montaigne*

## Danksagung

*Prof. Dr. Thomas Carell* danke ich für die interessante und abwechslungsreiche Themenstellung, die stete Diskussionsbereitschaft und seine großzügige Unterstützung. Durch das von ihm gebotene, hervorragende Arbeitsumfeld wurde das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht.

*Prof. Dr. Heinz Langhals* danke ich für die Übernahme des Koreferats. Gleichzeitig sei hier allen Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Mitwirken an der mündlichen Prüfung gedankt.

Ich danke *Slava Gärtner, Claudia Gräf* und *Sabine Voß* für ihre schnelle und unbürokratische Hilfe in allen organisatorischen und chemischen Belangen; Frau *Voß* sei hierbei besonders für die zügige und unproblematische Durchführung des Umlaufs zu dieser Dissertation gedankt.

Für die Präparation der humanen und bakteriellen Zellextrakte danke ich besonders *Dr. Susanne Manetto, Claudia Gräf, Melanie Maul, Dr. Claudia Chiocchini, Andreas Glas* und *Ralf Strasser*. Darüber hinaus danke ich *Carsten Pieck* für seine prompte Hilfe bei allen biochemischen Fragestellungen und Methoden, sowie *Antonio Manetto, Dr. Uli Hennecke* und *Dr. Martin von Meltzer* für die gute und sehr ergiebige Zusammenarbeit beim Elektronentransfer.

*Falk Butter* (Arbeitsgruppe *Prof. Dr. M. Mann*, MPI für Biochemie und Neurobiologie, Martinsried) danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den SILAC-Experimenten und die prompte und gewissenhafte massenspektrometrische Untersuchung der *Fishing*-Experimente (garantiert keratinfrei!).

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilungen für NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren. *Dr. Werner Spahl* danke ich hierbei besonders für die HPLC-MS/MS-Experimente. Ferner danke ich *Dr. Kurt Polborn* für die Durchführung und das Lösen der Kristallstrukturanalyse.

Ganz herzlich danken möchte ich *Dr. Simone Arnold, Sabine Voß* und *Johannes Gierlich*, deren Freundschaft mich durch die ganze Zeit hier in München (und teils auch schon in Marburg!) getragen hat und auch auf meinem weiteren Weg durchs Leben begleiten wird. *Johannes* danke ich dabei besonders – neben seiner unschätzbaren Unterstützung bei allen Computer-

und Geräteproblemen – für die gemeinsamen Opernbesuche und unsere vielfältigen kulinarischen Aktivitäten, sei es als Köche oder als Restauranttester. *Sabine* danke ich für die Starthilfe nach unserem Umzug nach München, für die vielen guten Gespräche und das Wachhalten meiner kulturellen Interessen. *Simone* danke ich besonders für ihr immer für alle meine Probleme offenes Ohr und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, für alle Aufmunterungen und den manchmal nötigen kleinen Anstoß zur rechten Zeit – und für das große gegenseitige Vertrauen.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des AK *Carell* danke ich für die entspannte und immer anregende Atmosphäre sowohl bei der Arbeit als auch bei den vielfältigen Aktivitäten außerhalb des Labors (Wiesn, Nockherberg, Bergtour, Kanutour, Grillen, Weihnachtsfeier, diverse Kneipen und Restaurants, Andechs, Fußballturnier etc.). Die schöne Zeit in Marburg und München wird mir dadurch in vielerlei Hinsicht unvergesslich bleiben. Hervorgehoben seien neben den oben genannten besonders die Laborgenossen aus F. 4.017. So danke ich besonders meinem alten Boxkollegen und Wohnungsgenossen *Florian Büsch* (dem ich an dieser Stelle nochmals zur Geburt seiner Zwillinge gratulieren möchte!), mit dem ich gerade beim Umzug nach München eine unvergessliche Zeit hatte, außerdem *Eva Jahn* für die gute Musikauswahl (Robbie!!!) und ihren unerschütterlichen Enthusiasmus sowie *Heiko Müller*, *Aaron Alt*, *Dr. Martin von Meltzer* und *Antonio Manetto* für die allzeit lockere und (zumeist) stressfreie Laboratmosphäre.

Für das schnelle und trotzdem gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich herzlich *Eva Jahn* und *Dr. Uli Hennecke* (Tut mir leid, aber es ging leider nicht kürzer!!).

Der abschließende und größte Dank gebührt meiner Familie für die immerwährende, selbstlose Unterstützung sowohl während meines Studiums in Marburg als auch während meiner Promotion im fernen München. Ohne diesen beständigen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen präsentiert:

### Beiträge in rezensierten Fachzeitschriften

1. Sascha Breeger, Uli Hennecke und Thomas Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *125*, 1302-1303. „Excess Electron Transfer Based Repair of a *cis-syn* Thymine Dimer is only Weakly Sequence Dependent“.
2. Antonio Manetto, Sascha Breeger, Chrysosstomos Chatgililoglu und Thomas Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45(2)*, 318-321. „Complex Sequence Dependence by Excess Electron Transfer through DNA with Different Strength Electron Acceptors“.
3. Sascha Breeger, Martin von Meltzer, Uli Hennecke und Thomas Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12(25)*, 6469-6477. „Investigation of the Pathways of Excess Electron Transfer in DNA with Flavin-Donor and Oxetane-Acceptor Modified DNA Hairpins“.

### Buchbeiträge

1. Thomas Carell, Sascha Breeger und Martin von Meltzer, in „*Soft Nanomaterials*“, Herausgeber S. Nalwa, *American Scientific Publishers*, Stevenson Ranch (California), *im Druck*. „Excess Electron Transfer in DNA“.

### Posterpräsentationen

1. Posterpräsentation „ Synthesis and Electron Transfer Properties of Flavin and Oxetane containing DNA hairpins“, Bayer-Doktorandenkurs, Leverkusen, August **2005**.
2. Posterpräsentation „ Chemical Proteomics – Towards Selective Photoaffinity labeling of DNA Repair Proteins“, 9th Chinese International Peptide Symposium, Shanghai, Juli **2006**.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>viii</b>
Zusammenfassung.....	xi
<i>Summary</i> .....	xv
<b>1 Einführung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Oxidativer Ladungstransfer in DNA.....	4
1.1.1 Der <i>Hopping</i> -Mechanismus.....	10
1.1.2 Das <i>A-Hopping</i> .....	13
1.1.3 Das <i>Polaron-Hopping</i> -Modell.....	16
1.1.4 Das „ <i>Delocalized Domain</i> “-Modell.....	19
1.2 Reduktiver Elektronentransfer in DNA.....	21
1.2.1 Reduktiver Ladungstransfer in der Natur und daraus abgeleitete Modellsysteme.....	26
1.3 <i>Photoaffinity labeling</i> als Methode zur Aufklärung von Protein-Substrat- Wechselwirkungen.....	35
1.3.1 Chemische Methoden in der Proteomanalyse – das <i>Activity-based protein         profiling</i> .....	40
1.3.2 Das <i>Photoaffinity labeling</i> – kovalente Markierung über Reaktion mit photolabilen Substraten.....	43
1.3.3 DNA als Substrat in <i>photoaffinity labeling</i> -Experimenten.....	54
<b>2 Synthese und Charakterisierung flavin- und oxetanenthaltender     DNA-Haarnadeln.....</b>	<b>58</b>
2.1 Aufgabenstellung.....	58
2.2 Synthese des Oxetanbausteins.....	60
2.3 Synthese flavin- und oxetanhaltiger DNA-Haarnadeln.....	66

2.4	Charakterisierung der DNA-Haarnadeln.....	70
2.5	Belichtungsexperimente unter Verwendung von Natriumdithionit.....	75
2.6	Belichtungsexperimente mit EDTA und N <sub>2</sub> O.....	79
2.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	84
<b>3</b>	<b>Synthese und Elektronentransfereigenschaften flavin- und bromnukleosidhaltender DNA-Haarnadeln.....</b>	<b>87</b>
3.1	Aufgabenstellung.....	87
3.2	Synthese und Reinigung der DNA-Haarnadeln.....	89
3.3	Charakterisierung der DNA-Haarnadeln.....	91
3.4	Belichtungsexperimente unter Verwendung von EDTA als Photoreduktionsmittel.....	95
3.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	102
<b>4</b>	<b>Synthese diazirinenthaltender DNA-Doppelstränge – <i>Photoaffinity labeling</i> DNA-bindender Proteine in Zellextrakten...</b>	<b>105</b>
4.1	Aufgabenstellung.....	105
4.2	Synthese der Diazirinfestphasenbausteine 99 und 100.....	108
4.3	Strategien zur Synthese diazirin- und DNA-Schäden enthaltender DNA-Doppelstränge.....	113
4.3.1	Direkter Einbau des Phosphoramidits 99.....	113
4.3.2	Inkorporation des Diazirinbausteins über <i>Click-Chemie</i> .....	119
4.3.3	Synthese der DNA-Schäden enthaltenden Oligonukleotide.....	123
4.4	Charakterisierung der Oligonukleotide.....	126
4.5	<i>Photoaffinity-labeling</i> -Experimente.....	132
4.5.1	Versuche mit rekombinanten DNA-Reparaturproteinen.....	132
4.5.2	Versuche mit Zellextrakten aus <i>E. coli</i> -Überexpressionsstämmen.....	139
4.5.3	Versuche mit <i>E. coli</i> Wildtyp-Zellextrakten.....	148
4.5.4	Experimente mit humanen Nuklearextrakten und <i>S. cerevisiae</i> -Zelllysaten.....	152
4.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	156

<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>160</b>
	Material und Methoden.....	160
5.1	Synthese des Thymin-Oxetanbausteins 77.....	166
5.2	Synthese des Diaziriniodids 101.....	171
5.3	Synthese des DNA-Diazirinbausteins 99.....	177
5.4	Synthese des RNA-Diazirinbausteins 100.....	182
5.5	Synthese und Aufreinigung der Oligonukleotide.....	188
5.5.1	Synthese der flavin- und bromnukleosidhaltenden DNA-Haarnadeln.....	188
5.5.2	Abspaltung und Aufreinigung der flavin- und bromnukleosidhaltenden DNA-Haarnadeln.....	189
5.5.3	Synthese und Aufreinigung der flavin- und oxetanhaltigen DNA-Haarnadeln .....	191
5.5.4	Synthese und Aufreinigung der diazirinenthaltenden Oligonukleotide.....	192
5.5.5	Synthese der schädenenthaltenden Gegenstränge.....	194
5.6	Reparaturexperimente mit den donor-/akzeptormodifizierten DNA-Haarnadeln H1-5 <sub>a,b,c</sub> und POx1-4.....	197
5.7	<i>Photoaffinity labeling</i> -Experimente.....	198
5.7.1	<i>Labeling</i> von gereinigten Proteinen.....	199
5.7.2	<i>Labeling</i> von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> -Zellextrakten.....	201
5.7.3	<i>Labeling</i> von humanen Nuklearextrakten.....	203
5.7.4	<i>In gel</i> -Trypsinverdau der gelabelten Banden.....	204
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>207</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>241</b>
A	Röntgenkristallstrukturdaten von Verbindung 87.....	241
B	Zusammenstellung der verwendeten Puffersysteme.....	249
C	<i>Mascot</i> -Ergebnisprotokolle der durch Trypsinverdau und <i>Peptide mass fingerprinting</i> untersuchten Proteine.....	251
D	Abkürzungsverzeichnis.....	269

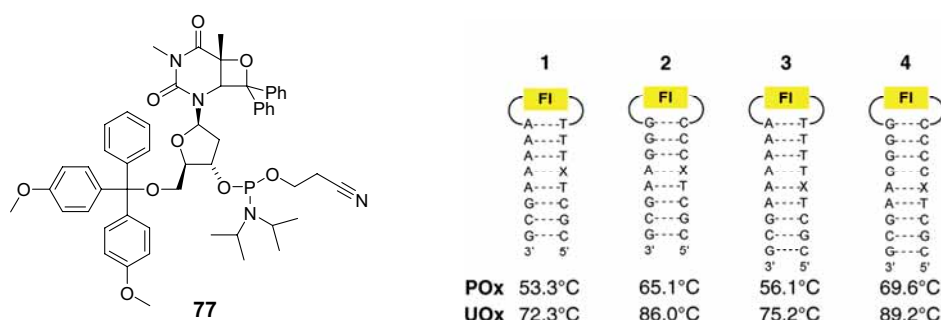
## Zusammenfassung

Auch mehr als 100 Jahre nach ihrer Entdeckung übt die DNA (Desoxyribonukleinsäure) noch immer eine ungebrochene Anziehungskraft auf Wissenschaftler aller Fachrichtungen aus. Ein Grund hierfür ist die enorme biologische und medizinische Bedeutung, die der DNA aufgrund ihrer Eigenschaft als Trägerin der Erbinformation zukommt. Eine Schädigung kann zu Mutationen und damit letztlich zu Krebs, Alterungserscheinungen oder in letzter Konsequenz zum Tod der betroffenen Zelle führen. Das Studium der Prozesse, die die Reparatur der DNA steuern und so die genomische Integrität wahren, ist daher von vitalem Interesse und wird intensiv vorangetrieben.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der besonders Chemiker und Physiker anspricht, ist die DNA als selbstorganisierendes, durch die Basensequenz strukturell programmierbares System. Auf Basis dieser Plattform erscheint es möglich, Nanostrukturen auf DNA-Basis gezielt zu erzeugen, die aufgrund der  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen innerhalb der Stränge zudem eine gewisse Leitfähigkeit besitzen könnten. Das Studium von Ladungstransferprozessen in DNA ist hierfür von zentraler Wichtigkeit. Sowohl die biologische Aktivität als auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der DNA waren Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit, deren Teilaspekte hier kurz vorgestellt werden.

In den beiden ersten Projekten, die im Rahmen der Arbeit bearbeitet wurden, stand die Untersuchung des Transfers von Überschusselektronen in DNA-Haarnadeln im Mittelpunkt des Interesses. Als Elektronendonator fungierte im verwendeten System ein Flavinderivat, welches in reduziertem, deprotoniertem und lichtangeregtem Zustand ein sehr starkes Reduktionsmittel darstellt. Als Elektronenakzeptor wurde im ersten Projekt ein vom Thymidin abgeleitetes Oxetan **77** eingesetzt. Dieses wurde ausgehend von 3-Methylthymidin über eine *Paternó-Büchi*-Reaktion mit Benzophenon und eine nachfolgende stereoselektive Glykosidierung dargestellt und mit dem Flavindonor in DNA-Haarnadeln inkorporiert (Abb.

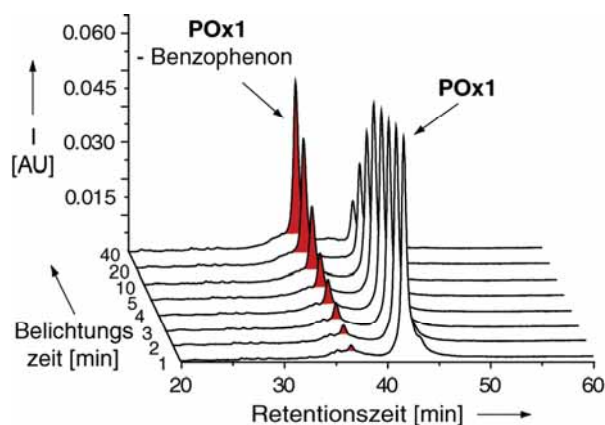
i)



**Abb. i.** links) Synthetisierter Thyminoxetanbaustein **77**; rechts) Sequenz der synthetisierten DNA-Haarnadeln, darunter die UV-Schmelzpunkte. Fl = Flavinderivat, X = Oxetanbaustein.

Bei Belichtung der DNA-Stränge mit  $\lambda = 366$  nm unter anaeroben Bedingungen (Reduktion des Flavins mit Natriumdithionit bzw. EDTA-Photoreduktion) erfolgte Elektronentransfer

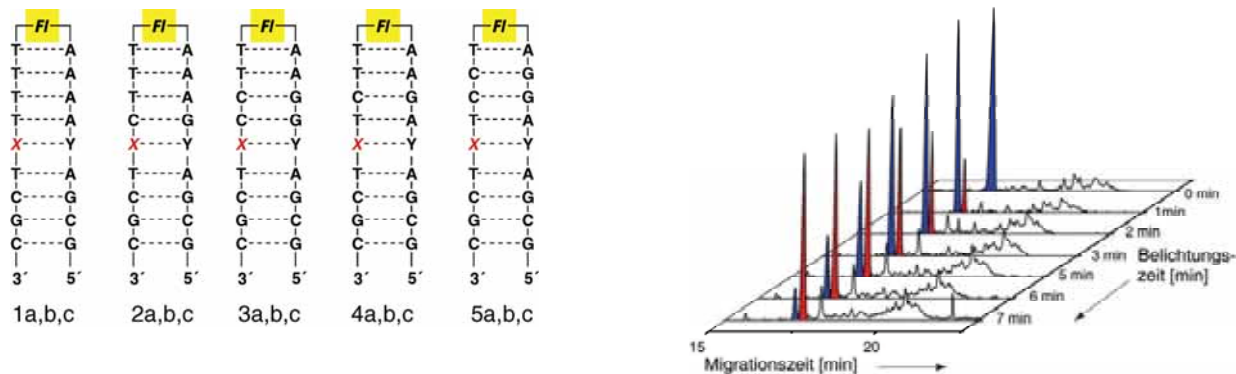
vom Flavin zum Oxetanakzeptor, der dadurch Benzophenon abspaltete, was sich per HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie verfolgen ließ (Abb. ii)



**Abb. ii.** Elektronentransferinduzierte Spaltung des Oxetans, veranschaulicht anhand der HPL-Chromatogramme einer Belichtung des Strangs **POx1**.

Durch Vergleich der Oxetanspaltungsausbeuten pro Zeiteinheit für die untersuchten Haarnadeln konnten verschiedene Aussagen getroffen werden. Zum einen zeigte sich die erwartete geringe Abstandsabhängigkeit der Elektronentransfereffizienz, was in Einklang mit einem thermisch aktivierten *Hopping*-Mechanismus steht, der auch in früheren Messungen innerhalb unserer und anderer Arbeitsgruppen gefunden wurde. Weiterhin zeigte sich eine Verlangsamung des Elektronentransfers durch G:C-Basenpaare zwischen Flavindonor und Oxetanakzeptor (ca. 25 % pro G:C-Basenpaar). Ein solcher Einfluss der Sequenz wurde von anderen Gruppen (*Rokita*, *Wagenknecht*) postuliert, war mit dem in unserer Arbeitsgruppe bis zu dieser Studie verwendeten T=T-Dimer-Elektronenakzeptor vermutlich aufgrund dessen langsamer Spaltung nicht messbar. Zudem erwies sich im Vergleich mit einem von *Hennecke* synthetisierten Oxetanbaustein, dass die Integrität der  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen und der lokalen Duplexstruktur vitale Voraussetzung für einen effizienten Elektronentransfer ist; die starke Störung, die Verbindung **77** auf den Duplex ausübte, äußerte sich hierbei in einer stark verminderten Oxetanspaltungsausbeute.

Im zweiten Projekt wurden ebenfalls DNA-Haarnadeln mit einem Flavinderivat als lichtinduzierbaren Elektronendonator synthetisiert. Als Akzeptor wurden hier die bromsubstituierten Nukleoside 5-Bromdesoxyuridin, 8-Bromdesoxyadenosin und 8-Bromdesoxyguanosin gewählt, von denen aus früheren Studien bekannt war, dass sie mit solvatisierten Elektronen sehr schnell reagieren ( $\rightarrow$  diffusionskontrollierte Geschwindigkeit). Nach Aufnahme des Elektrons kam es in diesen Akzeptoren zur Abspaltung eines Bromidions, Endprodukt war das debromierte Nukleosid. Die Abspaltung des Bromids konnte in diesem Fall per Kapillargelelektrophorese (CE) verfolgt werden. Die Struktur der synthetisierten Haarnadeln und ein Elektropherogramm einer Belichtung des Strangs **H1a** sind in Abb. iii dargestellt.

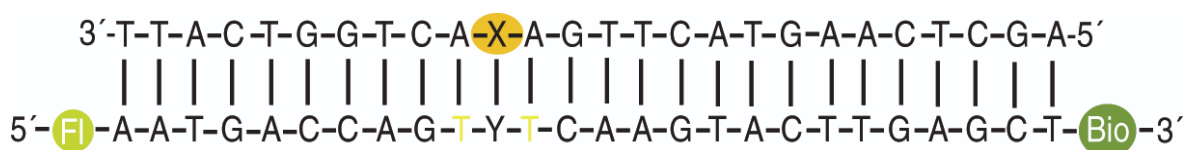
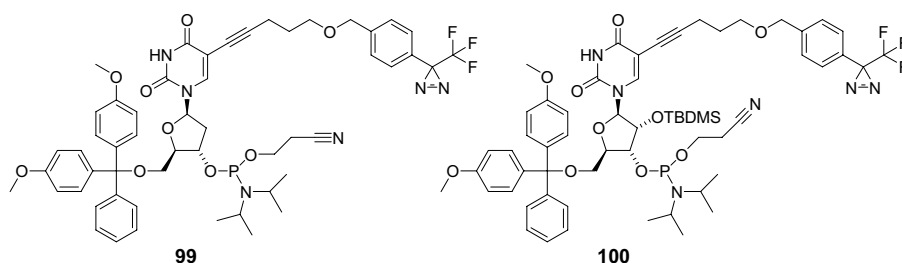


**Abb. iii.** links) Struktur der synthetisierten DNA-Haarnadeln (Fl = Flavin 35, X = Akzeptor 54 (5-Bromdesoxyuridin, Serie a), 97 (8-Bromdesoxyadenosin, Serie b) bzw. 98 (8-Bromdesoxyguanosin, Serie c), Y = adäquate Gegenbase); rechts) Elektropherogramm einer Belichtung von Strang 1a (blau = Strang 1a, rot = debromierter Produktstrang).

Der Vergleich der Debromierungsausbeuten in den dargestellten DNA-Haarnadeln ließ verschiedene Schlussfolgerungen zu. Zum einen zeigte sich auch hier die erwartete niedrige Abstandsabhängigkeit des Elektronentransfers, entsprechend dem *Hopping*-Mechanismus. Eine Verringerung der Debromierungsausbeute bei Anwesenheit eines oder mehrerer G:C-Basenpaare zwischen Donor und Akzeptor zeigte sich signifikant nur im Falle von 5-Bromdesoxyuridin als Akzeptor. Bei 8-Bromdesoxyadenosin war der Effekt schon wesentlich schwächer und bei 8-Bromdesoxyguanosin quasi nicht sichtbar. Diese Reihung korreliert mit der mutmaßlichen Abfolge der Redoxpotentiale. Offenbar wird im Falle der schwerer reduzierbaren Akzeptoren 8-Br-dA und 8-Br-dG der Übergang des Elektrons auf den Akzeptor zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Ferner zeigte sich, dass G:C-Basenpaare in direkter Nachbarschaft des Akzeptors eine wesentlich stärkere Verminderung der Debromierungsausbeuten zur Folge hatten, als wenn sie mittig zwischen Donor und Akzeptor positioniert waren. Die Erklärung hierfür könnte einerseits eine Modulation des Redoxpotentials sein, oder aber die größere Rigidität des Duplexes im Bereich von Donor und Akzeptor durch die direkte „Stapelung“ mehrerer G:C-Paare. Zusammen genommen wurde ein sehr komplexer Zusammenhang der Elektronentransfereffizienz von der Sequenz und der Art des verwendeten Akzeptors gefunden.

Im Fokus des dritten Projekts stand die biologische Funktion der DNA, speziell ihre Wechselwirkung mit DNA-Reparaturproteinen. Ziel war die Entwicklung eines Systems, mit dem in Zellextrakten selektiv DNA-Reparaturproteine kovalent markiert und so „gefischt“ werden konnten. Hierzu wurde die Methode des *Photoaffinity labeling* gewählt, bei der durch Belichtung aus einem photolabilen Vorläufer ein reaktives Intermediat erzeugt wird, welches die kovalente Bindung zum Enzym knüpft. Zunächst wurde hierzu ein Aryltrifluormethyldiazirinnukleosid ( $\rightarrow$  Carbenvorläufer) als DNA- oder RNA-Baustein synthetisiert und ersterer in DNA inkorporiert, welche zur Detektion und Reinigung weitere

Fluorescein- und Biotinmarkierungen aufwies. Die Stränge wurden mit Gegensträngen hybridisiert, in die per Festphasensynthese in definierter Position DNA-Schäden eingefügt worden waren. Die Struktur der Diazirinbausteine und die schematische Sequenz der DNA-Doppelstränge zeigt Abb. iv.



**Abb. iv.** Struktur der Diazirinfestphasenbausteine **99** (DNA) und **100** (RNA), unten schematische Darstellung der synthetisierten DNA-Duplexe. T = Baustein **99**, Fl = Fluorescein, Bio = Biotin, X = 8-Oxo-dG, 8-Oxo-dA,  $\beta$ -cFaPydG, 5-OH-dU, Hydantoin, T=T-CPD oder T<sup>^</sup>T-(6-4)-Photoprodukt, Y = entsprechende Gegenbase.

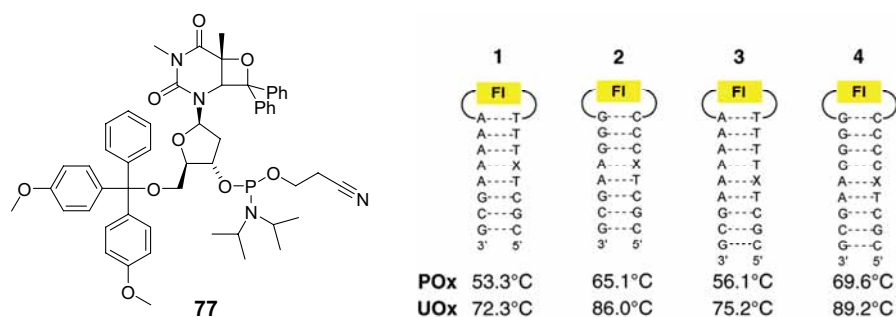
Bei Inkubation des  $\beta$ -cFaPydG enthaltenden Duplexes mit reiner Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase, welche diesen Schaden *in vivo* reparieren kann, und nachfolgender Belichtung konnte nach Reinigung per SDS-PAGE und Fluoreszenzaufnahmen deutlich die Bildung eines Protein-DNA-Crosslinks in guten Ausbeuten beobachtet werden. Dasselbe konnte auch mit dem T=T-CPD enthaltenden Strang und einer *E. coli* CPD-Photolyase sowie mit verschiedenen NER-Proteinen (Rad 14, Rad 23) beobachtet werden. Selbige Proteine konnten auch selektiv aus einem *E. coli* Ganzzellextrakt gefischt werden, in dem sie überexprimiert vorlagen; der Nachweis der Identität der Proteine konnte hier über Trypsinverdau und nachfolgendes *Peptide mass fingerprinting* (per MALDI-TOF-Massenspektrometrie) eindeutig erbracht werden. Das Markieren von DNA-Reparaturproteinen in Wildtypzellextrakten (*E. coli*) gelang aufgrund der niedrigen Konzentration der betreffenden Proteine dagegen nicht, auch Versuche zur Vorfraktionierung des Extrakts brachten keine Verbesserung. Versuche mit humanen Nuklearextrakten zeigten im SDS-PAGE signifikante Unterschiede zwischen den markierten Proteinen in Abhängigkeit vom verwendeten DNA-Schaden. Daher sind hier die Aussichten günstig, die Interaktion DNA bindender Proteine mit geschädigter DNA endlich systematisch untersuchen zu können. Eine massenspektrometrische Identifizierung der genannten Proteinbanden konnte hier aufgrund einer zu großen Zahl an Kontaminationen nicht erfolgen, steht aber für die nächste Zukunft in Aussicht.

## Summary

Even though more than 100 years have passed since its discovery, the DNA (deoxyribonucleic acid) has lost none of its attraction to scientists from remarkably different fields of activity. One main reason for this may be the enormous biological and medicinal importance of the DNA as the main carrier of genetic information. DNA damage is a cause of cancer, age-related diseases and, ultimately, death of the affected cell. Therefore the elucidation of processes which control DNA repair and the genome maintenance are of crucial importance and are under heavy investigation.

A second important aspect, especially intriguing for chemists and physicists, is the idea of DNA being a self-organizing, structurally programmable system. Directed assembly of DNA-based nanostructures is an interesting goal, particularly because of the electric conductivity that might arise from the  $\pi$ -stacking interactions within the strands. Both the biological activity and the physicochemical properties of DNA have been investigated in the course of this thesis, the main results of the three main subprojects will be presented in the following.

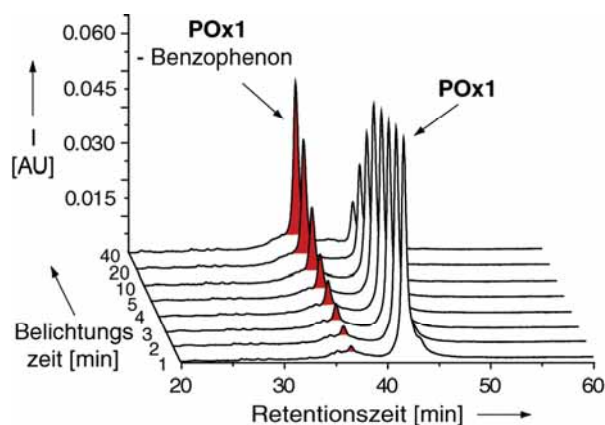
The first two main projects of the PhD thesis are focused on excess electron transfer in donor/acceptor modified DNA hairpins. A flavin derivative was used as the electron donor, as it is a powerful reducing agent in its reduced, deprotonated and singlet-excited state. In the first project the thymidine-derived oxetane building block **77** was used as the electron acceptor. **77** was synthesized starting from 3-methylthymine by a *Paternó-Büchi* reaction followed by a stereoselective glycosidation. It was incorporated into DNA hairpins together with the above mentioned flavin donor (Figure i).



**Figure i.** left) Oxetane building block **77**; right) Sequence of the synthesized DNA hairpins, the numbers below are the UV melting points. Fl = flavin, X = oxetane **77**.

Upon irradiation with  $\lambda = 366$  nm electron transfer occurred from the reduced flavin (reduction by sodium dithionite or EDTA-photoreduction) to the oxetane, which was subsequently cleaved to give benzophenone and the corresponding thymidine. This process could be monitored by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure ii).

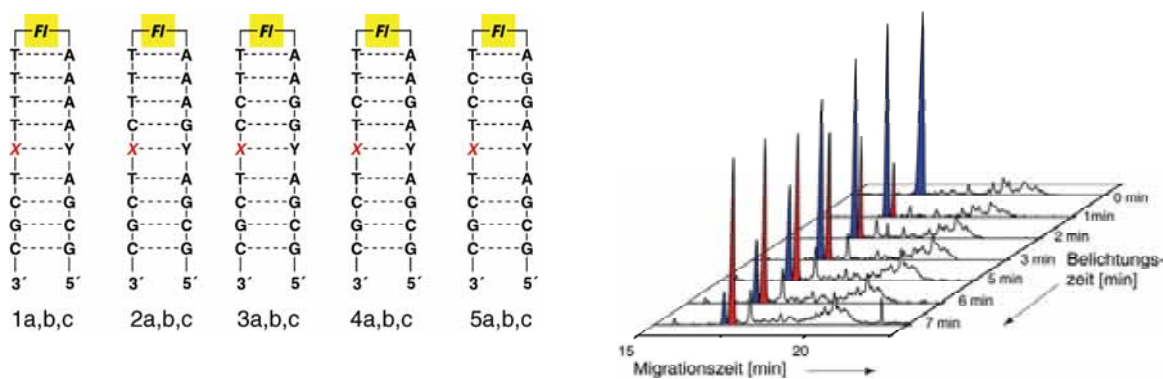




**Figure ii.** Electron transfer-induced cleavage of oxetane **77** shown by the HPL-chromatograms of an irradiation experiment with strand **POx1**.

Comparing the oxetane cleavage yields for all investigated hairpins allowed to extract several conclusions. First of all, the hairpins showed the expected small distance dependence of the electron transfer efficiency, which is consistent with the idea of excess electron transfer following a thermally activated hopping mechanism. Furthermore, electron transfer was slowed down by the presence of G:C base pairs between the flavin donor and the oxetane acceptor (about 25 % decrease per G:C base pair). A sequence effect of this kind had been observed by other groups (*Rokita, Wagenknecht*) but had never been detected with our previously used T=T dimer electron acceptor. Moreover, a comparative study between **77** and a sterically less demanding oxetane building block synthesized by *U. Hennecke* revealed that the integrity of  $\pi$ -stacking interactions and local duplex structure are prerequisites for efficient electron transfer. The strongly disturbing effect that **77** exerted on the duplex structure therefore led to significantly reduced oxetane cleavage yields.

The second project was focused on donor/acceptor modified DNA hairpins comprising a light inducible flavin derivative as electron donor, and the bromosubstituted nucleosides 5-bromodeoxyuridine, 8-bromodeoxyadenosine and 8-bromodeoxyguanosine served as electron donors. These molecules were known to react with solvated electrons at diffusion-limited rates. After electron capture these acceptors released a bromide ion and the final product of the reaction was the reduced (H-substituted) nucleoside. The loss of bromine could be monitored by capillary electrophoresis (CE). The investigated DNA hairpins and an electropherogram of an irradiation experiment performed with strand **H1a** are depicted in Figure iii.

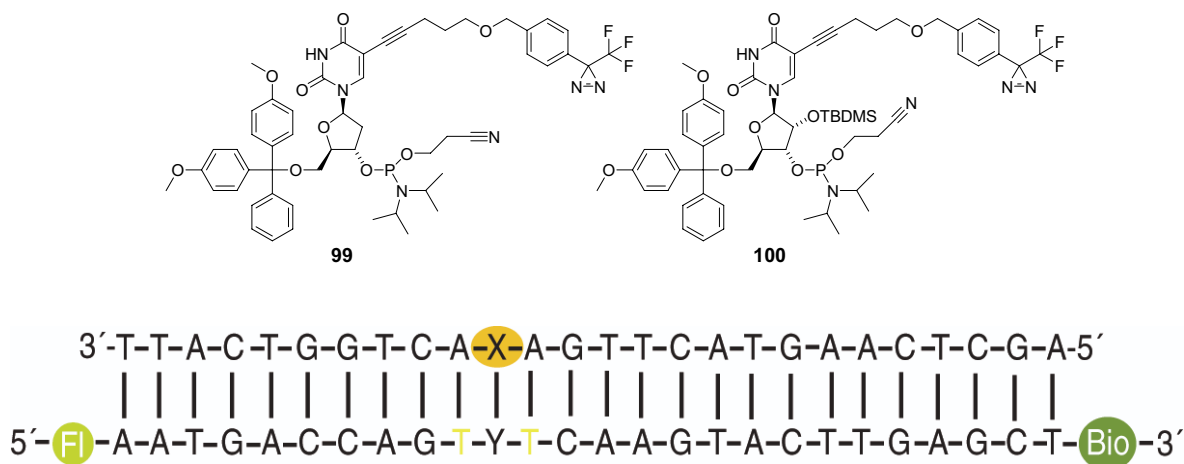


**Figure iii.** left) Structure of the synthesized DNA hairpins (Fl = Flavin 35, X = Electron acceptor 54 (5-bromodeoxyuridine, series a), 97 (8-bromodeoxyadenosine, series b), 98 (8-bromodeoxyguanosine, series c), Y = adequate counterbase; right) Electropherogram of an irradiation of strand **1a** (in blue: **1a**, in red: debrominated strand).

A comparative study of the debromination yields for all synthesized DNA hairpins led to several conclusions. As in the case of the oxetane acceptors a small distance dependence of the excess electron transfer was found, consistent with the hopping mechanism. The presence of one or two G:C base pairs between donor and acceptor led to a significant reduction of the debromination yields only when 5-Br-dU was used as the electron acceptor. However, this effect was much less pronounced with the 8-Br-dA comprising strands and more or less not visible with the 8-Br-dG comprising DNA hairpins. This sequence strongly reflects the putative redox potentials of the acceptors. In the case of the acceptors 8-Br-dA and 8-Br-dG, which are more difficult to reduce, electron capture by the acceptor appeared to become the rate-determining step of the electron transfer process. Moreover, G:C base pairs in direct vicinity of the electron acceptor gave rise to a much stronger reduction of the debromination yield than in case of the G:C base pairs being located in the middle between the donor and the acceptor. This may be explained by a modulation of the acceptor redox potential by  $\pi$ -stacking effects or, more likely, by a decrease of structural flexibility in the donor/acceptor area caused by the stacking of multiple purine bases. In summary, one can state that a rather complex sequence dependence of the debromination yields was found, which was in addition strongly influenced by the kind of acceptor used in the study.

The third main project was centered round the biological function of DNA, in particular its interaction with DNA repair proteins. The main goal was the development of a system that enabled the selective “fishing” of DNA repair proteins from whole cell lysates. To achieve this we chose a photoaffinity labeling approach. In this method a photolabile precursor is split by irradiation to release a highly reactive intermediate which covalently marks the protein of interest. The first step was the synthesis of an aryltrifluoromethyldiazirine nucleoside ( $\rightarrow$  carbene precursor) both as DNA and RNA building block. The former has been incorporated into DNA strands additionally comprising a fluorescein label (for facile detection) and a biotin

label (for streptavidin affinity purification). The strands were hybridized to appropriate counterstrands comprising a DNA lesion in a defined position (“between” the two diazirines). The structure of the diazirine building blocks and the sequence of the synthesized DNA duplexes are depicted in Figure iv.

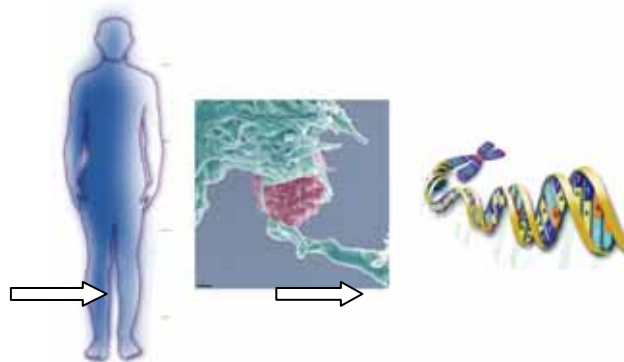


**Figure iv.** Structure of the diazirine building blocks **99** (for DNA) and **100** (for RNA), sequence of the synthesized DNA duplexes. T = **99**, Fl = fluorescein, Bio = biotin, X = 8-Oxo-dG, 8-Oxo-dA,  $\beta$ -cFaPydG, 5-OH-dU, T=T-CPD or T<sup>A</sup>T-(6-4) photoproduct, Y = adequate counterbase.

The  $\beta$ -cFaPydG containing DNA duplex gave rise to a high yield of a protein-DNA crosslink upon incubation and irradiation ( $\lambda = 365$  nm) in presence of formamidopyrimidine-DNA-glycosylase (Fpg). This enzyme can repair the lesion *in vivo*. The procedure also worked with a T=T-CPD comprising strand and *E. coli* CPD photolyase and for several nucleotide excision repair proteins (Rad 14, Rad 23). Fpg and *E. coli* CPD photolyase could also be “fished” from *E. coli* whole cell lysates overexpressing these enzymes. The proteins were unambiguously identified by trypsin digest of the protein-DNA crosslinks followed by peptide mass fingerprinting using a MALDI-TOF mass spectrometer. However, the covalent modification of DNA repair proteins in *E. coli* wild type extracts failed, presumably due to the low abundance of those proteins. Prefractionation of the lysates did not improve these results significantly. Experiments with human nuclear extracts showed in contrast remarkable differences on the SDS-PAGE, depending on the kind of DNA lesion used. Therefore this system seems to be favorable for a systematic investigation of the interaction of DNA binding proteins with lesion-comprising DNA. Mass spectrometric identification of the protein-DNA crosslinks was not possible due to the large amount of contaminations present in the experiment. A new set of experiments using an improved purification method is scheduled for the near future and is supposed to provide better material for MS experiments with the goal to identify the labeled proteins of interest.

# 1 Einführung

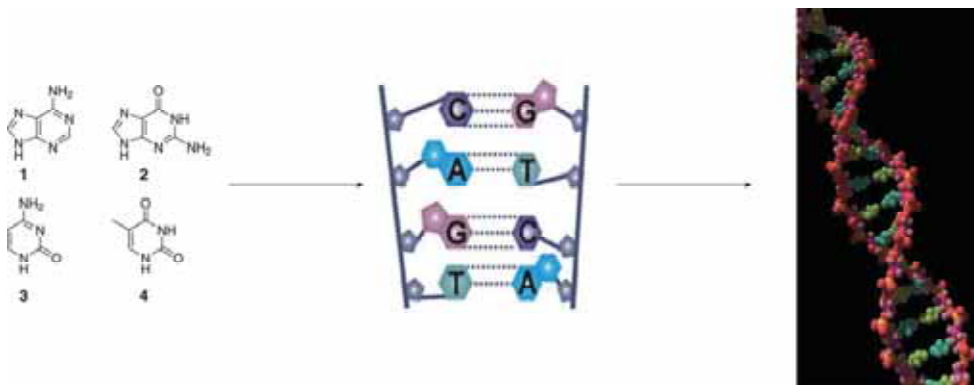
Welche Faktoren bestimmen über unser Aussehen? Warum erkranken wir an dem, was wir heute als Erbkrankheiten kennen? Auf welche Weise gehen Eigenschaften von den Eltern auf die Nachkommen über? Diese und ähnliche Fragen beschäftigten die Menschheit bereits seit Jahrtausenden – fast ebensoviel Zeit verging 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

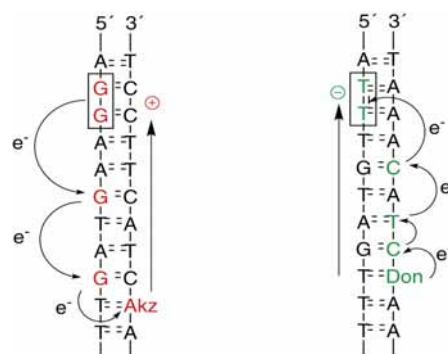
Phosphordiesterbindungen zwischen den 3'- und 5'-Positionen der Zuckereinheiten verbrückt. Es war die Leistung von *Watson* und *Crick*, die aus der Beobachtung *Chargaffs*,<sup>[5]</sup> dass G und C, bzw. A und T immer in gleichen Mengenverhältnissen auftreten, sowie aus den zuvor nicht auswertbaren 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), Zellularalterung 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).

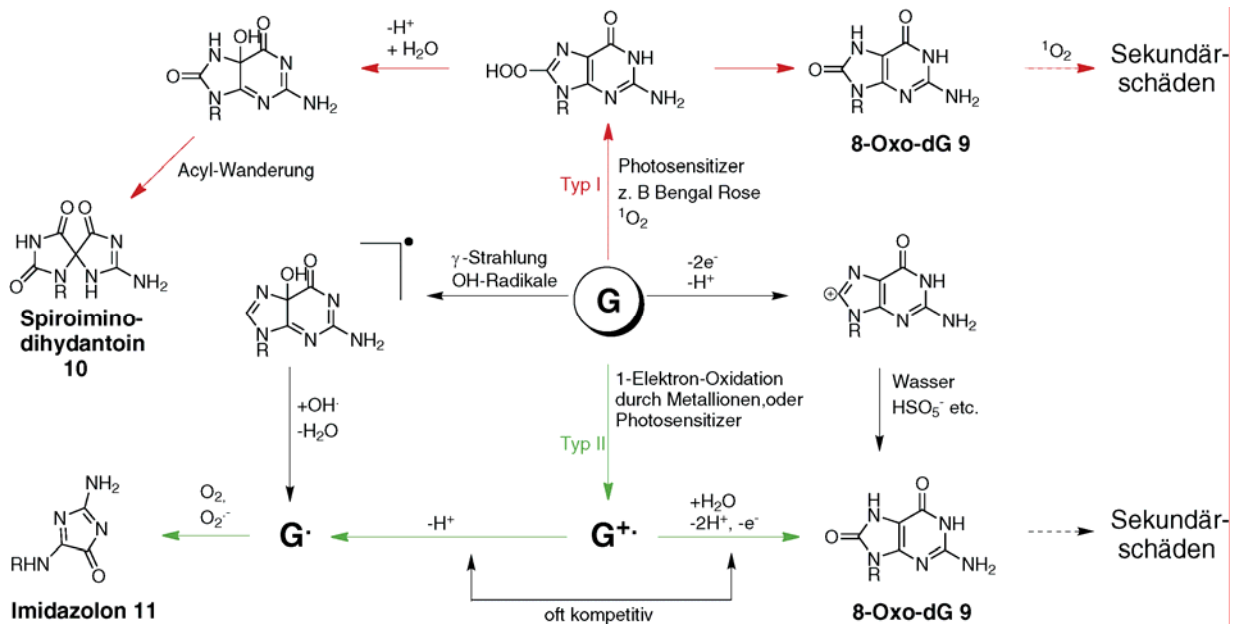
Aufgrund des  $\pi$ -stacking kann allerdings das Redoxpotential einer gegebenen Base im DNA-Strang nicht absolut betrachtet werden, es schwankt vielmehr abhängig von den flankierenden Basen.<sup>[16-18]</sup> Untersuchungen von *Saito* und anderen zeigen folgendes Bild (Tabelle 2).<sup>[19]</sup>

Basenabfolge	E <sup>0</sup> [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<sup>•+</sup>-Ion pH-Wert-abhängig auch als neutrales Radikal, bzw. Radikalanion vorliegen. Der Protonierungsgrad entscheidet hierbei über die Ver-

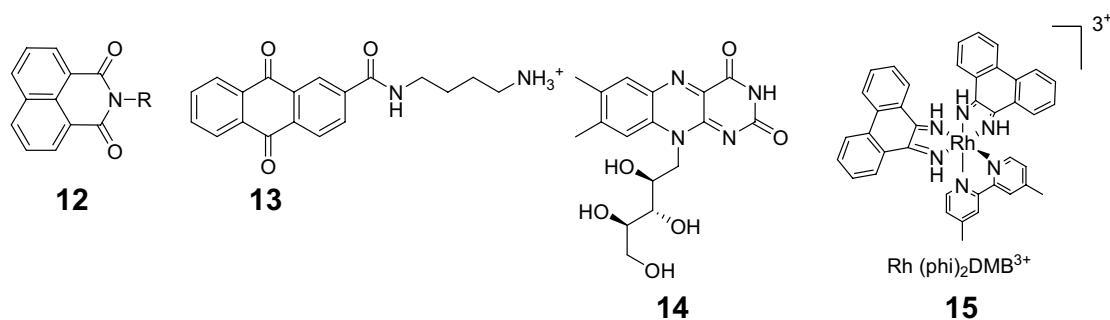


teilung der Produkte, welche durch Reaktion mit Wasser bzw. Sauerstoff zu verschiedenen Folgeprodukten führen können.<sup>[23]</sup> Manche der abgebildeten Spezies wie 8-Oxo-dG **9** oder das hier nicht gezeigte FaPydG, konnten mittlerweile synthetisch dargestellt werden und wurden vom Verfasser in 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:

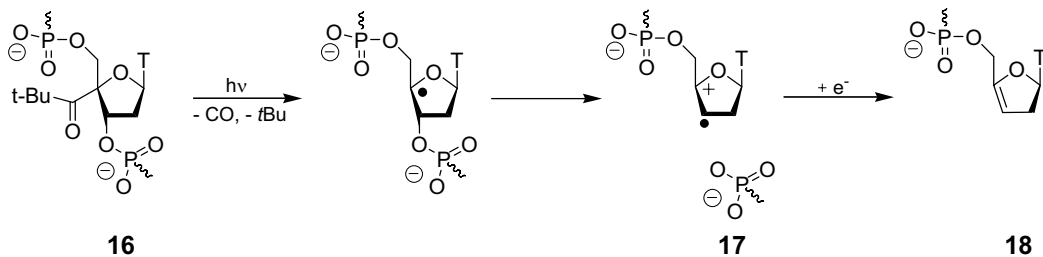
1. Einbringen redoxaktiver Sonden in DNA
2. Induktion des Ladungstransfers durch photochemische oder elektrochemische Methoden
3. Nachweis und kinetische Analyse der Ladungstransferprozesse

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>



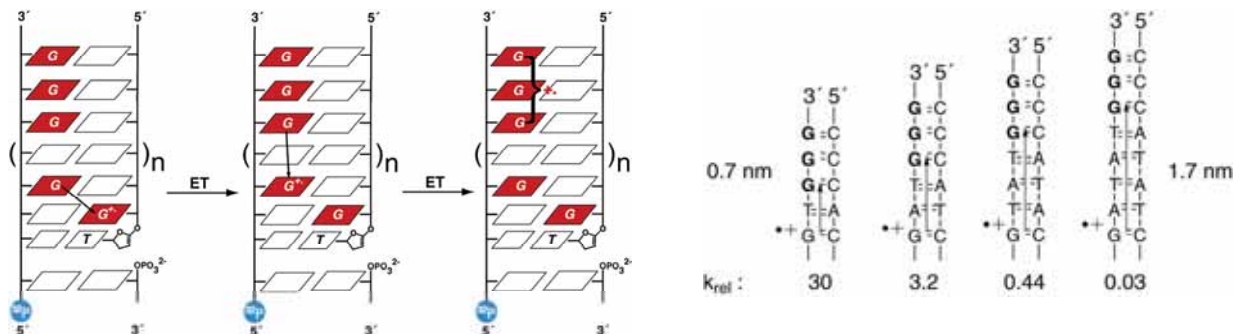
**Schema 3.** Zur Untersuchung des Lochtransfers eingesetzte Elektronenakzeptoren.

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.

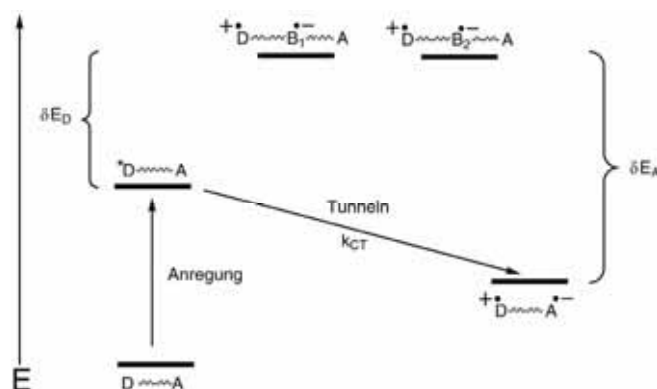
Es wurde festgestellt, dass die Elektronentransferrate mit jedem zusätzlichen AT-Basenpaar um den Faktor 10 absank. Dabei verringerte sich die Menge der Schädigung an der GGG-Einheit von 97 % bei 6.8 Å auf ca. 3 % bei 17 Å Abstand.

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).

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

( $V_0$  = Konstantenenergierterm 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)

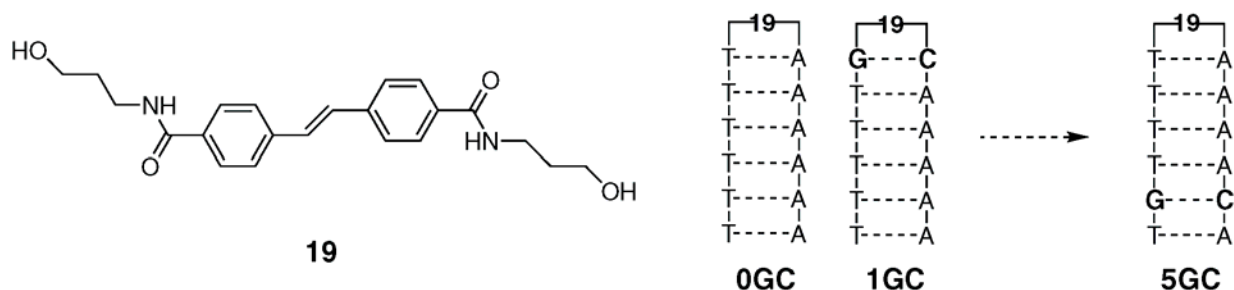


**Schema 5.** Schematische Darstellung eines Superaustauschprozesses.  $D$  = Donor,  $A$  = Akzeptor.

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.

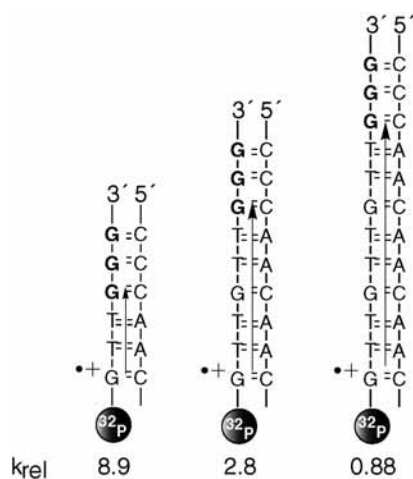
Eine weitere wichtige Erkenntnis aus Lewis und Wasielewskis Messungen konnte gewonnen werden, indem für verschiedene Donor-/Akzeptorpaare die freie Enthalpie  $\Delta G$  sowohl für den Ladungstrennung- als auch für den Ladungsrekombinationsprozess bestimmt und gegen die experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{CS}$  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:

1. Der Ladungstransfer ist auf sehr kleine Abstände beschränkt ( $< 10 \text{ \AA}$ ).
2.  $e^-$ -Transferreaktionen über kleine Distanzen verlaufen sehr schnell ( $k_{\text{ET}} = 10^9 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ).
3. Die gefundenen  $\beta$ -Werte liegen zumeist zwischen  $0.6 \text{ \AA}^{-1}$  und  $0.8 \text{ \AA}^{-1}$ .
4. Von entscheidender Bedeutung für einen effizienten Ladungstransfer ist ein stabiles  $\pi$ -stacking zwischen Donor und Akzeptor.

### 1.1.1 Der hopping-Mechanismus

Im Zuge weiterführender Untersuchungen zum Lochtransfer durch DNA, beispielsweise durch *Barton*, welche die Fluoreszenzlöschung zwischen zwei an den Enden eines DNA-Strangs befestigten Metallkomplexen beobachtet hatte, wurde sehr schnell klar, dass der Superaustausch nicht der einzige Mechanismus für die Bewegung des Elektrons sein konnte.<sup>[60]</sup> *Giese* konnte mit weiteren Arbeiten an seinem Modellsystem zeigen, dass auch bei sehr großen Abständen ( $> 40 \text{ \AA}$ ) zwischen dem primär erzeugten  $G^+$ -Radikalkation und der GGG-Einheit letztere dennoch messbar geschädigt wurde.<sup>[61]</sup> Die Menge der Schäden war dabei umso größer, je größer die Anzahl der zwischen Donor und Akzeptor liegenden Guanine war (Schema 7).



**Schema 7.** Von Giese bestimmte relative Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{rel}}$  für den Transport eines Elektrons über eine bzw. mehrere GTT-Sequenzen.

Zwar trat beim in Schema 7 dargestellten Transport eines Elektrons über eine verschiedene Anzahl an GTT-Sequenzen eine Abstandsabhängigkeit auf, der daraus berechnete  $\beta$ -Wert von  $0.07 \text{ \AA}^{-1}$  war allerdings so niedrig, dass ein Elektronentransfer nach dem Superaustauschmechanismus ausgeschlossen werden konnte. Hier wurde vielmehr ein anderer Mechanismus angenommen, in dem das Elektron nicht in einem einstufigen Tunnelprozess vom Donor auf

den Akzeptor übergeht, sondern unter Verwendung der Guanine als „stepping stones“ vom Donor zum Akzeptor hüpfet, wie in Schema 8 veranschaulicht.<sup>[62]</sup>



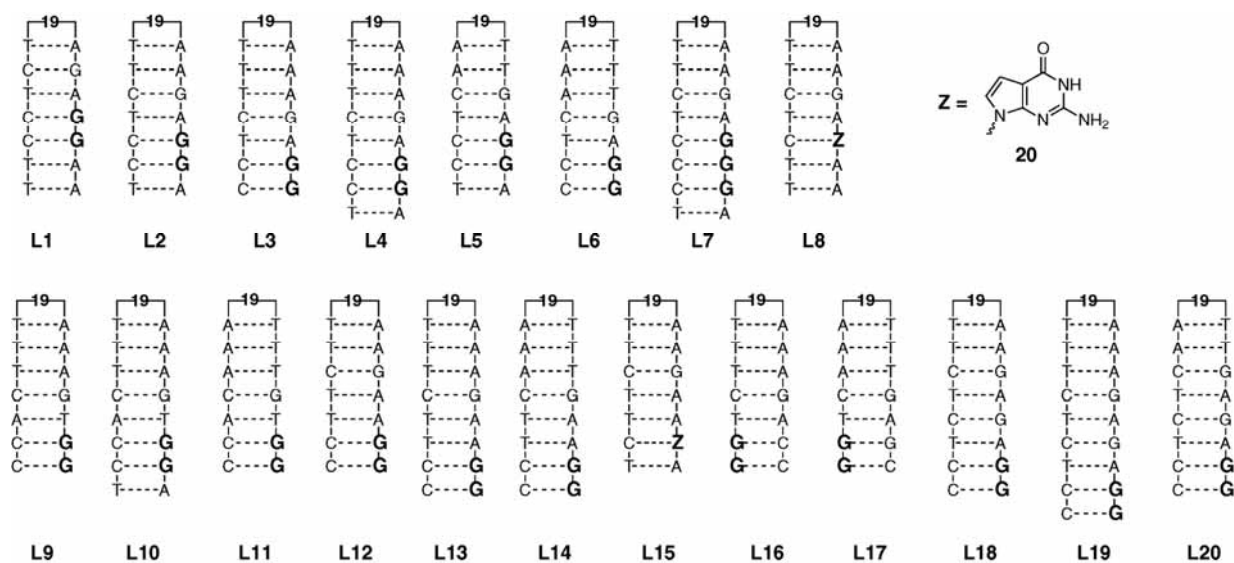
**Schema 8.** Schematische Darstellung eines Elektronentransfers nach dem Hopping-Mechanismus.

In Anlehnung an die Hüpf Schritte (von denen jeder einzelne einen Superaustausch darstellt) wurde dieser Mechanismus als **Hopping-Mechanismus** bezeichnet, oft auch als „nearest neighbor-hopping“, um diese Theorie besser vom im nachfolgenden Abschnitt noch zu erklärenden *polaron hopping*-Modell abzugrenzen.<sup>[63, 64]</sup> Im Falle des *Hoppings* tritt eine wesentlich verminderte Abstandsabhängigkeit auf, welche im Wesentlichen nur von der Lebensdauer der Ladung  $\tau$  und der Anzahl der als Brückenmoleküle dienenden Guanine  $N$  abhängt. Es konnte der folgende mathematische Zusammenhang empirisch ermittelt werden (Gleichung 1-2).<sup>[65, 66]</sup>

$$k_{HOP} \cong \tau^{-1} N^{\eta} \quad (1-2)$$

Im Falle eines *random walk*-Prozesses, in welchem die Bewegung der Ladung im Strang nicht richtungsabhängig ist, sollte  $\eta$  den Wert 2 annehmen, wie theoretisch gezeigt werden konnte.<sup>[54]</sup> Hierzu ist allerdings eine starke energetische Ähnlichkeit der Ionenpaare vonnöten. In Gieses Experiment wurde ein  $\eta$ -Wert von 1.7 ermittelt, was schon relativ nahe am Wert für einen *random walk*-Prozess liegt.<sup>[54, 61]</sup> Eine sehr große Zahl an theoretischen und experimentellen Daten lieferte zusätzliche Belege für die Plausibilität des *Hopping*-Mechanismus. Erneut waren es Lewis und Wasielewski, denen es per Femtosekundenspektroskopie gelang, den Hüpfprozess eines Elektrons in einem DNA-Duplex optisch zu verfolgen und die Abstands- und Sequenzabhängigkeit eingehend zu beleuchten.<sup>[67, 68]</sup> Zu diesem Zweck synthetisierten sie eine umfangreiche Serie von DNA-Haarnadeln, welche im Kopf jeweils das bereits vorgestellte Stilbencarboxamid **19** als Elektronenakzeptor, im Stamm ein bzw. zwei GC-Paare und in weiterem Abstand eine GG- bzw. GGG-Einheit als Senke für die positive Ladung enthielten.<sup>[69]</sup> Nach der photochemischen Injektion des Elektronenlochs, wurde dann sowohl die direkte Ladungsrekombination als auch der konkurrierende Transport der positiven Ladung zur Potentialsenke spektroskopisch verfolgt. Daneben wurden auch Haarnadeln synthetisiert, welche ein 7-Desazaguanin **20** enthielten. Dieses sollte aufgrund seines niedrigeren Redoxpotentials ( $E_{ox} = + 0.95$  V) eine tiefere, noch besser stabilisierte Falle für die positive Ladung

bilden, wie auch Experimente von *Giese*, *Lewis* und *Majima* gezeigt hatten.<sup>[70-72]</sup> Die Struktur der DNA-Haarnadeln ist in Schema 9 gezeigt.



**Schema 9.** Struktur der von Lewis und Wasielewski zur Untersuchung des Hopping-Mechanismus synthetisierten DNA-Haarnadeln.

Aus Zeit- und Platzgründen kann hier nicht auf alle Erkenntnisse detailliert eingegangen werden, die aus dieser Studie gewonnen wurden. Die wichtigsten Aussagen sind nachfolgend zusammengefasst.

1. Der primäre Ladungstrennungsschritt (Injektion der positiven Ladung) stellt einen Superaustausch dar. Dieser Vorgang wird durch die Anwesenheit weiterer Elektronenakzeptoren nur wenig beeinflusst und verläuft mit Geschwindigkeiten zwischen  $k_{CS} = 10^9 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$ . Es konnte ein  $\beta$ -Wert von  $0.7 \text{ \AA}^{-1}$  errechnet werden.
2. Für die *Hopping*-Schritte wurden Geschwindigkeiten von  $k_{HOP} = 10^5 \text{ s}^{-1} - 10^8 \text{ s}^{-1}$  gemessen, abhängig von Sequenzzusammenhang und der zur Stabilisierung der positiven Ladung verwendeten Elektronensenke (GG, GGG oder **20**).
3. Ein niedrigeres Oxidationspotential der Senke führt zu einer erhöhten Triebkraft für das *Hopping* und dementsprechend zu einer höheren Rate. Dies wird besonders augenfällig in den Haarnadeln **L2**, **L7** und **L8**, in welchen entweder ein GG, ein GGG oder ein 7-Desazaguanin **20** als Elektronenfall wirkt. Während die Stränge **L2** und **L7** mit  $k_{HOP} = 5.6 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_{HOP} = 6.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  sehr ähnliche *Hopping*-Raten aufweisen, verläuft der Prozess in **L8** mit  $k_{HOP} = 6.9 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  mehr als zehnmal schneller. GG und GGG sind demnach nur sehr flache Elektronensenken, wohingegen das 7-Desazaguanin **20** im Einklang mit *Gieses* vorherigen Messungen eine wesentlich bessere Stabilisierung der positiven Ladung bietet.<sup>[72]</sup>

4. Der Ladungstransfer über GAGG verläuft ca. 40fach schneller als durch eine GTGG-Sequenz (Strang L3, vs. Strang L10;  $k_{\text{HOP}} = 1.3 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  vs.  $k_{\text{HOP}} = 4.0 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ) Diese offensichtliche Bevorzugung des Transports über Purinbasen steht im Einklang mit den theoretischen Voraussagen und experimentellen Daten. Da im Rahmen der Studie auch gezeigt wurde, dass der Interstrang-Elektronentransfer ca. 7fach langsamer verläuft als der Intrastrang-Elektronentransfer (im Kontrast zu Messungen von Barton, die hier eine Verlangsamung um den Faktor 1000 fand)<sup>[73]</sup>, ist obiger Unterschied vermutlich Folge eines doppelten Interstrangprozesses (G→A(Gegenstrang) →GG).
5. Für das Hüpfen einer positiven Ladung von einem G zu einem weiteren innerhalb einer G(A)<sub>n</sub>G-Sequenz war zuvor eine Geschwindigkeit von ca.  $10^9 \text{ s}^{-1}$  abgeschätzt worden.<sup>[64]</sup> Tatsächlich finden sich hier Werte im Bereich von  $10^7 \text{ s}^{-1}$ . Als Erklärung für diese Diskrepanz wird eine erhöhte Solvens-Reorganisationsenergie für das *Hopping* gegenüber der initialen Ladungstrennung angenommen.

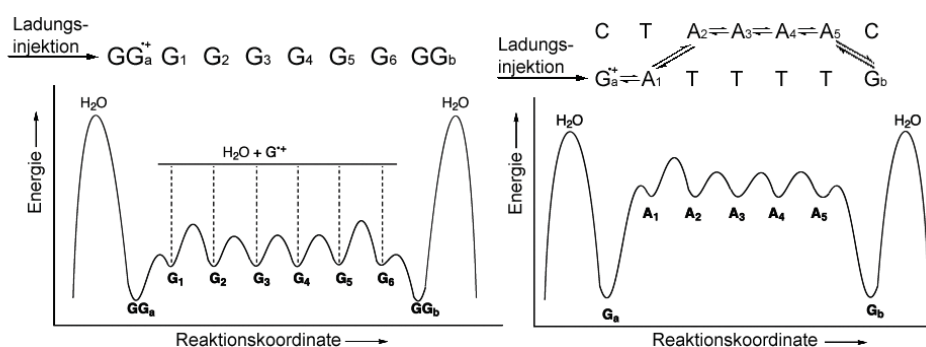
In den folgenden Jahren konnten die getroffenen Aussagen untermauert werden.<sup>[74]</sup> So konnten im Jahr 2005 die Lochtransferraten für einige der in obiger Arbeit dargestellten Haarnadeln durch ein verfeinertes, theoretisches Modell in guter Übereinstimmung berechnet werden.<sup>[75]</sup> Dabei zeigte sich, dass in der Tat die Reorganisationsenergie der Nukleobasen und des umgebenden Wassers signifikant zur Absenkung der *Hopping*-Raten beiträgt. Auch der Übergang vom Superaustausch- zum *Hopping*-Mechanismus bei einem Donor-Akzeptorabstand  $>$  ca.  $10 \text{ \AA}$  konnte in jüngster Zeit spektroskopisch sowohl für DNA als auch Peptide verfolgt werden, so dass diese Theorie mittlerweile breite Anerkennung gefunden hat.<sup>[76, 77]</sup> Trotz der relativ guten Beweglichkeit der Ladung im Strang, welche das *Hopping* beschreibt, kann hier allerdings nicht von einer eindimensionalen elektrischen Leitfähigkeit gesprochen werden. Der Wert für die elektrische Mobilität liegt bei ca.  $\mu = 0.04 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  [ $(\mu = (e/kT)w\delta^2$  mit  $e =$  Ladung,  $w =$  *Hopping*-Rate und  $\delta =$  Abstand zwischen den Basenpaaren ( $3.4 \text{ \AA}$ )], wenn man die natürliche Fehlordnung innerhalb eines hypothetischen Poly-GC-Strangs beachtet.<sup>[78]</sup> Mobilitäten in anderen diskotischen, flüssigkristallinen Medien liegen mindestens eine Größenordnung höher.<sup>[79]</sup>

### 1.1.2 Das A-Hopping

Die bestehende Theorie des *Hoppings* unter ausschließlicher Verwendung der Guanine als Brückenmoleküle musste ab dem Jahr 2000 erneut erweitert werden, als sowohl Giese als auch Barton zeigen konnten, dass eine positive Ladung auch über längere AT-Sequenzen transportiert werden konnte.<sup>[80-82]</sup> Hier standen logischerweise keine Guanine zur Verfügung. Da darüber hinaus – wenn auch in untergeordnetem Maße – oxidative Schäden an Adeninen gefun-



den wurden und das Adenin nach dem Guanin das zweitgünstigste Oxidationspotential besitzt, wurde angenommen, dass in diesen Fällen auch Adenine als Brückenmoleküle dienen können. Man bezeichnet dieses Modell, das eine Erweiterung des klassischen *Hopping*-Modells ist, daher oftmals auch als *A-Hopping*. Die geringe Menge oxidativer A-Schädigung wurde von *Giese* damit begründet, dass die Reaktion eines Adeninradikalkations mit Wasser im Vergleich zum Guanin sehr viel langsamer verläuft, wohingegen der Transport der Ladung zum nächsten Adenin bzw. Guanin sehr schnell vonstatten geht. In Schema 10 ist schematisch das Energieprofil für den Lochtransfer zwischen zwei Guaninen, zwischen denen entweder 5 GC- oder 5 AT-Basenpaare positioniert sind, dargestellt.

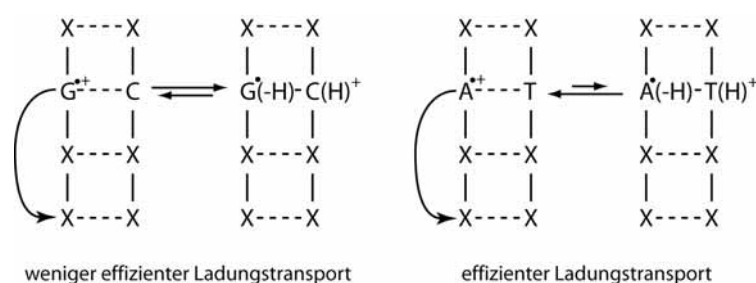


**Schema 10.** Energieprofil des Lochtransfers über GC- bzw. reine AT-Sequenzen.

Wie deutlich erkennbar ist, stellt die Oxidation eines Adenins durch ein Guaninradikalkation den langsamsten Reaktionsschritt dar. Die nachfolgende Oxidation eines Adenins durch das gebildete Adeninradikalkation erfolgt hingegen relativ schnell, von *Giese* wurde hier ein Wert von  $k \cong 10^8 \text{ s}^{-1}$  abgeschätzt.<sup>[62]</sup> Der weitere Transport der positiven Ladung innerhalb der Poly-AT-Sequenz verläuft sogar noch schneller. *Majima* fand bei Untersuchungen an DNA-Duplexen, welche ein Naphtalimid **12** als Elektronenakzeptor und ein Phenothiazinderivat als Falle für die positive Ladung enthielten, einen Wert von  $k \cong 10^{10} \text{ s}^{-1}$ , was noch schneller ist als der Lochtransport zwischen Guaninen.<sup>[83-85]</sup> *Lewis* fand kürzlich bei femtosekundenspektroskopischen Messungen an Poly-AT-Haarnadeln, welche an einem Ende mit dem Stilbencarboxamid **19** als Elektronenakzeptor und am anderen Ende einen Stilbendiether als Donor enthielten, eine mittlere Geschwindigkeit im Bereich von  $k \cong 10^9 \text{ s}^{-1}$ .<sup>[86]</sup> Diese Werte wurden zuvor auch schon in verschiedenen theoretischen Untersuchungen postuliert und decken sich ferner mit den von *Barton* an sehr langen DNA-Strängen vorgenommenen Untersuchungen.<sup>[82, 87, 88]</sup> Da folglich der Transport durch Poly-AT-Sequenzen sehr schnell vonstatten geht und die konkurrierende Wasserreaktion am Adenin sehr langsam verläuft, findet man hier ab einer Sequenz von ca. 4 AT-Basenpaaren nur noch eine extrem geringe Abstandsabhängigkeit der Lochtransfereffizienz.<sup>[89-91]</sup>

Erklärt wird dieser Unterschied in der *Hopping*-Geschwindigkeit damit, dass im Gegensatz zu  $[\text{A-T}]^+$ -Paaren das Guaninradikalkation ( $\text{pK}_a(\text{G}^{++}) \sim 3.9$ ) und Cytosin ( $\text{pK}_a(\text{C}) \sim 4.5$ ) im

[G-C]<sup>+</sup>-Paar sehr ähnliche pK<sub>a</sub>-Werte haben. Dadurch liegt hier ein Protonierungsgleichgewicht vor, das mit dem Ladungstransfer konkurriert.<sup>[92]</sup> In einem [A-T]<sup>+</sup>-Radikalkationenpaar verbleibt die Ladung wegen des stark sauren Charakters des Adeninradikalkations (pK<sub>a</sub>(A<sup>•+</sup>) ~ 1) und der extrem geringen Basizität des Thymins (pK<sub>a</sub>(T(H)<sup>+</sup>) ~ -5) auf dem Adenin (Schema 11).



**Schema 11.** Verlangsamung des Lochtransfers an Guaninen durch konkurrierende Umprotonierung.

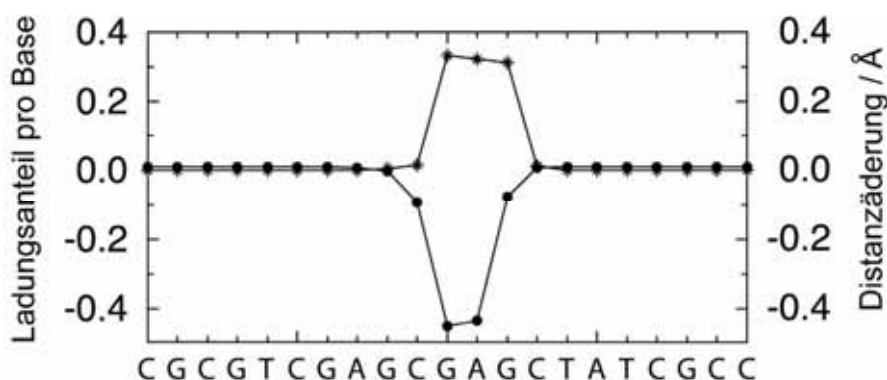
Aus diesem Phänomen resultiert eine gewisse Mobilität für Elektronenlöcher in Poly-A-Sequenzen. Aus Lewis' Daten wurde ein Wert von  $\mu = 4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  berechnet [ $\mu = (e/kT)w\delta^2$  mit  $e$  = Ladung,  $w$  = Hopping-Rate und  $\delta$  = Abstand zwischen den Basenpaaren (3.4 Å)].<sup>[86, 93]</sup> Dieser Wert ist aber immer noch um einige Größenordnungen kleiner als in einem diskotischen flüssigkristallinen Leiter, z. B. dem oft als Referenz genommenen Triphenylen, welches eine Mobilität von  $\mu = 0.1 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  aufweist.<sup>[79]</sup> Es ist auch wesentlich kleiner als in Poly-GC-Sequenzen.<sup>[78]</sup> Der Grund hierfür liegt wohl in der schwachen elektronischen Kopplung, einer großen statischen und dynamischen Fehlordnung und konformationellen Effekten.<sup>[94]</sup> Damit verhält sich auch Poly-AT-DNA wie ein elektrischer Isolator.

Inzwischen konnte in mehreren Arbeiten, beispielsweise von Barton, Schuster und Majima Lochtransfer über sehr lange Distanzen (> 200 Å) einerseits an künstlichen Duplexen wie auch an Nukleosomen-DNA bzw. DNA im Zellkern beobachtet werden.<sup>[95-99]</sup> Gerade letztere Fälle sind hierbei von beträchtlicher biologischer Relevanz für das Auftreten oxidativer Schädigungen in genomischer DNA. Besonders interessant ist die Entdeckung, dass der Transfer positiver Ladungen von DNA auf Proteine erfolgen kann, wobei besonders Tryptophan und Tyrosin als Träger der Ladung fungieren können.<sup>[100]</sup> So wurde auch der Transfer einer positiven Ladung von einem Guaninradikalkation auf einen [4Fe-4S]-Cluster im DNA-Reparaturenzym Mut Y beobachtet, der hier eventuell als Auslöser des Reparaturvorgangs dienen könnte.<sup>[101]</sup> Zudem konnte in einer älteren Arbeit effizienter Elektronentransfer von Histonen auf chromosomale DNA beobachtet werden.<sup>[102]</sup> Ein Mechanismus des Schutzes der DNA durch redoxaktive Proteine erscheint dadurch plausibel.

### 1.1.3 Das Polaron-Hopping-Modell

Beginnend mit Studien aus dem Jahr 2000 entwickelte *Schuster* ein zum „nearest neighbor-Hopping“ alternatives Elektronentransfermodell. In diesem Modell geht er davon aus, dass die positive Ladung zu keinem Zeitpunkt nur auf einem Guanin lokalisiert ist.<sup>[103-106]</sup> Vielmehr zieht ein Guaninradikalkation die benachbarten Basen aufgrund des  $\pi$ -stackings etwas näher zu sich hin, wodurch sich wiederum deren Abstand zu den Nachbarbasen vergrößert und die elektrische Wechselwirkung in dieser Richtung abnimmt. Auf diese Weise kommt es zu einer Polarisierung der Elektronendichte im Strang in Richtung der positiven Ladung.<sup>[107, 108]</sup> Ein solches, durch Polarisierung der Nachbarbasen im  $\pi$ -Stapel entstandenes, delokalisiertes Kation bezeichnet *Schuster* als **Polaron**. Durch die Abnahme der elektronischen Wechselwirkungen mit den weiter entfernten Basen ist ein solches Polaron quasi in sich selbst gefangen, es endet an der Stelle, an der die für die Deformation der DNA aufzuwendende Energie und die durch Delokalisation erreichte Stabilisierung gleich sind. Das Wort Polaron selbst ist eine Schöpfung von *Landau* und setzt sich aus den Bestandteilen Polarisierung und Elektron zusammen.<sup>[109]</sup> Dies soll verdeutlichen, dass die Bewegung eines Elektrons in einem polarisierbaren Medium immer mit einer lokalen Polarisierung desselben vonstatten geht.

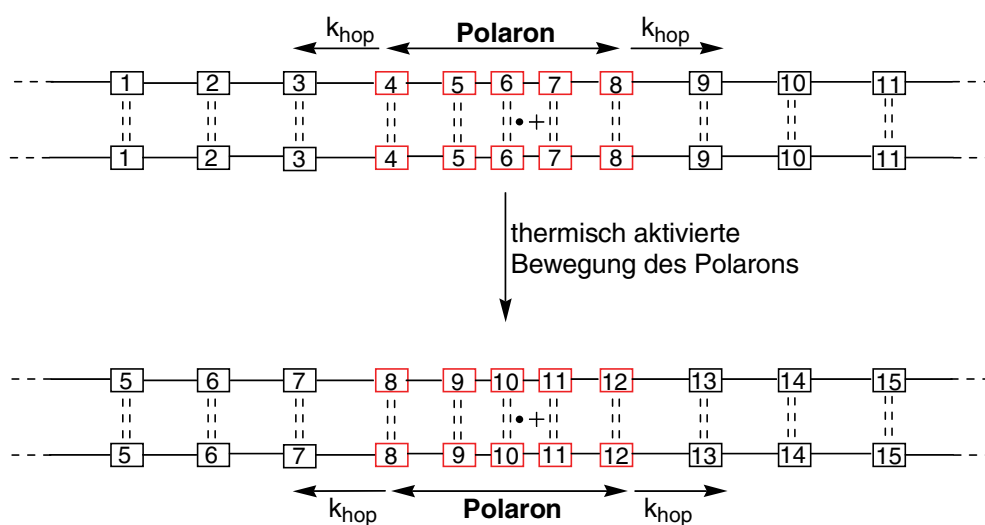
Ein Polaron in DNA soll im Allgemeinen 3-6 Basen umfassen, wobei dieser Wert in hohem Maße vom Sequenzkontext abhängt. Schema 12 zeigt schematisch, wie die delokalisierte Ladung über ein Beispelpolaron verteilt ist und welche räumliche Verschiebung der Basen dadurch hervorgerufen wird.<sup>[107]</sup>



**Schema 12.** Verteilung der positiven Ladung innerhalb eines Polarons und dadurch verursachte räumliche Verschiebung der Nachbarbasen.

Polaronen unterschiedlicher räumlicher Ausdehnung kann dabei durchaus das gleiche Ionisierungspotential zukommen. So zeigen Rechnungen, dass die Polarone  $[CGC]^{++}$  und  $[TTGTT]^{++}$  das gleiche Potential von  $I_p = 6.96$  eV besitzen.<sup>[49]</sup> Die Bewegung eines Polarons durch den Strang erfolgt über thermische Gitterschwingungen, sogenannte Phononen. Dieser

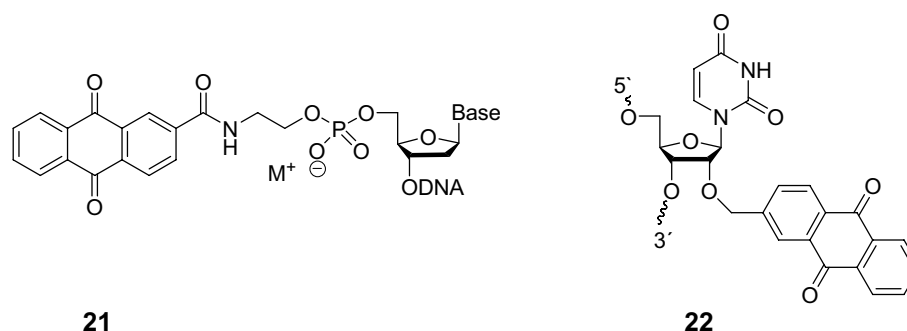
Vorgang ist ganz ähnlich der Fortpflanzung einer Gitterschwingung in einem Festkörper. Indem auf der einen Seite eine sich bewegende Base das Polaron verlässt und auf der anderen Seite eine neue Base aufgenommen wird, wird das Polaron durch den Strang transportiert, wobei die so erreichbare Entfernung stark von der Sequenz abhängt. Sind die ausscheidende und die neu aufgenommene Base identisch, spricht man von „Drift“. Da sich das Potential des Polarons hierbei nicht ändert, verlaufen solche Prozesse, die auch in Polymeren ablaufen, bereits durch die thermische Energie ( $kT$ ) oder schwache elektrische Felder. Wesentlich häufiger ist (da in DNA nur selten mehrere gleiche Basen nebeneinander positioniert sind) aber ein thermisch aktiviertes *Hopping* eines Polarons, das durch ganz analoge mathematische Formulierungen wie das „nearest neighbor-Hopping“ beschrieben werden kann. Eine solche thermisch aktivierte Bewegung eines Polarons in DNA ist in Schema 13 schematisch dargestellt.



**Schema 13.** Struktur und Bewegung des Polarons, hier um 4 Basenpaare nach rechts. Die durch gestrichelte Linien verbundenen Kästchen stellen die Basenpaare dar, durchgezogene Linien das Zucker-Phosphat-Rückgrat.  $k_{hop}$  = Geschwindigkeitskonstante des Polaron-Hoppings.

Da solche Vorgänge nur als Übergänge minimaler freier Energie wahrscheinlich sind, laufen sie bevorzugt zwischen Zuständen ähnlichen Ionisationspotentials ab. Da solche in einem DNA-Strang aber relativ zahlreich sind, sollte das thermische Polaron-Hopping leichter ablaufen als im Fall lokalisierter Ladungen. Im Falle des *A-Hoppings* beispielsweise müssen keine isolierten Adenine als Träger der positiven Ladung angenommen werden, sondern die Bewegung der Ladung kann über das energiegünstigste Polaron verlaufen.

Die Theorie *Schusters* gründet sich auf Elektronentransfermessungen in DNA-Duplexen, die unter Verwendung der in Schema 14 dargestellten Anthrachinonderivate als Elektronenakzeptoren durchgeführt wurden.<sup>[37, 110, 111]</sup>



**Schema 14:** Von Schuster verwendete Injektormoleküle zur Positionierung am 5'-Ende (**21**) bzw. innerhalb des Duplexes (**22**).

Bei Bestrahlung mit Licht ( $\lambda = 350 \text{ nm}$ ) wird **21** bzw. **22** in den Singulettzustand angeregt, geht dann durch *Intersystem crossing* (ISC) in den Triplettzustand über, aus dem heraus Elektronentransfer von einer Nukleobase zum Anthrachinonderivat **21/22** (AQ) auftritt.<sup>[38]</sup> Das gebildete Anthrachinonradikalanion kann dann sein Überschusselektron an Sauerstoff abgeben (Entstehung von  $\text{O}_2^-$ ), wonach ein Radikalkation in der DNA zurückbleibt, das sich dann durch den Duplex bewegen kann. In definiertem Abstand zum Anthrachinonderivat waren mehrere GG-Sequenzen als flache Elektronenlochfallen in den Strang eingebaut worden, welche durch unterschiedliche Sequenzen voneinander getrennt waren. (Tabelle 3).<sup>[112]</sup>

DNA	Sequenz
S01	5' -AQ-A A <span style="background-color: #e0e0ff;">G G<sub>1</sub></span> A A <span style="background-color: #e0e0ff;">G G<sub>2</sub></span> A A <span style="background-color: #e0e0ff;">G G<sub>3</sub></span> A A <span style="background-color: #e0e0ff;">G G<sub>4</sub></span> A A <span style="background-color: #e0e0ff;">G G<sub>5</sub></span> A A <span style="background-color: #e0e0ff;">G G<sub>6</sub></span> A A A A* -3'
S02	5' -AQ-A T <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>1</sub></span> A T <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>2</sub></span> A T <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>3</sub></span> A T <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>4</sub></span> A T <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>5</sub></span> A T <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>6</sub></span> A T A T* -3'
S03	5' -AQ-A A <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>1</sub></span> A A <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>2</sub></span> A A T A A A A A <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>3</sub></span> A A <span style="background-color: #ffe0e0;">G G<sub>4</sub></span> A A A A* -3'

**Tabelle 3.** Von Schuster zur Untersuchung des Lochtransfers verwendete Stränge.

An allen GG-Einheiten konnte nach basischer Aufarbeitung bzw. enzymatischer Spaltung durch Formamidopyrimidinglykosylase (FPG, bedeutendes bakterielles Enzym zur Reparatur oxidativer Schäden) Spaltung beobachtet und die Effizienz der Spaltung an jeder einzelnen GG-Sequenz quantifiziert werden. Im Strang **S01**, welcher ausschließlich Purine enthielt, betrug die Spaltungsausbeute in Position  $\text{GG}_6$  noch 92 % der Spaltung an  $\text{GG}_1$ . Dies konnte damit erklärt werden, dass in diesem Strang sehr viele, energiearme Polarone gebildet werden konnten, durch die ein effizienter *Hopping*-Prozess gegeben war. Bei Strang **S02**, welcher durch seine Sequenz weniger energiegünstige Polarone ermöglichte, betrug die relative Schädigung am  $\text{GG}_6$  nur noch 62 %, der größte Abfall tritt hier zwischen  $\text{GG}_1$  und  $\text{GG}_2$  auf. In **S03** schließlich ist durch den Einschub der langen Brücke zwischen  $\text{GG}_2$  und  $\text{GG}_3$  ein enormer Einbruch auf ca. 8 % relative Spaltungseffizienz zu verzeichnen, für Schuster ein Ausdruck des

Fehlens günstiger Polarone, die hier einen schnellen Ladungstransfer ermöglichen könnten. Mit Hilfe analoger Systeme gelang es *Schuster*, oxidative Schädigung noch in 185 Å zum Anthrachinon **21** zu detektieren.<sup>[113]</sup> Interpretation der Abstandsabhängigkeit gemäß dem Superaustauschmechanismus lieferte nur einen  $\beta$ -Wert von  $0.02 \text{ \AA}^{-1}$ , was absolut unvereinbar war und schließlich den eigentlichen Anstoß zur Entwicklung der Polaron-*hopping*-Theorie gab. Das Modell konnte durch weitere Untersuchungen untermauert werden, in denen ein Guanin in einer GG-Einheit durch ein 8-Oxo-dG **9** ersetzt wurde; dieses stellte aufgrund seines um 0.5 V gegenüber dem Guanin abgesenkten Redoxpotentials eine sehr tiefe Elektronenlochfalle dar.<sup>[114]</sup> Lokalisation der positiven Ladung auf einem Polaron, welches 8-Oxo-dG enthält, sollte also begünstigt, ein Weitertransport der Ladung gehemmt sein. In der Tat konnte man nach Bestrahlung und basischer Aufarbeitung oxidative Schädigung fast ausschließlich an der Stelle des 8-Oxo-dG **9** feststellen, die Schädigung weiter entfernter GG-Einheiten war nahezu vollständig unterdrückt worden.<sup>[111]</sup>

Auch nach Jahren der Untersuchung bestehen noch immer Differenzen zwischen Befürwortern und Gegnern der Polaron- bzw. „*nearest neighbor-Hopping*“-Theorien, zumal beide experimentell nie klar unterschieden werden konnten. Gegner des Polaron-Modells führen hier zum Beispiel an, dass der für die relativ ungehinderte Bewegung eines Polarons durch DNA theoretisch zu erwartende  $\eta$ -Wert nahe 2 (*random walk*) bisher nie beobachtet werden konnte, Werte von 1.7 wurden nie überschritten. Trotzdem also das „*nearest neighbor-Hopping*“-Modell heute das international anerkanntere ist und hier die weiter elaborierten mathematischen Beschreibungen existieren, werden noch immer intensive Forschungen sowohl theoretischer wie auch experimenteller Natur zum Polaron-Transfer angestellt.<sup>[115-119]</sup> So konnte *Conwell* rechnerisch begründen, dass bei Donor-Akzeptorabständen  $> 5$  Basen, wenn geeignete Basen zur Bildung eines Polarons vorhanden sind, auch ein solches gebildet wird.<sup>[120, 121]</sup> In neueren Untersuchungen wurden so auch plausible Beschreibungen für das *A-Hopping* und weitere damit verknüpfte Phänomene geliefert.<sup>[106, 122-124]</sup>

#### 1.1.4 Das „*Delocalized-Domain*“-Modell

Ausgehend von Studien seit den Jahren 1999-2000 wurde von *Barton* ein weiteres Modell zur Erklärung der sehr geringen Abstandsabhängigkeit der Lochtransfereffizienz über weitere Distanzen in DNA vorgestellt, in dem ebenfalls, wie in *Schusters* Polaron-Modell eine Delokalisation der positiven Ladung über mehrere Basen angenommen wird.<sup>[52, 125]</sup> Dabei griff sie zugleich auf mehrere theoretische Arbeiten zurück, die sich mit dem Phänomen der Delokalisation einer Ladung in DNA befassten. *Barton* geht hierbei davon aus, dass sich durch thermisch induzierte, konformationelle Bewegung der Basen spontan Verbände von ca. 4-5 Basen

zusammenlagern, welche ein transientes  $\pi$ -Orbital bilden, über welches eine Ladung delokalisiert werden kann.<sup>[126-128]</sup> Die Entstehung solcher **Domänen** ist eine inhärente, sequenzabhängige Fähigkeit der DNA, die unabhängig von der Existenz einer Ladung ist. Dies stellt den Hauptgegensatz zum Polaron dar, wo erst die durch die Anwesenheit der Ladung hervorgerufene Verzerrung zur Bildung eines abgegrenzten Polarons führt.

Während die Bewegung eines Polarons durch den Strang durch einen Phonon-artigen *Hopping*-Prozess beschrieben wird, führt im „*delocalized domain*“-Modell die thermische Bewegung der Basen zur Entstehung und Zerstörung von Domänen. Die Ladung kann so zwischen Domänen „hüpfen“, die aufgrund ihrer günstigen Konformation dazu befähigt sind, ein vorübergehendes, gemeinsames  $\pi$ -Orbital auszubilden, welches die Ladung stabilisieren kann.<sup>[129]</sup> Ein solcher Prozess, der als „*Conformationally Gated-Hopping*“ bezeichnet wird, ist in Abb. 4 dargestellt.

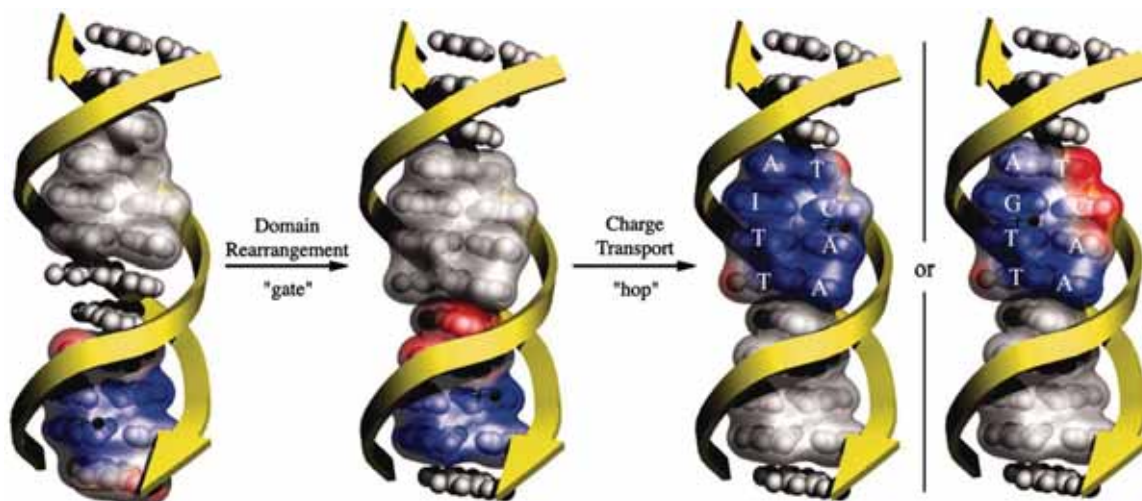


Abb. 4. Spontane Entstehung einer Domäne, Ladungstransfer zwischen zwei Domänen.<sup>[130]</sup>

Wie die *Polaron*-Theorie leidet auch dieses Modell darunter, dass die Delokalisierung einer Ladung bis jetzt experimentell nicht untersuchbar war, wodurch bisher weder Beweis noch Gegenbeweise erbracht werden konnte; *Barton* konnte daher argumentieren, dass die von *Schuster* gefundene Sequenz- und Abstandsabhängigkeit ebenso umfassend auch mit ihrem Modell beschrieben werden könnte.<sup>[131]</sup> Anhand von Untersuchungen an DNA-Strängen, welche ein 2-Aminopurin (bzw. ein Anthrachinon **21** oder einen der häufig verwendeten Rh-Komplexe **15**) als Elektronenakzeptor enthielten, konnten aber gewisse Hinweise erbracht werden, die für das „*delocalized domain*“-Modell sprechen.<sup>[132]</sup>

1. Die Injektion der Ladung vom 2-Aminopurin ist interessanterweise stark von weiter entfernten Basen abhängig. Dies ist im Sinne einer Domäne erklärbar, allerdings nicht mit Polaronen, die ja erst als Antwort auf die Injektion der Ladung gebildet werden.
2. Die Temperaturabhängigkeit der Elektronentransfereffizienz zeigte keinen einheitlichen Trend, sondern scheint in zwei verschiedenen Regimen abzulaufen. Dies

passt zu einer Situation, in der thermische Energie Zugang zu ET-aktiven Konformationen bietet. Im phononenvermittelten Polaron-Modell, in welchem thermische Energie zur Überwindung einer Barriere benötigt wird, sollte die ET-Effizienz mit steigender Temperatur ebenfalls stetig ansteigen.<sup>[133]</sup>

3. Die Temperaturabhängigkeit der Elektronentransfereffizienz zeigt keine Abhängigkeit von Solvens und monovalentem Gegenion. Auch dies ist eher im Einklang mit dem Domänen-Modell, wohingegen in der Bewegung eines Polarons, welches größere Reorganisation von Ionen und Solvens mit sich bringt, hier durchaus ein Einfluß zu vermuten wäre, auch wenn dieser noch nicht gezeigt werden konnte.<sup>[133]</sup>
4. Experimente unter Verwendung von *N*(4)-Cyclopropylcytosin als kinetische „*radical clock*“ zeigten deutlich oxidative Schädigung an diesem Cytosin. Die Einbeziehung der nur schwer oxidierbaren Pyrimidine in Domänen unter vorübergehender Mischung der Orbitale könnte hierfür eine Erklärung liefern. Somit wären alle Basen in den Lochtransfer involviert, nicht nur die Purinbasen, wie vorher oft angenommen.<sup>[130, 134]</sup>

Abschließend kann gesagt werden, dass es für alle dargestellten Theorien des *Hoppings* eine Fülle experimenteller und theoretischer Untersuchungen gibt, welche die Plausibilität der jeweiligen Theorie untermauern. Ein endgültiger Beweis in irgendeiner Richtung konnte bisher allerdings noch nicht erbracht werden. Vermutlich liegt die Wahrheit zwischen den Extremen. Neuere Theorien arbeiten auch intensiv daran, das *Hopping* über lokalisierte Brückenmoleküle mit den Vorstellungen der Bewegung einer delokalisierten Ladung in DNA zu verknüpfen, so dass man hier auf die zukünftigen Weiterentwicklungen gespannt sein darf.

## 1.2 Reduktiver Elektronentransfer in DNA

Im direkten Vergleich zu der enormen Zahl an Publikationen zum Transfer positiver Ladungen in DNA ist zum Transfer von Überschusselektronen (reduktiver Ladungstransfer) noch immer relativ wenig bekannt. Ein Grund hierfür war lange Zeit das Fehlen geeigneter Donor-Akzeptorsysteme, mit deren Hilfe der reduktive ET in DNA-Duplexen hätte untersucht werden können. In den letzten 10 Jahren konnten hier aber doch einige Fortschritte, mit großem Anteil auch unserer eigenen Arbeitsgruppe, erzielt werden. Diese sollen hier nun im Einzelnen kurz vorgestellt werden.

Ausgangspunkt für die Untersuchung reduktiver ET-Prozesse in DNA muss zunächst eine Analyse der Reduktionspotentiale der Nukleobasen sein, um zu klären, welche hier realistischerweise als Träger einer negativen Ladung infrage kommen. Hierzu ist festzustellen, dass



noch immer keine gesicherten Daten in wässrigen Medien existieren, die bestehenden Potentiale wurden in DMF<sup>[15]</sup> bzw. Acetonitril<sup>[135, 136]</sup> gemessen, wobei auch noch verschiedene Meßmethoden zur Anwendung kamen. Die so erhaltenen Werte sind in Tabelle 4 aufgelistet, qualitative Aussagen lassen sich hieraus durchaus ziehen.

Spezies	$E_{\text{Red}}$ (DMF/pg) (V vs. NHE)	$E_{\text{Red}}$ (DMF/cv) (V vs. NHE)	$E_{\text{Red}}$ (MeCN/fl) (V vs. NHE)
dG	$< -2.76 \pm 0.03$	$< -2.76 \pm 0.05$	
dA	$-2.45 \pm 0.03$	$-2.52 \pm 0.05$	
dC	$-2.23 \pm 0.03$	$-2.35 \pm 0.05$	$-2.16 \pm 0.08$
dT	$-2.14 \pm 0.03$	$-2.18 \pm 0.05$	$-2.12 \pm 0.08$
rU	$-2.07 \pm 0.03$	$-2.07 \pm 0.05$	$-2.11 \pm 0.08$
<i>cis,syn</i> T=T-CPD			$-2.20 \pm 0.08$
<i>cis,syn</i> C=C-CPD			$-2.17 \pm 0.08$

**Tabelle 4.** Reduktionspotentiale der Nucleobasen in N,N-Dimethylformamid (DMF) bzw. Acetonitril (MeCN). Die Werte sind polarographisch (pg), cyclovoltammetrisch (cv), oder über Fluoreszenzlöschung (fl) bestimmt worden. Für die Messungen per Fluoreszenzlöschung sind die Dimethylanaloga der Pyrimidine (1,3-Dimethylthymidin und 1,3-Bis(N(4),N(4)-dimethylcytosin-1-yl)propan) bzw. deren *cis,syn*-Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) verwendet worden.

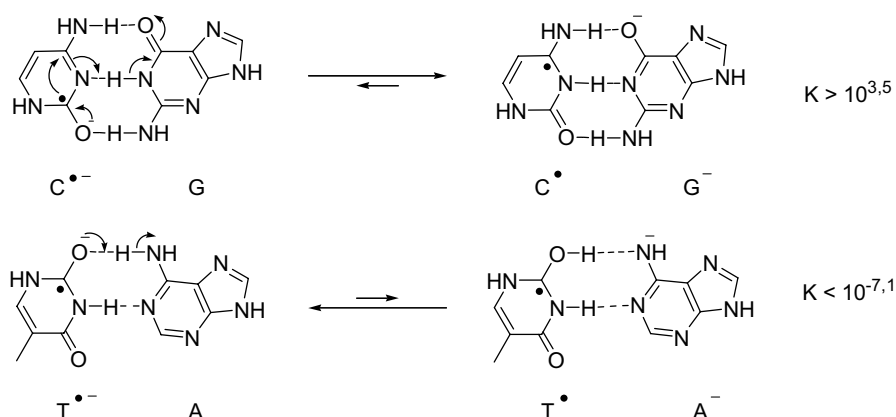
Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, besitzen Thymidin, Desoxycytidin und das in RNA anstelle des Thymidins auftretende Uridin die niedrigsten Redoxpotentiale, sollten also prinzipiell am leichtesten zu reduzieren sein und am ehesten negative Ladungen stabilisieren. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die entstehenden Radikalanionen in protischer Umgebung (Wasser) Protonierungsgleichgewichte mit dem umgebenden Solvens eingehen. Eine Betrachtung der relevanten  $pK_A$ -Werte zeigt, dass dies besonders beim Cytosin größere Auswirkungen hat (Tabelle 5).

Gleichgewicht	$pK_A$
$TH^{\bullet} \rightleftharpoons T^{\bullet} + H^+$	6.9
$AH \rightleftharpoons A^- + H^+$	> 14
$CH^{\bullet} \rightleftharpoons C^{\bullet} + H^+$	13
$GH \rightleftharpoons G^- + H^+$	9.5

**Tabelle 5.** Relevante  $pK_a$ -Werte der Nucleobasen.<sup>[137]</sup>

Aus den Zahlenwerten geht hervor, dass im Falle des Thymins Protonierung durch das gegenüberliegende Adenin bzw. das umgebende Wasser nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Im Cytosin hingegen tritt sehr schnelle Protonierung des Radikalanions durch das Wasser bzw. das gegenüberliegende Guanin auf (Schema 15).<sup>[137, 138]</sup>

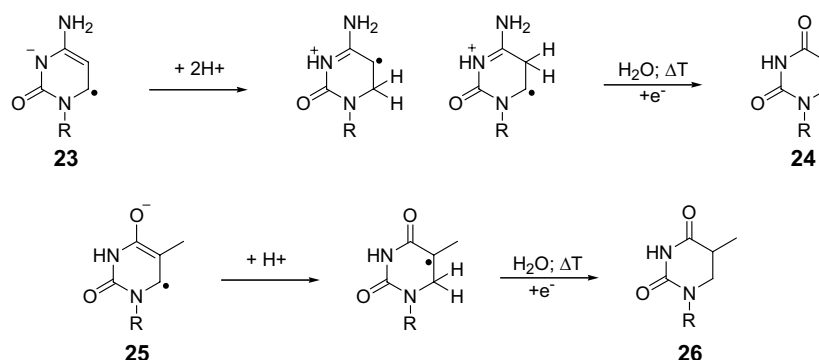


**Schema 15.** Protonierungsgleichgewicht im GC- und AT-Radikalanionenbasenpaar.

Die Protonierung des stark basischen C-Radikalanions hat einen beträchtlichen Einfluss auf sein Redoxpotential, das hierdurch abgesenkt wird, wie durch  $\gamma$ -Pulsradiolysemessungen gezeigt werden konnte. So konnte in wässriger Lösung bei pH 8.5 sowohl für dC als auch für dT ein identisches Reduktionspotential von  $-1.09$  V gemessen werden,<sup>[139]</sup> bei tieferen pH-Werten sinkt das Potential des dC sogar unter das von dT.<sup>[15]</sup> Selbiges scheint bei Temperaturen von 77 K und darunter der Fall zu sein. Bei höheren Temperaturen kann es aufgrund der Reversibilität der Protonierung zu einem thermisch aktivierten Elektronentransfer kommen.<sup>[140]</sup> Die Reduktionspotentiale unterliegen darüber hinaus einer Modulation durch das  $\pi$ -stacking mit den Nachbarbasen. So konnte rechnerisch gezeigt werden, dass Pyrimidine besonders gut reduzierbar sind, wenn sie von anderen Pyrimidinen umgeben werden, wohingegen sich umgebende Purine ungünstig auf die Redoxpotentiale auswirken.<sup>[141]</sup> Dies stellt interessanterweise die genaue Umkehrung dessen dar, was *Saito* für den Lochtransfer im Fall der Guanine ermittelt hatte.

Die Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA litt lange Zeit an mehreren großen Nachteilen. Ein Problem war die Detektion des Transportvorgangs. *Giese* und andere konnten, wie beschrieben, in ihren Studien zum Lochtransfer ausnutzen, dass es im Zuge der Bewegung der positiven Ladung zu oxidativen Schäden an Purinbasen kam, die durch Basenbehandlung in einen leicht detektierbaren Strangbruch übersetzt werden konnten. Vergleichbare reduktive Schäden an DNA sind dagegen kaum bekannt und spielen in diesem Rahmen auch nur eine untergeordnete Rolle. EPR-Untersuchungen an Strängen, die bei tiefen Temperaturen mittels  $\gamma$ -Pulsradiolyse reduziert wurden, zeigten als reduktive Schädigungen hauptsächlich 5,6-Dihydrouracil **24** und 5,6-Dihydrothymin **26**.<sup>[142]</sup> **26** entstand hierbei durch

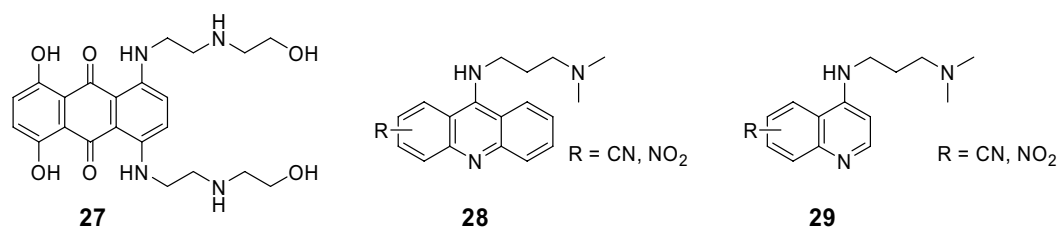
schnelle Protonierung aus dem Thyminradikalanion **25**, während **24** durch schnelle Desaminierung des protonierten Cytosinradikalanions **23** gebildet wurde (Schema 16).



**Schema 16.** Primärprodukte der Reduktion von Thyminidin und Cytosin sowie deren Folgeprodukte.

Ferner konnte von *Fukuzumi* gezeigt werden, dass durch photoinduzierten Elektronentransfer von NADH via  $e^-_{aq}$  Strangbrüche in Duplex-DNA erzeugt werden können.<sup>[143]</sup> Ein geeignetes System zur Quantifizierung des Elektronentransfers konnte auf Basis dieser Schäden aber nicht entwickelt werden.

Ein weiteres großes Problem, das mit dem oben angesprochenen eng verknüpft war, war lange Zeit das Fehlen eines selektiven Injektorsystems für die steuerbare Übertragung eines Elektrons auf einen DNA-Strang. Alle frühen Untersuchungen verwendeten die bereits mehrfach angesprochene Methode der  $\gamma$ -Pulsradiolyse, in welcher durch  $\gamma$ -Bestrahlung von DNA in gefrorenen LiBr-Gläsern solvatisierte Elektronen erzeugt wurden, welche die DNA reduzierten. Zur Detektion des Ladungstransfers wurden verschiedenen polyzyklische Aromaten eingesetzt, die unspezifisch in die DNA interkalierten, so z. B. das Mitoxanthron **27**,<sup>[144-148]</sup> Acridine wie **28**<sup>[149]</sup> oder Chinolinderivate wie **29**. (Schema 17). Daneben wurden auch Methylviologen und Naphtalimid **12** verwendet.<sup>[150]</sup>



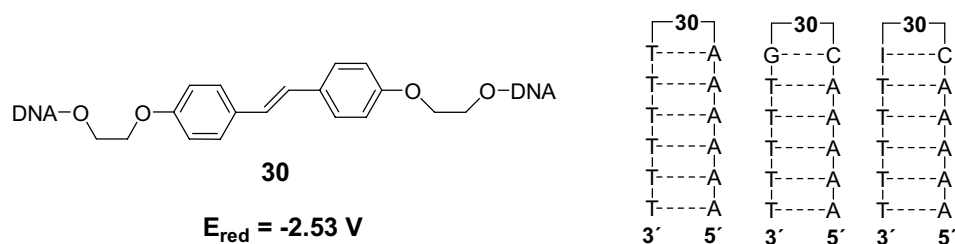
**Schema 17.** Darstellung der für die Untersuchung von Überschusselektronentransport per  $\gamma$ -Radiolyse genutzten DNA-Interkalatoren Mitoxanthron **27**, Acridin **28** und Quinolin **29**.

Alle diese Aromaten lieferten Reaktionsprodukte oder Intermediate, die EPR-spektroskopisch verfolgt werden konnten. Das Problem dieser Experimente ist offensichtlich: Weder die Injektion des Elektrons noch das Abfangen des Elektrons durch den Akzeptor erfolgten ortsspezifisch. Einzig *Shafirovich* verwendete ein kovalent an die DNA geknüpfted Benzopyrinderivat als lichtinduzierbaren Donor, mit dessen Hilfe er unter anderem einen maximalen Wanderungsradius eines Überschusselektrons in DNA von 40-100 Å abschätzen konnte.<sup>[151]</sup> Ein Radius von 6-10 Basen (nur Intrastrangtransfer) war auch von *Zimbrick* in Studien mit 5-Bromuracil-modifizierter *E. coli*-DNA gefunden worden.<sup>[152]</sup>

Trotz aller Nachteile konnten auch mit diesen einfachen Systemen interessante mechanistische Details des reduktiven Elektronentransfers in DNA ermittelt werden, wobei sich besonders die Gruppe um *Sevilla* hervortat. Sie konnten zeigen, dass ein *Hopping*-Prozess bei Temperaturen unterhalb 200 K extrem unwahrscheinlich war und vielmehr ein Ladungstransfer nach dem Superaustauschmechanismus erfolgte, bei welchem, wie zuvor gezeigt, das Elektron direkt vom Donor zum Akzeptor tunnelte.<sup>[153]</sup>

Für diesen Vorgang wurden, abhängig vom Sequenzkontext,  $\beta$ -Werte zwischen  $0.8 \text{ \AA}^{-1}$  und  $1.2 \text{ \AA}^{-1}$  ermittelt, was voll im Einklang mit den im Lochtransfer und auch in Protein-Elektronentunnelprozessen gefundenen Zahlen ist.<sup>[145, 154]</sup>

Erst ab einer Temperatur von ca. 130 K wurde auch eine Lokalisation der negativen Ladung auf Thyminiden beobachtet, gleichbedeutend mit einem Übergang vom Superaustausch zu einem *Hopping*-Prozess, bei welchem die Ladung auf den Brückenmolekülen lokalisiert war. Bei noch höheren Temperaturen von ca. 170 K konnte die negative Ladung auch auf Cytosinen nachgewiesen werden, ein Zeichen dafür, dass ab dieser Temperatur auch Cytosin als Brückenmolekül genutzt wurde. Die Temperaturdifferenz zum T rührte von der beschriebenen, konkurrierenden Protonierung des  $C^+$ -Radikalanions her, welche bei niedrigeren Temperaturen ein Hindernis für den Elektronentransfer bedeutete.<sup>[146]</sup> Dies steht auch im Einklang mit einer von *Anderson* für das *Hopping* bestimmten Aktivierungsbarriere von ca. 5 kcal/mol, welche bei sehr niedrigen Temperaturen nicht überwunden werden kann.<sup>[149]</sup> *Lewis und Wasielewski* untersuchten die Kinetik des reduktiven Elektronentransfers, indem sie Femtosekundenspektroskopie an DNA-Haarnadeln betrieben, welche als photoinduzierbaren Elektroneninjektor im Kopf der Haarnadel das Stilbendietherderivat **30** enthielten. (Schema 18).<sup>[155, 156]</sup>



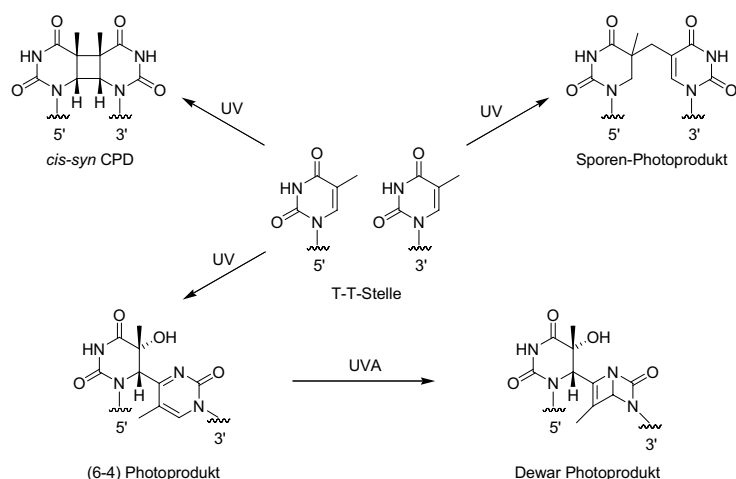
**Schema 18.** Von *Lewis und Wasielewski* verwendeter Injektor **30** und untersuchte DNA-Haarnadeln. I = Inosin.

Anhand dieser Systeme konnte gezeigt werden, dass die Injektion eines Elektrons in ein AT-Basenpaar etwas schneller erfolgte als im Falle eines GC-Basenpaares ( $> 2 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$  vs.  $3.3 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$ ), was ein Hinweis auf das günstigere Reduktionspotential von T in B-DNA sein konnte. Des Weiteren verlief die Injektion in ein CI-Basenpaar (I = Inosin) etwas schneller als in ein CG-Paar ( $1.4 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$  vs.  $3.3 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$ ), Ausdruck der Dynamik des Reduktionspotentials von C, welche aus unterschiedlichen H-Brücken zur Gegenbase resultiert. Weiterführende Messungen, in welchen GG-Mismatches als Spacer zwischen Injektor und AT-Basenpaaren eingebaut wurden, zeigten darüber hinaus eine im Vergleich zum analogen, für den Lochtransfer verwendeten System eine um den Faktor 130 verminderte Abstandsabhängigkeit. Voityuk errechnete darüber hinaus eine deutliche Begünstigung des Intrastrangelektronentransfers gegenüber der Interstrangvariante. Zudem sollte der Überschusselektronentransfer in wesentlich höherem Maße von strukturellen Änderungen in der DNA abhängen, als dies beim Lochtransfer offensichtlich der Fall ist.<sup>[157]</sup>

### 1.2.1 Reduktiver Elektronentransfer in der Natur und daraus abgeleitete Modellsysteme

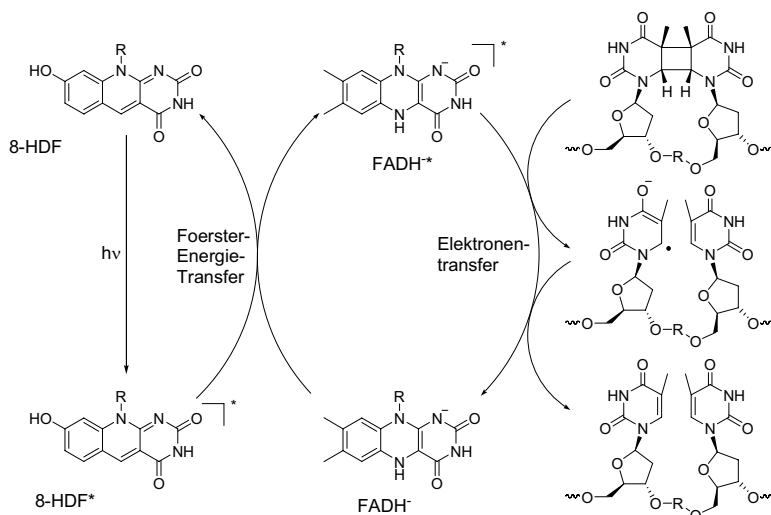
Auch in der Natur spielen Überschusselektronentransferprozesse auf DNA eine herausragende Rolle, speziell bei der Reparatur UV-induzierter Photoschäden.<sup>[158]</sup> In sehr vielen Organismen kommen die Enzyme CPD-Photolyase<sup>[159-161]</sup> und (6-4)-Photolyase<sup>[162-164]</sup> vor. Diese stellen (neben der Nukleotidexzisionsreparatur NER)<sup>[165]</sup> die wichtigsten Werkzeuge zur Beseitigung derartiger Photoschäden dar, die ansonsten zum Tod der Zelle führen könnten. So konnte Batschauer an CPD-Photolyase-defizienten Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* anschaulich zeigen, dass diese eine Exposition gegenüber normalem Sonnenlicht nicht oder nur sehr schlecht überleben.<sup>[166]</sup> Die wichtigsten UV-induzierten DNA-Schäden sind die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD), welche durch photochemische [2+2]-Cycloaddition zweier benachbarter Pyrimidine gebildet werden.<sup>[167, 168]</sup> Am häufigsten ist die Dimerisierung zweier Thymidine,<sup>[169]</sup> doch treten auch alle anderen möglichen Paarungen auf,<sup>[170, 171]</sup> wobei C-haltige Dimere schneller Desaminierung zum U unterliegen.<sup>[172, 173]</sup> Aufgrund der Topologie der DNA entsteht zumeist das *cis, syn*-Dimer, die entsprechenden *trans, syn*-Dimere werden nur in untergeordnetem Maße gebildet.<sup>[174, 175]</sup>

Der (6-4)-Schaden bildet sich zunächst durch eine Paternó-Büchi-Reaktion zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen.<sup>[176]</sup> Das hierbei zunächst gebildete Oxetanintermediat lagert sich bei Temperaturen über  $-80 \text{ °C}$  spontan in das (6-4)-Photoprodukt um (Schema 19).<sup>[177, 178]</sup>



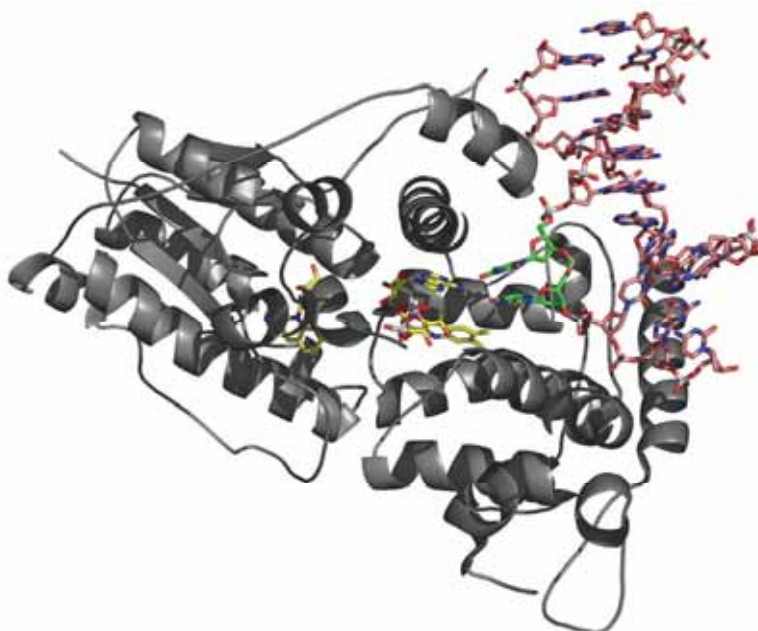
**Schema 19.** Die häufigsten Photoprodukte zwischen zwei benachbarten Thymidinen nach UV-Be-strahlung. Die gezeigten Photoprodukte können, bis auf das Sporen-Photoprodukt, auch zwischen be-nachbarten Cytidinen bzw. als gemischte Photoschäden aus Cytidin und Thymidin entstehen.

Sowohl bei der CPD- als auch bei der (6-4)-Photolyase handelt es sich um hoch substrat-spezifische Enzyme, wobei die Reparatur in beiden Fällen lichtabhängig ist. Der Reparaturmechanismus der CPD-Photolyasen konnte mittlerweile weitgehend aufgeklärt werden.<sup>[159]</sup> Den ersten Schritt bildet die Lichtabsorption durch einen als Antenne wirkenden Kofaktor (ähnlich wie der *light harvesting complex* in der Lichtreaktion der Photosynthese).<sup>[179]</sup> Diese Aufgabe übernimmt in Photolyasen der Klasse I ein Methenyltetrahydrofolat, in Photolyasen der Klasse II liegt hier ein 8-Hydroxydesazaflavin (8-HDF) vor.<sup>[180]</sup> Die Anregungsenergie wird nachfolgend durch Förster-Energietransfer auf ein nicht kovalent gebundenes FADH (reduziertes und deprotoniertes Flavin-Adenin-Dinukleotid) übertragen, das hierdurch selbst in den angeregten Singulettzustand übergeht.<sup>[181]</sup> In diesem Zustand ist das FADH ein sehr starkes Reduktionsmittel ( $E = -2.6\text{V}$  gegen SCE),<sup>[182]</sup> was es befähigt, alle Nukleobasen einschließlich des CPD-Dimers (siehe Tabelle 4) zu reduzieren. Elektronentransfer zum Dimer initiiert dessen Zerfall in die Monomere, woraufhin das Elektron zum FAD zurücktransportiert wird, was den katalytischen Zyklus schließt (Schema 20).<sup>[183, 184]</sup> In letzterem Punkt gibt es teils abweichende Meinungen, so räumt *McFarlane* ein, dass das Elektron evtl. nicht zum FAD zurücktransportiert wird.<sup>[185]</sup> Kurzpulsspektroskopische Messungen von *Sançar* zeigten aber deutlich den Rücktransport an, ferner konnte er den Übertrag des Elektrons auf das Dimer mit einer Dauer von  $\tau \cong 170$  ps als den ratenbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion aufklären.<sup>[186]</sup> Der gesamte Prozess vollzieht sich im Enzym in ca. 560 ps, es handelt sich hier also um ein „ultraschnelles“ Phänomen. Für die Öffnung eines freien T=T-Dimers in Lösung wurde von *Falvey* ein Wert im Bereich von  $k \cong 10^6$  s<sup>-1</sup> bestimmt.<sup>[187]</sup> Neue Untersuchungen zeigen allerdings, dass dieser Wert wohl um ca. 1-2 Größenordnungen zu niedrig ist.<sup>[188]</sup>



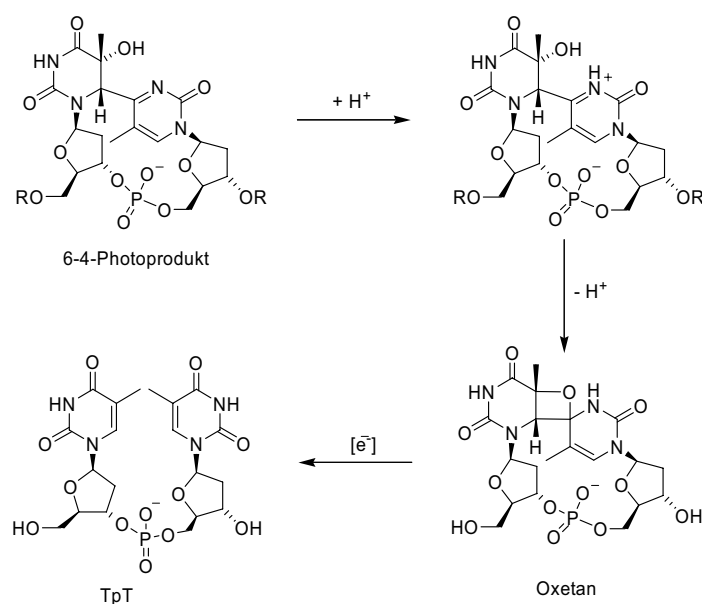
**Schema 20.** Mechanismus der katalytischen Spaltung von Thymidindimeren durch Typ II Photolyasen. 8-HDF = 8-Hydroxy-5-desazaflavin, FADH = reduziertem Flavin-Adenin Dinukleotid.

Der Mechanismus konnte in 2004 zusätzlich untermauert werden, als unter Beteiligung unserer Arbeitsgruppe eine Cokristallstruktur einer *Anacystis nidulans* CPD-Photolyase mit T=T-Dimer enthaltender DNA erhalten wurde.<sup>[189]</sup> Die Struktur zeigte deutlich das zur Reparatur aus dem Strang herausgeklappte Dimer und die zum Energie- bzw. Elektronentransfer nötige Stellung der Kofaktoren (Abb. 5)



**Abb. 5.** Ausschnitt aus der Cokristallstruktur der CPD-Photolyase mit einem CPD-Schaden enthaltenden Oligonukleotid. Das herausgeklappte und bereits geöffnete T=T-Dimer ist in grün dargestellt, die Koenzyme der Photolyase sind gelb.

Im Gegensatz zur CPD-Photolyase ist der Arbeitsmechanismus der (6-4)-Photolyase noch weitgehend ungeklärt, einzig eine wesentlich niedrigere Quantenausbeute von  $\Phi > 0.05-0.11$  konnte bestimmt werden. Zum Vergleich, die CPD-Photolyasen erreichen hier Werte bis zu  $\Phi > 0.9$ .<sup>[159]</sup> Es wird vermutet, dass der (6-4)-Photoschaden zunächst protonenkatalysiert<sup>[190]</sup> (besonders zwei konservierte Histidine sind hier wichtig)<sup>[191]</sup> in ein Oxetanintermediat überführt wird, welches dann durch Elektronentransfer vom hier ebenfalls als Kofaktor auftretenden FADH<sup>-</sup> gespalten werden kann (Schema 21).<sup>[164, 192, 193]</sup>

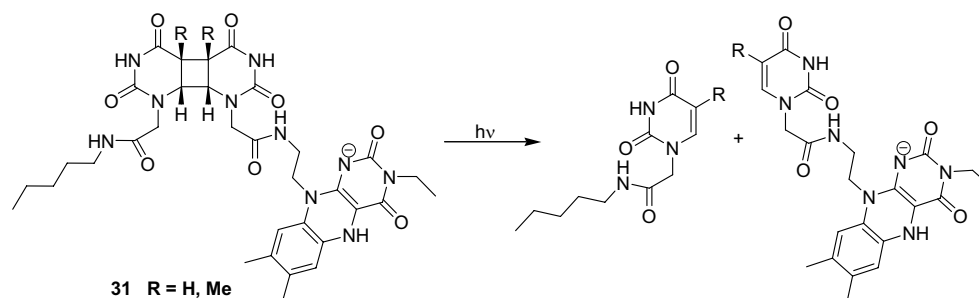


**Schema 21.** Postulierter Mechanismus für die Reparatur des (6-4)-Photoprodukts durch die (6-4)-Photolyase.<sup>[164, 191]</sup>

Bisher gelang es nicht, das postulierte Oxetanintermediat nachzuweisen. Ein von *Sancar* und *Taylor* untersuchtes und von *Clivio* verwendetes Thietan-Analogon wurde von der (6-4)-Photolyase nicht prozessiert.<sup>[190, 194-197]</sup> Zur Zeit sind in unserer Arbeitsgruppe große Bemühungen im Gange, eine Kokristallstruktur einer (6-4)-Photolyase mit einem DNA-Strang zu erhalten, in welchen photochemisch ein (6-4)-Photoprodukt eingeführt wurde. Auf diese Weise soll in nächster Zukunft versucht werden, endlich Licht in diesen, aufgrund der hochmutagenen Wirkung des (6-4)-Schadens interessanten, Reparaturmechanismus zu bringen.<sup>[198, 199]</sup>

Ausgehend von der Arbeitsweise der Photolyasen entwickelte *Carell* ein hocheffizientes System zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA, wobei ein reduziertes, deprotoniertes und lichtangeregtes Flavin als Donor und ein T=T-Dimer-Analogon als Elektronenakzeptor fungierte.<sup>[200-204]</sup> Erste Studien an Modellverbindungen wie **31** zeigten bereits früh, dass das Dimer auch außerhalb der Photolyase effektiv durch Elektronenübertrag von einem Flavin gespalten werden konnte (Schema 22).

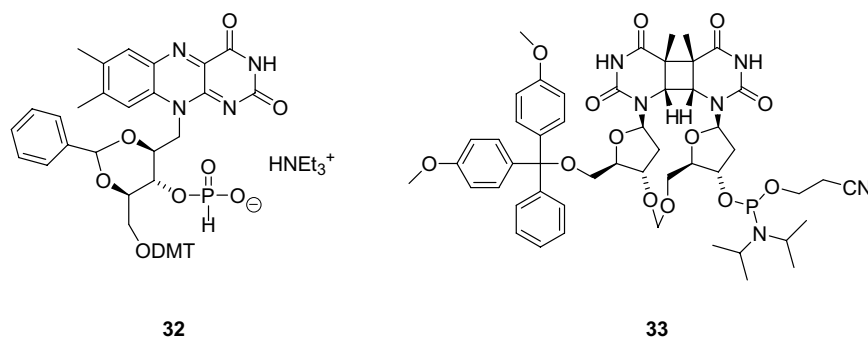




**Schema 22.** Reduktive Öffnung der CPD/Flavin-Modellverbindung **31**.

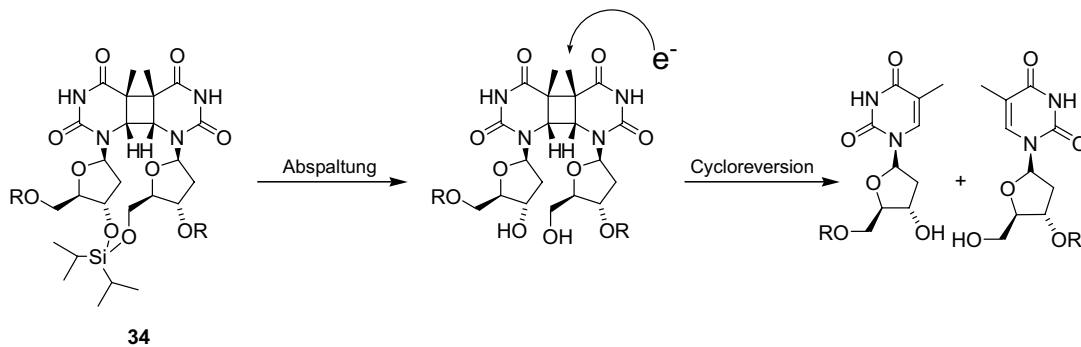
Die Reduktion des Flavins wurde durch Behandlung mit Natriumdithionit erreicht, der Vorgang konnte anhand der Entfärbung des in oxidiertem Zustand gelben Flavins verfolgt werden. Zur Lichtanregung wurde mit einer geeigneten Lichtquelle unter anaeroben Bedingungen im Absorptionsmaximum des Flavins ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) bestrahlt. Die Reaktion war stark pH-abhängig. Effizient verlief sie nur bei pH-Werten zwischen 7 und 9.<sup>[201, 205]</sup> Bei niedrigeren pH-Werten wurde das reduzierte Flavin protoniert.<sup>[206]</sup> Hierdurch käme es im Falle des Elektronentransfers zu einer Ladungstrennung, was die Reaktion hemmte. Im stark basischen Milieu hingegen lag das Thymindimer ( $\text{pK}_a \approx 11$ ) als Anion vor, auf das aufgrund elektrostatischer Abstoßung nur schwerlich ein weiteres Elektron übertragen werden konnte. Auch hier sank die Effizienz der Reaktion stark ab.<sup>[207]</sup>

Hiervon ausgehend wurden Flavin- und Dimerbausteine **32** bzw. **33** entwickelt und in Oligonukleotide eingebaut.<sup>[208]</sup> Damit stand zum erstenmal ein System zur Verfügung, in dem sowohl ein Donor als auch ein Elektronenakzeptor ortsspezifisch in DNA lokalisiert waren. Es konnte so ein geeignetes System für mechanistische Untersuchungen zum Überschusselektronentransfer aufgebaut werden. (Schema 23)



**Schema 23.** Von Carell zum Einbau in Oligonukleotide entwickelte Flavin- und T=T-Dimerbausteine **32** bzw. **33**.

Belichtungsexperimente mit ersten Strängen zeigten effiziente Reparatur der T=T-Dimers unter Bedingungen, in welchen das Flavin reduziert und deprotoniert vorlag. Erste Einblicke in den Mechanismus des reduktiven Elektronentransfers wurden dann hauptsächlich von C. Behrens erhalten. In den von ihm betrachteten Strängen war der formacetalverbrückte Baustein 33 gegen den von L. Burgdorf entwickelten silylverbrückten Baustein 34 ausgetauscht worden, da letzterer nach Abspaltung des neusynthetisierten DNA-Strangs von der Festphase ein offenes Rückgrat besaß. Durch die Reparatur des Dimers kam es so zu einem Strangbruch, der sehr leicht HPL-chromatographisch detektiert werden konnte, was die Quantifizierung der Elektronentransferprozesse extrem erleichterte (Schema 24).



Schema 24. Spaltung des offenen T=T-Dimerbausteins 34.

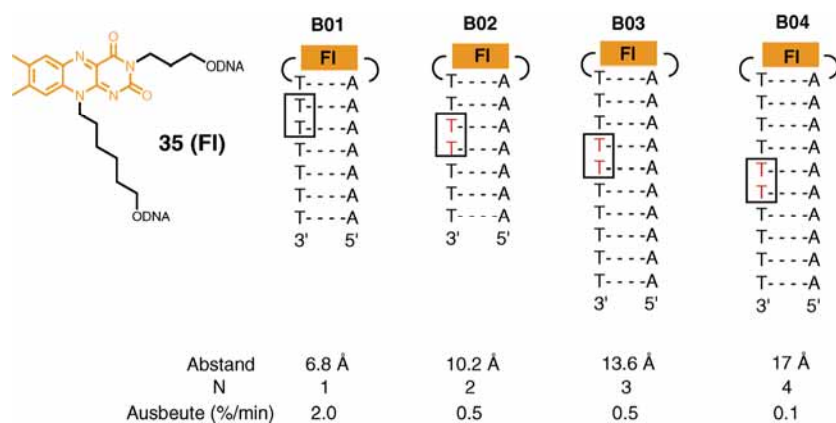
In den von Behrens untersuchten Doppelsträngen (Abb. 6) trat in größeren Donor-Akzeptorabständen, in welchen ein Superaustausch unwahrscheinlich war, die für einen Hopping-Prozess erwartete geringe Abstandsabhängigkeit des Elektronentransfers auf, eine Veränderung des Abstands von 3.4 Å auf 30.4 Å (1-10 Basenpaare) führte nur zu einem Absinken der Spaltungseffizienz von 3.7 %/min auf 0.13 %/min.<sup>[209]</sup>

Abb. 6. Darstellung der von Behrens für die Untersuchung von Überschusselektronentransfer verwendeten Oligonukleotide und deren Reparatur-ausbeuten.

Fl = 32, T=T = 34.

$\Delta r$ (Å)	3.4	6.8	10.2	13.6	17	20.4	23.8	30.6
N	1	2	3	4	5	6	7	9
Ausbeute (%/min)	3.7	2.5	1.0	2.2	1.9	1.0	0.8	0.13

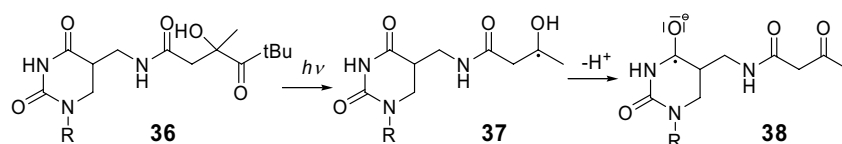
Diese Ergebnisse wurden durch Messungen in Haarnadelsystemen bestätigt. DNA-Haarnadeln zeigten gegenüber Doppelsträngen eine überlegene thermische Stabilität und strukturelle Rigidität, weswegen sie in der Folge bevorzugt für derartige Untersuchungen herangezogen wurden. Hierfür wurde der optimierte Flavinbaustein **35** als Donor entwickelt und in den Kopf der Haarnadeln eingebaut (Abb. 7).<sup>[210, 211]</sup>



**Abb. 7.** Darstellung der von Behrens für die Untersuchung des Überschusselektronentransfers verwendeten DNA-Haarnadeln und deren Reparaturraten.  $[TT]$  = CPD-Dimer **34**.

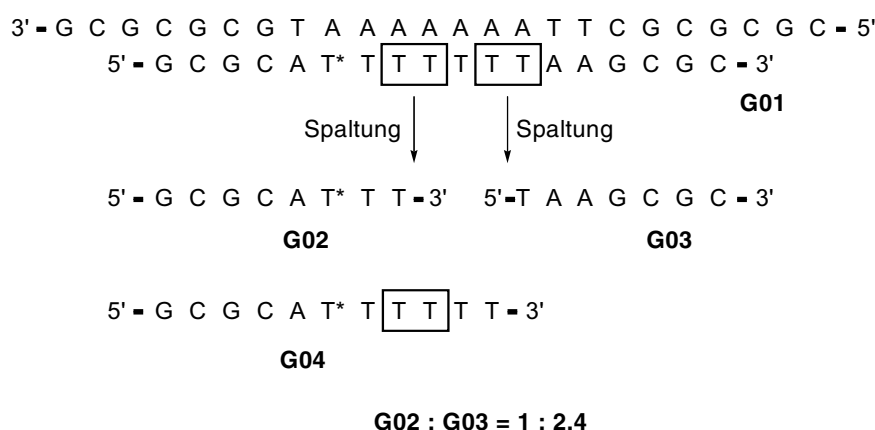
Auch hier sank die Reparaturausbeute nur sehr schwach, von 2.0 %/min auf 0.1 %/min zwischen **B01** und **B04**. Interpretation nach dem Superaustausch ergäbe hier einen unvereinbar niedrigen  $\beta$ -Wert von  $0.3 \text{ \AA}^{-1}$ , berechnet man dagegen nach Gleichung (1-2) einen  $\eta$ -Wert, so erhält man  $\eta = 1.9$ , was einem theoretischen *random walk* bereits sehr nahe kommt. Dieses Ergebnis, nämlich dass der reduktive Elektronentransfer in DNA einem thermisch aktivierten *Hopping*-Mechanismus folgt, konnte nachfolgend auch von verschiedenen anderen Gruppen wie z. B. *Rokita* und *Wagenknecht* bestätigt werden.<sup>[212-216]</sup> Als lichtinduzierte Elektronendonoren verwendete *Rokita* verschiedene aromatische Amine, von *Wagenknecht* wurde zu diesem Zweck ein Phenothiazinderivat verwendet. Als Akzeptor benutzte *Wagenknecht* ein Pyren, in neueren Untersuchungen ein 5-Bromdesoxyuridin, welches auch *Rokita* einsetzt. 5-Bromdesoxyuridin reagiert mit Elektronen ( $k > 10^{10} \text{ s}^{-1}$ ) unter Abspaltung des Bromidanions.<sup>[217-219]</sup> Das entstandene Radikal kann dann vom benachbarten Nukleosid ein 1'- bzw. 2'-H-Atom abstrahieren. Ersterer Fall führt zur Bildung des Ribonolactons, welches sich bei Basenbehandlung unter Entstehung eines Strangbruchs zersetzt.<sup>[220]</sup> Abstraktion des 2'-H-Atoms kann nach *Greenberg* durch Hydridshiftreaktionen ebenso zur Entstehung des Ribonolactons oder aber zum Bruch der 3'-Phosphordiesterbindung führen.<sup>[221]</sup> Beide Fälle führen bei Erhitzen in Piperidin zu einem gut per HPLC oder Gelelektrophorese detektierbaren Strangbruch.

Bezüglich Richtungs- und Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers gelangte man allerdings zu abweichenden Ergebnissen. So wurde in unserer Gruppe keine Vorzugsrichtung des reduktiven Elektronentransfers in PNA-DNA-Duplexen (PNA: *peptide nucleic acid*, DNA-Analogon mit peptidischem Rückgrat)) gefunden.<sup>[222]</sup> *Rokita* beobachtete hingegen in seinen Systemen eine deutliche Bevorzugung des Transfers in der 3'-5'-Richtung. Messungen an Flavin- und Dimer-enthaltenden DNA-Haarnadeln im Rahmen meiner Diplomarbeit zeigten keinen Einfluss der Sequenz auf die Spaltungseffizienz. Der Transfer durch AT- und GC-Basenpaare verlief im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich schnell.<sup>[223]</sup> Sowohl *Rokita* als auch *Wagenknecht* beobachteten hingegen in ihren Systemen eine deutliche Hinderung des Transports durch GC-Basenpaare.<sup>[212-216]</sup> Der Grund hierfür könnte die im Vergleich zu den anderen Akzeptoren langsame Spaltungsrate des T=T-Dimers sein, welche hier zum ratenbestimmenden Schritt werden kann. Ein Experiment in Zusammenarbeit mit *Giese* deutete ebenfalls darauf hin.<sup>[224]</sup> Hier wurde als Einelektronendonator der von *Giese* entwickelte T-Baustein **36** verwendet (Schema 25)



**Schema 25.** Photolyse von Keton **36** liefert über das Dialkylketonradikal **37** das Thyminradikalanion **38**. Der Mechanismus ist EPR-spektroskopisch bei 75 K bewiesen worden.

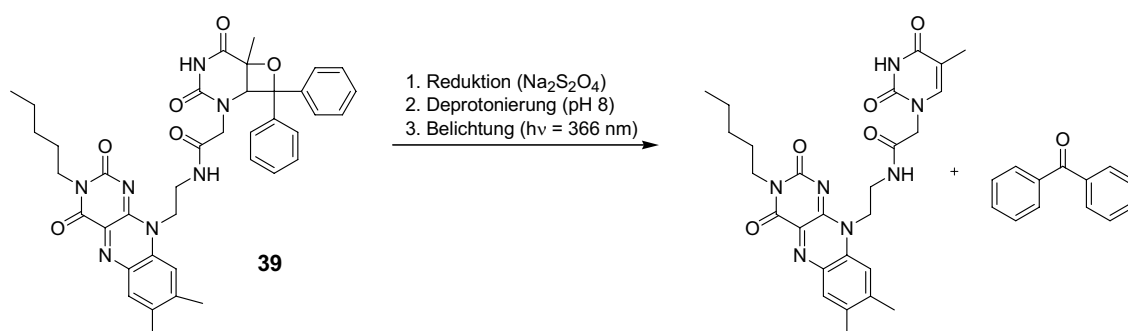
**36** wurde nebst zweier T=T-Dimere **34** in einen DNA-Duplex eingebaut. (Schema 26)



**Schema 26.** Darstellung der von *Giese* beobachteten verschiedenen Produkte bei der Injektion eines einzelnen Elektrons durch den modifizierte Thymidinbaustein **36** (T\*) in ein Oligonukleotid, das mehrere T=T-Dimere enthält. Das Elektron springt teilweise über das näher am Donor liegende Dimer und spaltet es nicht, sondern nur das weiter entfernte. [T T] = CPD-Dimer **34**.

Überraschenderweise konnte ein Elektron beide Dimere spalten, das Elektron konnte aber auch von einem Dimer weiterspringen, ohne dieses zu öffnen. Nur so ist zu erklären, dass in gewissem Maße Fragmente gefunden wurden, in denen nur das entferntere Dimer gespalten worden war. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass die *Hopping*-Geschwindigkeit höher als die Spaltrate des Dimers liegt, so dass dieses evtl. vorhandene sequenzabhängige Unterschiede nicht wiedergeben kann.

Ein wichtiger Ansatzpunkt für diese Arbeit war daher die Entwicklung neuer Elektronenakzeptoren. Zum einen sollten dabei das 5-Bromdesoxyuridin bzw. die verwandten 8-Br-Purinnukleoside aufgegriffen werden, die als schnelle Akzeptoren bekannt waren.<sup>[225-228]</sup> Zum anderen sollte ein Oxetanbaustein zum Einbau in DNA entwickelt werden. *Falvey* hatte die reduktive Spaltung verschiedener, von 1,3-Dimethylthymidin abgeleiteter Oxetane in den 90er Jahren eingehend untersucht, wobei er aromatische Amine als lichtinduzierbare Donoren einsetzte.<sup>[229-232]</sup> Aus spektroskopischen Daten wurde eine Spaltgeschwindigkeit im Bereich von  $k = 10^8 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. In unserer Gruppe konnte anhand von Modellverbindungen durch *Cichon* und *Friedel* gezeigt werden, dass Thyminoxetane wie **39** (bzw. analoge Thyminthietane) durch Elektronentransfer vom reduzierten, deprotonierten Flavin geöffnet werden können, ein wichtiges Indiz auch für den Mechanismus der (6-4)-Photolyase (Schema 27).<sup>[233, 234]</sup>



**Schema 27.** Elektronentransferinduzierte Spaltung der Flavin/Oxetanmodellverbindung **39**.

Nachdem *Diederichsen* die Öffnung von Oxetanen über Reduktion bzw. Oxidation (ein Mechanismus, der von *Miranda*<sup>[235-238]</sup> eingehend untersucht wurde) verglichen und eine vergleichbare Effizienz gefunden hatte,<sup>[239]</sup> publizierte er in jüngster Zeit eine Studie, in der ein dem von unserer Gruppe verwendeten Thyminoxetan **39** ähnlicher Akzeptor im Zusammenhang mit einem Flavindonor in PNA-Duplexen verwendet wurde.<sup>[240]</sup> Die Daten zeigten einen mit dem *Hopping*-System vereinbaren Verlauf der Spaltungseffizienzen. Die Datenbasis ist allerdings dünn, und das Experiment leidet unter den üblichen, beim Arbeiten mit PNA oft auftretenden Problemen, wie der übergroßen thermischen Stabilität und der Neigung zur Bildung von Tripelsträngen.

In Kapitel 2 soll gleichsam als Antwort hierauf unser eigenes, in dieser Hinsicht wesentlich vorteilhafteres Flavindonor/Oxetanakzeptorsystem zur Messung des reduktiven Elektronentransfers in DNA-Haarnadeln vorgestellt werden, mit dessen Hilfe Abstands- und Sequenzabhängigkeit detailliert untersucht wurden, aber auch der tatsächliche Transportweg der Elektronen in der DNA tiefer beleuchtet werden konnte. Damit sollte ein großer Schritt hin zur Beantwortung der bisher noch ungeklärten Fragen bezüglich des reduktiven Elektronentransfers in DNA getan werden.

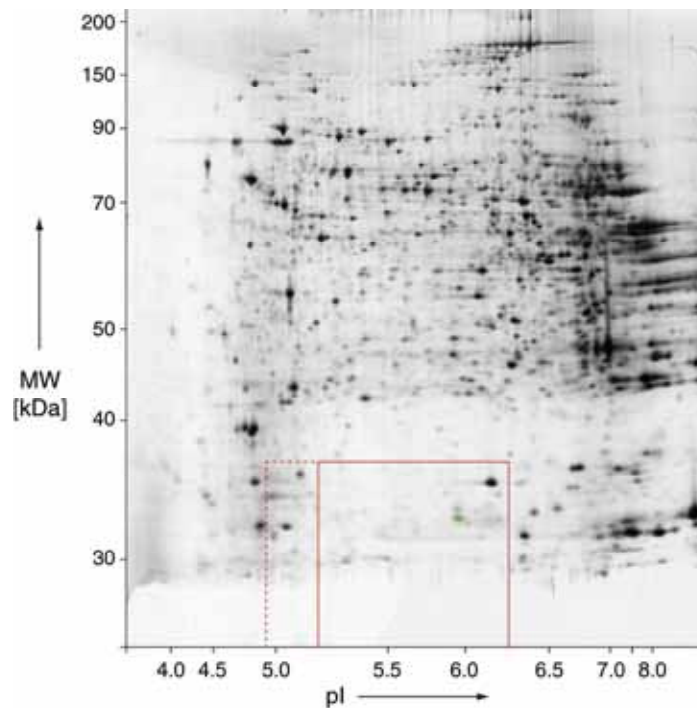
### 1.3 *Photoaffinity labeling* als Methode zur Aufklärung von Protein-Substrat-Wechselwirkungen

In den vergangenen Jahren wurden enorme Fortschritte auf dem Gebiet der Genomforschung gemacht, welche 2001 in der Entschlüsselung des kompletten menschlichen Genoms im *Human Genome Project* (HUGO) ihren vorläufigen Höhepunkt erreichten.<sup>[241]</sup> Letztlich sind es aber die Proteine, die die meisten biologischen Vorgänge in der Zelle steuern und zu diesem Zweck einer Vielzahl regulatorischer Prozesse unterworfen sind, so z. B. Kontrolle des Expressionsniveaus, Kompartimentierung in unterschiedliche Zellorganellen, posttranskriptionale und posttranslationale Modifikation.<sup>[242]</sup> Selbst konservative Schätzungen gehen daher mittlerweile davon aus, dass das menschliche **Proteom**, die Gesamtheit aller strukturell und funktional diversen Proteine, weit mehr als 100.000 Proteine umfasst und damit die geschätzte Zahl menschlicher Gene (30.000-40.000) weit übersteigt.<sup>[241]</sup>

Das große Ziel der als **Proteomics** bezeichneten Disziplin ist daher die Identifizierung, Charakterisierung und Funktionsbestimmung aller Proteine, die aus einem entsprechenden Genom exprimiert werden.<sup>[243]</sup> Die enormen wissenschaftlichen Anstrengungen auf diesem Gebiet (die sich auch in der Zahl von über 20.000 Publikationen seit Aufkommen des Begriffs um 1998 zeigt) fokussieren sich hier besonders auf die Entwicklung von Hochdurchsatzmethoden, mit denen eine möglichst große Zahl an Proteinen in möglichst geringer Zeit bezüglich ihres Expressionslevels, zellulärer Funktion, Lokalisierung und Interaktionsnetzwerks untersucht werden kann.

Das „Arbeitspferd“ zur Trennung umfangreicher Proteingemische (bis hin zum Ganzzell-extrakt) war und ist die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE).<sup>[244]</sup> In dieser Methode, die erstmals 1975 von *O'Farrell* und *Klose* unabhängig voneinander beschrieben wurde, wird das zu untersuchende Proteingemisch zunächst einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) unterzogen, welche die Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punkts (IEP) auf-

trennt.<sup>[245, 246]</sup> Der Polyacrylamidstreifen, in welchem die IEF durchgeführt wurde, wird dann auf ein denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel (SDS = Sodiumdodecylsulfat) aufgelegt. In der zweiten Dimension findet nun eine elektrophoretische Trennung nach dem Molekulargewicht der Proteine statt. Nach Anfärbung der Proteine im Gel (meist Silberfärbung oder *CoomassieBlue*-Färbung) erhält man so ein charakteristisches „Fleckenmuster“ auf dem Gel, bei dem jeder Fleck (*Spot*) für – mindestens – ein Protein steht.<sup>[247]</sup> Abb. 8 zeigt ein solches 2D-Gel, es handelt sich hierbei um ein Mäuseleberzelllysat.<sup>[248]</sup>

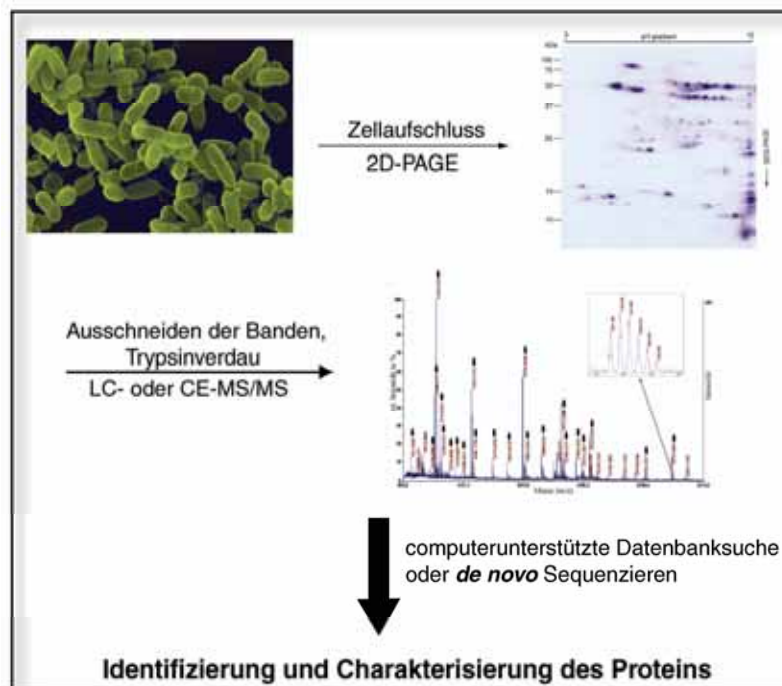


**Abb. 8.** Zweidimensionales Polyacrylamidgel eines Mäuseleberzelllysats. Der grünmarkierte Punkt bezeichnet das Enzym Cyclooxygenase 2.<sup>[248]</sup>

Die separierten Proteine können anschließend massenspektrometrisch untersucht werden. Es wurden Protokolle entwickelt, um sie noch im Gel mit geeigneten Proteasen (meistens Trypsin, Proteinase K etc.) zu verdauen.<sup>[249]</sup> Die so erhaltenen Fragmente können dann mittels hochauflösender Nanospray-ESI- bzw. MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert werden, durch Weiterfragmentierung mittels MS/MS, z. B. in einer Ionenfalle (bzw. *Orbitrap* etc.) kann die Peptidsequenz einschließlich aller posttranslationalen Modifikationen einwandfrei bestimmt werden.<sup>[250-252]</sup> Im Zuge des technischen Fortschritts wurden auch diese Methoden weiterentwickelt, so dass das Entnehmen der Proteinspots, Verdau und MS-Experimente heute bereits größtenteils automatisiert stattfinden, wodurch in einigen Fällen tausende Spots pro Versuch analysiert werden können. Die für jedes Protein erhaltenen Peptidfragmente und MS/MS-Fragmentierungsmuster bilden einen spezifischen Fingerabdruck.<sup>[253]</sup> Da die entsprechenden Daten in weltweiten Datenbanken, z. B. *NcBI*, *SwissProt* hinterlegt wurden, ist es heute möglich, bekannte Proteine durch Abgleich mit den bereits erfassten Daten zu identifizieren.

zieren. Diese Methode, die 1996 von *Mann* etabliert wurde und als *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) bekannt ist, wird sehr häufig angewendet.<sup>[254-256]</sup>

Die computertechnische Entwicklung gestattet heute auch die Untersuchung von Proteingemischen. Leistungsfähige Algorithmen (*Mascot*, *SEQUEST* etc.) wurden geschaffen, mit deren Hilfe auch in komplexen Gemischen tryptischer Peptide auf die Identität der Ursursproteine geschlossen werden kann.<sup>[257]</sup> Dies ist wichtig, da selbst auf einem guten 2D-Gel noch mehrere Proteine in einem Fleck lokalisiert sein können. Da in diesen Fällen sowohl höchste Empfindlichkeit als auch Massengenauigkeit notwendig ist, werden die Peptide per nano-HPLC bzw. Kapillarelektrophorese (CE) vorsepariert, bevor die Analyse im Massenspektrometer stattfindet.<sup>[258-262]</sup> Ein beeindruckendes Beispiel hierfür ist die Trennung und eindeutige Identifizierung eines Gemischs aller 55 ribosomalen Proteine per CE-MS, welche von *Moini* vorgenommen wurde.<sup>[263]</sup> In der folgenden Abbildung 9 ist der Ablauf eines solchen *Proteomics*-Experimentes noch einmal schematisch zusammengefasst.



**Abb. 9.** Schematischer Verlauf eines typischen Proteomics-Experimentes.

Seit wenigen Jahren kommen, begünstigt von der nun verfügbaren Rechenleistung bzw. der enorm gesteigerten Empfindlichkeit und Auflösung moderner Massenspektrometer auch Trennmethode zum Einsatz, bei denen auf eine Separierung per Gelelektrophorese völlig verzichtet wird und das zu analysierende Proteingemisch direkt in Lösung tryptisch verdaut wird.<sup>[264-266]</sup> Für den Erfolg solcher Methoden darf die Zahl der Proteinkomponenten nicht zu hoch sein, zudem ist eine effektive Auftrennung der tryptischen Peptide vor der MS-Untersuchung unentbehrlich, um eine möglichst hohe Zahl an Proteinen mit größtmöglicher Se-



quenzabdeckung und –genauigkeit zu identifizieren. Die bedeutendste Methode in diesem Feld wurde erstmals 2001 von Yates eingeführt und wird als *MudPIT* (*Multidimensional Protein Identification Technology*) bezeichnet.<sup>[267]</sup> In diesem Ansatz wird die zu untersuchende Proteinprobe tryptisch verdaut und die angereicherten Peptide sequentiell über einen starken Kationenaustauscher (SCX) und eine *reversed phase*-HPLC separiert und über ein *on line*-gekoppeltes Nanospray-ESI-Massenspektrometer mit geeignetem Analysator (Ionenfalle oder *Orbitrap*<sup>TM</sup>) sequenziert.<sup>[268-270]</sup> Diese Abfolge ist in Abb. 10 schematisch dargestellt.

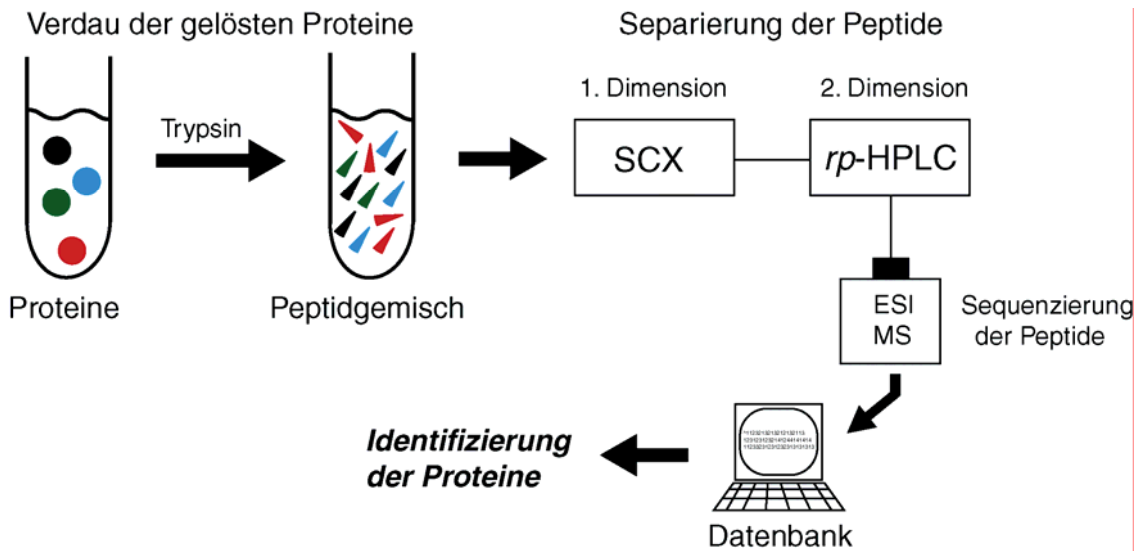


Abb. 10. Schematische Darstellung der Schritte in einem MudPIT-Experiment.

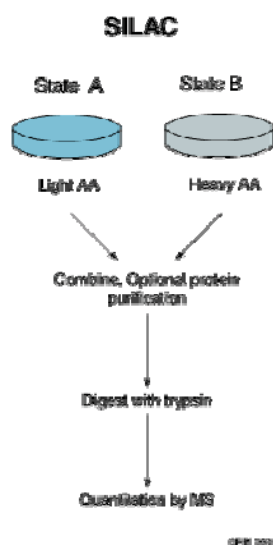
Unter Verwendung eines vorfraktionierten *S. cerevisiae* Zellextrakts konnten mit dieser Methode in einem Versuch ca. 1500 verschiedene Proteine identifiziert, und in ihrer Häufigkeit bzgl. verschiedener Fraktionen (Kernproteine, Membranproteine, etc.) bewertet werden.<sup>[267]</sup> Darunter waren auch verschiedene Transkriptionsfaktoren und in Signalwegen beteiligte Proteinkinasen, welche aufgrund ihres niedrigen Expressionsniveaus sonst nur selten fassbar waren. Insgesamt kann gesagt werden, dass diesem Gebiet, das aufgrund des ungezielten Ansatzes oft auch als *Shotgun-Proteomics* bezeichnet wird und von Gruppen wie Abersold und Yates ausgebaut wird, in Zuge der zukünftigen technischen Entwicklung sicherlich noch steigende Bedeutung zukommen wird.<sup>[271-275]</sup>

Obwohl durch diese nicht zielgerichtete Untersuchung des Proteoms aufbauend auf elektrophoretischer oder chromatographischer Trennung bereits sehr viele Proteine aufgefunden und charakterisiert werden konnten, leiden gerade die gelbasierten Methoden doch unter einigen Schwächen. So ist z. B. die Empfindlichkeit sehr begrenzt, was zu Schwierigkeiten in der Detektion seltener Proteine führt. Zudem ist der trennbare pH-Bereich in der isoelektrischen Fokussierung eingeschränkt, so dass stark basische bzw. saure Proteine nicht

aufgelöst werden können. Darüber hinaus ist die Reproduzierbarkeit zweidimensionaler Gele in den meisten Fällen problematisch.

Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um diesen Nachteilen entgegenzuwirken. So wurden verschiedene, fluoreszenzbasierte Färbemethoden etabliert, mit denen auch sehr selten auftretende Proteine nachgewiesen werden konnten; das Fluoreszenzsignal korreliert dabei über einen relativ großen dynamischen Bereich mit der Substanzmenge.<sup>[276]</sup> Über Fluoreszenz-2D-Differenzgelelektrophorese (DIGE)<sup>[276-278]</sup> oder Isotopenmarkierungsmethoden (*Isotope Coded Affinity Tagging, ICAT™*)<sup>[279-283]</sup> wurde es möglich, Proteinproben aus unterschiedlichen zellulären Zuständen simultan zu untersuchen und so Unterschiede in den Expressionsniveaus quantifizierbar zu machen.

Als wichtige Methode zur isotopenbasierten Quantifizierung von Proteinen hat sich das 2002 am CEBI von der Gruppe Mann entwickelte SILAC (*Stable Isotope Labeling of Amino Acids in Cell Culture*) erwiesen.<sup>[284-288]</sup> In diesem Ansatz geht man von zwei Zellkulturen aus, welche parallel angezchtet werden. Eine wächst in einem Standardmedium, der anderen werden eine oder mehrere der zum Wachstum nötigen essentiellen Aminosäuren in einer stabil isotopenmarkierten Form zugesetzt. Sehr häufig wird <sup>2</sup>H-markiertes Leucin bzw. <sup>13</sup>C-markiertes Arginin verwendet. Da diese Aminosäuren essentiell sind, sind die Zellen gezwungen, die markierten Aminosäuren in ihre Proteine einzubauen. Hierdurch können über einen Zeitraum von wenigen Tagen in allen synthetisierten Proteinen Markierungsraten nahe oder bei 100 % erreicht werden, was auf chemischem Wege nicht einmal annähernd möglich wäre. Die fertigen Zellen werden dann für die gewünschten biochemischen Experimente verwendet. Dann werden die Zellextrakte gewonnen, bzw. die interessierenden Proteine gereinigt, wobei die Extrakte vereinigt werden. Nach Trypsinverdau erhält man dann für jedes Peptid ein Paar von Signalen, jeweils ein Signalsatz für das isotopenmarkierte „schwere“ Fragment und das unmarkierte „leichte“ Fragment. Im Falle gleicher Expression sollten diese Signale 1:1 auftreten, ansonsten in einem abweichenden Verhältnis. Mit der geeigneten Software (z. B. *MSQuant*) können die SILAC-Paare aufgefunden und die jeweiligen Proteinmengen relativ quantifiziert werden. Ein weiterer hilfreicher Nebeneffekt ist, dass aus exogenen Kontaminationen stammende Proteine, welche das SILAC-Isotopenmuster nicht aufweisen, in der Prozessierung der MS-Daten nicht berücksichtigt werden. Dadurch steigt die Anzahl und Aussagekraft der gefundenen Peptide enorm an. Der Verlauf des SILAC-Experimentes ist in Abb. 11 noch einmal schematisch zusammengefasst.



**Abb. 11.** Schematischer Ablauf eines SILAC-Experimentes.<sup>[286]</sup>

Als das „ultimate“ Hochdurchsatzverfahren für die Zukunft könnten sich Protein-Mikroarrays erweisen, eine Technologie, in der analog zu DNA-Arrays ganze Proteome (Proteine zuvor isoliert und gereinigt) auf kleinen Chips in definierter Anordnung immobilisiert werden.<sup>[289, 290]</sup> In einem beeindruckenden Experiment konnte das gesamte Proteom von Bäckerhefe (*S. cerevisiae*, ca. 6000 ORFs) auf eine  $2.5 \times 7.5 \text{ cm}^2$  Glasplatte aufgebracht und damit verschiedene biologische Funktionen ausgetestet werden.<sup>[290]</sup>

Der größte Nachteil der nicht funktionsorientierten Methoden wurde damit aber noch nicht beseitigt, nämlich der begrenzte Informationsgehalt, der meistens nicht über die absolute Identität und eine relative Mengenangabe hinausgeht.<sup>[291]</sup> Über die biologische Funktion eines unbekanntes Proteins kann zumeist keine Aussage gemacht werden, bestenfalls sind Vermutungen aufgrund von Sequenzhomologien zu Proteinen bekannter Funktion möglich. Um daher die Vorteile gelbasierter Verfahren mit einer funktionsbasierten Analyse zu verknüpfen, wurden ab dem Jahr 2000 systematisch Ansätze zu einer chemischen Proteomanalyse verfolgt, die im folgenden näher vorgestellt werden sollen.

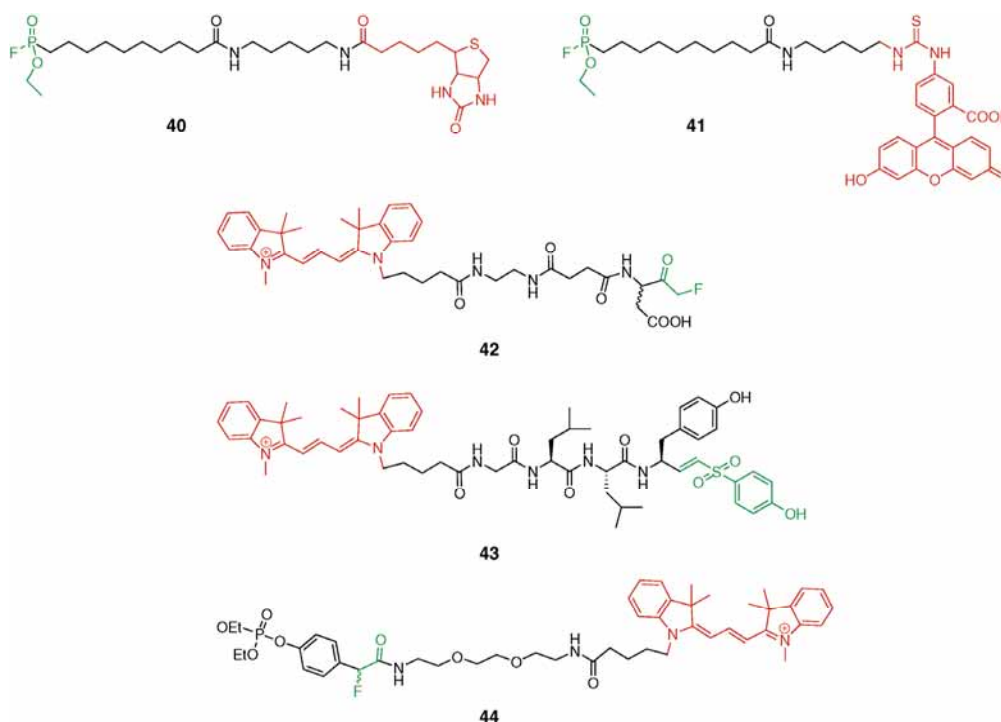
### 1.3.1 Chemische Methoden in der Proteomanalyse – das *Activity-based protein profiling*

Von *Cravatt* wurde ab den Jahren 1999-2000 eine Methode vorgestellt, bei der erstmals in Zelllysaten gezielt nach Proteinen bestimmter Funktion „gefischt“ werden konnte; da diese Methode auf der spezifischen Aktivität bestimmter Enzymklassen beruht, wurde die Technologie als *activity-based protein profiling* (ABPP) bezeichnet.<sup>[292, 293]</sup> Als Sonden in dieser

Art von Experiment wurden niedermolekulare Substanzen eingesetzt, welche stets die folgenden funktionellen Einheiten aufwiesen:

1. Die Reaktivgruppe („warhead“)
2. Die Reportergruppe
3. Ein Linker zur räumlichen Separierung von 1. und 2.

Als Reaktivgruppen wurden Funktionen verwendet, von denen man wusste, dass sie die zu untersuchende Klasse von Proteinen irreversibel kovalent modifizieren. Oftmals waren dies Gruppen, welche auch als Suizidinhibitoren für die entsprechende Enzymklasse bekannt waren. Unter Verwendung von Organofluorophosphaten/Organofluorophosphonaten **40** oder **41** (→ Sarin, VX) konnte *Cravatt* so spezifisch Serinhydrolasen bzw. -proteasen markieren und nachfolgend charakterisieren.<sup>[294, 295]</sup> Zur Markierung von Cysteinproteasen wurden verschiedene Reaktivgruppen erprobt, wie z. B.  $\alpha$ -Halogen- (bzw. Acyloxy)methylketone **42** (in neueren Studien auch zum „Fischen“ von Nitrilasen genutzt)<sup>[296, 297]</sup>, Epoxy- und Vinylsulfone **43**.<sup>[298]</sup> Mit Hilfe spezieller  $\alpha$ -Fluorarylphosphonate wie **44** schließlich konnten Phosphatasen in *S. cerevisiae* spezifisch markiert und nachfolgend untersucht werden (Schema 28).<sup>[299]</sup>



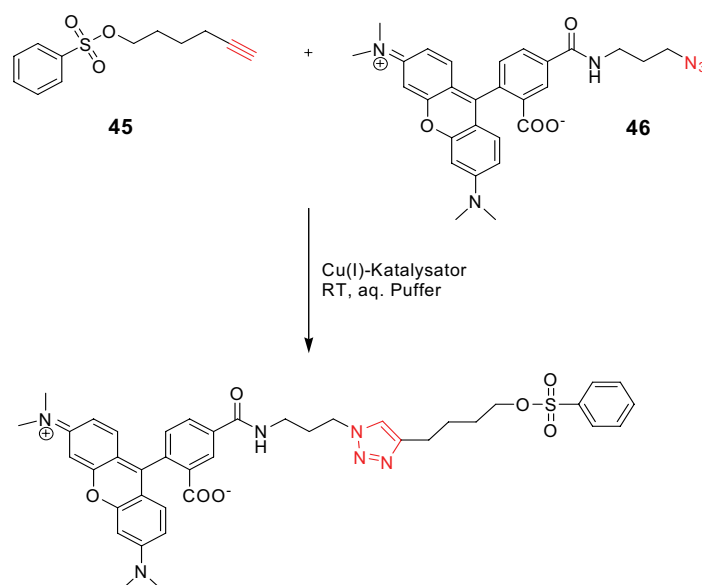
**Schema 28.** Zum ABPP verschiedener Proteasen und Phosphatasen eingesetzte Sonden. In grün die Reaktivgruppe, in schwarz der Linker und in rot die Reporterfunktion.

Als Linker fungiert meistens eine Alkylkette wie im Fall von **40** und **41**, oder auch eine von Oligoethylenglykolen abgeleitete Kette wie bei **44**. Sehr oft wurden auch peptidische Gerüste eingesetzt, besonders bei der Markierung proteolytischer Enzyme, wie im Falle von Molekül **43**. Die Hauptfunktion des Linkers ist die Separation von Reaktiv- und Reportergruppe, die Erhöhung der Affinität zu den Substraten und eine bessere Löslichkeit der Sonden in den verwendeten, wässrigen Puffern. Die Aufgabe der Reportergruppe ihrerseits ist es, die kovalente Markierung der gewünschten Enzyme bei der späteren Auftrennung im Gel detektierbar zu machen und/oder die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der markierten Proteine zu ermöglichen. Zur Detektion werden sehr oft Fluoreszenzfarbstoffe wie das Fluorescein (6-FAM, im Falle von **41**), Rhodamin oder Cyaninfarbstoffe wie Cy3<sup>TM</sup> (im Falle von **42**, **43** und **44**) verwendet, über deren spezifische Emission nach dem Versuch die „gefischten“ Proteine sichtbar werden. Sehr gerne werden auch radioaktive Atome eingeführt, häufig ist die Markierung mit <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H oder <sup>32</sup>P. Die radioaktive Strahlung kann auf dem Polyacrylamidgel mittels eines *PhosphorImagers* ausgelesen werden, was eine der empfindlichsten Methoden zur Detektion der markierten Proteine darstellt.

Zur Aufreinigung wird sehr oft ein Biotinkonjugat wie in Molekül **40** verwendet. Hierbei macht man sich zunutze, dass Biotin eine extrem große Affinität zu Avidin bzw. Streptavidin besitzt, die Wechselwirkung von Biotin zu Avidin ist mit einer Dissoziationskonstante von  $K_D = 10^{-15}$  M die stärkste bekannte Protein-Substratwechselwirkung überhaupt.<sup>[300]</sup> Da eine Vielzahl von Polymermatrices erhältlich sind, welche Avidin bzw. Streptavidin-beschichtet sind (z. B. Agarose, Sepharose, Polystyrol oder magnetische Partikel), kann man durch einfaches Inkubieren der Ansätze mit immobilisiertem Avidin alle biotinylierten Proteine herausziehen (ein sogenannter *pull down-Assay*), waschen und anschließend wieder eluieren. Für die folgende SDS-PAGE ist dann kein besonderes Label (Fluoreszenz etc.) nötig, da alle nicht markierten Proteine bereits eliminiert wurden. Sehr häufig kommen aber auch Sonden vor, in denen sowohl ein Fluoreszenz- als auch ein Biotinlabel vorliegt, da so eine größere Sensitivität im Nachweis der Proteine erzielt werden kann. Momentan wird intensiv versucht, die Reportergruppen so zu gestalten, dass die nach erfolgter Detektion und Reinigung abgespalten werden können, da sie manchmal die nachfolgende MS-Untersuchung stören.<sup>[301]</sup> Hierzu werden besonders Disulfid- oder Azobenzolverknüpfungen diskutiert, welche unter relativ milden Bedingungen reaktiv gespalten werden können.<sup>[302]</sup>

Da die Reportergruppen oftmals sehr groß sind (500-1000 Da), kam es vor allem bei *in vivo*-Experimenten zu Problemen, sowohl mit der Aufnahme in die Zellen als auch mit der biologischen Aktivität der Gruppen. Von der Gruppe *Cravatt* wurde daher eine Methode entwickelt, die eine nachträgliche Anknüpfung der Reportergruppe ermöglichte.<sup>[303,304]</sup> Hierzu versahen sie die Sonden mit einer endständigen Alkinfunktion, an die nach Abschluss des Versuches über eine kupferkatalysierte *Huisgen-Cycloaddition*<sup>[305]</sup> der entsprechende Fluoreszenzfarbstoff bzw. das Biotin als Azidbaustein angekuppelt wurde. Auf diese Weise konnte quantitative

Umsetzung unter sehr milden, biologisch verträglichen Bedingungen erreicht werden. Ein Beispiel für diesen *Click*-chemischen Ansatz ist in Schema 29 anhand der Umsetzung eines Arylsulfonats **45** mit Rhodaminazid **46** dargestellt. In den Sonden der neueren Generation ist dieser Ansatz mittlerweile die Methode der Wahl, zumal er eine größere Diversität an möglichen Reportergruppen erlaubt.



**Schema 29.** Nachträgliche Verknüpfung von Reaktio- und Reportergruppe über Click-Chemie.

Wie bereits anhand der obigen Beispiele deutlich wird, ist diese Methode in der hier beschriebenen Form auf Enzymklassen beschränkt, für die spezifische Suizidinhibitoren bekannt sind, was im wesentlichen auf die Familie der Hydrolasen und hier besonders auf die Serin- und Cysteinproteasen, Fettsäureamidhydrolasen bzw. Tyrosinphosphatasen oder Glycosidasen, aber auch auf bestimmte Oxidoreduktasen zutrifft, für die sich aber außer den angegebenen noch viele weitere Beispiele in der Literatur finden.<sup>[306-310]</sup> Für einen genaueren Überblick sei hier aus thematischen und Platzgründen auf den exzellenten Übersichtsartikel von *Cra-vatt* verwiesen, der die Entwicklungen in diesem Bereich umfassend beleuchtet.<sup>[311]</sup>

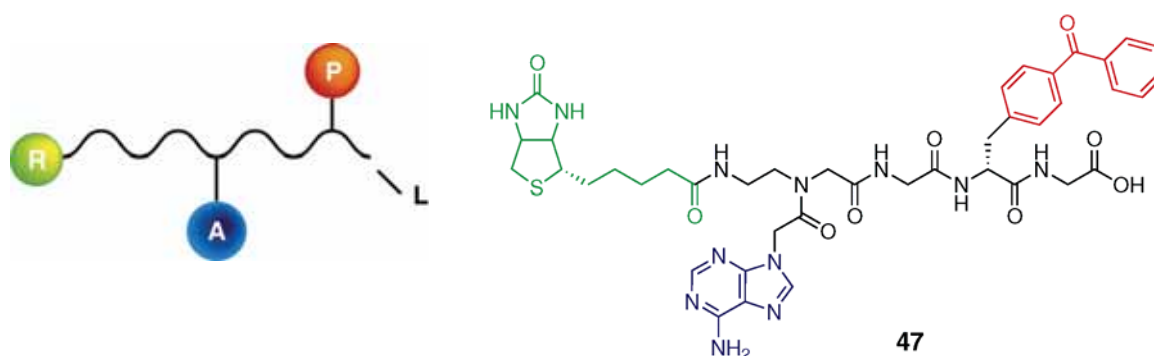
### 1.3.2 Das *photoaffinity labeling* – kovalente Markierung über Reaktion mit photolabilen Substraten

Um auch Proteine anderer Funktion kovalent markieren zu können, musste die Methode des *affinity-based protein profilings* dahingehend erweitert werden, dass auch nicht-kovalente Enzym-Substratwechselwirkungen genutzt werden können. Zu diesem Zweck muss aber neben der Gruppe, welche die Affinität zum Protein herstellt (das kann beispielsweise eine be-

stimmte kurze Peptid- oder Nukleinsäuresequenz sein), in relativer Nähe eine gesonderte Reaktivgruppe vorhanden sein. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um eine lichtspaltbare Funktion, die ein hochreaktives Intermediat, ein Radikal, Nitren, Carben oder Carbeniumion freisetzen kann, das dann mit dem zu markierenden Protein reagiert und eine kovalente Verknüpfung ausbildet. Da hier also sowohl eine Affinitätsgruppe als auch eine photolabile Reaktivgruppe genutzt werden, bezeichnet man diese Methode als „*photoaffinity labeling*“, erstmals ausgeführt von *Westheimer* im Jahr 1962.<sup>[312]</sup> Neben der Suche nach Proteinen bestimmter Funktion wird sie sehr oft benutzt, um das katalytische Zentrum bzw. die für die Katalyse entscheidenden Reste zu identifizieren.<sup>[313, 314]</sup> Eine Sonde für das *photoaffinity labeling* muss demnach folgende Bestandteile enthalten:

1. Einen Linker, der das Gerüst des Moleküls bildet.
2. Eine photoaktivierbare Reaktivgruppe
3. Eine Funktion mit hoher Affinität zum gesuchten Protein
4. Eine Reporterfunktion zur Detektion und Aufreinigung der markierten Proteine

Eine solche Sonde ist in Abb. 12 links schematisch dargestellt, daneben befindet sich ein reales Beispiel, das von *Hindi* zum „Fischen“ von Proteinen in humanen Zellkernextrakten verwendetes Molekül **47**.<sup>[315]</sup>



**Abb. 12.** links) Schematischer Aufbau einer Sonde zum Photoaffinity labeling, R= Reportergruppe, A = Affinitätsgruppe, P = photoaktivierbare Reaktivgruppe, L = Linker; rechts) von *Hindi* zur Untersuchung humaner Zellkernextrakte eingesetzte Sonde **47**, grün = Reportergruppe, blau = Affinitätsgruppe, rot = photoaktivierbare Reaktivgruppe, schwarz = Linker.

Als Reporterfunktion kommen alle Gruppen in Frage, die oben bereits angesprochen wurden (im vorliegenden Fall Biotin), gleiches gilt für den Linker. Die Affinitätsgruppe richtet sich nach der Substratspezifität der zu untersuchenden Proteine, hier kommen sehr viele Funktionalitäten in Frage. Der Unterschied liegt nur in der Verwendung der photolabilen

Gruppe als *warhead*. Das *Proteomics*-Experiment muss folglich nur um einen Belichtungsschritt erweitert werden, wie in Abb. 13 dargestellt. Die weitere Aufarbeitung, Auftrennung der markierten Proteine und MS-Charakterisierung der proteolytisch zerlegten Enzyme erfolgt dann wiederum analog zu den oben bereits genannten Vorgehensweisen.<sup>[283, 316]</sup>

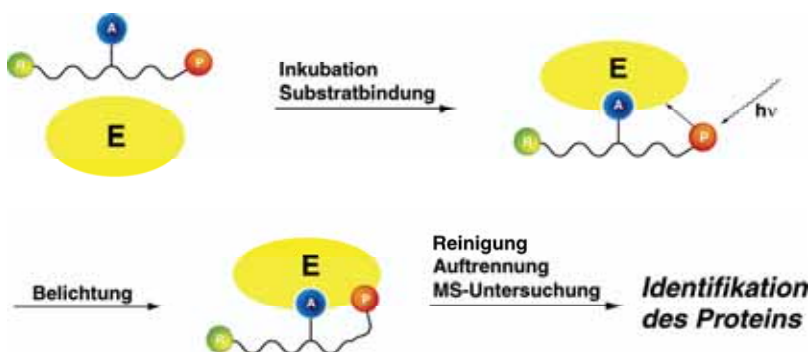


Abb. 13. Vereinfachte Darstellung eines Photoaffinity labeling-Experimentes.

In den nachfolgenden Abschnitten sollen nun die am häufigsten eingesetzten photoaktivierbaren Reaktivgruppen (auch als Fänger oder *Crosslinker* bezeichnet) und ihre Charakteristika vorgestellt und jeweils einige interessante Beispiele für ihre Einsatzmöglichkeiten gegeben werden.<sup>[317, 318]</sup>

### Radikalerzeugende Bausteine

Radikale sind prinzipiell ideale Intermediate für das *photoaffinity labeling*. Sie können H-Atome von praktisch jeder Position abstrahieren, zeigen größere Reaktivität gegenüber C-H-Bindungen als Nitrene und neigen in geringerem Maße zu intramolekularen Umlagerungen wie Carbene. Allerdings können verschiedene Nebenreaktionen die Effektivität des *Crosslinkings* stark herabsetzen, zum Beispiel intramolekulare H-Abstraktion, Rückreaktion des initialen Radikalpaars (siehe Abb. 14) oder Einelektronentransfer, durch den langlebige geladene Spezies entstehen, die zu unerwünschten Nukleophil/Elektrophil-Reaktionen führen können.

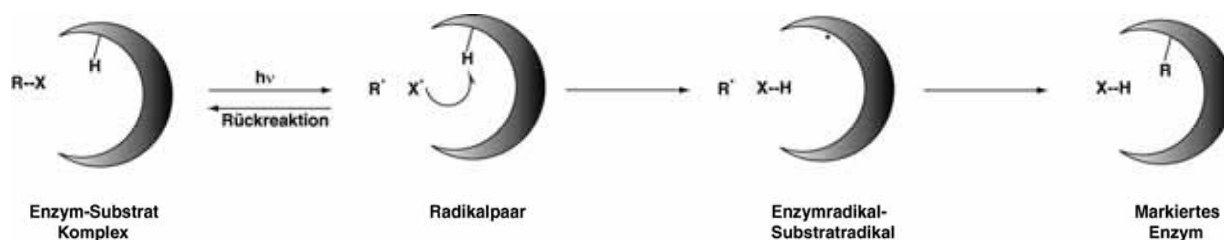
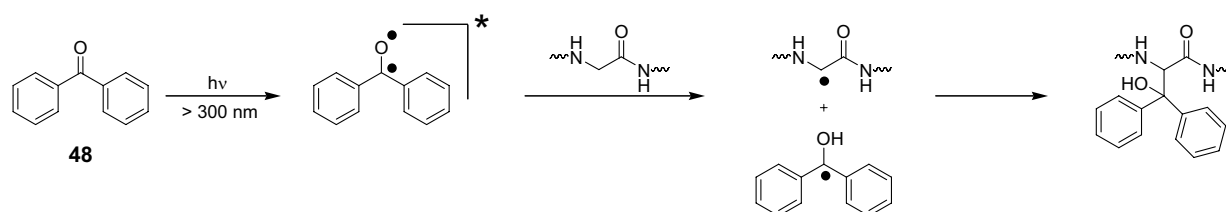


Abb. 14. Reaktion eines photogenerierten Radikals mit einem zu markierenden Enzym.



Wie Abb. 14 zeigt, können aus einem geeigneten Substrat photogenerierte Radikale H-Atome vom Enzym abstrahieren. Wenn das Substratradikal nicht abdiffundiert, kann es sich kovalent mit dem Enzym verknüpfen, wodurch ähnliche Produkte wie bei der Insertion von Nitrenen und Carbenen in C-H-Bindungen (siehe nachfolgende Abschnitte) entstehen. Interessant für hohe Ausbeuten bei der Radikalkupplung ist hierbei die geringe Reaktivität gegenüber Wasser und sonstigen üblichen Lösungsmitteln ( $\leftrightarrow$  Carbene, Nitrene).<sup>[319]</sup>

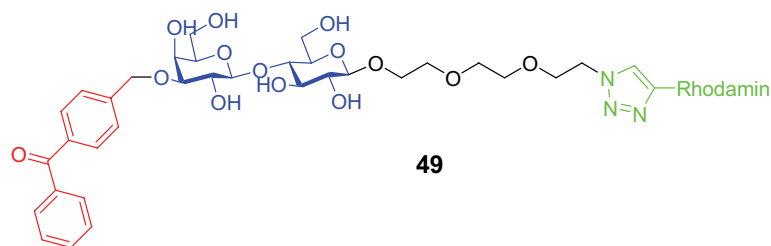
Der mit Abstand am häufigsten für diese Art von *Labeling* eingesetzte Baustein ist Benzophenon **48**, dessen Eignung zur C-H-Abstraktion bereits in den 60er Jahren untersucht wurde.<sup>[320, 321]</sup> Studien von *Galardy* in den frühen 70er Jahren zeigten dann, dass der durch Belichtung  $\lambda > 300$  nm gebildete langlebige Benzophenontriplettzustand selektiv  $\alpha$ -H-Atome von Aminosäurederivaten abstrahieren konnte.<sup>[322]</sup> Der allgemein akzeptierte Mechanismus für die Kupplung von **48** an Aminosäuren bzw. Proteine ist in Schema 30 dargestellt.<sup>[323]</sup>



**Schema 30.** Mechanismus der kovalenten Addition von Benzophenon **48** an Proteine, hier an Glycin.

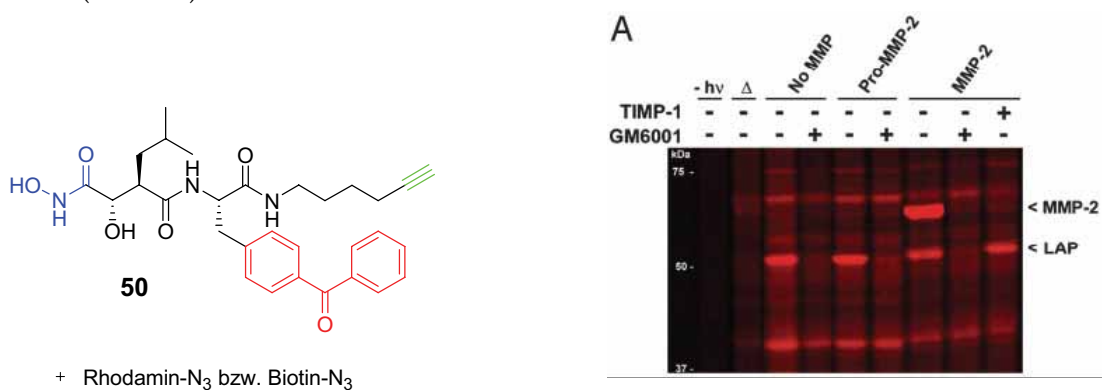
Neben den  $\alpha$ -H-Atomen können in folgender Abstufung auch andere Wasserstoffatome reagieren:  $\alpha$  zu Stickstoff >  $\alpha$  zu Schwefel > Methin > allylisch > Methylen > Methyl. Die Geschwindigkeitskonstanten liegen im Bereich von  $k = 10^5 \text{ s}^{-1}$ .<sup>[324]</sup> Da zudem die Lebensdauer des Tripletzustandes ca. 300 ns beträgt, ist eine Abdiffusion reaktiver Intermediate unwahrscheinlich, was zu hohen Markierungsausbeuten führt.<sup>[325]</sup> Benzophenonderivate konnten über Substituenten in den aromatischen Ringen in eine Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen wie Peptide, Oligonukleotide und Oligosaccharide eingebaut werden. Daher sollen hier nur einige wenige, repräsentative Beispiele vorgestellt werden.

*Pieters* et al. stellten eine Sonde auf Basis eines Disaccharids vor, genauer gesagt eines  $\beta$ -Digalaktosids.<sup>[326]</sup> Solche Zuckereinheiten werden von der Proteinfamilie der Lectine gebunden, welche eine wichtige Rolle in zellulären Erkennungsmechanismen spielen. Neben der für die Affinität zum Protein verantwortlichen Zuckereinheit ist das Benzophenon als Fänger und ein Rhodamin als Reportergruppe vorhanden. Dieses wird nach der von *Cravatt* vorgestellten Methode per *Click-Chemie* nach dem eigentlichen *Labeling*-Experiment eingeführt. Das Gesamtmolekül **49** ist in Schema 31 dargestellt.



**Schema 31.** Von Pieters zum Markieren von Lectinen verwendete Photosonde **49**.

Tatsächlich gelang es mit **49**, selektiv an bestimmte Vertreter der Lectinfamilie, speziell Galectin-1 und Galectin-3 zu binden. Diese konnten per SDS-PAGE aufgetrennt und über die Fluoreszenz des Rhodamins detektiert werden; hiernach konnten die gereinigten Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden. Cravatt et al. führten Experimente zum Fischen von Metalloproteasen aus, welche eine sehr umfangreiche und diverse Proteinfamilie darstellen, die an vielfältigen Prozessen von der Gewebedifferenzierung über die Prozessierung peptidischer Hormone bis zur Krebsentstehung beteiligt ist.<sup>[327]</sup> Hierfür verwendeten sie eine Sonde basierend auf dem bekannten Inhibitor *Marimastat*. Eine Hydroxamsäurefunktion sorgt hier für die Affinität zum Enzym, da die für die Katalyse entscheidenden Zinkionen mit Hydroxamaten stabile Chelatkomplexe bilden. Benzophenon fungierte als *Crosslinker*, als Reportergruppe diente Rhodamin oder Biotin, jeweils nach dem Experiment per *Click-Chemie* eingeführt (Abb. 15).

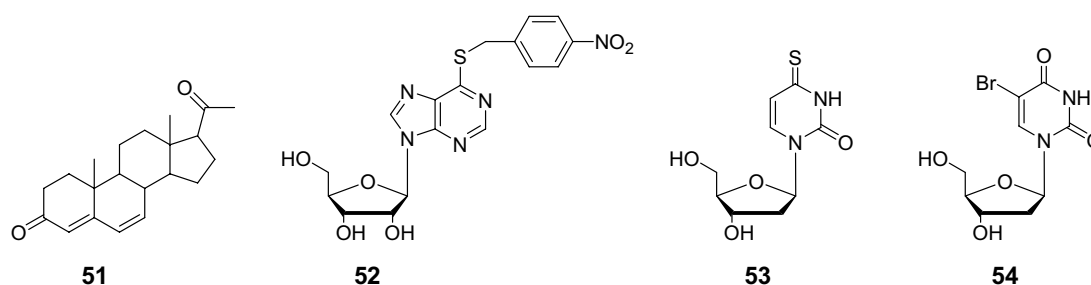


**Abb. 15.** links) von Cravatt verwendete Sonde **50**; rechts) Fluoreszenzaufnahme eines SDS-Gels nach Markierung von Mäusenierenlysat mit **50** in An- oder Abwesenheit gewisser Inhibitoren.<sup>[327]</sup>

In der Tat konnten mit der verwendeten Sonde **50** bestimmte Matrixmetalloproteasen (z. B. MMP-2) selektiv aus Mäusenierenlysat isoliert und identifiziert werden. Das Experiment wurde in einer nachfolgenden Arbeit von Sieber et al. ausgeweitet, indem er eine Bibliothek verschiedener, in der zentralen Aminosäuresequenz leicht verschiedener Sonden einsetzte (→ kombinatorischer Ansatz).<sup>[328]</sup> Mit dieser Methode konnten mehr als 20 Metalloproteasen isoliert und massenspektrometrisch identifiziert werden.

Ein interessantes Beispiel für den Einsatz von Benzophenon als *Crosslinker* in DNA durch Lippard wird im Abschnitt 1.3.3 diskutiert.

Neben Benzophenon werden – wenn auch wesentlich seltener – auch andere Radikalvorläufer verwendet, so z. B. das Steroid **51**, Benzylsulfide wie das Thionukleosid **52**, Thiopyrimidine wie **53** oder Halogenaromaten wie das häufig eingesetzte 5-Bromdesoxyuridin **54** (Schema 32).



**Schema 32.** Verschiedene neben Benzophenon eingesetzte Radikalvorläufermoleküle **51-54**.

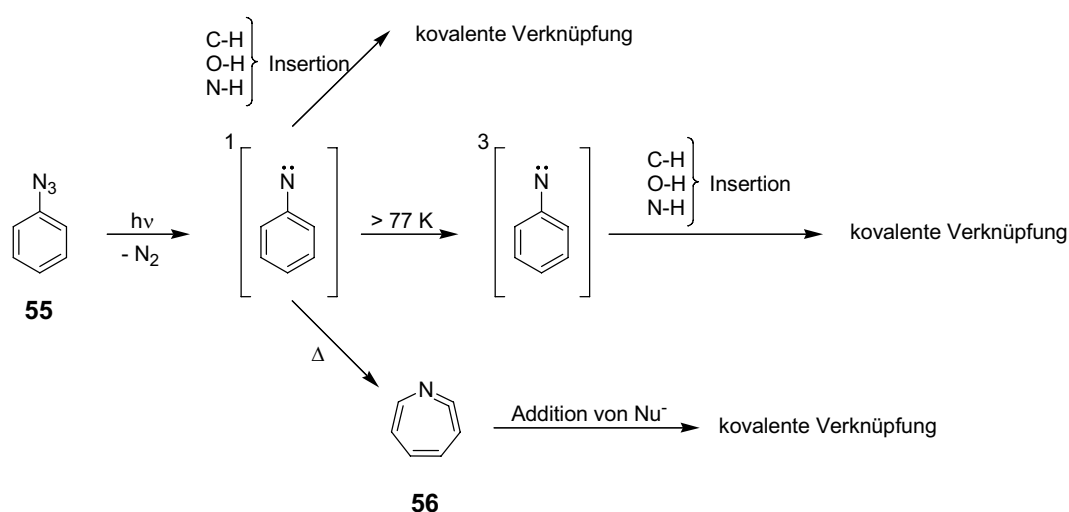
Mit Hilfe von **51**, welches analog zum Benzophenon durch Belichtung mit  $\lambda = 300$  nm in den Triplettzustand angeregt werden kann, konnte beispielsweise ein steroidbindendes Globulin markiert und ein bestimmter Tryptophanrest als Bindungsstelle ausgemacht werden.<sup>[329]</sup> **52** wurde verwendet, um in guten Ausbeuten das Membran-Nukleosid-Transportenzym zu „fischen“ und die Bindungsregion zu lokalisieren.<sup>[330]</sup> Untersuchungen zeigten, dass hier durch Belichtung mit  $\lambda = 320$  nm zunächst die Schwefel-Benzylbindung bricht.<sup>[331]</sup> Nach H-Abstraktion kombiniert das entstandene Thiylradikal dann mit dem gebildeten Enzymradikal zum gewünschten *Crosslink*. Thiopyrimidine wie **53** reagieren nach einem dem Benzophenon analogen Mechanismus.<sup>[332, 333]</sup> Aus dem angeregten Triplettzustand ( $\lambda = 340$  nm) kommt es zur H-Abstraktion mit nachfolgender Kupplung von Enzym- und Substratradikal. Beispiele für den Einsatz in DNA werden im folgenden Abschnitt 1.3.3 vorgestellt. Im Falle halogensubstituierter Aromaten wie **54** kommt es durch Belichtung mit  $\lambda = 254$  nm zur homolytischen Spaltung der C-Halogen-Bindung, das entstandene Arylradikal kuppelt dann zum wiederum über H-Abstraktion entstandenen Enzymradikal.<sup>[334, 335]</sup>

### Nitreneerzeugende Bausteine

Auch Nitrene sind potentiell gute, reaktive Intermediate für das *photoaffinity labeling*. Aufgrund ihrer guten, synthetischen Zugänglichkeit sind sie sogar die am häufigsten benutzte Spezies. Als Vorläufer werden dafür heutzutage nahezu ausschließlich substituierte Arylazide (1969 erstmals hierfür beschrieben)<sup>[336]</sup> verwendet, die in frühen Versuchen eingesetzten Acylazide bzw. Alkylazide werden aufgrund ihrer inhärenten Labilität und der großen Zahl

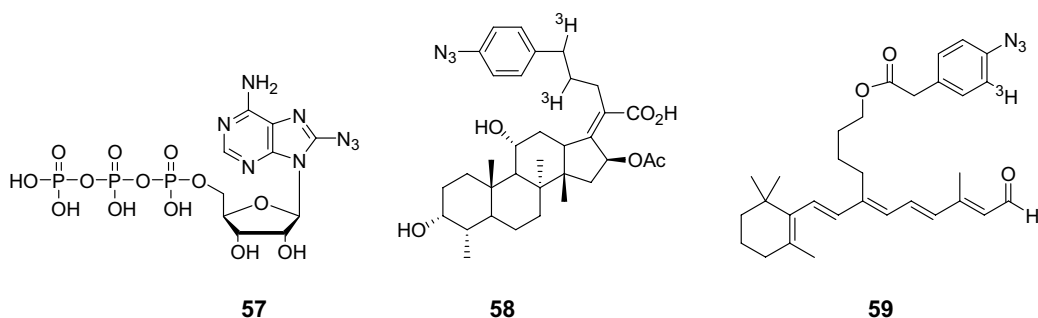
an unproduktiven Nebenreaktionen (z. B. *Curtius-Umlagerung* etc.) kaum noch verwendet.<sup>[337-</sup>

<sup>339]</sup> Der Mechanismus der photolytischen Spaltung unsubstituierter Phenylazide **55** ist in Schema 33 dargestellt.



**Schema 33.** Mechanismus der photolytischen Spaltung von Phenylaziden und Möglichkeiten der Reaktion mit potentiellen Substraten.

Das zunächst durch Belichtung mit  $\lambda = 254\text{ nm}$  gebildete Singulett-Nitren ist die aktivste Spezies, sie kann in jede Art von kovalenter Bindung mit hoher Geschwindigkeit (diffusionskontrolliert) insertieren. Bei Temperaturen über 77 K kann ein *Intersystem Crossing* zum Triplett-Grundzustand stattfinden, das so entstandene Nitren ist prinzipiell immer noch zur Insertion (über diradikalischen Mechanismus, siehe Benzophenon **48**) befähigt, ist aber aufgrund seiner Stabilität und langen Lebensdauer relativ reaktionsträge. Das Singulettnitren (Lebensdauer 10-100 ps) insertiert bei Raumtemperatur in sich selbst, es entsteht dabei das gespannte, ringerweiterte Ketenimin **56**, welches eine Vielzahl von Nucleophilen addieren kann.<sup>[340]</sup> Auch das Ketenimin **56** ist aber eher reaktionsträge, die Reaktionsgeschwindigkeit variiert sehr stark mit der Nucleophilie der angreifenden Aminosäure, wobei Cystein ca.  $10^6$ mal schneller reagiert als bsw. Glycin.<sup>[341]</sup> Die große Zahl an unproduktiven Reaktionswegen führt dazu, dass die Ausbeuten beim *Labeling* mit diesen Substraten zumeist unter 30 % liegen.<sup>[342]</sup> Erschwerend kommt hinzu, dass ein Teil der durch Insertion gebildeten Bindungen labil sind und bei der Aufarbeitung der Experimente oft wieder gebrochen werden.<sup>[343, 344]</sup> Die verwendete Wellenlänge von 254 nm ist darüber hinaus sehr energiereich und führt in biologischen Systemen zu Schäden. Außerdem sind Azide nicht stabil gegenüber in biologischen Puffern häufig anwesenden Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol oder  $\beta$ -Mercaptoethanol.<sup>[345]</sup> <sup>[346]</sup> Trotz der großen Zahl an Nachteilen wurden unsubstituierte Phenylazide häufig in biologischen Studien eingesetzt, einige Beispiele sind in Schema 34 abgebildet.

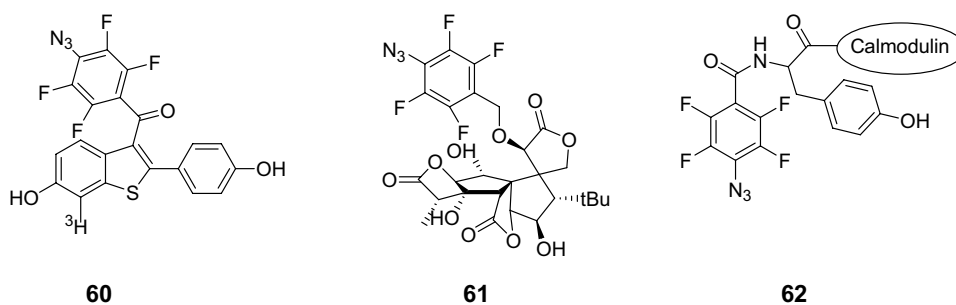


Schema 34. Zum Photoaffinity labeling eingesetzte Phenylazidderivate 57-59.

Mit Hilfe photolabiler ATP-Analoga wie des 8-Azidoadenosintriphosphats **57** konnten viele ATP-bindende bzw. umsetzende Enzyme untersucht werden, so z. B. der *recBCD*-Komplex aus *E. coli*, Fructose-1,6-bisphosphatase und Carbamoylphosphatsynthetase, in denen die katalytisch wichtigen Reste identifiziert werden konnten.<sup>[347-350]</sup> **58** stellt ein Analogon der *fusidic acid* dar, einem Antibiotikum, welches in Staphylokokken die Proteinbiosynthese hemmt. Mit **58** konnten hierfür wichtige Proteine identifiziert und die Bindungsstellen lokalisiert werden.<sup>[351]</sup> **59** wiederum, ein photolabiles Retinalderivat, wurde verwendet, um den Bindungsmodus in Bakteriorhodopsin näher zu beleuchten.<sup>[352]</sup>

Nach intensiven Studien konnte gezeigt werden, dass sich ein Teil der oben genannten Nachteile durch den Einbau elektronenziehender Substituenten in den Phenylring des Azids vermeiden lässt; denn hierdurch verschiebt sich die Absorption in den Bereich über 320 nm, die Lebensdauer des Singulett-Nitrens erhöht sich auf 1-10 ns, was mit einer erhöhten *Labeling*-Ausbeute einhergeht.<sup>[353-357]</sup> Die Bildung des Ketenimins **56** ist im Pentafluorphenylazid ca. 170fach gegenüber dem unsubstituierten Phenylazid verlangsamt, gleichzeitig reagiert es aber mit Nucleophilen wesentlich schneller (ca.  $10^8$ - $10^9$  s<sup>-1</sup>) als im unsubstituierten Fall, was ebenfalls zu einer erhöhten Markierungsausbeute beiträgt.<sup>[358, 359]</sup> Diese Vorteile führten dazu, dass sich tetrafluorierte Arylazide seit ersten Versuchen 1989 sehr schnell als die Nitrenvorläufer der Wahl für *photoaffinity labeling*-Experimente durchgesetzt haben.

Einige wichtige Beispiele sind nachfolgend dargestellt (Schema 35), andere werden im folgenden Abschnitt 1.3.3 in Verbindung mit dem Einsatz von DNA als Substrat vorgestellt.

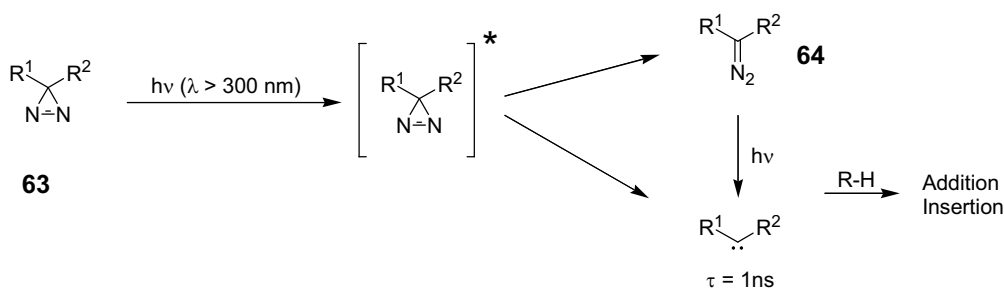


Schema 35. Beispiele für Sondenmoleküle auf Basis von Tetrafluorophenylaziden 60-62.

*Katzenellenbogen* verwendete den vom bekannten Wirkstoff *Tamoxifen* abgeleiteten Baustein **60**, um in Zellysat aus Mäuseuterus spezifisch den Östrogen-Rezeptor zu markieren. Später gelang ihm dies auch in menschlichen Zellen unter Verwendung verfeinerter Sonden.<sup>[360, 361]</sup> **61** ist ein Derivat des Gingkolids, einer Klasse von Naturstoffen mit hohem neuropharmakologischen Potential. **61** wurde hier dazu verwendet, Wechselwirkungen mit Neurorezeptoren wie dem *platelet-activating-Factor (PAF)* zu untersuchen.<sup>[362]</sup> **62** schließlich stellt ein photoaktives Konjugat des Calmodulins dar. Mit seiner Hilfe wurde die Einwirkung des Calcium-sensitiven Calmodulins auf die  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in Rindererythrozyten verfolgt. Die Bedeutung von Calmodulin als Ca-sensitives Peptidhormon konnte so untermauert werden.<sup>[363]</sup>

### Carbenerzeugende Bausteine

Carbene stellen aufgrund ihrer inhärenten großen Reaktivität hervorragende Intermediate zum *photoaffinity labeling* dar. Als Vorläufer wurden in den ersten Jahren hauptsächlich verschieden substituierte  $\alpha$ -Diazoketone und -ester eingesetzt.<sup>[312, 364, 365]</sup> Aufgrund einer hohen Zahl unerwünschter Nebenreaktionen (*Wolff-Umlagerung* etc.) sind diese aber quasi vollständig durch Diazirine verdrängt worden. Diazirine mit ihrem markanten Dreiring wurden erstmals in den frühen 70er Jahren von *Knowles* und *Smith* als gut handhabbare Carbenvorläufer vorgeschlagen.<sup>[366]</sup> Der Mechanismus der photoinduzierten Spaltung ist in Schema 36 dargestellt. Nach Lichtanregung  $\lambda = 300\text{-}350\text{ nm}$  entsteht aus **63** entweder unter Stickstoffabspaltung das Carben, welches mit einer Lebensdauer von ca. 1 ns sehr schnell unter Addition bzw. Insertion in jegliche kovalente Bindung abreagiert, oder es findet eine Umlagerung zur Diazoverbindung **64** statt.<sup>[367]</sup> Letzterer Weg kann bis zu 30 % ausmachen und ist unvorteilhaft, da **64** eine sehr lange Lebensdauer hat und durch spätere photochemische oder chemische (Dunkelreaktionen) Zersetzung zu unspezifischer Markierung führt.<sup>[368]</sup>

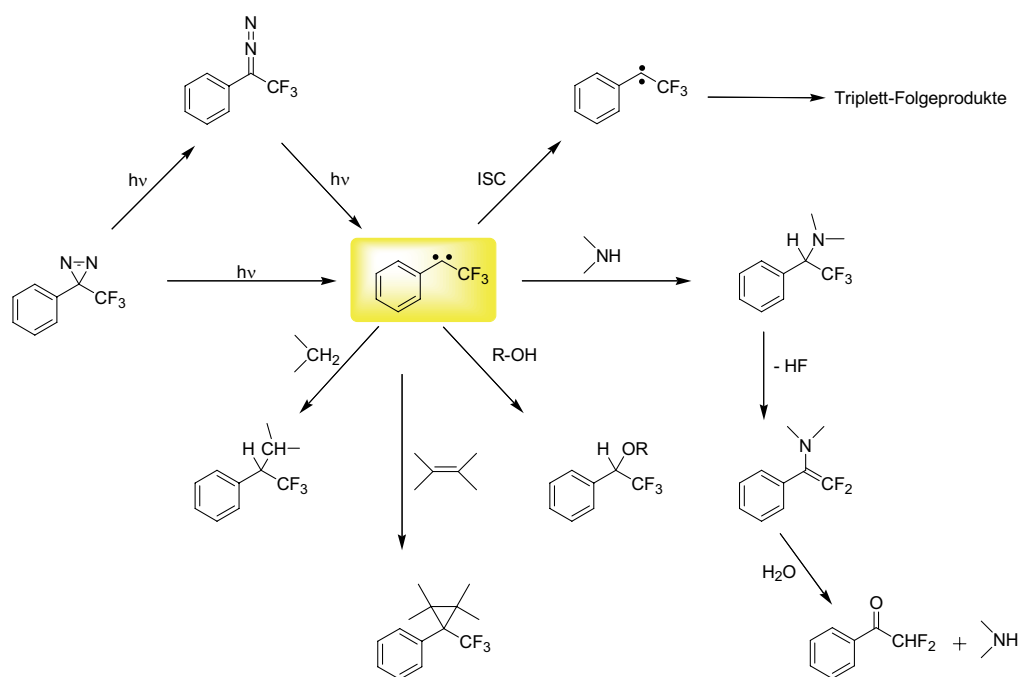


**Schema 36.** Mechanismus der lichtinduzierten Spaltung von Diazirinen.  $R^1, R^2 = \text{Aryl, Alkyl, H}$ .

Das Wechselspiel zwischen Diazirin, Diazoverbindung und Carben ist noch immer nicht gut untersucht und wird zudem durch Singulett/Triplett-Überlegungen verkompliziert.

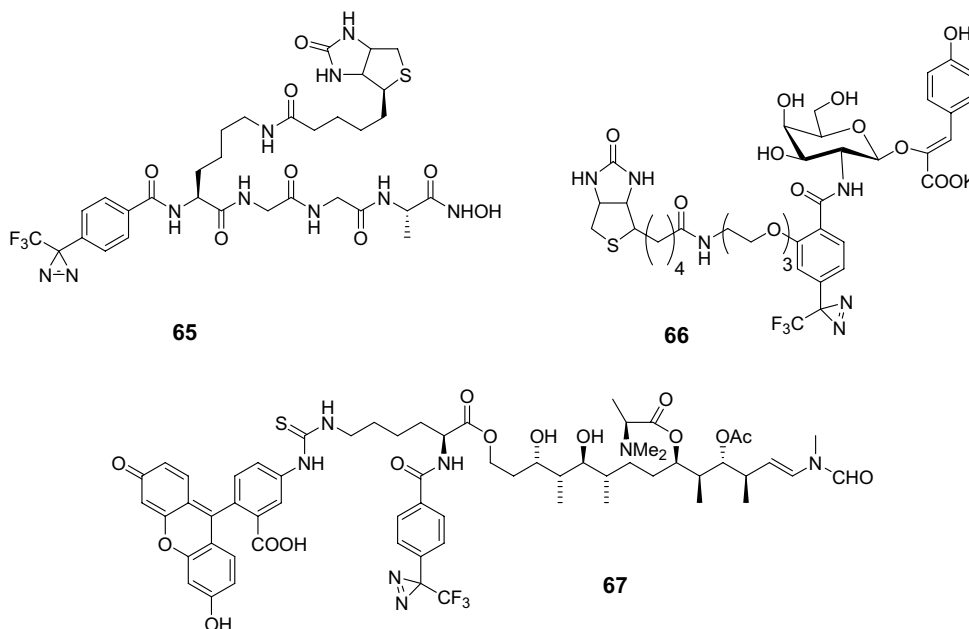
Vorteilhaft ist in jedem Fall die biologisch gut verträgliche Spaltungswellenlänge ( $\lambda \cong 350$  nm), die hervorragende chemische Stabilität, z. B. gegenüber Reduktionsmitteln, Metallen und erhöhten Temperaturen ( $\leftrightarrow$  Azide) und der geringe sterische Anspruch der Diazirinegruppe, der Einbau in verschiedenste Arten biologischer Moleküle zuließ.<sup>[369-371]</sup> Sehr verbreitet war, auch aufgrund der hohen Lipophilie der Diazirineinheit, der Einbau in Fettsäuren zur Untersuchung des Fettsäureauf- bzw. abbaus. So konnte ein Fettsäurebindungsprotein unter Verwendung von Diazirin-substituiertem Natriumoctadecanoat in guter Ausbeute gefangen werden.<sup>[372]</sup>

Um das Hauptproblem der Diazirine, die Umlagerung zur Diazoverbindung und das damit verbundene unspezifische *Labeling* zurückzudrängen, wurden von Brunner ab 1980 Aryltrifluormethyldiazirine als überlegene Carben-*Precursor* eingeführt.<sup>[373, 374]</sup> Diese Bausteine zeichnen sich zunächst durch die höhere Carbenlebensdauer (ca. 10 ns) aus, die zu besseren Ausbeuten aufgrund geringerer Reaktivität mit dem Solvens führt.<sup>[375, 376]</sup> Zudem ist die Umlagerung zur Diazoform hier aufgrund der stark elektronenziehenden Fluoratome wesentlich ungünstiger; einmal entstanden ist diese dann aber so stabil, dass Dunkelreaktionen, die zu unspezifischem *Labeling* führen, weitgehend auszuschließen sind. Das weitere „Schicksal“ von Aryltrifluormethyldiazirinen nach Belichtung zeigt Schema 37. Aus diesem Schema geht auch einer der wenigen Nachteile dieser Stoffklasse hervor, nämlich die Reversibilität der Carbeninsertion in N-H-Bindungen; diese rührt daher, dass das Primärprodukt HF eliminiert und das entstehende Enamin von Wasser hydrolysiert wird. Dies führt zu leichten Einbußen in der Gesamtmarkierungsausbeute.<sup>[377]</sup> Dennoch stellen Aryltrifluormethyldiazirine im Rahmen der für ein gutes *photoaffinity labeling* erforderlichen Kriterien die mit Abstand günstigsten photolabilen Reaktivgruppen dar.<sup>[378, 379]</sup> Sie konnten in alle Klassen biologisch relevanter Moleküle eingeführt werden und liefern routinemäßig Markierungsausbeuten bis  $> 70$  %.<sup>[377, 380-386]</sup>



**Schema 37.** Photochemische Zersetzung von Aryltrifluormethyldiazirinen und Reaktionsmöglichkeiten der gebildeten Carbene.

Einige interessante Einsatzmöglichkeiten der Stoffklasse zeigt Schema 38.



**Schema 38.** Einige Beispiele für Aryltrifluormethyldiazirin-enthaltende Sonden.

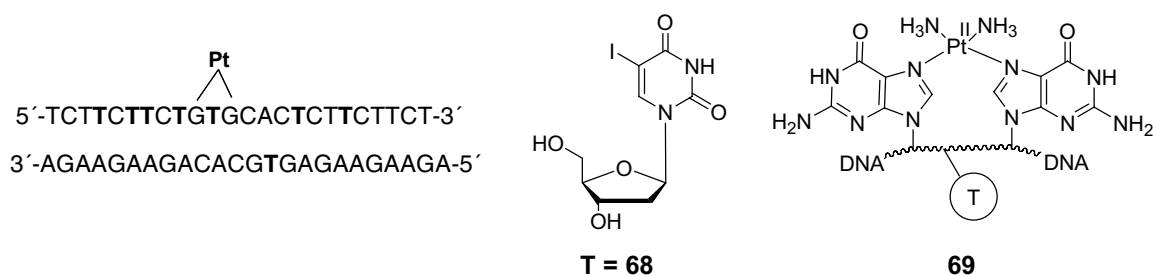
Verbindung **65** wurde von Yao zum *Labeln* von Metalloproteasen verwendet.<sup>[387]</sup> Wie bei *Cra-vatt* dient hier ein Hydroxamat zum Komplexieren der zentralen Zinkionen. So konnten aus Hefezelllysaten bis zu 20 verschiedene Metalloproteasen isoliert und identifiziert werden. **66**



stellt ein Analogon des Natriumlespedats dar, das beispielsweise in Mimosen für die zeitabhängige Bewegung der Blätter verantwortlich ist. Durch *Labeling*-Experimente konnten in *Cassia mimosoides*-Zelllysaten spezifisch zwei Bindungsproteine markiert werden, die zur Zeit massenspektrometrisch charakterisiert werden.<sup>[388]</sup> **67** ist ein photolabiles Analogon der Seitenkette des cytotoxischen und antikanzerogenen Makrolids Aplyronin A aus dem Seehasen *Aplysia kurodai*.<sup>[389]</sup> Die Substanz behindert die Polymerisation von Actin im Cytoskelett. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte erstmals eine Wechselwirkung des Aplyronins mit Actin direkt veranschaulicht und die Bindungsregion lokalisiert werden.

### 1.3.3 DNA als Substrat in *photoaffinity labeling*-Experimenten

Im Gegensatz zur Verwendung von niedermolekularen Sonden, für die es unzählige Beispiele gibt, sind Oligonukleotide nur selten zum *photoaffinity labeling* DNA bindender Proteine eingesetzt worden; noch seltener sind Beispiele, in denen tatsächlich mit modifizierten DNA-Strängen in Zelllysaten nach interessanten *Targets* gefischt wurde.<sup>[390]</sup> Ein Grund hierfür war lange Zeit das Fehlen geeigneter photolabiler Precursor, die in DNA eingebaut werden konnten. Die ersten Experimente wurden unter Verwendung von 5-Bromdesoxyuridin **54**, 5-Ioddesoxyuridin **68** bzw. Thiopyrimidinen wie **53** durchgeführt.<sup>[332, 334]</sup> In einer Arbeit von Krauss wurde im Jahr 1999 die Interaktion von DNA-Duplexen, die eine 1,3-d(GTG)-Cisplatinmodifikation **69** enthielten, mit der humanen Nukleotidexzisionsreparaturmaschinerie, besonders RPA (*replication protein A*) und XPA (*Xeroderma pigmentosum A complementing protein*) untersucht.<sup>[391]</sup> Die Stränge waren <sup>32</sup>P-markiert, als Radikalvorläufer wurde 5-Ioddesoxyuridin **68** verwendet, das an verschiedenen Positionen im Duplex eingebaut wurde (Schema 39).

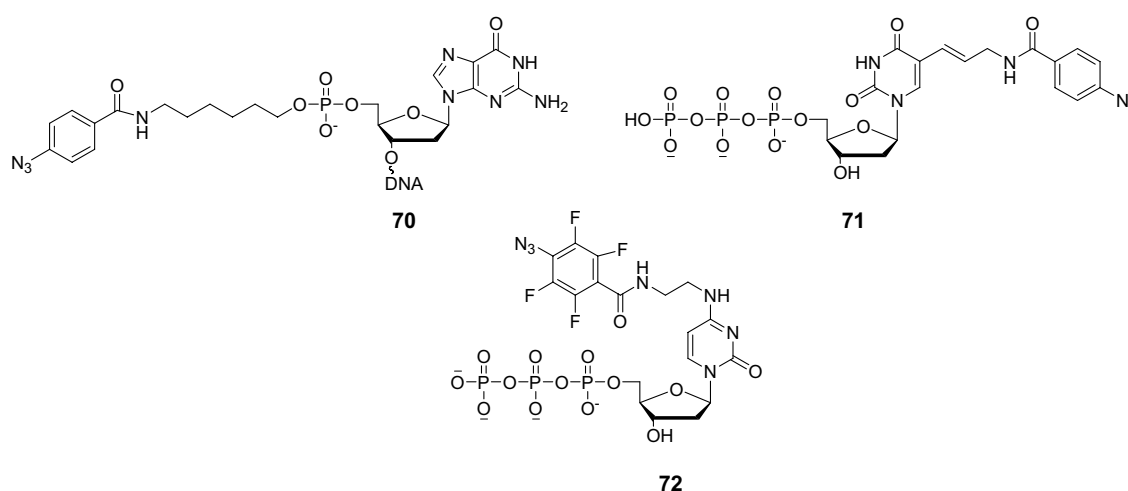


**Schema 39.** Von Krauss verwendete DNA-Duplexe. *T* indiziert die getesteten Positionen für das 5-Ioddesoxyuridin **68**, rechts eine schematische Darstellung des 1,3-d(GTG)-Cisplatin Schadens **69**.

Bei Belichtung mit  $\lambda = 312$  nm (bis zu 5 Stunden!) in Anwesenheit von RPA und XPA konnten je nach Position des *Catchers* Markierungsausbeuten zwischen 10-60 % erreicht werden. Aus der Verteilung der Ausbeuten konnte geschlossen werden, dass die 70 kDa-Unter-

einheit von RPA den geschädigten Strang auf der 5'-Seite des Schadens kontaktiert; ferner wurde das Vorhandensein eines Komplexes definierter Geometrie zwischen RPA und dem 1,3-d(GTG)-Schaden angenommen. Darüber hinaus wurde die Bildung eines stabilen XPA-RPA-Komplexes auf der Cisplatin-modifizierten DNA festgestellt.

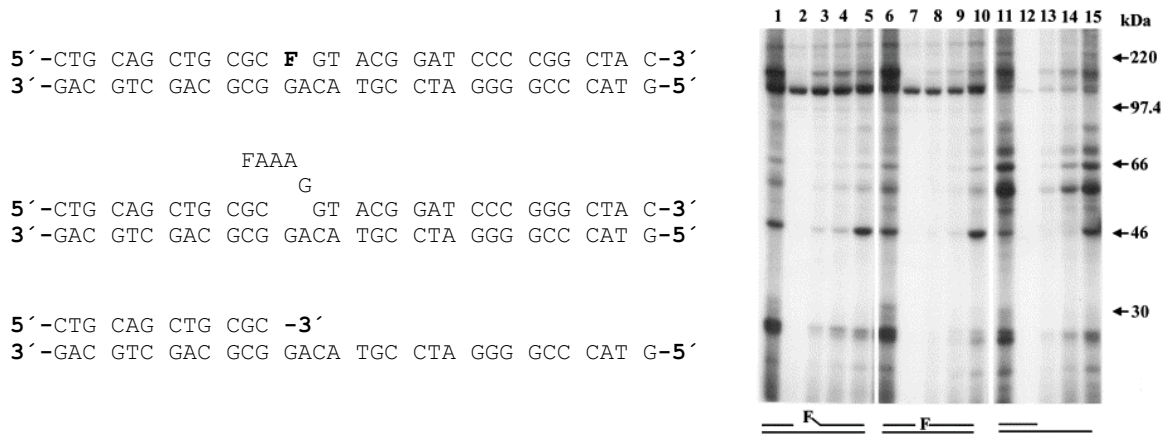
Die Verwendung Phenylazid-enthaltender Bausteine in DNA wurde lange Zeit dadurch limitiert, dass die Azidfunktion gegenüber der P(III)-Chemie in der Festphasen-DNA-Synthese nicht stabil war. Die einzigen Einbaumöglichkeiten waren entweder postsynthetische Modifikation (über Aktivesterkupplung mit aminmodifizierter DNA), die oftmals unter sehr schlechten Ausbeuten leidet, oder enzymatischer Einbau azidmodifizierter dNTPs, was Ort und Anzahl der einzubauenden Modifikationen stark einschränkte. Einige Beispiele für derartige Bausteine sind in Schema 40 abgebildet.



**Schema 40.** Zum photoaffinity labeling in DNA verwendete Azidbausteine 70-72.

70 wurde durch Kupplung von *p*-Azidobenzoesäure-NHS-Ester an aminmodifizierte DNA hergestellt und wurde von Cooperman zur Untersuchung der Interaktionen der ribosomalen 16 S RNA mit den benachbarten Komponenten in der 30 S Untereinheit des Ribosoms verwendet.<sup>[392]</sup> 71 konnte von Bartholomew enzymatisch in verschiedenen Positionen in ein *S. cerevisiae* tRNA<sup>Tyr</sup>-Gen eingebaut werden.<sup>[393, 394]</sup> Hiermit wurde die Struktur des hochkomplexen Transkriptionsfaktors TF IIIC (> 300 kDa) untersucht und verschiedene, transkriptionsrelevante Untereinheiten identifiziert.<sup>[395]</sup> Von der Gruppe um Lavrik wurde enorme Pionierarbeit geleistet. Sie versahen in 1995 alle natürlichen dNTPs (z.B. 72) mit der überlegenen Tetrafluorphenylazidgruppe und inkorporierten diese in verschiedenste Oligonukleotide.<sup>[396, 397]</sup> Interessant war hierbei der Ansatz, die Polymerasen, welche den Einbau vornahmen, direkt kovalent zu markieren. Auf diese Weise untersuchten sie besonders an der Basenexzisionsreparatur beteiligte Proteine, so zum Beispiel die Polymerasen  $\beta$  und  $\lambda$ , wofür sie verschiedene DNA-Duplexe, z. B. mit *Nicks*, abasischen Stellen oder Überhängen verwendeten. Ferner wurden auch die Enzyme APE (*apurinic / apyrimidinic endonuclease*), FEN-1 (*flap endo-*

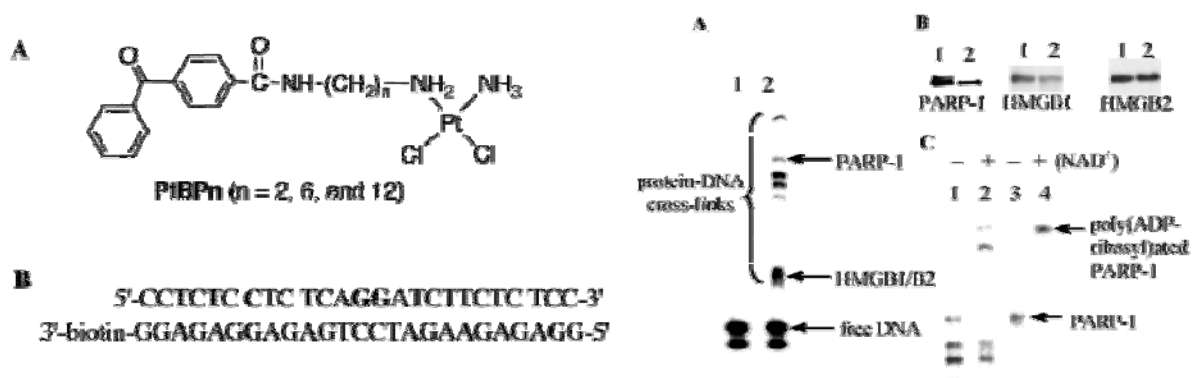
*nuclease-1*), PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) und XRCC1 (*X-ray cross complementing factor 1*) in die Experimente einbezogen.<sup>[398, 399]</sup> Es gelang dabei, das jeweils zuständige Enzym selektiv mit der spezifischen Sonde zu markieren, sowohl in einem Gemisch reiner Proteine als auch in einem Rinderhoden-Nuklearextrakt. (Abb. 16)<sup>[400]</sup>



**Abb. 16.** links) von Lavrik verwendete DNA-Sonden, rechts) Autoradiogramm eines SDS-Gels nach photoaffinity labeling der Sonden mit Rinder-Nuklearextrakt unter verschiedenen Bedingungen.<sup>[400]</sup> F bezeichnet eine abasische Stelle.

Mittlerweile konnte die Methode durch den Einsatz photosensibilisierender Additive bzw. noch empfindlicherer Azidbausteine auf Pyridinbasis weiter verfeinert werden.<sup>[401-404]</sup>

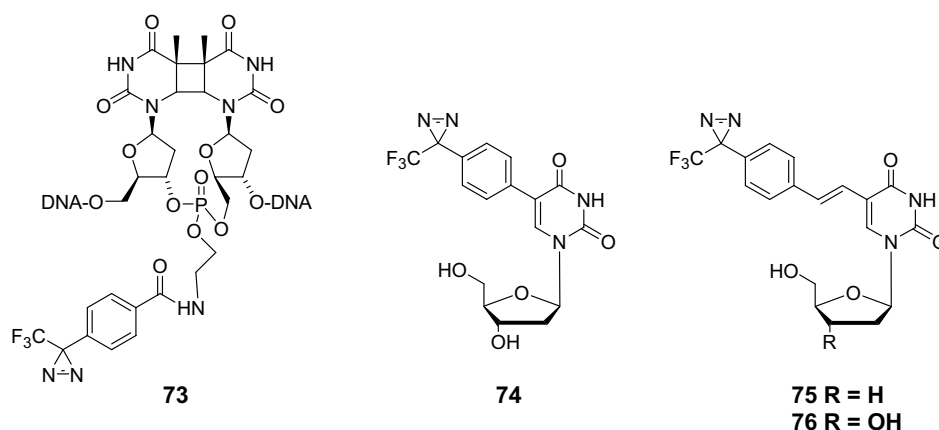
Für die Verwendung von Benzophenonderivaten als Photoreaktivgruppen in DNA gibt es nur wenige Beispiele. Das interessanteste Beispiel lieferte hier die Gruppe von Lippard im Jahr 2004.<sup>[405]</sup> Sie konstruierten DNA-Duplexe, welche einen G<sup>+</sup>G-Cisplatin Schaden, ein Biotin und eine <sup>32</sup>P-Markierung trugen. Ein Ammoniak-Ligand des Cisplatin wurde hierbei durch ein Benzophenon-substituiertes Alkylamin ersetzt. (Abb. 17)



**Abb. 17.** links A) Struktur von Lippards Cisplatinreagenz, B) verwendete DNA-Duplexstruktur; rechts A) Autoradiogramm des SDS-Gels nach photoaffinity labeling mit HeLa-Nuklearextrakt, B) Nachweis der markierten Proteine per Western Blot.<sup>[405]</sup>

Mit Hilfe der beschriebenen Sonde konnte *Lippard* aus HeLa-Nuklearextrakt selektiv PARP-1 und verschiedene *high mobility group binding*-Proteine (HMGB-1/2) markieren, über Biotin/Avidin-Affinitätsreinigung isolieren, radioaktiv detektieren und anschließend die Proteine über *Western Blot* bzw. MS/MS-*fingerprinting* identifizieren. Bis heute stellt dies das fortgeschrittenste Beispiel für *photoaffinity labeling* mit einer DNA-basierten Sonde dar; daher wird in dieser Arbeit in mehreren Punkten auf die hier etablierten Methoden aufgebaut.

Auch Aryltrifluormethyldiazirine wurden als photolabile Reaktivgruppen in DNA eingebaut.<sup>[406, 407]</sup> Trotz der herausragenden Eigenschaften dieser Stoffe, gibt es aber immer noch relativ gesehen sehr wenige Beispiele, wohl aufgrund des im Vergleich zu den anderen beschriebenen Verbindungen schwierigeren Synthesewegs. *Ohtsuka* verwendete 1991 ein diazirinmodifiziertes T=T-Dimer **73**, welches er im DNA-Duplex durch postsynthetische Kupplung erzeugte (Schema 41); hiermit konnte er das an der Reparatur dieser Photoschäden beteiligte Enzym T4 Endonuklease V (T4 endo V) kovalent verknüpfen, und erste Aussagen über die Topologie der DNA-Bindungsregion treffen.<sup>[408]</sup>



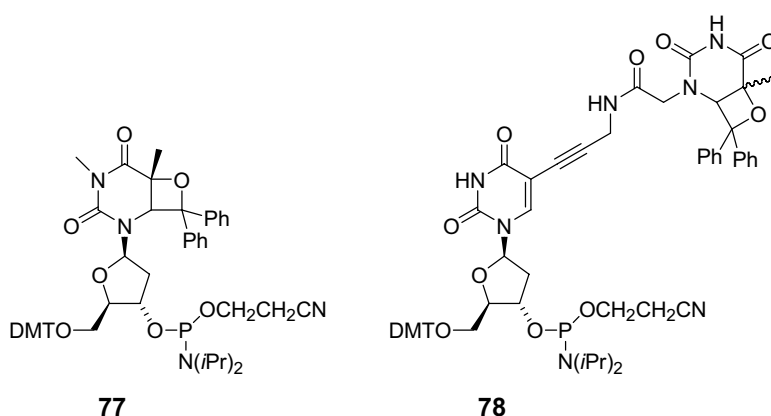
**Schema 41.** In DNA inkorporierte Aryltrifluormethyldiazirinderivate **73-76**.

Der vom Desoxyuridin abgeleitete Baustein **74** wurde 1998 von *Kuznetsova* entwickelt und sowohl als Phosphoramidit als auch enzymatisch als Triphosphat in DNA eingebaut. Eine Anwendung war der Einbau in 8-Oxo-dG **9** enthaltende DNA. Hierdurch konnte das derartige Schäden reparierende Enzym Fpg (Formamidopyrimidinglykosylase) selektiv gefangen werden,<sup>[409]</sup> in jüngster Zeit wurde dies von ihrer Gruppe auch auf chemischem Wege bewerkstelligt.<sup>[410]</sup> **75** und **76** wurden ab 1996 von *Yamaguchi* hergestellt und auf chemischem wie enzymatischen Wege in DNA eingebaut. Unter Verwendung von **76** enthaltender DNA konnte pol  $\beta$  (aus Ratte) in guten Ausbeuten kovalent verknüpft werden.<sup>[411]</sup> Das Didesoxyderivat **75** wurde bereits 1996 zur Markierung der HIV-1 *Reverse Transcriptase* genutzt, wobei besonders die Abhängigkeit der Transkription von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration untersucht wurde.<sup>[412]</sup>

## 2 Synthese und Charakterisierung flavin- und oxetanenthaltender DNA-Haarnadeln

### 2.1 Aufgabenstellung

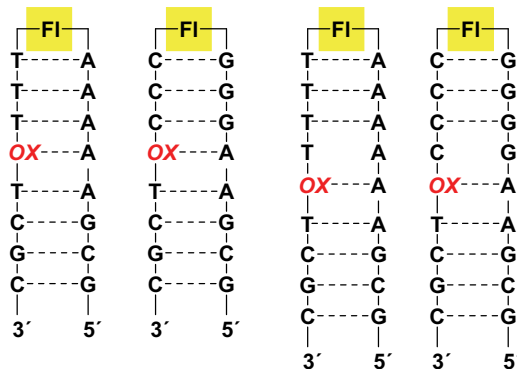
Wie in der Einführung beschrieben, konnte in früheren Arbeiten von *M. Cichon* und *M. Friedel* in unserer Gruppe gezeigt werden, dass sich die Oxetanmodellverbindung **39** und das analoge Thietan durch Elektronentransfer vom deprotonierten und reduzierten Flavin spalten ließen.<sup>[233, 234]</sup> Dies ist von enormem biologischen Interesse, da auch für die Reparatur des (6-4)-Photoschadens durch (6-4)-Photolyasen ein solcher reduktiver Elektronentransfer vom FADH auf das intermediär gebildete Oxetan postuliert wird.<sup>[163, 191]</sup> Im Rahmen dieses Projekts sollte nun versucht werden, diese einfachen Modellsysteme auf Oligonukleotide zu übertragen, wozu als erstes ein Thymidinoxetan-Festphasenbaustein **77** synthetisiert werden musste. Dieser Baustein sollte dann in flavinenthaltende DNA-Haarnadeln eingebaut werden. Zeitgleich hatte *U. Hennecke* die Aufgabe, den Oxetanfestphasenbaustein **78** zu synthetisieren, in welchem die Oxetanuntereinheit über einen semi-rigiden Alkylspacer angeknüpft ist, welcher im fertigen Strang dazu führen sollte, dass das Oxetan außerhalb des Strangs (ca. 10 Å) in die große Furche der DNA zeigt. (Schema 42)



**Schema 42.** Struktur des geplanten Oxetanbausteins **77**, bzw. des von *U. Hennecke* darzustellenden Oxetans **78**.

Anschließend sollten in Kooperation mit *U. Hennecke* und *M. von Meltzer* die DNA-Haarnadeln der umseitig abgebildeten Struktur synthetisiert werden (Abb. 18). Zwischen Donor **35** im Kopf und Akzeptor **77/78** im Stamm der Haarnadel wurden mindestens drei Basenpaare

eingebaut, da bei geringeren Donor/Akzeptorabständen auch ein Elektronentransfer per Superaustausch hätte auftreten können. Dieser hätte die Auswertung der folgenden Belichtungsexperimente nach den Kriterien des *Hopping*-Mechanismus unmöglich gemacht.



**Abb. 18.** Sequenzen der zu synthetisierenden DNA-Haarnadeln (FI = Flavin 35, OX = Oxetanbaustein 77 bzw. 78).

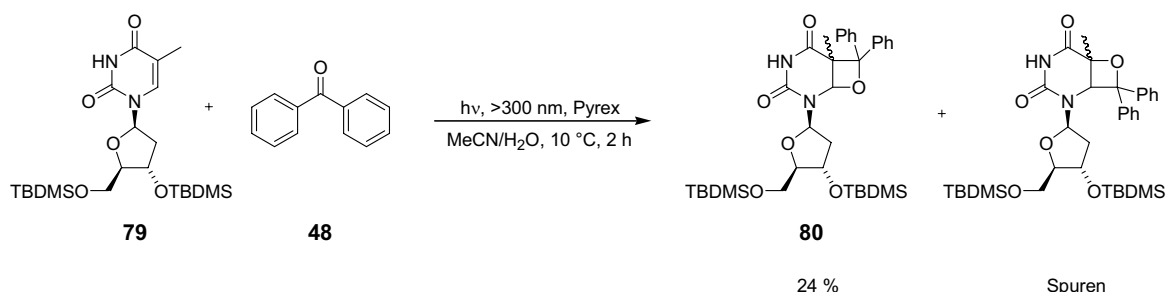
Nach erfolgter Synthese und Aufreinigung der DNA sollte diese dann ausführlich strukturell charakterisiert werden (mittels MALDI-TOF-MS, CD-Spektroskopie, enzymatischen Verdau, etc.), um Klarheit über Struktur und Zusammensetzung der Stränge zu erhalten. Davon ausgehend waren Elektronentransfermessungen, ebenfalls in enger Zusammenarbeit mit *U. Hennecke* und *M. von Meltzer*, durchzuführen. Hierzu sollten die DNA-Stränge nach der gruppenintern etablierten Methode zunächst mit Dithionit reduziert und anschließend bei 366 nm belichtet werden, wodurch die reduktive Spaltung der Oxetane initiiert würde. Das Hauptaugenmerk bei den Belichtungsexperimenten lag auf der Untersuchung der Abstands- sowie der Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers. Oxetane mit einer Spaltungsrate von  $k \cong 10^8 \text{ s}^{-1}$  sollten in der Lage sein, sequenzspezifische Unterschiede in der Spaltungsausbeute sichtbar zu machen, was in früheren Experimenten mit dem T=T-Dimer 34 nicht gelungen war. Zudem bestand hier die Chance, durch Vergleich der Elektronentransfereffizienz zwischen den Strängen mit dem Akzeptor 77 und dem Akzeptor 78 einen tieferen Einblick in die Bedeutung der lokalen Umgebung des Oxetans für den Transportprozess zu gewinnen.

Wegen der häufig unsauberen Reduktion des Flavins 35 mit Natriumdithionit sollte die Verwendbarkeit der auch im Kapitel 3 zur Untersuchung der bromsubstituierten Basen eingesetzten EDTA-Photoreduktion für dieses System experimentell ausgetestet werden. Um schließlich eindeutig den Transportweg der Elektronen (Basenstapel *vs.* umgebendes Medium) zu klären, sollte die Belichtung unter Anwendung der EDTA-Photoreduktion unter einer  $\text{N}_2\text{O}$ -Atmosphäre durchgeführt werden. Dieses Experiment war notwendig, da von *Harriman* und anderen Gruppen postuliert worden war, dass sich das Elektron potentiell auch

durch die den DNA-Strang umgebende Lösung fortbewegen könnte.<sup>[413]</sup> N<sub>2</sub>O als hocheffektiver Fänger solvatisierter Elektronen sollte jeglichen Elektronentransfer in Lösung unterbinden oder doch zumindest stark beeinträchtigen, was sich im Falle der Richtigkeit von *Harrimans* These in einem starken Rückgang der Elektronentransfereffizienz äußern sollte.

## 2.2 Synthese des Oxetanbausteins

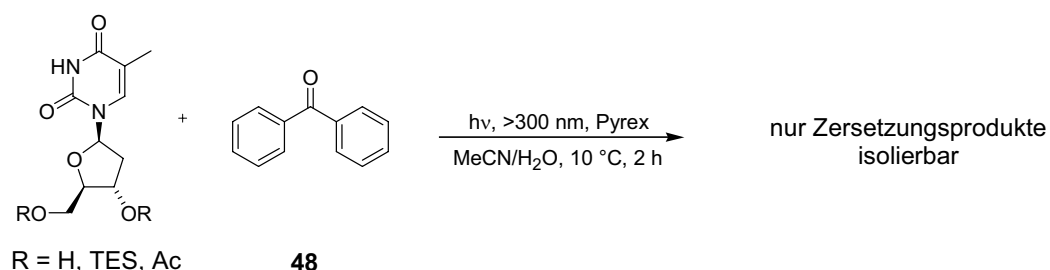
Zur Synthese des Oxetanbausteins **77** wurde in einem ersten Ansatz versucht, zweifach TBDMS-geschütztes Thymidin **79** in einer Pyrexapparatur (>300 nm) in Anwesenheit von Benzophenon **48** zu belichten, ähnlich wie *Cichon* bei der Darstellung der Oxetan-Modellverbindung **39** vorgegangen war. Tatsächlich entstand im Laufe der Belichtung ein *Paternó-Büchi*-Reaktionsprodukt, das nach chromatographischer Aufreinigung in 24%iger Ausbeute isoliert werden konnte. Eine genaue Analyse des Produktes mittels COSY und NOESY-NMR-Spektroskopie zeigte allerdings, dass es sich dabei um das unerwünschte Regioisomer **80** handelte (Schema 43). Ein gutes Indiz hierfür war bereits im <sup>1</sup>H NMR-Spektrum sichtbar, nämlich die enorme Tieffeldverschiebung des C(6)-Protons ( $\delta = 5.63$  ppm), welche sich mit der *N,O*-acetalartigen Struktur **80** korrelieren ließ.



**Schema 43.** Versuchte Belichtung von **79** mit Benzophenon **48**.

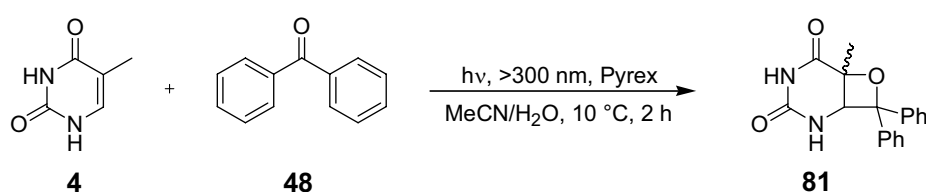
Das gesuchte Produkt entstand nur in Spuren, sehr wahrscheinlich aufgrund von sterischer Hinderung durch die räumlich anspruchsvollen TBDMS-Schutzgruppen. Kurz nach Durchführung dieses Experiment erschien ein Artikel von *Miranda*, in dem er exakt die gleiche Beobachtung beschrieb und auch die aufgrund von NMR-Untersuchungen angenommene Struktur bestätigte.<sup>[414]</sup> Der Einsatz von Thymidinen mit räumlich kleineren Schutzgruppen (wichtig zur besseren Löslichkeit in org. Solventien) führte nicht zu einer Verbesserung der Ausbeute an gesuchtem *head-to-head*-Addukt. Im Gegenteil, der Ersatz der TBDMS- durch Acetyl-, bzw. TES-Gruppen führte dazu, dass keine Oxetane mehr isoliert

werden konnten, sondern ausschließlich Zersetzung der Edukte eintrat (Schema 44). Es kann angenommen werden, dass das lichtangeregte Benzophenon **48** ein H-Atom von der Riboseinheit abstrahiert und das so entstehende Radikal verschiedenen Umlagerungen und Fragmentierungen unterliegt, die zur Zersetzung des Thymidins führen. Auf die Entstehung und Weiterreaktion derartiger C(1')- bzw. C(2')-Radikale wurde bereits im Zusammenhang mit der Belichtung 5-Br-Desoxyuridin-haltiger DNA-Stränge eingegangen.<sup>[220]</sup>



**Schema 44.** Versuche zur Belichtung verschiedener geschützter Thymidine.

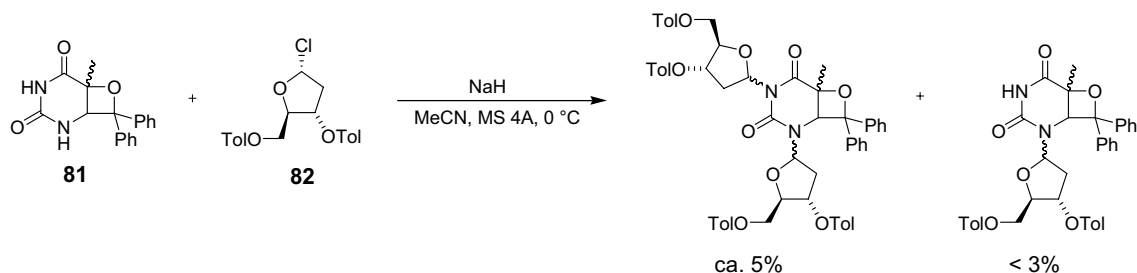
Aus diesem Grund wurde die Synthesestrategie dahingehend geändert, dass zunächst das bekannte Benzophenonoxetan **81** des Thymins dargestellt wurde, welches nachfolgend glykosidiert wurde.<sup>[415]</sup> Hierzu wurde Thymin **4** in großer Verdünnung (aufgrund der schlechten Löslichkeit) in Wasser/Acetonitril gelöst und bei 10 °C unter Argon in einer Pyrexapparatur mit Benzophenon **48** belichtet. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte das Oxetan **81** in 15 %iger Ausbeute als racemisches Gemisch erhalten werden. (Schema 45).



**Schema 45.** Darstellung des Benzophenonoxetans **81**.

Die nachfolgende Glykosidierung mit  $\alpha$ -1'-Chloro-3',5'-di-O-toluoylribofuranosid **82** (freundlicherweise von J. Gierlich zur Verfügung gestellt) lieferte nach der Vorbrüggen-Variante keine isolierbaren Produkte.<sup>[416]</sup> Eine andere Methode, bei der das Oxetan zunächst mit Natriumhydrid deprotoniert und dann mit dem Glykosyldonor **82** umgesetzt wurde, ergab ein Gemisch verschiedener Nukleoside in extrem geringer Ausbeute, darunter hauptsächlich doppelt glykosidierte Produkte (Schema 46).<sup>[417]</sup>

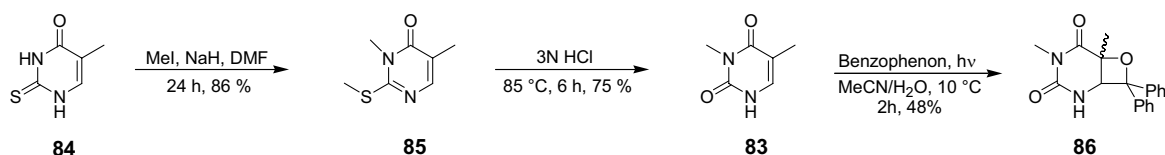




**Schema 46.** Versuch der Glykosidierung von **81**.

Die schlechten Ausbeuten bei der Herstellung und die aufgrund der sehr mäßigen Löslichkeit schwierige Handhabung von **81** führten zu dem Entschluss, anstelle von Thymin **4** das 3-Methylthymine **83** einzusetzen; dieses sollte wesentlich löslicher sein, zudem bestand hier keine Gefahr der Mehrfachglykosidierung.

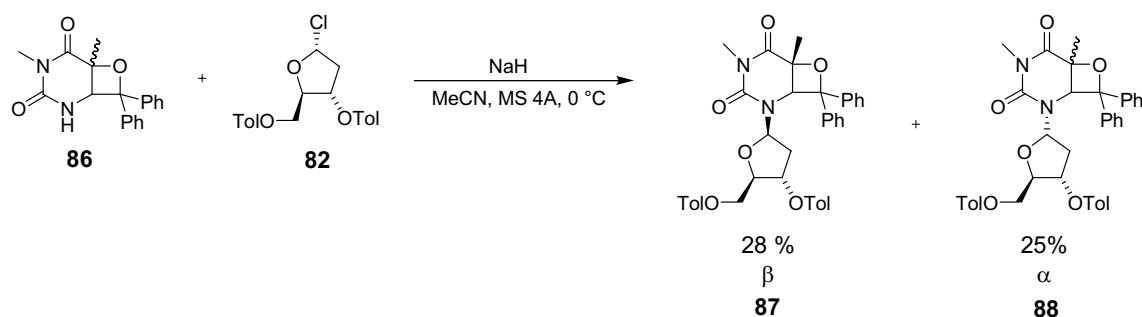
3-Methylthymine **83** wurde nach der Methode von *Itahara* dargestellt.<sup>[418]</sup> Hierzu wurde 4-Thiothymine **84** zunächst unter Standardbedingungen mit Iodmethan alkyliert, wobei als Hauptprodukt 2-S-Methyl-3-methylthiothymine **85** erhalten wurde. Durch mehrstündiges Kochen unter Rückfluss in salzsaure Lösung wurde die Thioharnstoffeinheit hydrolysiert und 3-Methylthymine **83** gebildet, welches nach mehrfacher Extraktion und chromatographischer Reinigung in 75 % iger Ausbeute isoliert werden konnte (Schema 47).



**Schema 47.** Darstellung des 3-Methylthyminoxetans **86**.

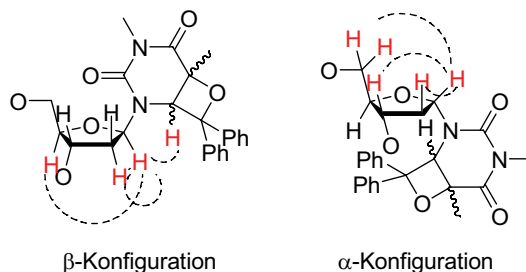
Die nachfolgende *Paternó-Büchi*-Reaktion (Bedingungen siehe Schema 47) lieferte das Oxetan **86** als racemisches Gemisch in mehr als 40 %iger Ausbeute, was für eine derartige Photoreaktion bemerkenswert ist. Voraussetzung hierfür war allerdings die Verwendung hochreiner Lösungsmittel (*MilliQ*-entionisiertes Wasser, *HPLC-grade* Acetonitril) und das mindestens zwanzigminütige Entgasen der Lösung mit Argon vor Beginn der Belichtung. Ebenso wichtig war die Einhaltung der Temperatur. Höhere Temperaturen führten zwar zu einer Beschleunigung der Reaktion, allerdings entstand auch eine Vielzahl sehr schwer abzutrennender Nebenprodukte. **86** konnte unter Beachtung dieser Maßnahmen letztlich im Grammaßstab hergestellt werden.

Zur Darstellung des Nucleosids wurde **86** unter basischen Bedingungen mit  $\alpha$ -1'-Chlor-3',5'-di-*O*-toluoylribofuranosid **82** umgesetzt. Hierzu wurde das Oxetan **86** gemäß einem Protokoll von *Hosmane* bei 0 °C in trockenem Acetonitril gelöst und mit Natriumhydrid deprotoniert.<sup>[417]</sup> Erst nach Ablauf der Gasentwicklung wurde dann in kleinen Portionen **82** zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Das glykosidierte Produkt konnte in 53 % Ausbeute erhalten werden, allerdings als  $\alpha$ / $\beta$ -Anomerengemisch, welches nahezu 1:1 anfiel. Das ungünstige Anomerenverhältnis ist einerseits darauf zurückzuführen, dass der Glykosyldonor **82** bei längerer Reaktionszeit in Lösung nicht konfigurationsstabil ist, zum anderen liegt es auch in der Struktur des Oxetans **86** selbst begründet, worauf in der Folge noch eingegangen wird. Die Anomere konnten chromatographisch getrennt werden, so dass das reine  $\beta$ -Nucleosid **87** in einer Ausbeute von ca. 28 % isoliert werden konnte (Schema. 48).



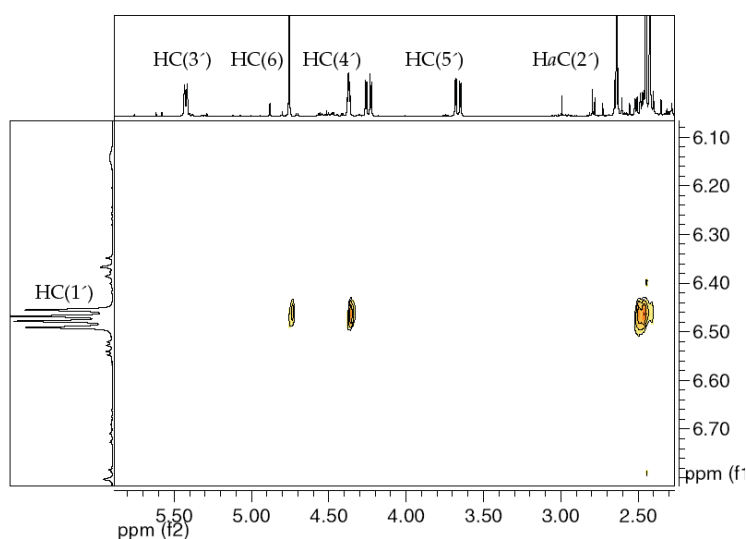
Schema 48. Darstellung der Oxetannucleoside **87** und **88**.

Die Zuordnung der Anomeren beruht auf NOESY-NMR-Spektren. Dabei wurden besonders die Kreuzsignale zwischen dem C(1')-Proton und dem C(3')- bzw. C(4')-Proton betrachtet, ebenso Wechselwirkungen zwischen dem C(6)-Proton und dem C(1')-Proton, wie in Schema 49 dargestellt.



Schema 49. Zur Identifizierung der Anomeren relevante NOE-Wechselwirkungen (Die Toluoylschutzgruppen wurden der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt).

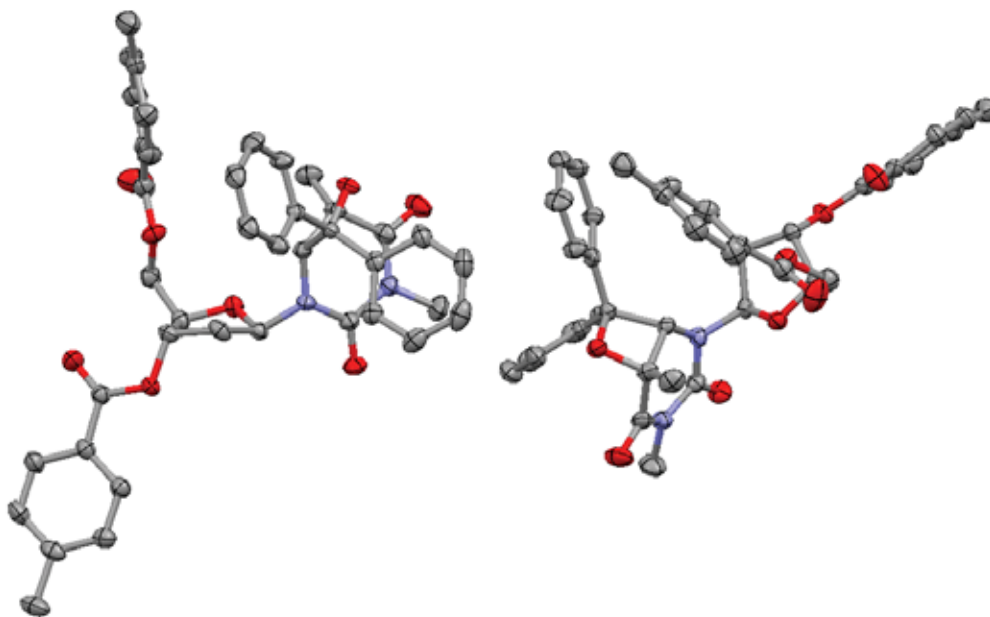
Im abgebildeten NOESY-NMR-Spektrenausschnitt (Abb. 19) ist deutlich das Kreuzsignal zwischen dem C(1′)-Proton ( $\delta = 6.47$  ppm) und dem C(4′)-Proton ( $\delta = 4.37$  ppm) zu sehen, hingegen sieht man keine Wechselwirkung zum C(3′)-Proton ( $\delta = 5.41$  ppm) bzw. zu den C(5′)-Protonen ( $\delta = 4.23$  ppm, 3.77 ppm), so dass es sich hier mit einiger Sicherheit um das  $\beta$ -Nukleosid **87** handeln musste. Zudem ist eine starke NOE-Wechselwirkung zum  $H_aC(2′)$  ( $\delta = 2.48$  ppm) zu erkennen, die diese Einschätzung weiter untermauert. Im NOESY-NMR-Spektrum des  $\alpha$ -Anomers **88** (keine Abbildung vorhanden) sind diese Wechselwirkungen nicht zu sehen, hingegen treten hier *Crosspeaks* zu den C(3′)- und C(5′)-Protonen auf.



**Abb. 19.** Relevante Ausschnitte aus den NOESY-Spektren des  $\beta$ -Nucleosids **87**.

Die getroffene Zuordnung wurde kurze Zeit später bestätigt, als eine Röntgenkristallstruktur des mutmaßlichen  $\beta$ -Nucleosids **87** erhalten werden konnte. Der fragliche Einkristall konnte durch langsames Verdunsten einer konzentrierten Lösung von **87** in  $CDCl_3$  bei Raumtemperatur gewonnen werden. Man erhielt farblose, monokline Plättchen der Raumgruppe  $P2_1$ , die Zelldimensionen waren  $a = 10.855(2)$  Å,  $b = 14.361(3)$  Å,  $c = 11.353(2)$  Å,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 100.52(3)^\circ$ . In der Elementarzelle waren je zwei Moleküle mit fast identischer Konformation vorhanden. Die interessanteste Entdeckung bei der Betrachtung der Struktur war die Tatsache, dass bei der Glykosidierung nur eines der bezüglich des Oxetans möglichen Diastereomere gebildet wurde, nämlich das 5-(*R*)-Isomer, in dem die Phenylringe des Oxetans und die Riboseeinheit maximal entfernt voneinander stehen. Dies ist nach dem derzeitigen Stand des Wissens der erste beschriebene Fall, in dem die Stereochemie des Reaktionspartners eine so unmittelbare Wirkung auf das stereochemische „Ergebnis“ der Glykosidierungsreaktion hat. Das 5-(*S*)-Isomer hingegen reagierte mit dem Glykosyldonor **82** quasi ausschließlich

zum unerwünschten  $\alpha$ -Nukleosid. Die Struktur eines der beiden Moleküle, welche pro asymmetrischer Einheit vorliegen, ist in Abb. 20 aus zwei verschiedenen Blickwinkeln gezeigt, um eine bessere Übersicht über die interessanten Substrukturen des Moleküls zu erhalten.

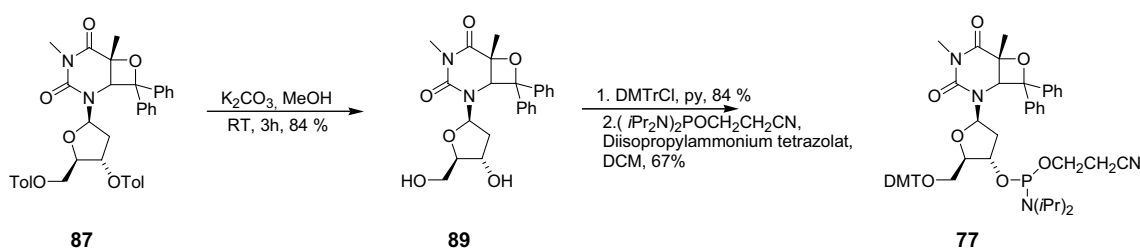


**Abb. 20.** Struktur des  $\beta$ -Nukleosids **87** im Kristall; links) Blick auf das anomere Zentrum; rechts) Aufsicht auf die Oxetan-Untereinheit.

Deutlich ist im Bild links die  $\beta$ -Konfiguration des Nukleosids zu erkennen. Der Torsionswinkel um die glykosidische Bindung  $\chi$  beträgt  $-160.1^\circ$ , damit liegt im Kristall das Nukleosid in der *anti*-Konformation vor. Außerdem muß hier auf die ungewöhnliche C(1')-*endo*-Konformation der Desoxyribose hingewiesen werden, welche das Molekül vermutlich aufgrund des enormen sterischen Anspruchs der Oxetaneinheit einnimmt. Die Aufsicht auf das Oxetan im Bild rechts zeigt deutlich, dass in diesem Fall ausschließlich das 5-(*R*)-Isomer vorliegt. (Details zur Kristallstrukturanalyse sind unter Anhang A zu finden).

Die weitere Synthese verlief nun ohne größere Schwierigkeiten. Nach basischer Abspaltung der Toluoylschutzgruppen mit Kaliumcarbonat in Methanol wurde das freie Nukleosid **89** in guten Ausbeuten erhalten. Dieses wurde selektiv in der 5'-Position mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid geschützt (Verbindung **90**) und anschließend in das Phosphoramidit **77** überführt. Ab der DMT-geschützten Stufe **90** musste aufgrund der sehr ausgeprägten Säurelabilität Pyridin zu den Elutionsmitteln der Säulenchromatographie zugesetzt werden, deuteriertes Chloroform für NMR-Messungen wurde durch Vorbehandlung mit basischem Aluminiumoxid entsäuert. Um an der Base (O(4)) eine O-Phosphitylierung zu vermeiden, welche an-

sonsten bei Thymin- und Guaninderivaten häufig auftritt (erkennbar als Signal im  $^{31}\text{P}$  NMR bei  $\delta \cong 140$  ppm), wurde statt des sonst sehr verbreiteten CED-Chlorids  $\beta$ -Cyanoethyl-tetraisopropylphosphordiamidit in Kombination mit sowohl als Base als auch als Aktivator fungierendem Diisopropylammoniumtetrazolat verwendet. Auf diese Weise konnte selektiv nur die 3'-Position zur Reaktion gebracht werden. Um das Phosphoramidit vor Oxidation im Zuge der nachfolgenden chromatographischen Reinigung zu bewahren, wurde das verwendete *Kieselgel-60* durch Vorbehandlung mit Pyridin deaktiviert, zudem wurde die Reinigung sehr schnell durchgeführt. Der Festphasensynthesebaustein **77** konnte so in Quantitäten von ca. 200-250 mg sauber dargestellt werden. Die abschließenden Schritte der Synthese sind in Schema 50 zusammengefasst.



Schema 50. Abschließende Schritte der Synthese des Oxetanphosphoramidits **77**.

## 2.3 Synthese flavin- und oxetanhaltiger DNA-Haarnadeln

Das in der beschriebenen Art und Weise dargestellte Oxetanphosphoramidit **77** wurde per Festphasensynthese in DNA-Haarnadeln eingebaut. Es wurden CPG-Träger (*controlled pore glass*, Fa. Amersham Biosciences), verwendet, an welche die erste Base, die das 3'-Ende des Stranges darstellt, bereits angekuppelt war. An diese Base wurden nun sukzessive die weiteren Basenphosphoramidite gekuppelt, welche als basenspaltbare, permanente *N*-Schutzgruppen entweder Acetyl- (Ac), Benzoyl- (Bz) oder Isopropylphenoxyacetylgruppen (*iPr*-Pac) trugen. Das Thyminphosphoramidit lag wie das Oxetanphosphoramidit **77** ungeschützt vor. Das Phosphit selber war  $\beta$ -Cyanoethyl-geschützt.

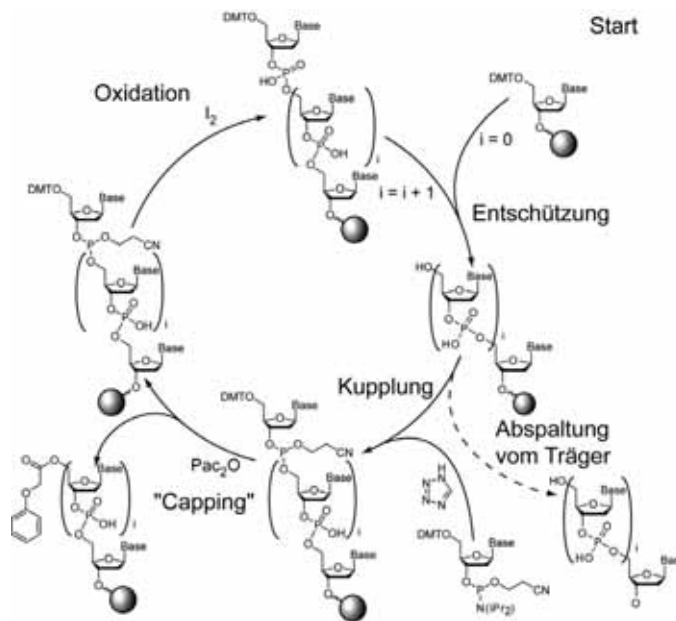
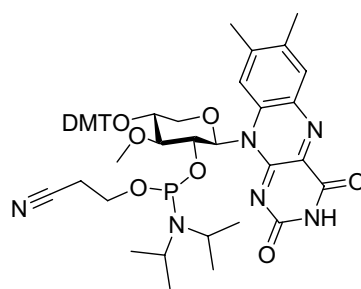


Abb. 21. Syntheszyklus in der Phosphoramiditchemie.

Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, bestand jeder Syntheszyklus aus 4 essentiellen Schritten. Der erste Schritt war jeweils die Abspaltung der DMT-Schutzgruppe des zuletzt gekuppelten Nucleotids mit 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan (Standardentschützungszeit 49 s). Anschließend wurde die nun freie Base unter Verwendung von 0.25 M 5-Benzylthiotetrazol als Aktivator mit dem nächsten Phosphoramidit gekuppelt. Die Kupplungszeit betrug 96 s, das Oxetanphosphoramidit **77** wurde zweimal für je 5 min gekuppelt. Es konnten so Kupplungsausbeuten von > 98 % erreicht werden. Die nicht elongierten Stränge wurden im nächsten Schritt mit Phenoxyessigsäureanhydrid ( $\text{PaC}_2\text{O}$ ) verestert. Dieser als *Capping* bezeichnete Schritt wurde durchgeführt, um die Bildung von Deletionsfehlsequenzen zu verhindern, die bei der chromatographischen Aufreinigung zu Problemen geführt hätten. Schließlich musste noch die entstandene Phosphit-Verbindung zum Phosphat oxidiert werden. Dies wurde durch Behandlung mit 0.015 M basischer Iodlösung erreicht. Der nächste Zyklus schloß sich an, usw.. Nach Abschluss der Synthese wurde die terminale DMT-Gruppe abgespalten, da dies bei den verwendeten kurzen Oligonucleotiden nicht zu Aufreinigungsproblemen führte und sich eine Abspaltung zu einem späteren Zeitpunkt als nicht vorteilhaft erwiesen hatte.

Der Flavinbaustein **35** wurde von *A. Manetto* nach der Vorschrift von *Behrens* als *H*-Phosphonat synthetisiert, da sich Flavinphosphoramidite an der Luft als nicht oxidationsstabil zeigten.<sup>[419]</sup> Eine Ausnahme hiervon bildet das in 2003 von *J. Gierlich* synthetisierte Pyranosylflavin-Phosphoramidit **91**, welches sich bei vorsichtiger Handhabung unter Luftausschluss in Oligonucleotide einbauen ließ (Schema 51).<sup>[420]</sup>



91

**Schema 51.** Struktur des 2003 von Gierlich synthetisierten Pyranosylflavin-Phosphoramidits **91**.

Da *H*-Phosphonate eine andere Kupplungsstrategie erfordern, wurde das Syntheseprotokoll für den Flavinbaustein **35** leicht abgeändert. Zum einen wurde als Aktivator hier ein großer Überschuss einer Lösung von Pivaloylchlorid (0.25 M) in Pyridin/Acetonitril 1:1 eingesetzt; zudem wurde der CPG-Träger vor jeder Kupplung mit Pyridin/Acetonitril 1:1 gespült. Die Kupplungszeit für den Flavinbaustein wurde auf 10 min erhöht, die nachfolgende Base wurde aufgrund des großen sterischen Anspruchs 5 min gekuppelt. Da *H*-Phosphonate unter den Bedingungen der Phosphoramiditchemie nicht vollständig oxidiert werden, mussten die flavinenthaltenden Stränge nach Abschluss der Synthese nach der Methode von *Froehler* nachoxidiert werden.<sup>[421]</sup> Hierzu behandelte man die Stränge 5 min mit einer 0.2 M Lösung von Iod, kombiniert mit einer schwachen Base (*N*-Methylmorpholin), dann 5 min mit Iod und einer stärkeren Base (Triethylamin). Auf diese Weise konnten die Phosphite in den Strängen in hinreichendem Maße zu den Phosphorsäurediestern aufoxidiert werden.

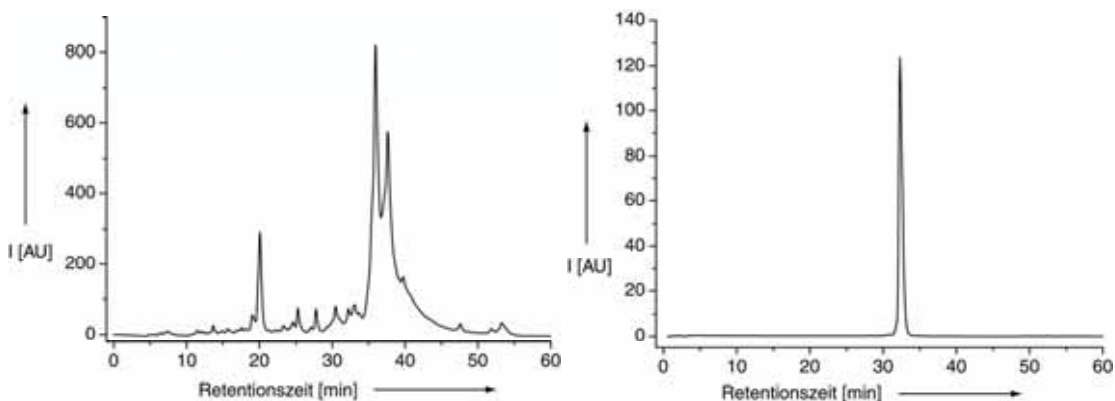
Zur Abspaltung der Oligonukleotide vom CPG-Träger und zur Entfernung der permanenten Schutzgruppen von Base und Phosphat wurde das Trägermaterial mit einem Gemisch aus wässrigem Ammoniak/Ethanol 3:1 behandelt. Die Abspaltzeit betrug hierbei 16-24 Stunden; zwar war die Entschützung zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig, wie MALDI-TOF-MS-Messungen von Proben zeigten, eine längere Abspaltungszeit jedoch führte nicht zu einer höheren Ausbeute, es erhöhte sich lediglich die Menge an Nebenprodukten. Eine höhere Temperatur bzw. die Zugabe von Methylamin-Lösung verbot sich aufgrund der ausgeprägten Basenlabilität des Flavins. Die Oxetaneinheit selber zeigte sich allerdings stabil gegenüber basisch-nukleophilen Bedingungen. Dies ist ein Unterschied zu dem von *U. Hennecke* dargestellten Oxetanbaustein **78**, welcher aufgrund seiner Propargylamid-Funktionalität sehr empfindlich gegenüber diesen Reagenzien ist, und nur sehr kurze Abspalt- und Entschütungszeiten zuließ.

Es konnten die folgenden DNA-Haarnadeln synthetisiert und isoliert werden (Tabelle 6):

Bezeichnung	Sequenz
POx1	5' -CGCTOx*TTTFLAAACAGCG-3'
POx2	5' -CGCTOx*CCCFLGGGCAGCG-3'
POx3	5' -CGCTOx*TTTTFLAAAACAGCG-3'
POx4	5' -CGCTOx*CCCCFLGGGGCAGCG-3'

**Tabelle 6.** Sequenz und Bezeichnung der synthetisierten DNA-Stränge (Fl = 35, Ox\* = 77).

Nach Synthese und Abspaltung vom Träger wurde die DNA HPL-chromatographisch gereinigt, vor allem, um unvollständig entschützte Stränge und bei der Synthese aufgetretene Abbruchfragmente abzutrennen. Hierzu wurde zunächst per *reversed phase*-HPLC und dann per Ionenaustauschchromatographie (SAX-Säule) präparativ aufgereinigt, da mit einer Methode allein keine ausreichende Reinheit der Fragmente erreicht werden konnte. Die Güte der Reinigung ist anhand des Roh- und des Endchromatogramms von Strang **POx1** kurz veranschaulicht.



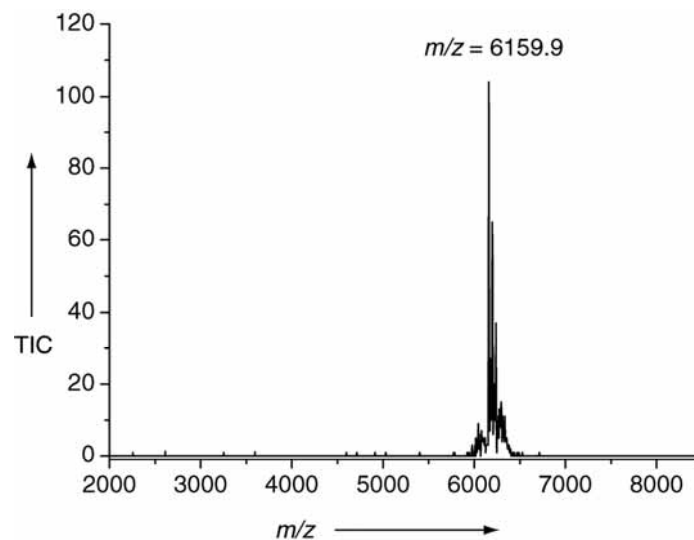
**Abb. 22.** links) Rohchromatogramm von **POx1**; rechts) nach HPLC-Aufreinigung. Die leicht unterschiedlichen Retentionszeiten wurden durch geringfügige Abweichungen in der Pufferzusammensetzung verursacht. Die Chromatogramme wurden bei 60 °C aufgenommen.

Wie in Abbildung 22 erkennbar, konnten die Oligonukleotide in guter Reinheit nach zweifacher chromatographischer Trennung isoliert werden. Wichtig war, sowohl analytische wie auch präparative Trennungen per HPLC bei 50 °C – 60 °C durchzuführen, da bei Raumtemperatur keine vollständige Denaturierung der Haarnadeln auftrat. Aufgrund der zwei Trennungen und der Vielzahl der entstandenen Nebenprodukte war die isolierte Ausbeute niedrig, sie betrug nur zwischen 5-10 %. Dennoch konnten mit dem zur Verfügung stehenden Material alle erforderlichen Experimente problemlos ausgeführt werden.



## 2.4 Charakterisierung der DNA-Haarnadeln

Zur Charakterisierung der Haarnadeln wurden per MALDI-TOF-Massenspektrometrie die molekularen Massen der gereinigten Oligonukleotide bestimmt. Dabei stimmten die ermittelten Massen im Rahmen der geräteeigenen Toleranzgrenzen in allen Fällen mit den vorausgesagten Massen überein. Eine Tabelle der berechneten und gefundenen Massen findet sich im Experimentellen Teil. Unter Verwendung der ebenfalls im Experimentellen Teil beschriebenen HPA-18-Krone-6-Matrix bei gleichzeitiger gründlicher Entsalzung der Proben (Dialysemembran oder *ZipTip™*) konnten hervorragende Massenspektren erhalten werden, wie in nachfolgender Abb. 23 anhand des MALDI-TOF-Massenspektrums von Strang **POx4** gezeigt:

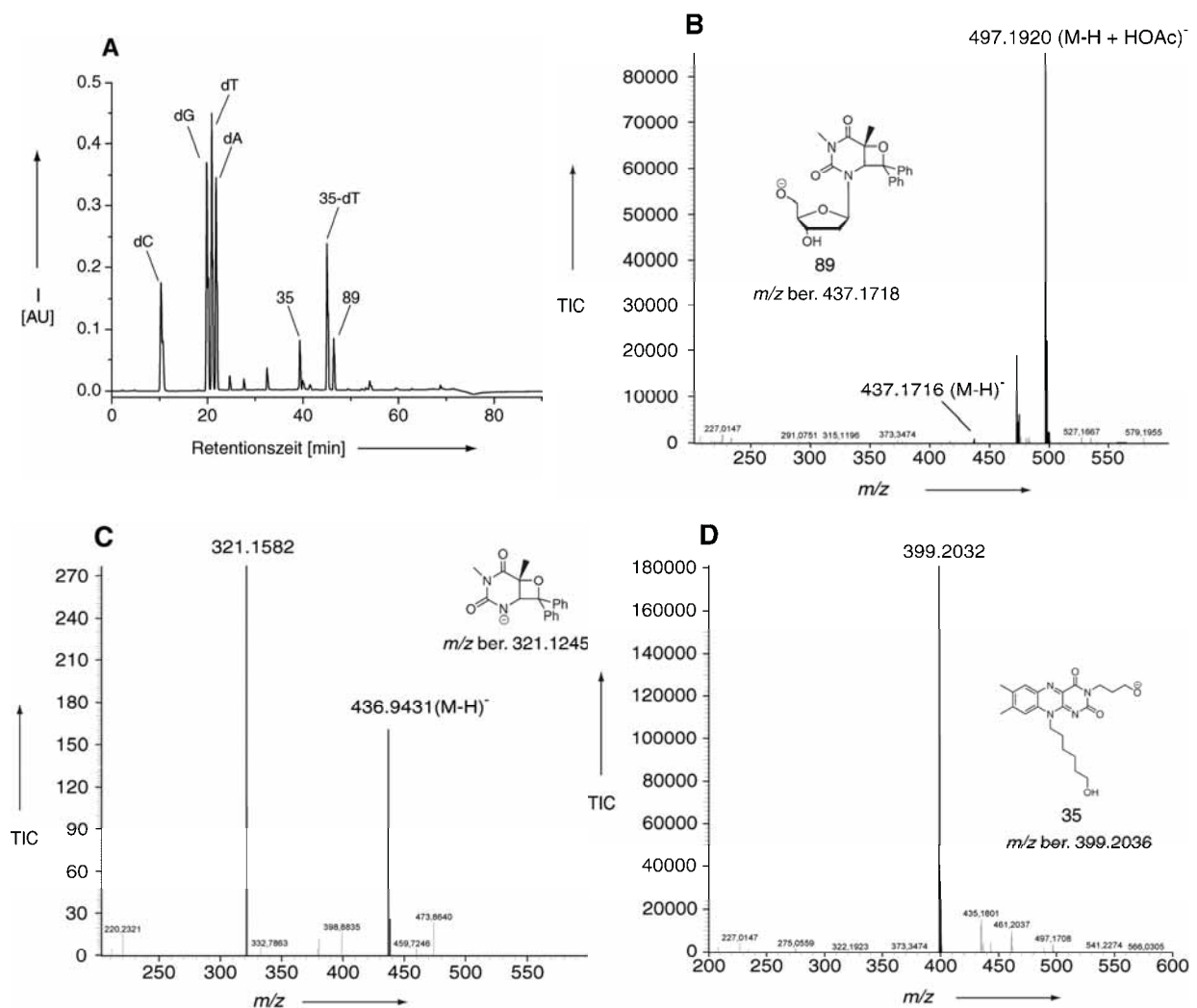


**Abb. 23.** MALDI-TOF-Massenspektrum des gereinigten Strangs **POx4** (negativer Modus, Matrix 3-HPA).

Außer dem Molekülpeak ( $m/z = 6159.9$ , ber. 6156.2) sind nach zweifacher chromatographischer Reinigung keine weiteren Signale zu detektieren. Wichtig war die Feststellung, dass das Oxetan unter den Bedingungen des MALDI-TOF-MS nicht gespalten wurde, so dass es qualitativ möglich sein sollte, die Spaltung des Oxetans in der DNA auch massenspektrometrisch zu verfolgen.

Die Unversehrtheit des Oxetanbausteins in den DNA-Doppelsträngen wurde neben der molekularen Masse der Stränge auch durch einen enzymatischen Totalverdau bestätigt. Hierzu wurden 100  $\mu\text{L}$  einer 20  $\mu\text{M}$  Lösung der DNA-Haarnadel **POx1** durch sukzessive Behandlung mit Nuclease  $P_1$ , *snake venom*-Phosphodiesterase I, *calf spleen*-Phosphodiesterase II und Alkalischer Phosphatase (im sauren bzw. basischen Milieu) in die einzelnen Nukleotide

gespalten, welche durch Inkubation mit *calf intestine*-Phosphatase zu den freien Nucleosiden dephosphoryliert wurden. Diese wurden nachfolgend per ESI-LC-MS/MS analysiert. Das Gemisch wurde dazu mit Hilfe von *rp*-HPLC getrennt und die einzelnen Komponenten mit dem gekoppelten *Finnigan LTQ* FTICR-Massenspektrometer untersucht; die Peaks wurden dazu auch durch MS/MS-Experimente in einer Ionenfalle weiterfragmentiert, um so zusätzlichen Aufschluss über die Identität der einzelnen Nucleoside zu erhalten. Ein UV-Chromatogramm eines solchen LC-MS/MS-Laufs ist in Abb. 24 A gezeigt, unter B, C und D sind die Massenspektren und MS/MS-Spuren zu den relevanten Signalen hinzugefügt worden.



**Abb. 24.** A: HPL-Chromatogramm (260 nm) eines enzymatischen Totalverbaus von Strang POx1. B: ESI-Massenspektrum der bei Retentionszeit 46.2 min eluierten Spezies 89. C: MS/MS-Fragmentierungsmuster (Ionenfalle) des in B dargestellten Ions. D: ESI-Massenspektrum der bei Retentionszeit 39.3 min eluierten Spezies 35.

Abb. 24 zeigt die Ergebnisse eines enzymatischen Totalverdaus des Strangs **POx1**. Im HPL-Chromatogramm (260 nm) sind die Signale aller im Strang enthaltenen Nucleoside deutlich zu erkennen, welche anhand ihrer charakteristischen UV-Vis-Absorptionsspektren und der sehr exakten Übereinstimmung ihrer ESI-FTICR-Massenspektren mit den berechneten molekularen Massen zugeordnet werden konnten (**A**). Das freie Oxetannucleosid **89** konnte als das Signal mit der Retentionszeit von 46.2 Minuten identifiziert werden, die gefundene molekulare Masse stimmte hervorragend mit dem berechneten Wert überein. Zwar war der Molekülpeak (M-H)<sup>-</sup> hier klein, doch traten in hohem Maße Chlorid- ( $m/z = 473.1714$ ) und Acetataddukte ( $m/z = 497.1920$ ) auf, welche zur Massenbestimmung ebenfalls herangezogen werden konnten, wie in **B** gezeigt ist. Als Ausgangsion für eine MS/MS-Fragmentierung wurde das Acetataddukt ( $m/z = 497.1920$ ) gewählt. Als Fragmente erhielt man hier außer dem Molekülpeak (M-H)<sup>-</sup> bei  $m/z = 436.9$  quasi ausschließlich die freie Base, welche durch den Bruch der glykosidischen Bindung gebildet wurde (Ausschnitt **C**). Im Rahmen der Messgenauigkeit der Ionenfalle konnten hier relativ exakte Übereinstimmungen erzielt werden.

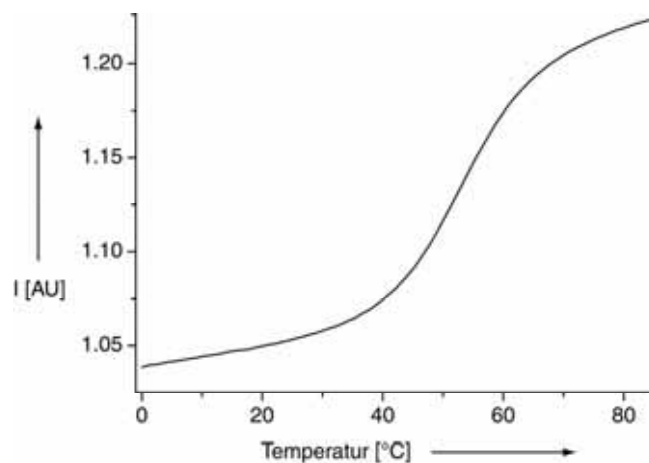
Außer dem Oxetan **89** konnte auch das Flavin **35** identifiziert werden, es handelte sich hier um das Signal bei der Retentionszeit 39.3 Minuten. Das in **D** dargestellte ESI-FTICR-Massenspektrum dieser Spezies zeigt wiederum eine sehr gute Übereinstimmung mit dem berechneten Wert. Das HPLC-Signal bei der Retentionszeit 45.0 Minuten wurde durch ein **35**+dT-Dinucleotid verursacht. Offensichtlich wurde hier die zum Flavin benachbarte Phosphordiesterbindung nicht vollständig gespalten, das sterisch anspruchsvolle Oxetan trug sicherlich zu diesem Effekt bei. Dieses Phänomen wurde so auch von *U. Hennecke* an anderen flavinhaltigen DNA-Strängen beobachtet.

Um zu belegen, dass die Moleküle tatsächlich durch Selbstpaarung ausreichend stabile Haarnadelstrukturen ausbildeten, wurden UV-Schmelzkurven aller Stränge aufgenommen. Dazu wurden nach UV-spektroskopischer Konzentrationsbestimmung 3  $\mu\text{M}$  Lösungen der DNA in 10 mM Tris·HCl (pH 7.4) und 150 mM NaCl präpariert. Diese Lösungen wurden in UV-Küvetten gefüllt und anschließend über fünf Zyklen in 0.5 °C-Schritten von 0-85 °C abgekühlt und erwärmt. Währenddessen wurde die Absorption der Lösungen bei verschiedenen Wellenlängen von 260 nm – 320 nm detektiert. Zur Bestimmung des Schmelzpunkts wurde jeweils das Mittel mehrerer Zyklen bestimmt und die so erhaltene Kurve durch ein Polynom 9. Ordnung approximiert. Die Nullstellen der zweiten Ableitung dieser Approximationsfunktion stellten die gesuchten Schmelzpunkte dar. In Tabelle 7 sind die ermittelten Schmelzpunkte zusammen mit den von *U. Hennecke* für seine analogen Stränge

bestimmten Schmelzpunkten dargestellt, darunter ist als Beispiel eine bei 260 nm bestimmte Schmelzkurve des Strangs **POx3** abgebildet.

Bezeichnung	Sequenz	Schmelzpunkt [ °C]
<b>POx1</b>	5´-CGCT <b>Ox</b> *TTTT <b>Fl</b> AAACAGCG-3´	53.3
<b>POx2</b>	5´-CGCT <b>Ox</b> *CCC <b>Fl</b> GGGCAGCG-3´	65.1
<b>POx3</b>	5´-CGCT <b>Ox</b> *TTTT <b>Fl</b> AAAACAGCG-3´	56.1
<b>POx4</b>	5´-CGCT <b>Ox</b> *CCCC <b>Fl</b> GGGGCAGCG-3´	69.6
<b>UOx1</b>	5´-CGCT <b>Ox</b> *TTTT <b>Fl</b> AAACAGCG-3´	72.3
<b>UOx2</b>	5´-CGCT <b>Ox</b> *CCC <b>Fl</b> GGGCAGCG-3´	86.0
<b>UOx3</b>	5´-CGCT <b>Ox</b> *TTTT <b>Fl</b> AAAACAGCG-3´	75.2
<b>UOx4</b>	5´-CGCT <b>Ox</b> *CCCC <b>Fl</b> GGGGCAGCG-3´	89.2

**Tabelle 7.** UV-Schmelzpunkte der synthetisierten DNA-Haarnadeln. Fl = 35, Ox\* = 77 (Serie **POx**) oder 78 (Serie **UOx**).



**Abb. 25.** UV-Schmelzkurve (260 nm) von **POx3**.

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, lagen alle Schmelzpunkte weit über Raumtemperatur (50 °C - 70 °C), so dass für die Belichtungsexperimente (bei 10 °C) von einer geschlossenen Duplexstruktur ausgegangen werden konnte. Dennoch liegen die gemessenen Schmelzpunkte der in dieser Arbeit dargestellten Haarnadeln (**POx**-Reihe) allesamt um ca. 20 °C unter denjenigen, die für die korrespondierenden DNA-Stränge mit dem von *Hennecke* dargestellten Oxetan **78** bestimmt wurden. Diese Destabilisierung ist am sinnvollsten mit der lokalen Verzerrung zu erklären, die das sterisch extrem anspruchsvolle Oxetannukleosid **77** auf seine direkte Umgebung im Duplex ausübt. Dies ist sehr gut in der folgenden Abbildung 26 zu erkennen, in der von *J. Gierlich* per *molecular modeling* (SYBYL 6.8 MMFF94, Strang **POx1** 8 ps

MD in Wasser, Strang **UOx1** energieminierte Struktur) Struktursimulationen für je eine DNA-Haarnadel mit Baustein **77** (**A**) bzw. **78** (**B**) generiert wurden.

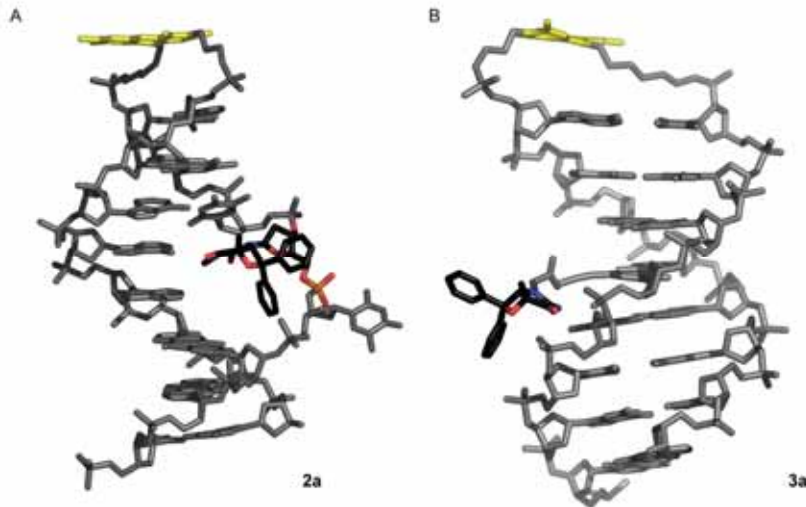


Abb. 26. Molecular modeling der Haarnadeln **POx1** (A) und **UOx1** (B).

Es ist klar zu erkennen, dass die Anwesenheit des Oxetans **77** zur Bildung einer lokalen Blase führt und das darunterliegende Thymidin sogar dazu zwingt, sich aus dem DNA-Duplex herauszudrehen, wohingegen im analogen Strang **UOx1** die Helixstruktur absolut unbeeinträchtigt ist und das Oxetan **78** wie vorgesehen in die große Furche hineinragt. In 5-Position alkylsubstituierte Desoxyuridine wie **78** üben bekanntermaßen sogar eine stabilisierende Wirkung auf den Zusammenhalt der Doppelstränge aus, was hier sicherlich noch zusätzlich zu den sehr hohen Schmelzpunkten der Oligonukleotide **UOx1-4** beiträgt.

Um experimentell zu klären, ob es sich bei der gefundenen Duplexstruktur entsprechend den Rechnungen auch um B-DNA handelte, wurden die Haarnadeln per Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) untersucht. Abb. 27 zeigt eine CD-Schmelzkurve der DNA-Haarnadel **UOx1**.

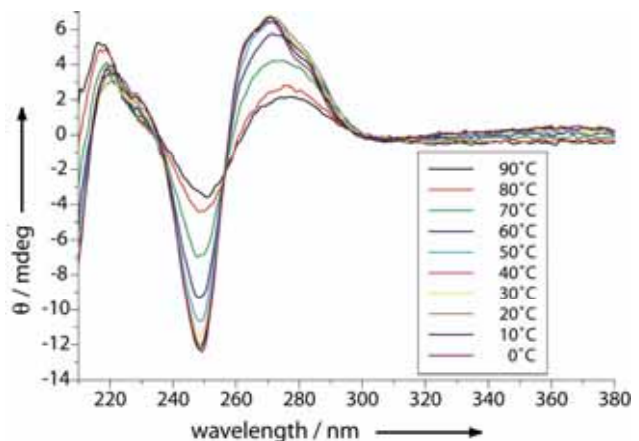


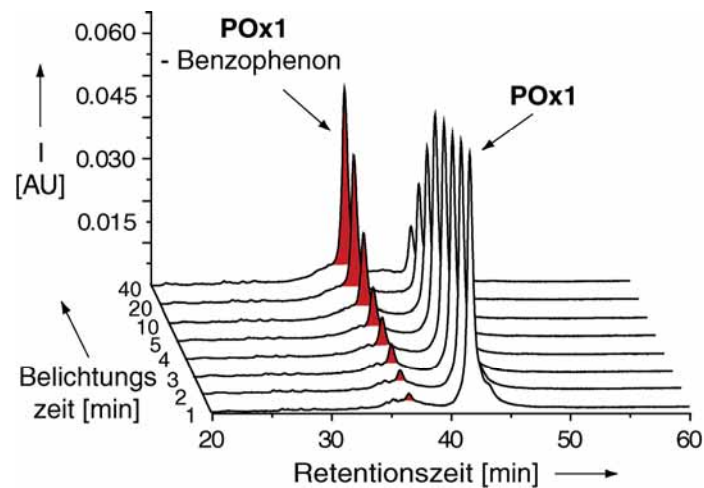
Abb. 27. CD-Schmelzkurve des Strangs **UOx1** ( $c_{DNA} = 3 \mu M$ , 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mL Probenvolumen).

Deutlich ist in den gezeigten CD-Kurven der für B-DNA typische Verlauf mit den Maxima bei  $\lambda = 270$  nm und  $\lambda = 220$  nm, sowie dem Minimum bei  $\lambda = 248$  nm zu erkennen. Trotz der durch das Oxetan **77** verursachten lokalen Verzerrung kann daher dennoch global gesehen das Vorliegen Haarnadel in der B-Konformation angenommen werden, was für die Interpretation der Ergebnisse aus den Belichtungsexperimenten von entscheidender Bedeutung war. Bei Annäherung an den Schmelzpunkt kam es erwartungsgemäß zum Verschwinden des strukturspezifischen CD-Signals im Zuge der Öffnung der Haarnadelstruktur.

## 2.5 Belichtungsexperimente unter Verwendung von Natriumdithionit

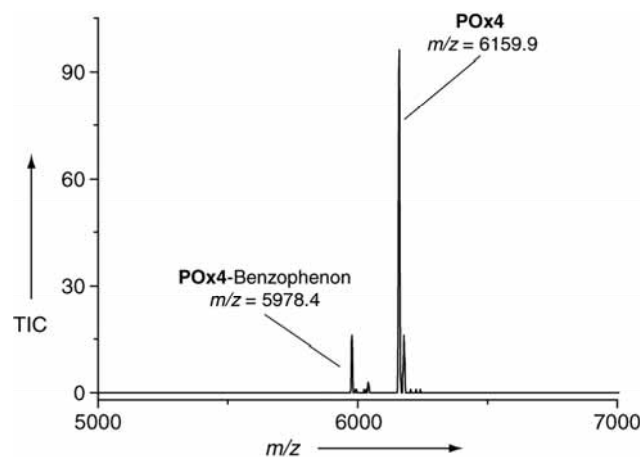
Nach eingehender Charakterisierung der synthetisierten DNA-Haarnadeln konnten die ersten Elektronentransfermessungen stattfinden. Dafür wurde nach dem in der Arbeitsgruppe *Carell* langjährig praktizierten und optimierten Protokoll vorgegangen. In eine mit einem Gummiseptum verschlossene Fluoreszenzküvette wurden 150  $\mu$ L der jeweiligen DNA-Lösung ( $c_{\text{DNA}} = 20$   $\mu$ M, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)) gegeben und durch mehrminütiges Einleiten eines Argonstroms entgast. Danach wurden 15  $\mu$ L einer frisch bereiteten, alkalischen Natriumdithionitlösung zugegeben. Hierdurch wurde das Flavin deprotoniert und reduziert, was am Verschwinden der Gelbfärbung der Lösung zu beobachten war. Nun wurden die Proben mit einer 1000 W-Xe-Lampe bei 10 °C unter Argon für 40 min belichtet, wobei in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen wurden. Diese wurden durch Schütteln unter Luftzutritt reoxidiert und anschließend per *rp*-HPLC untersucht. Die bequeme Untersuchung per HPLC war hier möglich, da durch die elektronentransferinduzierte Abspaltung des Benzophenons eine so große Polaritätsänderung auftrat, dass Edukt- und Produktstrang mit einem geeigneten Gradienten basisliniengetrennte Signale lieferten.

Ein Wasserfalldiagramm der aus der Belichtung von Strang **POx1** erhaltenen HPL-Chromatogramme ist in Abb. 28 dargestellt. Erkennbarerweise fand eine saubere Umsetzung des Eduktstrangs zum korrespondierenden Produktstrang ohne Benzophenon statt, es sind keine nennenswerten Nebenprodukte zu beobachten.



**Abb. 28.** Elektronentransferinduzierte Spaltung der DNA-Haarnadel **POx1** in Abhängigkeit von der Belichtungszeit.

Die Identität des Produktpeaks wurde bei allen Haarnadeln auch durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt. So zeigt Abb. 29 einen Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-Massenspektrum der DNA-Haarnadel **POx4** nach 30 Minuten Belichtungszeit. Hier sind deutlich der Eduktstrang und der gesplante Strang zu erkennen ( $m/z = -182 \equiv$  -Benzophenon). Darüber hinaus sind keine weiteren Spaltprodukte zu erkennen.



**Abb. 29.** Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-Massenspektrum des Strangs **POx4** nach 30minütiger Belichtungszeit (positiver Modus, HPA-18-Krone-6-Matrix).

Trägt man für alle Haarnadeln die gemessenen Spaltungsausbeuten (bestimmt über computerunterstützte Integration der entsprechenden Peakflächen) gegen die Belichtungszeit auf, und approximiert die Daten mit einer geeigneten Exponentialfunktion, so erhält man das folgende, in Abbildung 30 dargestellte Bild:

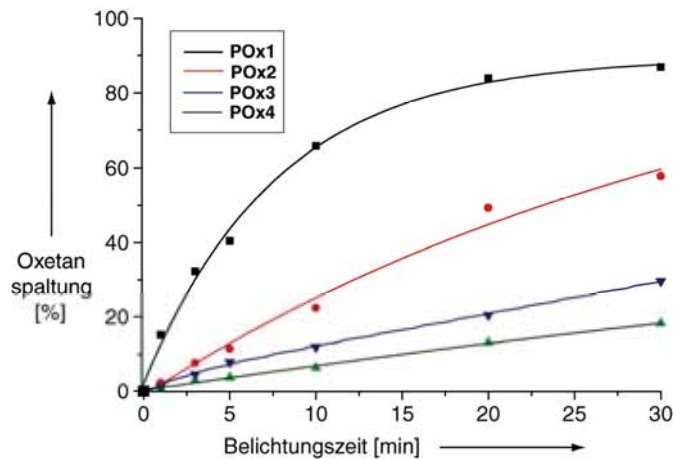


Abb. 30. Spaltungsausbeuten der DNA-Haarnadeln *POx1-4* in Abhängigkeit von der Belichtungszeit (jeweils aus mindestens drei unabhängigen Messungen bestimmt).

Schon in dieser Übersicht zeigen sich einige deutliche Unterschiede, sowohl in der Startgeschwindigkeit als auch in der insgesamt erreichten Ausbeute. Dies zeigt sich allerdings noch deutlicher im folgenden Balkendiagramm, in welchem die aus den Kurven abgetragenen Anfangsspaltungsausbeuten dargestellt sind; zusätzlich sind die mit den korrespondierenden Strängen *UOx1-4* von Hennecke (gleiche Sequenz, anstelle des Oxetans 77 liegt 78 vor) erhaltenen Werte aufgetragen (Abb. 31). In der darunter befindlichen Tabelle 8 sind die gemessenen Oxetanspaltungsausbeuten nochmal als Zahlenwerte aufgelistet.

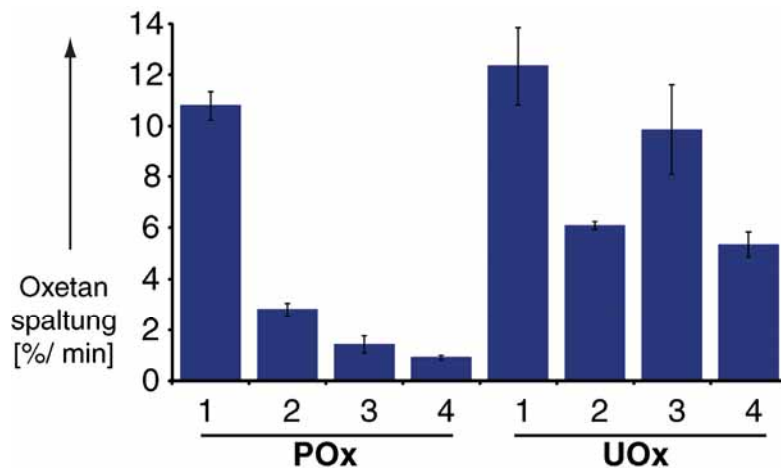


Abb. 31. Anfangsspaltungsgeschwindigkeiten der DNA-Stränge *POx1-4* und *UOx1-4*, angegeben in % Spaltung/min.



Nr.	POx1	POx2	POx3	POx4	UOx1	UOx2	UOx3	UOx4
<i>Spaltungs- ausbeute [%/min]</i>	10.9	3.0	1.7	1.0	12.2	6.0	9.8	4.9

**Tabelle 8.** Für die DNA-Haarnadeln **POx1-4** und **UOx1-4** bestimmte Oxetanspaltungsausbeuten (%/min).

Betrachtet man zunächst die Stränge, welche den von *U. Hennecke* synthetisierten Oxetanbaustein **78** enthalten, so lassen sich gewisse Trends erkennen. Vergleicht man die Anfangsgeschwindigkeiten der Stränge **UOx1** und **UOx3**, bzw. **UOx2** und **UOx4**, dann erkennt man zunächst die zu erwartende, geringe Abstandsabhängigkeit in der Effizienz des Elektronentransfers. Dies steht im Einklang mit dem gängigen Modell, wonach sich der Transport von Überschusselektronen in DNA durch einen thermisch aktivierten *Hopping*-Mechanismus beschreiben lässt. Hierfür konnten sowohl unsere, als auch verschiedene andere Forschergruppen eine Fülle an Belegen liefern.<sup>[209, 212, 216]</sup> Der beobachtete Abfall der Spaltungseffizienz um ca. einen Faktor 1.5 pro Basenpaar (ausgehend von den überaus schnellen > 12% in Strang **UOx1**) ist voll konsistent mit dieser Theorie und spricht für den bereits in der Einleitung beschriebenen *random walk*-Prozeß.

Darüber hinaus ist eine schwach ausgeprägte Sequenzabhängigkeit der ET-Effizienz festzustellen, wenn man die DNA-Haarnadeln **UOx1** und **UOx2** vergleicht. Der Austausch der AT-Basenpaare zwischen Flavindonor **35** und Akzeptor **78** führt zu einer Verringerung der Oxetanspaltungsausbeute um ca. 25 % pro GC-Basenpaar. Auch diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren, in der Gruppe *Rokita* gemachten Messungen, welche ebenfalls eine Verlangsamung des Elektronentransferprozesses durch den Einbau von GC-Basenpaaren zum Ergebnis hatten. Die unter Verwendung der bromhaltigen Nukleoside bestimmten Daten (siehe Kapitel 3) konnten also auch mit dem außerhalb des  $\pi$ -Stapels, in der großen Furche der DNA positionierten Akzeptor **78** bestätigt werden, im Gegensatz zu den früher mit dem T=T-Dimer **34** gemachten Experimenten.<sup>[223]</sup> Dies ist durchaus bemerkenswert, wenn man bedenkt, dass das Oxetan **78** über einen relativ rigiden Alkin-*Spacer* befestigt ist und ca. 10 Å in die Lösung hineinragt, ohne mit dem Duplex in unmittelbarem Kontakt zu stehen.

Die Stränge **POx1-4**, welche den Akzeptor **77** enthalten, lieferten unter den oben angesprochenen Kriterien kein so einheitliches Bild. Diese Tatsache ist allerdings nicht wirklich überraschend, wenn man sich in Erinnerung ruft, in welchem starkem Maße **77** seine lokale Umgebung

in der DNA verzerrt. Aus der Betrachtung ausnehmen muss man in jedem Fall den Strang **POx1**, welcher eine abnormal hohe Spaltungsrate aufweist. Der Grund hierfür ist wohl, dass die nur 3 AT-Basenpaare zwischen dem Donor und dem stark destabilisierenden Akzeptor nicht ausreichend sind, um in diesem Bereich eine stabile Duplexstruktur aufzubauen; dies zeigt sich auch darin, dass diese Haarnadel den mit Abstand niedrigsten Schmelzpunkt aller vermessenen Duplexe besitzt. Hierdurch können die Basenpaare gegeneinander „verrutschen“, wodurch sich der Donor-Akzeptor-Abstand signifikant verringert. Der niedrige Abstand wiederum erklärt im Einklang mit den bestehenden Mechanismen die sehr hohe Spaltungsgeschwindigkeit. Dieser Effekt wurde im Übrigen schon früher beobachtet und erklärt beispielsweise auch die extrem hohen Spaltungsgeschwindigkeiten in Einzelsträngen und in DNA-Haarnadeln, welche Fehlpaarungen zwischen Donor und Akzeptor besitzen.

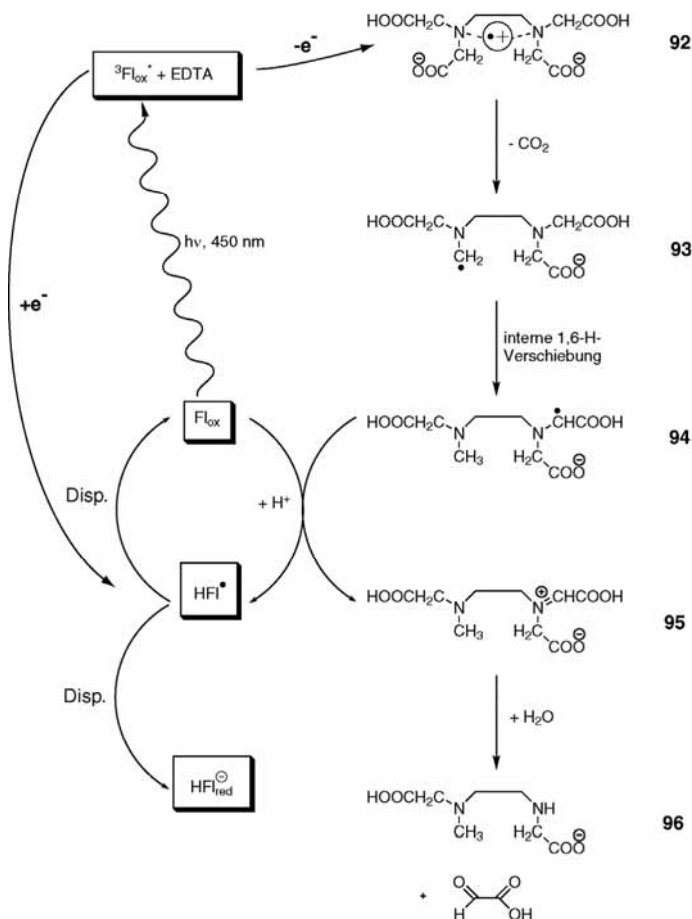
Bei den Strängen **POx1-4** ist zu konstatieren, dass die erreichten Oxetanspaltungsausbeuten allesamt deutlich unter den mit dem *Hennecke*-Oxetan **78** erzielten Werten liegen. Besonders augenscheinlich ist dieser Effekt, wenn man die Stränge **POx3** und **POx4** betrachtet, in denen 4 Basenpaare Donor und Akzeptor voneinander separieren. Da die Kernstruktur des Thyminoxetans in den Verbindungen **77/78** identisch ist, kann hier nicht mit einer unterschiedlichen Elektronenaffinität bzw. abweichendem Redoxpotential argumentiert werden. Ganz offensichtlich ist dieser Effekt eine Folge der lokalen Störung der DNA-Duplexstruktur, welche zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Elektronentransferprozesses führt. Es kann angenommen werden, dass es besonders die Störung der  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen ist, die das *Hopping* des Überschusselektrons zwischen den Basen, bzw. den Übergang des Elektrons auf den Akzeptor **77** negativ beeinflusst.

## 2.6 Belichtungsexperimente mit EDTA und N<sub>2</sub>O

In einem weiteren Satz von Belichtungsexperimenten wurde die Reduktion mit Dithionit durch eine EDTA-vermittelte Photoreduktion ersetzt. Der Grund hierfür war, dass die Belichtungen mit Dithionit oftmals unsauber verliefen, wie auch schon in früheren Arbeiten mit dem T=T-Dimer-Akzeptor **34** beobachtet werden konnte. Die Redoxchemie des Dithionits unter den Bedingungen der Reaktion ist sehr komplex, die Gefahr von Nebenreaktionen, welche mit dem Elektronentransfer interferieren können, ist dadurch akut gegeben. Wie auch Versuche in Kapitel 3 zeigen werden, waren die mit der EDTA-Photoreduktion erreichbaren Endausbeuten durchweg deutlich höher als bei der Verwendung von Dithionit als Reduktionsmittel, was eben ein Ausdruck verminderter Nebenreaktionen sein konnte.

Gleichzeitig waren die Anfangsgeschwindigkeiten der Spaltung im Rahmen der Fehlergrenzen nahezu identisch.

Der von *Traber, Kramer* und *Hemmerich* spektroskopisch aufgeklärte Mechanismus der Photooxidation ist im nachfolgenden Schema 52 dargestellt.<sup>[422]</sup>

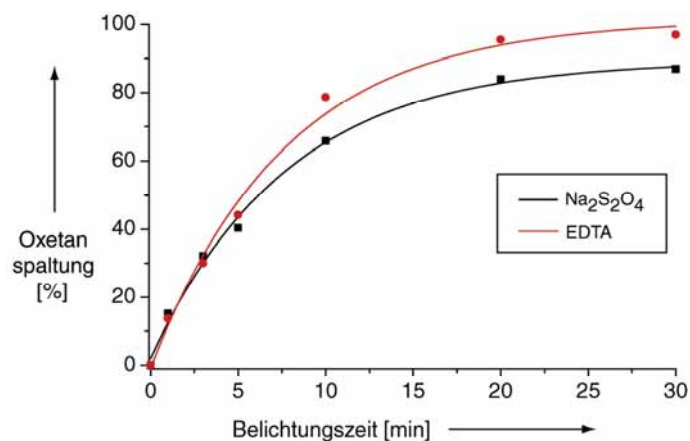


**Schema 52.** Mechanismus der EDTA-vermittelten Photoreduktion von Flavinen. Disp. = Disproportionierung.

Der erste Schritt der Reaktion ist die Anregung des oxidierten Flavins  $\text{Fl}_{\text{ox}}$  in den Triplettzustand  ${}^3\text{Fl}_{\text{ox}}^*$ . Dies wird durch die Belichtung mit Weißlicht erreicht, das Maximum der Anregungswellenlänge liegt bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . Das lichtangeregte Flavin ist dann in der Lage, vom EDTA irreversibel ein Elektron zu abstrahieren, wodurch einerseits das Flavinsemichinonradikal  $\text{HFI}^\bullet$  gebildet wird und andererseits das EDTA-Radikalkation **92** entsteht. Diese Spezies unterliegt einer sehr schnellen Decarboxylierung, wodurch das Radikal **93** gebildet wird. Durch eine intramolekulare 1,6-H-Verschiebung entsteht daraus das Radikal **94**. **94** kann dann ein Elektron auf ein weiteres oxidiertes Flavin übertragen, und dieses in die Semichinonform überführen. Die entstandene kationische Spezies **95**

hydrolysiert sehr schnell zu **96** und dem als Nebenprodukt anfallenden Glyoxylat. Die gebildeten zwei Flavinsemichinonradikale  $\text{HFl}^{\bullet}$  disproportionieren abschließend zu einem oxidierten Flavin  $\text{Fl}_{\text{ox}}$  und dem reduzierten, deprotonierten Flavinhydrochinon  $\text{HFl}_{\text{red}}^{-}$ . Betrachtet man die Gesamtstöchiometrie der Reaktion, so entsteht aus einem Molekül  $\text{Fl}_{\text{ox}}$  und einem Molekül EDTA ein Molekül  $\text{HFl}_{\text{red}}^{-}$  plus die genannten EDTA-Abbauprodukte. Das reduzierte Flavin steht hiernach für die eigentliche Belichtungsreaktion zur Verfügung, in welcher es durch Bestrahlung mit  $\lambda = 366 \text{ nm}$  in den angeregten Singulettzustand  $^1\text{HFl}_{\text{red}}^{-}$  überführt wird, aus dem heraus es Elektronen in die zu untersuchenden Oligonukleotide injizieren kann.

Für das Experiment wurden die DNA-Haarnadeln in einem EDTA-enthaltenden Puffer gelöst (10 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 7.4). Die Lösung wurde durch mehrminütiges Einleiten von Argon entgast. Zur Photoreduktion wurde die Küvette anschließend für 1-2 Minuten mit dem Weißlicht eines *Overhead*-Projektors bestrahlt, bis anhand der Entfärbung der Lösung die vollständige Reduktion des Flavins angenommen werden konnte. Bei den Strängen **POx2** und **POx4** (ebenso bei **UOx2** und **UOx4**) war die Fluoreszenz des Flavins aufgrund des benachbarten Desoxyguanosins weitgehend gelöscht, weshalb hier die Photoreduktion bis zu 4 Minuten dauerte. Die weitere Vorgehensweise war analog zu der für die Belichtung mit Dithionit beschriebenen. In der folgenden Abb. 32 ist die Spaltungsausbeute des Strangs **POx1** gegen die Belichtungszeit aufgetragen, einmal bei Reduktion mit Dithionit und im anderen Fall für die EDTA-Photoreduktion.

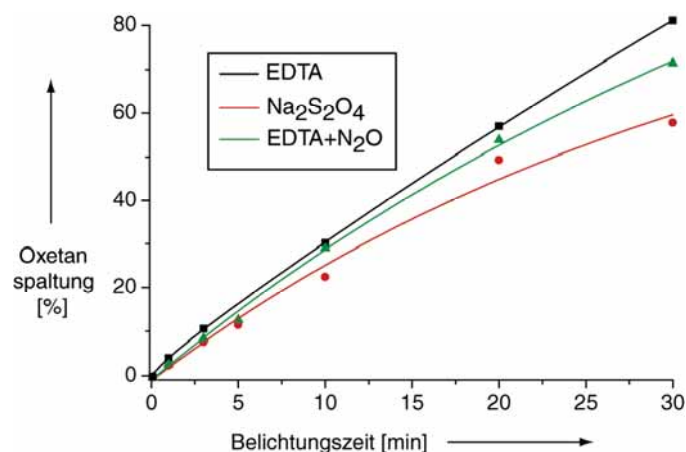


**Abb. 32.** Belichtung von Strang **POx1**; in schwarz) Verwendung von Dithionit als Reduktionsmittel; in rot) EDTA-Photoreduktion (jeweils aus mindestens drei unabhängigen Messungen bestimmt).

Wie man sieht, sind beide Kurven nahezu deckungsgleich. Die Anfangssteigung und damit auch die initialen Oxetanspaltungsraten sind sehr ähnlich, die Gesamtsplungsausbeute ist bei der EDTA-Photoreduktion allerdings noch 10-15 % höher und erreicht 100 %, d. h. vollständigen Umsatz, im Einklang mit der eingangs erwähnten Zurückdrängung von Nebenreaktionen. Ein vergleichbares Bild ergab sich auch für die Stränge **POx2**, **UOx1-2**, und **UOx4**, welche für diese Studie ausgewählt worden waren. Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass das zur Reduktion des Flavins eingesetzte Mittel auch im Falle oxetanmodifizierter DNA-Haarnadeln keinen signifikanten Einfluss auf die Anfangssplungsraten hatte, allerdings deutlich höhere Ausbeuten an Gesamtsplungprodukt lieferte.

Die EDTA-Photoreduktion wurde gewählt, um das folgende Experiment in Anwesenheit von Distickstoffmonoxid durchzuführen, da diese Prozedur sauberer und insofern verträglicher sein sollte. Um zu klären, ob der Elektronentransfer in unseren Modellsystemen wirklich durch den Basenstapel und nicht durch das umgebende Medium, an der DNA entlang, verläuft, wurde daher die Belichtung der Haarnadel **POx1** erneut unter den Bedingungen der EDTA-Reduktion durchgeführt. Zuvor wurden die verwendeten DNA-Lösungen mit Distickstoffmonoxid gesättigt und zusätzlich 3  $\mu\text{L}$  einer 20 mM Lösung von D-(+)-Mannitol zugegeben, um bei der evtl. Reduktion des  $\text{N}_2\text{O}$  entstehende OH-Radikale unschädlich zu machen.

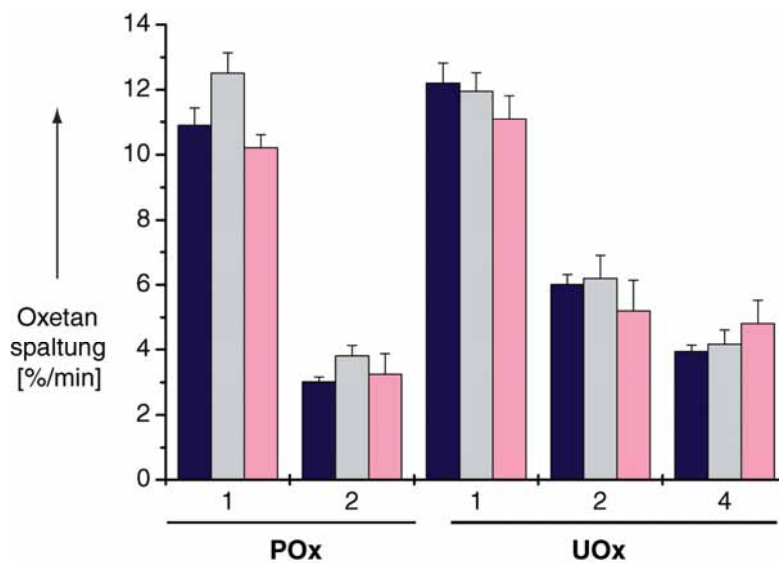
In der folgenden Abb. 33 ist die Belichtung des Strangs **POx2** unter den drei beschriebenen Bedingungen (Dithionit, EDTA, EDTA+N<sub>2</sub>O) dargestellt.



**Abb. 33.** Vergleich der Belichtungsausbeuten des Strangs **POx2** unter drei verschiedenen Reaktionsbedingungen; in schwarz) Dithionit-Reduktion; in grün) EDTA+N<sub>2</sub>O; in rot) EDTA.

Die Anfangsspaltungsausbeuten liegen, wie durch Auswertung der in aus Abb. 33 dargestellten Kurven ersichtlich, alle zwischen 2.9 %/min und 3.8 %/min, was im Rahmen der Fehlergenauigkeit sehr gut übereinstimmt. Der Wert für die Belichtung unter  $N_2O$ -Bedingungen liegt dabei genau zwischen denjenigen für die Belichtung unter Natriumdithionitbedingungen und EDTA-Photoreduktionsbedingungen, sowohl was die Startgeschwindigkeit als auch was die erreichte Endausbeute angeht. Damit kann festgestellt werden, dass die Anwesenheit von  $N_2O$  keinerlei Einfluss auf den Elektronentransport ausübt.

Abbildung 34 fasst die unter den verschiedenen, genannten Bedingungen gemessenen Anfangsspaltungsausbeuten für die Stränge **POx1-2** und **UOx 1-2,4** auf einen Blick zusammen:



**Abb. 34.** Vergleich der unter den verschiedenen beschriebenen Bedingungen erhaltenen Anfangsspaltungsgeschwindigkeiten der Stränge **POx1-2** und **UOx1-2,4**. (—  $Na_2S_2O_4$ , — EDTA, — EDTA +  $N_2O$ ).

Sichtbarerweise trifft die anhand des Strangs **POx1** gewonnene Erkenntnis auf alle vermessenen Haarnadeln zu: Die Spaltgeschwindigkeiten sind allesamt innerhalb der Fehlergrenzen identisch, unabhängig davon, welche Reduktions- und Belichtungsmethode gewählt wurde. Damit wurde eindeutig gezeigt, dass der reduktive Elektronentransfer tatsächlich durch den  $\pi$ -Basenstapel der DNA stattfindet und das Elektron sich zu keinem Zeitpunkt durch die umgebende Lösung bewegt. Wäre dies der Fall, hätte sich der Elektronentransport in Anwesenheit von Distickstoffmonoxid unterbrechen oder doch zumindest verlangsamen lassen müssen.

## 2.7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Verbindung **77** erstmals ein Thymidinoxetan-DNA-Festphasenbaustein synthetisiert werden. Da sich die Belichtung auf der Stufe des Nucleosids als ungeeignet erwies, wurde freies 3-Methylthymidin **83** eingesetzt, in einer *Paternó-Büchi*-Reaktion mit Benzophenon zum Thyminoxetan **86** verknüpft und anschließend stereoselektiv glykosidiert. In dieser interessanten Reaktion entstand wohl aufgrund der Sterik des Oxetans nur eines der bezüglich des Oxetans möglichen Isomere, das 5-(*R*)-Isomer, was auch durch eine Röntgenstruktur von Verbindung **87** bestätigt werden konnte (Abb. 35).

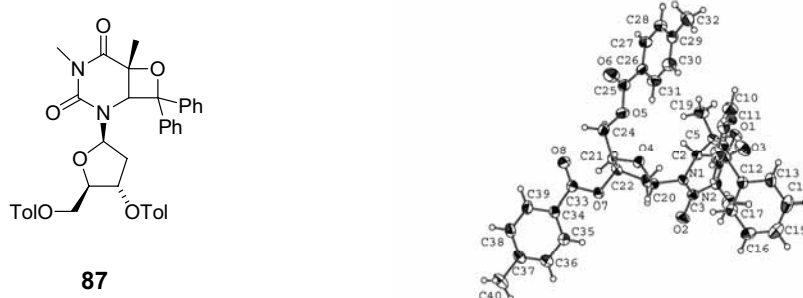


Abb. 35. Struktur des  $\beta$ -Nucleosids **87**. rechts) Röntgenkristallstruktur von Verbindung **87**.

Dies ist nach unserem Wissensstand das erstmalig, dass die Konfiguration des Edukts derartig direkten Einfluss auf den Ausgang der Glykosidierungsreaktion hat. Die für die Glykosidierung gute Gesamtausbeute von > 50 % bietet gute Chancen, die hier verwendete Methode in Zukunft auch für andere sterisch anspruchsvolle bzw. elektronisch unreaktive Substrate einzusetzen. Zum Teil wird dies derzeit schon bei der Synthese der modifizierten RNA-Basen *Queuosin* und *Archaeosin* in unserer Gruppe getan.<sup>[423]</sup> Die nachfolgende Einführung der für die Festphasensynthese nötigen Schutz- und Reaktivgruppen lieferte schließlich das Oxetanphosphoramidit in verlässlichen Mengen zwischen 200-300 mg. **77** konnte per Standardphosphoramiditchemie in Oligonucleotide eingebaut werden, einzig die Kupplungszeit musste verlängert und die Abspaltbedingungen etwas abgemildert werden. DNA-Haarnadeln nachfolgender Struktur konnten in routinemäßigen Ausbeuten von 5-10 % nach zweifacher chromatographischer Reinigung erhalten werden; Haarnadeln gleicher Struktur wurden zur selben Zeit von *U. Hennecke* unter Verwendung seines Oxetanbausteins **78** synthetisiert (Abb. 36):

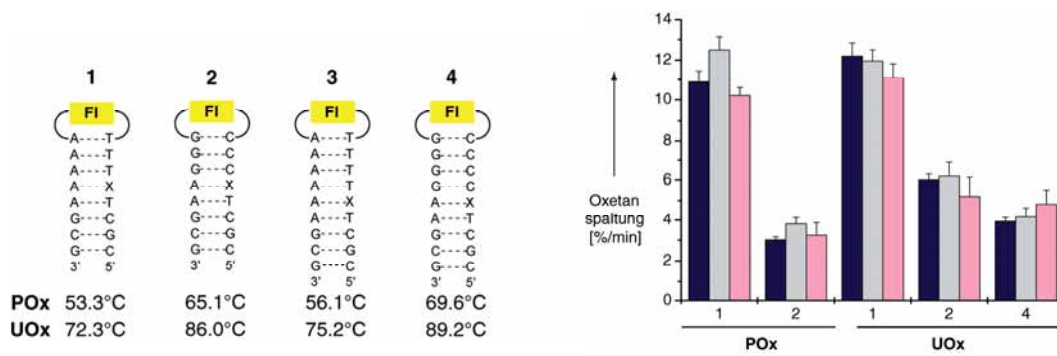


Abb. 36. Struktur der synthetisierten DNA-Haarnadeln, darunter angegeben die UV-Schmelzpunkte; rechts) Übersicht über die unter verschiedenen Reduktionsmethoden erhaltenen Oxetanspaltungsausbeuten.

Eingehende Charakterisierung zeigte, dass die DNA-Stränge **POx1-4** zwar in der Umgebung des Oxetans leichte Verzerrungen aufwiesen, ansonsten aber bis über Raumtemperatur stabile Duplexe in B-DNA-Konformation bildeten. Belichtungsexperimente zeigten, dass das Oxetan in allen Strängen durch Elektronentransfer vom reduzierten und deprotonierten Flavin **35** sauber gespalten wurde, wie schon durch die Modellexperimente von *Cichon* und *Friedel* impliziert worden war.

Die Spaltungsgeschwindigkeiten der Haarnadeln **POx1-4** lagen deutlich unter denen der Stränge **UOx1-4**; der Elektronentransfer wurde durch die lokal gestörte Duplexstruktur um das Oxetan **77** erheblich beeinträchtigt, mit Ausnahme des Strangs **POx1**, dessen übermäßig hohe Spaltungsgeschwindigkeit wohl auf „*slippage*“ der Basenpaare zwischen Donor und Akzeptor zurückzuführen war. Davon abgesehen zeigten alle DNA-Haarnadeln die aus früheren Studien schon erwartete schwache Abstandsabhängigkeit der Elektronentransfereffizienz, welche am besten durch einen thermisch aktivierten *Hopping*-Prozess beschrieben werden kann. Weiterhin war wie bei den bromnukleosidhaltenden Strängen (Kap. 3) ein schwacher Sequenzeffekt zu beobachten; jedes GC-Basenpaar verlangsamte den Prozess um ca. 25 %. Dies galt sowohl für die Experimente unter Verwendung von Dithionit als Reduktionsmittel als auch für die EDTA-Photoreduktion. Experimente unter N<sub>2</sub>O-Atmosphäre zeigten keinerlei Einfluss auf die Effizienz des Elektronentransfers, damit konnte einwandfrei gezeigt werden, dass der Transport von Überschusselektronen in unserem System durch den  $\pi$ -Basenstapel und nicht durch die umgebende Lösung stattfand (Abb. 36).

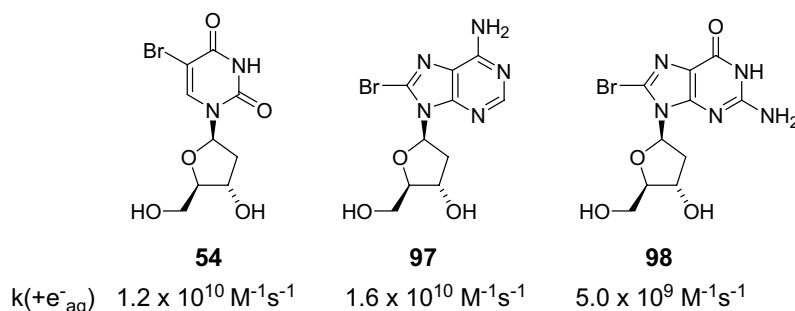


Abschließend kann gesagt werden, dass Oxetane sehr gut als Elektronenakzeptoren geeignet sind, vor allem, da ihre Spaltung zu gut unterscheidbaren, HPLC-trennbaren Fragmenten führt, welche die Auswertung der Belichtungsexperimente extrem erleichtern. Zudem sollten die relativ hohen Spaltungsausbeuten prinzipiell gestatten, auch Elektronentransfer in Strängen mit wesentlich höherem Donor/Akzeptorabstand zu detektieren, was bis jetzt aufgrund der nötigen sehr langen Belichtungszeiten nicht praktikabel war. Weitere Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit unter Verwendung gemischter Sequenzen und zur Richtungsabhängigkeit des Elektronentransfers könnten sich anschließen, um endgültige Klarheit über die theoretischen Grundlagen des Transfers von Überschusselektronen durch Oligonukleotide zu erhalten. In diesem Zusammenhang ist auch denkbar, vom Benzophenon zu einer anderen Carbonylkomponente überzugehen, z. B. Benzaldehyd oder Anisaldehyd; entsprechende, vom 1,3-Dimethylthymine abgeleitete Oxetane wurden in diesem Zusammenhang bereits von *Falvey* beschrieben.<sup>[231]</sup> Dies würde einerseits die sterische Hinderung im DNA-Strang verringern, andererseits könnte man vielleicht durch ein elektronisches „Feintuning“ der Substituenten das Redoxpotential des Oxetans auf den günstigst möglichen Wert senken, um die relevanten physikalischen Effekte auch optimal abbilden zu können.

### 3 Synthese und Elektronentransfereigenschaften flavin- und bromnukleosidenthaltender DNA-Haarnadeln

#### 3.1 Aufgabenstellung

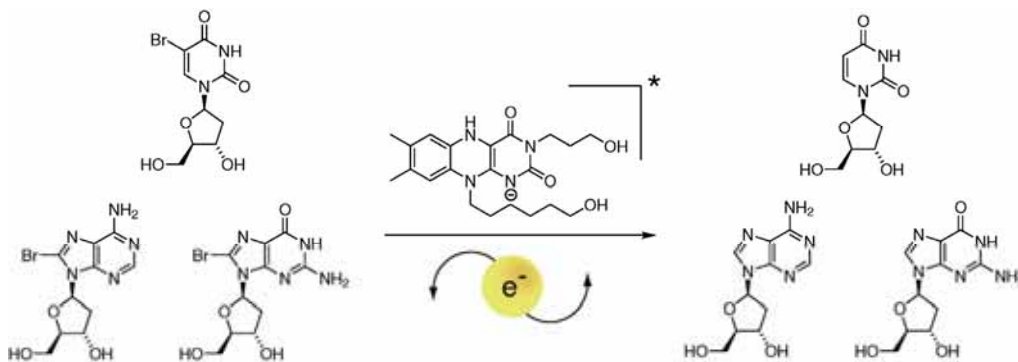
Ziel dieses Projektes war, ähnlich wie auch in Kapitel 2 beschrieben, die genauere Untersuchung der Sequenzabhängigkeit des Überschusselektronentransfers in Oligonukleotiden. Über diesen Punkt bestand, wie in der Einleitung geschildert, längere Zeit Unsicherheit aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse, die unter Verwendung verschiedener Systeme erhalten wurden. Während unsere Gruppe unter Verwendung des Flavin/T=T-Dimer Donor/Akzeptorsystems keinen Einfluss der Sequenz auf die Elektronentransfereffizienz feststellen konnte,<sup>[223]</sup> zeigten Messungen von *Rokita* bzw. *Wagenknecht* eine signifikante Verlangsamung der Prozesse durch die Anwesenheit von GC-Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor (letzterer in beiden Fällen 5-Br-Desoxyuridin **54**).<sup>[212, 216]</sup> Unsere damalige Erklärung hierfür war, dass die bis dato literaturbekannte, reduktive Öffnungsgeschwindigkeit des T=T-Dimers **34** ( $k \cong 10^6 \text{ s}^{-1}$ ) wahrscheinlich zu langsam sei (geschwindigkeitsbestimmender Schritt), um sequenzabhängige Unterschiede in der Elektronentransfergeschwindigkeit abbilden zu können. Daher rückten andere, schnellere Elektronenakzeptoren wie die zuvor beschriebenen Oxetane ins Zentrum des Interesses. Besonders naheliegend erschien in diesem Zusammenhang auch die Verwendung bromsubstituierter Nukleoside wie 5-Br-Desoxyuridin **54**, 8-Br-Desoxyadenosin **97** und 8-Br-Desoxyguanosin **98**, von denen aus Arbeiten von *Schuler* und *Chatgililoglu* bekannt war, dass ihre Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion durch solvatisierte Elektronen im diffusionskontrollierten Bereich liegen (Schema. 52).<sup>[218, 226, 227, 424]</sup>



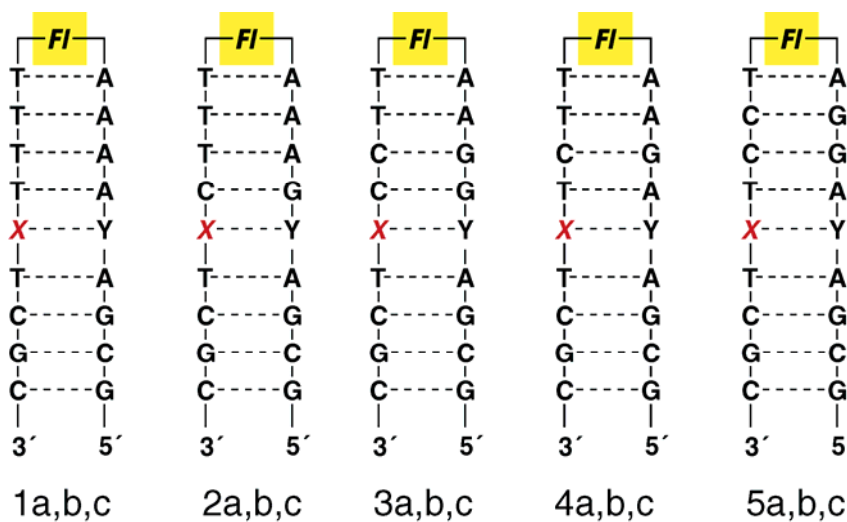
**Schema 52.** Struktur der als Akzeptor verwendeten bromsubstituierten Nukleoside **54**, **97-98**, darunter jeweils die Geschwindigkeitskonstanten für die Reduktion durch ein solvatisiertes Elektron.

## Synthese und Charakterisierung Flavin- und Bromnucleosid-enthaltender DNA-Haarnadeln

Nach der sehr schnellen Aufnahme des Elektrons folgt in allen Fällen als detektierbares Phänomen die Abspaltung eines  $\text{Br}^-$ -Anions. Das „Restnucleosid“ nimmt anschließend ein Proton auf, entweder aus dem umgebenden Medium, oder, wie vom 5-Br-Desoxyuridin **54** bekannt, durch Abstraktion eines C(1')- bzw. C(2')-Protons von einer benachbarten Desoxyribose-Einheit.<sup>[219]</sup> Das Endprodukt des Elektronentransfers ist damit die reduzierte, debromierte Base. Da auch das lichtangeregte, reduzierte und deprotonierte Flavin **35** aufgrund seines extrem niedrigen Redoxpotentials ( $E_0 = -2.6 \text{ V vs. NHE}$ )<sup>[206]</sup> in der Lage sein sollte, die angesprochenen Nucleoside reaktiv zu debromieren, wurde beschlossen, die folgenden DNA-Haarnadeln mit dem Flavin **35** im Kopf und je einem der Akzeptoren **45**, **97** bzw. **98** in der Stammregion herzustellen (Abb. 37 und 38).



**Abb. 37.** Reduktive Spaltung der bromsubstituierten Nucleoside durch das lichtangeregte, reduzierte und deprotonierte Flavin **35**.



**Abb. 38.** Sequenzen der zu untersuchenden DNA-Haarnadeln (Fl = Flavin **35**, X = Akzeptor **54** (Serie a), **97** (Serie b) bzw. **98** (Serie c), Y = adäquate Gegenbase).

Nach Synthese und Aufreinigung der oben genannten DNA-Stränge sollten damit, in Zusammenarbeit mit *A. Manetto*, Elektronentransfer-Belichtungsexperimente ausgeführt werden. Zur Reduktion des Flavins sollte sowohl Natriumdithionit als auch zum Vergleich mit der in Kapitel 2 geschilderten EDTA-Photoreduktion gearbeitet werden. Auf diese Weise sollte die Sequenzabhängigkeit sehr gut untersuchbar sein.

### 3.2 Synthese und Reinigung der DNA-Haarnadeln

Die Phosphoramidite der bromsubstituierten Nukleoside **54**, **97** und **98** waren in hinreichender Reinheit und Quantität käuflich zu erwerben (*GlenResearch*). Das Flavin-*H*-Phosphonat **35** wurde von *A. Manetto* nach einer Vorschrift von *C. Behrens* dargestellt.<sup>[210]</sup> Die DNA-Haarnadeln wurden mit dem *Expedite Nucleic Acid Synthesis System* mittels der bereits in Kapitel 2 geschilderten Standardphosphoramiditmethode, kombiniert mit dem zum Einbau des Flavins **35** nötigen *H*-Phosphonat-Kupplungs- und -oxidationsprotokoll in Ansatzgrößen von 1  $\mu\text{mol}$  synthetisiert. Daher soll hier auf die Details nicht noch einmal vertieft eingegangen werden. Die Bausteine **54**, **97** bzw. **98** wurden jeweils zweimal 5 min gekuppelt, die Kupplungszeit der nachfolgenden Base wurde wegen des leicht grösseren sterischen Anspruchs ebenfalls auf 5 min erhöht, obwohl dies vermutlich nicht zwingend notwendig gewesen wäre. Das Flavin **35** wurde 10 min gekuppelt, die nachfolgende Base 5 min. Wie auch bei den oxetanhaltigen DNA-Strängen (Kapitel 2) mussten die Oligonukleotide im Anschluss an die Synthese nach dem Protokoll von *Froehler* nachbehandelt werden, um vollständige Oxidation des *H*-Phosphonats zum Phosphat zu gewährleisten, ohne die es an dieser Stelle zum Strangbruch gekommen wäre.<sup>[421]</sup>

Extrem wichtig war es, die Abspaltung vom Träger milder als bei Standardoligonukleotiden zu handhaben. Zur Abspaltung und Entschützung der permanenten Schutzgruppen wurden die Stränge mit je 1 mL wässrigem Ammoniak/Ethanol 3:1 für ca. 6 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. In dieser kurzen Zeit konnte keine vollständige Entschützung der Oligonukleotide gewährleistet werden, längere Einwirkung führte jedoch zur Hydrolyse der Bromide, wodurch die OH- bzw. NH<sub>2</sub>-substituierten Basen entstanden. Noch mildere Abspaltbedingungen (0.05 M Kaliumcarbonat/Methanol) brachten hier keine Verbesserung. Im Gegenteil, es entstand zu gewissen Teilen das methoxysubstituierte Produkt. Die relativ ineffektive Entschützung führte in den meisten Fällen zu sehr komplexen Produktgemischen, aus denen das gewünschte Produkt nur schwer zu isolieren war. Dennoch konnten alle Haarnadeln nach zweifacher chromatographischer Reinigung, zunächst mit *rp*-HPLC, dann mit einem Anionenaustauscher (SAX-Säule) in Ausbeuten von ca. 5 % isoliert werden. Die präpa-

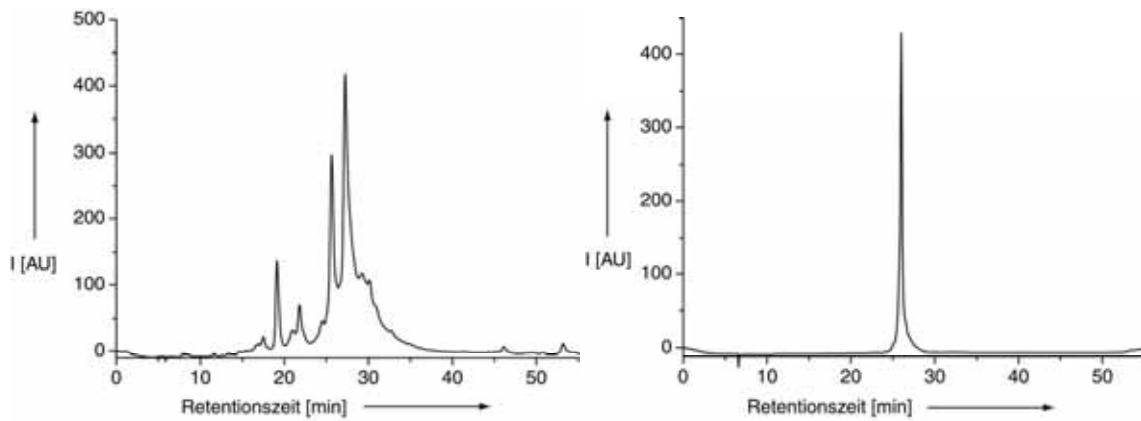
## Synthese und Charakterisierung Flavin- und Bromnukleosid-enthaltender DNA-Haarnadeln

rativen Reinigungen wurden aufgrund der meist beträchtlichen Stabilität der Duplexe bei 50 °C-60 °C durchgeführt, um möglichst vollständige Denaturierung zu gewährleisten. Die Trennung auf der SAX-Säule wurde in 10 mM Tris-HCl bei pH 7.4 ausgeführt, um Hydrolyse der Bromide, die bei den standardmäßig verwendeten Bedingungen (pH 12) eintrat, zu vermeiden. Nach Entsalzung (*SepPak™*) und Aufkonzentration per *SpeedVac* bei möglichst niedriger Temperatur wurden die folgenden DNA-Stränge erhalten (Tabelle 9):

Bezeichnung	Sequenz	UV-Smp. [°C]
H1c	5′-CGCT <b>G</b> *TTTT <b>FL</b> AAAACAGCG-3′	71.1
H2c	5′-CGCT <b>G</b> *TCTT <b>FL</b> AAGACAGCG-3′	74.8
H3c	5′-CGCT <b>G</b> *TCCT <b>FL</b> AGGACAGCG-3′	80.5
H4c	5′-CGCT <b>G</b> *CTTT <b>FL</b> AAAGCAGCG-3′	77.9
H5c	5′-CGCT <b>G</b> *CCTT <b>FL</b> AAGGCAGCG-3′	79.3
H1b	5′-CGCT <b>A</b> *TTTT <b>FL</b> AAAATAGCG-3′	66.4
H2b	5′-CGCT <b>A</b> *TCTT <b>FL</b> AAGATAGCG-3′	70.1
H3b	5′-CGCT <b>A</b> *TCCT <b>FL</b> AGGATAGCG-3′	76.3
H4b	5′-CGCT <b>A</b> *CTTT <b>FL</b> AAAGTAGCG-3′	71.4
H5b	5′-CGCT <b>A</b> *CCTT <b>FL</b> AAGGTAGCG-3′	74.1
H1a	5′-CGCT <b>U</b> *TTTT <b>FL</b> AAAAAAGCG-3′	73.3
H2a	5′-CGCT <b>U</b> *TCTT <b>FL</b> AAGAAAGCG-3′	70.8
H3a	5′-CGCT <b>U</b> *TCCT <b>FL</b> AGGAAAGCG-3′	76.7
H4a	5′-CGCT <b>U</b> *CTTT <b>FL</b> AAAGAAGCG-3′	73.7
H5a	5′-CGCT <b>U</b> *CCTT <b>FL</b> AAGGAAGCG-3′	77.2
H6b	5′-CGCT <b>A</b> *CCCC <b>FL</b> GGGGTAGCG-3′	72.4
H6a	5′-CGCT <b>U</b> *TATT <b>FL</b> AATAAAGCG-3′	74.4

**Tabelle 9.** Sequenz, Bezeichnung und UV-Schmelzpunkte der synthetisierten Oligonukleotide (Fl = Flavin 35, X = 5-Br-dU (Serie a), 8-Br-dA (Serie b) oder 8-Br-dG (Serie c)).

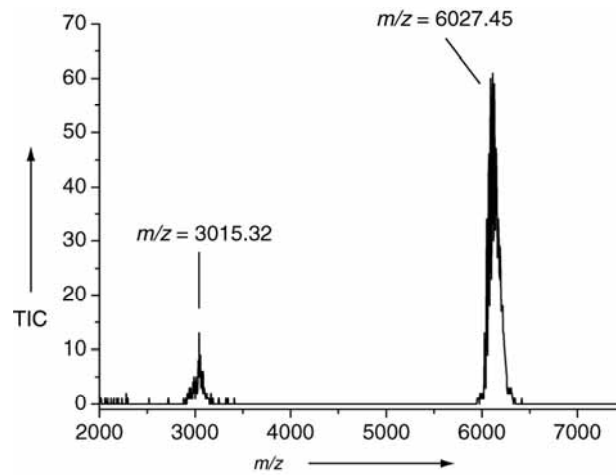
Die Effizienz der HPLC-Aufreinigung zeigt Abb. 39, in welcher ein analytisches Roh- und ein Endchromatogramm des Stranges H2a dargestellt sind. Das beim gereinigten Strang auftretende starke *tailing* zeigten übrigens fast alle Haarnadeln und ist wohl Ausdruck der hohen Stabilität der Duplexe, die selbst auf der HPLC keine vollständige Denaturierung aufwiesen; das Vorhandensein verschiedener Konformationen führte dann sehr oft zu solchen abnormalen Peakformen.



**Abb. 39.** links) analytisches Rohchromatogramm von **H2a**. rechts) nach zweifacher HPLC-Reinigung. Die leicht unterschiedlichen Retentionszeiten wurden durch geringfügige Abweichungen in der Pufferzusammensetzung verursacht. Die Chromatogramme wurden bei 60 °C aufgenommen.

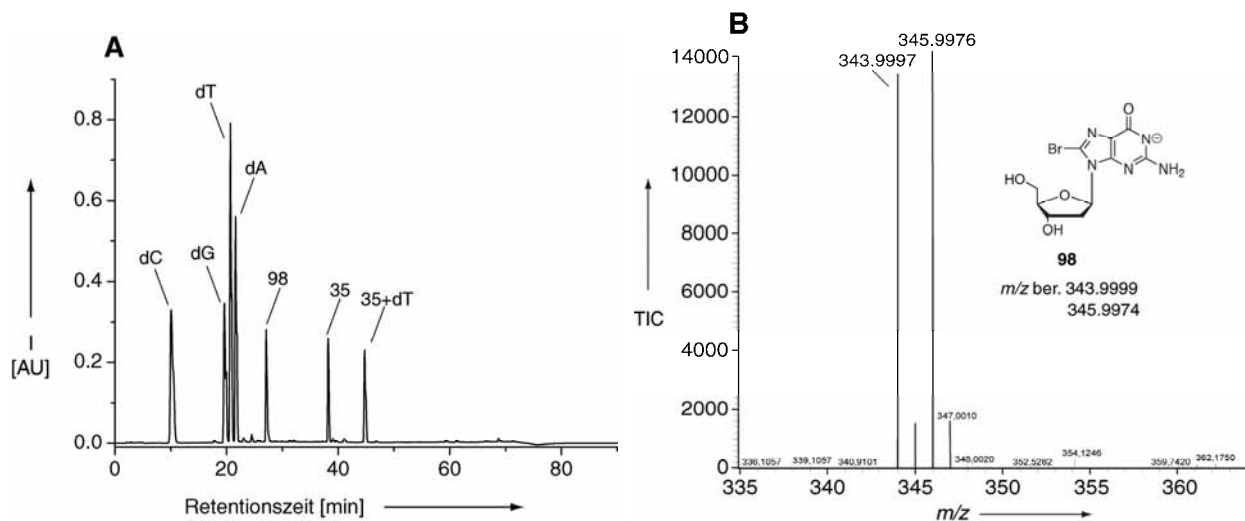
### 3.3 Charakterisierung der DNA-Haarnadeln

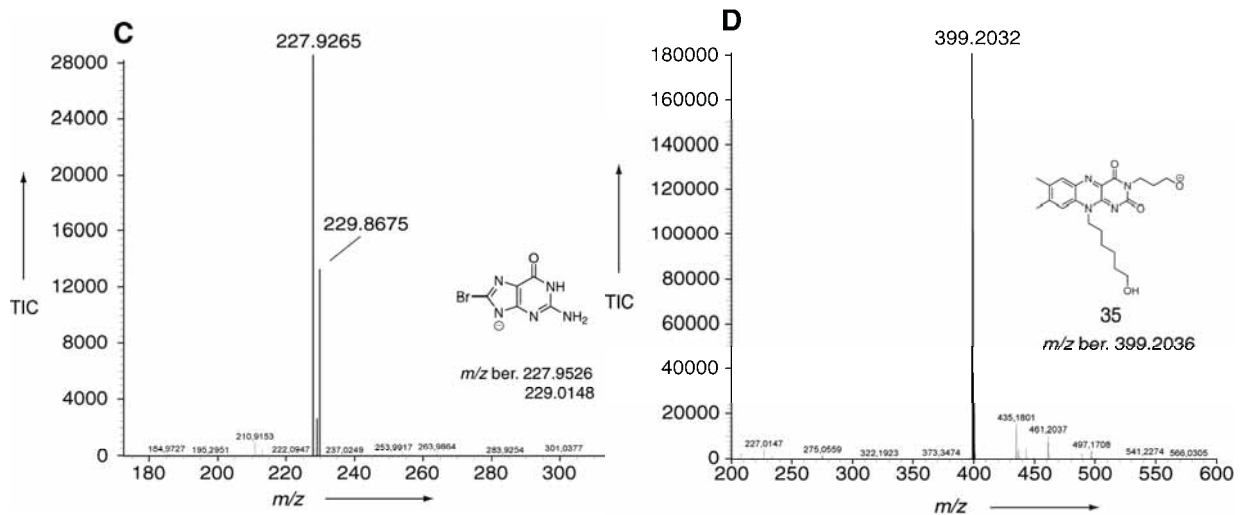
Zur Charakterisierung der Haarnadeln wurden MALDI-TOF-Massenspektren der vollständig aufgereinigten Moleküle aufgenommen. Dabei stimmten die ermittelten molekularen Massen im Rahmen der geräteeigenen Toleranzgrenzen in allen Fällen mit den vorausgesagten Massen überein. Eine Tabelle der berechneten und gefundenen Massen ist im Experimentellen Teil zu finden. Das Entsalzen der Proben für die Messungen (per Dialysemembran oder *ZipTip*<sup>TM</sup>) war hier in den meisten Fällen nicht sehr effizient, so dass die erhaltenen Massenspektren immer noch eine Schar von Salzadduktpeaks zeigten. Dieser Mangel konnte auch unter Verwendung der speziellen *HPA*-Matrix (Zusatz von 15-Krone-5 und Diammoniumhydrogencitrat, siehe Experimenteller Teil) nur in manchen Fällen beseitigt werden. Dennoch war in allen Fällen die Homogenität und Identität der gereinigten Oligonukleotide gewährleistet. Als Beispiel ist nachfolgend das Massenspektrum des Strangs **H1a** abgebildet (Abb. 40).



**Abb. 40.** MALDI-TOF-Massenspektrum des gereinigten Strangs **H1a** (positiver Modus, Matrix 3-HPA).

Neben dem Molekülpeak ( $m/z = 6027.5$ , ber. 6023.3) ist auch das doppelt geladene Signal ( $m/z = 3015.32$ ) zu erkennen, Fremdpeaks traten nicht auf. Wichtig war die Feststellung, dass es auch bei der Ionisierung im MALDI-TOF-Massenspektrometer nicht zu einer Abspaltung des Bromids kam, so dass hier, wie auch im Falle der Oxetanstränge, eine qualitative Untersuchung der Spaltung (im Zuge der Belichtungsexperimente) per Massenspektrometrie möglich sein sollte. Als weiterer Beleg der Intaktheit der Stränge und der Unversehrtheit der bromsubstituierten Nucleoside nach Einbau, Entschützung und Aufreinigung wurde ein enzymatischer Totalverdau mit je einem Strang pro Akzeptor durchgeführt und per ESI-LC-MS/MS analysiert. Die genaue Durchführung wurde in Kapitel 2 geschildert und findet sich detailliert im Experimentellen Teil. In untenstehender Abb. 41 ist das HPL-Chromatogramm eines LC-MS/MS-Laufs eines Verdau von Strang **H2c** dargestellt, zusammen mit den Massenspektren der relevanten Signale.





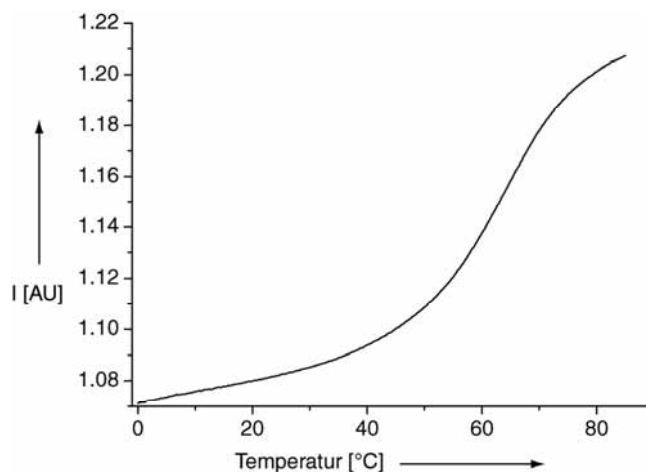
**Abb. 41.** *A:* HPL-Chromatogramm (260 nm) eines enzymatischen Totalverdaus von Strang **H2c**. *B:* ESI-Massenspektrum der bei Retentionszeit 27.1 min eluierten Spezies **98**. *C:* MS/MS-Fragmentierungsmuster (Ionenfalle) des in **B** dargestellten Ions. *D:* ESI-Massenspektrum der bei Retentionszeit 38.2 min eluierten Spezies **35**.

Im HPL-Chromatogramm (260 nm) eines enzymatischen Totalverdaus der DNA-Haarnadel **H2c** konnten deutliche Signale für sowohl die natürlichen als auch die modifizierten Nucleoside erhalten werden, die Zuordnung erfolgte dabei aufgrund der charakteristischen UV-Vis-Absorptionen und der Übereinstimmung des gemessenen ESI-FTICR-Massenspektrums mit den berechneten molekularen Massen. Das 8-Br-Desoxyguanosin **98** konnte als der Peak bei der Retentionszeit 27.1 Minuten identifiziert werden, das sehr gut übereinstimmende Massenspektrum ist in **B** dargestellt; die beiden Signale rühren von der natürlichen Isotopenverteilung des Broms her. Im MS/MS-Spektrum dieser Signale tritt nahezu ausschließlich die aus dem Bruch der glykosidischen Bindung entstehende freie Base auf, wiederum zeigen die Fragmentationen im Rahmen der Genauigkeit des Ionenfallenanalyzers eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Massen, wie in **C** gezeigt ist.

Neben **98** wurde auch der Flavinbaustein **35** als die bei der Retentionszeit 38.2 Minuten eluierende Spezies identifiziert. Das ESI-FTICR-Massenspektrum ist in **D** abgebildet. Das HPLC-Signal bei der Retentionszeit 44.7 Minuten rührt von dem bereits in Kapitel 2 erwähnten **35**+dT-Dinucleotid her, das durch unvollständigen Verdau im Bereich des Flavins auftrat.



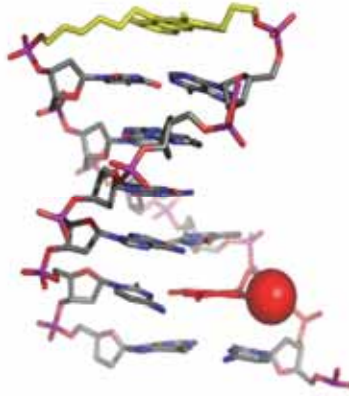
Weiterhin wurden UV-Schmelzkurven der Stränge aufgenommen, um die Ausbildung einer stabilen Duplexstruktur zu bestätigen. Die Vorgehensweise entspricht exakt der im Kapitel 2 vorgestellten, daher soll hier nicht noch einmal darauf eingegangen werden. Die ermittelten Schmelzpunkte sind in Tabelle 9 aufgeführt. Als ein Beispiel ist die bei 260 nm erhaltene Schmelzkurve der DNA-Haarnadel **H1b** abgebildet (Abb. 42).



**Abb. 42.** UV-Schmelzkurve (260 nm) von Strang **H1b**.

Alle DNA-Stränge zeigten normales Schmelzverhalten mit einem gut definierten Schmelzpunkt. Obwohl 8-Br-Desoxyadenosin **97** und 8-Br-Desoxyguanosin **98** dafür bekannt sind, die *syn*-Konformation zu stabilisieren,<sup>[425]</sup> konnte ein Einfluss auf das Schmelzverhalten, z. B. in Form eines zweiten Schmelzpunkts oder einer Hysterese, nicht beobachtet werden. Alle Schmelzpunkte lagen sehr hoch, was im Einklang mit der erhöhten Stabilität von Haarnadeln gegenüber Doppelsträngen steht, ferner korrelierten sie weitestgehend mit der Anzahl und Lage der GC-Basenpaare in den Duplexen.

CD-Experimente zeigten ebenfalls das Vorhandensein stabiler DNA-Duplexe an, die Stränge wiesen die für die *Watson-Crick-B*-Konformation typischen Maxima und Minima auf. Dies wurde überdies durch eine von *J. Gierlich* ausgeführte *molecular modeling*-Strukturberechnung einer 6-Basenpaar-Minimal-DNA-Haarnadel bestätigt, die wie die synthetisierten Stränge das Flavin **35** im Kopf und ein 8-Br-Desoxyguanosin **98** im Stamm trug. (Abb. 43).



**Abb. 43.** Von J. Gierlich berechnetes Strukturmodell einer Minimal-DNA-Haarnadel mit dem Flavin 35 (in gelb) und einem 8-Br-dG 98 als Akzeptor. Das nach außen in die große Furche weisende Bromatom wurde in rot hervorgehoben und vergrößert dargestellt (SYBYL 6.8, MMFF94, 8 ps MD in Wasser).

Erkennbarerweise ist die Duplexstruktur nicht gestört, das Flavin 35 legt sich, wie bereits in früheren Rechnungen gezeigt, optimal auf den  $\pi$ -Basenstapel der DNA, was für den effizienten Elektronentransfer von entscheidender Bedeutung ist.

### **3.4 Belichtungsexperimente unter Verwendung von Dithionit und EDTA als Photoreduktionsmittel**

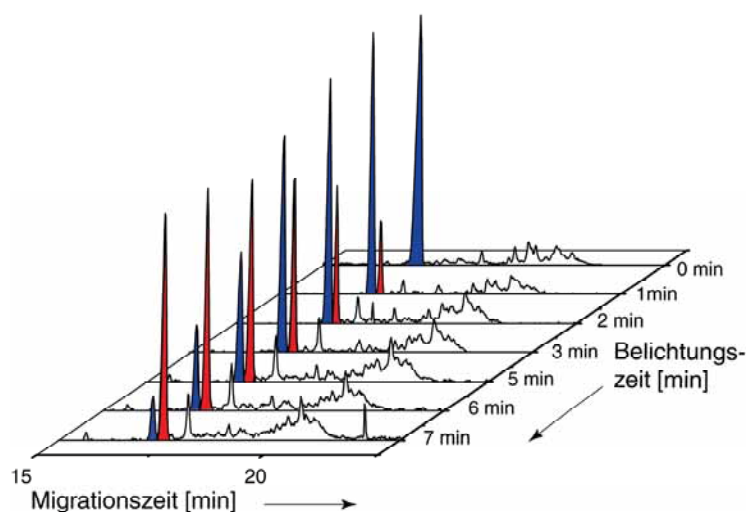
Nach Abschluss der Charakterisierung der DNA-Stränge konnten die ersten Elektronentransfermessungen unter Verwendung von Dithionit zur Reduktion des Flavins durchgeführt werden. Es wurde das in unserer Gruppe etablierte Standardprotokoll verwendet; insgesamt 150  $\mu\text{L}$  einer Lösung von 20  $\mu\text{M}$  DNA in 10 mM Tris-HCl und 150 mM NaCl wurden in eine Fluoreszenzküvette gegeben, mit einem Gummiseptum verschlossen und durch Einleiten eines Argonstroms über 20 min sauerstofffrei gespült. Zur Reduktion des Flavins wurden anschließend unter Lichtausschluss 15  $\mu\text{L}$  einer frisch bereiteten, alkalischen Lösung von Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) zugesetzt, woraufhin unmittelbare Entfärbung der Lösung eintrat. Die Küvette wurde in der gruppeneigenen Belichtungsapparatur bei 10 °C unter Argon mit einer 1000 W-Xe-Lampe belichtet, welche mit Wasserkühlung und einem  $>340$  nm *cut-off*-Filter ausgestattet war. Im Zuge der Belichtung wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben

## Synthese und Charakterisierung Flavin- und Bromnukleosid-enthaltender DNA-Haarnadeln

entnommen und unter Lichtausschluss und Luftzutritt für 1-2 Stunden zur Reoxidation des Flavins inkubiert.

Da sich allerdings bereits im Verlauf der ersten Experimente zeigte, dass die Belichtungsreaktion unsauber und die erreichten Gesamtpaltungsausbeuten sehr niedrig waren, wurde stattdessen für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen die in Kapitel 2 beschriebene EDTA-Photoreduktionsmethode angewendet. Sie lieferte höhere Ausbeuten, sauberere Umsetzungen und damit auch besser auswertbare, kinetische Daten. Hierzu wurden die Oligonukleotide in einem EDTA-enthaltenden Puffer (10 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 7.4), gelöst und die Assaylösung durch ca. 20 minütiges Einleiten von Argon sauerstofffrei gemacht. Hiernach wurde die Lösung 1-2 min mit dem Weißlicht eines *Overhead*-Projektors (möglichst exakt im Fokus der Lampe) bestrahlt, bis das Flavin vollständig reduziert war. Belichtung, Probenentnahme und Reoxidation verliefen dann wie oben dargestellt. Durch die Anwendung dieser Methode konnte ein stabil reduziertes System für über eine Stunde aufrechterhalten werden.

Vorversuche hatten gezeigt, dass die elektronentransferinduzierte Abspaltung des Bromatoms zu keiner sichtbaren Änderung der Retentionszeit auf der *reversed phase*-HPLC führte. Auch die Anwendung sehr flacher Gradienten und sehr langer Läufe führte zu keiner Trennung, im Gegenteil, es trat hier eine signifikante Verzerrung der Peakformen auf. Der Versuch der Trennung von Produkt und Edukt auf einer SAX-Anionenaustauschersäule führte ebenfalls nicht zum Erfolg. Letztendlich gelang die Trennung der sehr ähnlichen Oligonukleotide mittels Kapillargelelektrophorese (CE). Die Proben mussten dafür mittels *ZipTip*<sup>TM</sup>*C<sub>18</sub>*-Pipetenspitzen gründlich entsalzt und aufkonzentriert werden, um auf der CE gut getrennte, auswertbare Signale ausreichender Stärke zu erhalten. Die Elektrophorese wurde auf einem *P/ACE-MDQ*-DNA-System der Fa. *BeckmanCoulter* ausgeführt, wobei Polyacrylamid-innenbeschichtete Quarzkapillaren verwendet wurden, die mit einem 6%igen unvernetzten Polyacrylamidgel gefüllt wurden. Als Laufpuffer wurde ein denaturierender 0.1 M TBE-Harnstoffpuffer (Zusammensetzung siehe Anhang **B**) verwendet. Da teilweise auch bei Verwendung dieses Puffers keine vollständige Denaturierung der Haarnadeln auftrat, so z. B. bei den sehr GC-reichen Strängen **H3c** oder **H3a**, wurde zusätzlich während der Trennung erhöhte Temperatur angelegt (zwischen 30 °C und 60 °C), da sonst keine ausreichende Auflösung der Signale erreicht werden konnte. Nach elektrokinetischer Injektion wurden die Oligonukleotide für 30-45 min bei 9 kV getrennt, die Stränge wurden währenddessen UV-spektroskopisch detektiert ( $\lambda = 254$  nm). In der folgenden Abb. 44 sind die Elektropherogramme der Belichtung des Strangs **H1a** in einem Wasserfalldiagramm aufgetragen.



**Abb. 44.** Zeitabhängige Debromierung des Strangs **H1a** (blau = Strang **H1a**, rot = debromierter Produktstrang). Die große Zahl an Signalen bei höherer Migrationszeit stellt ein Artefakt der Messung dar und stammt aus dem verwendeten Gelpuffer.

Aus dem blau unterlegten Eduktstrang **H1a** entstand in einer sauberen Spaltungsreaktion das in rot abgebildete, debromierte Produkt. Allerdings entstanden bei der Belichtung von 5-Br-Desoxyuridin enthaltenden Strängen auch Nebenprodukte, wenn auch in untergeordnetem Maße. Diese rühren vermutlich daher, dass das intermediär gebildete dU-Radikal ein H-Atom der benachbarten Desoxyribofuranose abstrahiert, woraufhin das Zuckerradikal die in der Einführung genannten Sekundärreaktionen eingeht. Diese Seitenreaktionen konnten allerdings nicht näher untersucht werden. Der Unterschied in der Migrationszeit zwischen Produkt und Edukt betrug nur 12 s, was nahe an der Auflösungsgrenze dieses sehr empfindlichen Geräts lag. Daher konnte auf der HPLC keinerlei Trennung der Signale beobachtet werden. Durch Integration der Peakflächen der CE-Signale wurden die Debromierungsausbeuten in Abhängigkeit von der Belichtungszeit bestimmt. Die erhaltenen Punkte wurden aufgetragen und unter Verwendung von *Microcal Origin* mit einer geeigneten Exponentialfunktion (Funktion *ExpAssoc*) approximiert.

Aus den Kurven wurden durch Ermitteln der Anfangssteigung die Anfangsausbeuten der Debromierungsreaktion in Abhängigkeit von der Belichtungszeit bestimmt. Diese sind in der folgenden Abbildung 45 graphisch aufgetragen, darunter sind die Zahlenwerte noch einmal tabellarisch aufgeführt (Tabelle 10).

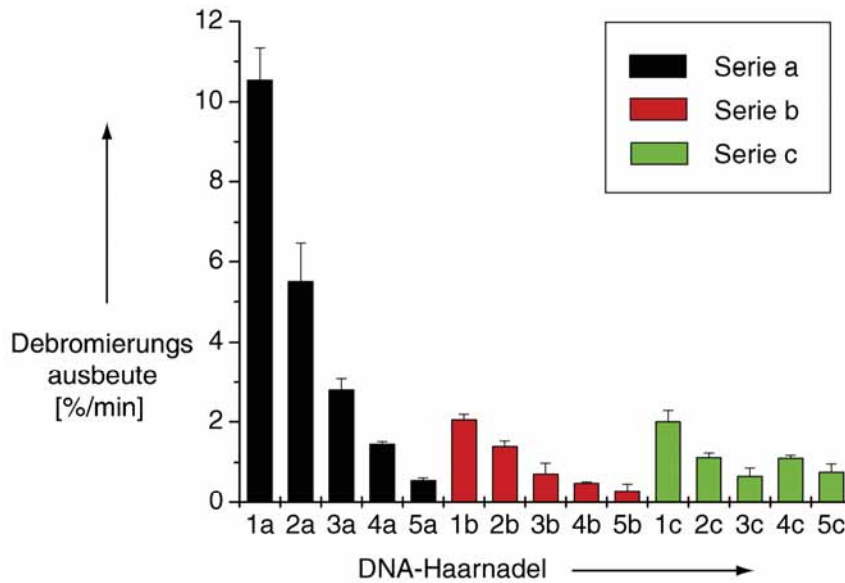


Abb. 45. Aus den Anfangssteigungen der Debromierungskurven ermittelte Anfangsausbeuten.

Nr.	H1a	H2a	H3a	H4a	H5a	H1b	H2b	H3b	H4b	H5b	H1c	H2c	H3c	H4c	H5c
Ausbeute [%/min]	10.6	5.5	2.8	1.5	0.6	2.1	1.4	0.7	0.5	0.3	2.0	1.1	0.7	1.1	0.8

Tabelle 10. Debromierungsausbeuten der belichteten Stränge H1-5a, H1-5b, H1-5c.

Aus den Daten konnten verschiedene Schlussfolgerungen gezogen werden. Am augenscheinlichsten ist die enorme Abhängigkeit der Debromierungsausbeuten von der Art des Akzeptors. Betrachtet man zunächst die Haarnadeln **H1a-c**, welche ausschließlich AT-Basenpaare zwischen Donor und Akzeptor enthalten, so zeigt sich, dass die Spaltung am schnellsten in den 5-BrdU enthaltenden Strängen erfolgte. Sie erreichte den sehr hohen Wert von 10.55 %/min im Strang **H1a** (Abb. 46).

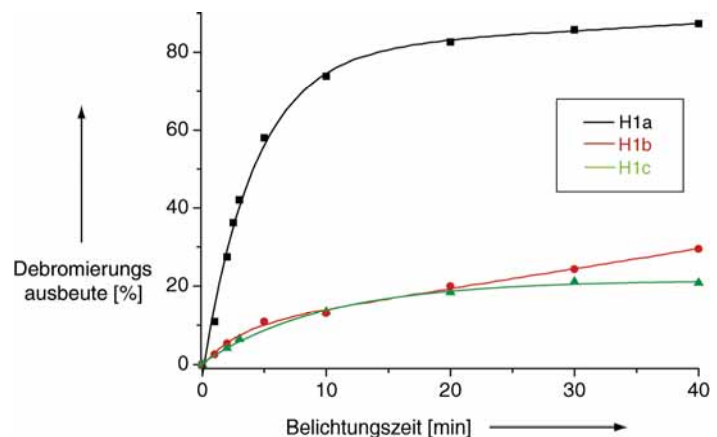
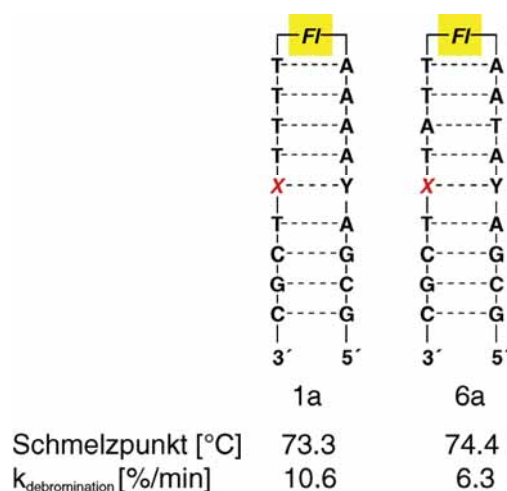


Abb. 46. Zeitabhängige Debromierung der 4AT-Stränge H1a, H1b, bzw. H1c.

## Synthese und Charakterisierung Flavin- und Bromnukleosid-enthaltender DNA-Haarnadeln

Um zu überprüfen, ob dieser sehr hohe Wert nicht aufgrund von „Verrutschen“ der 4 AT-Basenpaare gegeneinander und damit einer lokalen Annäherung von Donor und Akzeptor auftrat, wurde zusätzlich zu den oben gezeigten die Haarnadel **H6a** synthetisiert, in welcher eines der mittleren AT-Basenpaare umgekehrt ist. In dieser sollte die Möglichkeit zum Verrutschen unterdrückt sein. Der Strang zeigte in UV-Schmelzpunktstudien fast die gleiche Stabilität wie **H1a**, lieferte in der Belichtung aber nur Ausbeuten zwischen 6-7 %/min (Abb. 47). Ein Teil dieses Rückgangs liegt sicherlich in der niedrigeren Geschwindigkeit des Interstrang-Elektronentransfers begründet. Zusätzlich lag bei Strang **H1a** aber ebenso wie in der in Kapitel 2 beschriebenen Situation für den dortigen 3AT-Strang **POx1** wohl tatsächlich der Fall vor, dass es trotz global ähnlicher Stabilität durch lokal erhöhte Flexibilität im Bereich zwischen Donor und Akzeptor zu einer erhöhten Debromierungsausbeute kam.



**Abb. 47.** Gegenüberstellung der Stränge **H1a** und **H6a** bzgl. Stabilität und Elektronentransfereffizienz. (X = 5-Br-dU **54**).

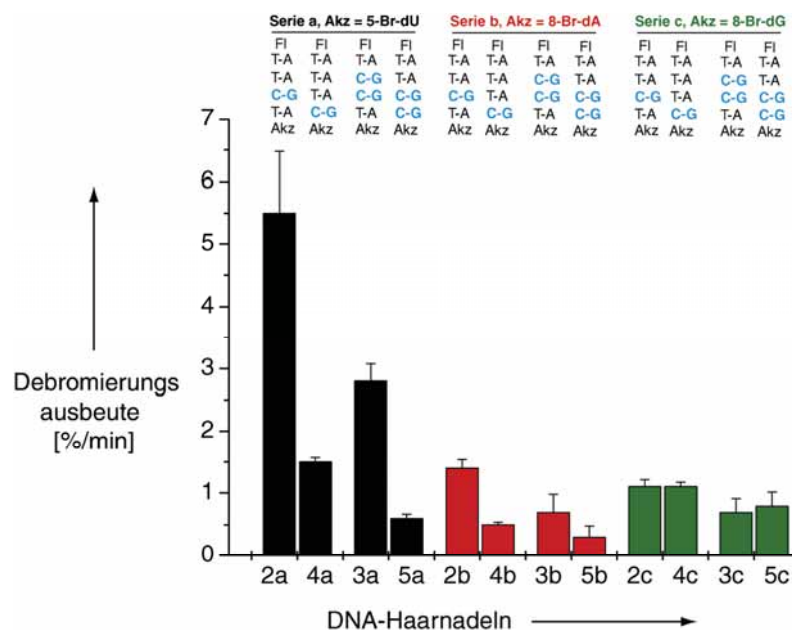
Bezüglich der Debromierungsausbeuten folgten in großem Abstand die 8-Br-Desoxyadenosin enthaltenden DNA-Haarnadeln, sehr ähnlich verhielten sich die Stränge mit dem 8-Br-Desoxyguanosin **98** als Elektronenakzeptor. Diese Reihung spiegelt exakt die vermutete Abfolge der Reduktionspotentiale wider. Während **54** sogar etwas leichter (ca. 40-50 mV) reduzierbar ist als Thymidin,<sup>[426]</sup> kann für **97** und **98**, ausgehend von den Redoxpotentialen der nicht bromierten Basen,<sup>[15]</sup> eine wesentlich geringere Elektronenaffinität angenommen werden (Genaue Werte für **97** und **98** existieren bisher nicht, da sich diese Nukleoside unter den Bedingungen der Cyclovoltammetrie und Potentiometrie zersetzen und daher nicht vermessen werden können).

Dieser direkte Einfluss zeigt deutlich, dass im Elektronentransferprozess, welcher die Schritte der Elektroneninjektion, des Elektronentransports und des Elektroneneinfangs durch

den Akzeptor umfasst, in der Tat die Reduktion des Akzeptors der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein kann. Trotzdem also die Reduktion durch solvatisierte Elektronen für alle drei Akzeptoren im diffusionskontrollierten Bereich liegt, verläuft die Reduktion durch das sich in der DNA bewegendes Elektron wohl wesentlich langsamer, abhängig von der Elektronenaffinität des jeweiligen Akzeptors. Im Einklang mit der *Marcus*-Theorie sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit mit abnehmender thermodynamischer Triebkraft der Reaktion (normale *Marcus*-Region). Legt man für die den *Hopping*-Prozess abgeschätzte Geschwindigkeit von  $k \cong 10^7 - 10^8 \text{ s}^{-1}$  zugrunde, so kann damit für den Übergang des Elektrons auf **54** eine vergleichbare bzw. höhere Geschwindigkeit angenommen werden, wohingegen der Übergang des Elektrons auf die Akzeptoren **97** und **98** offensichtlich langsamer verläuft.

Zusätzliche Argumente in diese Richtung liefert die Betrachtung der Sequenzabhängigkeit der Debromierungsraten für die verschiedenen Akzeptoren. In den 5-Br-Desoxyuridin **54** enthaltenden Oligonukleotiden **H1-3a** zeigte sich ein Abfall der Geschwindigkeit um ca. 50 % für jedes zusätzliche GC-Basenpaar zwischen Donor- und Akzeptor. Dies entspricht ungefähr dem Effekt, der auch bei der Untersuchung der oxetanhaltigen Haarnadeln zu beobachten war und so qualitativ auch von anderen Gruppen wie *Rokita* und *Wagenknecht* unter Verwendung ihrer eigenen Donor/Akzeptorsysteme bestimmt werden konnte. In den Oligonukleotiden mit den beiden purinbasierten Akzeptoren **97** bzw. **98** hingegen war der Sequenzeinfluss wesentlich geringer, bzw. gar nicht ausgeprägt. Offensichtlich ist die Elektronenaffinität in den letzteren Fällen nicht ausreichend, um den sicherlich dennoch vorhandenen Sequenzefekt in einen messbaren Geschwindigkeitsunterschied zu transformieren. Daher muss hier der Übergang des Elektrons auf den Akzeptor der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Gesamtprozesses sein.

Interessanterweise ist aber nicht nur die Anzahl sondern auch die Position der GC-Basenpaare relativ zum Akzeptor von entscheidender Bedeutung. Befinden sich ein bzw. zwei GC-Basenpaare in direkter Nachbarschaft des Akzeptors **54**, tritt ein dramatischer Abfall der Debromierungsgeschwindigkeit von 10.5 %/min für **H1a** (bzw. ca. 7 %/min in **H6a**) auf 1.5 %/min im Falle von **H4a**, bzw. sogar auf 0.6 %/min im Falle des Strangs **H5a** auf. In dieser Situation fällt die Debromierungsausbeute also sogar um 75 % mit jedem zusätzlichen GC-Basenpaar ab. Derselbe Effekt trat auch in den Serien **b** und **c** auf, allerdings wesentlich weniger stark ausgeprägt. Auch dies spricht klar dafür, dass hier die Reduktion des Akzeptors zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wurde. Abb. 48 fasst diese positionsabhängigen Unterschiede noch einmal zusammen.



**Abb. 48.** Abhängigkeit der Debromierungsausbeuten von der Positionierung der GC-Basenpaare relativ zum Akzeptor. In schwarz Serie a (5-Br-dU 54), in rot Serie b (8-Br-dA 97), in grün Serie c (8-Br-dG 98), Akz = jeweiliger Elektronenakzeptor, Fl = Flavin 35.

Eine Begründung für den Sachverhalt, dass die Position der GC-Basenpaare einen derart großen Einfluss hat, fällt auf den ersten Blick nicht leicht. Eine mögliche Erklärung könnte die Modulation des Redoxpotentials der Basen in Abhängigkeit der Nachbarbasen liefern. Untersuchungen von *Saito* zum Lochtransfer hatten, wie in der Einleitung dargelegt, klar gezeigt, dass die Stapelung von mehreren Guanin-Basen übereinander mit einer signifikanten Absenkung des Oxidationspotentials des äußersten 5'-Guanins einhergeht; die Stapelung eines Guanins mit mehreren Adeninen führt zu einem wesentlich schwächer ausgeprägten Effekt.<sup>[20]</sup> Übertragen auf unseren Fall könnte man argumentieren, dass die Stapelung ein oder mehrerer Cytosine auf dem Akzeptor hier zu einer Herabsetzung des Reduktionspotentials, und damit gleichzeitig auch zu einer Verringerung der Elektronenaffinität führt. Bedenkt man den in dieser Arbeit aufgedeckten, wichtigen Einfluss des Redoxpotentials, so könnte diese Änderung sehr wohl zu der beobachteten Absenkung der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit geführt haben. Ebenfalls denkbar ist, dass die Positionierung von GC-Basenpaaren direkt über dem Akzeptor zu einer Verringerung der Flexibilität des Strangs in dieser Region führte. Da erhöhte Bewegungsfreiheit des Basenstapels im Allgemeinen auch zu einer starken Steigerung der Elektronentransfereffizienz führt (siehe die sehr hohen Werte für Einzelstränge bzw. Stränge mit *Mismatches* zwischen Donor und Akzeptor) könnte dies im Umkehrschluss zu der Absenkung der Effizienz des Elektronentransfers in diesen Strängen geführt haben.



Wie auch in den von unserer Gruppe hierzu veröffentlichten Arbeiten dargelegt, zeigten die Untersuchungen insgesamt eine hochkomplexe Sequenzabhängigkeit des reduktiven Elektronentransfers der DNA-Duplexe abhängig vom jeweils verwendeten Akzeptor.<sup>[427]</sup> Eine universelle Theorie, welche alle beobachteten Resultate voll befriedigend und umfassend erklärt, besteht bisher nicht, so dass hier für die Zukunft noch erheblicher Bedarf und theoretischen und experimentellen Studien besteht.

### **3.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Im Rahmen dieses Projekts wurde die Eignung verschiedener bromsubstituierter Nukleoside als Elektronenakzeptoren für die Untersuchung des Überschusselektronentransfers in DNA-Haarnadeln untersucht, wobei besonders die Sequenzabhängigkeit der Elektronentransfereffizienz im Mittelpunkt des Interesses stand. Es wurden hierzu das in literaturbekannten Arbeiten häufig zu diesem Zweck eingesetzte 5-Bromdesoxyuridin **54**, sowie das 8-Bromdesoxyadenosin **97** bzw. das 8-Bromdesoxyguanosin **98** verwendet. Unter Einsatz der käuflichen Phosphoramidite konnten per Festphasensynthese DNA-Haarnadeln verschiedener Sequenz mit dem Flavin **35** im Kopf und je einem der genannten Akzeptoren im Stamm der Haarnadeln synthetisiert werden. Nach vorsichtiger Abspaltung vom CPG-Träger und mehrfacher chromatographischer Reinigung konnten die Stränge **H1-5a**, **H1-5b**, **H1-5c** in guter Reinheit in Ausbeuten von ca. 5-10 % erhalten werden. Die eingehende Charakterisierung der Oligonukleotide zeigte sehr stabile Haarnadelstrukturen mit Schmelzpunkten zwischen 60 °C und 90 °C, CD-Messungen zeigten ferner das Vorliegen der B-Konformation an. Mit allen Strängen wurden Belichtungsexperimente durchgeführt, wobei zur Reduktion des Flavins **35** die in Kapitel 2 beschriebene EDTA-vermittelte Photoreduktion eingesetzt wurde. In allen Fällen konnte im Zuge der Belichtung die saubere Abspaltung des Bromatoms als Folge des Elektronentransfers vom Flavin beobachtet werden, Nebenreaktionen traten nur in untergeordnetem Maße auf. Aufgrund des sehr geringen strukturellen Unterschieds zwischen dem Edukt- und dem Produktstrang erfolgte die Analyse der Belichtungsexperimente per Kapillargelelektrophorese (CE). Hierfür wurden Methoden entwickelt, die eine exakte Quantifizierung des Reaktionsverlaufs durch Integration der detektierten UV-Absorptionssignale ermöglichten; durch exponentielles *Fitten* und Abtragen der Anfangssteigungen konnten die Debromierungsausbeuten pro Minute für jeden der synthetisierten Stränge ermittelt werden.

## Synthese und Charakterisierung Flavin- und Bromnukleosid-enthaltender DNA-Haarnadeln

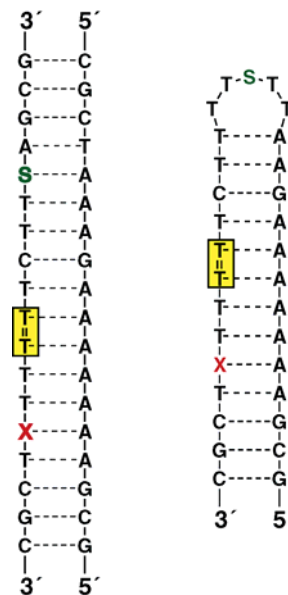
Die Auswertung der Daten ergab insgesamt sehr komplexe Abhängigkeiten der Debromierungsausbeuten von der Art des Akzeptors und der Sequenz der DNA-Haarnadeln. Die Betrachtung von **H1a-c** zeigt, dass die Abfolge der Ausbeuten der Bromabspaltung qualitativ die Abfolge der Elektronenaffinitäten wiedergibt (5-Br-dU >> 8-Br-dA  $\cong$  8-Br-dG). Offenbar wird bei den schwerer zu reduzierenden Akzeptoren **97** und **98** die Aufnahme des Elektrons zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Bezüglich der Sequenzabhängigkeit war nur beim gut reduzierbaren Akzeptor **54** ein deutliches Absinken der Debromierungsgeschwindigkeit (ca. 50 %) mit steigender Anzahl an GC-Basenpaaren zu beobachten. Sowohl in den Strängen mit **97** als auch, in noch stärkerem Maße, in den **98** enthaltenden Strängen war quasi kein Sequenzeffekt festzustellen. Die Akzeptoren sind hier zu „schwach“, um die Sequenzabhängigkeit meßbarzumachen. Auch die genaue Lage der GC-Basenpaare spielte eine wichtige Rolle, Positionierung direkt über dem Akzeptor führte hierbei zu einer wesentlich stärkeren Verlangsamung der Elektronentransferprozesse, als wenn das GC-Paar mitten in der Sequenz zwischen Donor und Akzeptor stand. Ein Grund hierfür könnte die Modulation der Redoxpotentiale der Akzeptoren durch den geänderten Sequenzzusammenhang (führt zum Absinken der Elektronenaffinität), sowie eine verminderte Flexibilität der Duplexe im Bereich des Akzeptors sein, die ebenfalls zu einer Erschwerung des Elektronentransfers beitragen könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bausteine **97** und **98** trotz ihrer schnellen Reaktion mit solvatisierten Elektronen aufgrund ihres unvorteilhaften Redoxpotentials nicht sehr geeignet sind für die kinetische Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA. Einzig 5-Bromdesoxyuridin **54** erwies sich als brauchbarer Akzeptor, der auch in der Lage war, sequenzspezifische Unterschiede in der Elektronentransfereffizienz wiederzugeben. Der besondere Fortschritt, der im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurde, liegt in der Entwicklung empfindlicher und hochauflösender CE-Methoden zur quantitativen Analyse der Elektronentransferprozesse. Sie sind der größtenteils angewendeten Prozedur, in welcher die DNA nach erfolgtem ET-Experiment zur Erzeugung von Strangbrüchen an den geschädigten Positionen mit Piperidin gekocht und anschließend per Gelelektrophorese untersucht wird, sowohl in der Milde der Methode als auch in Auflösung und Empfindlichkeit überlegen. Dieser Fortschritt führte – und führt noch immer – dazu, dass die CE als wichtiges Werkzeug der Nukleinsäureanalytik ständig steigende Anwendung in unserer Gruppe und auch darüber hinaus findet.<sup>[428]</sup> So wird mittlerweile z. B. die Auswertung von *primer extension*-Studien unter Verwendung fluoreszenter *Primer* routinemäßig mittels CE durchgeführt, auch enzymatische Totalverdau von DNA werden an der CE getrennt und bezüglich ihrer Nukleotidzusammensetzung untersucht. In einer neuen Arbeit, welche in Zusammenarbeit

## Synthese und Charakterisierung Flavin- und Bromnukleosid-enthaltender DNA-Haarnadeln

mit der Gruppe *Cramer* (LMU München, Genzentrum) durchgeführt wurde, konnte mittels CE und MALDI-TOF-Massenspektrometrie aufgeklärt werden, wie sich das Vorhandensein eines T=T-Dimers in einer DNA-Sequenz auf die Güte der Transkription dieser Sequenz durch die RNA-Polymerase II auswirkt.<sup>[429]</sup>

Das 5-Br-Desoxyuridin **54** als schnellere Alternative zum bisher eingesetzten T=T-Dimer **34** soll in einer neuen Studie auch weitere Fragen bezüglich der Öffnungsgeschwindigkeit des Dimers und der Geschwindigkeit der *Hopping*-Schritte beantworten helfen. Hierzu wurden bereits von *M. v. Meltzer* und *A. Manetto* DNA-Haarnadeln und Doppelstränge synthetisiert, welche im Stamm sowohl ein T=T-Dimer **34** als auch ein 5-Br-Desoxyuridin **54** enthielten. Als Einelektronendonator fungiert der von *Giese* entwickelte Injektor **36**, welcher im Kopf der DNA-Haarnadeln eingebaut wurde, da das Flavin **35** aufgrund seiner Fähigkeit, kontinuierlich Elektronen zu pumpen, für derartige Experimente ungeeignet ist. Die Struktur der zu untersuchenden DNA-Stränge ist in Abb. 49 gezeigt.



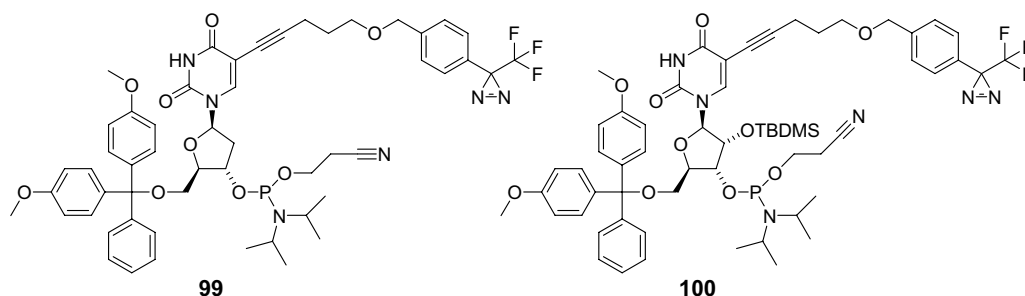
**Abb. 49.** Struktur der zu untersuchenden DNA-Duplexe mit zwei verschiedenen Elektronenakzeptoren. S = Giese-Injektor **36**, T=T = Dimer **34**, X = 5-Br-dU **54**.

Erste Belichtungen mit diesen Systemen wurden bereits ausgeführt, bisher gelang es jedoch nicht, die erhaltenen Ergebnisse auszuwerten und zu interpretieren, da zum jetzigen Zeitpunkt noch keine optimierte Methode zur CE-Trennung und Analyse für diesen Fall existiert. Denkt man aber hier an die von *Carell* und *Giese* veröffentlichte Arbeit, in der zwei T=T-Dimere in einem Strang eingesetzt wurden, sind sicherlich aufschlussreiche Ergebnisse zu erwarten.

## 4 Synthese Diazirin-enthaltender DNA-Doppelstränge – *Photoaffinity labeling* DNA-bindender Proteine in Zellextrakten

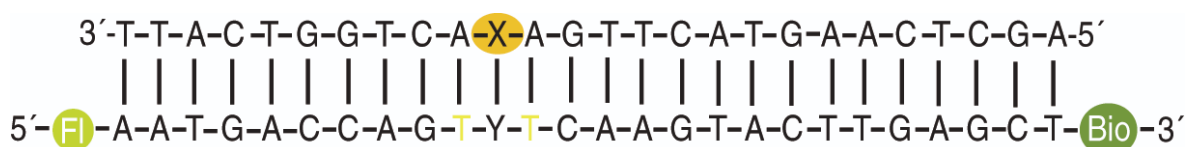
### 4.1 Aufgabenstellung

Im Rahmen der Einführung wurde dargelegt, dass es zwar Beispiele für die Verwendung DNA-basierter Sonden für das *photoaffinity labeling* DNA-bindender Proteine gibt, im Verhältnis zur Verwendung niedermolekularer Sonden sind es aber relativ wenige. Oftmals sind die Ergebnisse unbefriedigend, sei es aufgrund des suboptimalen Designs oder der eingeschränkten Verwendbarkeit der photolabilen Gruppe. Daher gibt es bis zum heutigen Tage auch kaum systematische Studien, in denen die Interaktion von DNA mit DNA-bindenden Proteinen in Zellextrakten mit Hilfe dieser Methode untersucht wurde. Dies gilt insbesondere für den Einsatz schädenerhaltender DNA. Das überzeugendste Beispiel auf diesem Gebiet ist das eingangs erwähnte Experiment von *Lippard* mit Cisplatin-modifizierter DNA, mit der selektiv reparaturassoziierte Proteine „gefischt“ werden konnten.<sup>[405]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher versucht werden, einen Aryltrifluormethyldiazirin-enthaltenden Baustein auf Basis des Thymidins zu entwickeln, da derartige Gruppen für *photoaffinity labeling*-Experimente mit DNA die günstigsten Eigenschaften aufweisen sollten (siehe Einführung). Die Struktur der geplanten DNA/RNA-Bausteine **99** und **100** zeigt Schema 53.



Schema 53. Struktur der geplanten Aryltrifluormethyldiazirin-enthaltenden Bausteine **99** und **100**.

Durch die Verwendung eines semi-rigiden, alkinbasierten Linkers sollten diese Bausteine in DNA zu einer wesentlich geringeren Destabilisierung führen, als dies bei *Kuznetsovas* Molekül 74 der Fall war, das zu einem Absinken des Schmelzpunkts um 15 °C pro Modifikation führte.<sup>[409]</sup> Zudem wurde der Aufbau derartiger alkinsubstituierter Nucleoside von *J. Gierlich* und *G. Burley* in unserer Gruppe eingehend untersucht. **99** und zu einem späteren Zeitpunkt auch **100** sollten per Festphasensynthese in DNA- bzw. RNA-Stränge eingebaut werden, welche neben einem Biotin zur Erleichterung der Aufreinigung ein Fluorescein zur besseren Detektion enthalten sollten. Diese Stränge sollten nachfolgend mit Gegensträngen hybridisiert werden, in welche ebenfalls per Festphasensynthese in definierter Position ein DNA-Schaden eingeführt wurde, wofür verschiedene kommerziell erhältliche bzw. in der Gruppe synthetisch zugängliche oxidative und photoinduzierte Schäden in Frage kamen. Der Schaden wurde dabei zwischen den beiden photolabilen Bausteinen **99** positioniert (Abb. 50)

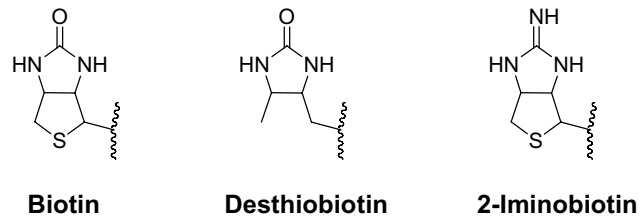


**Abb. 50.** Sequenz der zu synthetisierenden DNA-Duplexe. X = DNA-Schaden, T = **99**, FI = Fluorescein, Bio = Biotin.

Unter Verwendung der so erhaltenen DNA-Sonden war nun geplant, *photoaffinity labeling-Experimente* durchzuführen. Zunächst sollten hier die zur Reparatur des jeweiligen Schadens dienenden Enzyme in reiner Form untersucht werden. Der nächste Schritt wäre dann das „Fischen“ derartiger Proteine aus pro- und später auch aus eukaryotischen Zellextrakten, wobei hier naturgemäß humane Zellen am Ziel der Untersuchung stehen sollten. Nach Aufreinigung über die Biotinfunktion, Auftrennung der *Crosslinks* per SDS-Gelelektrophorese und Trypsinverdau sollten die Proteine letztlich durch MALDI-MS-*fingerprinting* bzw. ESI-MS/MS-Sequenzierungsexperimente mit nachfolgender Datenbanksuche identifiziert werden.

Um neben dem direkten Einbau von **99** in DNA per Festphasensynthese noch einen alternativen Weg zum Einbringen eines Aryltrifluormethyldiazirin-Bausteins in DNA zu beschreiten, sollte parallel versucht werden, diesen per *Click-Chemie* einzuführen. Hierzu war geplant, geeignete DNA-Stränge unter Verwendung von Dialkinbausteinen, die von *G. Burley* zur Verfügung gestellt wurden, zu synthetisieren. An diese sollte das Diazirin in Form eines geeigneten Azidbausteins per kupferkatalysierter [3+2]-Cycloaddition angeknüpft werden.

Das Aufbrechen der Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung erfordert relativ harsche Bedingungen wie z. B. das Aufkochen in 95 % Formamid oder 0.1 % SDS für mindestens 5 min. Um hierdurch evtl. auftretende Zersetzung der Sonden bzw. das „Ausbluten“ von Streptavidin in die Probe zu vermeiden, sollten schließlich Alternativen zum Biotin auf ihre Verwendbarkeit getestet werden. Es boten sich hierbei besonders Desthiobiotin und 2-Iminobiotin an (Schema 54).

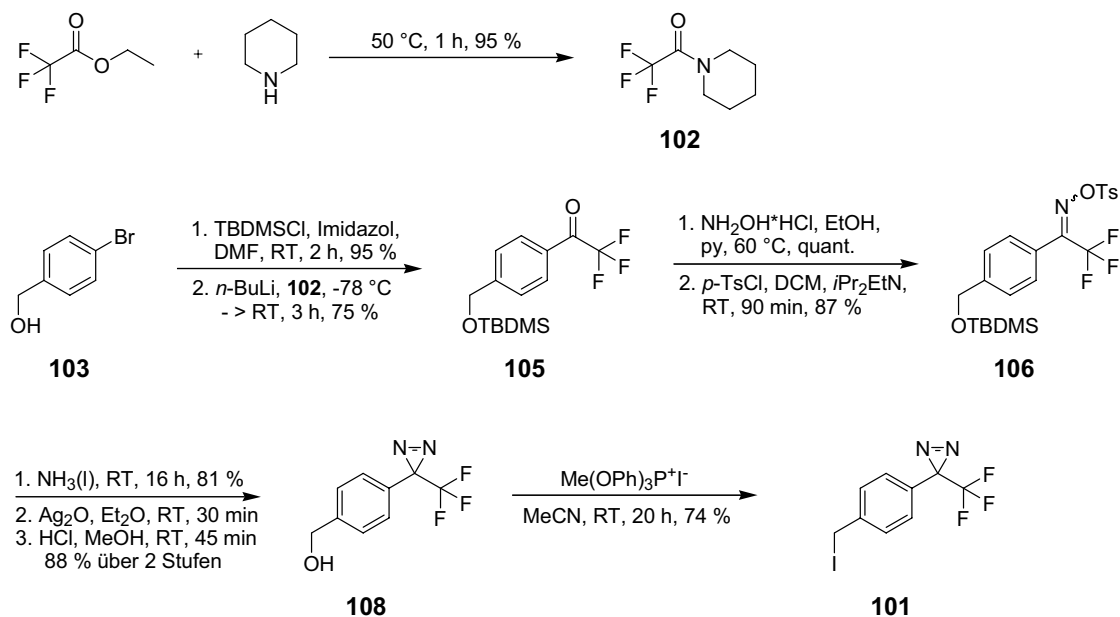


**Schema 54.** Biotin und schwächer an Streptavidin bindende Derivate Desthiobiotin und 2-Iminobiotin (nur relevanter Ausschnitt gezeigt)

Während Desthiobiotin *per se* eine um 7 Größenordnungen niedrigere Affinität zu Streptavidin aufweist, ist die Wechselwirkung von 2-Iminobiotin mit Streptavidin vom pH-Wert abhängig.<sup>[430, 431]</sup> Im basischen pH-Bereich ist das Imin deprotoniert und die Wechselwirkung stark, Verschiebung des pH-Werts in den sauren Bereich führt zur leichten Dissoziation des nun protonierten 2-Iminobiotins. Der Einbau dieser Modifikationen in DNA per Festphasensynthese oder postsynthetische Modifikation und die Untersuchung der Eignung der so gebildeten DNA-Duplexe für das *photoaffinity labeling* (im Vergleich zu Biotin) waren ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

## 4.2 Synthese der Diazirinfestphasenbausteine 99 und 100

Zur Darstellung des erforderlichen Diazirinfestphasenbausteins **99** wurde zunächst das Diazirinbenzylidiodid **101** benötigt. Dieses literaturbekannte Molekül konnte auf elegante Art und Weise durch eine Neukombination der Stufen aus verschiedenen beschriebenen Wegen dargestellt werden.<sup>[362, 378, 385]</sup> Schema 55 gibt einen Überblick über den Syntheseweg zu Verbindung **101**.



Schema 55. Synthese des Diaziriniodids **101**.

Im ersten Schritt der Synthese wurde das für die spätere Acylierung notwendige Trifluoracetyl-piperidinamid **102** dargestellt. Dies wurde nahezu quantitativ erhalten, indem Trifluoressigsäureethylester mit einem Überschuss an Piperidin für eine Stunde erhitzt und anschließend die flüchtigen Anteile am Rotationsverdampfer entfernt wurden. In einem weiteren Schritt wurde *p*-Brombenzylalkohol **103** nach Standardbedingungen mit *t*-Butyl-dimethylsilylchlorid umgesetzt, wonach der geschützte Baustein **104** in wiederum nahezu quantitativer Ausbeute gewonnen werden konnte. **104** wurde in THF bei  $-78\text{ °C}$  mit *n*-Butyllithium metalliert (Brom-Lithiumaustausch) und **102** dann langsam zugegeben, wodurch die gewünschte Monoaddition auftrat. Das Trifluormethylketon **105** konnte nach destillativer Aufreinigung in 75%iger Ausbeute isoliert werden. **105** wurde mit Hydroxylamin quantitativ zum Oxim umgesetzt, das ohne weitere Aufreinigung mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid behandelt wurde. Hierzu löste man das Oxim in abs. Dichlormethan und setzte bei Raumtempera-

tur *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und Hünig-Base zu. Im Gegensatz zu einer vorher verwendeten Prozedur, in der die Reaktion in refluxierendem Pyridin durchgeführt wurde, konnte so das Tosyloxim **106** in guten Ausbeuten als kristalliner Feststoff gewonnen werden. Bei höheren Temperaturen und stark basischen Bedingungen kam es offenbar zur Zersetzung des Edukts. Das Tosyloxim **106** wurde in einem Glasdruckrohr bei Raumtemperatur unter hohem Überdruck mit flüssigem Ammoniak zur Reaktion gebracht, wobei es durch Angriff des Ammoniaks an das Oxim und die Tosylgruppe zum Aufbau des Diaziridindreirings kam. Das Diaziridin **107** wurde nach chromatographischer Reinigung in guten Ausbeuten erhalten.

Als Reagenz zur Oxidation des Diaziridins **107** zum Diazirin wurde Silber(I)oxid in Diethylether verwendet. Diese Reaktion wurde anfangs dadurch beeinträchtigt, dass die Reaktionszeiten und –ausbeuten extrem schwankten. Während manchmal quantitativer Umsatz innerhalb 20 Minuten beobachtet wurde, trat in anderen Ansätzen auch nach Stunden keine Reaktion ein. Als Ursache dieser Schwankungen wurden schließlich sowohl Verunreinigungen des kommerziell erhältlichen Silberoxids als auch der Restwassergehalt des Ethers ausgemacht. Das Silberoxid wurde letztendlich immer frisch durch basische Fällung aus einer Silbernitratlösung hergestellt, sukzessive mit Wasser, Aceton und Ether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Der verwendete Ether musste immer über Natrium oder Molekularsieb 4 Å getrocknet und die Reaktion unter strengem Wasser- und Sauerstoffausschluss durchgeführt werden. Unter Einhaltung dieser Maßnahmen konnte die Oxidation innerhalb 30 Minuten quantitativ erreicht werden (DC-Kontrolle). Die Entstehung des Diazirins konnte auch UV-spektroskopisch durch das Auftreten der spezifischen Absorptionsbande bei 362 nm nachgewiesen werden (Abb. 51). Setzte man eine Probe für einen Tag dem Sonnenlicht aus, so verschwand diese Absorptionsbande nach und nach, ein Zeichen für den lichtinduzierten Zerfall des Diazirins.

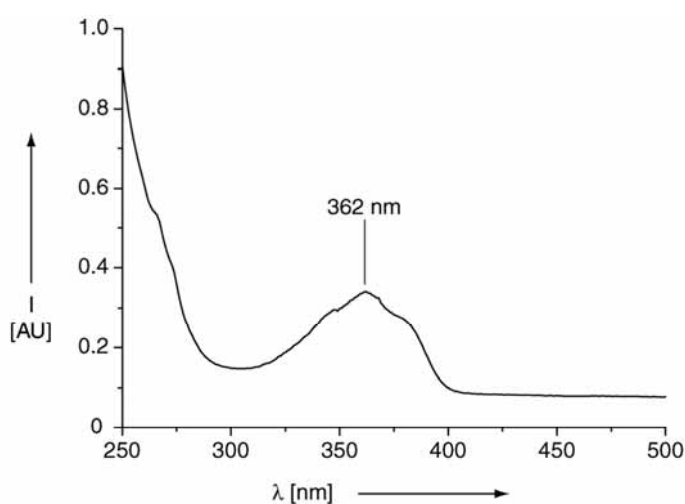
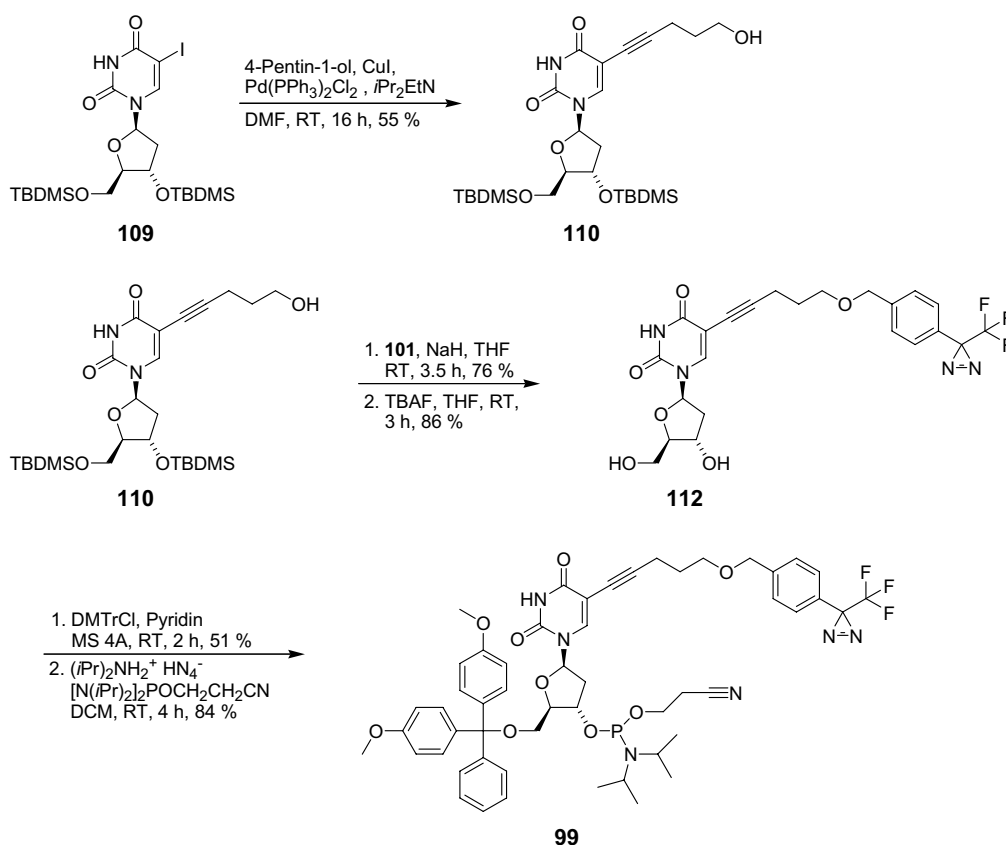


Abb. 51. UV-Vis-Spektrum von Verbindung **108** ( $c = 0.001 \text{ M}$  in Dichlormethan).



Nach Filtration des entstandenen Silbers und vorsichtiger (große Flüchtigkeit des Produkts) Aufkonzentration im Vakuum wurde der Rückstand zur Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe mit einer Lösung von HCl in Methanol (1.25 M) behandelt. Hiernach konnte das entschützte Diazirin **108** in sehr guter Ausbeute (88 % über zwei Stufen) als kristalliner Feststoff erhalten werden. Reaktion des Alkohols mit Methyltriphenoxyphosphoniumiodid in einer *Appel*-artigen Reaktion lieferte schließlich den Diaziriniodidbaustein **101** in 74%iger Ausbeute als gelben, kristallinen Feststoff, der (wie alle Verbindungen mit Diazirindreiring) unter Lichtausschluss bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. **101** war über diese Route in Mengen von  $> 500\text{ mg}$  ohne größere Schwierigkeiten zugänglich.

Der weitere Weg zum Festphasenbaustein **99** ist in Schema 56 dargestellt.



**Schema 56.** Synthese des Diazirinphosphoramidits **99**.

Der Alkohol **110** wurde durch *Sonogashira*-Kupplung aus TBDMS-geschütztem 5-Ioddesoxyuridin **109** (freundlicherweise von *J. Gierlich* zur Verfügung gestellt) erhalten. Die mäßige Ausbeute erklärt sich mit der schwierigen chromatographischen Reinigung des Produkts, besonders das aus dem Pd-Katalysator stammende Triphenylphosphin war nur sehr schwer abzutrennen. Die Verwendung von  $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  brachte hier zwar einen Vorteil ge-

genüber  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , allerdings konnten auch hier letztlich nicht mehr als 55 % des gewünschten Nucleosidbausteins **110** isoliert werden, wodurch aber dennoch ausreichend Material für die weitere Synthese generiert werden konnte. **110** wurde durch  $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion mit dem Diaziriniodid **101** gekuppelt, wobei in guten Ausbeuten das Diazirinnucleosid **111** entstand. Des- sen Identität konnte neben den anderen spektroskopischen Daten auch sehr gut über das UV-Spektrum der Verbindung belegt werden. Sehr klar sind dort sowohl die starke Absorptions- bande des alkinsubstituierten Pyrimidinrings ( $\lambda_{\text{max}} = 286 \text{ nm}$ ) als auch die wesentlich schwä- cher ausgeprägte Bande des Diazirinrings ( $\lambda_{\text{max}} = 362 \text{ nm}$ ) zu erkennen (Abb. 52).

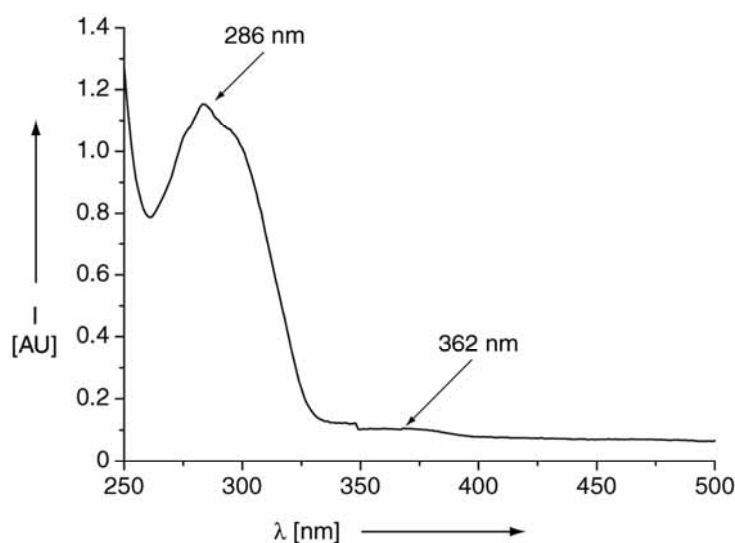
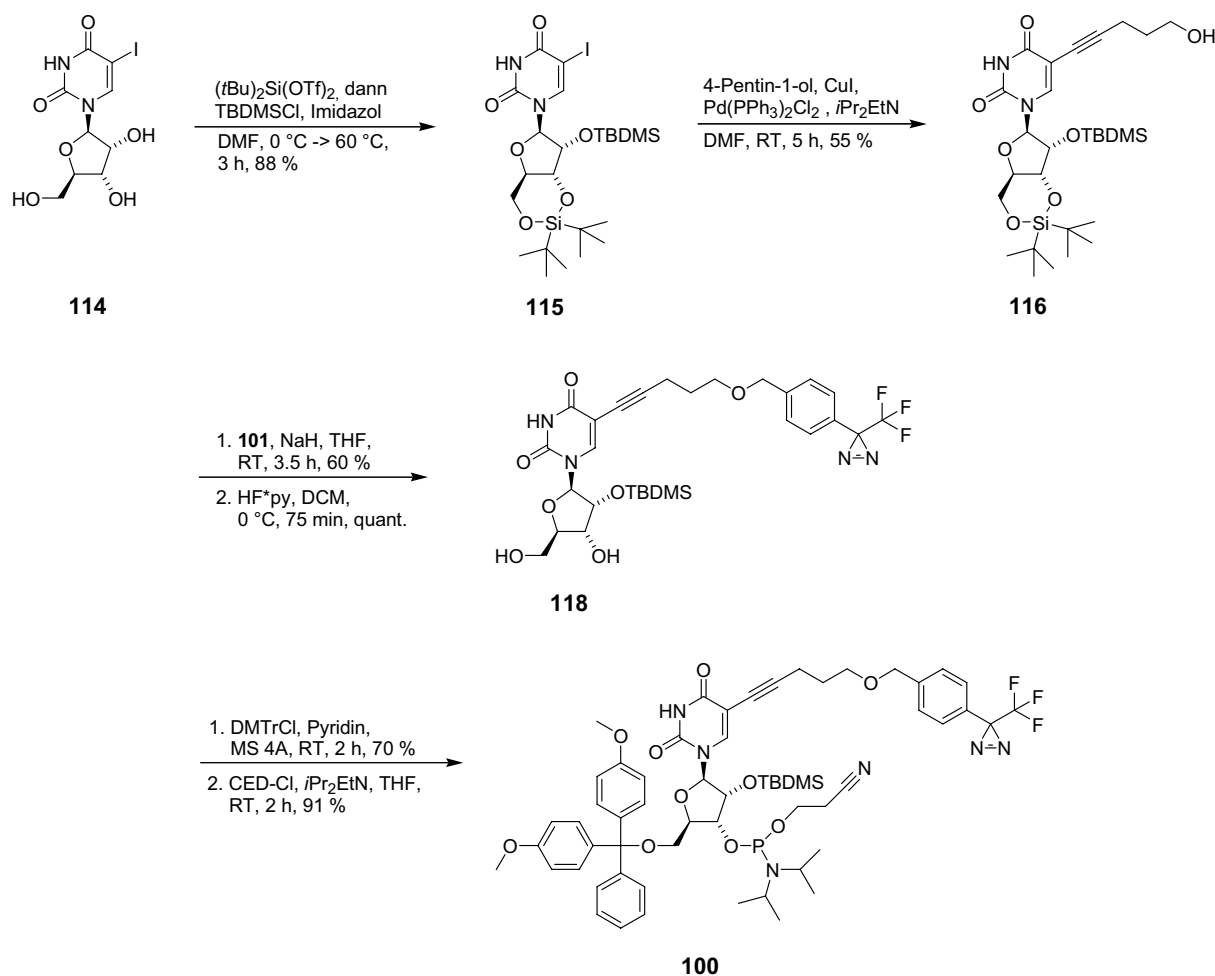


Abb. 52. UV-Vis-Absorptionsspektrum von Verbindung **111** ( $c = 10^{-4} \text{ M}$  in Dichlormethan).

Nach nahezu quantitativer Entschützung von **111** mit Tetrabutylammoniumfluorid in THF zum freien Baustein **112** wurde die 5'-Hydroxylgruppe selektiv mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid geschützt (Verbindung **113**). Einmal mehr zeigte sich, dass die DMT-Schützung der mengenbegrenzende Schritt in der späten Phase der Synthese war, ebenso wie beispielsweise auch beim Oxetanbaustein **77**. Trotz viel Optimierungsarbeit überstieg die Ausbeute hier nie die angegebenen 51 %, es trat in signifikantem Maße auch zweifache Schützung auf. Offenbar wirkte sich die relativ große sterische Hinderung im Molekül negativ auf die 5'-Selektivität der Reaktion aus. Die nachfolgende Überführung ins Phosphoramidit **99** gelang dagegen wieder mit sehr guten Ausbeuten (84 %). Durch sorgfältige Reaktionsführung und Aufreinigung konnte die Entstehung oxidierter Produkte nahezu vollständig zurückgedrängt werden, wichtig war die Verwendung von deaktiviertem *Kieselgel-60* in der säulenchromatographischen Reinigung. Durch Verwendung einer Kombination aus Diisopropylammoniumtetrazolat als Base und Aktivator sowie  $\beta$ -Cyanoethyltetrakispropylphosphordiamidit konnte auch die Bildung *O*(4)-phosphitylierter Produkte unterdrückt werden. Der Diazirinfestphasen-

baustein **99** war so in Mengen > 200 mg zugänglich und erwies sich sowohl in Substanz als auch in Lösung als relativ luft- und hydrolysestabil. Dennoch wurde er bis zum Einbau unter Lichtausschluss bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Synthese des analogen RNA-Festphasensynthesebausteins **100** wurde in großen Teilen ähnlich vorgegangen. Der Syntheseweg ist in Schema 57 dargestellt.



Schema 57. Synthese des Ribophosphoramidits **100**.

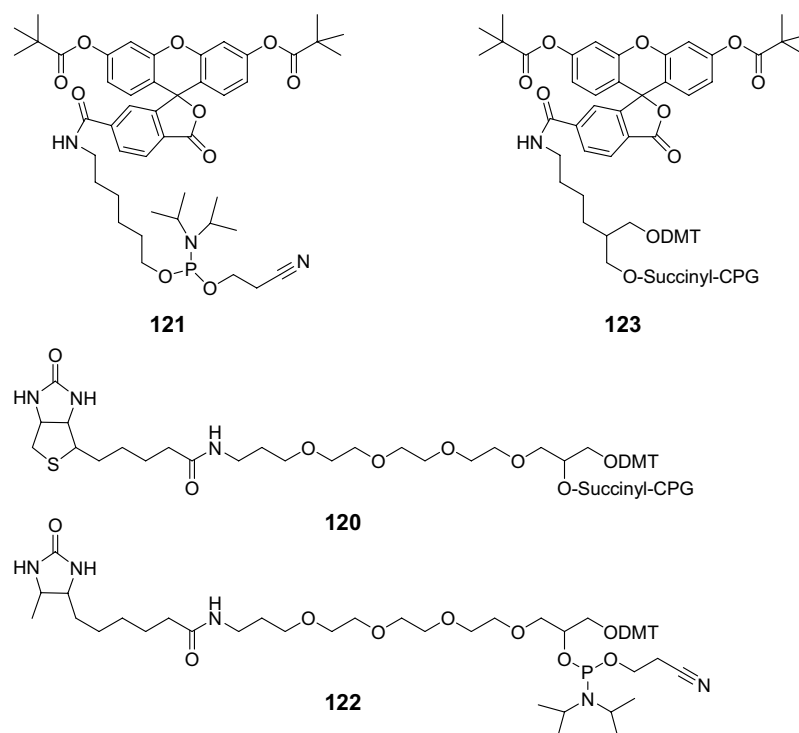
Käufliches 5-Ioduridin **114** wurde zunächst nach der von *Beigelman et al.* für die selektive Schützung natürlicher Nukleoside entwickelten Strategie geschützt.<sup>[432]</sup> Umsetzung mit  $(t\text{Bu})_2\text{Si}(\text{OTf})_2$  bei tiefer Temperatur führte die 3'-5'-Di-*tert*-Butylsilylengruppe ein, bei höherer Temperatur wurde dann in einer *one pot*-Prozedur mit *tert*-Butyl-dimethylsilylchlorid und Imidazol die 2'-Hydroxylgruppe TBDMS-geschützt. Der geschützte Baustein **115** konnte so in sehr guten Ausbeuten als weißer kristalliner Feststoff erhalten werden. Dieser musste unter Lichtausschluss gelagert werden, da er sich ansonsten unter Ausscheidung von Iod zersetzte.

*Sonogashira*-Kupplung mit 5-Pentin-1-ol lieferte analog zur Desoxyverbindung den Alkohol **116** in 55 %iger Ausbeute. Auch hier gilt das zuvor bezüglich der problematischen Reinigung Gesagte. Die Kupplung an das Diaziriniodid **101** lieferte den Baustein **117** in 60 %iger Ausbeute. Durch Behandlung mit HF-Pyridin-Komplex bei 0 °C konnte selektiv die 3'-5'-Di-*tert*-Butylsilylengruppe abgespalten werden, ohne dass die 2'-TBDMS-Schutzgruppe davon „angetastet“ worden wäre, wodurch man Verbindung **118** erhielt. Selektive Schützung der 5'-Hydroxylgruppe mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid lieferte **119** in 70 % Ausbeute. Für die Umsetzung zum Phosphoramidit wurde in diesem Fall CED-Chlorid verwendet, da sich andere Phosphitylierungsmethoden an diesem gehinderten Substrat als nicht reaktiv genug erwiesen. Dennoch traten hier kaum Nebenprodukte auf, der RNA-Festphasenbaustein **100** konnte nach Reinigung in der hervorragenden Ausbeute von 91 % isoliert werden. Von dieser Verbindung konnten insgesamt > 100 mg hergestellt werden. Aufgrund zeitlicher Einschränkungen konnte **100** nicht mehr in RNA-Stränge eingebaut werden und wird bis zur weiteren Verwendung unter Lichtausschluss bei -80 °C gelagert.

## **4.3 Strategien zur Synthese diazirin- und DNA-Schäden-enthaltender Doppelstränge**

### **4.3.1 Direkter Einbau des Phosphoramidits 99**

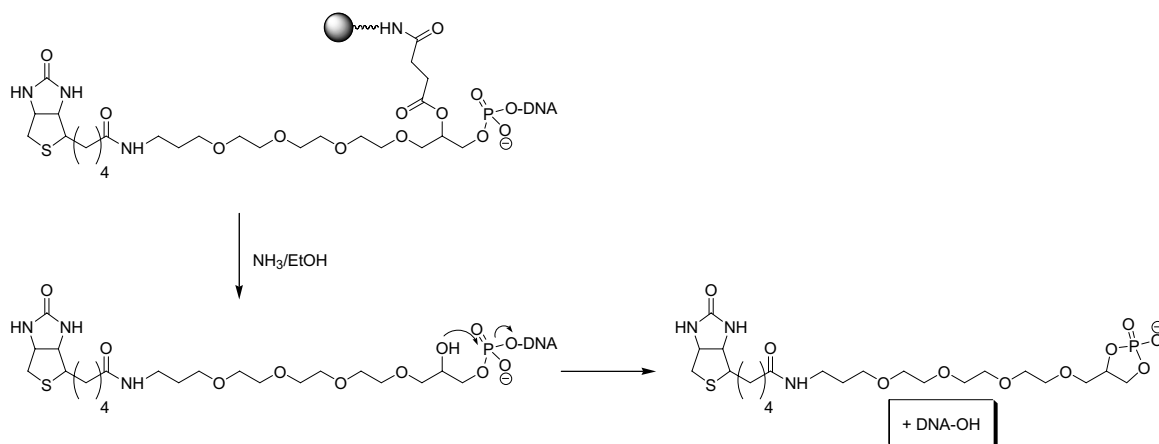
Der wichtigste Schritt zu den gewünschten diazirinenthaltenden DNA-Duplexen war die Festphasen-DNA-Synthese unter Verwendung des Monomers **99**. Um die zusätzlich erforderlichen Biotin- und Fluoresceinmarkierungen einzuführen, wurden biotinbeladene CPG-Kartuschen **120** verwendet, das Fluorescein wurde als 6-FAM-Phosphoramidit **121** eingesetzt. Angesichts der eingangs geschilderten, sehr schwer aufzubrechenden Streptavidin/Biotinwechselwirkung sollte in einer anderen Reihe von Strängen das schwächer bindende und damit leichter wieder abspaltbare Desthiobiotin verwendet werden. Da dieses nur als 5'-Phosphoramidit **122** erhältlich war, wurden hier fluoresceinbeladene CPG-Kartuschen **123** verwendet, die Markierungen waren also genau seitenverkehrt zu den erstgenannten Strängen. Die Struktur der neben **99** eingebauten Sondermonomere ist in Schema 58 dargestellt.



**Schema 58.** In der Festphasen-DNA-Synthese eingesetzte Fluorescein- und Biotinbausteine **120-123**.

Die DNA-Synthese wurde im 1  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der schon mehrfach beschriebenen Standardphosphoramiditchemie am Expedite-DNA-Synthesizer durchgeführt. Aufgrund des großen sterischen Anspruchs der Phosphoramidite **99**, **121** und **123** wurden diese Bausteine doppelt gekuppelt, nach einer 10 minütigen Kupplung wurde gewaschen, mit frischem Amidit/Aktivator beschickt und erneut für 10 Minuten gekuppelt. Auf diese Weise konnten diese anspruchsvollen Substrate routinemäßig mit Ausbeuten > 90 % inkorporiert werden. Hierzu wurde zusätzlich die Deblocking-Zeit dieser Monomere erhöht und die Kupplungszeit der jeweils nachfolgenden Base (soweit vorhanden) ebenfalls auf 5 Minuten gesteigert. Die Entschützungszeit der Biotin- bzw. 6-FAM-CPG-Träger wurde auf 90 Sekunden heraufgesetzt, die Kupplungszeit der ersten nachfolgenden Base dann auf 144 Sekunden erhöht. Während der Synthese und der nachfolgenden Entschützung wurde die DNA unter Lichtausschluss gehalten, um Spaltung der Diazirineinheit zu verhindern.

Die Abspaltung vom CPG-Träger erfolgte durch 24 Stunden Behandlung mit einem Gemisch aus wässrigem Ammoniak/Ethanol 3:1 bei Raumtemperatur. Ein großes Problem hierbei war, dass trotz der relativ milden Bedingungen immer ein Teil (bis zu 30 %!) der Biotin-Marker abgespalten wurden, vermutlich durch einen intramolekularen Angriff innerhalb des entsprechenden Bausteins. In den ersten Versuchen kam es sogar zum völligen Verlust des Labels (Schema 59).

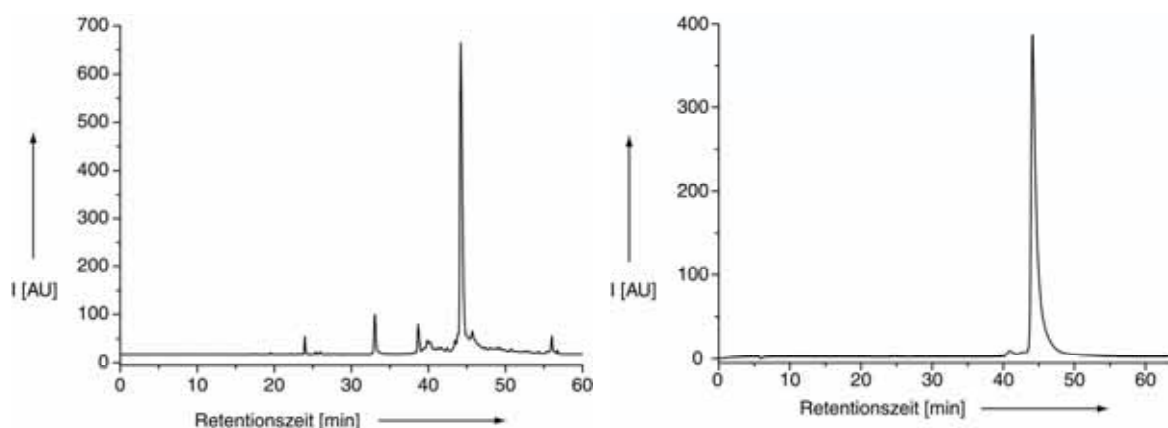


**Schema 59.** *Mutmaßlicher Mechanismus der Abspaltung des Biotin-, bzw. 6-FAM-Labels im Zuge der Abspaltung vom Träger/Entschützung der Basen.*

Nach schneller Abspaltung vom Träger kam es vermutlich im Laufe der weiteren Entschütungszeit zu einem Angriff der nun freien 3'-Hydroxylgruppe auf die terminale Phosphordiesterbindung, wobei unter Eliminierung des DNA-Strangs ein zyklisches Phosphat als Primärprodukt auftrat (analog zur baseninduzierten Spaltung von RNA), das unter den Reaktionsbedingungen wohl schnell weiter hydrolysiert wird. Dieses Phänomen konnte weder durch Anwendung niedriger Temperaturen, noch durch kürzere Reaktionszeiten oder alternative Entschütungsreagenzien wie Kaliumcarbonat in Methanol oder Ammoniak in Methanol unterdrückt werden. Zudem kam es in letzteren Fällen zu unvollständiger Entschützung, die eine HPL-chromatographische Reinigung der Oligonukleotide unmöglich machte. Daher mussten die genannten Einbußen in Kauf genommen werden, das verbleibende Material wurde per *reversed phase*-HPLC gereinigt. Auch dies gestaltete sich schwierig, da wegen des stark unpolaren Charakters dieser modifizierten DNA sehr steile Gradienten und lange Läufe (75 min) durchgeführt werden mussten. Nach Entsalzung (*SepPak*<sup>TM</sup>) und Konzentration konnten die folgenden DNA-Einzelstränge in Ausbeuten von 5-7 % in ca. 97-98 % Reinheit isoliert werden (Tabelle 11). In Abbildung 53 ist exemplarisch die Reinigung des Strangs **DA2** anhand der HPL-Chromatogramme gezeigt.

Bezeichnung	Sequenz
DA1	5`-F1AATGACCAGT*CT*CAAGTACTTGACTTB-3`
DA2	5`-F1AATGACCAGT*AAT*CAAGTACTTGACTTB-3`
DA3	5`-DbAATGACCAGT*CT*CAAGTACTTGACTTF1-3`
DA4	5`-DbAATGACCAGT*AAT*CAAGTACTTGACTTF1-3`
DA5	5`-F1TACCT*GCAACCGCT*GT -3`

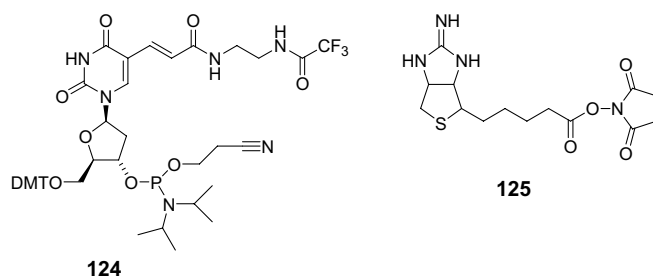
**Tabelle 11.** Bezeichnung und Sequenz der dargestellten DNA-Einzelstränge. T\* = Diazirinbaustein 99, Fl = 6-FAM 121/123, B = Biotin 120, Db = Desthiobiotin 122.



**Abb. 53.** Gegenüberstellung zweier rp-HPL-Chromatogramme des Strangs DA2. links) nach Abspaltung vom Träger; rechts) nach Aufreinigung. Geringfügige Unterschiede in der Retentionszeit liegen in Schwankungen der Puffer- und Probenzusammensetzung begründet. Die Chromatogramme wurde bei Raumtemperatur aufgenommen.

Um neben Desthiobiotin noch eine weitere mögliche Alternative zum Biotin zu haben, sollte auch das pH-abhängig reversibel an Streptavidin bindende 2-Iminobiotin in DNA-Stränge inkorporiert werden. Bei pH-Werten > 8-9 kommt es zur Deprotonierung des Imins, die entstandene Spezies bindet an Streptavidin. Absenkung des pH-Werts auf 4-5 löst die Bindung wieder. Da 2-Iminobiotin mit den Bedingungen der Festphasen-DNA-Synthese nicht kompatibel ist und folglich nicht als Phosphoramidit- oder H-Phosphonatbaustein verwendet werden konnte, wurde eine postsynthetische Modifizierung geplant, bei der ein amin-modifizierter DNA-Strang nachfolgend mit einem 2-Iminobiotin-NHS-Aktivester gekuppelt wurde. Hierzu wurden zunächst DNA-Stränge synthetisiert, welche neben dem Diazirin 99 und dem 6-FAM 121 am 3'-Ende einen C2-Amino-Linker enthielten. Die Struktur des Amino-Linkers 124

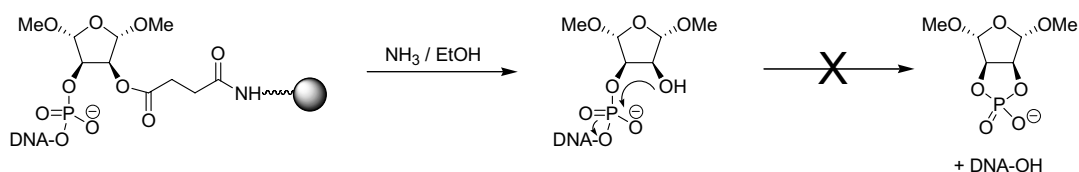
und des 2-Iminobiotin-NHS-Esters (NHS = N-Hydroxysuccinimid) **125** sind in Schema 60 dargestellt.



**Schema 60.** Struktur des C2-Amino-Linkers **124** und des 2-Iminobiotin-NHS-Esters **125**.

Die DNA-Synthese wurde im 1  $\mu$ mol-Maßstab am *Expedite-DNA-Synthesizer* nach Methoden der Standardphosphoramiditchemie ausgeführt, für den Einbau der Amidite **99** und **121** gilt das eingangs dieses Abschnitts Gesagte. Da im hier vorliegenden Fall der Strang direkt am 3'-Ende mit dem Amino-Linker **124** beginnt, welcher nicht als bereits beladener CPG-Träger erworben werden konnte, mussten sogenannte *Universal Support-CPG-Träger* verwendet werden, welche unbeladen und zur Kupplung mit jeglichem Monomer geeignet sind. Da *Universal Support-CPG-Träger* bekanntermaßen sehr reaktionsträge sind, wurde ihre *Deblocking-Zeit* auf 90 Sekunden erhöht, die Kupplungszeit des Amino-Linkers **124** betrug 5 Minuten, die jeweils nachfolgende Base musste 144 Sekunden gekuppelt werden, um akzeptable Ausbeuten an DNA zu erhalten.

Auch hier stellte die Abspaltung vom CPG-Träger/Entschützung der Basen einen Schlüsselschritt dar. Bei Anwendung der bereits oben genannten Standardbedingungen kam es zwar hier nicht zum Verlust der Modifikationen, allerdings wurde der *Universal Support* nur unvollständig abgespalten. Im Gegensatz zu den Strängen **DA1-5** unterblieb hier die Reaktion, die dort als störende Nebenreaktion zu größeren Produktverlusten geführt hatte. Anhand der per MALDI-TOF-MS bestimmten Massendifferenz von  $\Delta m/z = + 227$  zwischen theoretischem und gefundenem Produkt, kann der folgende Vorgang angenommen werden (Schema 61).



**Schema 61.** Unvollständige Entfernung des Universal Support II-Linkers.



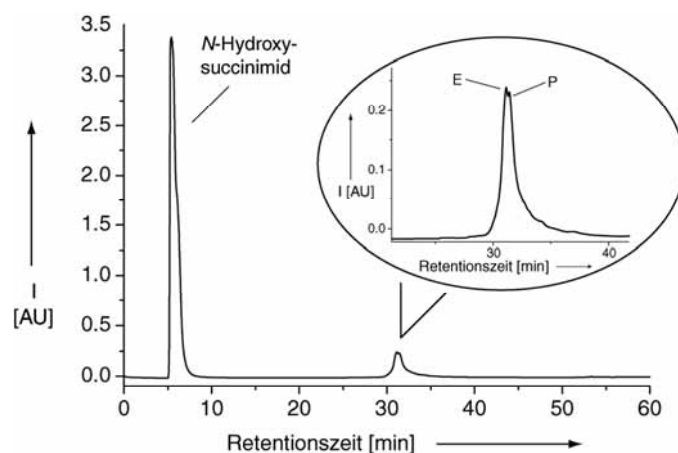
Das Auftreten derartiger Probleme war bereits vom Hersteller *GlenResearch* eingeräumt worden, welcher verschiedene andere, härtere Entschützungsverfahren zur vollständigen Abspaltung des *Linkers* vorschlug. Für die weiteren Abspaltungen wurde das Trägermaterial für 24 h bei Raumtemperatur mit einem Gemisch aus 0.4 M Natriumhydroxid in Methanol/Wasser 4:1 behandelt, danach musste durch Zugabe von 1 M Triethylammoniumacetat neutralisiert und anschließend entsalzt werden. Auf die gleiche Weise wurden auch alle zuvor behandelten Stränge noch einmal nachentschützt. Bei dieser Vorgehensweise kam es zwar in geringem Maße zum Verlust des Fluorescein-Labels (< 10 %), der *Universal Support* wurde aber quantitativ entfernt.

Nach Aufreinigung und Entsalzung wurden die folgenden DNA-Einzelstränge erhalten (Tabelle 12).

Bezeichnung	Sequenz
<b>DA6</b>	5`-F1AATGACCAGT*CT*CAAGTACTTGACTT <b>A1</b> -3`
<b>DA7</b>	5`-F1AATGACCAGT*AAT*CAAGTACTTGACTT <b>A1</b> -3`

**Tabelle 12.** Bezeichnung und Sequenz der Stränge zur Inkorporation von 2-Iminobiotin. T\* = Diazirinbaustein **99**, Fl = 6-FAM **121**, Al = Amino-Linker **124**.

Nach Aufreinigung und Konzentration wurde der 2-Iminobiotin-NHS-Ester **125** angekuppelt. Hierzu wurde die DNA stark aufkonzentriert und in einem basischen Puffer mit dem Aktivester (Überschuss, zuvor in trockenem DMSO gelöst) für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde die DNA per Ethanol-fällung abgetrennt, gewaschen und zur HPL-chromatographischen Reinigung in Puffer A (siehe Anhang B) aufgenommen. Es zeigte sich allerdings, dass der Umsatz nur rund 70 % betrug, ein Wert, der für derartige Aktivesterkupplungen aber schon eine gute Ausbeute darstellte. Eine chromatographische Abtrennung des Produkts erwies sich als nicht machbar. Auch mit optimierten Gradienten, sowie dem Wechsel auf eine *reversed phase*-C<sub>8</sub>-Säule (vom Hersteller zur Reinigung empfohlen) konnte kein sinnvoller Unterschied in der Retentionszeit von Produkt und Edukt erzielt werden, welcher eine Reinigung mit akzeptablen Ausbeuten zugelassen hätte (Abb. 54).



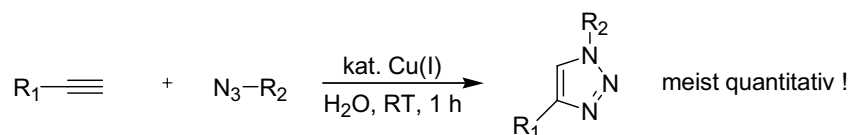
**Abb. 54.** Vergrößerte Darstellung des HPL-Chromatogramms des Strangs DA7 nach der versuchten Kupplung mit dem Aktivester 125. E = Eduktstrang DA7, P = Produktstrang).

Nachdem diese Reinigungsstrategie nicht zum Erfolg geführt hatte, wurde versucht, die Affinität des 2-Iminobiotins für Streptavidin auszunutzen und auf diesem Wege den Produktstrang zu reinigen. Überraschenderweise konnte aber in verschiedenen Puffersystemen zwischen pH 8-11 keinerlei Bindung der DNA an Streptavidin-Agarose beobachtet werden. Der Grund mag entweder in einer in Lösung vorliegenden DNA-Konformation begründet sein, welche keine Bindung zuließ, oder aber in der Tatsache, dass bei diesen pH-Werten auch die DNA-Basen selbst bereits deprotoniert werden (z. B. T, siehe Einleitung), was das Bindungsvermögen beeinträchtigen könnte. Da letztendlich also keine Möglichkeit zur Reinigung gefunden werden konnte und die 2-Iminobiotin-modifizierte DNA keine Affinität zu Streptavidin zeigte, musste dieser Weg leider aufgegeben werden. Es kann festgehalten werden, dass 2-Iminobiotin postsynthetisch in DNA eingebaut werden kann, unter den üblichen Bedingungen aber nicht die gewünschte Affinität zu Avidin/Streptavidin zeigt; als Ersatz für Biotin ist es daher in diesem Fall ungeeignet.

#### 4.3.2 Inkorporation des Diazirinbausteins über *Click*-Chemie

Obwohl diazirinhaltige DNA wie gezeigt über direkten Einbau des Phosphoramidits 99 per Festphasensynthese erhalten werden konnte, zeigte sich doch, dass die große Nähe der sterisch anspruchsvollen Diazirine im Strang zu einer signifikanten Absenkung der Kupplungseffizienz führte, die auch durch Optimierung des Kupplungsprotokolls nicht überwunden werden konnte. Daher sollte als Alternative versucht werden, die Diazirineinheit erst nach der

Synthese per *Click*-Chemie einzubauen. Unter einer *Click*-Reaktion, wie sie auch in der Einführung schon mehrfach erwähnt wurde, versteht man in diesem Zusammenhang die Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition eines Azids an ein Alkin unter Erzeugung eines Triazols (Schema 62).

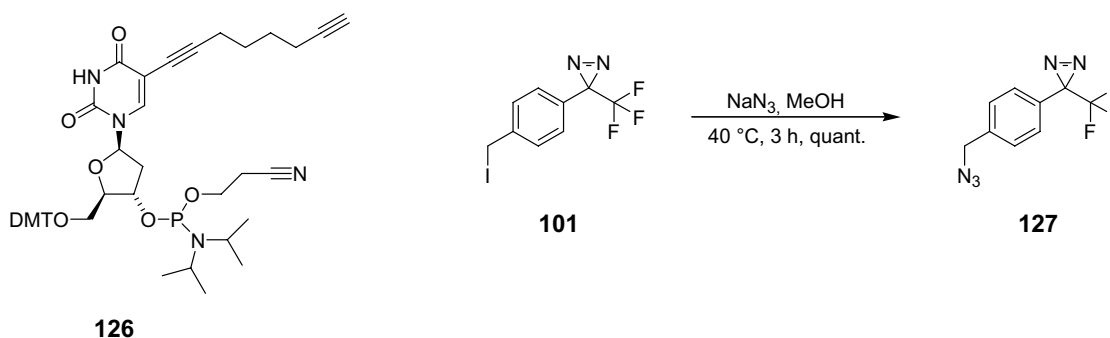


**Schema 62.** Schema der Cu(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition eines Alkins an ein Azid.  $R_1$  und  $R_2$  können beliebige Alkyl- oder Arylsubstituenten sein.

Obwohl dieser Reaktionstyp bereits seit Jahrzehnten bekannt war, und durch *Huisgen*<sup>[433]</sup> systematisch untersucht und mechanistisch beleuchtet wurde, brachte erst die Entdeckung der kupferkatalysierten Variante durch *Sharpless*<sup>[434, 435]</sup> und *Meldal*<sup>[305]</sup> den entscheidenden Fortschritt, der die Reaktion bei Raumtemperatur möglich machte und bei kurzen Reaktionszeiten meistens (nahezu) quantitative Ausbeuten unter milden und extrem chemoselektiven Bedingungen schaffte. Seit ihrer Neuentdeckung steigt die Zahl der Publikationen auf diesem Feld von Jahr zu Jahr exponentiell an.

Auch in unserer Gruppe wurde hier Pionierarbeit geleistet. So gelang *J. Gierlich* und *G. Burley* routinemäßig der Einbau alkinmodifizierter Basen in DNA sowohl per Festphasensynthese als auch über PCR (*Polymerase Chain Reaction*) unter Verwendung der entsprechenden Alkinnukleosidtriphosphate.<sup>[436, 437]</sup> Die Alkin-DNA konnte nachfolgend mit einer Fülle verschiedener Azide sowohl in Lösung als auch im Polyacrylamidgel umgesetzt werden, darunter z. B. Fluoresceinazid, Biotinazid oder verschiedene Azidozucker (für nachfolgende Silberfärbung). So wurde eine hocheffiziente Methode zur selektiven, quantitativen Modifizierung von DNA mit verschiedensten Bausteinen etabliert, die zukünftig auch im Bereich der medizinischen Chemie und Diagnostik sicherlich breite Anwendung finden wird.

Im konkreten Fall wurden DNA-Stränge synthetisiert, welche zwei der Alkinmodifikationen **126** enthielten (freundlicherweise von *G. Burley* zur Verfügung gestellt). Das Diazirinazid **127** wurde durch nukleophile Substitution aus dem entsprechenden Iodid **101** dargestellt und konnte in quantitativer Ausbeute erhalten werden (Schema 63).



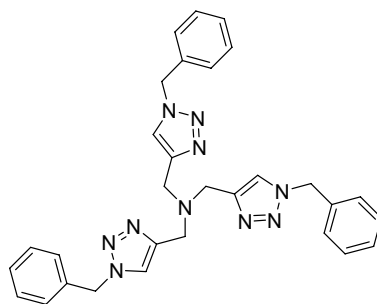
**Schema 63.** Struktur des verwendeten Alkinnukleosids **126** und Darstellung des Diazirinazids **127**.

Für die Details der Festphasensynthese gilt das in diesem und den vorherigen Kapiteln Gesagte. Der Baustein **126** wurde in der gleichen Weise gekuppelt wie der Diazirinbaustein **99**, doch konnten hier höhere Einbauausbeuten >95 % erreicht werden. Nach Abspaltung vom Träger, Entschützung und HPL-chromatographischer Aufreinigung konnten die folgenden Stränge in ca. 10 %iger Ausbeute isoliert werden (Tabelle 13).

Bezeichnung	Sequenz
DA8	5´-F1AATGACCAGKCKCAAGTACTTGACTTB -3´
DA9	5´-F1AATGACCAGKAAKCAAGTACTTGACTTB -3´

**Tabelle 13.** Synthetisierte DNA-Stränge mit dem Alkinbaustein **126**. Fl = 6-FAM **121**, B = Biotin **120**, K = Alkinbaustein **126**.

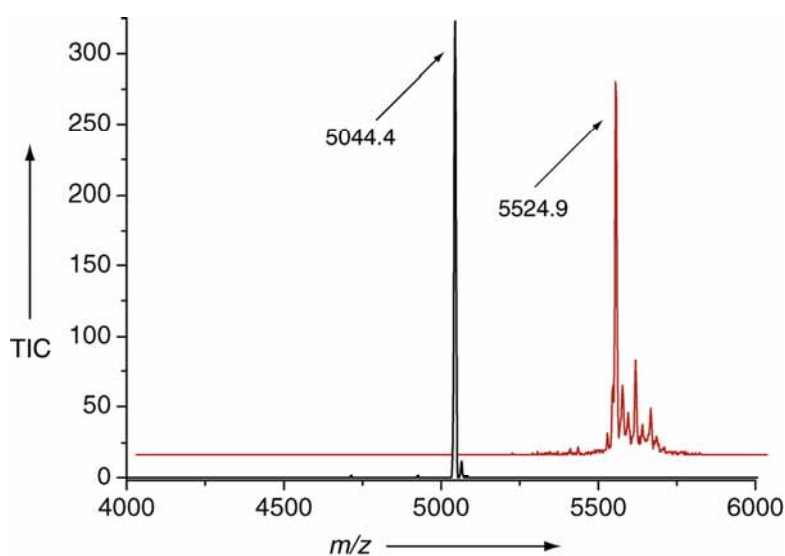
Um die Anwendbarkeit der *Click*-Reaktion in diesem konkreten Fall zu überprüfen, wurde zunächst eine Testreaktion mit dem von *Burley* synthetisierten DNA-Strang 5´-GCGCTG**XX**CATTCGCG-3´ (mit **X** = **126**) durchgeführt, welcher ebenso wie **DA8** und **DA9** zwei Alkinbausteine **126** enthielt. Hierzu wurde zu einer kleinen Menge dieses Oligonukleotids (1 nmol) ein ca. dreifacher Überschuss einer Lösung des Diazirinazids **127** (in DMSO/Wasser) gegeben. Danach wurde der Kupfer(I)-Katalysator zugesetzt, welcher zuvor frisch durch Mischen einer 10 mM Lösung von Kupfer(I)bromid in DMSO und einer 10 mM Lösung des Kupfer(I)-stabilisierenden Liganden **128** dargestellt worden war (Schema 64). Letzterer war nötig, da Kupfer(I) in wässriger Lösung zur Disproportionierung neigt und das entstehende Kupfer(II) bekanntermaßen zu Strangbrüchen in der DNA führen kann.<sup>[10]</sup>



128

**Schema 64.** Struktur des Cu(I)-stabilisierenden Liganden **128**.

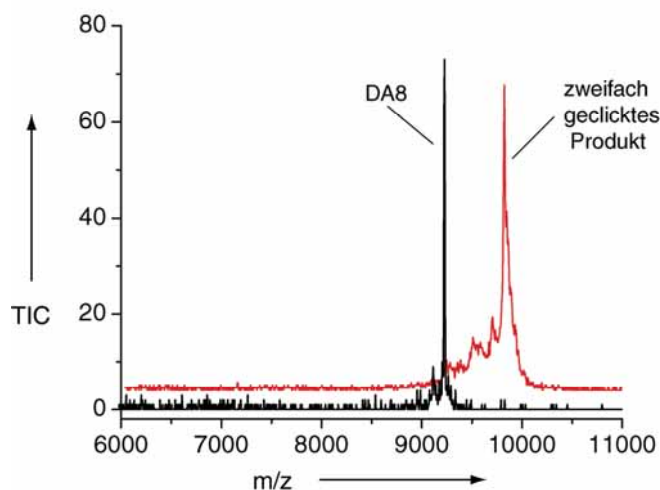
Die Mischung wurde ca. 90 Minuten bei 40 °C inkubiert, anschließend lyophilisiert, in Wasser wiederaufgenommen und entsalzt. Vergleich der MALDI-TOF-Massenspektren von Edukt und Produkt zeigten vollständigen Umsatz zum gewünschten zweifach *geclickten* DNA-Strang an (Abb. 55).



**Abb. 55.** MALDI-TOF-Massenspektren des von G. Burley zur Verfügung gestellten Teststrangs (nur relevanter Bereich abgebildet). schwarz) nach HPLC-Reinigung (positiver Modus); rot) nach Click-Reaktion (negativer Modus).

Die Massendifferenz von  $\Delta m/z = + 480$  entspricht exakt dem Einbau zweier Moleküle **127** ( $m/z = 241.06$ ). Die Inkorporation von **127** in Oligonukleotide durch *Click*-Chemie erwies sich also als möglich.

Daher wurde nun versucht, den DNA-Strang **DA8** nach den gleichen Bedingungen wie oben angegeben zu modifizieren. Erneut wurde nach der Umsetzung mit dem Diazirinazid **127** das zweifach geclückte Produkt in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten (Abb. 56).



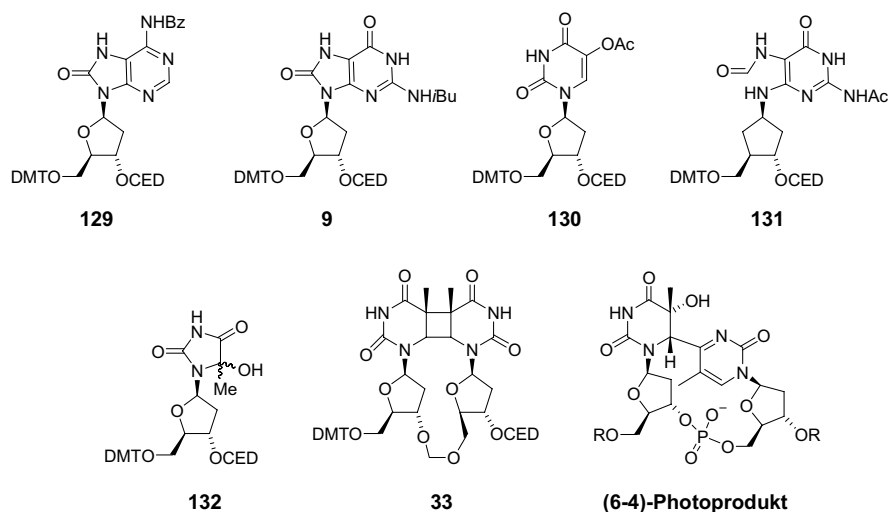
**Abb. 56.** MALDI-TOF-Massenspektren des Strangs **DA8** (nur relevanter Bereich abgebildet). schwarz ) nach HPLC-Reinigung; rot) nach Click-Reaktion (beide Messungen negativer Modus).

Nach *reversed phase*-HPLC konnte das modifizierte Oligonukleotid in guten Ausbeuten isoliert werden, so dass in nachfolgenden Versuchen auch größere Stoffmengen von **DA8-9** umgesetzt wurden, um genug Material für die geplanten photoaffinity labeling-Experimente zu generieren. Der Weg der postsynthetischen Modifizierung über *Click*-Chemie stellte damit eine potentielle Alternative zum direkten Einbau des Diazirinphosphoramidits **99** dar. Die ersten *photoaffinity labeling*-Experimente wurden dennoch zunächst mit den durch Festphasen-DNA-Synthese hergestellten Strängen durchgeführt.

### 4.3.3 Synthese der DNA-Schäden enthaltenden Oligonukleotide

Als potentielle „Köder“ für die geplanten *Fishing*-Experimente wurden verschiedene DNA-Stränge synthetisiert, welche je einen synthetischen DNA-Schaden enthielten. Insgesamt wurden Stränge mit 8-Oxo-dA **129**, 8-Oxo-dG **9**, 5-OH-dU **130**,  $\beta$ -cFaPydG **131**, Hydantoin **132** und dem T=T-Dimerbaustein **33** hergestellt. Zudem wurde von *A. Glas* durch Belichtung ein Oligonukleotid erzeugt, welches ein (6-4)-Photoprodukt enthielt. Die geschützten Phosphoramidite von 8-Oxo-dG, 8-Oxo-dA und 5-OH-dU waren kommerziell erhältlich (*GlenResearch*), die Bausteine **131**, **132** und **33** wurden innerhalb der Arbeitsgruppe synthetisiert und von dieser freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Sequenz der DNA-Oligonukleotide wurde so gewählt, dass sie als Gegenstränge zu den vorgestellten diazirinhaltigen

Strängen geeignet waren. Die Struktur der eingebauten oxidativen und UV-Schäden ist in Schema 65 dargestellt.



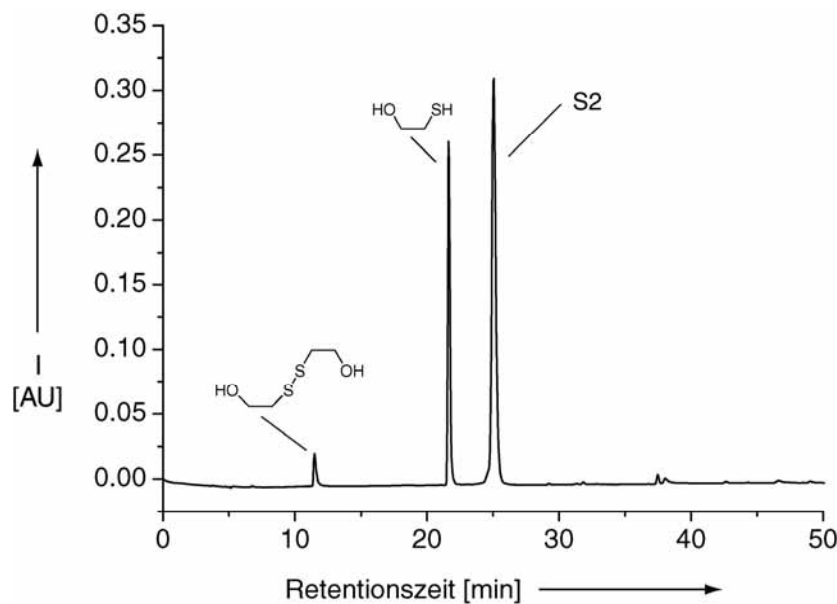
**Schema 65.** Struktur der in Oligonukleotide eingebauten, synthetischen DNA-Schäden.

Die Synthese erfolgte wie bei den diazirinenthaltenden Strängen auf dem *Expedite DNA Synthesizer* im Maßstab 1  $\mu$ mol unter Verwendung von bereits beladenen CPG-Kartuschen und wurde per Standardphosphoramiditchemie durchgeführt. Aufgrund der Länge der Oligonukleotide (26-27 Basen) wurde die Synthese im *DMT-on* Modus durchgeführt, um eine einfachere HPLC-Aufreinigung der gewünschten Produktstränge zu ermöglichen. Für jeden der angegebenen Schäden mussten die Synthesebedingungen und die Konditionen der nachfolgenden Abspaltung vom Träger variiert werden, um sinnvolle Ausbeuten an intakten DNA-Strängen zu erhalten. Im Falle des 8-Oxo-dG **9** beispielsweise musste der Abspatlösung  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt werden, um die in diesem Fall (siehe Einführung) sehr leichte Weiteroxidation zu unterdrücken. Für alle weiteren Abweichungen von den Standardprozeduren sei hier auf den Experimentellen Teil verwiesen, da zusätzliche Ausführungen an dieser Stelle zu weit führen würden.

Nach Abspaltung vom Träger wurden die rohen DNA-Stränge per *reversed phase*-HPLC einer ersten Reinigung unterzogen. Danach wurden die aufkonzentrierten Stränge auf eine *Sep-Pak<sup>TM</sup>*-Kartusche aufgebracht und die endständige DMT-Gruppe durch Behandlung mit 1.5 % Trifluoressigsäure entfernt. Hierbei war es wichtig, die Zeit der Exposition gegenüber der Säure sehr kurz zu halten (90 Sekunden), um Depurinierung und weitere Nebenreaktionen auszuschließen. Nach Neutralisation mit HPLC-Puffer A (siehe Anhang B) wurden die Oligonukleotide gewaschen, eluiert, aufkonzentriert und einer weiteren *reversed phase*-HPLC-Reini-

gung unterworfen. In allen Fällen war die DMT-Gruppe quantitativ abgespalten worden. Die gereinigten DNA-Einzelstränge wurden nachfolgend erneut aufkonzentriert, entsalzt und standen dann für die weiteren Versuche zur Verfügung. Die folgenden Oligonukleotide wurden in letztlich bis zu 20 % Gesamtausbeute in sehr guter Reinheit (> 99 %) erhalten (Tabelle 14). Abb. 57 zeigt ein HPL-Chromatogramm des gereinigten Strangs **S2**.

Bezeichnung	Sequenz
S1	5´-TTACTGGTGAG*AGTTCATCGAACTGAA-3´
S2	5´-TTACTGGTGAA*AGTTCATCGAACTGAA-3´
S3	5´-TTACTGGTGAF*AGTTCATCGAACTGAA-3´
S4	5´-TTACTGGTGAU*AGTTCATCGAACTGAA-3´
S5	5´-TTACTGGTGAH*AGTTCATCGAACTGAA-3´
S6	5´-TTACTGGTGAT=TAGTTCATCGAACTGAA-3´
S7	5´-TTACTGGTGATTAGTTCATCGAACTGAA-3´
S8	5´-ACAGCGGT^TGCAGGTA -3´



**Tabelle 14 und Abb. 57.** Sequenz und Bezeichnung der schädenenthaltenden Oligonukleotide. G\* = 8-Oxo-dG 9, A\* = 8-Oxo-dA 129, F\* =  $\beta$ -cFaPydG 131, U\* = 5-OH-dU 130, H\* = Hydantoin 132, T=T = Dimer 33, T^T = (6-4)-Photoprodukt. unten) HPL-Chromatogramm des Strangs **S2** nach erfolgter Reinigung. Die Fremdpeaks stammen vom in der Entschützungslösung enthaltenen  $\beta$ -Mercaptoethanol bzw. dessen Oxidationsprodukt.

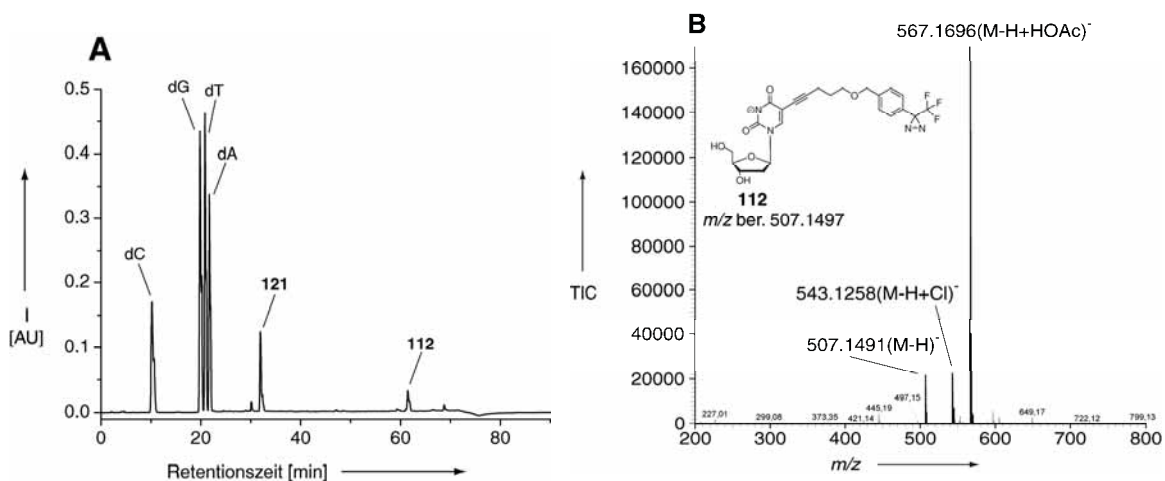


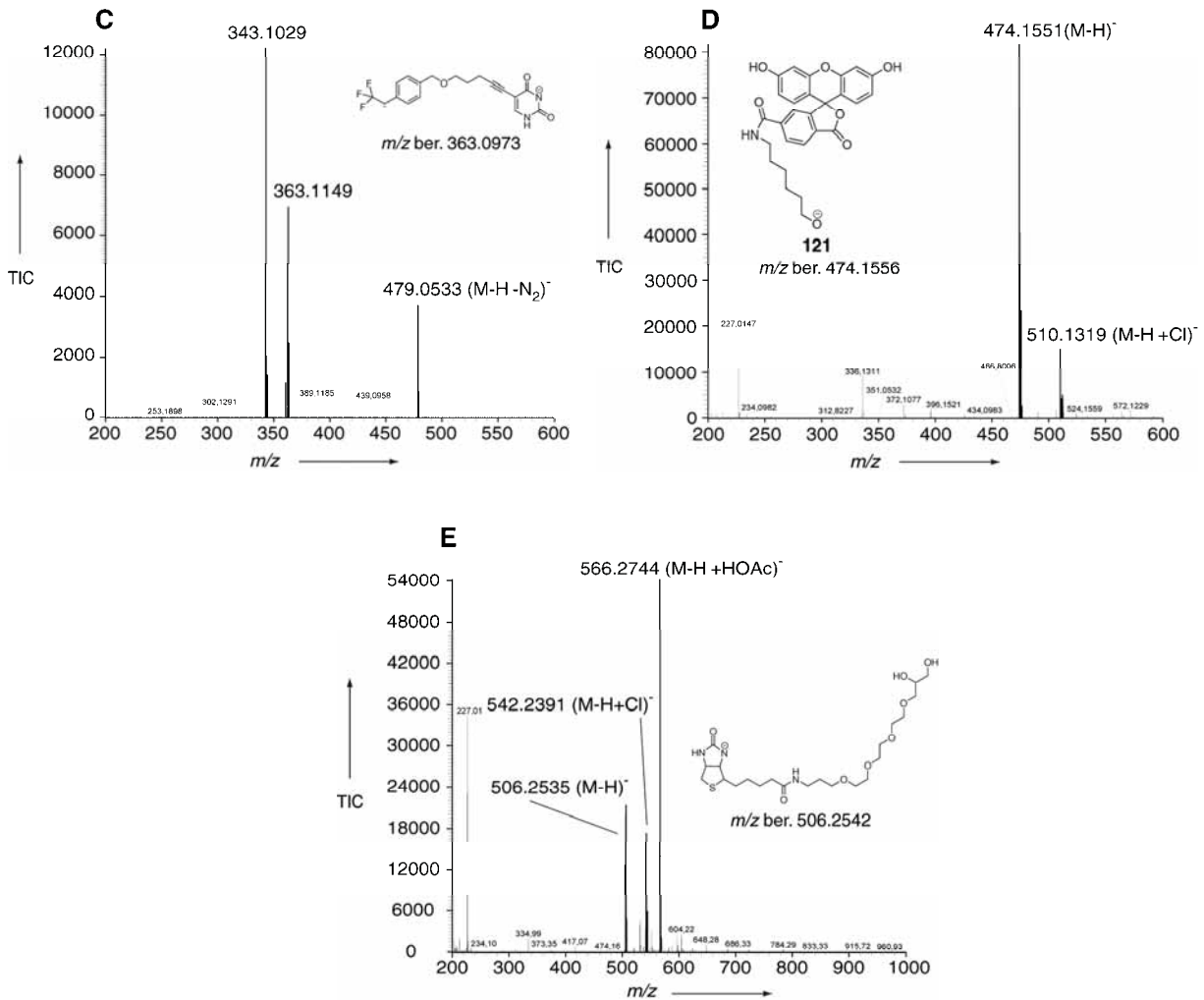
Die gereinigten Oligonukleotide wurden nun nach Bedarf mit den entsprechenden Gegensträngen hybridisiert und standen zur weiteren Charakterisierung der Duplexe bzw. die *Fishing*-Experimente zur Verfügung. Der Strang **S8** wurde von *A. Glas* durch UV-Belichtung erzeugt und aufgereinigt.

#### 4.4 Charakterisierung der Oligonukleotide

Zur Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide wurden verschiedene spektroskopische und spektrometrische Methoden angewendet. Zunächst wurden von den Strängen in allen Stadien der Reinigung und Modifizierung MALDI-TOF-Massenspektren aufgenommen. Die Ergebnisse zeigten in allen Fällen im Rahmen der geräteeigenen Genauigkeit gute Übereinstimmung der berechneten und gemessenen Molekülmassen. Da im vorangegangenen Abschnitt bereits mehrere Massenspektren abgebildet sind, soll an dieser Stelle auf weitere Beispiele verzichtet werden. Eine Tabelle mit allen berechneten und bestimmten Massen findet sich im Experimentellen Teil.

Zum Beweis, dass der Diazirinbaustein nach der DNA-Synthese tatsächlich noch in unveränderter Weise vorlag, wurde das Oligonukleotid **DA2** enzymatisch verdaut, und die erhaltenen Nukleoside per ESI-LC-MS/MS-Messungen untersucht. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigt Abb. 58.





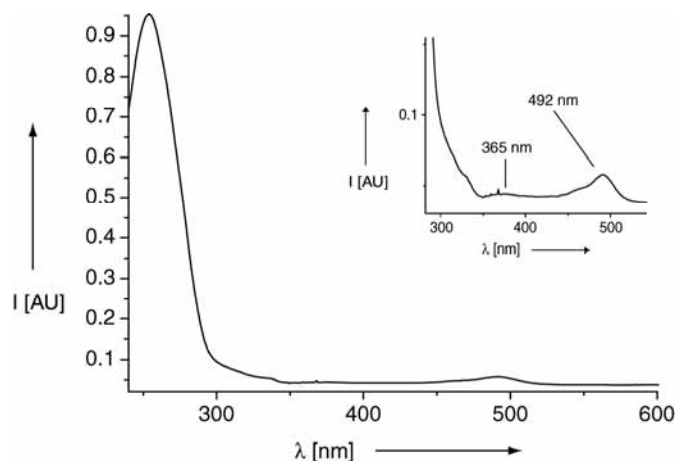
**Abb. 58.** (A) HPL-Chromatogramm (260 nm) eines enzymatischen Totalverdaus von Strang DA2. (B) ESI-Massenspektrum der bei Retentionszeit 61.5 min eluierten Spezies **112**. (C) MS/MS-Fragmentierungsmuster (Ionenfalle) des in (B) dargestellten Ions. (D) ESI-Massenspektrum der bei Retentionszeit 31.9 min eluierten Spezies **121**. (E) ESI-Massenspektrum der bei Retentionszeit 33.0 min eluierten Spezies **120**.

In der in **A** dargestellten UV-Spur des HPL-Chromatogramms sind alle natürlichen Nukleoside sichtbar und konnten über ESI-FTICR-MS identifiziert werden. Das freie Diazirinnukleosid **112** wurde aufgrund seiner sehr unpolaren Natur extrem spät eluiert und konnte als Peak bei einer Retentionszeit von 61.5 Minuten identifiziert werden. Die Identifikation erfolgte dabei sowohl über das charakteristische UV-Vis-Spektrum mit den Absorptionen des Diazirindreirings und des konjugierten Alkins, als auch über das ESI-Massenspektrum, in welchem neben verschiedenen Addukten der Molekülpeak mit hoher Massengenauigkeit gefunden werden konnte (wie in **B** dargestellt). Ein weiteres gutes Indiz für die Identität der Verbindung **112** liefert **C**, in welchem das MS/MS-Fragmentierungsmuster des in **B** dargestellten

Ausgangsions ( $m/z = 507.1491$ ) gezeigt ist. Durch die Kollisionsenergie (Ionenfalle) kommt es hier zur Spaltung des Diazirindreirings unter Verlust eines Moleküls Stickstoff, wodurch das Carben mit der Masse  $m/z = 479.0533$  entsteht. Durch Spaltung der glykosidischen Bindung bleibt das gezeigte Fragment bei  $m/z = 363.1149$  zurück; dieses Teilchen wiederum kann sich durch Eliminierung von HF stabilisieren, wodurch das Fragmentation bei  $m/z = 343.1029$  zu erklären ist.

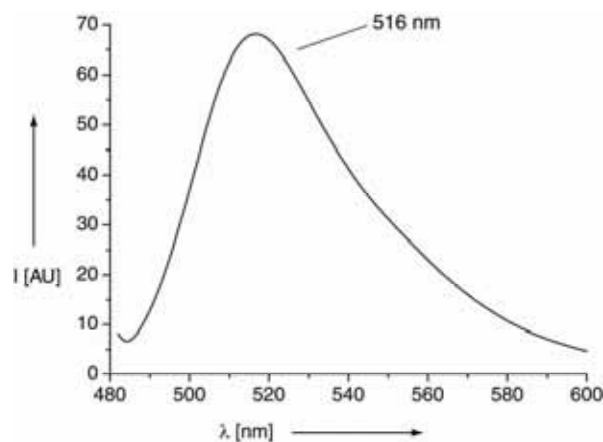
Neben dem Diazirin konnte das Fluorescein **121** (in freier Form) als die bei der Retentionszeit 31.9 Minuten eluierte Spezies sowohl anhand des UV-Vis-Spektrums als auch des sehr gut übereinstimmenden ESI-FTICR-Massenspektrums identifiziert werden (das Massenspektrum ist in **D** gezeigt). Auch der Biotinbaustein **120** konnte in freier Form identifiziert werden. Im HPL-Chromatogramm ist er aufgrund seiner fehlenden Absorption bei 260 nm nicht zu erkennen, im TIC konnte aber eine Retentionszeit von ca. 33 Minuten bestimmt werden. Auch hier gelang die Identifizierung über die sehr gute Übereinstimmung des ESI-FTICR-Massenspektrums, welches in **E** abgebildet ist.

Zum Nachweis der vorhandenen Chromophore wurden von den diazirinhaltigen Strängen **DA1-7** UV-Vis- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Das nachfolgende Beispiel zeigt das UV-Vis-Spektrum des Strangs **DA1** in Wasser (Abb. 59).



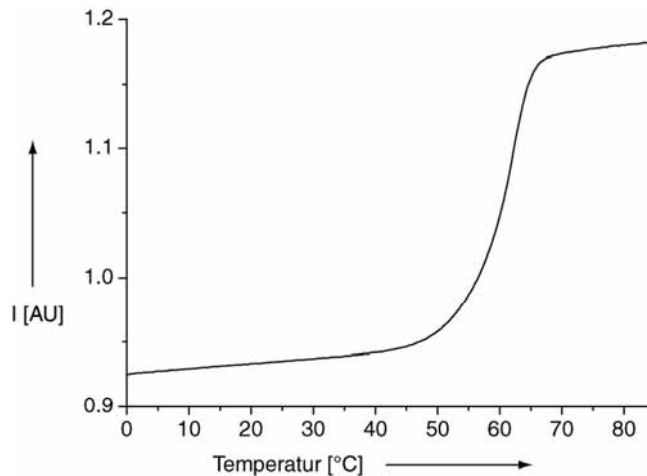
**Abb. 59.** UV-Vis-Absorptionsspektrum des Strangs **DA1** in Wasser. (Der Bereich unter 240 nm, in welchem die Carbonylbanden der DNA-Basen absorbieren, ist der besseren Sichtbarkeit der anderen Banden wegen ausgelassen worden).

Wie in Abbildung 59 deutlich erkennbar ist, sind alle den Modifikationen des Strangs zuweisbaren Absorptionsbanden vorhanden. Neben der starken Absorption der DNA-Basen bei  $\lambda = 260$  nm ist die über 300 nm auslaufende Bande der alkinsubstituierten Uridineinheit der Diazirine zu sehen. Bei  $\lambda = 492$  nm findet sich die Hauptabsorptionsbande des Fluoresceins (die auch für die gelbgrüne Farbe der Oligonukleotide verantwortlich war) und bei  $\lambda = 365$  nm ist schließlich auch die im Vergleich zu den anderen Absorptionen sehr schwache Bande der Diazirine zu erkennen ( $\epsilon_{\max}$  Diazirin = 500 vs.  $\epsilon_{\max}$  Fluorescein = 75000). Dies stellte einen wichtigen Nachweis der Diaziringruppe nach der Synthese dar, welche auch durch den bereits genannten enzymatischen Verdau bestätigt werden konnte. Das Fluoreszenzspektrum desselben Strangs **DA1** zeigte deutlich die sehr starke Emissionsbande des Fluoresceins bei  $\lambda = 516$  nm. Da die Fluoreszenz zur Detektion in den folgenden *Fishing*-Versuchen von entscheidender Bedeutung war, war es wichtig, zu zeigen, dass es hier zu keinen internen *Quenchungs*-Effekten kam (Abb. 60).



**Abb. 60.** Ausschnitt aus dem Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Strang **DA1** in Wasser. Der Bereich unterhalb 480 nm, welcher den starken Anregungspeak enthält, ist der besseren Sichtbarkeit wegen ausgelassen worden.

Um zu überprüfen, ob die diazirinhaltigen Stränge stabile Duplexe mit den schädenenthaltenden Oligonukleotiden ausbilden, wurden von einigen ausgewählten Duplexen UV-Schmelzkurven aufgenommen. Eine Schmelzkurve des Strangs **DA2** im Duplex mit dem T=T-Dimer Strang **S6** ist in Abb. 61 gezeigt.



**Abb. 61.** UV-Schmelzkurve ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) des DNA-Duplexes **DA2:S6**.

Alle vermessenen Duplexe zeigten ein reguläres Schmelzverhalten. Unregelmäßigkeiten wie ein zweiter Schmelzpunkt oder eine Hysterese, welche auf die Bildung einer lokalen Blase (im Bereich der Modifikationen) hindeuten könnte, traten nicht auf. Selbst im in Abb. 61 abgebildeten Duplex **DA2:S6**, welcher das verzerrende T=T-Dimer **33** und zwei Diazirine **99** in enger Nachbarschaft enthielt, wurde ein sauberer Schmelzpunkt von ca.  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  gemessen. Diese hohe Festigkeit ist bemerkenswert, wenn man den stark destabilisierenden Einfluß z. B. von *Kuznetsovas* Diazirinbaustein **74** bedenkt. Der Vorteil unseres Systems liegt wohl in der starren, linearen Alkineinheit des Fängermoleküls, welche hier stabilisierend wirkt und den zuvor verwendeten Molekülen dahingehend überlegen ist. Eine hohe thermische Stabilität ist eine wichtige Voraussetzung für *Fishing*-Experimente, da nur so die Integrität des Duplexes während der Experimente gewährleistet werden kann. Zudem ist die hohe Stabilität ein erstes gutes Indiz dafür, dass die Fängermoleküle, wenn überhaupt, nur eine geringe Störung des Duplexes darstellen und damit im biologischen Sinne stumm sind. Dies ist eine wichtige Prämisse für die *Fishing*-Experimente, denn wenn die Fänger selbst schon als Schädigung wahrgenommen und von Proteinen gebunden würden, würde das die mit den verschiedenen Schäden erhaltenen Ergebnisse naturgemäß verzerren.

Um festzustellen, welche Konformation in den Duplexen vorliegt, wurden CD-spektroskopische Messungen durchgeführt. Dabei wurde prinzipiell der für die B-Konformation typische Verlauf festgestellt, mit einem Maximum bei  $\lambda = 279 \text{ nm}$ , dem Nulldurchgang bei  $\lambda = 258 \text{ nm}$  und einem Minimum bei  $\lambda = 249 \text{ nm}$ . Leichte Abweichungen von den Normwerten ( $275 \text{ nm}$  für das Maximum bzw.  $240 \text{ nm}$  für das Minimum) könnten auf lokale Abweichungen von der idealen B-Konformation hindeuten, doch lässt sich dies hier nicht näher belegen oder beweisen. Des Weiteren ist die relativ schwache Intensität des Minimums bei

$\lambda = 249$  nm typisch für die Anwesenheit einer oder mehrerer Alkinmodifikationen im Strang und wurde so auch von *Burley* und *Gierlich* im Rahmen ihrer Messungen mit mehrfach alkin-modifizierten DNA-Strängen beobachtet. Ein solches CD-Spektrum zeigt Abb. 62.

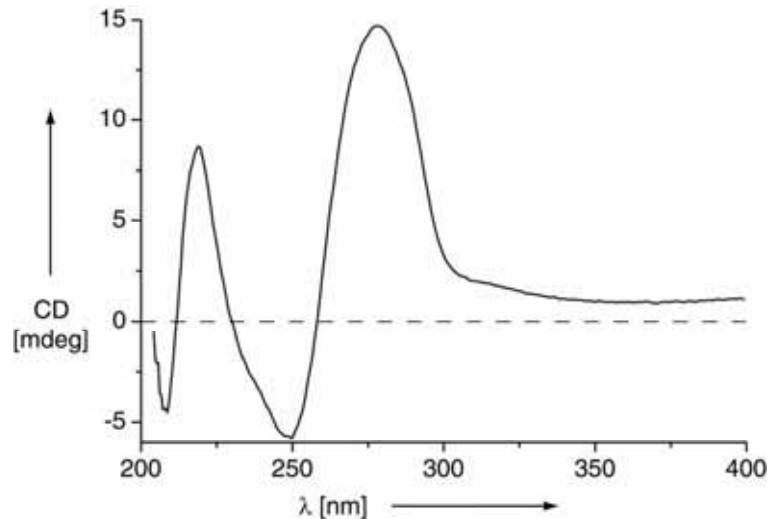


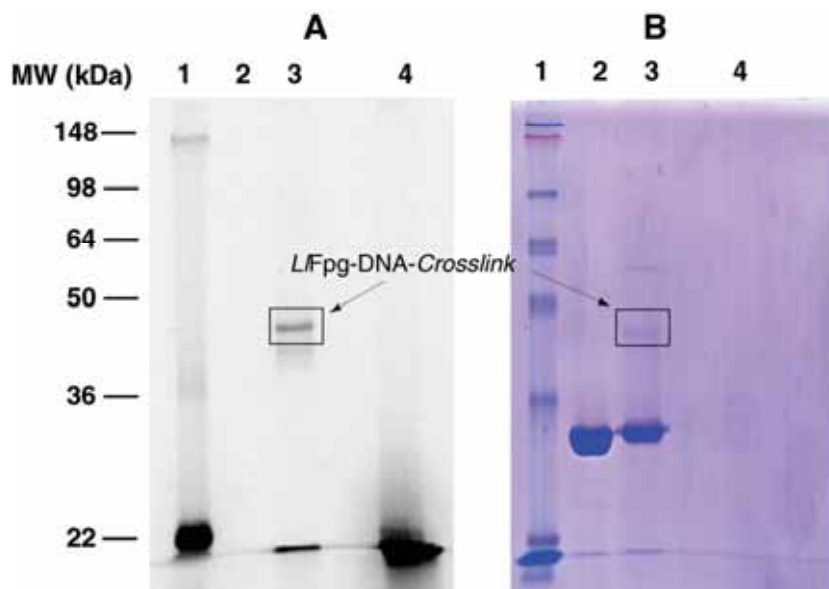
Abb. 62. CD-Spektrum des Duplexes DA2:S6.

Abschließend wurde testmäßig versucht, die biotinmodifizierten DNA-Duplexe an Streptavidin-Agarose zu binden, um sicherzustellen, dass das Biotin auch für diese Wechselwirkung zur Verfügung steht und nicht verdeckt bzw. blockiert wird. Hierzu wurden je 100 pmol der Stränge DA1 bzw. DA3 im *magnetic beads*-Bindungspuffer A (siehe Anhang B) gelöst, mit 20  $\mu$ L Streptavidin-Agarose (50 % Suspension in PBS-Puffer pH 7.0) versetzt und für mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vorsichtiger Zentrifugation konnte gezeigt werden, dass im Falle des biotinenthaltenden Strangs DA1 nach zwei Stunden Inkubation tatsächlich der weitaus größte Teil der Fluoreszenz am Streptavidin lokalisiert war. Die Bindung des desthiobiotinhaltigen Strangs DA3 an Streptavidin verlief wesentlich schlechter, auch nach 12 Stunden Inkubation (bzw. über Nacht) konnte bei weitem nicht die Bindungseffizienz erreicht werden. Es zeigte sich in weiteren Versuchen, dass die Bindung des desthiobiotinhaltigen Strangs DA3 an Streptavidin in Anwesenheit von Proteingemischen (Zellextrakt) noch weiter absank, so dass sie für die *photoaffinity labeling*-Experimente leider nicht mehr praktikabel war. Daher können bis zu einer Lösung dieses Problems die Desthiobiotinstränge DA3-4 zumindest nicht für Experimente in Zellextrakten eingesetzt werden.

## 4.5 Photoaffinity labeling-Experimente

### 4.5.1 Versuche mit rekombinanten DNA-Reparaturproteinen

Um die prinzipielle Eignung der Diazirin-DNA-Sonden zu überprüfen, wurden zunächst *photoaffinity labeling*-Experimente mit gereinigten DNA-Reparaturproteinen durchgeführt. Dies diente auch dazu, die Empfindlichkeitsgrenzen der Fluoreszenzdetektion auf den SDS-Gelen auszuloten und davon ausgehend optimale Sonden- und Enzymkonzentrationen einzustellen. Als Proteine standen *Lactococcus lactis*-Formamidopyrimidinglykosylase (*LIFpg*, von A. Glas in *E. coli* überexprimiert), *E. coli* CPD-Photolyase (von C. Chiocchini in *E. coli* überexprimiert) und *S. cerevisiae* Rad 14 bzw. Rad 23 (Analoge zum humanen XPA-Protein bzw. hR23b-Protein, von R. Strasser aus *E. coli* überexprimiert) zur Verfügung. Zur Markierung von *LIFpg* wurde der Duplex **DA1:S3** verwendet, welcher das von diesem Enzym erkannte und reparierte  $\beta$ -FaPydG **131** als oxidativen Schaden enthielt. Da es sich im hier verwendeten Molekül um ein carbozyklisches Analogon dieses Schadens handelte, konnte zwar Bindung aber keine Prozessierung durch das Enzym erfolgen, was für den Versuch überaus günstig war. In 100  $\mu$ L Assayvolumen wurden 50 pmol der DNA-Sonde mit 50 pmol *LIFpg* versetzt (Konzentrationen Sonde/Protein je 500 nM), kurz bei niedrigen Temperaturen (0-4 °C) inkubiert und danach auf Eis für ca. 1 Stunde mit 366 nm belichtet. Nach Aufkonzentration, Hitzedenaturierung und Analyse per SDS-PAGE ergab sich das folgende Bild (Abb. 63)



**Abb. 63 (umseitig).** (A) Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 10 % SDS-Polyacrylamidgels nach Belichtung des Duplex **DA1:S3** mit gereinigtem LIFpg-Protein. (B) Aufnahme des gleichen Gels nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: LIFpg (10  $\mu\text{g}$ ), Spur 3: Belichtung von 50 pmol **DA1:S3** mit 5  $\mu\text{g}$  LIFpg, Spur 4: **DA1:S3** (100 pmol). Die Belichtungszeit betrug 60 Minuten bei 0 °C.

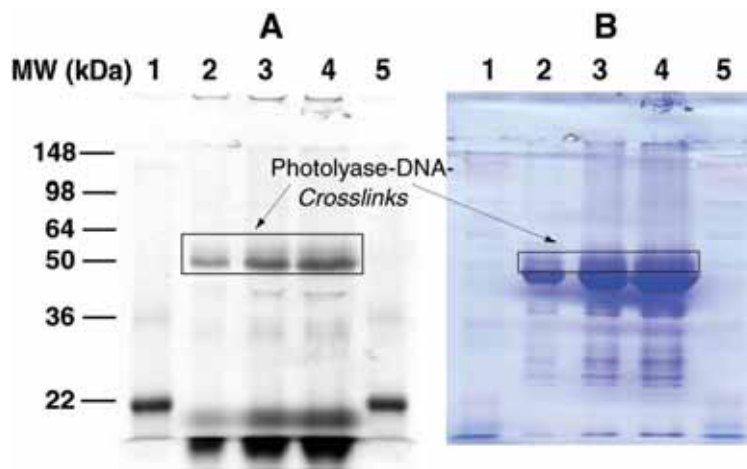
Die Fluoreszenzaufnahme (A) in Abb.63 zeigt in Spur 2 wie erwartet keine Banden, da hier nur das reine Protein vorlag, wie im *Coomassie Blue*-gefärbten Gel (B) zu sehen. In Spur 3 hingegen zeigt sich neben der freien DNA-Sonde **DA1:S3**, welche grundsätzlich mit der Lauf-front migriert, deutlich eine fluoreszierende Bande mit einer Masse von ca. 42 kDa, welche hier schwarz umrahmt wurde. (Anmerkung: Die Zuordnung einer molekularen Masse aufgrund des Laufverhaltens im SDS-PAGE ist immer *cum grano salis* zu betrachten, da sich abhängig von der Zusammensetzung des Proteins die tatsächliche Masse und das augenscheinliche Laufverhalten teils beträchtlich unterscheiden können. Bei den hier verwendeten Proteinen war die Übereinstimmung jedoch meist gut, Abweichungen werden im Einzelfall erläutert.) Diese Masse setzt sich aus der Masse des freien Proteins (ca. 33 kDa) + der Masse des Diazirinstrangs **DA1** (ca. 9 kDa) zusammen. Durch die Hitzedenaturierung im Vorfeld der Gelelektrophorese schmelzen die Doppelstränge auf, so dass hier nur noch **DA1** vorliegt. Diese Bande konnte daher als der gewünschte Protein-DNA-Crosslink identifiziert werden. Auch in der *Coomassie Blue*-Färbung zeigt sich auf dieser Höhe eine aufgrund der niedrigen Empfindlichkeit dieser Färbemethode sehr schwache Bande (siehe Umrahmung). Zudem ist hier noch eine schwerere, nicht fluoreszente Bande (50-60 kDa) zu sehen, deren Herkunft nicht geklärt werden konnte; evtl. handelt es sich um ein Aggregat zweier Fpg-Moleküle.

Die *Crosslink*-Ausbeute war insgesamt nur mäßig (ca. 5 %). Der Grund hierfür ist in der hohen Reaktivität der Aryltrifluormethyldiazirineinheit ( $\rightarrow$  Reaktion des Carbens mit Wasser bzw. der DNA selbst) gepaart mit der im Vergleich zu früher beschriebenen Versuchen großen Länge des *Linkers* (ca. 10 Å) zu suchen. Bringt man das Diazirin näher an den Schaden heran, führt dies zu einer weit höheren Ausbeute, allerdings muss man hier eine starke Destabilisierung und Verzerrung des Duplex in Kauf nehmen. Zudem war die größere Flexibilität des Diazirinbausteins eine Voraussetzung für bessere Ergebnisse beim *Fischen* in Proteingemischen (Abschnitt 4.5.2 und folgende), indem man sich nicht auf Proteine fixierte, die in unmittelbarem Kontakt zum Schaden traten. Auch war die hohe Reaktivität des Bausteins ja durchaus erwünscht. Insofern waren die erreichten Ausbeuten im Hinblick auf die späteren Experimente durchaus ermutigend, zumal hier nur äquimolare Mengen an Sonde und Protein



in nicht allzu hoher Konzentration verwendet wurden und noch keine Optimierung des Assaypuffers stattgefunden hatte.

Zur Markierung der gereinigten *E. coli*-CPD-Photolyase wurde vollkommen analog vorgegangen, nur wurde hier der Duplex **DA2:S6** eingesetzt, in welchem als potentielles Substrat der Formacetal-dimerbaustein **33** vorlag. Zudem wurde die Vorinkubation mit dem Protein unter Lichtausschluss durchgeführt, um zu verhindern, dass die Photolyase bereits hier aktiv wurde und dann nicht mehr hätte markiert werden können. In Abb. 64 ist ein SDS-Polyacrylamidgel eines *labeling*-Versuchs dargestellt.



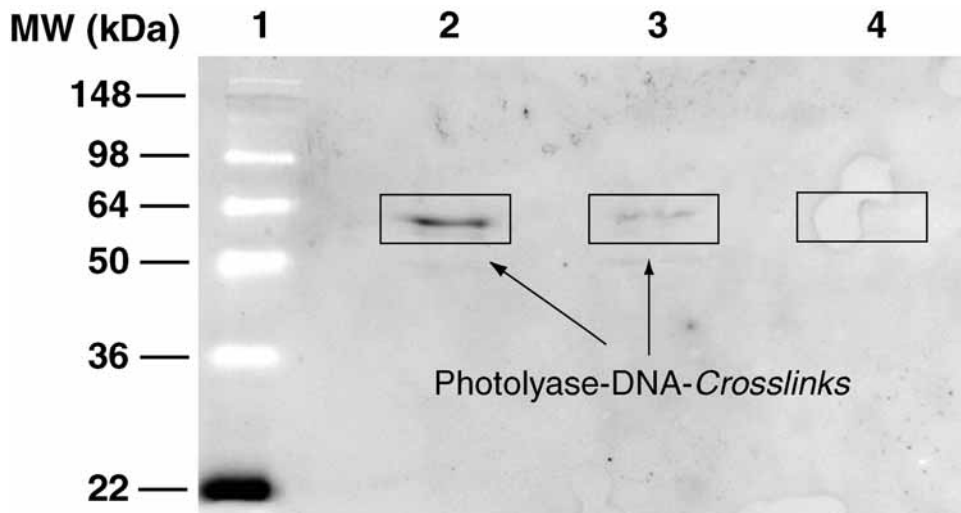
**Abb. 64.** (A) Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 12.5 % SDS-Polyacrylamidgels nach Belichtung des Duplex **DA2:S6** mit gereinigter *E. coli* CPD-Photolyase. (B) Aufnahme des gleichen Gels nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Spuren 1+5: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: Belichtung **DA2:S6** + 2  $\mu\text{g}$  CPD-Photolyase, Spur 3: Belichtung **DA2:S6** + 5  $\mu\text{g}$  CPD-Photolyase, Spur 4: Belichtung **DA2:S6** + 10  $\mu\text{g}$  CPD-Photolyase. Es wurden je 50 pmol **DA2:S6** in 100  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen eingesetzt, die Belichtungszeit betrug 30 Minuten bei 0 °C.

In den Spuren 2, 3 und 4 sind Belichtungen von je 50 pmol **DA2:S6** mit einer steigenden Menge an CPD-Photolyase gezeigt (2, 5 bzw. 10  $\mu\text{g}$  Protein). Im *Coomassie Blue*-gefärbten Gel ist das freie Protein in Form der sehr starken Bande unterhalb von 50 kDa (trotz seiner tatsächlichen Masse von 53 kDa!) zu erkennen. Unterhalb der Banden des intakten Proteins ist eine Vielzahl an Banden kleinerer Masse zu sehen, welche vermutlich von Zersetzung im Zuge häufiger Auftau- und Einfrierzyklen herrühren. Die Belichtungszeit wurde hier (und für alle folgenden Versuche) auf 30 Minuten gesenkt, da Versuche gezeigt hatten, dass die Spaltung des Diazirins unter Verwendung der 366 nm-Handlampe (30 Watt) bereits nach ca.

20 Minuten vollständig abgelaufen war. Im Verlauf der Belichtung entstand ähnlich wie im Falle des *LIFpg*-Proteins eine neue Bande mit augenscheinlich leicht größerer Masse als das reine Protein (siehe Umrahmung). Der Blick in die Fluoreszenzaufnahme (**B**) zeigt deutlich, dass diese neuentstandene Bande fluoresziert, es handelt sich folglich um den gewünschten Protein-DNA-Crosslink. Ferner sieht man in der Fluoreszenzaufnahme (neben der freien Sonde **DA2:S6**, welche mit der Laufront wandert), dass die Abbaufragmente der Photolyase quasi nicht markiert werden. Vermutlich sind diese aufgrund ihrer unvollständigen Struktur nicht mehr in der Lage, mit hoher Affinität an dimergeschädigte DNA zu binden. Es lässt sich daher festhalten, dass die Markierung der CPD-Photolyase selektiv erfolgt und an die Aktivität des vollständigen Proteins geknüpft ist.

Auch in diesem Fall konnten keine Ausbeuten > 10 % erzielt werden, die Gründe für diesen Sachverhalt sind im Wesentlichen die gleichen wie oben bereits gesagt. Erschwerend kommt hinzu, dass die Wellenlänge von 366 nm, welche zur Spaltung des Diazirins verwendet wurde, auch die Photolyase aktiviert, welche daraufhin das Dimer spalten und abdissoziieren kann, so dass keine Markierung mehr erfolgt.

Ein zusätzlicher Nachweis für die kovalente Markierung der CPD-Photolyase durch den Duplex **DA2:S6** wurde über einen *WesternBlot* erbracht. Dazu wurden 3 Belichtungsansätze unter Verwendung von je 50 pmol der Sonde **DA2:S6** mit je 5 µg gereinigter CPD-Photolyase durchgeführt, wobei den Ansätzen eine steigende Menge an *calf thymus* DNA als Kompetitor-DNA zugefügt wurde (1, 10 bzw. 50 Äquivalente). Nach der Trennung per SDS-PAGE wurden die Proteine nach dem *Semi dry*-Blotverfahren (*Khyse-Anderson, 1984*)<sup>[438]</sup> elektrophoretisch auf eine Nylonmembran transferiert. Nach dem Blocken der Membran (Absättigung der Proteinbindungsstellen der Membran durch Inkubation mit gelöstem Milchpulver) und mehreren Waschschritten wurde die Membran über Nacht mit einem *Cy3*<sup>TM</sup>markierten Anti-Biotin-Antikörper (*Biomol*) inkubiert. Nach verschiedenen Waschschritten zur Entfernung des freien Antikörpers wurde die Membran mit dem *LAS 3000-Imager* untersucht, wobei hier die grünen LED-Leuchtkörper zur Anregung des *Cy3*<sup>TM</sup> verwendet wurden ( $\lambda_{\text{Anregung}} = 550 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} = 570 \text{ nm}$ ). Man erhielt das folgende Bild (Abb. 65).



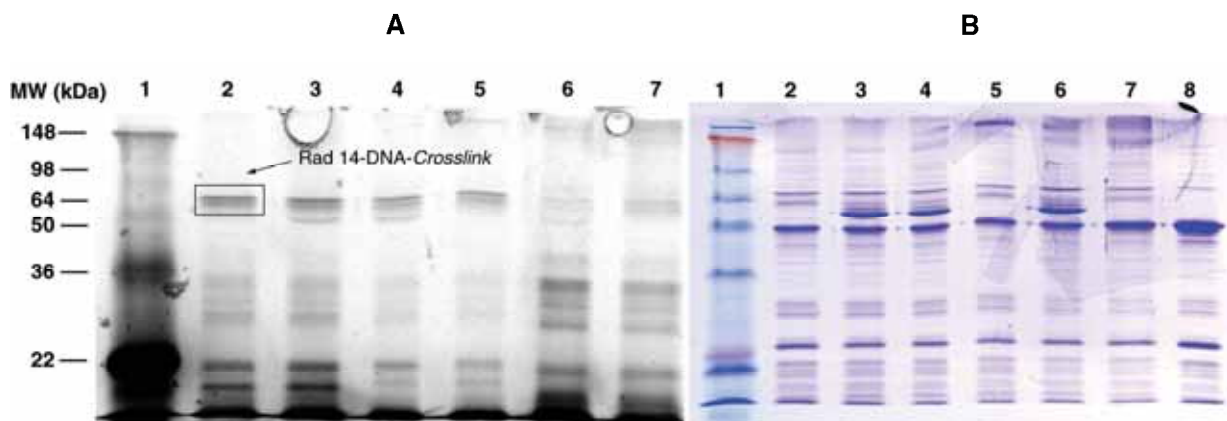
**Abb. 65.** Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 570 \text{ nm}$ ) des WesternBlot einer Belichtung von **DA2:S6** (je 50 pmol) mit *E. coli* CPD-Photolyase (je 5  $\mu\text{g}$ ) unter Verwendung eines Cy3<sup>TM</sup>-markierten Anti-Biotin-Antikörpers. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: + 1 Äquivalent calf thymus DNA, Spur 3: + 10 Äquivalente calf thymus DNA, Spur 4: + 50 Äquivalente calf thymus DNA. Gesamtvolumen 100  $\mu\text{L}$ , Belichtung für 30 Minuten bei 0 °C. Details WesternBlot siehe Text und Experimenteller Teil.

In Spur 2 ist deutlich eine fluoreszente Bande zwischen 50 und 60 kDa, auf der Höhe des erwarteten Protein-DNA-Crosslinks zu sehen. Diese rührt von der Bindung des Cy3<sup>TM</sup>-markierten Anti-Biotin-Antikörpers an das Biotin in der DNA-Sonde **DA2:S6** her; damit ist die kovalente Markierung der CPD-Photolyase durch **DA2:S6** erwiesen. In Spur 3 ist die Bande aufgrund der gesteigerten Menge (10 Äquivalente) an Konkurrent-DNA im Assay bereits stark abgeschwächt um in Spur 4 (50 Äquivalente) schließlich gar nicht mehr aufzutreten. Offenbar ist die Affinität der CPD-Photolyase zu dimerenthaltenden Strängen zwar hoch, ein hoher Überschuss an Konkurrenz-DNA führt aber auch hier nach und nach zum Verschwinden der spezifischen Bindung. Der hier gefundene, zur Unterdrückung der spezifischen Wechselwirkungen nötige Überschuss wird so auch in EMSA-Experimenten (*Enzyme Mobility Shift Assays*) gefunden und beschreibt eine normale Interaktion zwischen einem DNA-bindenden Protein und seiner Targetsequenz.

In einem dritten Versuch schließlich sollte die Wechselwirkung von rekombinanten *S. cerevisiae* Rad 14- bzw. Rad 23-Proteinen mit sowohl schädenehaltender als auch ungeschädigter DNA untersucht werden. Beiden Proteinen kommt eine Schlüsselrolle in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) von DNA-Schäden zu, in der das geschädigte Nukleotid in einem

komplexen Zusammenspiel mehrerer Komponenten zusammen mit einem größeren DNA-Stück (ca. 30 Basen) entfernt wird.<sup>[439, 440]</sup> Die entstandene Lücke wird von Polymerasen gefüllt und die Bruchstellen von DNA-Ligasen verschlossen. Rad 14 ist ein Analogon des humanen Proteins XPA (*Xeroderma pigmentosum A*), welches als die entscheidende Komponente für die Verifizierung einer zu entfernenden DNA-Schädigung gilt. Rad 23 ist seinerseits ein Analogon des humanen hR23b-Proteins, welches in Komplex mit XPC (*Xeroderma pigmentosum C*) als verantwortlich für die initiale Erkennung und Bindung des DNA-Schadens betrachtet wird.<sup>[390]</sup>

Bevorzugte Substrate für NER sind sterisch anspruchsvolle, helixverzerrende und das Wasserstoffbrückenmuster störende Addukte (sog. *bulky adducts*) wie z. B. Benzopyrenaddukte oder das Acetylaminofluorenaddukt (AAF), aber auch das (6-4)-Photoprodukt, welche auf anderem Wege nur schwer prozessiert werden können ( $\rightarrow$  *translesion synthesis TLS*). Da auch das T=T-CPD-Dimer ein – wenn auch nicht besonders gutes – Substrat für die NER darstellt, wurde für dieses Experiment das CPD-enhaltende Konstrukt **DA2:S6** verwendet. Daneben wurden auch der ungeschädigte Duplex **DA2:S7** und das  $\beta$ -cFaPydG-enhaltende Konstrukt **DA1:S3** eingesetzt, welche kein Substrat für die NER darstellen sollten. Für die Belichtungen wurden je 50 pmol der drei DNA-Doppelstränge benutzt. Belichtet wurde je einmal in Anwesenheit von 5  $\mu$ g Rad 14, und einmal in Anwesenheit von sowohl 5  $\mu$ g Rad 14 als auch 5  $\mu$ g Rad 23. Das Ergebnis dieses Versuchs, der in enger Zusammenarbeit mit R. Strasser in unserer Gruppe durchgeführt wurde, zeigt Abb. 66.



**Abb. 66.** (A) Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 12.5 % SDS-Polyacrylamidgels einer Belichtung der Duplexe **DA2:S6**, **DA2:S7** bzw. **DA1:S3** (je 50 pmol) mit gereinigtem Rad 14 Protein (5  $\mu$ g) bzw. Rad 14+Rad 23 (je 5  $\mu$ g). (B) Aufnahme des gleichen Gels nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: **DA2:S7** (ungeschädigt) + Rad 14, Spur 3: **DA2:S7** (ungeschädigt) + Rad 14 + Rad 23, Spur 4: **DA2:S6** (T=T-Dimer) + Rad 14, Spur 5: **DA2:S6** (T=T-Dimer) + Rad 14 + Rad 23, Spur 6: **DA1:S3** ( $\beta$ -cFaPydG) + Rad 14, Spur 7: **DA1:S3**

( $\beta$ -cFaPydG) + Rad 14 + Rad 23, Spur 8: Rad 14. Die Belichtung erfolgte für je 30 Minuten bei 0 °C, Gesamtvolumen 100  $\mu$ l.

Betrachtet man zunächst die Spuren 2, 4 und 6, in denen die DNA-Sonden nur in Anwesenheit von Rad 14 belichtet wurden, so zeigt sich im Falle des ungeschädigten Strangs (Spur 2) und des T=T-Dimer-enthaltenden Strangs (Spur 4) deutlich die Entstehung eines Protein-DNA-Crosslinks bei ca. 60 kDa. Da das freie Protein (Spur 8) trotz seiner Masse von 43 kDa ungefähr auf der Höhe von 50 kDa läuft, ist das kovalent markierte Protein bei ca. 60 kDa zu erwarten. Es tritt hier eine Doppelbande auf, der Grund hierfür konnte bisher nicht ermittelt werden. Da die Stränge mit zwei Diazirinen **99** versehen waren, konnten sie ein- oder zweimal mit dem Protein reagieren, wodurch konformationell leicht unterschiedliche Crosslinks erzeugt würden, durch welche es zum Auftreten zweier Banden im SDS-Gel kommen könnte. Ein Rad 14-spezifischer *WesternBlot* zeigte ebenfalls diese Doppelbande, so dass es sich hier nicht um eine Kontamination handelte.

Interessanterweise scheint hier auch eine erstaunlich hohe Affinität des Rad 14 zu ungeschädigter DNA zu bestehen, die so vorher nicht erwartet wurde. Von R. Strasser wird in nächster Zeit versucht werden, diese Affinität auch in EMSA-Assays zu reproduzieren, um zu zeigen, ob es sich hier nur um ein Artefakt des Experiments handelte oder ob dies eine echte Eigenschaft von Rad 14 ist. Die mangelnde Selektivität für den T=T-Dimer-enthaltenden Strang **DA2:S6** gegenüber dem ungeschädigten Strang **DA2:S7** zeigt ferner, dass der CPD-Schaden, wie vorher bereits gesagt wurde, nur ein sehr mäßiges Substrat für die Nukleotidexzisionsreparatur darstellt. Ein *Crosslink* der  $\beta$ -cFaPydG-enthaltenden Sonde **DA1:S3** zu Rad 14 (Spur 6) wurde nur sehr schwach gebildet, die Affinität von Rad 14 zu DNA mit oxidativen Schäden kann daher eher als gering angesehen werden. Dies steht im Einklang mit der bekannten Substratspezifität von Rad 14.

Der Blick auf die Spuren 3, 5 und 7, welche die Belichtungen in Anwesenheit von Rad 14 und Rad 23 zeigen, belegt keine Markierung von Rad 23, welche leicht (Masse des freien Proteins ca. 46 kDa, Laufhöhe im SDS-PAGE ca. 55 kDa) über der vom Rad 14 herrührenden Doppelbande zu sehen sein müsste. Ein *WesternBlot* bestätigte diese Annahme. Rad 23 besitzt, wenn es nicht mit Rad 4 (Analogon zum humanen XPC-Protein) komplexiert ist, offenbar keine Affinität sowohl zu geschädigter als auch zu intakter DNA. Die Anwesenheit von Rad 23 hat ferner keine Auswirkungen auf die Effizienz der Markierung von Rad 14, wie ein Vergleich der Spuren 2-3, 4-5 und 6-7 zeigt. Einzig im Falle des  $\beta$ -cFaPydG-enthaltenden Strangs **DA1:S3** (Spur 7) scheint das Vorhandensein von Rad 23 zu einer leicht verstärkten Markierung von Rad 14 zu führen, doch ist dieser Effekt schwach und daher kein verlässliches Indiz.

Insgesamt fällt auf, dass das reine Rad 14 (Spur 8) bereits vor der Belichtung eine Vielzahl an Banden aufwies, die entweder von Kontaminationen aus dem Reinigungsprozess oder aber von proteolytischer Zersetzung des Proteins herrührten. Auch diese Banden wurden, wenn man beispielsweise die Spuren 6-7 betrachtet, mit teils beträchtlicher Effizienz kovalent markiert. Eine massenspektrometrische Untersuchung dieser Banden soll daher in nächster Zukunft vorgenommen werden, um die Identität dieser Proteine (bzw. Proteinfragmente) zu klären. Zudem soll der Versuch noch einmal mit dem Duplex **DA5:S8**, welcher das stark helixverzerrende (6-4)-Photoprodukt enthält, durchgeführt werden, um einen Eindruck davon zu gewinnen, mit welcher Effizienz ein gutes NER-Substrat Rad 14 bzw. Rad 23 markieren kann.

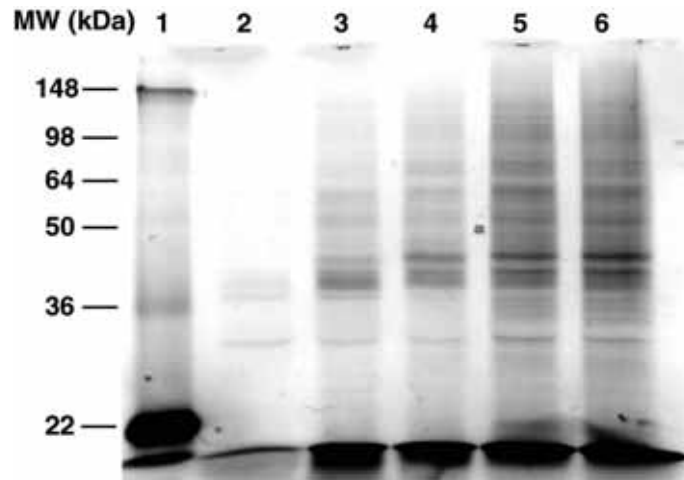
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die synthetisierten diazirinenthaltenden DNA-Sonden allesamt gut für die kovalente Markierung gereinigter Proteine geeignet waren und es in den gewünschten Fällen zur Ausbildung von Protein-DNA-Crosslinks mit guter Effizienz (bis 10 %) kam. Dabei konnte gute Selektivität der Protein-DNA-Wechselwirkung beobachtet werden. Ferner war (wie im Falle der *E. coli* CPD-Photolyase gezeigt) die Markierung vom Vorhandensein des intakten Proteins mit seiner Affinität zur Ziel-DNA abhängig, so dass es sich hier tatsächlich um ein aktivitätsbasiertes und nicht um ein rein statistisches Phänomen handelte.

### **4.5.2 Versuche mit Zellextrakten aus *E. coli*-Überexpressionsstämmen**

Ermutigt von den mit Reinproteinen erhaltenen Ergebnissen wurde versucht, die Experimente auch auf Gesamtzellextrakte auszudehnen. Als Startpunkt boten sich die Lysate der vorliegenden *E. coli*-Stämme an, in welchen das LIFpg bzw. die CPD-Photolyase überexprimiert wurden, denn hier machten besagte Proteine einen relativ großen Anteil am Gesamtzellprotein aus. Die Ergebnisse des *photoaffinity labeling* sollten damit gut detektier- und auswertbar sein. Im Rahmen dessen sollten darüber hinaus der Einfluss des Puffersystems auf die Selektivität und die möglichen Detektionsgrenzen untersucht werden.

In ersten Ansätzen wurde zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen ein LIFpg-überexprimierender *E. coli*-Extrakt von *A. Glas* präpariert, pro analytischem Ansatz wurden davon je 100 µg eingesetzt (Proteinkonzentration im Assay 1 mg/mL). In einem ersten Versuch wurde getestet, wie weit sich die Sondenkonzentration verringern ließ, um danach noch ein klares Fluoreszenzsignal auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu erhalten. Als Puffer für das

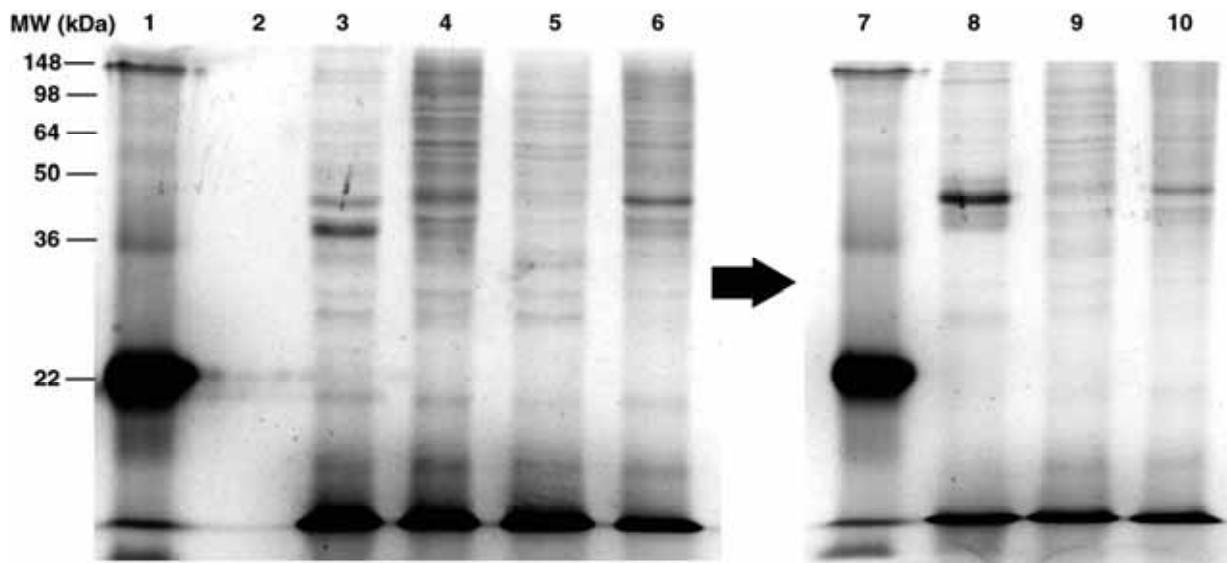
Experiment wurde zunächst der Fpg-Lagerpuffer (siehe Anhang A) verwendet. Die Ergebnisse zeigt Abb. 67.



**Abb. 67.** Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 10 % SDS-Polyacrylamidgels nach Belichtung des Duplex **DA1:S3** mit *E. coli*-Zellextrakt (LIFpg überexprimiert). Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: 1 pmol **DA1:S3**, Spur 3: 10 pmol **DA1:S3**, Spur 4: 25 pmol **DA1:S3**, Spur 5: 50 pmol **DA1:S3**, Spur 6: 100 pmol **DA1:S3**. Es wurden je 100  $\mu\text{g}$  Zellextrakt verwendet, als Assaypuffer wurde der Fpg-Lagerpuffer eingesetzt; die Belichtungszeit betrug je 30 min bei 0 °C.

Abb. 67 zeigt, dass bereits bei Belichtung mit 1 pmol der Sonde **DA1:S3** (Spur 2) erste schwache, von markierten Proteinen herrührende Banden sichtbar wurden. Hierzu mussten recht lange Expositionszeiten am *LAS3000-Imager* gewählt werden (30 s). Dennoch bewegt man sich damit in einem ähnlichen Sensitivitätsbereich wie im Falle radioaktiver Markierung der DNA mit  $^{32}\text{P}$ . Erhöhung der DNA-Menge bis zu 100 pmol (Spuren 3-6) führte erwartungsgemäß zu einer enormen Verstärkung der erhaltenen Banden, allerdings nahm auch der Hintergrund an nichtspezifischer Markierung stark zu. Als Kompromiss wurde für alle nachfolgenden analytischen *photoaffinity labeling*-Experimente eine DNA-Menge von 30-50 pmol (DNA-Konzentration 300-500 nM) pro Ansatz verwendet.

Der hohe Grad an unspezifischer Markierung von Proteinen im Extrakt, der sich in einem sehr hohen Hintergrund äußerte, sollte durch Wahl eines geeigneten Assaypuffers minimiert werden. Im oben dargestellten Experiment wurde als Ausgangspunkt der Fpg-Lagerpuffer (siehe Anhang B) gewählt, in welchem das LIFpg-Protein hinreichend stabil sein sollte. Vermutlich störte aber der hohe Gehalt an Glycerin (10 %) die freie Diffusion der Proteine in Lösung. Daher wurden in einer Reihe von Belichtungsexperimenten von je 50 pmol DA1:S3 + 100 µg *E. coli*-Zelllysate (LIFpg überexprimiert) verschiedene Puffer auf ihre Eignung getestet. Das Resultat dieser Experimente zeigen die in Abb. 68 dargestellten SDS-Gele.



**Abb. 68.** Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) zweier 12.5 % SDS-Polyacrylamidgele nach Belichtung des Duplex DA1:S3 mit *E. coli*-Zellextrakt (LIFpg überexprimiert) in verschiedenen Puffersystemen. Spuren 1 und 7: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: 100 µg unbelichteter Extrakt, Spur 3: Belichtung im Fpg-Assaypuffer, Spur 4: Belichtung im Fpg-Lagerpuffer, Spur 5: Belichtung im CPD-Photolyase-Assaypuffer, Spur 6: Belichtung im von Lippard verwendeten Puffersystem,<sup>[405]</sup> Spur 8: wie Spur 6 + 50 ng/µL calf thymus DNA bzw. Poly dI:dC, Spur 9: wie Spur 6, statt 50 mM KCl wurde 50 mM NaCl verwendet, Spur 10: wie Spur 6, statt 50 mM KCl wurde 100 mM KCl verwendet. Es wurden je 50 pmol DA1:S3 und 100 µg Zellextrakt verwendet, es wurde für 30 min auf Eis belichtet, das Gesamtassayvolumen betrug je 100 µl. Zusammensetzung der Puffer siehe Anhang B.

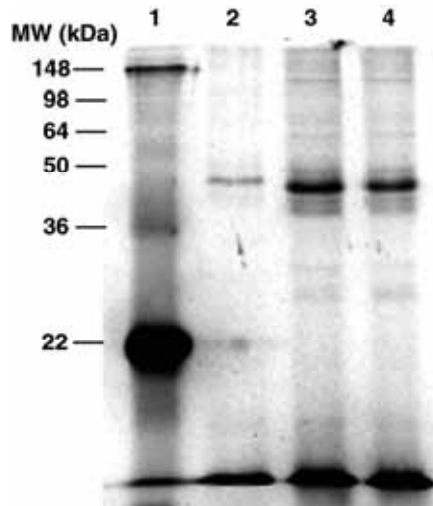
Wie erwartet lieferte die Verwendung verschiedener Puffersysteme auch sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich Effizienz und Selektivität der Belichtungsreaktion. Die Belichtung im Fpg-Assaypuffer (10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 100 mM KCl, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA) lieferte aufgrund des hier nicht enthaltenen Glycerins einen geringeren Hintergrund als im Falle des Fpg-Lagerpuffers (10 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 50 mM NaCl, 10 % Glycerin), wie



die Spuren 3 und 4 zeigen. Allerdings traten die prominentesten fluoreszenten Banden nicht dort auf, wo ausgehend von den Versuchen mit dem reinen Protein der DNA-*LI*Fpg-*Crosslink* zu erwarten wäre; erstaunlicherweise ist die Affinität des *LI*Fpg zu oxidativ geschädigter DNA wie **DA1:S3** im Fpg-Assaypuffer wohl geringer als angenommen.

Der Übergang zu einem Tris-HCl-basierten Puffer wie dem CPD-Photolyase-Assaypuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaCl) brachte keine Vorteile, wie Spur 5 zeigt. Erst die Verwendung des von *Lippard*<sup>[405]</sup> entwickelten Puffersystems (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Nonidet P-40, 0.2 µg/mL BSA), welches sich durch den Gehalt an NP-40 (einem nichtionischen Detergens) von den vorher genannten Puffern unterschied, lieferte eine Bande auf der Höhe des erwarteten DNA-*LI*Fpg-*Crosslinks* (ca. 43 kDa) (Spur 6). Zur Erhöhung der Selektivität wurden ausgehend von diesem Puffer weitere Optimierungen versucht. Allerdings führten weder der Ersatz von KCl gegen NaCl (Spur 9) noch die Erhöhung der KCl-Konzentration auf 100 mM zu einem positiven Effekt. Im Gegenteil, hier ging die spezifische Bindung an Fpg wieder zurück, und der Hintergrund verstärkte sich. Das mit Abstand beste Ergebnis ist in Spur 8 sichtbar. Hier wurde dem *Lippard*-Puffersystem noch zusätzlich eine Kompetitor-DNA (50 ng/µL *cal*f *thymus* DNA) zugesetzt, wie z. B. auch in EMSA-Assays üblich. Dies führte zu einer enormen Verstärkung der dem DNA-*LI*Fpg-*Crosslink* zugeschriebenen Bande bei gleichzeitiger Verringerung des unspezifischen Hintergrunds. Da dieser Puffer auch für andere Proteine in allen Systemen immer die besten Ergebnisse lieferte, wurde er fortan standardmäßig verwendet und ist in Anhang B als *photoaffinity labeling*-Belichtungspuffer aufgeführt.

Zur besseren Veranschaulichung, dass die hier auftretende fluoreszente Bande tatsächlich das exakt gleiche Laufverhalten zeigte, wie das mit dem gereinigten Protein erzeugte *LI*Fpg-DNA-Addukt, wurden noch einmal Belichtungen des Reinproteins und des überexprimierenden Zellextrakts im *photoaffinity labeling*-Belichtungspuffer durchgeführt, auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 69).

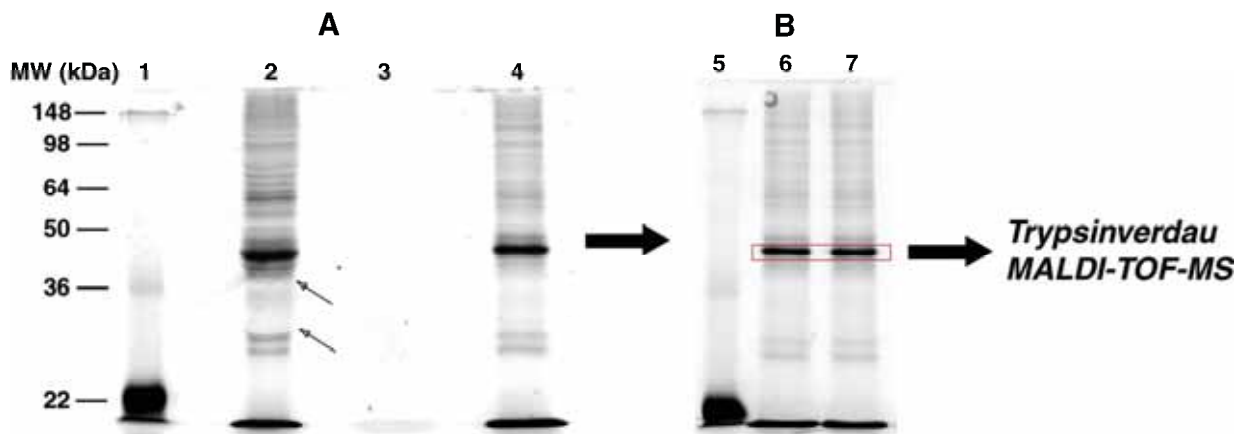


**Abb. 69.** Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 12.5 % SDS-Polyacrylamidgels nach Belichtung des Duplex **DA1:S3** mit *E. coli*-Zellextrakt (*LlFpg* überexprimiert) bzw. gereinigtem *LlFpg*-Protein. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: Belichtung von 2  $\mu\text{g}$  gereinigtem *LlFpg*-Protein, Spur 3: Belichtung von 2  $\mu\text{g}$  gereinigtem *LlFpg*-Protein + 100  $\mu\text{g}$  Zellextrakt, Spur 4: Belichtung von 100  $\mu\text{g}$  Zellextrakt. Es wurden je 50 pmol **DA1:S3** eingesetzt, die Belichtungszeit betrug 30 min bei 0 °C. Alle Belichtungen wurden im photoaffinity labeling-Belichtungspuffer durchgeführt.

Aus Abbildung 69 geht deutlich hervor, dass die bei der Belichtung des Reinproteins entstehende DNA-Proteinbande (Spur 2) und die im Zellextrakt vornehmlich durch die DNA markierte Bande (Spur 4) auf exakt gleicher Höhe liefen. In Spur 3 wurde der Zellextrakt durch gereinigtes *LlFpg* angereichert, ein Vorgang der als *Spiken* bezeichnet wird. Hierdurch kam es zu einer Verstärkung der Bande bei ca. 43 kDa, ein weiterer Beleg, dass es sich hier um markiertes *LlFpg*-Protein handelte.

Der Beweis konnte allerdings nur über einen Trypsinverdau der entsprechenden Proteinbande mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der Fragmente erfolgen. Um hierfür ausreichend Material zu erhalten, wurden Belichtungen im präparativen Maßstab mit je 1 nmol der DNA-Sonde **DA1:S3** und 1 mg des *E. coli*-Zellextrakts (*LlFpg* überexprimiert) in einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. Wie bei den analytischen Ansätzen war auch hier eine Belichtungszeit von 20-30 Minuten voll ausreichend, um maximale Ausbeuten an „gefischtem“ Protein zu erhalten. Im Zuge der Belichtung präzipitierte wohl aufgrund von Unverträglichkeit mit dem Puffer immer ein Teil des Proteins, der nachfolgend abzentrifugiert werden musste. Der Überstand wurde mit streptavidinbeschichteten, magnetischen Partikeln (*Dynabeads M-270, Invitrogen*) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Stunden bei Raumtemperatur hatte der weitaus größte Teil der biotinylierten DNA (mit und ohne *Cross-link* zu Proteinen) an die Magnetpartikel gebunden und konnte so einfach mit einem Magne-

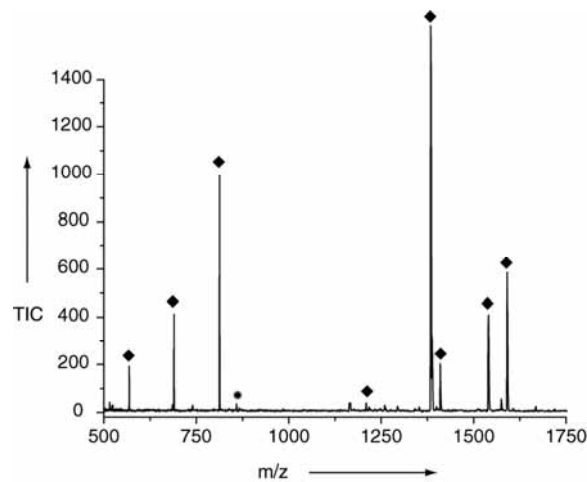
ten vom Überstand abgetrennt werden. Entscheidend war an dieser Stelle die Güte und Effizienz des Waschens der Magnetpartikel. Fünfmaliges Waschen der Magnetpartikel mit dem vom Hersteller angegebenen Waschpuffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) erwies sich als nicht ausreichend, um alle unspezifisch an den Magnetpartikeln haftenden Proteine zu entfernen. Erst die Zugabe von 5 % SDS als denaturierendes Agens und 1 % Noidet P-40 als Detergens zum genannten Waschpuffer führte zu einer effektiven Entfernung aller nicht markierten Proteine von den streptavidinbeschichteten Partikeln. Zur Elution der gebundenen DNA-Protein-Komplexe wurden die Ansätze in SDS-Auftragspuffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS), 20 % (w/v) Glycerin, 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Dadurch konnte >90 % des gebundenen Materials wieder abgespalten werden. Längeres Erhitzen führte zum „Ausbluten“ von Streptavidin-Untereinheiten in die Lösung und war daher zu vermeiden. Die Proben wurden direkt im Anschluss per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Ergebnisse dieses Gels zeigt Abb. 70.



**Abb. 70.** Fluoreszenzaufnahmen ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) zweier 10 % SDS-Polyacrylamidgels einer im präparativen Maßstab durchgeführten Belichtung des Duplex DA1:S3 mit *E. coli*-Zellextrakt (LlFpg überexprimiert). Spuren 1, 5: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: Belichtung mit 1 mg Zellextrakt, magnetic beads-Waschpuffer A, Spur 3: Negativkontrolle, 1 mg Zellextrakt unbelichtet, Spuren 4, 6, 7: Belichtung mit 1 mg Zellextrakt, magnetic beads-Waschpuffer B. Es wurde je 1 nmol der Sonde DA1:S3 eingesetzt, die Belichtungszeit betrug je 30 min bei 0 °C. Alle Versuche wurden im photoaffinity labeling-Belichtungspuffer ausgeführt. Aufarbeitung siehe Text und Experimenteller Teil.

In Spur 2 wurde eine Belichtungsprobe aufgetragen, in der die Magnetpartikel ausschließlich mit dem vom Hersteller genannten Waschpuffer behandelt wurden. Deutlich ist der sehr hohe Hintergrund unspezifisch haftender Proteine zu sehen. Zwei besonders dicke Proteinbanden wurden hier mit Pfeilen hervorgehoben. In Spur 4 wurde im Vergleich dazu eine Be-

lichtungsprobe aufgetragen, bei deren Präparation der mit SDS und NP-40 „angereicherte“ Waschpuffer verwendet wurde. Der Hintergrund ist hier wesentlich geringer, man erhielt zudem schärfere und besser definierte Banden. Diese Waschmethode wurde auch in den späteren Ansätzen angewendet. In (B) ist ein SDS-Gel dargestellt, das nach der gerade beschriebenen Methode präpariert wurde. Die Gelbanden des mutmaßlichen DNA-*LIFpg*-Addukts wurden ausgeschnitten und nach Standardmethoden einem Trypsinverdau unterzogen. Die erhaltenen Fragmente wurden mittels *ZipTip*<sup>TM</sup><sub>C<sub>18</sub></sub>-Pipettenspitzen konzentriert und anschließend mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Das erhaltene Spektrum ist in Abb. 71 dargestellt.

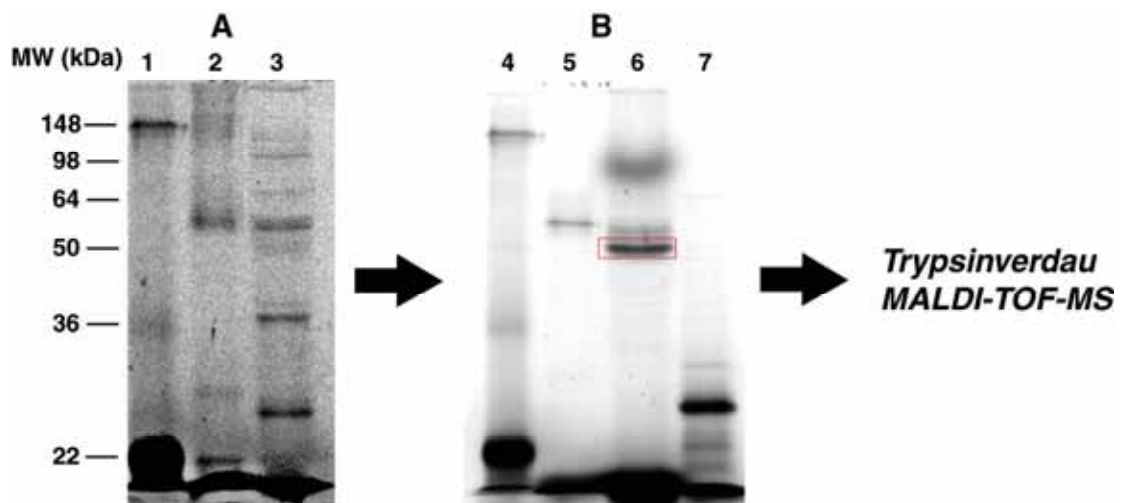


**Abb. 71.** MALDI-TOF-Massenspektrum (positiver Modus, Matrix  $\alpha$ -Cyanohydroxyzimtsäure) des tryptischen Verdau der mutmaßlich Fpg-enthaltenden Banden des Gels aus Abbildung 70 (B). Die mit einem Quadrat markierten Signale (jeweils der monoisotopische Basispeak) wurden einer Datenbanksuche mittels Mascot unterzogen, das mit einem Stern markierte Fragment ist ein Autoproteolyseprodukt des Trypsins, auf das intern kalibriert wurde ( $m/z = 842.15$ ).

Nach der Aufnahme des Massenspektrums wurden basierend auf bekannten Untersuchungen zunächst alle diejenigen Signale eliminiert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Trypsin-Autoproteolyse, Keratine (aus Hautpartikeln) oder andere häufig auftretende Kontaminationen zurückgeführt werden konnten.<sup>[441, 442]</sup> Das Trypsin-Autoproteolysefragment bei  $m/z = 842.15$  (im Spektrum mit einem Stern markiert) wurde zur internen Kalibrierung genutzt, wodurch sich die Genauigkeit des Spektrums enorm erhöhte. Die verbliebenen Signale (mit einem Quadrat gekennzeichnet) wurden einem Peptid-Massen-fingerprint-Abgleich über den Suchalgorithmus *Mascot* unterzogen (Bedingungen siehe Experimenteller Teil, Kap. 5.7.4). Als wahrscheinlichster Treffer mit einem sehr hohen *Score* von 117 (Werte größer 60 sind signifikant) wurde die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (*Lactococcus*

*lactis subsp. cremoris SK11*) erhalten, welches exakt das gesuchte Protein war. Bei allen folgenden Treffern handelte es sich um Abarten bzw. Isoformen des Fpg-Proteins, so dass diese Identifizierung als sicher angenommen werden kann. Die Gesamtsequenzabdeckung betrug 23 %, die mittlere Abweichung der Peptidmassen war kleiner 0.2 Da. Das vollständige *Mascot*-Ergebnisprotokoll ist in Anhang C beigefügt.

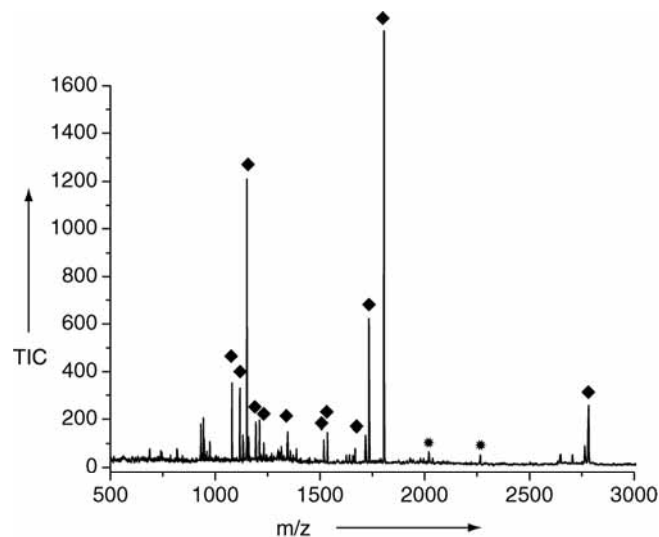
Nachdem nun anhand des Beispiels der Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase der Ablauf eines *Fishing*-Experiments bis hin zur massenspektrometrischen Untersuchung der erzeugten Protein-DNA-Crosslinks optimiert wurde, sollte versucht werden, auf analoge Art und Weise auch die *E. coli* CPD-Photolyase aus einem Gesamtzellextrakt zu fischen, in dem dieses Protein überexprimiert vorlag. Hierzu wurden zunächst Belichtungen im analytischen Maßstab (je 50 pmol der DNA-Sonde **DA2:S6**) mit gereinigter CPD-Photolyase (5 µg) bzw. dem Überexpressionszellextrakt (je 100 µg) ausgeführt. Parallel dazu wurde eine Belichtung im präparativen Maßstab (1 nmol DNA, 1 mg Zellextrakt) durchgeführt, nach der für das Fpg beschriebenen Prozedur aufgearbeitet und per SDS-PAGE getrennt. Die Resultate der Belichtungen im analytischen und präparativen Maßstab sind in nachfolgender Abb. 72 dargestellt.



**Abb. 72.** Fluoreszenzaufnahmen ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) zweier 10 % SDS-Polyacrylamidgels einer im analytischen (A) bzw. präparativen Maßstab (B) durchgeführten Belichtung des Duplex **DA2:S6** mit *E. coli*-Zellextrakt (CPD-Photolyase überexprimiert). Spuren 1, 4: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: Belichtung mit 2 µg gereinigter CPD-Photolyase, Spur 3: Belichtung mit 100 µg Zellextrakt, Spur 5: Belichtung mit 5 µg gereinigter CPD-Photolyase, Spur 6: Belichtung mit 1 mg Zellextrakt, anschließend Aufreinigung über magnetic beads, Spur 7: Vergleichsbelichtung mit 1 mg *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakt, Aufreinigung über magnetic beads. Es wurden je 50 pmol (Spuren 2, 3 und 5) bzw. 1 nmol (Spuren 6 und 7) der Sonde **DA2:S6** eingesetzt, die Belichtungszeit betrug je 30 min bei 0 °C.

Alle Versuche wurden im photoaffinity labeling-Belichtungspuffer ausgeführt. Aufarbeitung siehe Text und Experimenteller Teil.

In der Belichtung des gereinigten Proteins (Spur 2) ist der erwartete Protein-DNA-Crosslink als fluoreszente Bande bei einer Masse von ca. 60 kDa zu erkennen, in guter Übereinstimmung mit der berechneten Masse. Auch in der Belichtung des Zellextrakts (Spur 3) trat diese Bande deutlich sichtbar auf. Daneben sind auch Banden mit kleinerer Masse zu sehen, die entweder von Zersetzung der Photolyase im Verlauf der Belichtung oder von anderen Proteinen herrühren. Zur genaueren Identifikation wurden aber keine weiteren Versuche unternommen. Die Belichtung im präparativen Maßstab (B) lieferte ein überraschendes Bild. Vergleicht man die hauptsächlich auftretende Bande in der Belichtung mit 1 mg Zellextrakt (Spur 6), mit einer Belichtung des Reinproteins (Spur 5), so laufen diese deutlich verschieden. Der Grund für die augenscheinlich leichtere Masse des mutmaßlichen Photolyase-DNA-Addukts in der Belichtung des Zellextrakts ist unklar. Entweder lag hier ein Artefakt aufgrund der unterschiedlichen Puffer- und Salzkonzentrationen der beiden Proben vor, oder es kam evtl. zum teilweisen Abbau des Proteins. Die in Abbildung 72 rot umrahmte Hauptbande wurde ausgeschnitten, tryptisch verdaut und anschließend per MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Man erhielt das folgende Spektrum (Abb. 73)



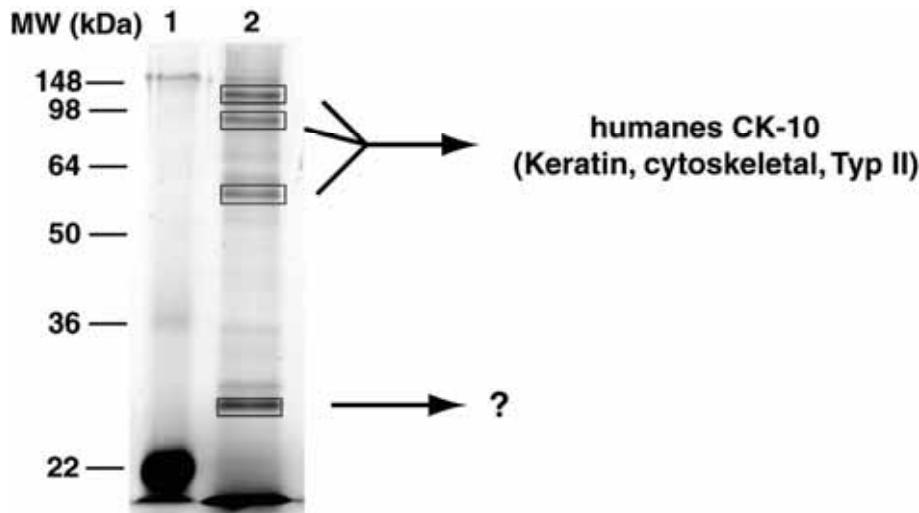
**Abb. 73.** MALDI-TOF-Massenspektrum (positiver Modus, Matrix  $\alpha$ -Cyanohydroxyzimtsäure) des tryptischen Verdaus der mutmaßlich *E. coli*-CPD-Photolyase-enthaltenden Bande des Gels aus Abbildung 72 (B). Die mit einem Quadrat markierten Signale (jeweils der monoisotopische Basispeak) wurden einer Datenbanksuche mittels Mascot unterzogen, die mit einem Stern markierten Fragmente sind Autoproteolyseprodukte des Trypsins, auf die intern kalibriert wurde ( $m/z = 2058.13$  bzw.  $2223.7$ ).

Nach Ausschluss aller auf Kontaminationen beruhenden Signale und Kalibrierung des Spektrums auf zwei Trypsin-Autoproteolysefragmente ( $m/z = 2058.13$  bzw.  $2223.7$ , mit Stern gekennzeichnet) wurden die verbliebenen Signale (mit einem Quadrat markiert) einem Peptid-Massen-*fingerprint*-Abgleich über den Suchalgorithmus *Mascot* unterzogen (Bedingungen siehe Experimenteller Teil, Kap. 5.7.4). Als sicheren Treffer mit einem *Score* von 73 wurde die Desoxyribopyrimidin-Photolyase (*E. coli*) ermittelt. Alle folgenden Treffer waren ebenfalls Isoformen oder Substrukturen dieses Enzyms. Die mittlere Massenabweichung der Peptidfragmente betrug hier  $0.48$  Da, es konnte eine Sequenzabdeckung von 19 % erreicht werden. Damit konnte auch die *E. coli* CPD-Photolyase erfolgreich aus einem *E. coli*-Zelllysate isoliert werden, in dem dieses Protein überexprimiert vorlag. Das vollständige *Mascot*-Ergebnisprotokoll ist in Anhang C beigefügt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein funktionierendes System entwickelt wurde, um Proteine in Zellextrakten selektiv kovalent zu markieren. Auf diese Weise konnten sowohl das *LlFpg*-Protein als auch die *E. coli* CPD-Photolyase in Zelllysaten markiert werden, in denen diese Proteine überexprimiert vorlagen. In präparativen Ansätzen konnte ausreichend Material erzeugt werden, um die entstandenen Protein-DNA-*Crosslinks* mit Trypsin zu verdauen und die Fragmente per Peptid-Massen-*fingerprint* (PMF) zu analysieren, wobei beide genannten Proteine eindeutig identifiziert werden konnten.

### 4.5.3 Versuche mit *E. coli* Wildtyp-Zellextrakten

Als nächster Schritt sollte versucht werden, unter Verwendung der präparierten, diazirinhalten DNA-Sonden DNA-bindende Proteine in *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakten selektiv zu fischen. In diesem Fall wurden hauptsächlich Belichtungen im präparativen Maßstab durchgeführt, da der Gehalt an DNA-bindenden Proteinen bezogen auf die Gesamtproteinmenge so gering war, dass in analytischen Ansätzen keinerlei Markierung von Proteinen beobachtet werden konnte. Abb. 74 zeigt ein SDS-Gel nach Belichtung von  $1$  nmol **DA1:S3** mit  $1$  mg *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakt (freundlicherweise von *M. Maul* zur Verfügung gestellt). Die Belichtung und Aufreinigung über streptavidinbeschichtete Magnetpartikel erfolgte analog zu der in Kap. 4.5.2 beschriebenen Vorgehensweise.



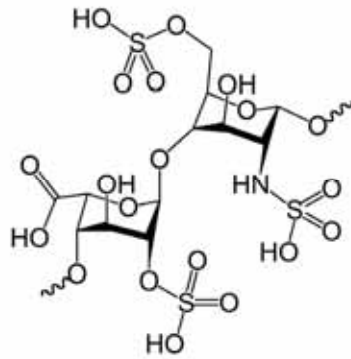
**Abb. 74.** Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 10 % SDS-Polyacrylamidgels einer Belichtung des Duplex DA1:S3 mit *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakt. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: Belichtung von 1 mg *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakt. Es wurde 1 nmol DA1:S3 eingesetzt, die Belichtungszeit betrug 30 min bei 0 °C. Die Belichtung wurde im photoaffinity labeling-Belichtungspuffer durchgeführt.

Auf dem in Abb. 74 dargestellten SDS-Gel sind nur wenige, gut definierte Banden zu erkennen, die im Verlauf der Belichtungsreaktion entstanden. Nachfärbung des Gels mit *Coomassie Brilliant Blue R-250* zeigte allerdings, dass diese Banden nur von sehr wenig Protein herrührten. Der Trypsinverdau der drei prominenten Banden zwischen 60 und 100 kDa führte darüber hinaus zu dem ernüchternden Ergebnis, dass es sich hierbei um verschiedene Formen des humanen cytoskeletalen Keratins handelte, also um eine reine Kontamination (Die *Mascot*-Ergebnisprotokolle finden sich in Anhang C). Der Verdau der fluoreszenten Bande bei ca. 28 kDa lieferte trotz mehrerer Versuche kein auswertbares Ergebnis, so dass über die Identität dieses Proteins keine Aussage gemacht werden konnte. Es darf aber angenommen werden, dass es sich auch hier um eine Kontamination, möglicherweise ein Keratinabbauprodukt handelte.

Um den offensichtlich zu einer Detektion zu geringen Gehalt DNA-bindender Proteine im Extrakt zu erhöhen, wurde eine Anreicherung über zwei chromatographische Reinigungsschritte versucht. Zu diesem Zweck wurde eine große Menge (ca. 100 mg) des *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakts mit Hilfe eines ÄKTA™ Protein Purification Systems (Amersham Biosciences) zunächst über eine Mono Q™5/50 GL-Anionenaustauschersäule gegeben, wodurch der Großteil der zellulären DNA entfernt werden konnte, die meisten Proteine aber in den Durchlauf gingen. Der Durchlauf wurde aufkonzentriert und einer zweiten Trennung über eine HiTrap™

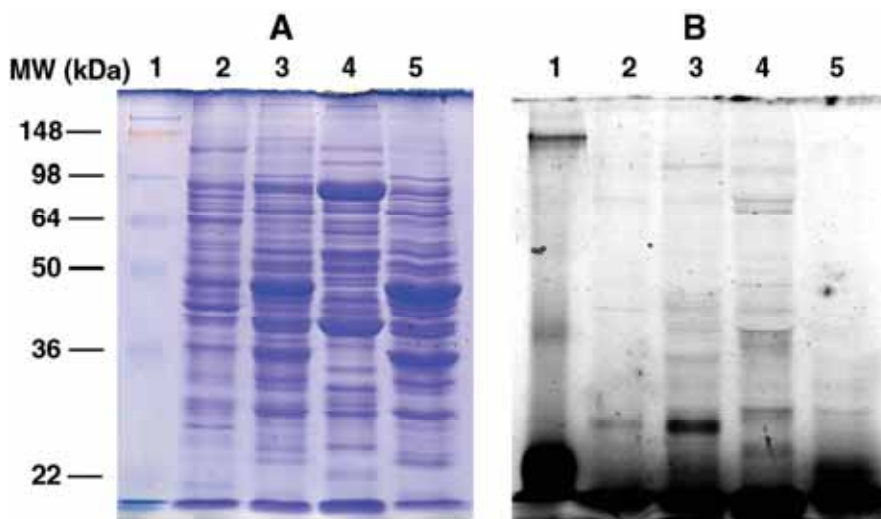


*Heparin*HP-Säule unterzogen. Heparin ist ein Polysaccharid, das aufgrund multipler Sulfatgruppen als ein DNA-Mimetikum fungiert. Viele DNA-bindende Proteine binden daher auch mit einer gewissen Affinität an Heparin und können über diese Eigenschaft von Proteinen anderer Klassen abgetrennt werden. Ein relevanter Strukturausschnitt des Heparins ist in Schema 66 abgebildet.



**Schema 66.** Wichtigstes Strukturmotiv des Heparins, bestehend aus D-Glucosamin und D-Glucuronsäure.

Neben dem Durchlauf wurde eine Fraktion erhalten, die an das Heparin gebunden hatte und mittels eines NaCl-Gradienten eluiert wurde. Nach Abschluss der Reinigung wurden alle erhaltenen Fraktionen entsalzt und aufkonzentriert. Zur Kontrolle der Zusammensetzung der Fraktionen wurde ein SDS-Polyacrylamidgel aufgenommen, im Anschluss wurden Testbeleuchtungen des  $\beta$ -cFaPydG-enthaltenden DNA-Duplexes DA1:S3 mit jeder der Fraktionen durchgeführt. Die Gele sind in folgender Abbildung 75 dargestellt.



**Abb. 75.** (A) Darstellung eines 10 % SDS-Polyacrylamidgels (Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250) zur Kontrolle der nach zweimaliger chromatographischer Trennung erhaltenen

Proteinfraktionen. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: 30  $\mu\text{g}$  *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakt, Spur 3: 30  $\mu\text{g}$  Durchlauf Anionenaustauscher, Spur 4: 30  $\mu\text{g}$  Eluat Heparinsäule, Spur 5: 30  $\mu\text{g}$  Durchlauf Heparinsäule. (B) Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 10 % SDS-Polyacrylamidgels einer Belichtung des Duplex **DA1:S3** (je 50 pmol) mit je 100  $\mu\text{g}$  der in (A) genannten Proteinfraktionen. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakt, Spur 3: Durchlauf Anionenaustauscher, Spur 4: Eluat Heparinsäule, Spur 5: Durchlauf Heparinsäule. Die Belichtungszeit betrug 30 min bei 0 °C. Die Belichtung wurde im photoaffinity labeling-Belichtungspuffer durchgeführt.

Betrachtet man zunächst Gel (A), so zeigte sich von Rohextrakt (Spur 2) zum Durchlauf des Anionenaustauschers (Spur 3) eine deutliche Anreicherung bestimmter Proteine. Das Gleiche lässt sich für die folgende Trennung per Heparin-Affinitätschromatographie (Spuren 4, 5) sagen. Interessant sollte hier besonders die Spur 4 sein, die die Fraktion zeigt, die an die Heparinsäule gebunden hatte und daher potentiell viele DNA-bindende Proteine enthalten sollte. Hier traten zwei sehr prominente Banden bei ca. 40 und 96 kDa auf. Nach Trypsinverdau, MALDI-TOF-MS und Peptid-Massen-fingerprint-Abgleich (PMF) konnten beide Proteine mit sehr hohen Score-Werten (>110) identifiziert werden. Bei der schweren Bande handelte es sich um Acetaldehyd-Dehydrogenase (*E. coli*, MW 96580 Da), bei dem leichteren Protein um die 2-Phosphoglycerat-Kinase (*E. coli*, MW 40705). Die vollständigen Mascot-Ergebnisprotokolle finden sich in Anhang C. Beide Proteine sind an der Glykolyse beteiligt und gehören nicht zu den DNA-assoziierten Proteinen.

Dies zeigte bereits ein großes Problem der versuchten Fraktionierung auf: Der relativ simple verfolgte Ansatz war nicht ausreichend, um DNA bindende Proteine, die eine sehr diverse Stoffklasse darstellen, signifikant anzukonzentrieren. Vielmehr kam es zu einer Anreicherung unerwünschter Proteine, die wohl aufgrund einer gewissen Affinität zu Phosphatgruppen an die Heparinsäule gebunden hatten. Ein Blick auf das Gel (B) bestätigte diese Befürchtung: In keiner der belichteten Fraktionen (Spuren 2-5) kam es zu einer nennenswerten Markierung von Proteinen durch die DNA-Sonde **DA1:S3**. Aufgrund dieser unbefriedigenden Ergebnisse wurden die Experimente mit *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakten zunächst zurückgestellt. Stattdessen rückten Versuche mit eukaryontischen Zellen in den Mittelpunkt des Interesses, speziell Hefeextrakte und humane Zellkernextrakte sollten als vielversprechendere Substrate zum „Fischen“ von DNA bindenden und besonders DNA reparierenden Enzymen getestet werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass in naher Zukunft mit der Verfügbarkeit genauerer und empfindlicherer Massenspektrometrie-Methoden (ESI-FTICR) auch die bakteriellen Extrakte wieder interessant werden, zumal sie aufgrund der relativ geringen

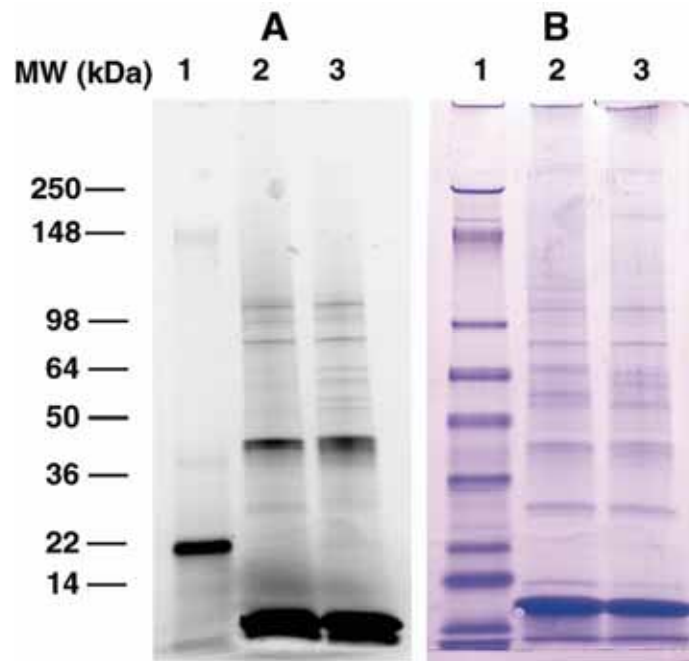
Größe ihres Proteoms prinzipiell leichter zu analysieren sein sollten als ihre eukaryotischen *Pendants*.

#### 4.5.4 Versuche mit humanen Zellkernextrakten und *S. cerevisiae*-Lysaten

Wie zum Ende des letzten Abschnitts bereits angedeutet, rückten in der neuesten Serie von *photoaffinity labeling*-Experimenten eukaryotische und hier speziell humane Zellextrakte in den Mittelpunkt des Interesses. Die Gründe hierfür waren vielfältig. Zum einen bot das Arbeiten mit humanen Kernextrakten einen praktischen Vorteil: Die DNA-assoziierten Proteine sind durch ihre Lokalisation im Zellkern bereits vorkonzentriert, so dass eine Anreicherung, wie sie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben wurde, hier nicht notwendig war. Zum anderen stellt die Untersuchung des menschlichen Proteoms immer das vordringlichste Ziel jeglicher Proteomforschung dar, das Arbeiten mit menschlichen Kernextrakten führte also wesentlich näher an den derzeitigen Stand der Wissenschaft im Bereich *Proteomics* heran. Bakterielle Extrakte hingegen können meist nur als ein vereinfachtes Modellsystem, als Ausgangspunkt für die Optimierung von Methoden und Protokollen betrachtet werden.

Zur Gewinnung der humanen Kernextrakte wurden Zellen der Linie *HCT-116* (Darmkrebs epithelzellen) im gruppeneigenen Zellkulturlabor gezüchtet. War eine ausreichende Zelldichte erreicht, wurden die Zellen nach dem Protokoll von *Dignam* aufgeschlossen und in einer Folge verschiedener Inkubations- und Zentrifugationsschritte die reine Kernproteinfraktion präpariert (Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von *S. Manetto*, *C. Gräf* und *M. Maul* ausgeführt).<sup>[443]</sup> Auf diese Weise konnten aus  $1 \times 10^8$  Zellen ca. 6-8 mg Nuklearextrakt gewonnen werden. Aufgrund der Instabilität der Proteine wurden die Extrakte sofort auf Eis aliquotiert und in 50 % Glycerin bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Nur das jeweils benötigte Aliquot wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut und vollständig aufgebraucht.

In ersten präparativen Ansätzen wurden je 1 nmol der DNA-Sonden **DA2:S6** (T=T-Dimer) und **DA1:S3** ( $\beta$ -cFaPydG) mit 1 mg des Kernextrakts belichtet (Gesamtassayvolumen 1 mL). Die Aufarbeitung und Aufreinigung der Ansätze über magnetic beads erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt und im Experimentellen Teil beschrieben. Für die Auftrennung der Proteine per SDS-PAGE wurden hier der überlegenen Trennleistung wegen 4-15 %-Gradientengele (*Biorad*) verwendet, anstelle von *Coomassie Brilliant Blue R-250* wurde zum Anfärben der Proteine im Gel *SimplyBlue™ Safe Stain* (*Invitrogen*), eine sensitivere, kolloidale *Coomassie*-Färbung eingesetzt. Abbildung 76 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.



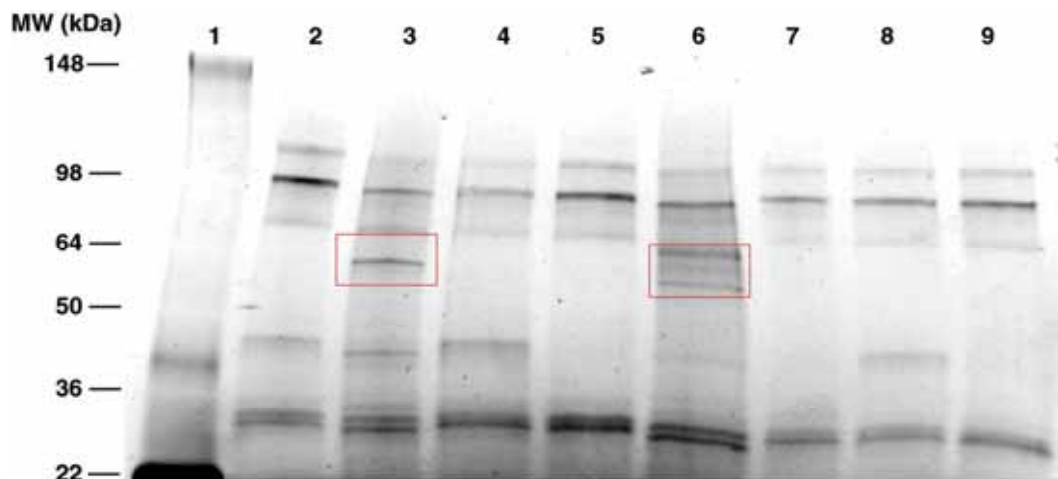
**Abb. 76.** (A) Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 4-15 % SDS-Polyacrylamidgels einer präparativen Belichtung des Duplex **DA1:S3** bzw. **DA2:S6** mit humanem Nuklearextrakt (Stamm HCT-116). (B) Aufnahme des gleichen Gels nach Anfärbung mit SimplyBlue™ Safe Stain. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: Belichtung von **DA1:S3** (1 nmol) mit 1 mg HCT-Nuklearextrakt, Spur 3: Belichtung von **DA2:S6** (1 nmol) mit 1 mg HCT-Nuklearextrakt. Es wurde im photoaffinity labeling-Puffer gearbeitet, die Belichtung erfolgte für 30 min bei 0 °C. Aufarbeitung siehe Text und Experimenteller Teil.

Wie Abbildung 76 (A) zeigt, entstanden sowohl im Falle der Verwendung von **DA1:S3** als Sonde (Spur 2) als auch im Falle von **DA2:S6** (Spur 3) eine definierte Anzahl an Protein-DNA-Crosslinks in solcher Stärke, dass eine Anfärbung mittels kolloidaler *CoomassieBlue*-Färbung möglich war (Nachweisgrenze ca. 100 ng Protein). Unterschiede zwischen den Spuren 2 und 3 zeigten sich besonders anhand einiger Banden im mittleren Massenbereich zwischen 40-100 kDa. Daher sollte dieser Massenbereich einer eingehenden massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen werden. Hierzu wurde der Bereich des Gels von *F. Butter* (Arbeitsgruppe M. Mann, MPI für Biochemie und Neurobiologie, Martinsried) mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Peptidfragmente wurden dann per nano-HPLC getrennt und über ein *on line*-gekoppeltes Nanospray-ESI-Massenspektrometer (*Orbitrap™*) analysiert. Hierzu wurden zu jedem gegebenen Zeitpunkt die zehn intensivitätsstärksten Ionen in einer *Orbitrap™* sequenziert. Hierdurch konnte sowohl eine extreme Empfindlichkeit als auch eine Massengenauigkeit der Peptidfragmente unter 5 ppm Abweichung erreicht werden. Die rund 20.000 auf diese Weise detektierten Peptide wurden in *Mascot* einer Sequenzsuche unterzogen. Dabei konnten

anhand der Peptide rund 200 Proteine sicher identifiziert werden, die sich im untersuchten Bereich des Gels befanden.

Die Auswertung der Proteintreffer ergab ein sehr unbefriedigendes Bild: Die 20-30 Proteine mit der höchsten Trefferwahrscheinlichkeit (*Score* >5000), auf die auch der größte Teil der detektierten Peptide entfiel, waren allesamt Keratine. Ein Gutteil dieser Keratine stammte auch nicht aus der Probe selbst, sondern musste durch Kontamination hineingelangt sein. Die Schlußfolgerung hieraus konnte nur lauten, dass vermutlich alle auf dem oben gezeigten SDS-Gel sichtbaren Banden Keratine sein mussten. Durch das hohe Aufkommen dieser Skleroproteine sank die Empfindlichkeit, so dass seltene Proteine nicht mehr detektiert wurden. Infolgedessen konnten die tatsächlichen Unterschiede in den von **DA1:S3** bzw. **DA2:S6** markierten Proteinen nicht mehr detektiert werden. Dennoch wurde in beiden Fällen auch eine gewisse Zahl an DNA-Reparaturproteinen gefunden. Darunter waren z. B. die *Flap*-Endonuklease 1 (FEN-1), die AP-Endonuklease 1 (APE-1), das XPA-Protein und andere. Ein Auszug aus dem extrem umfangreichen *Mascot*-Ergebnisprotokoll für diesen Versuch befindet sich in Anhang C.

In neuesten Ansätzen sollte versucht werden, die bei Belichtungen unter Verwendung humanen Kernextrakts erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Belichtung von Hefelysaten, jeweils unter Einsatz der Sonden **DA2:S7** (ungeschädigt), **DA2:S6** (T=T-Dimer) und **DA1:S3** ( $\beta$ -cFaPyG), zu vergleichen. Für diese semipräparativen Ansätze wurden je 500 pmol DNA und 500  $\mu$ g des jeweiligen Extrakts eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden auch Belichtungen des ungeschädigten DNA-Duplexes **DA2:S7** mit Hefelysaten und humanen Kernextrakten durchgeführt, die zuvor durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert wurden. Da in diesem Schritt die Aktivität der Proteine vollständig zerstört wurde, sollte hier keinerlei kovalente Markierung erfolgen. Die Ergebnisse des Versuchs sind im folgenden Gel in der Abbildung 77 dargestellt.



**Abb. 77 (umseitig).** Fluoreszenzaufnahme ( $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) eines 4-15 % SDS-Polyacrylamidgels einer semipräparativen Belichtung der Duplexe **DA2:S7**, **DA2:S6** bzw. **DA1:S3** mit humanem Nuklearextrakt (Zelllinie HCT-116) bzw. *S. cerevisiae*-Ganzzelllysat. Spur 1: Molekulargewichts-Marker, Spur 2: **DA2:S7** + HCT-Kernextrakt, Spur 3: **DA1:S3** + HCT-Kernextrakt, Spur 4: **DA2:S6** + HCT-Kernextrakt, Spur 5: **DA2:S7** + *S. cerevisiae*-Lysat, Spur 6: **DA1:S3** + *S. cerevisiae*-Lysat, Spur 7: **DA2:S6** + *S. cerevisiae*-Lysat, Spur 8: **DA2:S7** + HCT-Kernextrakt (hitzenedenaturiert), Spur 9: **DA2:S7** + *S. cerevisiae*-Lysat (hitzenedenaturiert). Es wurde im photoaffinity labeling-Puffer gearbeitet, die Belichtung erfolgte für 30 min bei 0 °C. Aufarbeitung siehe Text und Experimenteller Teil.

Besonders interessant ist hier der Blick auf die Spuren 8 und 9, welche die Belichtungen mit den hitzenedenaturierten Extrakten zeigen. Hier sind 5 gut definierte Banden zu sehen, obwohl die Proteine bereits vor der Belichtung inaktiviert wurden. Da diese Banden sowohl im menschlichen (Spur 8) als auch im Hefeextrakt (Spur 9) zu sehen sind, kann es sich hier nur um eine von außen stammende Kontamination handeln – auch hier erscheinen Keratine als die wahrscheinlichste Möglichkeit. Diese von Kontaminationen herrührenden Proteinbanden sind auch in allen anderen belichteten Proben (Spuren 2-7) deutlich zu erkennen und verzerren das Gesamtbild. Subtrahiert man aber diese Banden, so folgt, dass sowohl im Falle der ungeschädigten als auch der T=T-Dimer-enthaltenden Sonden **DA2:S7** bzw. **DA2:S6** quasi keine Proteine in sowohl menschlichem Kernextrakt als auch in Hefezelllysat detektierbar markiert wurden (Spuren 2, 4, 5, 7). Im Falle des  $\beta$ -cFaPydG enthaltenden DNA-Duplexes **DA1:S3** kam es allerdings sowohl im menschlichen als auch im Hefezelllysat zur selektiven, kovalenten Markierung einiger weniger Proteine (zur besseren Sichtbarkeit durch einen roten Kasten hervorgehoben). Die massenspektrometrische Untersuchung dieser Proteinbanden ist für die nahe Zukunft geplant und wird wieder von *F. Butter* (Arbeitsgruppe M. Mann, MPI für Biochemie und Neurobiologie, Martinsried) per Nanospray-ESI-MS/MS durchgeführt werden. Damit sollte es möglich sein, diese Proteine, die mutmaßlich aufgrund des Schadens an die DNA gebunden haben, einwandfrei zu identifizieren.

Aus den Ergebnissen des letzten Versuchs erwächst eine weitere Perspektive. Es hat den Anschein, dass ungeschädigte DNA, bzw. das nicht sehr stark helixverzerrende T=T-Dimer enthaltende DNA nur schwach in Wechselwirkung mit den zellulären Proteinen treten, wohingegen das  $\beta$ -cFaPydG, das einen stärker störenden Einfluss auf die Integrität der DNA ausübt, auch in höherem Maße von zellulären Proteinen adressiert wird. Um diese These zu überprüfen, sollen in naher Zukunft Belichtungsexperimente unter Verwendung eines DNA-Strangs ausgeführt werden, der das (6-4)-Photoprodukt enthält. Auch Stränge mit einem G<sup>+</sup>G bzw. GTG-Cisplatinaddukt sind in Vorbereitung. Aufgrund der stark helixverzerrenden und

das Wasserstoffbrückenmuster störenden Natur dieser Schäden ist hier eine deutliche Markierung von Proteinen sowohl in menschlichen Kernextrakten als auch in Hefezelllysaten zu erwarten.

Ein wichtiger Punkt, der sich gerade bei den letzten Versuchen gezeigt hat, war die Empfindlichkeit der Probe gegenüber Kontaminationen, besonders durch Keratin. Solche Kontaminationen haben störenden Einfluss auf die Belichtung und Separation auf dem Gel und senken sowohl die Empfindlichkeit als auch die Genauigkeit der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse der trypsinverdauten Proteinbanden. Für erfolgreiche Experimente muss der Ausschluss von Keratin aus allen verwendeten Puffern und Gefäßen, sowie die maximale Sauberkeit und Staubfreiheit aller verwendeten Materialien vordringlichstes Ziel sein.

## 4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des hier vorgestellten Projekts konnten die Aryltrifluormethyldiazirin-enthaltenden DNA- bzw. RNA-Bausteine **99** und **100** in guten Gesamtausbeuten synthetisiert werden. **99** konnte per Festphasen-DNA-Synthese unter leicht modifizierten Kupplungs- und Abspaltungsbedingungen in Oligonukleotide eingebaut werden, welche zusätzlich über eine Biotin- bzw. Desthiobiotinfunktion (zur späteren Affinitätsreinigung) und ein Fluorescein zur Fluoreszenzdetektion verfügten. Die Kupplungsausbeuten für **99** betragen dabei routinemäßig > 90 %. Nach HPLC-Aufreinigung konnten die Stränge **DA1-9** in guter Reinheit in 5-10 %iger Ausbeute isoliert werden. Als Alternative zur Erzeugung diazirinhaltiger DNA-Stränge konnte ferner gezeigt werden, dass sich die alkinmodifizierten Oligonukleotide **DA8-9** in einer kupferkatalysierten [3+2]-Cycloaddition (*Click-Chemie*) in sehr guter Ausbeute mit dem Diazirinazid **127** umsetzen ließen. Der Einbau eines 2-Iminobiotinbausteins in die DNA-Stränge **DA6-7** über postsynthetische Modifikation (Aktivesterkupplung) gelang zwar, eine Aufreinigung der Produkte war allerdings nicht möglich. Zudem war keine Bindung der modifizierten Stränge an Streptavidin zu beobachten, weshalb dieser Weg nicht weiterverfolgt wurde. Auch die desthiobiotinenthaltenden Oligonukleotide **DA3-4** zeigten suboptimale Bindungseigenschaften gegenüber Streptavidin. Zum Erreichen gleicher Effizienz mussten wesentlich höhere Mengen an streptavidinbeschichteten Partikeln verwendet werden, zugleich erhöhte sich auch die Inkubationszeit um ein Vielfaches. In Anwesenheit von Proteingemischen war eine Bindung der desthiobiotinenthaltenden Oligonukleotide an Streptavidin schließlich kaum noch zu beobachten, weshalb auch diese Methode letztlich eine Sackgasse

darstellte. Zu den DNA-Strängen **DA1-2** wurden passende Gegenstränge **S1-8** per Festphasensynthese hergestellt, in die je ein oxidativer bzw. UV-induzierter DNA-Schaden in definierter Position eingebaut wurde. Nach HPLC-Reinigung konnten diese Stränge in bis zu 30 %iger Ausbeute erhalten werden.

Nach Hybridisierung von **S1-8** diazirinhaltigen Strängen **DA1-2** und Charakterisierung der Duplexe wurden erste *photoaffinity labeling*-Experimente mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Dabei gelang es unter Verwendung des Duplexes **DA1:S3**, das *LI*Fpg-Protein selektiv kovalent zu markieren. Das Gleiche gelang auch mit der *E. coli* CPD-Photolyase unter Einsatz des T=T-Dimer enthaltenden Duplexes **DA2:S6**. Belichtung der Duplexe **DA1:S3**, **DA2:S6** bzw. **DA2:S7** mit Rad 14 und Rad 23 zeigten keinerlei Markierung von Rad 23. Rad 14 komplexierte sowohl den ungeschädigten als auch den T=T-Dimer enthaltenden Strang, der  $\beta$ -cFaPydG enthaltende Duplex wurde nicht markiert. Der Nachweis der Protein-DNA-Crosslinks erfolgte über das Auftreten der entsprechenden fluoreszenten Gelbanden, bzw. *Western Blot*.

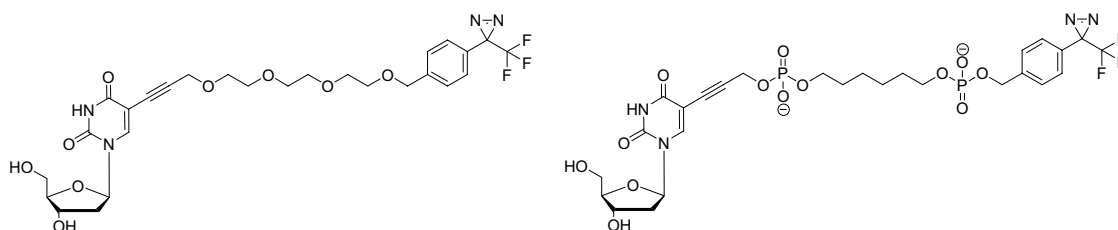
Nach Optimierung des Versuchs konnten das *LI*Fpg-Protein bzw. die *E. coli* CPD-Photolyase auch selektiv aus *E. coli*-Zellysaten der entsprechenden Überexpressionsstämme „gefischt“ werden. Aus präparativen Belichtungsansätzen konnten die Protein-DNA-Crosslinks über die Bindung der biotinmodifizierte DNA an streptavidinbeschichtete Magnetpartikel gereinigt werden, wofür effiziente Bindungs- und Waschprotokolle entwickelt wurden. Die auf diese Weise erhaltenen Proteingelbanden waren stark genug, um sie einem Trypsinverdau zu unterziehen. MALDI-TOF-MS-Messungen und anschließender Peptid-Massen-fingerprint-Abgleich (PMF) mittels *Mascot* bestätigten einwandfrei die Identität der markierten Proteine. Das „Fischen“ DNA-bindender Proteine aus *E. coli*-Wildtyp-Zellextrakten gelang nicht, vermutlich, weil die Konzentration der betreffenden Proteine im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge zu gering war, um detektierbare Ergebnisse zu liefern. Auch eine chromatographische Vorfractionierung des Rohextrakts ergab hier keine Verbesserung, es kam im Gegenteil sogar zur Anreicherung unerwünschter Proteine. Daraufhin wurden die Experimente an *E. coli*-Extrakten zunächst eingestellt, um Hefelysate und menschliche Kernextrakte (Linie *HCT-116*) zu untersuchen. Die Vorkonzentration DNA-bindender Proteine im Zellkern sollte hier eine höhere und besser detektierbare Markierung bestimmter Proteine liefern.

Erste Belichtungen der Duplexe **DA1:S3** und **DA2:S6** mit humanen Kernextrakten wurden von Kontaminationen durch Keratine stark beeinträchtigt. Die Belichtungsansätze wurden tryptisch verdaut und in Kooperation mit *F. Butter* (Arbeitsgruppe M. Mann, MPI für Biochemie und Neurobiologie, Martinsried) per Nanospray-ESI-MS/MS untersucht. Hierbei konnten zwar im Falle beider Duplexe eine gewisse Zahl an DNA-Reparaturproteinen detektiert und identifiziert werden, aufgrund des hohen Aufkommens an Keratin (und der daraus re-



sultierenden Peptide) waren allerdings keine Unterschiede in der Markierung gewisser Proteine fassbar. Auch vergleichende Belichtungen von Hefe- und menschlichen Extrakten wurden durch Kontamination mit (vermutlich) Keratin erschwert. Es zeigte sich allerdings, dass in beiden Organismen eine deutliche Markierung bestimmter Proteine nur im Falle des  $\beta$ -cFaPydG enthaltenden DNA-Duplexes **DA1:S3** erfolgte, wohingegen quasi keine Wechselwirkung mit **DA2:S6** oder **DA2:S7** zu beobachten war. Dies führte zu der Hypothese, dass stark helixverzerrende, störende DNA-Schäden offenbar in wesentlich stärkerem Maße mit zellulären Proteinen interagieren, als dies mit den ungeschädigten bzw. nur leicht geschädigten Duplexen zu beobachten ist.

Für die Zukunft bleibt noch eine Vielzahl an Optimierungs- und Variationsmöglichkeiten. Beginnen kann man hier mit dem Diazirinbaustein selber. Es konnte bisher nicht ermittelt werden, ob die gewählte Länge des Alkin-Linkers optimal für den Versuch war, von daher wäre eine Untersuchung der Eigenschaften von Bausteinen mit längeren oder kürzeren Linkern interessant. Um zu verhindern, dass das Diazirin sich in die DNA zurückfaltet und bei der Belichtung in hohem Maße mit dieser reagiert, sollte außerdem die Entwicklung eines Bausteins mit Polyethylenglykol-Linker bzw. Phosphatgruppen forciert werden. Verschiedene denkbare Strukturen sind in Schema 67 dargestellt.



**Schema 67.** Mögliche Diazirinbausteine mit alternativen Linker-Strukturen.

Die dargestellten Strukturen könnten günstigere Eigenschaften zum „Fischen“ aufweisen als die jetzt verwendeten. Bausteine mit dem Polyethylenglykol-Linker bzw. einem  $C_{10}$ -Alkin-Linker werden zur Zeit bereits durch M. Winnacker in der Arbeitsgruppe Carell hergestellt.

In Zukunft sollen mit diesen Bausteinen neue Oligonukleotide synthetisiert und auf ihre Eignung in den Belichtungsexperimenten überprüft werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Synthese weiterer geschädigter Oligonukleotide nötig. Besonders die bereits erwähnten Cisplatinaddukte und *bulky adducts* sind hier von großem Interesse, da in menschlichem Kernextrakt und auch in Hefe eine bevorzugte Interaktion mit diesen helixverzerrenden Schäden postuliert wurde. Zudem sind diese Schäden von enormer medizinischer Relevanz;

eine genauere Untersuchung der Reparaturnetzwerke bezüglich dieser Modifikationen ist daher von größter Bedeutung.

Im Text wurde schon angedeutet, dass gerade die Messungen mit eukaryotischen Zellextrakten sehr unter Verunreinigung durch Keratine litten. Für die Zukunft muss daher sauberes Arbeiten gewährleistet sein, alle verwendeten Puffer und Materialien müssen höchsten Reinheitsansprüchen genügen. Eine Durchführung der Belichtung bzw. vor allem des Trypsinverdau und der Probenvorbereitung für das MS unter einer *Cleanbench* könnte hier eine Option sein. Zudem kann überlegt werden, ob die prinzipiell sehr kontaminationsträchtige Trennung der Protein-DNA-Crosslinks nicht vermieden werden kann, wenn das entsprechende Proteingemisch nicht zu komplex ist. In diesem Fall ist ein direkter Verdau der Proteine in Lösung eine wertvolle Alternative.

Bezüglich der *photoaffinity labeling*-Experimente ist festzuhalten, dass die massenspektrometrische Untersuchung von Protein-DNA-Crosslinks per MALDI-TOF-MS zwar möglich war, allerdings große Reinheit der Banden und eine Proteinmenge von mindestens 1 µg und mehr erforderte. Mit der in Kooperation mit F. Butter (Arbeitsgruppe M. Mann, MPI für Biochemie und Neurobiologie, Martinsried) durchgeführten Methode, die auf nano-HPLC mit *on line*-gekoppelter Nanospray-ESI-MS/MS beruhte, konnte auch ein komplexes Peptidgemisch mit höchster Empfindlichkeit und Genauigkeit analysiert werden. Diese Methode, die auch dem aktuellen Stand der Technik entspricht, sollte daher für alle zukünftigen Experimente angewendet werden. Hierzu wird zur Zeit ein entsprechendes nano-LC-MS/MS-System auf der Basis des fakultätseigenen Finnigan LTQ-FTICR-Massenspektrometers aufgebaut, das demnächst einsatzbereit sein sollte. Damit sollte auch der Nachweis von nur in wenigen Kopien auftretenden DNA-Reparaturproteinen in den Experimenten durchführbar sein. Mit dieser gesteigerten Empfindlichkeit könnten auch bakterielle Extrakte wieder untersuchbar werden, die mit den momentanen Methoden nicht experimentell erfasst werden konnten. Für die nähere Zukunft stellt auch eine Kopplung der Kapillarelektrophorese (CE) an ein ESI-Massenspektrometer eine Option dar. Damit könnte eine unübertroffene Trennleistung der tryptischen Peptide im Vorfeld der massenspektrometrischen Untersuchung bei gleichzeitiger hoher Empfindlichkeit erreicht werden.

Berücksichtigt man alle diese methodischen und apparativen Verbesserungen, so kann man daher optimistisch sein, dass mit der hier entwickelten Technik mittelfristig die angestrebte, systematische Untersuchung der Interaktion DNA-bindender Proteine mit schädenenthaltender DNA per *photoaffinity labeling* in greifbare Nähe rückt, wodurch der spannenden Disziplin der *Proteomics* ein weiteres, erfolgreiches Kapitel hinzugefügt wird.

## 5 Experimenteller Teil

### Material und Methoden

Alle Reaktionen mit luft- bzw. wasserempfindlichen Substanzen wurden unter Stickstoffatmosphäre in mehrfach ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt.

**CD-Spektroskopie** (Zirkulardichroismus-Spektroskopie) an DNA-Duplexen wurde mit einem *J 810* Spektropolarimeter der Firma *Jasco* durchgeführt, welches mit einem *CDF 426 S Temperature Controller* ausgestattet war. Es wurden spannungsfreie Küvetten der Fa. *Hellma* mit einem Innendurchmesser von 1 cm und einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die gemessenen Oligonukleotidlösungen besaßen eine Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  (Gesamtvolumen 2 mL) in einer wässrigen Pufferlösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4).

**Dünnschichtchromatographie** (DC) wurde auf Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck* (Kieselgel-60,  $F_{254}$ -Dünnschicht, 5 cm  $\times$  10 cm) bzw. Polyesterfertigplatten (*Polygram*<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub>, 4 cm  $\times$  8 cm) der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurden die Platten unter UV-Licht betrachtet ( $\lambda = 254$  nm bzw. 366 nm) bzw. mit Anisaldehyd-Tauchreagenz (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL konz. Schwefelsäure, Platte auf 100 °C erwärmen) angefärbt.

**Enzymatischer Totalverdau** von Oligonukleotiden zur Bestimmung ihrer Zusammensetzung per HPLC-MS/MS wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Der zu verdauenden Oligonukleotidlösung (100  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) wurden 10  $\mu\text{L}$  eines Puffers (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, pH 5.7) zugesetzt. Die Lösung wurde mit 22 *units* Nuklease P<sub>1</sub> (*Penicillium citrum*) sowie 0.05 *units* *calf spleen*-Phosphodiesterase versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Es wurden 12  $\mu\text{L}$  eines zweiten Puffers (0.5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) zugesetzt, anschließend wurden 10 *units* *alkaline calf intestinal*-Phosphatase sowie 9 *units* *snake venom*-Phosphodiesterase hinzugegeben und die Lösung weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde zur Denaturierung der Proteine HCl (6  $\mu\text{L}$ , 0.1 M) zugegeben. Die Lösung wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt und für HPLC-MS/MS-Messungen verwendet.

**Säulenchromatographie** wurde nach der *Flash*-Methode durchgeführt. Hierzu wurde Kieselgel-60 (Korngröße 0.04-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Elution erfolgte bei

Raumtemperatur unter Anlegen eines  $N_2$ -Überdrucks. Das Lösungsmittelgemisch ist jeweils in Volumenanteilen angegeben.

**Kapillargelelektrophorese (CE)** wurde mit einem *P/ACE MDQ DNA System* der Firma *Beckman-Coulter* durchgeführt. Es wurden polyimidbeschichtete *fused silica*-Kapillaren (Gesamtlänge 30 cm, Länge zum Detektorfenster 20 cm, Innendurchmesser 100  $\mu$ m) verwendet. Als Trennmatrix diente ein 6 % iges, unvernetztes Polyacrylamidgel, als Laufpuffer wurde 0.1 M Tris Borat-EDTA/7 M Harnstoff (pH 8.3) verwendet. Die Proben wurden vor der Injektion mit *ZipTip<sup>®</sup>-C<sub>18</sub>*-Pipettenspitzen der Firma *Millipore* gemäß dem Herstellerprotokoll entsalzt. Die Injektion erfolgte elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von 10 kV für 1-8 s. Für die folgende Trennung wurde eine Spannung von 9-12 kV über 45 min angelegt, die Temperatur betrug je nach Messung zwischen 25 und 50 °C. Die Proben wurden per UV-Detektion ( $\lambda = 254$  nm), fluoresceingelabelte Proben per LIF-Detektion (*laser induced fluorescence*,  $\lambda_{\text{Anregung}} = 496$  nm,  $\lambda_{\text{Emission}} = 520$  nm) sichtbar gemacht.

**SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)** wurde auf Apparaturen der Firma *Bio-Rad* durchgeführt. Es wurde entweder eine *Mini Protean 3 cell* (Größe des Gels 8.0  $\times$  7.3  $\times$  0.075 cm) oder eine *PROTEAN II xi cell* (Größe des Gels 16  $\times$  20  $\times$  0.1 cm) verwendet. Als Spannungsquelle diente ein *E-815* der Firma *Consort* (max. 1200 V, 500 mA). Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach *Laemmli* wurde ein 3.75 % iges Sammelgel (pH 6.8) und ein 10 % bzw. 12.5 % iges Trenngel (pH 8.8) eingesetzt. Alternativ wurden Gradientengele verwendet (linearer Gradient 4 $\rightarrow$ 15 %, erzeugt mit dem Gradientenformer *Model 495*, Fa. *Bio-Rad*). Es wurde ein klassisches SDS-Tris-Glycin-Laufpuffersystem verwendet. Die zu trennenden Proben wurden jeweils mit einem Volumen 6x-SDS-Auftragspuffer versetzt, 5 min aufgeköcht, auf Eis gesetzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Als Proteingrößenstandard wurde jeweils in einer Spur ein *SeeBlue<sup>™</sup> Plus2 pre-stained Protein Standard* der Fa. *Invitrogen* aufgetragen. Die Zusammensetzung des *Markers* ist in untenstehender Abbildung 78 dargestellt.

Protein	Approx. Molecular Weights (kDa)				
	SDS-PAGE System:				
	Tris-Glycine	Tricine	NUPAGE <sup>®</sup> MES	NUPAGE <sup>®</sup> MCPG	NUPAGE <sup>®</sup> Tris-Acetate
	250 kDa	210 kDa	185 kDa	191 kDa	210 kDa
Myosin					
Phosphorylase B	148	105	98	97	111
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

NUPAGE<sup>®</sup> Novex  
Bis-Bits 4-12% Gel

**Abb. 78.** Zusammensetzung des *SeeBlue<sup>™</sup> Plus2 pre-stained Protein Standard* der Fa. *Invitrogen*. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das *Tris-Glycin SDS-PAGE-System* verwendet.

*Mini Protean 3*-Gele wurden bei konstanter Spannung von 120 V für ca. 75 min getrennt, *PROTEAN II xi*-Gele wurden bei 300-450 V für ca. 3 h getrennt, wobei die Apparatur mit Eiswasser gekühlt wurde. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurden die Gele anschließend nach Standardprotokoll mit *Coomassie-Blue*, *SilverXpress™ Silver Stain (Invitrogen)* oder *Sypro-Ruby™ (Invitrogen)* gefärbt. Zur Sichtbarmachung fluoresceingelabelter Banden wurden die Gele unter einem *LAS3000-Imager (Fuji)* Geldokumentationssystem ( $\lambda_{\text{Anregung}} = 460 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$ ) betrachtet und mit einer CCD-Kamera fotografiert.

**NMR-Spektren ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ )** wurden bei Raumtemperatur auf den Geräten *Varian Oxford 200*, *Bruker AMX 300*, *Varian XL 400*, *Bruker AMX 500* und *Bruker ARX 600* aufgenommen; bei den höherfrequenten Spektrometern erfolgte die Messung durch die NMR-Service Abteilung des Departments Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel sind jeweils in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in ppm relativ zu TMS (das Lösungsmittel diente als interner Standard) angegeben, die Kopplungskonstanten  $J$  in Hz. Die Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen *s* (Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplet), *q* (Quadruplett), *m* (Multipllett) bzw. deren Kombination gekennzeichnet.

**UV-Vis-Spektren** wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio* mit Temperaturcontroller, Transporteinheit und *MultiCellBlock* aufgenommen. Die Temperaturmessung erfolgte in einer Referenzküvette, der Meßraum wurde während der Messung mit Stickstoff durchspült. Es wurden Quarzküvetten der Fa. *Helma* verwendet, welche 4 mm Innendurchmesser, 10 mm Strahlengang und ein Innenvolumen von 1 mL besaßen. UV-spektroskopische Quantifizierung von DNA-Strängen wurde bei 85 °C durchgeführt, indem man über einen Zeitraum von 20 min mehrmals die Absorption bei 260 nm und 320 nm maß. Anschließend wurde der gemittelte Hintergrund bei 320 nm von der gemittelten Absorption bei 260 nm subtrahiert. Der so erhaltene OD-Wert konnte dann über den für den betreffenden Strang berechneten Extinktionskoeffizienten zur Konzentrationsbestimmung des Oligonukleotids verwendet werden.

**Fluoreszenz-Spektren** wurden mit einem *FP-750* Spektrofluorometer der Firma *Jasco* mit Peltier-Element aufgenommen. Für die Messung wurden Fluoreszenzküvetten (*Helma*) mit 2 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang (Probenvolumen bis 500  $\mu\text{L}$ ) verwendet.

**Massenspektren** wurden durch den MS-Service des Departments Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. ESI-Massenspektren (auch hochaufgelöste Massenspektren) wurden auf einem *Finnigan LTQ-FT FT-ICR*-Spektrometer mit ESI-Quelle aufgenommen. LC-MS/MS-Messungen von Nukleosidverdauen wurden ebenfalls auf diesem Gerät gemessen; MS/MS-Fragmentierung erfolgte in der eingebauten Ionenfalle

unter Verwendung einer Kollisionsspannung von 30 kV. MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem *Bruker Autoflex II* unter Verwendung einer Beschleunigungsspannung von 19 kV im Reflektormodus aufgenommen. Als Matrix wurden 6-Aza-2-thiothymine (bei Kleinmolekülen, ges. in Wasser/Acetonitril 1:1), 3-Hydroxypicolinsäure (für Oligonukleotide, 7 mg in 100  $\mu$ L Wasser/Acetonitril 1:1, Zusatz von Diammoniumhydrogencitrat und [15]-Krone-5) oder ein Gemisch aus 3,5-Dihydroxybenzoesäure und  $\alpha$ -Cyanohydroxizimtsäure (für Trypsinverdau von Proteinen, jeweils 10 mg/mL in 0.1 % Trifluoressigsäure/Acetonitril 30:70) verwendet. Die wichtigsten Signale werden in  $m/z$ -Einheiten angegeben, wobei die prozentualen Intensitäten bezüglich des Basispeaks und, wenn möglich, eine Zuordnung in Klammern angemerkt sind. Für die Auswertung der MS-Fingerprints tryptischer Peptide wurde das Programm *Bruker BioTools*, als Suchalgorithmen *Mascot* oder *MS-Fit* verwendet.

**IR-Spektren** wurden auf einem *Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100*-Spektrometer aufgenommen, welches mit einer ATR-Einheit (Totalreflexionsverfahren) ausgestattet war. Die Lage der Banden ist in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben, die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen *s* (stark), *m* (mittel), *w* (schwach) und *br* (breit) gekennzeichnet.

**Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide bei 260 nm** wurden durch Addition der Extinktionskoeffizienten der Einzelbasen berechnet. Diese betragen: dA 15.0 L/mmol·cm, dC 7.1 L/mmol·cm, dG 12.0 L/mmol·cm, dT 8.4 L/mmol·cm, Flavin **35** 27.3 L/mmol·cm, Fluorescein **121/123** 13.7 L/mmol·cm. Die Extinktionskoeffizienten von 8-Br-dG **98**, 8-Br-dA **97** und 5-Br-dU **54** entsprechen in erster Näherung denen der unhalogenierten Nukleoside. Für das Diazirin **99** wurde der Wert von dT verwendet. Für das Oxetan **77** wurde ein Wert von 6.1 L/mmol·cm bestimmt.

**Schmelzpunkte** wurden auf einer *Büchi B-540*-Schmelzpunktapparatur gemessen und sind nicht korrigiert.

**HPL-Chromatographie** wurde auf verschiedenen Anlagen von *Merck-Hitachi* bzw. *Waters* durchgeführt. Die Komponenten waren im Einzelnen: *Merck*<sub>analytisch</sub>: L-7100 Pumpe, L-7200 Autosampler, L-7400 UV-Detektor, L-7480 Fluoreszenzdetektor; *Merck*<sub>präparativ</sub>: L-7150 Pumpe, L-7200 Autosampler, *Rheodyne* P/N 77 25i Einspritzventil, L-7420 UV-Vis, L-7350 Säulenofen, ERC-3415 Lösungsmittel Entgaser; *Waters*<sub>analytisch</sub>: 2996 Diode Array Detector, 2695 Separation Module; *Waters*<sub>präparativ</sub>: 1525 HPLC Pump, 2487 Dual Wavelength UV Detector. Für analytische *reversed-phase*-Trennungen wurden CC 250/4 *Nucleosil 120-3 C18*- und VP 250/4 *Nucleodur 100-3 C18 ec*- Säulen der Fa. *Macherey-Nagel* verwendet. Für präparative Trennungen wurden VP 250/10 *Nucleodur 100-5 C18 ec*- und VP 250/10 *Nucleosil 100-7 C18*-Säulen eingesetzt. Als Puffersystem wurden 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser (Puffer A) und

0.1 M Triethylammoniumacetat in Acetonitril (Puffer B) verwendet (in den Methoden jeweils als **A** oder **B** bezeichnet). Zur Trennung der Nucleoside nach enzymatischem Totalverdau von Oligonukleotiden wurde eine *MS Uptisphere 3HDO* der Fa. *Interchrom* verwendet. Als Puffersystem diente 2 mM Triethylammoniumacetat in Wasser (Puffer A) und 2 mM Triethylammoniumacetat in 80 % Acetonitril (Puffer B), die Flussrate betrug hier nur 0.2 mL/min.

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde zur analytischen Trennung eine *VA 50/4.6 Nucleogel SAX 1000-8*-Säule, für präparative Trennungen eine *VA 50/7.7 Nucleogel SAX 1000-8*-Säule, beide von der Fa. *Macherey-Nagel*, eingesetzt. Als Puffersystem wurden 0.1 M NaCl/0.01 M NaOH, pH 12 (Puffer A) und 1 M NaCl/0.01 M NaOH, pH 12 (Puffer B) verwendet. Präparative Trennungen wurden bei pH 7.4 durchgeführt, hierfür wurden, anstelle der NaOH enthaltenden Puffer, auf 10 mM Tris-HCl basierende Salzlösungen verwendet. Die Detektion der Oligonukleotide erfolgte über die UV-Absorption bei 260 nm, bzw. über Fluoreszenz. Bei flavinhaltigen Oligonukleotiden wurde hierfür bei 360 nm angeregt und die Emission bei 520 nm detektiert; fluoresceinhaltige Stränge wurden mit 480 nm angeregt, die Emission wurde bei 526 nm detektiert.

**Lösungsmittel und Chemikalien** wurden, soweit nicht anders vermerkt, in den kommerziellen Qualitätsstufen *puriss.*, *p.a.* oder *purum* eingesetzt und von den Firmen *Fluka*, *Acros*, *Aldrich*, *Lancaster* oder *Sigma* bezogen. Bidestilliertes Wasser (Impedanz 18.2 MΩ) wurde mit einer *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* erzeugt. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Fluka*, *Acros*, oder *Aldrich* bezogen, Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor Verwendung destilliert. Zum Einengen von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde ein *Laborota 4001-efficient* Rotationsverdampfer der Fa. *Heidolph* verwendet, welcher mit einem *Vario PC2001*-Membranpumpenstand der Fa. *Vacuubrand* ausgestattet war. Zur Feintrocknung *in vacuo* wurde eine Ölvaakuumpumpe *RZ-4* der Fa. *Vacuubrand* verwendet (Endvakuum  $10^2$ - $10^3$  mbar). Kleinere Mengen an wässrigen oder pufferhaltigen Lösungen wurden mittels einer *SpeedVac Plus SC110A*, *SpeedVac SPD 111V* der Fa. *Savant* bzw. einer *RVC 2-25* mit *CT 62-50*-Kompressorkühlfalle der Fa. *Christ* entfernt. Zur Lyophilisierung wässriger Lösungen wurde eine *Alpha 2-4* Lyophille der Firma *Christ* verwendet.

**Oligonukleotidsynthese** wurde auf einem *Expedite Nucleic Acid Synthesis System* der Fa. *PerSeptive Biosystems* im Maßstab 1 μmol durchgeführt. Die geschützten Amidite wurden von der Firma *Glen Research* bezogen, die nukleosidbeladenen CPG-Träger stammten von der Fa. *PE Biosystems*. 6-FAM-beladene bzw. biotinbeladene CPG-Träger wurden von *Glen Research* bezogen. Phosphoramidite und Aktivatoren wurden in Acetonitril der Fa. *Riedel de Haen* (Wassergehalt < 0.1 ppm) gelöst, für die übrigen Reagenzien wurde Acetonitril der Fa. *Roth*

(Wassergehalt < 0.3 ppm) als Lösungsmittel verwendet. Als Aktivator für Flavin-*H*-Phosphonate diente Adamantylcarbonylchlorid bzw. Pivaloylsäurechlorid der Fa. *Fluka*, welches in einem Gemisch aus Acetonitril und Pyridin 1:1 gelöst wurde. Alle hergestellten Lösungen wurden vor der Synthese 24 h über Molekularsieb 4 Å getrocknet. Die Synthese natürlicher Oligonukleotide erfolgte nach Standardprotokollen des Geräteherstellers, Stränge ohne Sonderbasen wurden von den Firmen *Metabion* bzw. *IBA* bezogen. Einzelheiten zum Einbau modifizierter Bausteine finden sich in Abschnitt 5.5.

**Schmelzpunkte von Oligonukleotiden** wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio* mit Temperaturcontroller, Transporteinheit und *MultiCellBlock* aufgenommen. Der Temperaturgradient betrug 0.5 °C/min. Es wurden pro Messung je 5 Abkühlkurven (85 °C → 0 °C) und 5 Aufheizkurven (0 °C → 85 °C) bei 260 nm und 320 nm aufgenommen. Die Temperaturmessung erfolgte hierbei in einer Referenzküvette. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gespült, um ein Anlaufen der Küvetten bei tiefen Temperaturen zu verhindern. Es wurden Küvetten der Fa. *Hellma* mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang verwendet. Für die Schmelzkurven wurden 3 µM DNA-Duplexlösungen angesetzt, welche zusätzlich 150 mM NaCl und 10 mM Tris HCl (pH 7.4) enthielten. In den Küvetten wurden die Lösungen mit Dimethylpolysiloxan überschichtet, um ein Verdampfen der Probe zu verhindern. Die Auswertung der Messungen erfolgte unter Verwendung von *Microcal Origin*. Hierzu wurden die erhaltenen Kurven bei 260 nm gemittelt und hiervon die gemittelte Hintergrundmessung bei 320 nm subtrahiert. Die so erzeugte Kurve wurde durch ein Polynom 9. Ordnung approximiert, die Nullstelle der 2. Ableitung der Näherungsfunktion stellt den gesuchten Schmelzpunkt dar.

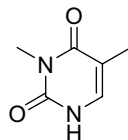
**Röntgenstrukturanalyse** von Kleinmolekülen wurde von Dr. *Kurt Polborn*, Department Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, auf einem *IPDS/CCD*-Gerät durchgeführt. Experimentelle Details, Angaben zur Strahlungsquelle und Tabellen der Kristalldaten von Verbindung **87** finden sich im Anhang A.

**Proteinkonzentrationen** von Zelllysaten wurden photometrisch nach der Methode von *Bradford* bestimmt. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue R250* durch Interaktion mit den basischen Aminosäureseitenketten von Arginin und Lysin von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Es wurden jeweils 200 µL der *Bradford*-Stammlösung (*BioRad*) mit 800 µL bidestilliertem Wasser versetzt. Hierzu wurden 0.5-10 µL der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer anhand von BSA-Standardlösungen bekannter Konzentration ermittelten Kalibriergeraden ließ sich dann die gesuchte Proteinkonzentration ablesen.



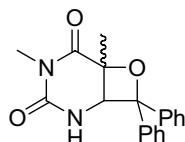
## 5.1 Synthese des Thymin-Oxetanbausteins 77

### 3-Methylthymin (83)<sup>[418]</sup>



Zu einer Lösung von 4-Thiothymin **84** (4.000 g, 28.14 mmol) in trockenem DMF (400 mL) wurde Natriumhydrid zugegeben (1.293 g, 56.26 mmol, 2.00 eq). Nach Abklingen der Gasentwicklung wurde Methyljodid (5.26 mL, 84.40 mmol, 3.00 eq) zugetropft und die entstandene Mischung bei Raumtemperatur 18 h gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand mit Chloroform (300 mL) behandelt und von unlöslichen Bestandteilen abfiltriert. Das Filtrat wurde *in vacuo* eingeeengt und der verbliebene weiße Feststoff säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Chloroform/Methanol 100:1). Das 2-S-Methyl-3-methylthymin **85** (3.125 g, 65%) wurde als weißer Feststoff erhalten. Dieser wurde in 2 N HCl (200 mL) gelöst und die Lösung für 8 h auf 80° C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Chloroform (300 mL) extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wurde **83** (2.360 g, 93 %) als weißer Feststoff erhalten. Alle erhaltenen spektroskopischen Daten waren in Übereinstimmung mit den von *Itahara* beschriebenen.<sup>[418]</sup>

### *rac*-4,6-Dimethyl-8,8-diphenyl-7-oxa-2,4-diaza-bicyclo[4.2.0]octan-3,5-dion (86)



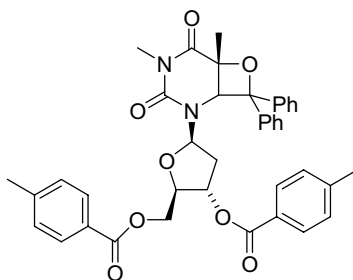
In einer Pyrex-Apparatur ( $\lambda > 340$  nm) wurde Benzophenon **48** (6.137 g, 33.68 mmol, 2.00 eq) zu einer Lösung von 3-Methylthymin **83** (2.360 g, 16.84 mmol) in trockenem Acetonitril (800 mL) gegeben. Die entstandene Lösung wurde durch Einleiten eines starken Argonstroms über 20 min entgast. Die Mischung wurde anschließend bei 10 °C in einer Argonatmosphäre für 2 h mit einer Mitteldruckquecksilberlampe (750 W) belichtet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch

aufgereinigt (Kieselgel-60, Chloroform/Methanol 100:1). **86** wurde als weißer Feststoff erhalten (2.270 g, 44 %).

$R_f = 0.36$  (Chloroform/Methanol 20:1)

**Smp.:** 191 °C; **IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3326$  m, 2978 w, 1730 s, 1687 vs, 1473 m, 1448 m, 1382 w, 1300 m, 1238 w, 1128 w, 1105 w, 978 w, 751 m, 704  $\text{cm}^{-1}$  m;  **$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7.41$ -7.23 (m, 10H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 6.35 (d, 1H,  $^3J = 4.2$  Hz,  $\text{HC}(6)$ ), 4.70 (d, 1H,  $^3J = 4.2$  Hz,  $\text{HN}(1)$ ), 2.80 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C-N}(3)$ ), 1.77 ppm (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C-C}(6)$ );  **$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 170.3$ , 152.5, 144.3, 138.5, 128.6 (2C), 128.3 (2C), 127.9 (2C), 125.8 (2C), 124.8 (2C), 90.8, 75.7, 59.7, 26.8, 23.6 ppm; **HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3^{35}\text{Cl}_1$   $[\text{M} + \text{Cl}]^-$  : 357.1006; gefunden 357.1005.

**(R)-2-(4-(4'-Toluoyloxy)-5-(4'-toluoloxy)methyl-tetrahydro-furan-2-yl)-4,6-dimethyl-8,8-diphenyl-7-oxa-2,4-diaza-bicyclo[4.2.0]octan-3,5-dion (87)**



**86** (500 mg, 1.55 mmol) wurde in trockenem Acetonitril (30 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde Natriumhydrid (46 mg, 1.91 mmol, 1.25 eq) zugegeben, anschließend wurde in kleinen Portionen 1'-Chloro-3',5'-di-O-toluoyl-2'-desoxyribofuranosid **82** (756 mg, 1.94 mmol, 1.25 eq) zugesetzt. Man ließ die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und rührte 4 h unter Argon. Nach Verdünnung mit Chloroform (100 mL) wurde je einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlg. und *Brine* gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Toluol/EtOAc 15:1). Das gewünschte  $\beta$ -Nukleosid **87** wurde als weißer Schaum erhalten (290 mg, 28 %).

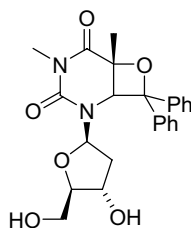
$R_f = 0.20$  (Toluol/EtOAc 10:1)

$[\alpha]_D^{26} = +52.14^\circ$  ( $c = 0.026$  in Chloroform); **Smp.:** 169 °C; **IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3438$  m, 3064 w, 3035 w, 2990 w, 2924 w, 1722 vs, 1686 vs, 1611 m, 1448 s, 1410 w, 1373 w, 1271 vs, 1201 m, 1179 s, 1101 vs, 1019 m, 970 m, 866 w, 843 w, 752 vs, 705  $\text{cm}^{-1}$  m;  **$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7.81$ -7.72 (m, 4H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 7.50-7.48 (m, 2H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 7.30-7.05 (m, 12H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 6.34 (dd, 1H,  $^3J =$

5.2 Hz, 9.2 Hz,  $HC(1')$ ), 5.30 (d, 1H,  $^3J = 6.5$  Hz,  $HC(3')$ ), 4.63 (s, 1H,  $HC(6)$ ), 4.25 (m, 1H,  $HC(4')$ ), 4.12 (dd, 1H,  $^3J = 3.6$  Hz,  $^2J = 12.1$  Hz,  $H_aC(5')$ ), 3.58 (dd, 1H,  $^3J = 3.0$  Hz,  $^2J = 12.1$  Hz,  $H_bC(5')$ ), 2.52 (s, 3H,  $H_3C-N(3)$ ), 2.40-2.35 (m, 1H,  $H_aC(2')$ ), 2.32 (s, 3H,  $H_3C-Tol$ ), 2.30 (s, 3H,  $H_3C-Tol$ ), 2.09-1.99 (m, 1H,  $HC(2')$ ), 1.56 (s, 3H,  $H_3C-C(5)$ );  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 170.0, 166.0, 165.7, 151.9, 144.3, 143.9, 142.2, 137.2, 129.6$  (4C), 129.1 (4C), 128.9, 128.6 (2C), 128.0 (2C), 127.9, 126.7, 126.3, 126.2 (2C), 126.1 (2C), 103.2, 90.7, 85.2, 80.7, 76.9, 74.2, 63.5, 61.7, 35.3, 27.3, 22.0, 21.5 ppm; HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $C_{40}H_{38}N_2O_8^{23}Na_1$   $[M + Na]^+$  : 674.2526; gefunden 674.2513.

Als Nebenprodukt konnte auch das  $\alpha$ -Anomer **88** isoliert werden (260 mg, 25 %):  $R_f = 0.23$  (Toluol/EtOAc 10:1),  $[\alpha]_D^{26} = -63.4^\circ$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7.90$ -7.95 (m, 4H,  $HC_{arom}$ ), 7.42-7.28 (m, 10H,  $HC_{arom}$ ), 7.24-7.19 (m, 4H,  $HC_{arom}$ ), 6.36 (dd, 1H,  $^3J = 5.4$  Hz, 9.6 Hz,  $HC(1')$ ), 5.30 (dt, 1H,  $^3J = 5.0$  Hz,  $^3J = 1.9$  Hz,  $HC(3')$ ), 4.79 (s, 1H,  $HC(6)$ ), 4.50 (ddd, 2H,  $^3J = 5.5$  Hz,  $^3J = 11.7$  Hz,  $^2J = 15.9$  Hz,  $H_2C(5')$ ), 4.34 (m, 1H,  $HC(4')$ ), 2.59 (s, 3H,  $H_3C-N(3)$ ), 2.42-2.36 (m, 7H,  $2 \times H_3C-Tol$ ,  $H_aC(2')$ ), 1.87 (ddd, 1H,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^3J = 9.6$  Hz,  $^2J = 13.9$  Hz,  $H_bC(2')$ ), 1.72 (s, 3H,  $H_3C-C(5)$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 170.1, 166.1, 165.8, 151.9, 144.4, 144.0, 142.2, 137.3, 129.7$  (4C), 129.2 (4C), 128.9, 128.6 (2C), 128.1 (2C), 128.0, 126.8, 126.3, 126.2 (2C), 126.1 (2C), 90.7, 85.2, 80.7, 76.9, 74.3, 63.6, 61.7, 35.4, 27.4, 22.0, 21.6, 21.5 ppm; HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $C_{40}H_{38}N_2O_8^{23}Na_1$   $[M + Na]^+$  : 674.2526; gefunden 674.2519.

**(R)-2-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-4,6-dimethyl-8,8-diphenyl-7-oxa-2,4-diaza-bicyclo[4.2.0]octan-3,5-dion (89)**

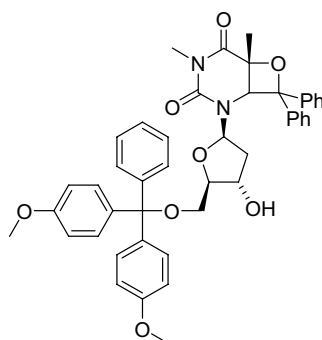


Zu einer Lösung von **87** (276 mg, 0.41 mmol) in trockenem Methanol (20 mL) wurde wasserfreies Kaliumcarbonat (141 mg, 1.02 mmol, 2.50 eq) gegeben. Die entstandene Mischung wurde bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Nach Neutralisation mit Amberlit IR-120 Ionenaustauscher ( $H^+$ -Form, 2.000 g) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Chloroform/Methanol 50:1). **89** wurde als kompakter weißer Schaum erhalten (151 mg, 84 %).

$R_f = 0.31$  (Chloroform/Methanol 10:1)

$[\alpha]_D^{25} = +2.96^\circ$  ( $c = 0.009$  in Chloroform); **Smp.:** 66 °C; **IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3022$  w, 2927 w, 1718 s, 1672 vs, 1463 m, 1448 m, 1417 w, 1374 w, 1293 m, 1202 m, 1149 w, 1095 m, 1052 m, 1020 w, 918 w, 876 w, 750 m, 706 m 653 w, 596  $\text{cm}^{-1}$  w;  **$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7.62$ -7.52 (m, 4H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 7.40-7.29 (m, 6H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 7.30-7.05 (m, 12H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 6.29 (dd, 1H,  $^3J = 6.0$  Hz,  $^3J = 8.3$  Hz,  $\text{HC}(1')$ ), 4.63 (s, 1H,  $\text{HC}(6)$ ), 4.30 (m, 1H,  $\text{HC}(4')$ ), 3.79 (m, 1H,  $\text{HC}(3')$ ), 3.34 (dd, 1H,  $^3J = 3.1$  Hz,  $^2J = 12.2$  Hz,  $\text{H}_a\text{C}(5')$ ), 3.20 (dd, 1H,  $^3J = 3.0$  Hz,  $^2J = 12.2$  Hz,  $\text{H}_b\text{C}(5')$ ), 2.61 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C-N}(3)$ ), 2.06 (ddd, 1H,  $^3J = 2.7$  Hz, 6.0 Hz,  $^2J = 13.5$  Hz,  $\text{H}_a\text{C}(2')$ ), 1.98 (ddd, 1H,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^2J = 13.6$  Hz,  $\text{H}_b\text{C}(2')$ ), 1.81 ppm (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C-C}(5)$ );  **$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 169.9$ , 151.1, 143.2, 137.4, 128.7, 128.5, 128.3 (2C), 128.1 (2C), 126.5 (2C), 126.1 (2C), 91.3, 86.2, 85.5, 76.8, 71.4, 62.4, 62.3, 39.4, 27.1, 22.6 ppm; **HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6^{35}\text{Cl}_1$  [ $\text{M} + \text{Cl}$ ] : 473.1479; gefunden 473.1452.

**(R)-2-[4-Hydroxy-5-(4',4''-dimethoxytrityl)oxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl]-4,6-dimethyl-8,8-diphenyl-7-oxa-2,4-diaza-bicyclo[4.2.0]octan-3,5-dion (90)**



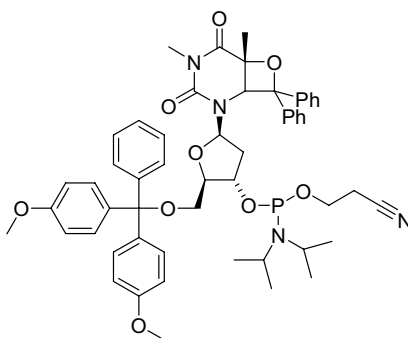
**89** (110 mg, 0.25 mmol) wurde zweimal mit trockenem Pyridin (1 ml) koevaporiert und anschließend in Pyridin (2 mL) gelöst. Nach Zugabe von Molekularsieb 4 Å wurde die Lösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (102 mg, 0.30 mmol, 1.20 eq) wurde zugegeben und die Lösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Chloroform/Methanol/Pyridin 100:1:0.1). Verbindung **90** wurde als gelblicher Film erhalten (156 mg, 84%).

$R_f = 0.18$  (Chloroform/Methanol 20:1)

**Smp.:** 84 °C (Zers.); **IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3058$  w, 2927 w, 1719 m, 1677 s, 1607 m, 1580 w, 1508 s, 1444 s, 1413 m, 1371 m, 1293 s, 1247 s, 1200 m, 1175 s, 1147 m, 1068 m, 1051 m, 1030 s, 1002 m, 951 m, 916 m, 876 w, 827 s, 800 w, 791 w, 746 vs, 726 w, 706 vs  $\text{cm}^{-1}$ ;  **$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,**

$\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 7.59$  (m, 1H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ -DMT), 7.41-7.32 (m, 5H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 7.24-7.10 (m, 10H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 6.94-6.92 (m, 3H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 6.73 (dd, 4H,  $^3J = 4.8$  Hz,  $^4J = 8.8$  Hz,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ -DMT), 6.10 (t, 1H,  $^3J = 6.7$  Hz,  $\text{HC}(1')$ ), 4.36 (s, 1H,  $\text{HC}(6)$ ), 4.01 (m, 1H,  $\text{HC}(4')$ ), 3.77 (m, 1H,  $\text{HC}(3')$ ), 3.71 (s, 6H,  $2 \times \text{H}_3\text{CO}$ -DMT), 3.10 (dd, 1H,  $^3J = 4.7$  Hz,  $^2J = 9.6$  Hz,  $\text{H}_a\text{C}(5')$ ), 2.64 (dd, 1H,  $^2J = 9.6$  Hz,  $^3J = 1.2$  Hz,  $\text{H}_b\text{C}(5')$ ), 2.53 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}$ -N(3)), 2.21 (s, br, 1H,  $\text{HO}$ -C(3')), 2.12-2.08 (m, 1H,  $\text{HC}(2')$ ), 1.72-1.68 (m, 1H,  $\text{HC}(2')$ ), 1.59 ppm (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}$ -C(5));  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.7$ , 158.6, 151.0, 149.7, 144.4, 143.6, 138.5, 136.0, 135.6, 135.4, 130.0 (2C), 129.9 (2C), 128.1 (2C), 128.0 (2C), 127.9 (2C), 127.8 (4C), 127.6, 127.0, 125.9, 125.4, 123.8, 113.2 (4C), 91.2, 86.7, 85.5, 84.0, 73.2, 63.7, 61.4, 55.2 (2C), 38.9, 27.1, 22.7 ppm; HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6^{23}\text{Na}_1$  [M + Na]<sup>+</sup>: 763.2995 gefunden 763.2983.

**(R)-2-[4-( $\beta$ -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoxy)-5-(4',4''-dimethoxytrityl)oxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl]-4,6-dimethyl-8,8-diphenyl-7-oxa-2,4-diaza-bicyclo[4.2.0]octan-3,5-dion (77)**



**90** (130 mg, 0.17 mmol) wurde in dreifach entgastem Tetrahydrofuran (1 mL) aufgenommen. Nach Zugabe von Hünig-Basis (130  $\mu\text{L}$ , 0.74 mmol, 4.50 eq) wurde die Lösung auf  $-78$  °C gekühlt (Aceton/Trockeneis-Kältebad) und  $\beta$ -Cyanoethyltetraisopropylphosphordiamidit (77  $\mu\text{L}$ , 0.29 mmol, 1.70 eq) tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 4 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Deaktiviertes<sup>(\*)</sup> Kieselgel-60, Chloroform/Methanol/Pyridin 100:1:0.1). **77** konnte als gelblicher Film isoliert werden (110 mg, 67%), zur Aufbewahrung wurde es anschließend bei  $-80$  °C unter Argon gelagert.

$R_f = 0.29$  (Chloroform/Methanol 50:1)

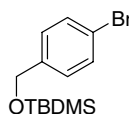
**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3042$  w, 2950 w, 2922 w, 1710 m, 1672 s, 1605 w, 1574 m, 1504 m, 1444 m, 1405 m, 1362 m, 1293 s, 1247 s, 1193 m, 1131 m, 1060 m, 1047 m, 1028 m, 998 m, 947 m, 912 m, 870

w, 821 s, 794 w, 791 w, 742 vs, 720 w, 702 vs  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.54-7.53 (m, 1H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 7.43-7.20 (m, 15H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 6.99-6.92 (m, 3H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 6.81-6.77 (m, 4H,  $\text{HC}_{\text{arom}}$ ), 6.10 (dd, 1H,  $^3J = 5.6 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 6.4 \text{ Hz}$ ,  $\text{HC}(1')$ ), 4.43 (s, 1H,  $\text{HC}(6)$ ), 4.23 (m, 1H,  $\text{HC}(4')$ ), 4.12 (m, 1H,  $\text{HC}(3')$ ), 3.72 (s, 6H,  $\text{H}_3\text{CO-DMT}$ ), 3.71-3.51 (m, 5H,  $\text{H}_a\text{C}(5')$ ,  $-\text{O}-\text{H}_2\text{C-PA}$ ,  $2 \times \text{HN-}i\text{Pr}$ ), 2.96 (dd, 1H,  $^2J = 9.9 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 5.0 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_b\text{C}(5')$ ), 2.69 (m, 1H,  $\text{HC}(2')$ ), 2.62 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C-N}(3)$ ), 2.58 (t, 2H,  $^3J = 6.2 \text{ Hz}$ ,  $-\text{H}_2\text{C-CN}$ ), 2.29 (dd, 1H,  $^3J = 5.2 \text{ Hz}$ ,  $^2J = 13.2 \text{ Hz}$ ,  $\text{HC}(2')$ ), 1.64 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C-C}(5)$ ), 1.26-0.96 ppm (m, 12H,  $4 \times \text{H}_3\text{C-}i\text{Pr}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 169.8, 158.6, 151.2, 144.5, 143.7, 138.7, 135.8, 135.5, 130.1 (2C), 130.0 (2C), 128.1 (2C), 128.0 (2C), 127.9 (2C), 127.8 (2C), 127.6, 127.5, 126.9, 125.9 (2C), 125.4 (2C), 117.5, 113.1 (2C), 113.0 (2C), 91.2, 86.4, 85.9, 84.6, 74.5, 74.3, 63.2, 61.0, 58.1, 55.2 (2C), 43.3, 43.2, 37.5, 29.7, 27.1, 24.6, 24.5 (2C), 22.6, 20.3 ppm;  $^{31}\text{P NMR}$  (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 150.1, 149.3 ppm; HRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{45}\text{H}_{61}\text{N}_4\text{O}_9^{23}\text{Na}_1\text{P}_1$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ : 963.4073; gefunden 963.4059.

(\*) Kieselgel-60 (75 g) wurde in einem Gemisch aus Dichlormethan (200 mL) und Pyridin (50 mL) aufgeschlämmt. Danach wurden die flüchtigen Bestandteile zunächst am Rotationsverdampfer und anschließend im HV entfernt. Das so deaktivierte Kieselgel wurde über Nacht bei 80 °C im Trockenschrank gelagert und dann sofort zur Reinigung des Phosphoramidits verwendet.

## 5.2 Synthese des Diaziriniodids **101** <sup>[362, 378, 385]</sup>

### (4-Brom-benzyloxy)-*tert*-butyl-dimethylsilan (**104**)

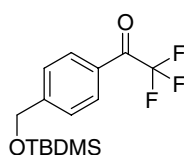


In trockenem DMF (50 mL) wurden sukzessive 4-Brombenzylalkohol **103** (5.000 g, 26.73 mmol), Imidazol (3.740 g, 53.46 mmol, 2.00 eq.) und *tert*-Butyl-dimethylsilyl-chlorid (4.835 g, 32.08 mmol, 1.20 eq.) gelöst. Die Lösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde je einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlsg., dest. Wasser und *Brine* gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknung im HV wurde **104** (7.655 g, 95 %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.69$  (Hexan/Dichlormethan 4:1)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.45$  (d, 2H,  $^3J = 7.5$  Hz, HC(2), HC(6)), 7.20 (d, 2H,  $^3J = 7.5$  Hz, HC(3), HC(5)), 4.69 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C-Bn}$ ), 0.95 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.10 (s, 6H,  $\text{H}_3\text{C-TBDMS}$ );  
 $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 140.4$  (C(1)), 131.3 (2C, C(2),C(6)), 127.7 (2C, C(3), C(5)), 120.6 (C4), 64.3 (C-Bn), 25.9 (3C, *t*Bu-TBDMS), 18.4 (*t*Bu-TBDMS), -5.3 (2C,  $\text{H}_3\text{C-TBDMS}$ ).

### 1-[4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-phenyl]-2,2,2-trifluoro-ethanon (105)

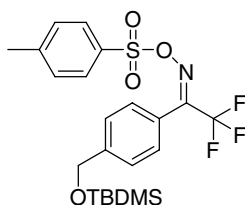


Bei  $-78$  °C (Aceton/Trockeneis-Mischung) wurde der Silylether **104** (3.650 g, 12.11 mmol) unter Argon in trockenem THF (40 mL) gelöst. Es wurde *n*-Butyllithium zugegeben (5.81 mL, 2.5 M in Hexanfraktion, 14.52 mmol, 1.20 eq.) und 75 min bei  $-78$  °C gerührt. Es wurde Trifluoracetyl-piperidinamid **102** (3.000 g, 16.56 mmol, 1.40 eq.) über eine Spritze so zugetropft, dass die Temperatur nicht über  $-60$  °C stieg (ca. 20 min). Nach der Zugabe wurde für weitere 75 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. Ammoniumchloridlg. (50 mL) gequencht und unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Das Gemisch wurde mit Ether (60 mL) verdünnt und je zweimal mit ges. Ammoniumchloridlg. (100 mL) und dest. Wasser (30 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde ein gelbes, öliges Rohprodukt erhalten (ca. 3.6 g). Nach Vakuumdestillation erhielt man hieraus das Produkt **105** als farbloses Öl (Sdp.  $70$  °C, 0.4 mbar, 2.930 g, 75 %).

$R_f = 0.15$  (Hexan/Dichlormethan 4:1)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.05$  (d, 2H,  $^3J = 7.7$  Hz, HC(2), HC(6)), 7.50 (d, 2H,  $^3J = 7.7$  Hz, HC(3), HC(5)), 4.83 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C-Bn}$ ), 0.96 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.12 ppm (s, 6H,  $\text{H}_3\text{C-TBDMS}$ );  
 $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 180.5$  (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 34.7$  Hz), 150.5, 130.7 (2C), 129.0, 126.6 (2C), 117.7 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 289.4$  Hz), 64.7, 26.3 (3C), 18.8, -4.9 ppm (2C).

**1-[4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy)methyl]-phenyl]-2,2,2-trifluoro-(4'-toluoylsulfonyl)-ethanonoxim (106)**



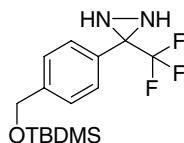
Keton **105** (2.930 g, 9.00 mmol) wurde in einem Gemisch aus abs. Ethanol (12 mL) und abs. Pyridin (40 mL) gelöst. Es wurde Hydroxylammoniumchlorid zugegeben (653 mg, 9.04 mmol, 1.04 eq) und die entstandene Lösung 4 h bei 60 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in Ether (60 mL) aufgenommen und mit dest. Wasser (100 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer verblieb das freie Oxim als farbloses Öl (3.060 g, quant.). Dieses wurde ohne weitere Aufreinigung in abs. Dichlormethan (25 mL) gelöst. Es wurden sukzessive Hünig-Base (2.00 mL, 11.48 mmol, 1.28 eq) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (2.100 g, 10.80 mmol, 1.20 eq.) zugegeben und 90 min bei Raumtemperatur gerührt, wobei die Lösung sich zunehmend rot färbte. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ether (100 mL) aufgenommen und mit dest. Wasser (100 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Einengen *in vacuo* verblieb ein rotes Öl, das säulenchromatographisch gereinigt wurde (Kieselgel-60, Hexan/Dichlormethan 2:1). **106** wurde in Form eines farblosen Öls erhalten (3.920 g, 87 %).

$R_f = 0.35$  (Hexan/Dichlormethan 2:1)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.89$  (d, 2H,  $^3J = 8.5$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ -Ph), 7.40 (m, 6H,  $H_{\text{arom}}$ -Ph,  $H_{\text{arom}}$ -Ts), 4.78 (s, 2H,  $-H_2\text{C}-\text{OTBDMS}$ ), 2.48 (s, 3H,  $H_3\text{C}_{\text{arom}}$ -Ts), 0.96 (s, 9H, *t*-Bu-TBDMS), 0.12 ppm (s, 6H,  $H_3\text{C}$ -TBDMS);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 154.0$  (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 24.7$  Hz), 146.0, 145.6, 131.3, 129.8 (2C), 129.3 (2C), 128.5 (2C), 126.0 (2C), 123.0, 118.3 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 276.2$  Hz), 64.3, 25.9 (3C), 21.8, 18.4, -5.3 ppm (2C).



**3-[4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-phenyl]-3-trifluoromethyl-diaziridin (107)**

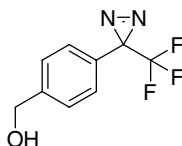


Tosyloxim **106** (1.400 g, 2.50 mmol) wurde in einem dickwandigen Glasdruckgefäß (*Aldrich*, 15 mL Volumen) in trockenem Ether (6.30 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt (Aceton/Trockeneis-Mischung) und mit zuvor einkondensiertem flüssigem Ammoniak (2.00 mL) versetzt. Das Druckgefäß wurde sofort verschlossen und das Kältebad entfernt. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Anschließend wurde erneut auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt, das Druckgefäß geöffnet und der Ammoniak verdampft. Der Rückstand wurde mit Ether verdünnt (20 mL) und mit dest. Wasser (20 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* verblieb ein gelbliches, öliges Rohprodukt (786 mg), das säulenchromatographisch gereinigt wurde (Kieselgel-60, Dichlormethan). **107** wurde als farbloses Öl erhalten, welches bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  auskristallisierte (681 mg, 81 %).

$R_f = 0.41$  (Dichlormethan, kanariengelbe Färbung mit Anisaldehyd-Dip)

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.58$  (d, 2H,  $^3J = 8.2\text{ Hz}$ ,  $H_{\text{arom}}$ -Ph),  $7.38$  (d, 2H,  $^3J = 8.2\text{ Hz}$ ,  $H_{\text{arom}}$ -Ph),  $4.76$  (s, 2H,  $H_2\text{C-OTBDMS}$ ),  $2.77$  (s, breit, 1H, HN),  $2.18$  (s, breit, 1H, HN),  $0.94$  (s, 9H, *t*Bu-TBDMS),  $0.10$  ppm (s, 6H,  $H_3\text{C-TBDMS}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 143.8$ ,  $130.2$ ,  $128.0$  (2C),  $126.2$  (2C),  $123.6$  (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 276.2\text{ Hz}$ ),  $64.4$ ,  $58.0$  (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 27.4\text{ Hz}$ ),  $25.9$  (3C),  $18.4$ ,  $-5.3$  ppm (2C).

**[4-(3-Trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-phenyl]-methanol (108)**



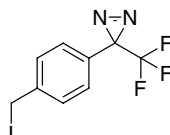
Diaziridin **107** (1.000 g, 3.10 mmol) wurde in abs. Ether (22 mL) gelöst und unter Argon mit Silberoxid (2.820 g, 12.17 mmol, 4.00 eq) versetzt. [Das Silberoxid war zuvor frisch gefällt worden. Hierzu wurde Silbernitrat (8.500 g) in dest. Wasser (100mL) gelöst, zum Sieden er-

hitzt und dann tropfenweise mit 1 M NaOH (insgesamt 50 mL) versetzt. Der braune Niederschlag wurde mit dest. Wasser, Aceton und Ether gewaschen und sofort verwendet.] Die Suspension wurde dann unter Lichtausschluss gerührt. Nach Ablauf der Reaktion (DC-Kontrolle, ca. 30 min) wurde das Silber abfiltriert, mit Ether gewaschen und das Filtrat im HV eingengt. Der Rückstand wurde mit einer 1.25 M Lösung von HCl in Methanol (5 mL) versetzt und bei Raumtemperatur für 45 min gerührt. Es wurde mit Ether verdünnt (30 mL) und je einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlsg. (30 mL) und dest. Wasser (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt kristallisierte hierbei in Form farbloser Nadeln aus (570 mg, 88 %).

$R_f = 0.18$  (Dichlormethan)

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.39$  (d, 2H,  $^3J = 8.2$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ -Ph), 7.19 (d, 2H,  $^3J = 8.2$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ -Ph), 4.71 (s, 2H,  $-H_2C-OH$ ), 1.76 (s, br, 1H,  $HO-$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 142.5$ , 128.3, 127.1 (2C), 126.6 (2C), 122.5 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 273.2$  Hz), 64.5, 28.3 (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 28.1$  Hz) ppm.

### 3-(4-Iodomethyl-phenyl)-3-trifluoromethyl-3H-diazirin (101)

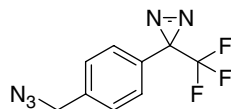


Eine Lösung des Alkohols **108** (500 mg, 2.31 mmol) in abs. Acetonitril (4.40 mL) wurde mit Methyltriphenoxyphosphoniumiodid versetzt (2.140 g, 4.62 mmol, 2.00 eq) und unter Lichtausschluss für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Ether (20 mL) verdünnt und je einmal mit 1 M NaOH und dest. Wasser gewaschen. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der gelbe, ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Dichlormethan). Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten, welches beim Abkühlen in Form blaugelber Plättchen auskristallisierte (556 mg, 74 %).

$R_f = 0.50$  (Isohexan)

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.40$  (d, 2H,  $^3J = 8.3$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{-Ph}$ ),  $7.11$  (d, 2H,  $^3J = 8.3$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{-Ph}$ ),  $4.42$  (s, 2H,  $\text{-H}_2\text{C-I}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 141.1$ ,  $129.1$  (2C),  $128.7$ ,  $126.9$  (2C),  $121.5$  (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 273.6$  Hz),  $62.8$ ,  $28.6$  (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 28.4$  Hz) ppm.

### 3-(4-Azidomethyl-phenyl)-3-trifluoromethyl-3H-diazirin (127)



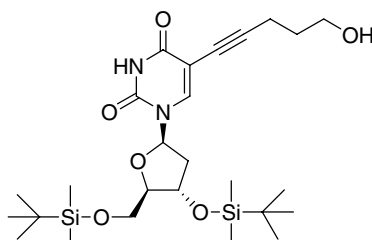
Das Iodid **101** (100 mg, 0.31 mmol) wurde in abs. Methanol (3 mL) gelöst und Natriumazid (50 mg, 0.62 mmol, 2.00 eq.) zugegeben. Die Lösung wurde 3 h bei  $40^\circ\text{C}$  gerührt (im Wasserbad eines Rotationsverdampfers). Nach Ablauf der Reaktion wurde dest. Wasser zugegeben (20 mL) und mit Isohexan (20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei  $20^\circ\text{C}$  am Rotationsverdampfer entfernt. Das Diazirinazid **127** wurde als gelbliche Flüssigkeit erhalten (70 mg, quant.).

$R_f = 0.31$  (Isohexan)

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.36$  (d, 2H,  $^3J = 8.3$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{-Ph}$ ),  $7.22$  (d, 2H,  $^3J = 8.3$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{-Ph}$ ),  $4.37$  (s, 2H,  $\text{-H}_2\text{C-N}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 137.2$ ,  $129.1$ ,  $128.4$  (2C),  $127.0$  (2C),  $121.5$  (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 273.2$  Hz),  $54.1$ ,  $28.3$  (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 30.2$  Hz) ppm.

### 5.3 Synthese des DNA-Diazirinbausteins 99

#### 1-[4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-tetrahydro-furan-2-yl]-5-(5-hydroxy-pent-1-ynyl)-1*H*-pyrimidin-2,4-dion (110)

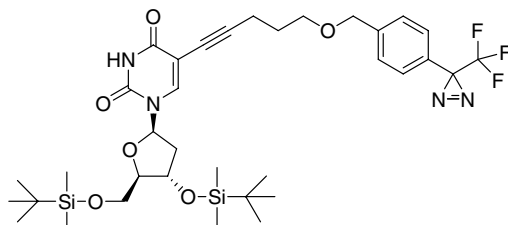


TBDMS-geschütztes 5-Ioddesoxyuridin **109** (1.000 g, 1.72 mmol) wurde in DMF (1 mL) gelöst und dreimal entgast. Anschließend wurden in der angegebenen Reihenfolge PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (241 mg, 0.34 mmol, 0.20 eq), Hünig-Base (597 µL, 3.44 mmol, 2.00 eq), 4-Pentin-1-ol (479 µL, 5.16 mmol, 3.00 eq) und Kupfer-(I)-iodid (130 mg, 0.69 mmol, 0.40 eq) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht unter Lichtausschluss gerührt. Es wurde mit Diethylether (30 mL) verdünnt, je einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlsg. und zweimal mit *Brine* gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das braune Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Dichlormethan/Methanol 100:1 → 50:1). Es konnte **110** (540 mg, 55%) als farbloser Film isoliert werden.

$R_f = 0.37$  (Chloroform/Methanol 10:1)

**IR (ATR)** :  $\tilde{\nu} = 3416$  w, 3181 w, 3066 w, 2951 m, 2928 m, 2856 m, 1681 vs, 1627 m, 1575 w, 1461 m, 1404 w, 1360 w, 1322 w, 1278 m, 1251 s, 1190 w, 1099 m, 1065 s, 1028 s, 1005 m, 966 m, 937 w, 919 w, 885 w, 829 vs, 812 s, 775 vs, 670 s; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta = 9.05$  (s, 1H, HN), 7.92 (s, 1H, HC(6)), 6.28 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, HC(1')), 4.39 (td, 1H, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, HC(3')), 3.95 (m, 1H, HC(4')), 3.89 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 2.4 Hz, <sup>2</sup>J = 11.4 Hz, H<sub>a</sub>C(5')), 3.76 (m, 3H, H<sub>2</sub>C-OH, H<sub>b</sub>C(5')), 2.49 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, H<sub>2</sub>C-C≡C), 2.29 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, <sup>2</sup>J = 13.1 Hz, H<sub>a</sub>C(2')), 2.01 (m, 1H, H<sub>b</sub>C(2')), 1.80 (q, 2H, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 0.92 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.88 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.14 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-TBDMS), 0.12 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-TBDMS), 0.07 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-TBDMS), 0.06 ppm (s, 3H, H<sub>3</sub>C-TBDMS); **<sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta = 162.1, 149.1, 141.5, 100.5, 94.6, 88.3, 85.6, 72.2, 62.9, 61.4, 41.9$  (2C), 31.0, 26.0 (3C), 25.7 (3C), 18.4, 18.0, -4.7, -4.9, -5.4, -5.6 ppm; **HRMS (ESI<sup>+</sup>)**:  $m/z$  berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> : 539.2973; gefunden 539.2968.

**1-[4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-tetrahydro-furan-2-yl]-5-{5-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-pent-1-ynyl}-1*H*-pyrimidin-2,4-dion (111)**

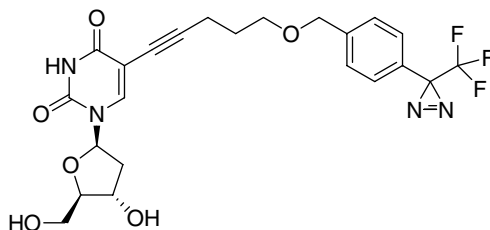


Zu einer Lösung von **110** (270 mg, 0.50 mmol) in abs. THF (1 mL) wurde Natriumhydrid (50 mg, 60% Suspension in Öl, 1.25 mmol, 2.50 eq) zugegeben. Nach Abklingen der Gasentwicklung (20 min) wurde **101** (204 mg, 0.60 mmol, 1.20 eq) zugesetzt und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur 3.5 h gerührt. Es wurde durch Zugabe von ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (1 mL) gequencht, mit Diethylether (20 mL) verdünnt und mit *Brine* gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Konzentration *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Dichlormethan/Methanol 75:1). Man erhielt Verbindung **111** (280 mg, 76 %) als farblosen Schaum.

$R_f = 0.17$  (Chloroform/Methanol 30:1)

**IR (ATR)** :  $\tilde{\nu} = 3182$  w, 3065 w, 2953 m, 2929 m, 2885 w, 2857 m, 2285 m, 1723 s, 1682 vs, 1625 m, 1519 w, 1461 m, 1404 w, 1361 w, 1344 m, 1323 w, 1278 m, 1253 s, 1232 m, 1182 s, 1153 s, 1103 s, 1067 m, 1028 m, 1005 w, 967 m, 937 s, 918 w, 885 m, 836 vs, 810 m, 776 vs, 733 m, 670  $\text{cm}^{-1}$  m;  **$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta = 8.20$  (s, 1H, HC(6)), 7.36 (d, 2H,  $^3J = 8.2$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 7.16 (d, 2H,  $^3J = 8.2$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 6.29 (dd, 1H,  $^3J = 6.0$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz, HC(1')), 4.52 (s, 2H,  $H_2\text{C-Bn}$ ), 4.41 (m, 1H, HC(3')), 3.96 (d, 1H,  $^3J = 2.2$  Hz, HC(4')), 3.89 (dd, 1H,  $^3J = 2.2$  Hz,  $^2J = 11.4$  Hz,  $H_a\text{C}(5')$ ), 3.76 (dd, 1H,  $^3J = 2.2$  Hz,  $^2J = 11.4$  Hz,  $H_b\text{C}(5')$ ), 3.59 (t, 2H,  $^3J = 6.1$  Hz,  $H_2\text{C-O-Bn}$ ), 2.50 (t, 2H,  $^3J = 7.1$  Hz,  $H_2\text{C-C}\equiv\text{C}$ ), 2.30 (ddd, 1H,  $^3J = 2.6$  Hz,  $^3J = 5.8$  Hz,  $^2J = 13.1$  Hz,  $H_a\text{C}(2')$ ), 2.12 (ddd, 1H,  $^3J = 6.0$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz,  $^2J = 13.3$  Hz,  $H_a\text{C}(2')$ ), 1.87 (dt, 2H,  $^3J = 6.1$  Hz,  $^3J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 0.92 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.89 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.13 (s, 3H,  $H_3\text{C-TBDMS}$ ), 0.12 (s, 3H,  $H_3\text{C-TBDMS}$ ), 0.08 (s, 3H,  $H_3\text{C-TBDMS}$ ), 0.07 ppm (s, 3H,  $H_3\text{C-TBDMS}$ );  **$^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta = 161.4$ , 149.0, 141.6, 140.4, 128.2, 127.7 (2C), 126.1 (2C), 122.5 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 274$  Hz), 100.6, 94.2, 88.3, 85.6, 72.4, 72.1, 69.1, 63.0, 41.9 (2C), 28.6, 26.0 (3C), 25.7 (3C), 18.4, 18.0, 16.5, -4.6, -4.8, -5.4, -5.5 ppm; **HRMS (ESI $^+$ )**:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_6\text{Si}_2\text{Na}_1$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  : 759.3197; gefunden 759.3206.

**1-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-5-{5-[4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-pent-1ynyl}-1H-pyrimidin-2,4-dion (112)**

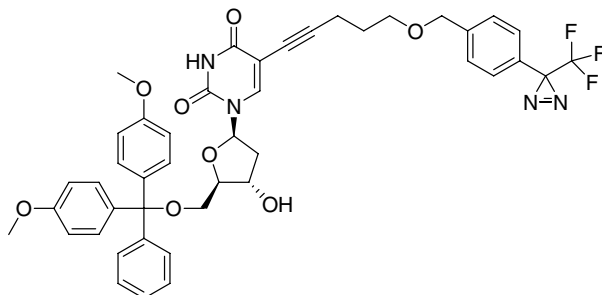


**111** (530 mg, 0.72 mmol) wurde in 1 M Tetrabutylammoniumfluorid in THF (20 mL) aufgenommen und bei Raumtemperatur 3 h gerührt (DC-Kontrolle). Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der ölige Rückstand wurde in Diethylether (30 mL) aufgenommen und sukzessive einmal mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg., zweimal mit Wasser und einmal mit *Brine* gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Man erhielt **112** (315 mg, 86 %) als leicht orangefarbenes Öl.

$R_f = 0.21$  (Chloroform/Methanol 10:1)

**IR (ATR)** :  $\tilde{\nu} = 3403$  br, 3058 w, 2961 m, 2928 w, 2859 w, 2090 w, 1681 vs, 1625 m, 1519 m, 1461 m, 1344 m, 1320 w, 1278 m, 1259 s, 1231 m, 1180 m, 1149 s, 1078 vs, 1050 vs, 956 w, 937 s, 869 w, 799 vs, 733 m, 662 w  $\text{cm}^{-1}$ ;  **$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta = 7.85$  (s, 1H, HC(6)), 7.37 (d, 2H,  $^3J = 8.2$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 7.17 (d, 2H,  $^3J = 8.1$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 6.18 (t, 1H,  $^3J = 6.6$  Hz, HC(1')), 4.57 (m, 1H, HC(3')), 4.52 (s, 2H,  $H_2\text{C-Bn}$ ), 4.02 (m, 1H, HC(4')), 3.92 (dd, 1H,  $^3J = 2.9$  Hz,  $^2J = 11.7$  Hz,  $H_a\text{C}(5')$ ), 3.82 (dd, 1H,  $^3J = 2.8$  Hz,  $^2J = 11.7$  Hz,  $H_b\text{C}(5')$ ), 3.60 (t, 2H,  $^3J = 6.1$  Hz,  $H_2\text{C-O-Bn}$ ), 2.51 (t, 2H,  $^3J = 7.1$  Hz,  $H_2\text{C-C}\equiv\text{C}$ ), 2.35 (m, 2H, HC(2')), 1.87 (qi, 2H,  $^3J = 6.6$  Hz,  $H_2\text{C}$ ) ppm;  **$^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta = 161.5, 149.3, 142.9, 140.5, 128.5, 128.0$  (2C), 126.8 (2C), 122.4 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 273$  Hz), 101.0, 94.5, 87.2, 87.0, 72.3, 71.6, 69.2, 62.4, 40.9, 20.8, 18.2, 16.6, 14.2 ppm; **HRMS (ESI)**:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}^{35}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_6$  [ $\text{M} + \text{Cl}$ ] $^-$ : 543.1258; gefunden 543.1264.

**1-[4-(Hydroxy-5-(4',4''-dimethoxytrityl)oxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-5-{5-[4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-pent-1-ynyl]-1H-pyrimidin-2,4-dion**  
(113)

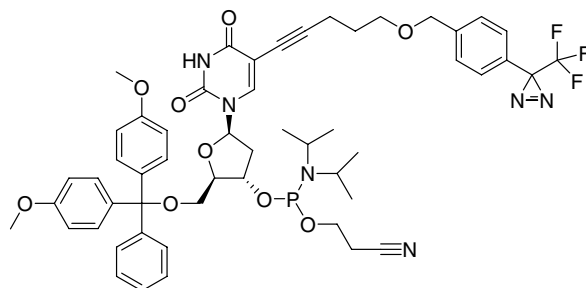


**112** (315 mg, 0.61 mmol) wurde in trockenem Pyridin (2.0 mL) gelöst und Molsieb 4Å zugegeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (252 mg, 0.73 mmol, 1.20 eq) zugegeben und weitere 2 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol (300 µL) gestoppt. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol/Pyridin 50:1:0.1). Man erhielt **113** (248 mg, 51 %) als weißen kompakten Schaum.

$R_f = 0.46$  (Chloroform/Methanol 10:1)

**IR (ATR)** :  $\tilde{\nu} = 3467$  w, 3181 w, 3066 w, 2954 m, 2930 m, 2869 w, 2837 w, 2084 w, 1688 vs, 1607 s, 1592 m, 1507 s, 1439 m, 1404 w, 1343 m, 1278 m, 1247 s, 1175 vs, 1150 vs, 1097 s, 1052 m, 1031 s, 1002 w, 988 w, 937 s, 914 w, 872 w, 825 m, 810 m, 791 w, 772 w, 752 m, 726 w, 701 vs, 657 w  $\text{cm}^{-1}$ ;  **$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta = 8.94$  (s, 1 H, HN), 8.01 (s, 1H, HC(6)), 7.43 (d, 2H,  $^3J = 7.4$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 7.34-7.32 (m, 4 H,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 7.30-7.28 (m, 4 H,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 7.20-7.17 (m, 1H,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 7.14 (d, 2H,  $^3J = 8.1$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 6.83 (d, 4H,  $^3J = 8.8$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 6.32 (dd, 1H,  $^3J = 6.0$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz, HC(1')), 4.51 (m, 1 H, HC(3')), 4.37 (s, 2 H,  $H_2\text{C-Bn}$ ), 4.07 (m, 1 H, HC(4')), 3.76 (s, 3 H,  $H_3\text{CO-DMT}$ ), 3.75 (s, 3 H,  $H_3\text{CO-DMT}$ ), 3.41 (dd, 1H,  $^3J = 3.0$  Hz,  $^2J = 10.7$  Hz,  $H_a\text{C}(5')$ ), 3.37 (t, 2H,  $^3J = 6.1$  Hz,  $H_2\text{C-O-Bn}$ ), 3.32 (dd, 1H,  $^3J = 3.5$  Hz,  $^2J = 10.7$  Hz,  $H_b\text{C}(5')$ ), 2.48 (ddd, 1H,  $^3J = 2.5$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz,  $^2J = 13.5$  Hz,  $H_a\text{C}(2')$ ), 2.29-2.21 (m, 3 H,  $H_b\text{C}(2')$ , C $\equiv$ C- $H_2\text{C-CH}_2$ -), 1.55 (qi, 2 H,  $^3J = 6.6$  Hz, C $\equiv$ C- $\text{CH}_2\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-O-}$ );  **$^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta = 161.7$ , 158.5, 149.2, 144.4, 141.5, 140.4, 135.4, 129.9 (2C), 128.0 (2C), 127.9 (2C), 127.8, 127.6 (4C), 126.9 (2C), 126.4 (2C), 123.0 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 273.1$  Hz), 113.2 (4C), 100.9, 94.4, 86.9, 86.4, 85.5, 72.3, 71.8, 71.0, 69.0, 68.1, 63.4, 55.1 (2C), 41.4, 38.7, 29.6, 28.3, 16.3; **HRMS (ESI $^+$ )**:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{41}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_8^{23}\text{Na}_1$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  : 833.2774; gefunden 833.2773.

**1-[4-( $\beta$ -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminophosphanoxy)-5-(4',4''-dimethoxytri-  
tyl)oxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl]-5-[5-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl)-  
benzyloxy]-pent-1-ynyl]-1*H*-pyrimidin-2,4-dion (99)**



**113** (200 mg, 0.25 mmol) wurde in abs. Dichlormethan (1.5 mL) gelöst und dreimal entgast. Es wurde Diisopropylammoniumtetrazolat (22 mg, 0.13 mmol, 0.50 eq) und  $\beta$ -Cyanoethyl-tetraisopropylphosphordiamidit (119  $\mu$ L, 0.38 mmol, 1.50 eq) zugegeben und bei Raumtemperatur 4 h unter Argon gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (deaktiviertes Kieselgel-60, Dichlormethan/Methanol/Pyridin 75:1:0.1). **99** konnte als leicht gelblicher Film erhalten werden (240 mg, 84 %).

$R_f = 0.42$  (Chloroform/Methanol 20:1)

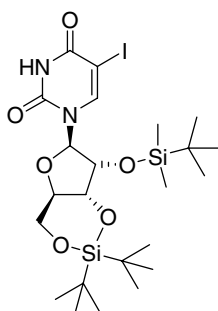
**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3189$  w, 3065 w, 2966 m, 2931 m, 2871 w, 1693 vs, 1608 s, 1583 w, 1508 s, 1456 s, 1398 w, 1364 m, 1344 m, 1278 s, 1247 vs, 1177 vs, 1153 s, 1106 m, 1077 m, 1031 s, 975 s, 937 m, 914 w, 896 w, 879 w, 826 m, 809 m, 791 m, 772 w, 754 m, 726 m, 700 m, 641 w  $\text{cm}^{-1}$ ;  **$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 8.94$  (s, 1 H, HN), 8.05 (s, 0.5 H, HC(6)), 8.01 (s, 0.5 H, HC(6)), 7.43 (d, 2H,  $^3J = 7.8$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 7.34-7.32 (m, 4 H,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 7.30-7.28 (m, 4 H,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 7.20-7.17 (m, 1H,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 7.14 (d, 2H,  $^3J = 7.8$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 6.83 (d, 4H,  $^3J = 7.8$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 6.32-6.28 (m, 1 H, HC(1')), 4.58 (m, 1 H, HC(3')), 4.37 (s, 1 H,  $H_2\text{C-Bn}$ ), 4.35 (s, 1 H,  $H_2\text{C-Bn}$ ), 4.20-4.14 (m, 1 H, HC(4')), 3.76 (s, 6 H,  $2 \times H_3\text{CO-DMT}$ ), 3.66-3.49 (m, 4 H,  $H_2\text{C-O-P}$ ,  $2 \times \text{HC-N-P}$ ), 3.43 (dd, 1H,  $^3J = 2.5$  Hz,  $^2J = 10.7$  Hz,  $H_a\text{C}(5')$ ), 3.34 (m, 2H,  $^3J = 6.1$  Hz,  $H_2\text{C-O-Bn}$ ), 3.29 (dd, 1H,  $^3J = 3.5$  Hz,  $^2J = 10.7$  Hz,  $H_b\text{C}(5')$ ), 2.61 (t, 1 H,  $^3J = 6.3$  Hz,  $H_2\text{C-CN}$ ), 2.58-2.51 (m, 1 H,  $H_a\text{C}(2')$ ), 2.44-2.42 (dt, 1 H,  $^3J = 6.4$  Hz,  $^2J = 1.1$  Hz,  $H_2\text{C-CN}$ ), 2.20 (m, 2 H,  $\text{C}\equiv\text{C-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$ ), 1.52-1.47 (m, 2 H,  $\text{C}\equiv\text{C-CH}_2\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-O-}$ ), 1.28-1.06 (m, 12 H,  $4 \times H_3\text{C-CH-N-P}$ ;  **$^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 161.8$ , 158.8, 149.3, 144.3, 141.8, 140.7, 135.8, 130.2 (2C), 129.1 (2C), 128.2 (2C), 127.9 (2C), 127.1 (2C), 126.7 (4C), 124.0, 121.9 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 273.3$  Hz), 113.5 (4C), 101.2, 94.7, 87.2, 86.3, 85.8, 72.1, 71.3, 68.4, 69.3, 63.3, 58.5, 55.4 (2C), 45.6, 43.5, 40.8, 39.0, 30.6, 28.9 (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 30.1$  Hz), 28.5, 24.8,



23.2, 20.4, 16.5, 14.3, 11.2 ppm;  $^{31}\text{P}$  NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 149.9, 149.5$ ; HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{53}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_9\text{P}_1$   $[\text{M} - \text{H}]^-$ : 1009.3882; gefunden 1009.3916.

## 5.4 Synthese des RNA-Diazirinbausteins 100

1-[2,2-Di-*tert*-butyl-7-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxy)-tetrahydro-furo[3,2-*d*][1,3,2]dioxasilin-6-yl]-5-iodo-1*H*-pyrimidin-2,4-dion (115)



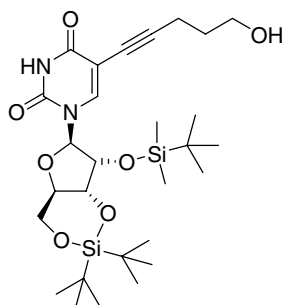
Zu einer Lösung von 5-Ioduridin **114** (1.000 g, 2.82 mmol) in trockenem DMF (5.2 mL) wurde bei 0 °C Di-*tert*-Butyl-silyl-bis-trifluormethansulfonat (966  $\mu\text{L}$ , 3.11 mmol, 1.10 eq) über 15 min zugetropft. Es wurde 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Imidazol (919 mg, 14.10 mmol, 5.00 eq) zugesetzt, 5 min bei 0 °C und 25 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde *tert*-Butyl-dimethylsilylchlorid (488 mg, 3.38 mmol, 1.20 eq) zugegeben und 2 h bei 60 °C gerührt. Es wurde mit Diethylether (30 mL) verdünnt, einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlsg. und einmal mit *Brine* gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Kieselgel-60, Chloroform/Methanol 50:1) lieferte das Produkt als weißen Schaum (1.560 g, 88 %).

$R_f = 0.39$  (Chloroform/Methanol 20:1)

IR (ATR):  $\tilde{\nu} = 3128 \text{ w}, 3067 \text{ w}, 2932 \text{ m}, 2858 \text{ m}, 1718 \text{ s}, 1690 \text{ vs}, 1607 \text{ m}, 1471 \text{ m}, 1439 \text{ m}, 1388 \text{ w}, 1363 \text{ w}, 1321 \text{ w}, 1258 \text{ m}, 1204 \text{ w}, 1168 \text{ m}, 1152 \text{ w}, 1143 \text{ m}, 1114 \text{ m}, 1056 \text{ s}, 998 \text{ m}, 983 \text{ m}, 902 \text{ m}, 826 \text{ vs}, 778 \text{ s}, 751 \text{ s}, 719 \text{ w}, 683 \text{ m cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.40$  (s, 1H, HN), 7.65 (s, 1H, HC(6)), 5.64 (s, 1H, HC(1')), 4.32 (dd, 1H,  $^3J = 5.1 \text{ Hz}, ^2J = 9.2 \text{ Hz}, H_a\text{C}(5')$ ), 4.27 (d, 1H,  $^3J = 4.6 \text{ Hz}, \text{HC}(2')$ ), 4.16 (m, 1H, HC(4')), 3.98 (dd, 1H,  $^2J = 9.3 \text{ Hz}, ^3J = 10.5 \text{ Hz}, H_b\text{C}(5')$ ),

3.85 (dd, 1H,  $^3J = 4.6$  Hz,  $^3J = 9.6$  Hz, HC(3')), 1.07 (s, 9H, (tBu)<sub>2</sub>-Si-O), 1.03 (s, 9H, (tBu)<sub>2</sub>-Si-O), 0.94 (s, 9H, tBu-TBDMS), 0.18 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-TBDMS), 0.15 ppm (s, 3H, H<sub>3</sub>C-TBDMS); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 159.2, 148.9, 143.7, 112.4, 93.8, 88.6, 75.2, 67.8, 67.4, 27.3 (3C), 26.8 (3C), 26.6 (3C), 22.6, 20.1, 18.0, -4.5, -5.3 ppm; HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub><sup>127</sup>I<sub>1</sub> [M + H]<sup>+</sup> : 625.1626; gefunden 625.1624.

**1-[2,2-Di-*tert*-butyl-7-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxy)-tetrahydro-furo[3,2-*d*][1,3,2]dioxasilin-6-yl]-5-(5-hydroxy-pent-1-ynyl)-1*H*-pyrimidin-2,4-dion (116)**



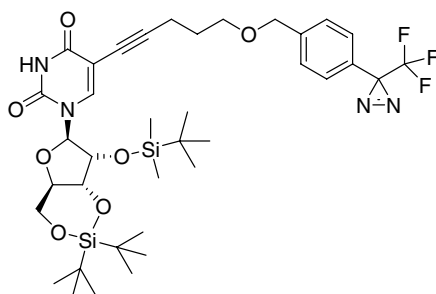
**115** (1.000 g, 1.60 mmol) wurde in DMF (1.5 mL) gelöst und dreimal entgast. Anschließend wurden in der angegebenen Reihenfolge PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (225 mg, 0.32 mmol, 0.20 eq), Hünig-Basis (557 µL, 3.2 mmol, 2.00 eq), 4-Pentin-1-ol (446 µL, 4.8 mmol, 3.00 eq) und Kupfer(I)-iodid (122 mg, 0.64 mmol, 0.40 eq) zugegeben. Die Mischung wurde 5 h unter Lichtausschluss gerührt. Es wurde mit Diethylether (30 mL) verdünnt, je einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlg. und zweimal mit *Brine* gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das braune Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Dichlormethan/Methanol 100:1 → 20:1). Es konnte **116** (500 mg, 55%) als gelblicher Film isoliert werden.

*R<sub>f</sub>* = 0.35 (Chloroform/Methanol 10:1)

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3125 w, 3065 w, 2932 m, 2886 w, 2858 m, 1712 s, 1688 vs, 1620 w, 1575 w, 1467 m, 1461 m, 1386 m, 1363 w, 1320 w, 1273 m, 1252 m, 1203 w, 1169 m, 1154 m, 1117 m, 1054 s, 1000 s, 953 w, 938 w, 901 m, 828 vs, 778 s, 750 s, 712 w, 691 w, 670 w cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.31 (s, 1H, HN), 7.14 (s, 1H, HC(6)), 5.54 (s, 1H, HC(1')), 4.39 (dd, 1H,  $^3J = 5.2$  Hz,  $^2J = 9.3$  Hz, H<sub>a</sub>C(5')), 4.15 (d, 1H,  $^3J = 4.8$  Hz, HC(2')), 4.04 (ddd, 1H,  $^3J = 5.2$  Hz,  $^3J = 10.2$  Hz,  $^3J = 10.1$  Hz, HC(4')), 3.88 (dd, 1H,  $^2J = 9.6$  Hz,  $^3J = 10.2$  Hz, H<sub>b</sub>C(5')), 3.74 (dd, 1H,  $^3J = 4.8$  Hz,  $^3J = 9.7$  Hz, HC(3')), 3.68 (t, 2H,  $^3J = 5.9$  Hz, H<sub>2</sub>C-OH), 2.42 (t, 2H,  $^3J = 6.9$  Hz, H<sub>2</sub>C-C≡C), 1.72 (qi,

$2H$ ,  $^3J = 6.0$  Hz,  $H_2C-C\equiv C$ ), 0.95 (s, 9H,  $(tBu)_2$ -Si-O), 0.91 (s, 9H,  $(tBu)_2$ -Si-O), 0.81 (s, 9H,  $tBu$ -TBDMS), 0.05 (s, 3H,  $H_3C$ -TBDMS), 0.02 ppm (s, 3H,  $H_3C$ -TBDMS);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 161.4, 148.5, 140.8, 100.7, 99.6, 95.1, 94.1, 76.0, 75.3, 74.6, 67.5, 61.6, 31.0, 27.5$  (3C), 27.0 (3C), 25.8 (3C), 22.8, 20.4, 18.2, 16.3, -4.3, -5.1 ppm; HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $C_{28}H_{49}N_2O_7Si_2$  [M + H]<sup>+</sup> : 581.3078; gefunden 581.3082.

**1-[2,2-Di-*tert*-butyl-7-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxy)-tetrahydro-furo[3,2-*d*][1,3,2]dioxasilin-6-yl]-5-{5-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-pent-1-ynyl}-1*H*-pyrimidin-2,4-dion (117)**



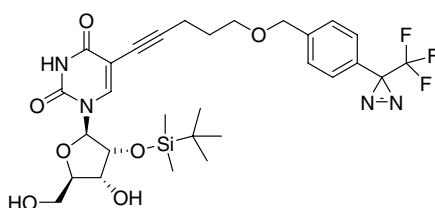
Zu einer Lösung von **116** (250 mg, 0.43 mmol) in abs. THF (1 mL) wurde Natriumhydrid (50 mg, 60% Suspension in Öl, 1.25 mmol, 2.90 eq) zugegeben. Nach Abklingen der Gasentwicklung (20 min) wurde X (168 mg, 0.52 mmol, 1.20 eq) zugesetzt und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Es wurde durch Zugabe von ges. Ammoniumchloridlg. (1 mL) gequencht, mit Diethylether (20 mL) verdünnt und mit *Brine* gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Konzentration *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel-60, Dichlormethan/Methanol 70:1). Man erhielt **117** (199 mg, 60 %) als gelblichen Schaum.

$R_f = 0.29$  (Chloroform/Methanol 30:1)

**IR (ATR)** :  $\tilde{\nu} = 3194$  w, 3063 w, 2934 m, 2869 m, 2080 w, 1689 vs, 1619 m, 1519 w, 1471 m, 1462 m, 1388 w, 1364 w, 1344 m, 1321 w, 1271 m, 1254 m, 1231 w, 1183 s, 1153 s, 1109 m, 1055 s, 1000 m, 938 s, 900 w, 833 vs, 810 m, 779 m, 753 s, 691 w;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.17$  (s, 1H,  $HC(6)$ ), 7.37 (d, 2H,  $^3J = 7.1$  Hz,  $H_{arom}$  C), 7.17 (d, 2H,  $^3J = 8.0$  Hz,  $H_{arom}$  C), 5.65 (s, 1H,  $HC(1')$ ), 4.52 (m, 3H,  $H_2C$ -Bn und  $H_aC(5')$ ), 4.27 (d, 1H,  $^3J = 4.6$  Hz,  $HC(2')$ ), 4.16 (dt, 1H,  $^3J = 5.3$  Hz,  $^3J = 10.1$  Hz,  $HC(4')$ ), 3.99 (t, 1H,  $^3J = 10.0$  Hz,  $H_bC(5')$ ), 3.89 (dd, 1H,  $^3J = 4.6$  Hz,  $^3J = 9.5$  Hz,  $HC(3')$ ), 3.60 (t, 2H,  $^3J = 5.9$  Hz,  $H_2C$ -O-Bn), 2.54 (t, 2H,  $^3J = 7.0$  Hz,  $H_2C-C\equiv C$ ), 1.89

(qi, 2H,  $^3J = 6.6$  Hz,  $H_2C-H_2C-C\equiv C$ ), 1.06 (s, 9H,  $(tBu)_2-Si-O$ ), 1.03 (s, 9H,  $(tBu)_2-Si-O$ ), 0.93 (s, 9H,  $tBu-TBDMS$ ), 0.17 (s, 3H,  $H_3C-TBDMS$ ), 0.14 ppm (s, 3H,  $H_3C-TBDMS$ );  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 161.1, 148.4, 140.9, 140.3, 128.3, 127.8$  (2C), 126.5 (2C), 125.8, 122.3 (q,  $^1J_{C-F} = 273$  Hz), 100.8, 94.7, 94.0, 76.0, 75.3, 74.6, 72.2, 69.0, 67.5, 30.3, 29.7, 28.6, 27.5 (3C), 27.0 (3C), 25.8 (3C), 22.8, 18.2, 16.5, -4.3, -5.1 ppm; HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $C_{37}H_{53}F_3N_4O_7Si_2Na_1$   $[M + Na]^+$  : 801.3302; gefunden 801.3310.

**1-[3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl]-5-{5-[4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-pent-1-ynyl}-1H-pyrimidin-2,4-dion (118)**



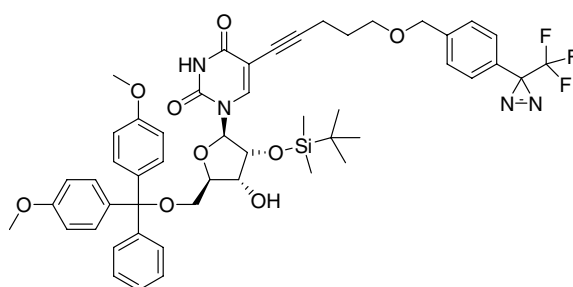
**117** (344 mg, 0.44 mmol) wurde in trockenem Dichlormethan (2.2 mL) gelöst. Bei 0 °C wurden sukzessive Pyridin (276  $\mu$ L) und HF·Pyridin-Komplex (44.2  $\mu$ L) zugegeben. Die gelbe Lösung wurde bei 0 °C für 75 min gerührt. Anschließend wurde zum Quenchen des überschüssigen HF Methoxytrimethylsilan (250  $\mu$ L) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Man erhielt **118** (280 mg, ~quant.) in Form eines gelblichen Feststoffs, welcher ohne weitere Aufreinigung in die Synthese von Verbindung **119** eingesetzt wurde.

$R_f = 0.39$  (Chloroform/Methanol 10:1)

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3465$  m, 3194 w, 3064 w, 2953 m, 2929 m, 2860 w, 2084 w, 1916 w, 1765 w, 1687 vs, 1636 s, 1591 m, 1575 m, 1519 w, 1508 w, 1445 m, 1403 w, 1365 w, 1341 s, 1275 m, 1253 s, 1231 s, 1182 s, 1150 vs, 1114 vs, 1052 s, 1019 m, 1004 m, 959 w, 937 s, 917 w, 837 s, 805 vs, 780 s, 752 m, 734 m, 703 w, 671 w, 652 w  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.37$  (s, 1H, HN), 7.83 (s, 1H, HC(6)), 7.37 (d, 2H,  $^3J = 8.1$  Hz,  $H_{arom}$  C), 7.17 (d, 2H,  $^3J = 7.9$  Hz,  $H_{arom}$  C), 5.62 (d, 1H,  $^3J = 4.7$  Hz, HC(1')), 4.52 (m, 3H,  $H_2C-Bn$  und HC(2')), 4.20 (m, 1H, HC(3')), 4.13 (m, 1H, HC(4')), 3.97 (d, 1H,  $^2J = 11.6$  Hz,  $^3J = 2.1$  Hz,  $H_a$  C(5')), 3.80 (dd, 1H,  $^2J = 12.0$  Hz,  $^3J = 1.7$  Hz,  $H_b$  C(5')), 3.60 (t, 2H,  $^3J = 6.1$  Hz,  $H_2C-O-Bn$ ), 2.52 (t, 2H,  $^3J = 7.0$  Hz,  $H_2C-C\equiv C$ ), 1.88 (qi, 2H,  $^3J = 6.6$  Hz,  $H_2C-H_2C-C\equiv C$ ), 0.91 (s, 9H,  $tBu-TBDMS$ ), 0.10 (s, 3H,  $H_3C-TBDMS$ ), 0.09 ppm (s,

3H,  $H_3C$ -TBDMS);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 161.1, 149.1, 143.6, 140.3, 128.3, 127.8 (2C), 126.6 (2C), 124.6, 122.1 (q,  $^1J_{C-F}$  = 275 Hz), 99.6, 94.6, 92.5, 85.4, 74.6, 72.1, 71.2, 70.6, 69.1, 62.0, 28.5, 25.6 (3C), 18.0, 16.5, 1.0, -4.8 ppm; HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  berechnet für  $C_{29}H_{37}F_3N_4O_7Si_1^{23}Na_1$  [M + Na]<sup>+</sup> : 661.2281; gefunden 661.2279.

**1-[3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-4-hydroxy-5(4',4''-dimethoxytrityl)oxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl]-5-{5-[4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-pent-1-ynyl}-1H-pyrimidin-2,4-dion (119)**



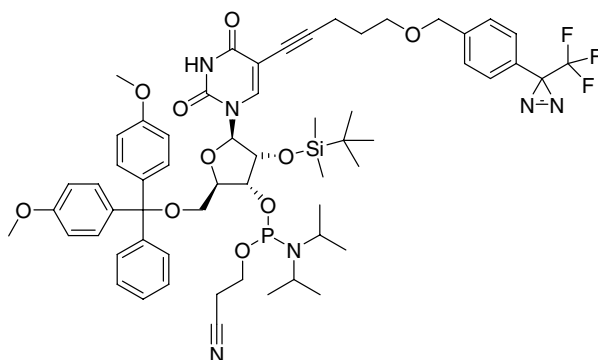
Unter Argon wurde **118** (280 mg, 0.44 mmol) in abs. Pyridin (1 mL) gelöst und über Molsieb 4Å für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (177 mg, 0.53 mmol, 1.20 eq) zugegeben und weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol (300  $\mu$ L) gestoppt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol/Pyridin 50:1:0.1). Man erhielt das Produkt als zähen, gelben Schaum (290 mg, 70 %).

$R_f$  = 0.62 (Chloroform/Methanol 10:1)

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3175 w, 3069 w, 2930 m, 2857 m, 2284 w, 1694 vs, 1608 m, 1583 w, 1508 s, 1456 m, 1362 w, 1344 w, 1277 w, 1249 vs, 1177 vs, 1152 vs, 1116 m, 1091 m, 1034 m, 989 w, 937 m, 913 w, 833 vs, 779 s, 754 m, 725 w, 695 w, 673 w, 663 w, 630 m  $cm^{-1}$ ;  **$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  = 10.26 (s, 1H, HN), 8.08 (s, 1H, HC(6)), 7.42 (d, 2H,  $^3J$  = 7.9 Hz,  $H_{arom}$  C), 7.32 (m, 4H,  $H_{arom}$ -DMT), 7.24 (m, 5H,  $H_{arom}$  C), 6.80 (dd, 4H,  $^3J$  = 8.9 Hz,  $^4J$  = 1.8 Hz,  $H_{arom}$ -DMT), 6.01 (d, 1H,  $^3J$  = 5.4 Hz, HC(1')), 4.31 (s, 2H,  $H_2$ C-Bn), 4.21 (m, 1H, HC(2')), 4.13 (m, 1H, HC(4')), 3.74-3.68 (m, 7H, HC(3')), 2  $\times$   $H_3CO$ -DMT), 3.46 (d, 1H,  $^2J$  = 11.1 Hz,  $^3J$  = 2.0 Hz,  $H_a$ C(5')), 3.31 (dd, 1H,  $^2J$  = 11.1 Hz,  $^3J$  = 2.0 Hz,  $H_b$ C(5')), 3.28 (t, 2H,  $^3J$  = 6.1 Hz,  $H_2$ C-O-Bn), 2.01 (m, 2H,  $H_2$ C-C $\equiv$ C), 1.41 (qi, 2H,  $^3J$  = 6.6 Hz,  $H_2$ C-H $_2$ C-C $\equiv$ C), 0.87 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.09 (s, 3H,  $H_3$ C-TBDMS), 0.08 ppm (s, 3H,  $H_3$ C-TBDMS);  **$^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  = 162.0, 158.5, 149.6, 149.4, 144.4,

141.2, 140.4, 136.0, 135.3, 135.2, 129.9 (2C), 127.9, 127.7, 127.5 (4C), 127.0, 126.3 (2C), 123.7 (2C), 122.2 (q,  $^1J_{C-F} = 273.4$  Hz), 113.2 (4C), 101.2, 94.4, 88.0, 87.1, 83.9, 76.3, 71.7, 71.3, 70.9, 68.9, 63.0, 55.1, 55.0, 28.4 (q,  $^2J_{C-F} = 30.1$  Hz), 28.1, 25.5 (3C), 17.9, 16.2, -4.9, -5.3 ppm; HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $C_{50}H_{54}F_3N_4O_9^{28}Si_1$  [M - H]<sup>-</sup>: 939.3618; gefunden 939.3639.

**1-[3-(*tert*-Bu-dimethyl-silyloxy)-4-( $\beta$ -cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphanoxy)-5-(4',4''-dimethoxytrityl)oxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl]-5-[5-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl)-benzyloxy]-pent-1-ynyl]-1*H*-pyrimidin-2,4-dion(100)**



**119** (100 mg, 0.11 mmol) wurde in trockenem THF (1 mL) gelöst und Hünig-Basis (73  $\mu$ L, 0.43 mmol, 4.00 eq.) zugegeben. Die gelbe Lösung wurde dreimal entgast. Es wurde  $\beta$ -Cyanoethyl-diisopropylamino-chlorophosphin (40  $\mu$ L, 0.18 mmol, 1.70 eq) mit einer Eppendorf-Pipette zugegeben und unter Lichtausschluss 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (deaktiviertes Kieselgel-60, Dichlormethan/Methanol/Pyridin 45:1:0.1). **100** (110 mg, 91 %) wurde als weißer Schaum erhalten.

$R_f = 0.32$  (Chloroform/Methanol 25:1)

**IR(ATR):**  $\tilde{\nu} = 3067$  w, 2930 m, 2858 m, 1694 vs, 1608 s, 1583 w, 1508 s, 1447, m, 1393 w, 1363 w, 1344 w, 1278 w, 1249 vs, 1177 vs, 1151 vs, 1119 m, 1092 m, 1034 s, 980 m, 937 s, 859 m, 831 vs, 810 s, 778 s, 753 m, 726 m, 674 m, 633 w  $\text{cm}^{-1}$ ;  **$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 8.26$  (s, 1H, HN), 8.10 (s, 1H, HC(6)), 7.46-7.27 (m, 10H,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 7.20-7.12 (m, 3H,  $H_{\text{arom}}\text{C}$ ), 6.82 (ddd, 4H,  $^3J = 8.9$  Hz,  $^4J = 4.3$  Hz,  $^3J = 3.0$  Hz,  $H_{\text{arom}}\text{-DMT}$ ), 5.99 (t, 1H,  $^3J = 5.9$  Hz, HC(1')), 4.48 (m, 1H, HC(2')), 4.34 (s, 2H,  $H_2$ ), 4.22 (m, 1H, HC(3')), 4.15 (m, 1H, HC(4')), 3.75 (s, 3H,  $H_3\text{CO-DMT}$ ), 3.74 (s, 3H,  $H_3\text{CO-DMT}$ ), 3.56 (m, 2H,  $H_2\text{C-O-P}$ ), 3.47 (dt, 1H,  $^3J = 2.9$  Hz,  $^2J = 11.4$  Hz,  $H_a\text{C}(5')$ ), 3.30 (m, 2H,  $H_2\text{C-O-Bn}$ ), 3.24 (m, 1H,  $H_b\text{C}(5')$ ), 2.68 (m, 1H, HC-N-P), 2.30 (m, 1H, HC-N-P),

2.10 (m, 2H,  $H_2C-C\equiv C$ ), 1.41 (m, 2H,  $H_2C-CH_2-C\equiv C$ ), 1.35-0.93 (m, 14H,  $4\times H_3C-CH-N-P$ ,  $H_2C-CN$ ), 0.90 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.11 (s, 3H,  $H_3C-TBDMS$ ), 0.06 ppm (s, 3H,  $H_3C-TBDMS$ );  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 161.5, 158.8, 149.4, 144.6, 141.8, 140.7, 135.6, 132.7, 131.1, 130.2 (4C), 127.9, 127.7, 127.5 (4C), 127.0, 126.3 (2C), 123.7 (2C), 117.9 (*q*,  $^1J_{C-F}$  = 273.2 Hz), 113.6 (4C), 101.6, 95.0, 88.3, 87.5, 84.3, 76.5, 72.1, 69.3, 68.4, 63.4, 55.4 (2C), 43.6, 39.0, 30.6, 29.1, 28.4, 28.2 (*q*,  $^2J_{C-F}$  = 30.3 Hz), 25.8 (3C), 24.9, 24.0, 23.2, 18.2, 16.5, 14.2, 11.2, -4.6, -5.0 ppm;  $^{31}P$  NMR (81 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 152.03, 149.98; HRMS (ESI): *m/z* berechnet für  $C_{59}H_{73}F_3N_6O_{10}^{28}Si_1P_1$  [ $M + H$ ] $^+$ : 1141.4847; gefunden 1141.4846.

## 5.5 Synthese und Aufreinigung der Oligonukleotide

### 5.5.1 Synthese der flavin- und bromnukleosidhaltenden DNA–Haarnadeln

Für die Kupplung unmodifizierter Nukleotide wurden die vom Gerätehersteller vorgeschlagenen Standardprotokolle verwendet. Für *Deblocking*, *Capping* und Oxidation wurden die folgenden Lösungen genutzt:

*Deblocking*: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan

*Capping* A: 0.53 M Phenoxyessigsäureanhydrid + 11.1 % 2,6-Lutidin in Acetonitril

*Capping* B: 16 % *N*-Methylimidazol in Acetonitril

Oxidation: 0.015 M Iod in 2,6-Lutidin/Acetonitril/Wasser 0.6: 6.5: 3

Für die Oligonukleotidsynthese wurden CPG-gefüllte Kartuschen verwendet (Ansatzgröße 1  $\mu$ mol), wobei das Trägermaterial im Allgemeinen bereits mit einer Base beladen war. Als Aktivator für die Phosphoramiditkupplungen diente eine 0.25 M Lösung von 5-Benzylthio-tetrazol (BTT) in Acetonitril. Die Kupplungszeit für Standardbasen (Konzentration 0.1 M in Acetonitril) betrug 96 s, die Kupplungszeit für die 8-Br-dA- (**97**), 8-Br-dG- (**98**) und 5-Br-dU- (**54**) Bausteine wurde auf 10 min erhöht; die den Sonderbasen nachfolgenden Bausteine wurden je 5 min gekuppelt.

Für das Flavin **35** als *H*-Phosphonat wurde das in der Gruppe etablierte *H*-Phosphonatkupplungsprotokoll verwendet. Als Aktivatorreagenz wurde eine 0.15 M Lösung von Adamantylsäurechlorid bzw. Pivalinsäurechlorid in Acetonitril/Pyridin 1:1 eingesetzt, der Bau-

stein selbst lag als 0.13 M Lösung in Acetonitril/Pyridin 1:1 vor. Vor der Kupplung des Flavins wurde der CPG-Träger mit Acetonitril/Pyridin 1:1 gewaschen, die Kupplungszeit betrug 10 min, die dem Flavin nachfolgende Base wurde aufgrund des hohen sterischen Anspruchs des Flavins 5 min gekuppelt. Zusätzlich wurde die Oxidationszeit auf 10 min erhöht, da *H*-Phosphonate generell schwerer oxidierbar sind als Phosphoramidite.

Nach Abschluss der Synthese wurde die DMT-Gruppe am 5'-Terminus des endständigen Nukleotids entfernt und die Oligonukleotide zur vollständigen Oxidation des Flavinbausteins einem weiteren Oxidationsschritt unterworfen. Hierzu wurde der noch am Träger befindliche Strang zunächst 5 min mit 0.2 M Iod in *N*-Methylmorpholin/Wasser/Acetonitril 1:1:8 und anschließend weitere 5 min mit 0.2 M Iod in Triethylamin/Wasser/Acetonitril 1:1:8 behandelt.

### 5.5.2 Abspaltung und Aufreinigung der flavin- und bromnukleosidhaltenden Oligonukleotide

Nach Abschluss der Nachoxidation wurde die DNA im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden die Kartuschen vorsichtig geöffnet und ca. die Hälfte des CPG-Trägermaterials in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß (1.5 mL) überführt. Es wurden 1.2 mL einer Lösung von ges. Ammoniak in Wasser und Ethanol 3:1 zugegeben. Die Mischung wurde 16 h bei Raumtemperatur in einem Thermoschüttler der Fa. *Eppendorf* inkubiert. Die Flüssigkeit wurde *in vacuo* zur Trockne eingedampft, danach wurden ca. 250 µL Wasser zugegeben und erneut zur Trockne eingengt, um letzte Ammoniakreste zu beseitigen. Der Rückstand wurde in 700 µL Wasser aufgenommen, und das verbliebene CPG-Trägermaterial wurde über einen Spritzenfilter der Fa. *Macherey-Nagel* abfiltriert. Die so erhaltene Roh-DNA wurde nun zunächst per analytischer *reversed phase*-HPLC untersucht und anschließend HPL-chromatographisch aufgereinigt. Hierzu wurde sie sukzessive einer Trennung per *reversed Phase*-HPLC und Ionenaustauschchromatographie unterworfen. Die genauen Protokolle für die präparativen Trennungen lauteten wie folgt:

*reversed Phase*-HPLC: *Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleosil 100/7 C18*

Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser

Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser/80 % Acetonitril

Flussrate: 5 mL/min                      Gradient: 0 → 10 % B in 5 min

10 → 40 % B in 45 min

Ionenaustauschchromatographie: *Macherey-Nagel VA 50/7.7 Nucleogel SAX 1000-8*

Puffer A: 0.1 M NaCl / 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) in Wasser

Puffer B: 1.0 M NaCl / 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) in Wasser

Flussrate: 4 mL/min                      Gradient: 0 → 40 % B in 45 min



Die *reversed phase*-HPLC-Trennungen wurden bei 50 °C durchgeführt, da bei Raumtemperatur Artefakte durch unvollständige Denaturierung der Stränge aufgetreten waren. Bei der Ionenaustauschchromatographie war dies nicht nötig, da hier vollständige Denaturierung auftrat. Nach der Trennung per Ionenaustauschchromatographie mussten die Stränge entsalzt werden, um eine Analyse per MALDI-TOF-MS zu ermöglichen. Hierzu wurden *SepPak*<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>-Säulen der Fa. *Waters*, Abmessungen 9×10 mm, benutzt. Die Säulen wurden zunächst mit Acetonitril (5 mL) und Wasser (10 mL) gespült. Anschließend wurde die wässrige DNA-Lösung langsam aufgetragen und mit ca. 20 mL Wasser gewaschen. Die DNA wurde dann mit 5 mL Acetonitril/Wasser 1:1 von der Säule eluiert. Die Lösungen wurden mittels einer *Speed-Vac* bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in ca. 700 µL Wasser aufgenommen. Mit diesen Lösungen wurde dann zunächst die Konzentration bestimmt, das UV-Schmelzverhalten untersucht und per erneuter analytischer *reversed phase*-HPLC und MALDI-TOF-MS die Reinheit der betreffenden Oligonukleotide bestimmt.

Die erhaltenen DNA-Haarnadeln sind in der nachfolgenden Tabelle 15 nebst ihrer UV-Schmelzpunkte und ihrer berechneten und gefundenen Molekülmassen dargestellt:

Nr.	Sequenz	UV-Smp. [°C]	<i>m/z</i> ber. [M+H] <sup>+</sup>	<i>m/z</i> gef. [M+H] <sup>+</sup>
H1c	5´-CGCT <b>G</b> *TTTT <b>F</b> LAAAAACAGCG-3´	71.1	6039.3	6042.7
H2c	5´-CGCT <b>G</b> *TCTT <b>F</b> L AAGACAGCG-3´	74.8	6040.4	6041.5
H3c	5´-CGCT <b>G</b> *TCCT <b>F</b> L AAGACAGCG-3´	80.5	6041.4	6045.3
H4c	5´-CGCT <b>G</b> *CTTT <b>F</b> L A AAGCAGCG-3´	77.9	6040.4	6043.9
H5c	5´-CGCT <b>G</b> *CCTT <b>F</b> L A AAGGCAGCG-3´	79.3	6041.4	6043.1
H1b	5´-CGCT <b>A</b> *TTTT <b>F</b> LAAAAACAGCG-3´	66.4	6038.4	6036.8
H2b	5´-CGCT <b>A</b> *TCTT <b>F</b> L A AAGACAGCG-3´	70.1	6039.3	6041.3
H3b	5´-CGCT <b>A</b> *TCCT <b>F</b> L A AAGACAGCG-3´	76.3	6040.4	6042.7
H4b	5´-CGCT <b>A</b> *CTTT <b>F</b> L A A AAGCAGCG-3´	71.4	6039.3	6043.6
H5b	5´-CGCT <b>A</b> *CCTT <b>F</b> L A A AAGGCAGCG-3´	74.1	6040.4	6044.3
H1a	5´-CGCT <b>U</b> *TTTT <b>F</b> LAAAAACAGCG-3´	73.3	6023.3	6027.5
H2a	5´-CGCT <b>U</b> *TCTT <b>F</b> L A AAGACAGCG-3´	70.8	6024.4	6025.9
H3a	5´-CGCT <b>U</b> *TCCT <b>F</b> L A AAGACAGCG-3´	76.7	6025.3	6030.4
H4a	5´-CGCT <b>U</b> *CTTT <b>F</b> L A A AAGCAGCG-3´	73.7	6024.4	6028.2
H5a	5´-CGCT <b>U</b> *CCTT <b>F</b> L A A AAGGCAGCG-3´	77.2	6025.3	6030.1
H6b	5´-CGCT <b>A</b> *CCCC <b>F</b> L GGGGCAGCG-3´	72.4	6041.4	6041.8
H6a	5´-CGCT <b>U</b> *TTAT <b>F</b> L A T A A CAGCG-3´	74.4	6023.3	6025.8

**Tabelle 15 (umseitig).** Analytische Daten der synthetisierten flavin- und brompurin- bzw. brompyrimidinsubstituierten DNA-Haarnadeln. G\* = 8-Br-dG **98**, A\* = 8-Br-dA **97**, U\* = 5-Br-dU **54**, Fl = Flavinbaustein **35**.

### 5.5.3 Synthese und Reinigung der flavin- und oxetanenthaltenden DNA-Haarnadeln

Für die Synthese der Flavin-Oxetan-Haarnadeln wurden die gleichen Protokolle verwendet, die schon im vorangegangenen Kapitel 5.5.1 detailliert dargelegt wurden. Die Kupplungszeit des Oxetanphosphoramidits **77** betrug 10 min, die nachfolgende Base wurde 5 min gekuppelt, um dem hohen sterischen Anspruch des Oxetans Rechnung zu tragen. Zur Abspaltung vom CPG-Träger wurde auch hier ein Gemisch aus ges. Ammoniak (aq.) und Ethanol (3:1, 1 mL) verwendet, die gesamte Entschützungszeit betrug 24 h bei Raumtemperatur. Die weitere Behandlung der Stränge verlief weitgehend analog zur in Kapitel 5.5.2 beschriebenen Vorgehensweise. Zur Reinigung wurde eine Kombination aus *rp*-HPLC und Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Im Einzelnen wurden die folgenden Trennmethode verwendet:

reversed Phase-HPLC: Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleosil 100/7 C18

Puffer **A:** 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser

Puffer **B:** 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser / 80 % Acetonitril

Flussrate: 5 mL/min                      Gradient: 0 → 10 % B in 5 min

10 → 40 % B in 45 min

Ionenaustauschchromatographie: Macherey-Nagel VA 50/7.7 Nucleogel SAX 1000-8

Puffer **A:** 0.1 M NaCl / 0.01 M Tris·HCl (pH 7.4) in Wasser

Puffer **B:** 1.0 M NaCl / 0.01 M Tris·HCl (pH 7.4) in Wasser

Flussrate : 4 mL/min                      Gradient: 0 → 40 % B in 45 min

Nach Entsalzung und Aufkonzentrierung konnten die folgenden Oligonukleotide erhalten werden (Tabelle 16):

Nr.	Sequenz	UV- Smp. [°C]	<i>m/z</i> ber. [M-H] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> gef. [M-H] <sup>-</sup>
POx1	5′-CGCTOx*TTTFLAAACAGCG-3′	53.3	5535.1	5537.4
POx2	5′-CGCTOx*CCCFLGGGCAGCG-3′	65.1	5538.1	5542.7
POx3	5′-CGCTOx*TTTTFLAAAACAGCG-3′	56.1	6152.3	6155.4
POx4	5′-CGCTOx*CCCCFLGGGCAGCG-3′	69.6	6156.2	6159.9

**Tabelle 16.** Analytische Daten der synthetisierten flavin- und oxetanenthaltenden DNA-Haarnadeln POx1-4. Ox\* = Oxetanbaustein 77, Fl = Flavinbaustein 35.

#### 5.5.4 Synthese und Aufreinigung der diazirinenthaltenden Oligonukleotide

Für die Synthese der diazirinenthaltenden Oligonukleotide wurden die gleichen Standardprotokolle und – reagenzien verwendet wie in Kapitel 5.5.1 vorgestellt. Für das Diazirinhosphoramidit **99** wurde ein Doppelkupplungsprotokoll eingesetzt, das heißt, nach einer zehnminütigen Kupplung wurde gewaschen und mit frischem Amidit/Aktivator erneut 10 min gekuppelt. Zudem wurde die *Deblocking*-Zeit dieses Bausteins auf 120 s erhöht, da nur so eine vollständige Entschützung erreicht werden konnte. Die nachfolgende Base wurde für 5 min gekuppelt. Die gleichen Modifikationen wurden auch beim Einbau des Fluoresceinphosphoramidits **121** (*GlenResearch*), beim Alkinbaustein **126** (Vorstufen freundlicherweise von G. Burley zur Verfügung gestellt) und beim Desthiobiotinphosphoramidit **122** vorgenommen.

Zur Synthese der Stränge DA6-7, welche bereits mit einem C2-Amino-Linker **124** (*GlenResearch*) beginnen, mussten *UniversalSupport II*-Kartuschen (*GlenResearch*) verwendet werden. Für diese wurde eine *Deblocking*-Zeit von 90 s angesetzt, der folgende Amino-Linker wurde 5 min gekuppelt, die dann nachfolgende Base verlangte eine Kupplungszeit von 144 s. Bei den Strängen DA1-5, 8-9, wurden 3′-Biotin-CPG-Träger **120**, bzw. 3′-(6-FAM)-CPG-Träger **123** (beide *GlenResearch*) verwendet. Hier wurde die Zeit des ersten *Deblockings* auf 90 s angehoben, die Kupplungszeit der ersten nachfolgenden Base wurde auf 144 s erhöht.

Da beide Enden der Stränge ohnehin durch unpolare Modifikationen verschlossen waren, wurden die Synthesen im DMT-off-Modus durchgeführt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Diazirins **99** wurden die Kartuschen während der Synthese mit Alufolie umwickelt.

Nach der Synthese wurden die DNA-Stränge durch 24 h Behandlung mit ges. Ammoniak (aq.) und Ethanol (3:1, 1 mL) bei Raumtemperatur vom Träger abgespalten und entschützt, wobei diazirinhaltige DNA immer durch Alufolie vor Belichtung geschützt wurde.

Zur Abspaltung der Stränge **DA6-7** vom *UniversalSupport II* mussten härtere Bedingungen angewandt werden. Anstelle der Ammoniak/Ethanol-Mischung wurde hier eine 0.4 M Lösung von Natriumhydroxid in Methanol/Wasser (1 mL, 4:1) benutzt, die Entschützungszeit betrug 24 h bei Raumtemperatur. Danach wurde durch Zugabe von 1 M Triethylammoniumacetat (500  $\mu$ L) neutralisiert und das Methanol an der *SpeedVac* entfernt. Die Lösung wurde über *SepPak™*-Kartuschen wie in Kapitel 5.5.2 beschrieben entsalzt und anschließend erneut an der *SpeedVac* eingeeengt.

Alle Stränge wurden per analytischer *rp*-HPLC untersucht und per präparativer *rp*-HPLC gereinigt. Zur Detektion der fluoresceinhaltigen Stränge wurde hierbei sowohl bei 260 nm als auch bei 490 nm ein Chromatogramm aufgenommen. Es wurde folgender Gradient verwendet:

*reversed Phase-HPLC: Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec*

Puffer **A**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser

Puffer **B**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser/ 80 % Acetonitril

Flussrate: 5 mL/min

Gradient: 0  $\rightarrow$  10 % B in 5 min

10  $\rightarrow$  40 % B in 45 min

Die Oligonukleotide **DA1-5** wurden standardmäßig weiterbehandelt und waren damit bereit für den Einsatz in *photoaffinity labeling*-Experimenten. Bei den Strängen **DA8-9** musste noch das Diazirin durch *Click*-Chemie eingeführt werden. Hierzu wurden je 50  $\mu$ L der DNA-Lösung mit 150  $\mu$ L Diazirinazid **127** (5 mM Lösung in Dimethylsulfoxid/Wasser 1:1) und 10  $\mu$ L Cu-Katalysatorlösung versetzt (5 mM, frisch hergestellt aus gleichen Volumina einer 10 mM Lösung von Kupfer(I)bromid in Dimethylsulfoxid und einer 10 mM Lösung des Liganden **128** in *t*-Butanol/Dimethylsulfoxid 3:1). Die so entstandene Lösung wurde anschließend unter Lichtausschluss 2 h bei 40 °C auf einem *Eppendorf*-Thermoschüttler inkubiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels (*SpeedVac*) wurden die Oligonukleotide unter Verwendung des oben dargestellten Gradienten per *rp*-HPLC gereinigt.

Im Falle der Stränge **DA6-7** musste das 2-Iminobiotin **125** noch an den entschützten Amino-*Linker* angekuppelt werden. Hierzu wurden zunächst 250  $\mu$ g des 2-Iminobiotinaktivesters **125** (*Sigma*) in 14  $\mu$ L trockenem Dimethylsulfoxid gelöst. Zu dieser Lösung wurden 7  $\mu$ L bidest. H<sub>2</sub>O, 75  $\mu$ L Aktivesterkupplungspuffer (siehe Anhang B) und 100  $\mu$ g Oligonukleotid **DA6** bzw. **DA7** gegeben. Nach 16 h Inkubation bei 30 °C wurde die DNA mit Ethanol gefällt. Hierzu wurden 10  $\mu$ L 3 M NaCl und 250  $\mu$ L Ethanol (auf -30 ° vorgekühlt) zugesetzt und 30

min bei <-20 °C inkubiert. Es wurde 30 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die pelletierte DNA mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 50 µL 0.1 M Triethylammoniumacetat-Puffer (pH 8.0) aufgenommen. Da allerdings keine Bedingungen gefunden werden konnten, die eine HPL-chromatographische Trennung erlaubt hätten, und, entgegen der Planung, keine Aufreinigung über Inkubation mit Streptavidin-Agarose erreicht werden konnte, wurde dieser Syntheseweg letztendlich nicht weiterverfolgt.

In Tabelle 17 sind alle auf die obige Weise hergestellten und modifizierten Oligonukleotide mit ihren Molekülmassen dargestellt.

Nr.	Sequenz	<i>m/z</i> ber. [M-H] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> gef. [M-H] <sup>-</sup>
DA1	5`-F <b>l</b> AATGACCAG <b>T</b> *C <b>T</b> *CAAGTACTTGACT <b>Tb</b> -3`	9589.1	9593.1
DA2	5`-F <b>l</b> AATGACCAG <b>T</b> *A <b>A</b> <b>T</b> *CAAGTACTTGACT <b>Tb</b> -3`	9926.1	9925.8
DA3	5`-D <b>b</b> AATGACCAG <b>T</b> *C <b>T</b> *CAAGTACTTGACT <b>Tf</b> l -3`	9588.4	9591.4
DA4	5`-D <b>b</b> AATGACCAG <b>T</b> *A <b>A</b> <b>T</b> *CAAGTACTTGACT <b>Tf</b> l -3`	9925.8	9925.3
DA5	5`-F <b>l</b> TAC <b>C</b> <b>T</b> *GCAACCG <b>C</b> <b>T</b> *G <b>T</b> -3`	5884.0	5585.4
DA6	5`-F <b>l</b> AATGACCAG <b>T</b> *C <b>T</b> *CAAGTACTTGACT <b>Al</b> -3`	9093.3	9102.0
DA7	5`-F <b>l</b> AATGACCAG <b>T</b> *A <b>A</b> <b>T</b> *CAAGTACTTGACT <b>Al</b> -3`	9430.7	9434.9
DA8	5`-F <b>l</b> AATGACCAG <b>K</b> <b>C</b> <b>K</b> CAAGTACTTGACT <b>Tb</b> -3`	9243.4	9248.2
DA9	5`-F <b>l</b> AATGACCAG <b>K</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>K</b> CAAGTACTTGACT <b>Tb</b> -3`	9580.3	9576.4

**Tabelle 17.** Analytische Daten der synthetisierten diazirinhaltigen DNA-Stränge DA1-9. Fl = Fluorescein 121/123, T\* = Diazirin 99, B = Biotin 120, Db = Desthiobiotin 122, Al = Amino-Linker 124, K = Alkinbaustein 126.

Alle diazirinhaltigen Oligonukleotide wurden unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

### 5.5.5 Synthese der schädenenthaltenden Gegenstränge

Für die diazirinhaltigen Stränge wurden Gegenstränge konstruiert, welche je einen der DNA-Schäden T=T-CPD 33, 8-Oxo-dA 129, 8-Oxo-dG 9, β-cFaPydG 131, 5-OH-dU 130 oder Hydantoin 132 enthielten. Die Phosphoramidite des Formacetal T=T-Dimer 33, β-cFaPydG 131 und Hydantoin 132 wurden freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, die anderen sind kommerziell erhältlich (*GlenResearch*). Die Synthese verlief auch hier nach den in Kapitel 5.5.1 vorgestellten Standardbedingungen, für den Einbau der Schäden wurden hieran allerdings einige Modifikationen vorgenommen. Dies waren im Einzelnen:

## Experimenteller Teil

---

T=T-CPD-Dimer:	10 min Kupplungszeit, nachfolgende Base 5 min Kupplungszeit.
8-Oxo-dA:	5 min Kupplungszeit
8-Oxo-dG:	5 min Kupplungszeit
$\beta$ -cFaPydG:	2×10 min Kupplungszeit, ab dem Schaden nur noch <i>mild capping</i> (0.25 M Isobutyrylanhydrid, 11.1 % 2,6-Lutidin in Acetonitril, <b>kein Cap B</b> )
5-OH-dU:	5 min Kupplungszeit
Hydantoin:	10 min Kupplungszeit, nachfolgende Base 5 min Kupplungszeit

Zur leichteren Aufreinigung wurden alle Synthesen im DMT-*on*-Modus durchgeführt.

Bei der nachfolgenden Abspaltung vom CPG-Träger/Entschützung mussten für alle Schäden gemäß ihrer Basen- und Oxidationsempfindlichkeit unterschiedliche Bedingungen angewendet werden. Es waren dies:

T=T-Dimer: ges. Ammoniak/Ethanol 3:1, 24 h, Raumtemperatur

8-Oxo-dG, 8-Oxo-dA, 5-OH-dU: ges. Ammoniak/ges. Methylaminlsg. 1:1 + 0.25 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 40 °C, 20 h

$\beta$ -cFaPydG, Hydantoin: ges. Ammoniak/Ethanol 3:1, 24 h, 15-17 °C, Proben vor der Entfernung des Ammoniaks in der *SpeedVac* in fl. Stickstoff schockfrieren, *SpeedVac* nicht erhitzen

Die Roh-DNA wurde anschließend per *rp*-HPLC gereinigt. Hierbei wurden die folgenden Bedingungen angewendet:

*reversed Phase HPLC*: Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec

Puffer **A**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser

Puffer **B**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser/ 80 % Acetonitril

Flussrate: 5 mL/min

Gradient: 0→10 % B in 5 min

10→30 % B in 45 min

Nach Entsalzen und Einengen wurde die 5'-Dimethoxytritylgruppe entfernt. Hierzu wurde eine *SepPak*<sup>TM</sup>-Kartusche nach dem beschriebenen Protokoll äquilibriert. Die gereinigte DNA-Lösung wurde langsam über die Kartusche gegeben, diese wurde anschließend mit 15 mL bidest. Wasser gewaschen. Eine wässrige Trifluoressigsäurelösung (1.5 %) wurde in 90 s über die Kartusche gepumpt, danach wurde sofort durch Zugabe von Triethylammoniumacetat (6 mL, 0.1 M, pH 7.4) neutralisiert und der Puffer mit bidest. Wasser (15 mL) von der Kartusche gespült. Die DNA wurde mit Acetonitril/Wasser 4:1 (4 mL) eluiert, anschließend wurde

## Experimenteller Teil

in der *SpeedVac* eingengt. Die entschützten Stränge wurden erneut per *rp*-HPLC gereinigt. Hierzu wurden die folgenden Bedingungen angewendet:

*reversed Phase-HPLC*: Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleodur100-5 C18ec

Puffer **A**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser

Puffer **B**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser/ 80 % Acetonitril

Flussrate: 5 mL/min

Gradient: 0→10 % B in 5 min

10→20 % B in 45 min

Nach Entsalzung und Einengen *in vacuo* wurde die Reinheit per analytischer *rp*-HPLC überprüft und die Konzentration der Stränge UV-spektrometrisch bestimmt. Es konnten die folgenden Oligonukleotide erhalten werden:

Nr.	Sequenz	<i>m/z</i> ber. [M-H]	<i>m/z</i> gef. [M-H]
S1	5´-TTACTGGTGAG*AGTTCATCGAACTGAA-3´	7997.4	8001.8
S2	5´-TTACTGGTGAA*AGTTCATCGAACTGAA-3´	7981.4	7984.6
S3	5´-TTACTGGTGAF*AGTTCATCGAACTGAA-3´	7997.4	8000.1
S4	5´-TTACTGGTGUA*AGTTCATCGAACTGAA-3´	7958.3	7961.7
S5	5´-TTACTGGTGAH*AGTTCATCGAACTGAA-3´	7960.3	7967.1
S6	5´-TTACTGGTGAT=TAGTTCATCGAACTGAA-3´	8210.5	8214.4
S7	5´-TTACTGGTGATTAGTTCATCGAACTGAA-3´	8613.5	-
S8	5´-ACAGCGGT^TGCAGGTA -3´	4943.4	4941.7

**Tabelle 18.** Analytische Daten der schädenenthaltenden Oligonukleotide. G\* = 8-Oxo-dG **9**, A\* = 8-Oxo-dA **129**, F\* =  $\beta$ -cFaPydG **131**, U\* = 5-OH-dU **130**, H\* = Hydantoin **132**, T=T = Dimer **33**, T^T = (6-4)-Photoprodukt. Der ungeschädigte Strang **S7** wurde von Metabion bezogen, **S8** wurde von A. Glas durch UV-Belichtung hergestellt und gereinigt.

## 5.6 Reparaturexperimente mit den donor-/akzeptormodifizierten DNA-Haarnadeln H1-5<sub>a,b,c</sub> und POx1-4

Für die Belichtung der DNA-Haarnadeln wurden je 150  $\mu\text{L}$  einer 20  $\mu\text{M}$  DNA-Lösung in 150 mM NaCl und 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) in eine 500  $\mu\text{L}$  *MicroCell*-Quarzglasfluoreszenzküvette (*Helma*) gefüllt, die mit einem Gummiseptum gasdicht verschlossen wurde. Die Lösung wurde durch 20 minütiges Durchleiten von Argon entgast. Für die nachfolgende Reduktion des Flavins wurden verschiedene Wege verfolgt:

1. Reduktion mit Natriumdithionit: Zur entgasten DNA-Lösung wurden 15  $\mu\text{L}$  einer frisch bereiteten alkalischen Natriumdithionitlösung zugesetzt. Zur Darstellung der Dithionitlösung wurden 87 mg Natriumdithionit mit 75  $\mu\text{L}$  5 M Natronlauge versetzt und mit bidest. Wasser auf 5g aufgefüllt. Die Reduktion des Flavins zeigte sich an der sofortigen Entfärbung der Lösung.
2. Photoreduktion mit EDTA: Zur entgasten DNA-Lösung wurden 80  $\mu\text{L}$  einer 0.2 M EDTA-Lösung gegeben, zudem wurden 3  $\mu\text{L}$  einer 20 mM D-(+)-Mannitollösung (zum Abfangen evtl. entstehender OH-Radikale) zugesetzt. Die Lösung wurde anschließend mit Weißlicht (*Overhead*-Projektor) bestrahlt, bis sich die Lösung entfärbt hatte (je nach Sequenz 1-3 min).
3. Photoreduktion mit EDTA/ $\text{N}_2\text{O}$ -Atmosphäre: Durchführung wie unter Punkt 2 beschrieben, die Lösung wurde vor der Belichtung für 20 min mit Distickstoffmonoxid (*Air Liquide*, Reinheit 2.0) gesättigt.

Nach der Reduktion wurden die Proben mit einer *ThermoOriel*-Xe-Mitteldrucklampe der Fa. *L.O.T-Oriel* bestrahlt. Dabei wurde mit einem Filter eine *cut off*-Wellenlänge von 340 nm eingeregelt, die Temperatur wurde durch Wasserkühlung auf 10 °C reguliert. Während der Bestrahlung wurde ein leichter Strom von Argon durch die Küvette geleitet, bei den Lachgas-Experimenten wurde konstant  $\text{N}_2\text{O}$  durch die Probe geleitet. In definierten Zeitabständen wurden Proben von 15  $\mu\text{L}$  genommen. Diese wurden unter Lichtausschluss in dunkle *Eppendorf*-Reaktionsgefäße überführt und unter Luftzutritt 2 h auf einem Thermoschüttler der Fa. *Eppendorf* inkubiert, um eine vollständige Reoxidation des Flavins zu erreichen.

Bei den bromnukleosidhaltigen DNA-Haarnadeln erfolgte die Probenanalyse per Kapillargelelektrophorese (CE). Hierzu wurden die Aliquote zunächst mit *ZipTip*<sup>TM</sup> $\text{C}_{18}$ -Pipettenspitzen nach Herstellerprotokoll entsalzt und anschließend wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Das Verhältnis von intaktem zu debromierten Strang wurde durch Integration der Peakflächen in den Elektropherogrammen



(UV-Detektion 254 nm) ermittelt. Dazu wurde die *32Karat-CE-Software* von *BeckmanCoulter* verwendet. Zur Berechnung der Spaltungsausbeuten/Minute bzw. Anfangsspaltungsausbeuten der verschiedenen Belichtungen wurden die erhaltenen Werte in *Microcal Origin* nachbearbeitet und die sich ergebenden Kurven mit einer geeigneten Exponentialfunktion approximiert.

Bei den oxetanmodifizierten Oligonukleotiden **POx1-4** konnte die Probenanalyse per *rp-HPLC* erfolgen, da der große Polaritätsunterschied zwischen intaktem und gespaltenem Strang zu stark unterschiedlichen Retentionszeiten führte, die eine basisliniengetrennte Auflösung der Signale ermöglichte. Es wurde im Allgemeinen ein Probenvolumen von 10 µL injiziert, und der folgende Gradient wurde zur Untersuchung der Probe verwendet:

*reversed Phase-HPLC: Macherey-Nagel CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18*

Puffer **A**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser

Puffer **B**: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser/ 80 % Acetonitril

Flussrate: 5 mL/min

Gradient: 0→ 10 % B in 5 min

10→40 % B in 60 min

Um die Identität der Peaks zu klären, wurden die Fraktionen der analytischen Trennung zudem aufgefangen, entsalzt und per MALDI-TOF-MS untersucht.

## 5.7 Photoaffinity labeling-Experimente

Zur Durchführung der Belichtungsexperimente wurden zunächst Duplex-DNA-Sonden hergestellt. Hierzu wurden äquimolare Mengen der Diazirinstrangs **DA1-9** mit einem der geschädigten Stränge **S1-8** zusammengegeben, in einem Heizblock für 2 min auf 85 °C erhitzt, und über Nacht auf Raumtemperatur kommen gelassen. Danach standen die Doppelstränge für die weiteren Versuche zur Verfügung. Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden ausschließlich unter Verwendung autoklavierter Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße ausgeführt, zudem wurden Nitril- oder Latexhandschuhe getragen, um eine Kontamination der Proben durch körpereigene Proteine zu verhindern. Die angegebenen **Temperaturen** und **Lichtausschlussbedingungen** sind unbedingt einzuhalten, da sonst der Erfolg der Experimente durch Zersetzung entweder der Proteine oder der Sonde gefährdet ist!

### 5.7.1 Labeling von gereinigten Proteinen

*Photoaffinity labeling*-Experimente wurden sowohl mit einer gereinigten *Lactococcus lactis* (subsp. *Cremoris SK11*)-Formamidopyrimidinglykosylase (Fpg), als auch einer gereinigten *Escherichia coli*-CPD-Photolyase durchgeführt. Darüber hinaus wurde rekombinantes Rad 14 bzw. Rad 23 (NER-Proteine, *S. cerevisiae*) eingesetzt. Das rekombinante Fpg-Protein wurde von A. Glas als Lösung (ca. 5 mg/mL) im Fpg-Lagerpuffer (siehe Anhang B) zur Verfügung gestellt. Das fpg-Gen wurde von ihm in einen geeigneten Expressionsvektor (*pExp007*, von C. Pieck) kloniert und dieser in *E. coli* (Stamm *Rosetta*) transformiert. Die Bakterien wurden bei 37 °C in LB-Medium bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0.6$  gezogen, dann wurde durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration 200 ng/mL) induziert. Zur Rekonstitution des Zinkfingermotivs wurde zudem 50  $\mu$ M  $ZnCl_2$  zugegeben und die Expression für 4 Stunden durchgeführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einer *French press* (3-4 Zyklen, 1500 psi). Das Protein wurde nach Zellaufschluss über den eingeführten *StrepTagII<sup>TM</sup>* per Affinitätschromatographie gereinigt (*Streptactin Superflow*-Säule, 5 mL Bettvolumen, Fa. IBA) und aufkonzentriert. Das rekombinante Protein besaß eine Masse von ca. 33 kDa (Wildtyp 30.2 kDa).

*E. coli*-CPD-Photolyase wurde von C. Chicchini in einen geeigneten Vektor (*pEXPR-CPD-Photolyase*) kloniert und in *E. coli* (Stamm *Tuner*) transformiert. Die Bakterien wurden bei 37 °C in LB-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0.6$  gezogen und die Expression durch Zugabe von 200 ng/mL Anhydrotetracyclin induziert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einer *French press* (3 Zyklen, 1000 psi). Das Protein wurde nach Zellaufschluss über den eingeführten *StrepTagII<sup>TM</sup>* per Affinitätschromatographie gereinigt (*Streptactin Superflow*-Säule, 5 mL Bettvolumen, Fa. IBA) und aufkonzentriert. Das rekombinante Protein besaß eine Masse von ca. 56 kDa (Wildtyp 54 kDa) und wurde als Lösung (6.8 mg/mL) im CPD-Photolyase-Assaypuffer (siehe Anhang B) zur Verfügung gestellt. Beide Proteine wurden ausschließlich bei 0-4 °C gehandhabt und zur Lagerung als Lösung in 50 % Glycerin bei -80 °C tiefgefroren.

Rad 14 bzw. Rad 23 wurden von R. Strasser in geeignete Expressionsvektoren (*pExp007-Rad14* bzw. *pExp007-Rad23*) kloniert und in *E. coli* (Stamm *Rosetta*) transformiert. Beide Proteine besaßen einen *N*-terminalen *StrepTagII<sup>TM</sup>*, Rad 14 wurde zudem als *N*-terminal verkürzte Version kloniert, da das natürliche Gen hier ein Intron aufweist, welches in *E. coli* nicht prozessierbar ist ( $\rightarrow$  *Splicen*). Nach Wachstum der Bakterien bis zu einer  $OD_{600}$  von 0.8 (Rad 14) bzw. 0.6 (Rad 23) wurde die Expression durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration 200 ng/mL) induziert. Rad 14 wurde 4 h bei 30 °C exprimiert, Rad 23 für 16 h bei 16 °C. Nach Zellaufschluss per *French press* (3 Zyklen, 1000 psi) wurden beide Proteine über den eingeführten *StrepTagII<sup>TM</sup>* per Affinitätschromatographie gereinigt (*Streptactin Superflow*-Säule, 5 mL Bettvolumen, Fa. IBA). Im Falle von Rad 14 schloss sich eine zweite Reinigung über eine *HiTrap<sup>TM</sup>* HeparinHP-Säule (*Amersham Biosciences*, 1 mL Bettvolumen) an, bei Rad 24

war ein zweiter Reinigungsschritt per Gelfiltration (*Sepharose FF GF*, Amersham Biosciences) nötig. Die gereinigten Proteine wurde aufkonzentriert und als Lösung in 50 % Glycerin bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert; auch hier erfolgte die Handhabung der Proteine ausschließlich bei 0-4 °C.

Für die *Labeling*-Experimente wurden bei 0 °C je 50-100 pmol des DNA-Duplexes (**DA1:S3** im Falle des Fpg, **DA2:S6** im Falle der CPD-Photolyase) in ein 0.2 mL-PCR-*Eppendorf*-Cup gegeben und je 5-10 µg des Proteins hinzugesetzt. Mit dem *photoaffinity labeling*-Belichtungspuffer (siehe Anhang B) wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 µL verdünnt. Die Ansätze (DNA-Endkonzentration 500 nM-1 µM) wurden 30 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert, im Falle der CPD-Photolyase mussten aufgrund ihrer lichtabhängigen Aktivität bereits die Pipettierschritte unter Rotlicht ausgeführt werden. Danach wurden die Proben 30-60 min bei 366 nm belichtet, wie im Teil Material und Methoden beschrieben. Die Lösungen wurden in *Biomax*-Zentrifugationsfiltersäulen der Fa. *Millipore* (100 µL Fassungsvermögen, Ausschlussmasse 10 kDa) umpipettiert und diese bei ca. 3500 rpm bei 4 °C zentrifugiert, bis eine Aufkonzentration auf 30 µL erreicht war (ca. 30 min). Es wurden 10 µL des 6x-SDS-Auftragspuffers zugesetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Proben danach kurz auf Eis abgeschreckt. Je 10-15 µL der Proben wurden dann per SDS-PAGE (10 bzw. 12.5 % Acrylamid) analysiert (Details siehe Material und Methoden). Zur Sichtbarmachung der Fluoreszenz wurden die Gele unter einem *LAS3000-Imager* (*Fuji*) betrachtet und photographiert. Danach wurde mit *Coomassie Blue*, *SimplyBlue™ safe stain* (*Invitrogen*), oder dem *SilverXpress™ Silver Stain* (*Invitrogen*) nach Herstellerangaben gefärbt. Beim Silberfärben wurde als einzige Änderung statt der vorgesehenen Färbelösung (*Stainer A+ Stainer B*) eine selbst hergestellte *Tollens*-Lösung (80 mL bidest. H<sub>2</sub>O, 1 mL 3 M NaOH, 5 mL 0.5 M AgNO<sub>3</sub>, 2.2 mL halbkonzentrierte, wässrige Ammoniak-Lösung) verwendet. Infolgedessen sank die vom Hersteller angegebene Entwicklungszeit von 5-15 min auf ca. 15-30 s. Nach der Färbung wurden die Gele in bidest. H<sub>2</sub>O bei 4 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Für *WesternBlot*-Experimente wurden die durch SDS-PAGE getrennten Proteine (ohne nachträgliche Färbung!) über ein elektrisches Feld im *Semi-Dry*-Verfahren auf eine *Hybond™* Nitrozellulosemembran (*Amersham Biosciences*) übertragen und für die nachfolgende Immundetektion fixiert.

Dazu wurden sieben *Whatman* Papiere (3 mm stark), ebenso wie eine Nitrozellulosemembran, auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Drei *Whatman* Papiere wurden im Kathodenpuffer, jeweils zwei im Anodenpuffer I und Anodenpuffer II (siehe Anhang B) getränkt. Die Nitrozellulosemembran wurde im Anodenpuffer II befeuchtet. Nach der Entfernung des Sammelgels wurde das Trenngel mit destilliertem H<sub>2</sub>O abgespült und dann wie Abbildung 79 dargestellt zwischen Membran und den *Whatman*-Papieren positioniert. Die *Whatman*-Papiere wurden zuvor durch Abstreifen an der Gefäßkante von überschüssigem Puffer befreit.

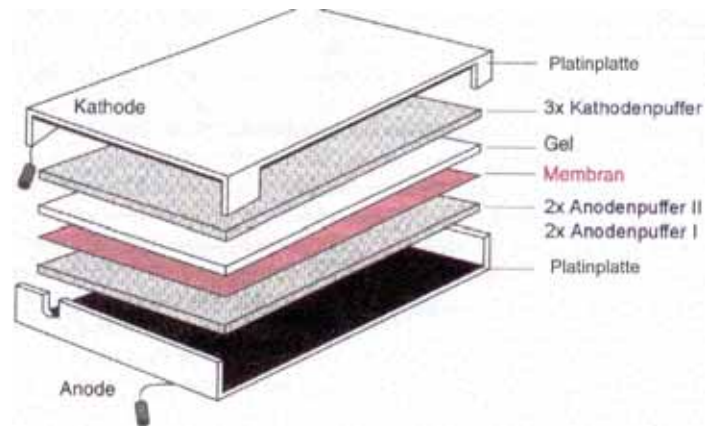


Abb. 79. Aufbau der Semi-Dry-Blot Apparatur (nach Lottspeich, 1998)

Der Proteintransfer erfolgte bei einer der Gelgröße angepassten Stromstärke von  $2.5 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche. Die Blotdauer betrug 75 min. Die Spannung durfte während des Blotens nicht über 20 V steigen, da es sonst zu einer starken Wärmeentwicklung kam. Nach dem Blot wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Danach wurden 20 mL *Blocking Buffer* (Invitrogen) zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die freien Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Anschließend wurde erneut dreimal für je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wurde nachfolgend mit 10 mL einer Lösung eines Cy3<sup>TM</sup>-markierten Anti-Biotin-Antikörpers (aus Ziege, *Biomol*, Verdünnung 1:10000 in TBST) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde verworfen und die Membran erneut dreimal für je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Sichtbarmachung der markierten Proteinbanden wurde die Membran unter dem *LAS3000-Imager* (Fuji) unter Verwendung der grünen LEDs ( $\lambda_{\text{Anregung}} = 550 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} = 570 \text{ nm}$ ) photographiert.

### 5.7.2 Labeling von *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Zellextrakten

Für weitergehende Experimente wurden von A. Glas bzw. C. Chiocchini *E. coli*-Gesamtzell-extrakte präpariert, in denen das rekombinante *LlFpg*-Protein bzw. die rekombinante CPD-Photolyase überexprimiert vorlagen. Von M. Maul wurde ein *E. coli*-Zelllysate (Stamm Top-10<sup>TM</sup>) präpariert, in dem keine molekularbiologischen Veränderungen vorgenommen wurden. R. Strasser stellte einen *S. cerevisiae*-Ganzzellextrakt her (Stamm *INVSc1*, *Invitrogen*), auch hier wurden keine molekularbiologischen Änderungen vorgenommen. Alle Zellextrakte besaßen Konzentrationen (Proteinbestimmung nach *Bradford*) zwischen 10-40 mg/mL und wurden als Lösung in 50 % Glycerin verwendet. Die Handhabung erfolgte ausschließlich bei 0-4 °C, zur Lagerung wurde der Ausgangsextrakt aliquotiert und bei -80 °C gekühlt. Da wiederholte

Einfrier-/Auftauzyklen der Stabilität der Proteine abträglich sind, wurde jedes Aliquot nur einmal verwendet.

Im Falle der Zellextrakte mit den überexprimierten Proteinen und des *S. cerevisiae*-Zellextrakts erfolgte die weitere Durchführung des *labeling*-Experiments analog zu der in Abschnitt 5.7.1 geschilderten Prozedur. Anstelle der gereinigten Proteine wurden 100 µg des jeweiligen Zellextrakts eingesetzt, die Gesamtproteinkonzentration betrug somit 1 mg/mL. Belichtung, Auftrennung und Analyse der Ansätze erfolgte dann wieder analog zu Kap. 5.7.1.

Für die Versuche mit dem *E. coli*-Wildtyp-Zellysate wurde probeweise eine Vorfraktionierung mit Hilfe eines ÄKTA™ Protein Purification Systems (Amersham Biosciences) vorgenommen. Hierzu wurden insgesamt 100 mg Zellextrakt (zuvor in MonoQ-Puffer A verdünnt) in 8 Portionen über eine Mono Q™5/50 GL-Anionenaustauschersäule (Amersham Biosciences, 5 mL Bettvolumen) geleitet (Probenauftrag über den SuperLoop, Flußrate 1 mL/min). Die Detektion der Proteine erfolgte UV-spektroskopisch bei 280 nm. Mit Hilfe eines automatischen Fraktionssammlers wurde der Durchlauf aufgefangen, die bindenden Proteine/DNA wurden dann mit einem Gradienten 0-100 % MonoQ-Puffer B in 20 min eluiert und verworfen. Der vereinigte Durchlauf aller Trennungen wurde mit einer Amicon Ultra-Säule (Millipore, Ausschlußmasse 5 kDa) auf 2 mL konzentriert und anschließend in 4 Portionen per manuelle Injektion über eine HiTrap™ HeparinHP-säule geleitet (Flußrate 1 mL/min). Der Durchlauf wurde mit einem automatischen Fraktionssammler aufgefangen, die gebundenen Proteine wurden durch einen Gradienten 0-100 % MonoQ-Puffer B in 20 min eluiert und ebenfalls aufgefangen. Die vereinigten Fraktionen von Durchlauf bzw. Eluat wurden mit Amicon Ultra-Säulen (Millipore, Ausschlußmasse 5 kDa) auf je 500 µL konzentriert. Anschließend wurde der Proteingehalt mittels Bradford-Proteinbestimmung festgestellt. Hiernach standen die fraktionierten Extrakte für die *photoaffinity labeling*-Experimente zur Verfügung, pro Versuch wurden je 100 µg des fraktionierten Extrakts eingesetzt. Belichtung, Auftrennung und Analyse erfolgte dann vollständig analog zu der in Abschnitt 5.7.1 beschriebenen Prozedur.

Für Experimente im präparativen Maßstab wurde das Protokoll in einigen Punkten geändert und erweitert. Es wurde 1 nmol der jeweiligen DNA-Sonde verwendet, 1 mg Zellextrakt zugesetzt und mit dem *photoaffinity labeling*-Belichtungspuffer auf 1 mL verdünnt (Gesamtproteinkonzentration 1 mg/mL). Anschließend wurde wie in 5.7.1 beschrieben, 1 h auf Eis belichtet. Von evtl. präzipitiertem Protein wurde abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

1.0 mg M-270 bzw. MyOne™C1 Dynabeads (Dyna) wurden zunächst vom Lagerungspuffer befreit, zweimal mit *magnetic beads*-Bindungspuffer (je 500 µL) gewaschen und in 500 µL *magnetic beads*-Bindungspuffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde der Belichtungsansatz gegeben und die Mischung 2-3 h bei Raumtemperatur unter leichtem Rotieren (→ Rotationsverdampfer) inkubiert. Die Magnetpartikel wurden magnetisch fixiert, der nicht gebun-

dene Überstand abgenommen und verworfen. Die *Beads* wurden nun in mehreren Waschgängen von unspezifisch anhaftendem Protein gereinigt. Hierzu wurde zunächst in 1 mL *magnetic beads*-Waschpuffer A suspendiert, kurz gevortext, die *Beads* magnetisch fixiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Diese Prozedur wurde anschließend viermal unter Verwendung von je 1 mL *magnetic beads*-Waschpuffer B wiederholt. Abschließend wurde noch einmal mit 1 mL *magnetic beads*-Waschpuffer A gewaschen, um störende SDS-Reste zu beseitigen. Die *Beads* wurden in 30 µL eines 1:1-Gemischs aus SDS-Auftragspuffer und bidest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und durch 5 min Erhitzen bei 95 °C die gebundenen Proteine eluiert. Nach magnetischer Fixierung der *Dynabeads* wurde die nun fertige Probe abgenommen, kurz auf Eis abgeschreckt und danach wie beschrieben per SDS-PAGE analysiert.

### 5.7.3 **Labeling von humanen Nuklearextrakten**

Die Aufzucht und Ernte humaner Zellen sowie die Präparation der Kernextrakte wurde von S. Manetto und C. Gräf durchgeführt, die Prozedur soll daher nur kurz dargestellt werden. Humane Zellen der Linie HCT-116 (Darmkrebsephitelzellen, DSMZ-Nr. ACC581, adhärent wachsend) wurden bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> in *Dulbecco's MEM with high glucose*+ 5 % FKS unter mehrfachem Umsetzen bis zu einer Dichte von 50.000-60.000 Zellen/cm<sup>2</sup> gezüchtet. Die Zellen wurden durch Trypsin/EDTA-Behandlung von der Wandung gelöst und durch Zentrifugation bei 450 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, anschließend wurden die Zellen im fünffachen Pelletvolumen Kernextraktionspuffer A resuspendiert und auf Eis für 20 min inkubiert. Nach Abzentrifugation wurde in zwei Pelletvolumen Kernextraktionspuffer A suspendiert und die Zellen durch 20 Stöße eines *WheatonDounce*-Homogenisators lysiert. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 15 min) wurde der Überstand abgenommen, nochmals zentrifugiert (13.000 rpm, 20 min) und der Überstand erneut sorgfältig entfernt. Das Zellkernpellet wurde im gleichen Volumen Kernextraktionspuffer B resuspendiert, und durch 20 Stöße eines *WheatonDounce*-Homogenisators lysiert; die Suspension wurde dann für 30 min bei 4 °C gerührt, anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde abgenommen und unter Verwendung von *Slide-A-Lyzer*<sup>TM</sup>-Dialysekassetten (*Pierce*), über Nacht gegen das 1000fache Volumen Kernextraktionspuffer C dialysiert. Der Kernextrakt wurde bei 13.000 rpm für 20 min zentrifugiert, anschließend in 1 mg-Aliquote aufgeteilt, welche bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

Die Durchführung der Belichtungsexperimente in analytischem und präparativen Maßstab erfolgte gemäß den in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Methoden.

#### 5.7.4 *In gel*-Trypsinverdau der gelabelten Banden

Zur massenspektrometrischen Untersuchung der gelabelten Banden wurden diese nach Anfärbung bzw. direkt nach Photographie mit dem *LAS3000-Imager (Fuji)* ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Hierzu wurde ein Protokoll verwendet, welches eine Kombination aus den Protokollen der Fa. *Promega, Bruker* und der *UCSF* darstellt. Bei allen nachfolgenden Schritten mussten Handschuhe getragen und nur autoklavierte bzw. anderweitig sterilgemachte Utensilien verwendet werden, um Kontamination der Proben, z. B. durch Keratin aus Hautpartikeln zu vermeiden.

1. Das Gel wurde zunächst auf eine sterile Unterlage gelegt, z. B. eine zuvor mit Ethanol/Wasser gereinigte Glasplatte. Anschließend wurden mit einem Skalpell die zu untersuchenden Banden ausgeschnitten, wobei darauf zu achten war, möglichst wenig „leeres“ Polyacrylamid auszuschneiden. Die Bande wurde dann in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten und diese in ein 0.5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, welches zuvor zweimal mit je 200 µL 50 % Acetonitril/0.1 % Trifluoressigsäure gewaschen worden war. Im Falle *Coomassie*-gefärbter Banden mussten diese zunächst entfärbt werden. Dazu wurden die Gelstücke zweimal für je 45 min mit je 200 µL 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat/50 % Acetonitril bei 37 °C inkubiert. Die Gelstücke wurden durch Zugabe von 50 µL Acetonitril dehydriert. Der Überstand wurde verworfen und die nun geschrumpften Gelstücke in einer *SpeedVac* bei Raumtemperatur getrocknet (ca. 10 min). Mit *Simply Blue™ safe stain (Invitrogen, kolloidale Coomassie-Färbung)* gefärbte Gele wurden durch Inkubation der Gelpartikel in 200 µL 30 % Acetonitril für 15 min bei Raumtemperatur entfärbt. Anschließend wurde durch Behandlung mit 100 % Acetonitril dehydriert und die geschrumpften Gelpartikel in einer *SpeedVac* für 10 min getrocknet.

Silbergefärbte Gele wurden analog zu einer Vorschrift von *Blum et al.* entfärbt. Hierzu wurden die in 1 mm<sup>3</sup> groß geschnittenen Gelpartikel zunächst dreimal für je 5 min mit je 1 mL bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde frisch ein 1:1-Gemisch aus Lösungen von Kaliumhexacyanoferrat(III) (30 mM) und Natriumthiosulfat (100 mM) hergestellt und die Gelpartikel damit gerade bedeckt. Nachdem die Braunfärbung der Banden vollständig verschwunden war (ca. 5-15 min) wurde der Überstand verworfen und die Gelteilchen in mehreren 30minütigen Waschrufen mit bidest. H<sub>2</sub>O gespült, bis sie wieder vollständig farblos waren. Durch fünfminütiges Inkubieren mit 100 % Acetonitril wurde dehydriert und die Partikel in einer *SpeedVac* bei Raumtemperatur getrocknet (ca. 10 min).

2. Zur Reduktion evtl. Disulfidbrücken wurde anschließend eine zur Rehydratisierung der Gelstücke gerade ausreichende Menge (meist 15-25  $\mu\text{L}$ ) einer Lösung von 10 mM DTT in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (immer frisch hergestellt) zugegeben und für 45 min bei 56 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde evtl. überschüssige Flüssigkeit abpipettiert und schnell durch dasselbe Volumen einer Lösung von 55 mM Iodacetamid (*Sigma, ultra grade*) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat ersetzt. Die Proben wurden dann 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert, um die freien Cysteinreste zu alkylieren. Der Überstand wurde abpipettiert und die Gelstücke zweimal für je 15 min mit je 50  $\mu\text{L}$  50 mM Ammoniumhydrogencarbonat / 50 % Acetonitril (1:1; v/v) gewaschen. Die Gelstücke wurden mit Acetonitril gerade bedeckt und für 5 min dehydriert. Der Überstand wurde abgenommen, das Gel für 10 min in einer *SpeedVac* getrocknet.

3. Anschließend wurden die Gelstücke im minimal möglichen Volumen einer Lösung von Trypsin (*Promega, modified sequence grade*), 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat / 10 % Acetonitril) bei 30 °C für 1 h rehydratisiert. Überschüssige Enzymlösung wurde abpipettiert, die Gelpartikel mit ca. 10  $\mu\text{L}$  40 mM Ammoniumhydrogencarbonat / 10 % Acetonitril bedeckt und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Es wurde zweimal mit je 50  $\mu\text{L}$  50 % Acetonitril / 5% Trifluoressigsäure versetzt, 1 h mit Ultraschall behandelt, kurz gevortext und zentrifugiert. Die vereinigten Extrakte wurden hiernach in einer *SpeedVac* zur Trockne eingedampft, wobei die Temperatur unter 30 °C gehalten wurde.

4. Die getrockneten Peptide wurden in 5-10  $\mu\text{L}$  0.1 % Trifluoressigsäure aufgenommen und anschließend nach Herstellerprotokoll mit *Millipore ZipTip<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>* entsalzt und aufkonzentriert. Gemäß dem Protokoll der Fa. *Bruker* wurden die Peptide direkt mit der MALDI-TOF-Matrixlösung (10 mg/mL  $\alpha$ -Cyanohydroxyzimtsäure in Acetonitril / 0.1 % Trifluoressigsäure 70:30, 1.5  $\mu\text{L}$ ) eluiert und in Spots à 0.5  $\mu\text{L}$  auf ein *Bruker massive steel*-MALDI-Target aufgebracht. Zur externen Kalibrierung wurde zudem ein Gemisch aus Bradykinin ( $m/z$  monoisot. = 745.5253), ACTH 15-39 ( $m/z$  monoisot. = 1063.7980) und Angiotensin II ( $m/z$  monoisot. = 2465.9873), 1:1-Gemisch mit der Matrixlösung, aufgetragen. Zur Messung des MALDI-TOF-Massenspektrums wurde pro Peptidspot über ca. 150-200 Schüsse summiert, wobei die Laserintensität zwischen 40-50 % lag. Zwischen der Messung der Peptidspots wurde jeweils extern auf das genannte Peptidstandardgemisch kalibriert. Während der Messung selber wurde zudem intern auf häufig auftretende Trypsin-Autoproteolysefragmente kalibriert, wodurch maximale Abweichungen von  $\pm 0.03$  Da erreicht werden konnten. Das gemessene Spektrum wurde mit *Bruker FlexAnalysis* nachbearbeitet, mit *Bruker BioTools* wurden dann alle gut definierten, monoisotopisch aufgelösten und nicht einer Kontamination zuzuschreibenden Signale markiert und einem



*fingerprint*-Abgleich über den mit der Software assoziierten Suchalgorithmus *Mascot* unterworfen. Hierbei wurden die folgenden Startparameter verwendet:

1. monoisotopische Massen
2. max. Abweichung 0.1 Da
3. verwendetes Enzym: Trypsin
4. max. eine übersprungene Schnittstelle
5. feste Modifikation: Carbamidomethyl (C)
6. variable Modifikation: Oxidation (M)
7. Suche in der *NCBI*-Datenbank (jeweils neuester Stand)
8. Organismus: *Eubacteria* bzw. *Homo sapiens*
9. keine Einschränkung bei Masse oder pI des gesuchten Proteins

Durch Verfeinerung von Daten wie der Anzahl verpasster Schnittstellen und der maximalen Massenabweichung konnten dann aus den anfänglichen Ergebnissen die tatsächlich wahrscheinlichsten Treffer herausgefiltert werden. (Erläuterungen zum Algorithmus der Trefferwahrscheinlichkeit siehe [www.mascot.com](http://www.mascot.com)).

Die MS-Analyse der Belichtungsexperimente mit humanen Kernextrakten erfolgten in Kooperation mit *F. Butter* (Arbeitsgruppe M. Mann, MPI für Biochemie und Neurobiologie, Martinsried). Hierzu wurden die erhaltenen Gelbanden ähnlich zur oben beschriebenen Prozedur ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die Peptide wurden nach Entsalzung und Konzentration per nano-RP-HPLC getrennt und mittels eines angekoppelten *LTQ Orbitrap™* - Massenspektrometers (*ThermoFinnigan*) analysiert. Dabei wurden zu jedem gegebenen Zeitpunkt die zehn intensivitätsstärksten Peptide in der Ionenfalle sequenziert. Der so erhaltene Datensatz (im Mittel ca. 20.000 Peptide pro Lauf) wurde nach Konvertierung mittels *Mascot* analysiert, wobei folgende Parameter angelegt wurden:

1. monoisotopische Massen
2. max. Peptidmassenabweichung 4 ppm
3. max. Abweichung der Fragmentmassen 0.5 Da
4. Verwendetes Enzym Trypsin
5. max. eine übersprungene Schnittstelle
6. feste Modifikation: Carbamidomethyl (C)
7. variable Modifikation: Oxidation (M, H, W), N-Terminus (Acetyl) oder Pyroglutamat, Desamidierung (N, Q)
8. Suche in der *SwissProt*-Datenbank (jeweils neuester Stand)
9. Organismus: keine Einschränkung
10. keine Einschränkung bei Masse oder pI des gesuchten Proteins

## Literaturverzeichnis

- [1] S. Hackett, K. Feldheim, M. Alvey, *DNA Cell Biol.* **2006**, *25*, 12, 655-658. Genes and genius: The inheritance of Gregor Mendel.
- [2] K. Landsteiner, P. Levine, *J. Exp. Med.* **1927**, *47*, 5, 757-775. On individual differences in human blood.
- [3] F. Miescher, *Hoppe-Seyler's medicinisch-chemische Untersuchungen* **1871**, *4*, 441-460. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen.
- [4] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137-158. Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus Type III.
- [5] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, *6*, 201-209. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation.
- [6] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature (London, United Kingdom)* **1953**, *172*, 156-157. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate.
- [7] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
- [8] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Transactions of the Faraday Society* **1962**, *58*, 411-415. Semiconductivity of organic substances. IX. Nucleic acid in the dry state.
- [9] M. Taniguchi, T. Kawai, *Physica E* **2006**, *33*, 1-12. DNA electronics.
- [10] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 3, 1109-1151. Oxidative nucleobase modifications leading to strand breaks.
- [11] E. Gajewski, G. Rao, Z. Nackerdien, M. Dizadaroglu, *Biochemistry* **1990**, *29*, 34, 7876-7882. Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals.
- [12] K. Kawai, Y. Wata, N. Ichinose, T. Majima, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 23, 4327-4329. Selective Enhancement of the One-Electron Oxidation of Guanine by Base Pairing with Cytosine.
- [13] Y. Yoshioka, Y. Kitagawa, Y. Takano, K. Yamaguchi, T. Nakamura, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 38, 8712-8719. Experimental and Theoretical Studies on the Selectivity of GGG Triplets toward One-Electron Oxidation in B-Form DNA.
- [14] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3, 617-618. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution.

- [15] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13, 5541-5553. Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes. 1. Nucleobase One-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies.
- [16] F. Prat, K. N. Houk, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4, 845-846. Effect of Guanine stacking on the oxidation of 8-oxoguanine in B-DNA.
- [17] S. Fukuzumi, H. Miyao, K. Okhubo, T. Suenobu, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 15, 3285-3294. Electron-Transfer Oxidation of DNA-Bases and DNA Oligomers.
- [18] K. Kawai, Y. Wata, M. Hara, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14, 3586-3590. Regulation of One-Electron Oxidation Rate of Guanine by Base Pairing with Cytosine Derivatives.
- [19] K. Ito, S. Inoue, K. Yamamoto, S. Kawanishi, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 18, 13221-13227. 8-Hydroxyguanosine formation at the 5'-site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV Radiation with riboflavin.
- [20] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 30, 7063-7068. Theoretical studies of GG-specific photocleavage of DNA via electron transfer: significant lowering of ionization potential and 5'-localization of HOMO of stacked GG Bases in B-Form DNA.
- [21] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, A. Tsuchida, M. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 23, 6406-6407. Photoinduced DNA Cleavage via Electron Transfer: Demonstration That Guanine Residues Located 5' to Guanine Are the Most Electron-Donating Sites.
- [22] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503-520. Purine Bases, Nucleosides, and Nucleotides: Aqueous Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and  $e^-$  and OH Adducts.
- [23] R. P. Hickerson, F. Prat, J. G. Muller, C. S. Foote, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 40, 9423-9428. Sequence and Stackin Dependence of 8-Oxoguanine Oxidation: Comparison of One-Electron vs Singlet Oxygen Mechanism.
- [24] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1, 293-301. Synthesis, Stability, and Cornformation of the Formamidopyrimidine G DNA Lesion.
- [25] M. Ober, diploma thesis, Philipps-Universität (Marburg), **2002**.
- [26] Y. L. Jiang, C. J. Wiederholt, J. N. Patro, K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *J. Org. Chem.* **2004**, *70*, 1, 141-149. Synthesis of Oligonucleotides Containing FaPy dG ( $N^6$ -(2-Deoxy- $\alpha,\beta$ -D-erythropentafuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) Using a 5'-Dimethoxytrityl Dinucleotide Phosphoramidite.

- [27] C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1, 474-477. Photosensitized Oxygenation of a 7,8-Dihydro-8-oxoguanosine Derivative. Formation of Dioxetane and Hydroperoxide Intermediates.
- [28] W. Adam, C. R. Saha-Möller, A. Schönberger, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 39, 9233-9238. Photooxidation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by Thermally Generated Triplet-Excited Ketones from 3-(Hydroxymethyl)-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane and Comparison with Type I and Type II Photosensitizers.
- [29] S. Raoul, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8, 1892-1898. Photosensitized reaction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Identification of 1-(2-deoxy-beta-D erythro-pentofuranosyl)cyanuric acid as the major singlet oxygen oxidation product.
- [30] W. Luo, J. G. Muller, E. M. Rachlin, C. J. Burrows, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 5, 613-616. Characterization of spiroiminodihydantoin as product of one-electron oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine.
- [31] G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J. L. Ravanat, J. Cadet, P. D. Mascio, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 3-4, 607-617. [O-18]- labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine oxidative damage: Detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone and oxazolone derivatives.
- [32] D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, *382*, 731-735. Oxidative DNA damage through long-range electron transfer.
- [33] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R. E. Holmlin, J. K. Barton, A. Hörmann, E. J. C. Olson, P. F. Barbara, *Science* **1996**, *273*, 475-480. Rates of DNA-mediated electron transfer between metallointercalators.
- [34] K. Kawai, T. Majima, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236*, Long-Range Charge Transfer in DNA I, 117-137. Hole transfer in DNA by monitoring the transient absorption of radical cations of organic molecules conjugated to DNA.
- [35] T. Takada, K. Kawai, S. Tojo, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2, 761-766. Effects of Interaction of Photosensitizer with DNA and Stacked G Bases on Photosensitized One-Electron Oxidation of DNA.
- [36] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *43*, 1, 89-91. Hole transfer through DNA monitored by transient absorption of phenothiazine radical cation.
- [37] D. Ly, Y. Kan, B. Armitage, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 36, 8747-8748. Cleavage of DNA by irradiation of substituted anthraquinones: intercalation promotes electron transfer and efficient reaction at GG steps.

- [38] D. T. Breslin, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10, 2311-2319. Anthraquinone photonucleases: Mechanisms for GG-selective and nonselective cleavage of double-stranded DNA.
- [39] H. Kasai, Z. Yamaizumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 24, 9692-9694. Photosensitized Formation of 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by Riboflavin: A Non Singlet Oxygen Mediated Reaction.
- [40] K. Kino, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7373-7374. Product Analysis of GG-Specific Photooxidation of DNA via Electron Transfer: 2-Aminoimidazolone as a Major Guanine Oxidation Product.
- [41] D. B. Hall, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10, 5045-5046. Sensitivity of DNA-mediated electron transfer to the intervening p-stack: A probe for the integrity of the DNA base stack.
- [42] R. E. Holmlin, P. J. Dandlicker, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 24, 2715-2730. Charge transfer through the DNA base stack.
- [43] E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2921-2925. Oxidation of guanine in DNA by  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})^{3+}$  using the flash-quench technique.
- [44] V. Shafirovich, N. E. Geacintov, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *237*, Long-Range Charge Transfer in DNA II, 129-157. Proton-coupled electron transfer reactions at a distance in DNA duplexes.
- [45] V. Shafirovich, J. Cadet, D. Gasparutto, A. Dourandin, W. Huang, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2, 586-592. Direct Spectroscopic Observation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine Radicals in Double-Stranded DNA Generated by One-Electron Oxidation at a Distance by 2-Aminopurine Radicals.
- [46] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 19, 4399-4408. Electron transfer at a distance induced by site-selective photoionization of 2-aminopurine in oligonucleotides and investigated by transient absorption techniques.
- [47] E. Meggers, D. Kusch, M. Spichty, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 4, 460-462. Electron transfer through DNA in the course of radical-induced strand cleavage.
- [48] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 49, 12950-12955. Sequence Dependent Long Range Hole Transport in DNA.
- [49] I. Saito, T. Nakamura, K. Nakatani, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, H. Suhiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 48, 12686-12687. Mapping of the Hot spots for DNA Damage by one electron oxidation: Efficacy of GG Doublets and GGG Triplets as a Trap in Long range Hole Migration.

- [50] F. D. Lewis, X. Y. Liu, J. Q. Liu, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 48, 12037-12038. Dynamics and equilibria for oxidation of G, GG, and GGG sequences in DNA hairpins.
- [51] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673-676. Distance-dependent electron transfer in DNA hairpins.
- [52] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 26, 14052-14055. Femtosecond direct observation of charge transfer between bases in DNA.
- [53] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Act.* **1985**, *811*, 3, 265-322. Electron transfers in chemistry and biology.
- [54] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12759-12765. Charge transfer and transport in DNA.
- [55] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 159-170. Dynamics of photoinduced charge transfer and hole transport in synthetic DNA hairpins.
- [56] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 42, 9746-9747. Electronic interactions between  $\pi$ -stacked DNA base pairs and Diphenylacetylene-4,4'-dicarboxamide in hairpin DNA.
- [57] F. D. Lewis, T. Wu, X. Liu, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12, 2889-2902. Dynamics of Photoinduced Charge Separation and Charge Recombination in Synthetic DNA Hairpins with Stilbenedicarboxamide Linkers.
- [58] F. D. Lewis, R. S. Kalgutkar, Y. Wu, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 49, 12346-12351. Driving Force Dependence of Electron Transfer Dynamics in Synthetic DNA Hairpins.
- [59] R. A. Marcus, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 8, 1161-1280. Elektronentransferreaktionen in der Chemie - Theorie und Experiment (Nobel-Vortrag).
- [60] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025-1029. Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix.
- [61] B. Giese, S. Wessely, M. Spormann, U. Lindemann, E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, *Angew. Chem. Int Ed.* **1999**, *38*, 7, 996-998. On the mechanism of long-range electron transfer through DNA.
- [62] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 9, 631-636. Long-Distance Charge Transport in DNA: The Hopping Mechanism.

- [63] Y. A. Berlin, A. L. Burin, M. A. Ratner, *Chem. Phys.* **2002**, *275*, 61-74. Elementary steps for charge transport in DNA: thermal activation vs. tunneling.
- [64] M. Bixon, J. Jortner, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 393-408. Long-range and very long-range charge transport in DNA.
- [65] M. Bixon, B. Giese, S. Wessely, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, J. Jortner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 21, 11713-11716. Long-range charge hopping in DNA.
- [66] M. Bixon, J. Jortner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 50, 12556-12567. Charge transport in DNA via thermally induced hopping.
- [67] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, *406*, 51-53. Direct measurement of hole transport dynamics in DNA.
- [68] F. D. Lewis, X. Zuo, J. Liu, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 17, 4568-4569. Dynamics of Inter- and Intrastrand Hole Transport in DNA Hairpins.
- [69] F. D. Lewis, J. Liu, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16, 4850-4861. Dynamics and Energetics of Single-Step Hole Transport in DNA Hairpins.
- [70] T. Kimura, K. Kawai, T. Majima, *Chem. Comm.* **2004**, *3*, 268-269. Fluorescence properties of 2-aminopurine-cytidine-7-deazaguanine (5'-ApCdzG-3') trimer in B- and Z-DNA.
- [71] F. D. Lewis, J. Liu, X. Liu, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 6, 1026-1028. Dynamics and energetics of hole trapping in DNA by 7-deazaguanine.
- [72] B. Giese, A. Biland, *Chem. Comm.* **2002**, *7*, 667-672. Recent developments of charge injection and charge transfer in DNA.
- [73] H. A. Wagenknecht, S. R. Rajjski, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 19, 4400-4407. Direct Observation of Radical Intermediates in Protein-Dependent DNA Charge Transport.
- [74] A. A. Voityuk, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 1-4. Charge transfer in DNA: Hole charge is confined to a single base due to solvation effects.
- [75] K. Senthilkumar, F. C. Grozema, C. F. Guerra, F. M. Bickelhaupt, F. D. Lewis, Y. A. Berlin, M. A. Ratner, L. D. A. Siebbeles, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *125*, 42, 14894-14903. Absolute Rates of Hole Transfer in DNA.
- [76] R. Abdel Malak, Z. Gao, J. F. Wishart, S. S. Isied, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 43, 13888-13889. Long-Range Electron Transfer Across Peptide Bridges: The Transition from Electron Superexchange to Hopping
- [77] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3, 791-800. Crossover from Superexchange to Hopping as the Mechanism for Photoinduced Charge Transfer in DNA Hairpin Conjugates.

- [78] F. C. Grozema, L. D. A. Siebbeles, Y. A. Berlin, M. A. Ratner, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 6, 536-539. Hole Mobility in DNA: Effects of Static and Dynamic Structural Fluctuations.
- [79] A. M. v. d. Craats, J. M. Warman, M. P. d. Haas, D. Adam, J. Simmerer, D. Haarer, P. Schuhmacher, *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 10, 823-826. The mobility of charge carriers in all four phases of the columnar discotic material hexakis(hexylthio)triphenylene: Combined TOF and PR-TRMC results.
- [80] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318-320. Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunneling.
- [81] B. Giese, M. Spichty, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 4, 195-198. Long distance charge transport through DNA: quantification and extension of the hopping model.
- [82] T. T. Williams, D. T. Odom, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 37, 9038-9049. Variations in DNA Charge Transport with Nucleotide Composition and Sequence.
- [83] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 23, 6842-6843. Kinetics of Weak Distance-Dependent Hole Transfer in DNA by Adenine-Hopping Mechanism.
- [84] K. Kawai, Y. Osakada, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2007**, ASAP. Hole Transfer in DNA and Photosensitized DNA Damage: Importance of Adenine Oxidation.
- [85] T. Takada, K. Kawai, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 34, 11012-11013. Rapid Long-Distance Hole Transfer through Consecutive Adenine Sequence.
- [86] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, B. Cohen, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 47, 7982-7985. Hole Mobility in DNA A Tracts.
- [87] C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 2-3, 409-428. Charge transport through a molecular  $\pi$ -stack: double helical DNA.
- [88] E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320-329. Charge transport in DNA.
- [89] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4, 1125-1129. Charge Separation in DNA via Consecutive Adenine Hopping.
- [90] K. Kawai, Y. Osakada, M. Fujitsuka, T. Majima, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 9, 1049-1054. Consecutive Adenine Sequences Are Potential Targets in Photosensitized DNA Damage.
- [91] T. Kendrick, B. Giese, *Chem. Comm.* **2002**18, 2016-2017. Charge transfer through DNA triggered by site selective charge injection into adenine.



- [92] S. Steenken, *Free Rad. Res. Comm.* **1992**, *16*, 6, 349-379. Electron-transfer-induced acidity/basicity and reactivity changes of purine and pyrimidine bases. Consequences of redox processes for DNA base pairs.
- [93] M. Pope, C. E. Swenberg, *Electronic Processes in Organic Crystals and Polymers*, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
- [94] T. Renger, R. A. Marcus, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 41, 8404-8419. Variable-Range Hopping Electron Transfer through Disordered Bridge States: Application to DNA.
- [95] T. Takada, K. Kawai, M. Fujitsuka, T. Majima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 39, 14002-14006. Direct observation of hole transfer through double-helical DNA over 100 .ANG.
- [96] Y. Osakada, K. Kawai, M. Fujitsuka, T. Majima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 48, 18072-18076. Charge transfer through DNA nanoscaled assembly programmable with DNA building blocks.
- [97] M. Nunez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85-97. Long-range oxidative damage to DNA: effects of distance and sequence.
- [98] M. E. Nunez, G. P. Holmquist, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, *40*, 42, 12465-12471. Evidence for DNA charge transport in the nucleus.
- [99] M. E. Nunez, K. T. Noyes, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **2002**, *6*, 4, 403-415. Oxidative charge transport through DNA in nucleosome core particles.
- [100] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5483-5491. DNA-bound peptide radicals generated through DNA-mediated electron transport.
- [101] E. Yavin, A. K. Boal, E. A. D. Stemp, E. M. Boon, A. L. Livingston, V. L. O'Shea, S. S. David, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10, 3546-3551. Protein-DNA charge transport: Redox activation of a DNA repair protein by guanine radical.
- [102] P. M. Cullis, G. D. Jones, M. C. Symons, J. S. Lea, *Nature* **1987**, *330*, 6150, 773-774. Electron Transfer from protein to DNA in irradiated chromatin.
- [103] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 253-260. Long-range charge transport in DNA: Transient structural distortions control the distance dependence.
- [104] G. B. Schuster, U. Landman, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236*, Long-Range Charge Transfer in DNA I, 139-161. The mechanism of long-distance radical cation transport in duplex DNA: Ion-gated hopping of polaron-like distortions.
- [105] C.-S. Liu, R. Hernandez, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9, 2877-2884. Mechanism for Radical Cation Transport in Duplex DNA Oligonucleotides.
- [106] V. Sartor, E. Boone, G. B. Schuster, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 45, 11057-11059. Long-Distance Radical Cation Migration through A/T Base Pairs in DNA: An Experimental Test of Theory.

- [107] E. M. Conwell, S. V. Rakhmanova, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9, 4556-4560. Polarons in DNA.
- [108] E. M. Conwell, D. M. Basko, *Synth. Met.* **2003**, *137*, 3, 1381-1383. Polarons and conduction in DNA.
- [109] L. D. Landau, *Phys. Z. Sowjetunion* **1933**, *3*, 664–665. Über die Bewegung der Elektronen im Kristallgitter.
- [110] S. M. Gasper, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 52, 12762-12771. Intramolecular photoinduced electron transfer to anthraquinones linked to duplex DNA: The effect of gaps and traps on long range cation migration.
- [111] D. Ly, L. Sanii, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 40, 9400-9410. Mechanism of Charge Transfer in DNA: Internally-Linked Anthraquinone Conjugates Support Phonon-Assisted Polaron Hopping.
- [112] C.-S. Liu, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 20, 6098-6102. Base Sequence Effects in Radical Cation Migration in Duplex DNA: Support for the Polaron-Like Hopping Model.
- [113] P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Kan, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 15, 8353-8358. Long-distance charge transport in duplex DNA: The phonon-assisted polaron-like hopping mechanism
- [114] C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 24, 6439-6442. Reactivity towards singlet oxygen of a 7,8-Dihydro-8-oxoguanosine (8-hydroxyguanosine) formed by photooxidation of a guanosine derivative.
- [115] A. Joy, G. Guler, S. Ahmed, L. W. McLaughlin, G. B. Schuster, *Faraday Discuss.* **2006**, *131*, 357-365. Polaronic semiconductor behavior of long-range charge transfer in DNA oligomers in solution: controlling barriers to long-distance radical cation migration in DNA with thymine analogs.
- [116] A. Joy, A. K. Ghosh, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16, 5346-5347. One-Electron Oxidation of DNA Oligomers That Lack Guanine: Reaction and Strand Cleavage at Remote Thymine by Long-Distance Radical Cation Hopping.
- [117] F. O. Onyemauwa, G. B. Schuster, *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 3, 729-732. The reaction of water with guanosine radical cation in DNA.
- [118] R. N. Barnett, A. Bongiorno, C. L. Cleveland, A. Joy, U. Landman, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 33, 10795-10800. Oxidative Damage to DNA: Counterion-Assisted Addition of Water to Ionized DNA.
- [119] P. Das, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 40, 14227-14231. Effect of condensate formation on long-distance radical cation migration in DNA.

- [120] E. M. Conwell, J.-H. Park, H.-Y. Choi, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 19, 9760-9763. Polarons in DNA: Transition from Guanine to Adenine Transport.
- [121] J.-H. Park, H.-Y. Choi, E. M. Conwell, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 50, 19483-19486. Hole Traps in DNA Calculated with Exponential Electron-Lattice Coupling.
- [122] E. M. Conwell, D. M. Basko, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 46, 23603-23606. Effect of Water Drag on Diffusion of Drifting Polarons in DNA.
- [123] E. M. Conwell, S. M. Bloch, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 11, 5801-5806. Base Sequence Effects on Transport in DNA.
- [124] E. M. Conwell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 25, 8795-8799. Charge transport in DNA in solution: The role of polarons.
- [125] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelly, C. R. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6014-6019. Femtosecond dynamics of DNA-mediated electron transfer.
- [126] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236*, Long-Range Charge Transfer in DNA I, 67-115. DNA-mediated charge transport chemistry and biology.
- [127] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 41, 13234-13235. DNA-Mediated Charge Transport Requires Conformational Motion of the DNA Bases: Elimination of Charge Transport in Rigid Glasses at 77 K.
- [128] R. K. Neely, A. C. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 50, 15952-15953. Influence of Base Dynamics on the Conformational Properties of DNA: Observation of Static Conformational States in Rigid Duplexes at 77 K
- [129] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H. A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 27, 10192-10195. Base pair motions control the rates and distance dependencies of reductive and oxidative DNA charge transfer.
- [130] F. Shao, M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 52, 17914-17919. Long-range oxidative damage to cytosines in duplex DNA.
- [131] F. Shao, K. Augustyn, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 49, 17445-17452. Sequence Dependence of Charge Transport through DNA Domains.
- [132] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 37, 11471-11483. DNA Charge Transport: Conformationally Gated Hopping through Stacked Domains.
- [133] M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5896-5900. Ultrafast Dynamics in DNA-Mediated Electron Transfer: Base Gating and the Role of Temperature.
- [134] R. F. Anderson, S. S. Shinde, A. Maroz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 50, 15966-15967. Cytosine-Gated Hole Creation and Transfer in DNA in Aqueous Solution.

- [135] M. P. Scannel, D. J. Fenick, S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1971-1977. Model Studies of DNA Photorepair: Reduction Potentials of Thymine and Cytosine Cyclobutane Dimers Measured by Fluorescence Quenching.
- [136] M. P. Scannel, G. Prakash, D. E. Falvey, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4332-4337. Photoinduced electron transfer to pyrimidines and 5,6-dihydropyrimidine derivatives: Reduction potentials determined by fluorescence quenching kinetics.
- [137] S. Steenken, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1293-1297. Electron transfer in DNA? competition by ultra-fast proton transfer.
- [138] X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 41, 10115-10123. Investigation of Proton Transfer within DNA Base Pair Anion and Cation Radicals by Density Functional Theory (DFT).
- [139] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701-4709. One-electron reduction potentials of pyrimidine bases, nucleosides, and nucleotides in aqueous solution. Consequences for DNA redox chemistry.
- [140] K. Kawai, A. Yokooji, S. Tojo, T. Majima, *Chem. Comm.* **2003**, *22*, 2840-2841. Effects of base pairing on the one-electron reduction rate of cytosine.
- [141] A. A. Voityuk, M. E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *342*, 231-238. Energetics of excess electron transfer in DNA.
- [142] M. G. Debije, W. A. Bernhard, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 4608-4615. Thermally stable sites for electron capture in directly ionized DNA: Free radicals produced by the net hain of hydrogen at C5/C6 of cytosine and thymine in crystalline oligodesoxynucleotides.
- [143] M. Tanaka, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 38, 12372-12373. Reductive DNA Cleavage Induced by UVA Photoirradiation of NADH without Oxygen.
- [144] A. Pezeshk, M. C. R. Symons, J. D. McClymont, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18562-18566. Electron movement along DNA strands: use of intercalators and electron paramagnetic resonance spectroscopy.
- [145] A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 5, 1128-1136. Electron spin resonance study of electron transfer rates in DNA: determination of the tunneling constant  $\beta$  for single-step excess electron transfer.
- [146] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10406-10411. Electron spin resonance study of the temperature dependence of electron transfer in DNA: competitive processes of tunneling, protonation at carbon, and hopping.

- [147] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 44, 10406-10411. Electron Spin Resonance Study of the Temperature Dependence of Electron Transfer in DNA: Competitive Processes of Tunneling, Protonation at Carbon, and Hopping.
- [148] Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 29, 6942-6949. Electron Spin Resonance Study of Electron Transfer in DNA: Inter-Double-Strand Tunneling Processes.
- [149] R. F. Anderson, K. B. Patel, W. R. Wilson, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, *87*, 23, 3739-3746. Pulse radiolysis studies of electron migration in DNA from DNA base-radical anions to nitroacridine intercalators in aqueous solution.
- [150] K. Kawai, T. Kimura, K. Kawabata, S. Tojo, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 46, 12838-12841. Excess Electron Transfer in DNA Studied by Pulse Radiolysis und  $\gamma$ -Radiolysis of Naphtalimide and Iodouridine Modified ODN.
- [151] V. Y. Shafirovich, A. Dourandin, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 5863-5868. Migration and trapping of photoinduced excess electrons in double-stranded B-form DNA but not in single-stranded DNA.
- [152] C. Beach, A. F. Fuciarelli, J. D. Zimbrick, *Radiat. Res.* **1994**, *137*, 3, 385-393. Electron migration along 5-bromouracil-substituted DNA irradiated in solution and in cells.
- [153] Y. Razskazovskii, S. G. Swart, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1460-1467. Competitive electron scavenging by chemically modified pyrimidine bases in bromine-doped DNA: Relative efficiency and relevance of intrastrand electron migration.
- [154] Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10, 2755-2762. Excess Electron Transfer in DNA: Effect of Base Sequence and Proton Transfer.
- [155] F. D. Lewis, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280-11281. Dynamics of electron injection in DNA hairpins.
- [156] F. D. Lewis, Y. S. Wu, X. Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 41, 12165-12173. Synthesis, structure, and photochemistry of exceptionally stable synthetic DNA hairpins with stilbene diether linkers.
- [157] A. A. Voityuk, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 1-4. Estimates of electronic coupling for excess electron transfer in DNA.
- [158] M. Friedel, M. K. Cichon, T. Carell, in *CRC Handbook of Photochemistry and Photobiology*, Vol. 141, **2003**, pp. 1-22.
- [159] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2238. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.
- [160] H.-W. Park, S.-T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866-1872. Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*.

- [161] T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. M. Eker, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 887-891. Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*.
- [162] T. Todo, H. Takemori, H. Ryo, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido, K. Sato, T. Nomura, *Nature* **1993**, *361*, 371-374. A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts.
- [163] K. Hitomi, S.-T. Kim, S. Iwai, N. Harima, E. Otsoshi, M. Ikenaga, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32591-32598. Binding and catalytic Properties of a *Xenopus* (6-4) photolyase.
- [164] S.-T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J.-S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8535-8540. Characterization of a (6-4) photoproduct DNA photolyase.
- [165] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., **1995**.
- [166] O. Kleiner, J. Butenandt, T. Carell, A. Batschauer, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 161-167. Class II DNA photolyase from *Arabidopsis thaliana* contains FAD as cofactor.
- [167] D. G. Lemaire, B. P. Ruzsicska, *Photochem Photobiol* **1993**, *57*, *5*, 755-769. Quantum yields and secondary photoreactions of the photoproducts of dTpdT, dTpdC and dTpdU.
- [168] W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernández, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, *315*, 625-629. Thymine Dimerization in DNA Is an Ultrafast Photoreaction.
- [169] P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4256-4263. Triplet State Interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: intermolecular energy transfer.
- [170] T. Douki, M. Court, S. Sauvaigo, F. Odin, J. Cadet, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, *16*, 11678-11685. Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
- [171] T. Douki, J. Cadet, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495-2501. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions.
- [172] J.-S. Taylor, S. Nadji, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2579-2590. Unraveling the origin of the major mutations induced by ultraviolet light, the C-T transition at dTpdC Sites. A DNA synthesis building block for the cis-syn cyclobutane dimer of dTpdU.
- [173] N. Jiang, J.-S. Taylor, *Biochemistry* **1993**, *32*, 472-481. In Vivo Evidence that UV-Induced C-T Mutations at Dipyrimidine sites could result from the Replicative Bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products.

- [174] J. L.-F. Kao, S. Nadji, J.-S. Taylor, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 561-567. Identification and Structure Determination of a Third Cyclobutane Photodimer of Thymidylyl-(3'-5')-Thymidin: The trans-syn II Product.
- [175] S. Tornaletti, G. P. Pfeifer, *Science* **1994**, *263*, 1436-1438. Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer.
- [176] J. Cadet, P. Vigny, in *Bioorganic Photochemistry, Vol. 1* (Ed.: H. Morrison), Wiley, New York, **1990**, pp. 1-272.
- [177] T. Douki, L. Voituriez, J. Cadet, *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53*, 293-297. Characterization of the (6-4) photoproduct of 2'-deoxycytidylyl-(3'->5')-thymidine and of its Dewar valence isomer.
- [178] J.-S. Taylor, D. S. Garrett, M. J. Wang, *Biopolymers* **1988**, *27*, 1571-1593. Models for the solution structure of the (6-4) photoproduct of Thymidylyl-(3'->5')-thymidine derived via a distance- and angle-constrained conformation search procedure.
- [179] M. S. Jorns, E. T. Baldwin, G. B. Sancar, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1, 486-491. Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase.
- [180] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2-9. Structure and Function of DNA Photolyase.
- [181] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7-17. Transfer Mechanism of Electronic Excitation.
- [182] S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7313-7314. Model Studies of DNA Photorepair: Energetic Requirements for the Radical Anion Mechanism Determined by Fluorescence Quenching.
- [183] S.-T. Kim, A. Sancar, C. Essenmacher, G. T. Babcock, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4442-4443. Evidence from Photoinduced EPR for a Radical Intermediate during Photolysis of Cyclobutane Thymine Dimer by DNA Photolyase.
- [184] R. A. S. McMordie, T. P. Begley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1886-1887. Mechanistic Studies on DNA Photolyase. 5. Secondary Deuterium Isotope Effects on the Cleavage of the Uracil Photodimer Cation and Anion.
- [185] A. W. MacFarlane IV, R. J. Stanley, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8558-8568. *Cis-syn* thymidine dimer repair by DNA photolyase in real time.
- [186] Y.-T. Kao, C. Saxena, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 45, 16128-16132. Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase.
- [187] S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8557-8558. Model studies of DNA photorepair: Radical anion cleavage of thymine dimer probed by nanosecond laser spectroscopy.

- [188] C. Chatgililoglu, M. Guerra, Q. G. Mulazzani, *Journal of American Chemical Society* **2003**, *125*, 3839-3848.
- [189] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. M. Eker, T. Carell, L.-O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789-1793. Crystal Structure of a Photolyase Bound to a CPD-Like DNA Lesion After in Situ Repair.
- [190] X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J.-S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 51, 32580-32590. Reaction Mechanism of (6-4) Photolyase.
- [191] K. Hitomi, H. Nakamura, S.-T. Kim, T. Mizikoshi, T. Ishikawa, S. Iwai, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13, 10103-10109. Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction.
- [192] T. Todo, S. T. Kim, K. Hitomi, E. Otsoshi, T. Inui, H. Morioka, H. Kobayashi, E. Ohtsuka, H. Toh, M. Ikenaga, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4, 764-768. Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4) photolyase.
- [193] T. Todo, H. Yyo, K. Yamamoto, H. Toh, T. Inui, H. Ayaki, T. Nomura, M. Ikenaga, *Science* **1996**, *272*, 109-112. Similarity among the *Drosophila* (6-4) Photolyase, a human Photolyase homolog, and the DNA Photolyase-blue light photoreceptor family.
- [194] P. Clivio, J.-L. Fourrey, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5481-5483. DNA photodamage mechanistic studies: Characterization of a thietane intermediate in a model reaction relevant to "6-4 lesions".
- [195] P. Clivio, J.-L. Fourrey, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1615-1618. Novel insight into the stereochemical pathway leading to (6-4) pyrimidine-pyrimidone photoproducts in DNA.
- [196] P. Clivio, J. L. Fourrey, T. Szabo, J. Stawinski, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 24, 7273-7283. Photochemistry of di(deoxyribonucleoside) methylphosphonates containing N-3-methyl-4-thiothymine.
- [197] P. Clivio, J. L. Fourrey, *Chem. Commun.* **1996**, *18*, 2203-2204. (6-4) photoproduct DNA photolyase mechanistic studies using s<sup>5</sup>-(6-4) photoproducts.
- [198] J. E. LeClerc, A. Borden, C. W. Lawrence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9685-9689. The thymine-thymine pyrimidine pyrimidone (6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3'thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*.
- [199] J. H. Lee, G. S. Hwang, B. S. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12, 6632-6636. Solution structure of a DNA decamer duplex containing the stable 3' T · G base pair of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: Implications for the highly specific 3' T -> C transition of the (6-4) adduct.
- [200] T. Carell, R. Eppe, V. Gramlich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 6, 620-623. Synthesis of Flavin-Containing Model Compounds for DNA Photolyase Mediated DNA Repair.



- [201] R. Epple, E.-U. Wallenborn, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7440-7451. Investigation of Flavin-Containing DNA-Repair Model Compounds.
- [202] R. Epple, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 938-941. Flavin and deazaflavin containing model compounds mimic the energy-transfer step in type II DNA-photolyases.
- [203] T. Carell, R. Epple, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**1245-1258. Repair of UV Light Induced DNA Lesions: A Comparative Study with Model Compounds.
- [204] R. Epple, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7318-7329. Efficient Light-dependent DNA repair requires a large cofactor separation.
- [205] R. F. Hartman, S. D. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3559-3560. Efficient Photosensitized Pyrimidine Dimer Splitting by a Reduced Flavin Requires the Deprotonated Flavin.
- [206] K. H. Dudley, A. Ehrenberg, P. Hemmerich, F. Müller, *Helv. Chim. Act.* **1964**, *47*, 5, 1354-1383. Spektren und Strukturen der am Flavin-Redoxsystem beteiligten Partikeln.
- [207] M. A. Herbert, J. C. LeBlanc, D. Weinblum, H. E. Johns, *Photochem. Photobiol.* **1969**, *9*, 33-44. Properties of thymine dimers.
- [208] A. Schwögler, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 21, 3918-3920. Self-repairing DNA based on a reductive electron transfer through the base stack.
- [209] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1763-1766. Weak distance dependence of excess electron transfer in DNA.
- [210] C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *European Journal of Organic Chemistry* **2002**3281-3289. Excess electron transfer in flavin-capped DNA-hairpins.
- [211] C. Behrens, T. Carell, *Chem. Comm.* **2003**1632-1633. Excess electron transfer in flavin-capped, thymine dimer-containing DNA hairpins.
- [212] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480-11481. Excess Electron Transfer from an Internally Conjugated Aromatic Amine to 5-Bromo-2'-deoxyuridine in DNA.
- [213] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *116*, 14, 1875-1878. Criteria for Efficient Transport of Excess Electrons in DNA.
- [214] H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2454-2460. Reductive Electron Transfer and Transport of Excess Electrons in DNA.
- [215] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 11, 1636-1639. Real-time spectroscopic and chemical probing of reductive electron transfer in DNA.
- [216] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6, 1871-1876. Reductive electron transfer in phenothiazine-modified DNA is dependent on the base sequence.

- [217] K. Bhatia, R. H. Schuler, *J. Phys. Chem. A* **1973**, *77*, 15, 1888-1896. Uracilyl radical production in the radiolysis of aqueous solutions of the 5-halouracils.
- [218] E. Rivera, R. H. Schuler, *J. Phys. Chem. A* **1983**, *87*, 3966-3971. Intermediates in the reduction of 5-halouracils in  $e_{aq}^-$ .
- [219] H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6720-6721. Highly sequence-selective photoreaction of 5-bromouracil-containing deoxyhexanucleotides.
- [220] K. Fujimoto, Y. Ikeda, S. Ishihara, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 12, 2243-2245. Deoxyribonolactone formation in photoirradiation of 5-bromouracil-containing oligonucleotides by direct C1' hydrogen abstraction.
- [221] G. P. Cook, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10025-10030. A novel mechanism for the formation of direct strand breaks upon anaerobic photolysis of duplex DNA containing 5-bromodeoxyuridine.
- [222] M. K. Cichon, C. H. Haas, F. Grolle, A. Mees, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13984-13985. Efficient Intrastrand excess electron transfer in PNA:DNA hybrids.
- [223] S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5, 1302-1303. Excess electron transfer based repair of a cis-syn thymine dimer in DNA is only weakly sequence dependent.
- [224] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *14*, 1848-1851. Excess electron transport through DNA: A single electron repairs more than one UV-induced lesion.
- [225] C. Chatgililoglu, C. Caminal, M. Guerra, Q. G. Mulazzani, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 37, 6030-6032. Tautomers of one-electron-oxidized guanosine.
- [226] C. Chatgililoglu, M. Guerra, Q. G. Mulazzani, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13, 3839-3848. Model Studies of DNA C5' Radicals. Selective Generation and Reactivity of 2'-Deoxyadenosin-5'-yl Radical.
- [227] M. Ioele, R. Bazzanini, C. Chatgililoglu, Q. G. Mulazzani, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9, 1900-1907. Chemical Radiation Studies of 8-Bromoguanosine in Aqueous Solutions.
- [228] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 2, 513-886. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ ) in aqueous solution.
- [229] G. Prakash, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11375-11376. Model Studies of the (6-4) Photoproduct DNA Photolyase: Synthesis and Photosensitized Splitting of a thymine-5,6-Oxetane.
- [230] A. Joseph, G. Prakash, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11219-11225. Model Studies of the (6-4) Photoproduct Photolyase Enzyme: Laser Flash Photolysis

- Experiments Confirm Radical Ion Intermediates in the Sensitized Repair of Thymine Oxetane Adducts.
- [231] A. Joseph, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3145-3146. Photolysis of thymine oxetane produces triplet excited carbonyl compounds with high efficiency.
- [232] A. Joseph, D. E. Falvey, *Photochem. Photobiol. Sci* **2002**, *1*, 632-635. Photoinduced electron transfer cleavage of oxetane adducts of uracil and cytosine.
- [233] M. K. Cichon, S. Arnold, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *51*, 5, 767-770. A (6-4) Photolyase Model: Repair of DNA (6-4) Lesions requires a reduced and deprotonated flavin.
- [234] M. G. Friedel, M. K. Cichon, T. Carell, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 10, 1937-1941. Model compounds for (6-4) photolyases: a comparative flavin induced cleavage study of oxetanes and thietanes.
- [235] M. A. Miranda, M. A. Izquierdo, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6532-6533. Stepwise cycloreversion of oxetane radical cations with initial C-O bond cleavage.
- [236] M. A. Miranda, M. A. Izquierdo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **2003**364-365. Chemical and transient spectroscopic evidence for C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> cleavage of 2,3-diaryloxetane radical cations.
- [237] M. A. Miranda, M. A. Izquierdo, F. Galindo, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 13, 1965-1976. Steady-state and time-resolved studies on oxetane cycloreversion using (thia)pyrylium salts as electron-transfer photosensitizers.
- [238] M. A. Miranda, M. A. Izquierdo, F. Galindo, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4138-4142. Involvement of triplet excited states and olefin radical cations in electron-transfer cycloreversion of four-membered ring compounds photosensitized by (thia)pyrylium salts.
- [239] T. Stafforst, U. Diederichsen, *Chem. Comm.* **2005**, , 3430-3432. (6-4)-Photolyase activity requires a charge shift reaction.
- [240] T. Stafforst, U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 32, 5376-5380. Thymine Oxetanes as Charge Traps for Chemical Monitoring of Nucleic Acid Mediated Transfer of Excess Electrons.
- [241] C. J. Venter, *Science* **2001**, *291*, 1304-1351. The Sequence of the Human Genome.
- [242] M. Tyers, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 6928, 193-197. From genomics to proteomics.
- [243] S. Fields, *Science* **2001**, *251*, 1221-1224. Proteomics in Genomeland.
- [244] M. Oishi, K. Dobashi, *Idenshi Igaku Mook* **2005**, *2*, 70-75. Forefront of 2D electrophoresis.
- [245] J. Klose, *Humangenetik* **1975**, *26*, 3, 231-243. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.

- [246] P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 10, 4007-4021. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
- [247] J. E. Celis, P. Gromov, M. Østergaard, P. Madsen, B. Honoré, K. Dejgaard, E. Olsen, H. Vorum, D. B. Kristensen, *e. a. Irina Gromova*, *FEBS Lett.* **1996**, *398*, 2-3, 129-134. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>.
- [248]<http://www.bio.davidson.edu/COURSES/genomics/2003/clement/yeastproteins.html>
- .
- [249] K. L. Stone, K. R. Williams, *Enzymatic Digestion of Proteins in Gels for Mass Spectrometric Identification and Structural Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., **2004**.
- [250] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 6928, 198-207. Mass spectrometry-based proteomics.
- [251] N. G. Ahn, J. B. Shabb, W. M. Old, K. E. Resing, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *2*, 1, 39-51. Achieving In-Depth Proteomics Profiling by Mass Spectrometry.
- [252] B. Domon, R. Aebersold, *Science* **2006**, *312*, 212-217. Mass spectrometry and protein analysis.
- [253] W. J. Henzel, C. Watanabe, J. T. Stults, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 9, 931-942. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting.
- [254] E. Mørtz, P. B. O'Connor, P. Roepstorff, N. L. Kelleher, T. D. Wood, F. W. McLafferty, M. Mann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 16. Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass spectral data against sequence data bases.
- [255] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 5, 850-858. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels.
- [256] D. J. C. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Curr. Biol.* **1993**, *3*, 6, 327-332. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting
- [257] W. Zhang, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 11, 2482-2489. ProFound: An Expert System for Protein Identification Using Mass Spectrometric Peptide Mapping Information.
- [258] P. L. Courchesne, M. D. Jones, J. H. Robinson, C. S. Spahr, S. McCracken, D. L. Bentley, R. Luethy, S. D. Patterson, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 956-967. Optimization of capillary chromatography ion trap-mass spectrometry for identification of gel-separated proteins.
- [259] G. J. Opiteck, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 8, 1518-1524. Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins.

- [260] D. Figeys, S. P. Gygi, Y. Zhang, J. Watts, M. Gu, R. Aebersold, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1811-1818. Electrophoresis combined with novel mass spectrometry techniques: powerful tools for the analysis of proteins and proteomes.
- [261] C. Neusüß, M. Pelzing, M. Macht, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3149-3159. A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry.
- [262] W. Kolch, C. Neusüß, M. Pelzing, H. Mischak, *Mass Spec. Rev.* **2005**, *24*, 6, 959-977. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery
- [263] S. Garza, M. Moini, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 20, 7309-7316. Analysis of Complex Protein Mixtures with Improved Sequence Coverage Using (CE-MS/MS)<sup>n</sup>.
- [264] J. Ladik, A. Bierman, *Physics Letters A* **1969**, *29*, 10, 636-637. Possibility of room-temperature superconductivity in double stranded DNA.
- [265] A. J. Link, J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, J. R. Yates III, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 7, 676-682. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry.
- [266] C. S. Spahr, M. T. Davis, M. D. McGinley, J. H. Robinson, E. J. Bures, J. Beierle, J. Mort, P. L. Courchesne, K. Chen, R. C. Wahl, W. Yu, R. Luethy, S. D. Patterson, *Proteomics* **2001**, *1*, 1, 93-107. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry I. Profiling an unfractionated tryptic digest
- [267] M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates III, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 3, 242-247. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology.
- [268] A. Motoyama, J. D. Venable, C. I. Ruse, J. R. Yates III, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 14, 5109-5118. Automated Ultra-High-Pressure Multidimensional Protein Identification Technology (UHP-MudPIT) for Improved Peptide Identification of Proteomic Samples.
- [269] J. Peng, J. E. Elias, C. C. Thoreen, L. J. Licklider, S. P. Gygi, *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 1, 43-50. Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC/LC-MS/MS) for Large-Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome.
- [270] M. Gilar, P. Olivova, A. E. Daly, J. C. Gebler, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 19, 6426-6434. Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography.
- [271] P. J. Boersma, N. Divecha, A. J. R. Heck, S. Mohammed, *Anal. Chem.* **2007**, *ASAP*. Evaluation and Optimization of ZIP-HILIC-RP as an Alternative MudPIT Strategy.

- [272] A. I. Nesvizhskii, R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 10, 1419-1440. Interpretation of shotgun proteomic data. The protein inference problem.
- [273] S. K. Swanson, M. P. Washburn, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 10, 719-725. The continuing evolution of shotgun proteomics.
- [274] W. Haas, B. K. Faherty, S. A. Gerber, J. E. Elias, S. A. Beausoleil, C. E. Bakalarski, X. Li, J. Villen, S. P. Gygi, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 7, 1326-1337. Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics.
- [275] M. L. Nielsen, M. M. Savitski, R. A. Zubarev, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 12, 2384-2391. Extent of modifications in human proteome samples and their effect on dynamic range of analysis in shotgun proteomics.
- [276] S. J. Cordwell, A. S. Nouwens, N. M. Verrills, D. J. Basseal, B. J. Walsh, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 6, 1094-1103. Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis gels.
- [277] M. Unlu, M. E. Morgan, J. S. Minden, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 11, 2071-2077. Difference Gel Electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts.
- [278] R. Tonge, J. Shaw, B. Middleton, R. Rowlinson, S. Rayner, J. Young, F. Pognan, E. Hawkins, I. Currie, M. Davison, *Proteomics* **2001**, *1*, 3, 377-396. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.
- [279] Y. Shiio, R. Aebersold, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1, 139-145. Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry.
- [280] K. Kubota, K. Wakabayashi, T. Matsuoka, *Proteomics* **2003**, *3*, 5, 616-626. Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography.
- [281] W. A. Tao, R. Aebersold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 1, 110-118. Advances in quantitative proteomics via stable isotope tagging and mass spectrometry.
- [282] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994-999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.
- [283] A. Sinz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, ASAP. Isotope-Labeled Photoaffinity Reagents and Mass Spectrometry To Identify Protein-Ligand Interactions.
- [284] M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 12, 952-958. Functional and quantitative proteomics using SILAC.

- [285] P. A. Everley, J. Krijgsveld, B. R. Zetter, S. P. Gygi, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 7, 729-735. Quantitative cancer proteomics: Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research.
- [286] S.-E. Ong, I. Kratchmarova, M. Mann, *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 2, 173-181. Properties of <sup>13</sup>C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC).
- [287] S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 5, 376-386. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.
- [288] M. F. de Godoy Lyris, V. Olsen Jesper, A. de Souza Gustavo, G. Li, P. Mortensen, M. Mann, *Genome Biol FIELD Full Journal Title:Genome biology* **2006**, *7*, 6, R50. Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system.
- [289] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760-1763. Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination.
- [290] B. Schweitzer, P. Predki, M. Snyder, *Proteomics* **2003**, *3*, 11, 2190-2199. Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale.
- [291] X. Huang, E. L. P. Tan, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Appl. Genomics Proteomics* **2003**, *2*, 225-238. Enzyme-targeting small-molecule probes for proteomics applications.
- [292] B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 6, 663-668. Chemical strategies for the global analysis of protein function.
- [293] D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 1, 87-95. Chemical proteomics and its application to drug discovery.
- [294] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 26, 14694-14699. Activity-based protein profiling: The serine hydrolases.
- [295] D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13, 4005-4015. Profiling Serine Hydrolase Activities in Complex Proteomes.
- [296] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 44, 7408-7411. Substrate Mimicry in an Activity-Based Probe That Targets the Nitrilase Family of Enzymes.
- [297] M.-L. Liau, R. C. Panicker, S. Q. Yao, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5, 1043-1046. Design and synthesis of an affinity probe that targets caspases in proteomic experiments.
- [298] G. Wang, U. Mahesh, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 5, 737-740. Solid-Phase Synthesis of Peptide Vinyl Sulfones as Potential Inhibitors and Activity-Based Probes of Cysteine Proteases.
- [299] Q. Zhu, X. Hang, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 13, 2669-2672. Activity-based fluorescent probes that target phosphatases.

- [300] M. Wilchek, E. Bayer, in *Methods in Enzymology*, Vol. 184 (Eds.: M. Wilchek, E. Bayer), Academic Press, New York, **1990**, pp. 14-45.
- [301] J.-j. Park, Y. Sadakane, K. Masuda, T. Tomohiro, T. Nakano, Y. Hatanaka, *ChemBioChem* **2005**, 6, 5, 814-818. Synthesis of Diazirinyl Photoprobe Carrying a Novel Cleavable Biotin.
- [302] S. H. L. Verhelst, M. Fonovic, M. Bogyo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, ASAP. A Mild Chemically Cleavable Linker System for Functional Proteomic Applications.
- [303] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 4, 535-546. Profiling Enzyme Activities In Vivo Using Click Chemistry Methods.
- [304] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16, 4686-4687. Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition.
- [305] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 9, 3057-3064. Peptidotriazoles on solid-phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides.
- [306] X. Tang, G. R. Munske, D. P. Adhikari, N. L. Zakharova, J. E. Bruce, *J. Proteome Res.* **2007**, ASAP. Profiling the Membrane Proteome of *Shewanella oneidensis* MR-1 with New Affinity Labeling Probes.
- [307] J. Chavez, J. Wu, B. Han, W.-G. Chung, C. S. Maier, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 19, 6847-6854. New Role for an Old Probe: Affinity Labeling of Oxylipid Protein Conjugates by *N*'-Aminooxymethylcarbonylhydrazino D-biotin.
- [308] A. Argyrou, L. Jin, L. Siconilfi-Baez, R. H. Angeletti, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **2006**, 45, 47, 13947-13953. Proteome-wide Profiling of Isoniazid Targets in *Mycobacterium tuberculosis*.
- [309] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 8, 805-809. Proteomic profiling of mechanistically distinct enzyme classes using a common chemotype.
- [310] M. C. Hagenstein, J. H. Mussnug, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, O. Kruse, N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 45, 5635-5638. Affinity-based tagging of protein families with reversible inhibitors: A concept for functional proteomics.
- [311] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 8, 3279-3301. Mechanism-based profiling of enzyme families.
- [312] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 9, 3006-3008. The Photolysis of Diazo-acetylchymotrypsin.
- [313] D. Robinette, N. Neamati, K. B. Tomer, C. H. Borchers, *Exp. Rev. Proteomics* **2006**, 3, 4, 399-408. Photoaffinity labeling combined with mass spectrometric approaches as a tool for structural proteomics.



- [314] Y. Sadakane, Y. Hatanaka, *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 209-217. Photochemical Fishing Approaches for Identifying Target Proteins and Elucidating the Structure of a Ligand-binding Region Using Carbene-generating Photoreactive Probes.
- [315] A. Kawamura, S. Hindi, *Chirality* **2005**, *17*, 6, 332-337. Protein Fishing with Chiral Molecular Baits.
- [316] Y. Hatanaka, Y. Sadakane, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 3, 271-288. Photoaffinity Labeling in Drug Discovery and Developments: Chemical Gateway for Entering Proteomic Frontier.
- [317] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 46, 12479-12520. Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling.
- [318] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483-514. New Photolabeling and Crosslinking Methods.
- [319] S. Srivastava, M. B. Cable, S. P. Driska, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *156*, 3, 447-451. Photoaffinity labelling of gizzard myosin with 3'- O-(4-benzoyl)-benzoic-adenosine 5'-triphosphate.
- [320] J. N. Pitts, H. W. Johnson, T. Kuwana, *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 12, 2456-2461. STRUCTURAL EFFECTS IN THE PHOTOCHEMICAL PROCESSES OF KETONES IN SOLUTION.
- [321] R. Breslow, S. Baldwin, T. Flechtner, P. Kalicky, S. Liu, W. Washburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 10, 3251-3262. Remote oxidation of steroids by photolysis of attached benzophenone groups.
- [322] R. E. Galardy, L. C. Craig, J. D. Jamieson, M. P. Printz, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 11, 3510-3518. Photoaffinity Labeling of Peptide Hormone Binding Sites
- [323] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 6, 170-177. Biomimetic control of chemical selectivity.
- [324] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1984**, *33*, 19, 5661-5673. Benzophenone Photophores in Biochemistry.
- [325] A. Gilbert, J. Baggott, *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific, Cambridge, MA, **1991**.
- [326] L. Ballell, K. J. Alink, M. Slijper, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, R. J. Pieters, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2, 291-295. A New Chemical Probe for Proteomics of Carbohydrate-Binding Proteins.
- [327] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 27, 10000-10005. Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases.

- [328] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 5, 274-281. Proteomic Profiling of metalloprotease activities with cocktails of active-site probes.
- [329] C. Grenot, T. Blachere, M. R. d. Ravel, E. Mappus, C. Y. Cuilleron, *Biochemistry* **1994**, 33, 30, 8969-8981. Identification of Trp-371 as the main site of specific photoaffinity labeling of corticosteroid binding globulin using  $\Delta 6$  derivatives of cortisol, corticosterone, and progesterone as unsubstituted photoreagents.
- [330] J. D. Young, S. M. Jarvis, M. J. Robins, A. R. Paterson, *J. Biol. Chem.* **1983**, 253, 4, 2202-2208. Photoaffinity labeling of the human erythrocyte nucleoside transporter by N6-(p-Azidobenzyl)adenosine and nitrobenzylthioinosine. Evidence that the transporter is a band 4.5 polypeptide
- [331] S. A. Fleming, D. B. Rawlins, V. Samano, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 22, 5968-5976. Photochemistry of nucleoside transport inhibitor 6-S-benzylated thiopurine ribonucleosides. Implications for a new class of photoaffinity labels.
- [332] T. T. Nikiforov, B. A. Connolly, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 6, 1209-1214. Oligodeoxynucleotides containing 4-thiothymidine and 6-thiothiopyrimidine as affinity labels for the Eco RV restriction endonuclease and modification methylase.
- [333] A. Favre, in *Biorganic Photochemistry, Vol. 1* (Ed.: H. Morrison), J. Wiley & Sons, New York, **1990**.
- [334] K. L. Wick, K. S. Matthews, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 10, 6106-6112. Interactions between lac repressor protein and site-specific bromodeoxyuridine-substituted operator DNA. Ultraviolet footprinting and protein-DNA cross-link formation.
- [335] N. C. C. Yang, A. Huang, a. D. D. H. Yang, *Journal of the American Chemical Chemistry* **1989**, 111, 20, 8060-8061. Photodehalogenation of 4-haloindoles.
- [336] G. W. J. Fleet, R. R. Porter, J. R. Knowles, *Nature* **1969**, 224, 511. Affinity Labelling of Antibodies with Aryl Nitrene as Reactive Group.
- [337] S. H. Burstein, C. A. Audette, A. Charalambous, S. A. Doyle, Y. Guo, S. A. Hunter, A. Makriyannis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1991**, 176, 1, 492-497. Detection of cannabinoid receptors by photoaffinity labelling.
- [338] I. Woelfle, B. Sauerwein, T. Autrey, G. B. Schuster, *Photochem. Photobiol.* **1988**, 47, 4, 497-501. The photochemistry of 3-nitrobenzoyl and 4-nitrobenzoyl azides: possible reagents for photoaffinity labeling.
- [339] T. Melvin, G. B. Schuster, *Photochem. Photobiol.* **1990**, 51, 2, 155-160. The photochemistry of acetyl-substituted aryl azides: the design of photolabeling agents for inert sites in hydrophobic regions.
- [340] G. B. Schuster, M. S. Platz, *Adv. Photochem.* **1992**, 17, 69-143. Photochemistry of Phenyl Azide.

- [341] M. A. Schwartz, *NATO ASI Ser., Ser. C; Photochem. Probes Biochem.* **1989**, 272, 157-168.
- [342] R. L. Brown, W. V. Gerber, J. W. Karpen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 11, 5369-5373. Specific Labeling and Permanent Activation of the Retinal Rod cGMP- Activated Channel by the Photoaffinity Analog 8-p-Azidophenacylthio-cGMP.
- [343] N. Lamarche, P. Gaudreau, B. Massie, Y. Langelier, *Anal. Biochem.* **1994**, 220, 2, 315-320. Affinity of Synthetic Peptides for the HSV-2 Ribonucleotide Reductase R1 Subunit Measured with an Iodinated Photoaffinity Peptide.
- [344] J. F. Resek, A. E. Ruoho, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 28, 14410-14416. Photoaffinity labeling the beta-adrenergic receptor with an iodoazido derivative of norepinephrine
- [345] R. K. Evans, B. E. Haley, *Biochemistry* **1987**, 26, 1, 269-276. Synthesis and biological properties of 5-azido-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate, a photoactive nucleotide suitable for making light-sensitive DNA.
- [346] J. V. Staros, H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1978**, 80, 3, 568-572. Reduction of aryl azides by thiols: Implications for the use of photoaffinity reagents.
- [347] M. Wright, A. D. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 943-948. Novel fluorescent labelled affinity probes for diadenosine-5',5'''-P<sub>1</sub>, P<sub>4</sub>-tetraphosphate (AP4A)-binding studies.
- [348] D. A. Julin, I. R. Lehman, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 19, 9044-9051. Photoaffinity labeling of the recBCD enzyme of Escherichia coli with 8- azidoadenosine 5'-triphosphate.
- [349] S. G. Powers-Lee, K. J. Corina, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 15, 9052-9056. Photoaffinity labeling of rat liver carbamoyl phosphate synthetase I by 8-azido-ATP
- [350] K. Palczewski, M. Kochman, *Biochemistry* **1987**, 26, 12, 3466-3471. Photoaffinity labeling of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase with 8-azido-1,N6-ethenoadenosine 5'-triphosphate.
- [351] D. Riber, M. Venkataramana, S. Sanyal, T. Duvold, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5, 1503-1505. Synthesis and Biological Evaluation of Photoaffinity Labeled Fusidic Acid Analogues.
- [352] H. Zhang, K. A. Lerro, S.-I. Takekuma, D.-J. Baek, C. Moquin-Patthey, M. F. Boehm, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 15, 6823-6831. Orientation of the Retinal 9-Methyl Group in Bacteriorhodopsin As Studied by Photoaffinity Labeling.
- [353] S. X. Cai, D. J. Glenn, J. F. W. Keana, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4, 1299-1304. Toward the development of radiolabeled fluorophenyl azide-based photolabeling reagents: synthesis and photolysis of iodinated 4-azidoperfluorobenzoates and 4-azido-3,5,6-trifluorobenzoates.

- [354] K. A. Schnapp, R. Poe, E. Leyva, N. Soundararajan, M. S. Platz, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, *2*, 172-177. Exploratory Photochemistry of Fluorinated Aryl Azides. Implications for the Design of Photoaffinity Labeling Reagents.
- [355] K. A. Schnapp, M. S. Platz, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, *2*, 178-183. A Laser Flash Photolysis Study of Di-, Tri- and Tetrafluorinated Phenylnitrenes; Implications for Photoaffinity Labeling.
- [356] M. J. T. Young, M. S. Platz, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, *17*, 2199-2202. Polyfluorinated aryl azides as photoaffinity labelling reagents; the room temperature CH insertion reactions of singlet pentafluorophenyl nitrene with alkanes
- [357] S. X. Cai, J. F. W. Keana, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, *40*, 5409-5412. 4-azido-2-iodo-3,5,6-trifluorophenylcarbonyl derivatives. A new class of functionalized and iodinated perfluorophenyl azide photolabels.
- [358] R. Poe, K. A. Schnapp, M. J. T. Young, J. Grayzar, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, *13*, 5054-5067. Chemistry and Kinetics of Singlet (Pentafluorophenyl)nitrene.
- [359] M. R. Cline, S. M. Mandel, M. Platz, *Biochemistry* **2007**, *ASAP*. Identification of the Reactive Intermediates Produced upon Photolysis of p-Azidoacetophenone and Its Tetrafluoro Analogue in Aqueous and Organic Solvents: Implications for Photoaffinity Labeling.
- [360] K. G. Pinney, K. E. Carlson, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, *Biochemistry* **1991**, *30*, *9*, 2421-2431. Efficient and Selective Photoaffinity Labeling of the Estrogen Receptor Using Two Nonsteroidal Ligands That Embody Aryl Azide or Tetrafluoroaryl Azide Photoreactive Functions.
- [361] K. G. Pinney, J. A. Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, *9*, 3125-3133. Synthesis of a Tetrafluoro-Substituted Aryl Azide and its Protio Analogue as Photoaffinity Labeling Reagents for the Estrogen Receptor.
- [362] K. Stromgaard, D. R. Saito, H. Shindou, S. Ishii, T. Shimizu, K. Nakanishi, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, *18*, 4038-4046. Ginkgolide Derivatives for Photolabeling Studies: Preparation and Pharmacological Evaluation.
- [363] P. J. Crocker, N. Imai, K. Rajagopalan, M. A. Boggess, S. Kwiatkowski, L. D. Dwyer, T. C. Vanaman, D. S. Watt, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, *6*, 419-424. Heterobifunctional Cross-Linking Agents Incorporating Perfluorinated Aryl Azides.
- [364] P. A. Bartlett, N. I. Carruthers, B. M. Winter, K. P. Long, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, *7*, 1284-1291.  $\alpha$ -Diazophosphonic acids as potential photoaffinity labeling reagents: synthesis, stability, and photochemistry.
- [365] P. A. Bartlett, K. P. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, *4*, 1267-1268. A new class of potential photoaffinity labels:  $\alpha$ -Diazophosphonic acids: synthesis and stability.

- [366] R. A. G. Smith, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 15, 5072-5073. Aryldiazirines. Potential reagents for photolabeling of biological receptor sites.
- [367] J. Brunner, G. Semenza, *Biochemistry* **1981**, *20*, 25, 7174-7182. Selective labeling of the hydrophobic core of membranes with 3-(trifluoromethyl)-3-(m-[125I]iodophenyl)diazirine, a carbene-generating reagent.
- [368] H. Bayley, J. R. Knowles, *Biochemistry* **1978**, *17*, 12, 2414-2423. Photogenerated reagents for membrane labeling. 2. Phenylcarbene and adamantylidene formed within the lipid bilayer.
- [369] J. Xi, M. J. Rossi, J. Yang, P. J. Loll, W. P. Dailey, R. G. Eckenhoff, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 6, 377-384. Photoactive Analogues of the Haloether Anesthetics Provide High-Resolution Features from Low-Affinity Interactions.
- [370] J. Lehmann, S. Petry, *Liebigs Ann.* **1993**, *1993*, 110, 1111-1116. (1-4)- $\beta$ -D-Galaktosyltransferase lässt sich durch photolabile Liganden im Akzeptor-Bindebereich spezifisch kovalent modifizieren.
- [371] C.-S. Kuhn, J. Lehmann, J. Steck, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 9, 3129-3134. Syntheses and properties of some photolabile  $\beta$ -thioglycosides. Potential photoaffinity reagents for  $\beta$ -glycoside hydrolases.
- [372] G. Stoll, R. Voges, W. Gerok, G. Kurz, *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 5, 843-857. Synthesis of a metabolically stable modified long-chain fatty acid salt and its photolabile derivative
- [373] J. Brunner, H. Senn, F. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8, 3313-3318. 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents
- [374] J. Brunner, F. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8, 3319-3329. Analysis of membranes photolabeled with lipid analogues. Reaction of phospholipids containing a disulfide group and a nitrene or carbene precursor with lipids and with gramicidin A
- [375] M. Platz, A. S. Admasu, S. Kwiatkowski, P. J. Crocker, N. Imai, D. S. Watt, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 5, 337-341. Photolysis of 3-aryl-3-(trifluoromethyl)diazirines: a caveat regarding their use in photoaffinity probes.
- [376] Y. Hatanaka, M. Hashimoto, H. Nakayama, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 5, 826-831. Syntheses of Nitro-Substituted Aryl Diazirines. An Entry to Chromogenic Carbene Precursors for Photoaffinity Labeling.
- [377] J. M. Rimoldi, D. G. L. Kingston, A. G. Chaudhary, G. Samaranayake, S. Grover, E. Hamel, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 8, 1313-1330. Modified Taxols, 9. Synthesis and Biological Evaluation of 7-Substituted Photoaffinity Analogues of Taxol.

- [378] M. Nassal, *Liebigs Ann.* **1983**, 1983, 9, 1510-1523. 4-(1-Azi-2,2,2-trifluoroethyl)benzoic Acid, a Highly Photolabile Carbene Generating Label Readily Fixable to Biochemical Agents
- [379] M. Dolder, H. Michel, H. Sigrist, *J. Prot. Chem.* **1990**, 9, 4, 407-415. 3-(Trifluoromethyl)-3-(*m*-isothiocyanophenyl)diazirine: Synthesis and chemical characterization of a heterobifunctional carbene-generating crosslinking reagent.
- [380] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Anal. Biochem.* **2006**, 348, 154-156. Practical conditions for photoaffinity labeling with 3-trifluoromethyl-3-phenyldiazirine photophore.
- [381] G. A. Korshunova, N. V. Sumbatyan, A. N. Topin, M. T. Mtchedlidze, *Mol. Biol.* **2000**, 34, 6, 966-983. Photoactivable Reagents Based on Aryl(trifluoromethyl)diazirines: Synthesis and Application for Studying Nucleic-Acid-Protein Interactions.
- [382] Y. Hatanaka, M. Hashimoto, H. Kurihara, H. Nakayama, Y. Kanaoka, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2, 383-387. A Novel Family of Aromatic Diazirines for Photoaffinity Labeling.
- [383] Y. Y. Agapkina, D. V. Agapkin, A. V. Zagorodnikov, Y. I. Alekseev, G. A. Korshunova, M. B. Gottikh, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2002**, 28, 4, 293-299. Synthesis of Oligonucleotide Derivatives with Aryl(trifluoromethyl)diazirine Moiety for the Photoaffinity Modification of Proteins and Nucleic Acids.
- [384] A. Rühmann, C. Wentrup, *Tetrahedron* **1994**, 50, 12, 3785-3796. Synthesis of a photoactivatable 9-*Z*-oleic acid for protein kinase C labeling.
- [385] L. B. Shih, H. Bayley, *Anal. Biochem.* **1985**, 144, 1, 132-141. A carbene-yielding amino acid for incorporation into peptide photoaffinity reagents.
- [386] Y. Hatanaka, E. Yoshida, H. Nakayama, Y. Kanaoka, *Bioorg. Chem.* **1989**, 17, 4, 482-485. Chromogenic diazirine: A new spectrophotometric approach for photoaffinity labeling.
- [387] E. W. S. Chan, S. Chattopadhyaya, R. C. Panicker, X. Huang, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 44, 14435-14446. Developing Photoactive Affinity Probes for Proteomic Profiling: Hydroxamate-based Probes for Metalloproteases.
- [388] T. Fujii, Y. Manabe, T. Sugimoto, M. Ueda, *Tetrahedron* **2005**, 61, 33, 7874-7893. Detection of 210 kDa receptor protein for a leaf-movement factor by using novel photoaffinity probes.
- [389] T. Kuroda, K. Suenaga, A. Sakakura, T. Handa, K. Okamoto, H. Kigoshi, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 2, 524-529. Study of the Interaction between Actin and Antitumor Substance Aplyronine A with a Novel Fluorescent Photoaffinity Probe.
- [390] J. T. Reardon, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 16, 5938-5945. Molecular Anatomy of the Human Excision Nuclease Assembled at Sites of DNA Damage.

- [391] U. Schweizer, T. Hey, G. Lipps, G. Krauss, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 15, 3183-3189. Photocrosslinking locates a binding site for the large subunit of human replication protein A to the damaged strand of cisplatin-modified DNA.
- [392] R. Wang, R. W. Alexander, M. VanLoock, S. Vladimirov, Y. Bukhtiyarov, S. C. Harvey, B. S. Cooperman, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 2, 521-540. Three-dimensional Placement of the Conserved 530 Loop of 16 S rRNA and of its Neighboring Components in the 30 S Subunit.
- [393] J. J. Tate, J. Persinger, B. Bartholomew, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 6, 1421-1426. Survey of four different photoreactive moieties for DNA photoaffinity labeling of yeast RNA polymerase III transcription complexes.
- [394] B. Bartholomew, G. A. Kassavetis, B. R. Braun, E. P. Geiduschek, *EMBO J.* **1990**, *9*, 7, 2197-2205. The subunit structure of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor III C probed with a novel photocrosslinking reagent.
- [395] P. Muralikrishna, B. S. Cooperman, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6, 1392-1398. A Photolabile Oligodeoxyribonucleotide Probe of the Decoding Site in the Small Subunit of the *Escherichia coli* Ribosome: Identification of Neighboring Ribosomal Components.
- [396] S. N. Khodyreva, O. I. Lavrik, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 6, 641-655. Photoaffinity labeling technique for studying DNA replication and DNA repair.
- [397] W. A. Wlassoff, M. I. Dobrikov, I. V. Safronov, R. Y. Dudko, V. S. Bogachev, V. V. Kandaurova, G. V. Shishkin, G. M. Dymshits, O. I. Lavrik, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 4, 352-360. Synthesis and Characterization of (d)NTP Derivatives Substituted with Residues of Different Photoreagents.
- [398] Z. K. Nazarkina, D. V. Pyshnyi, I. A. Pyshnaya, O. I. Lavrik, S. N. Khodyreva, *Biochemistry (Moscow)* **2005**, *70*, 12, 1327-1334. Use of Modified Flap Structures for Study of Base Excision Repair Proteins.
- [399] N. A. Lebedeva, N. I. Rechkunova, S. V. Dezhurov, S. N. Khodyreva, A. Favre, L. Blanco, O. I. Lavrik, *Biochim. Biophys. Act.* **2005**, *1751*, 150-158. Comparison of functional properties of mammalian DNA polymerase  $\lambda$  and DNA polymerase  $\beta$  in reactions of DNA synthesis related to DNA repair.
- [400] N. A. Lebedeva, N. I. Rechkunova, S. N. Khodyreva, A. Favre, O. I. Lavrik, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2002**, *297*, 4, 714-721. Photoaffinity labeling of proteins in bovine testis nuclear extract.
- [401] T. I. Gainutdinov, O. E. Shestova, L. A. Yakubov, M. I. Dobrikov, V. V. Vlassov, *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2002**, *51*, 7, 1198-1203. Sensitized photomodification of oligonucleotide-binding proteins displayed on the eucaryotic cell surface.

- [402] N. A. Lebedeva, N. I. Rechkunova, S. V. Dezhurov, S. N. Khodyreva, A. Favre, O. I. Lavrik, *Biochemistry (Moscow)* **2003**, *68*, 4, 476-481. A New Binary System for Photosensitized Labeling of DNA Polymerases in Nuclear Extract.
- [403] S. V. Dezhurov, S. N. Khodyreva, E. S. Plekhanova, O. I. Lavrik, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1, 215-222. A New Highly Efficient Photoreactive Analogue of dCTP. Synthesis, Characterization, and Application in Photoaffinity Modification of DNA Binding Proteins.
- [404] M. J. DellaVecchia, D. L. Croteau, M. Skorvaga, S. V. Dezhurov, O. I. Lavrik, B. V. Houten, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 43, 45245-45256. Analyzing the Handoff of DNA from UvrA to UvrB Utilizing DNA-Protein Photoaffinity Labeling.
- [405] C. X. Zhang, P. V. Chang, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 21, 6536-6537. Identification of Nuclear Proteins that Interact with Platinum-Modified DNA by Photoaffinity Labeling.
- [406] Y. Sadakane, T. Takagi, T. Tomohiro, K. Tsurusawa, K. Konoha, M. Kawahara, Y. Hatanaka, *Photomed. Photobiol.* **2004**, *26*, 35-40. Photoaffinity identification of DNA-binding proteins: comparison of labeling efficiency between photoreactive DNAs bearing diazirine or benzophenone.
- [407] M. Liebmann, F. D. Pasquale, A. Marx, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 12, 1965-1969. A New Photoactive Building Block for Investigation of DNA Backbone Interactions: Photoaffinity Labeling of Human DNA Polymerase  $\beta$ .
- [408] N. Hori, S. Iwai, H. Inoue, E. Ohtsuka, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22, 15591-15594. Photoaffinity Labeling of T4 Endonuclease V with a Substrate Containing a Phenyl diazirine Derivative.
- [409] M. Taranenko, A. Rykhlevskaya, M. Mtchedlidze, J. Laval, S. Kuznetsova, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 14, 2945-2949. Photochemical cross-linking of *Escherichia coli* Fpg protein to DNA duplexes containing phenyl(trifluoromethyl)diazirine groups.
- [410] M. Rogacheva, A. Ishchenko, M. Sapparbaev, S. Kuznetsova, V. Ogryzko, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 43, 32353-32365. High Resolution Characterization of Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase Interaction with Its Substrate by Chemical Cross-linking and Mass Spectrometry Using Substrate Analogs.
- [411] T. Yamaguchi, K. Suyama, K. Narita, S. Kohgo, A. Tomikawa, M. Saneyoshi, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 12, 2352-2358. Synthesis and evaluation of oligodeoxynucleotides containing an aryl(trifluoromethyl)diazirine moiety as the cross-linking probe: photoaffinity labeling of mammalian DNA polymerase  $\beta$ .



- [412] T. Yamaguchi, M. Saneyoshi, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 17, 3364-3369. A photolabile 2', 3'-dideoxyuridylylate analog bearing an aryl(trifluoromethyl)diazirine moiety: photoaffinity labeling of HIV-1 reverse transcriptase.
- [413] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 23, 10383-10393. Energy- and electron-transfer processes involving palladium porphyrins bound to DNA.
- [414] S. Encinas, N. Belmadoui, M. J. Climent, S. Gil, M. A. Miranda, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 7, 857-862. Photosensitization of Thymine Nucleobase by Benzophenone Derivatives as Models for Photoinduced DNA Damage: Paterno-Büchi vs Energy and Electron Transfer Processes.
- [415] I. v. Wilucki, H. Matthäus, C. H. Krauch, *Photochem. Photobiol.* **1967**, *6*, 497-500. Photosensibilisierte Cyclodimerisation von Thymin in Lösung.
- [416] H. Vorbrüggen, K. Krolikiewicz, B. Bennua, *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1234-1255. Nucleoside Synthesis with Trimethyl Triflate and Perchlorate as Catalyst.
- [417] N. Zhang, H.-M. Chen, V. Koch, H. Schmitz, M. Minczuk, P. Stepień, A. I. Fattom, R. B. Naso, K. Kalicharran, P. Borowski, R. S. Hosmane, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 22, 4776-4789. Potent Inhibition of NTPase/Helicase of the West Nile Virus by Ring-Expanded ("Fat") Nucleoside Analogues.
- [418] T. Itahara, Y. Fujii, M. Tada, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 15, 3421-3424. Oxidation of Thymines by Peroxosulfate Ions in Water.
- [419] C. Frier, J.-L. Décout, M. Fontecave, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3520. Methods for Preparing New Flavin Derivatives: Synthesis of Flavin-Thymine Nucleotides and Flavin-Oligonucleotide Adducts.
- [420] T. Carell, C. Behrens, J. Gierlich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2221-2228. Electron transfer Through DNA and Metal-Containing DNA.
- [421] B. C. Froehler, *Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ, United States)* **1993**, *20*, Protocols for Oligonucleotides and Analogs, 63-80. Oligodeoxynucleotide synthesis. H-phosphonate approach.
- [422] R. Traber, H. E. A. Kramer, P. Hemmerich, *Biochemistry* **1982**, *21*, 7, 1687-1693. Mechanism of Light-induced Reduction of Biological Redox Centers by Amino Acids. A Flash Photolysis Study of Flavin Photoreduction by Ethylenediaminetetraacetate and Nitrilotriacetate.
- [423] E. Haumont, L. Droogmans, H. Grosjean, *Eur. J. Biochem* **1987**, *168*, 219-225. Enzymatic formation of queuosine and galactosyl queuosine in yeast tRNAs microinjected into *Xenopus laevis* oocytes.
- [424] L. K. Patterson, K. M. Bansal, *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 17, 2392-2399. Pulse radiolysis studies of 5-halouracils in aqueous solutions.

- [425] A. Möller, A. Nordheim, S. A. Kozlowski, D. Patel, A. Rich, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1, 54-62. Bromination stabilizes poly(dG-dC) in the Z-DNA form under low-salt conditions.
- [426] S. T. Gaballah, G. Collier, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 24, 12175-12181. Charge Transfer Excited-State Dynamics in DNA Duplexes Substituted with an Ethynylpyrenyldeoxyuridine Electron Source and a Fluorodeoxyuridine Electron Trap.
- [427] A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2, 318-321. Complex Sequence Dependence by Excess-Electron Transfer through DNA with Different Strength Electron Acceptors
- [428] M. Ober, H. Müller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 51, 18143-18149. Base Pairing and Replicative Processing of the Formamidopyrimidine-dG DNA Lesion.
- [429] F. Brueckner, U. Hennecke, T. Carell, P. Cramer, *Science* **2007**, *315*, 859-862. CPD Damage Recognition by Transcribing RNA Polymerase II.
- [430] J. D. Hirsch, L. Eslamizar, B. J. Filanoski, N. Malekzadeh, R. P. Haugland, J. M. Beecham, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **2002**, *308*, 343-357. Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection and isolation.
- [431] G. Orr, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 761-766. The use of 2-iminobiotin-avidin interaction for the selective retrieval of labeled plasma membrane components.
- [432] V. Serebryany, L. Beigelman, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1983-1985. An efficient preparation of protected ribonucleosides for phosphoramidite RNA synthesis.
- [433] R. Huisgen, *1,3 [One,Three]-Dipolar Cycloaddit. Chem.* **1984**, *1*, 1-176. 1,3-Dipolar cycloaddition - introduction, survey, mechanism.
- [434] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11, 3192-3193. Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition.
- [435] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 14, 2596-2599. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes.
- [436] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 17, 3639-3642. Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA.
- [437] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5, 1398-1399. Directed DNA Metallization.

- [438] J. Khyse-Anderson, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1984**, *10*, 203-209. Electroblothing of multiples gels: A simple apparatus without buffertanks for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose.
- [439] R. M. A. Costa, V. Chigancas, R. d. S. Galhardo, H. Carvalho, C. F. M. Menck, *Biochimie* **2003**, *85*, 11, 1083-1099. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway.
- [440] R. Dip, U. Camenisch, H. Naegeli, *DNA Repair* **2004**, *3*, 11, 1409-1423. Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair.
- [441] Q. Ding, L. Xiao, S. Xiong, Y. Jia, H. Que, Y. Guo, S. Liu, *Proteomics* **2003**, *3*, 1313-1317. Unmatched masses in peptide mass fingerprints caused by cross-contamination: An updated statistical result.
- [442] W. A. Harris, D. J. Janecki, J. P. Reilly, *Rapid. Comm. Mass. Spec.* **2002**, *16*, 1714-1722. Use of matrix clusters and trypsin autolysis fragments as mass calibrants in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectrometry.
- [443] D. Dignam, R. M. Lebovitz, R. G. Roeder, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 5, 1475-1489. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.

## Anhang

## A. Röntgenstrukturdaten von Verbindung 87

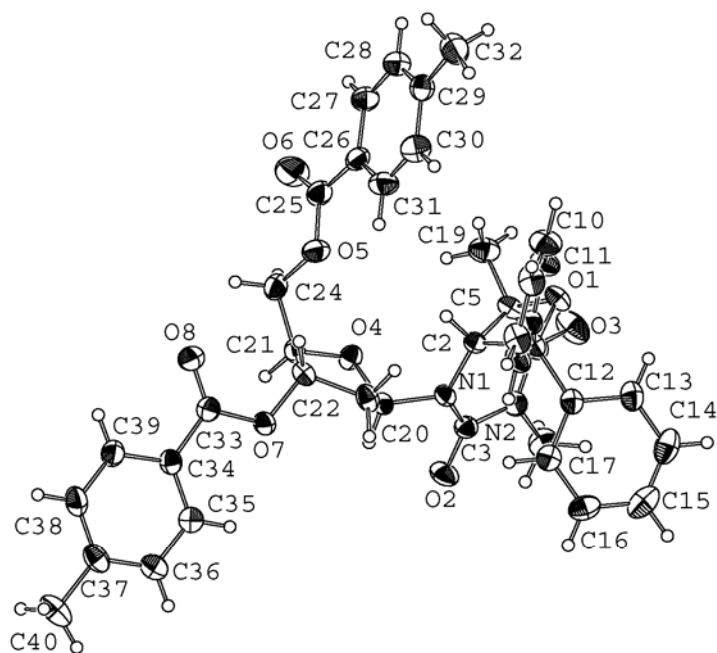


Abb. A1. Struktur und Atomnummerierung von Verbindung 87.

Tabelle A1. Allgemeine Kristalldaten, Datenaufnahme und -verfeinerung.

Kristalldaten	
Summenformel	$C_{40}H_{38}N_2O_8$
Molekülmasse	674.72
Habitus	farblose Platte
Kristallgröße [mm]	$0.33 \times 0.43 \times 0.53$
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	$P2_1$ (Nr. 4)
a, b, c [Å]	10.855(2), 14.361(3), 11.353(2)

## Anhang

$\alpha, \beta, \gamma$ [°]	90.00(0), 100.52(3), 90.00(0)
$V$ [Å <sup>3</sup> ]	1740.0(6)
$Z$	2
$\rho_{\text{ber.}}$ [g/cm <sup>3</sup> ]	1.288
$\mu$ [mm <sup>-1</sup> ]	0.09
$F(000)$	712

### Datensammlung

Temperatur [K]	295(2)
Strahlung Mo-K $\alpha$ [Å]	0.71073
$\Theta_{\text{min}}, \Theta_{\text{max}}$ [°]	2.78, 25.57
Datensatz (h;k;l)	-13/13 ; -17/17 ; -13/13
Gesamtzahl Reflexe	7030
unabhängige Reflexe	3315
beobachtete Reflexe [ $I > 2\sigma I$ ]	2752
$R_{\text{int}}$	0.0181

### Verfeinerung

$N_{\text{Reflexe}}, N_{\text{Parameter}}$	3315, 451
$R, \omega R_2, S$	0.0363, 0.0910, 1.058
$\omega = 1/[\sigma^2(F_0^2) + (0.0548 \cdot P)^2 + 0.2614 \cdot P]$ mit $P = (F_0^2 + 2F_c^2)/3$	
Flack X	0(10)
$\Delta\rho_{\text{min}}, \Delta\rho_{\text{max}}$ [e/Å <sup>3</sup> ]	-0.146, 0.177

## Anhang

**Tabelle A2:** Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotrope Temperaturfaktoren der Nichtwasserstoffatome ( $\text{Å}^2 \times 10^3$ ).  $U(\text{eq})$  ist definiert als ein Drittel des Betrags des orthogonalisierten  $U_{ij}$ -Tensors ( $U_{\text{eq}} = \frac{1}{3} \sum_i \sum_j U_{ij} a_i^* a_j^* a_i a_j$ ).

Atom	x	y	z	U(eq)
O(1)	3893(2)	6921(2)	9629(2)	51(1)
O(2)	1457(2)	4421(2)	7109(2)	65(1)
O(3)	5281(2)	5622(2)	8368(3)	83(1)
O(4)	630(2)	6700(2)	6067(2)	49(1)
O(5)	496(2)	8666(2)	6055(2)	59(1)
O(6)	1551(3)	9469(3)	4881(2)	98(1)
O(7)	-2496(2)	6845(2)	6109(2)	49(1)
O(8)	-3124(2)	8120(2)	5047(3)	75(1)
N(1)	1504(2)	5911(2)	7778(2)	43(1)
N(2)	3349(2)	5006(2)	7938(2)	51(1)
C(1)	2642(2)	6645(2)	9825(2)	42(1)
C(2)	2220(3)	6653(2)	8418(2)	41(1)
C(3)	2047(3)	5077(2)	7568(3)	47(1)
C(4)	4164(3)	5733(3)	8213(3)	55(1)
C(5)	3605(3)	6690(2)	8361(3)	48(1)
C(6)	2099(3)	7392(2)	10520(2)	44(1)
C(7)	984(3)	7254(3)	10930(3)	56(1)
C(8)	523(3)	7927(3)	11595(3)	63(1)
C(9)	1157(3)	8743(3)	11881(3)	64(1)
C(10)	2259(4)	8892(3)	11471(4)	75(1)
C(11)	2718(3)	8222(3)	10787(3)	61(1)
C(12)	2701(3)	5696(2)	10429(3)	46(1)
C(13)	3809(3)	5440(3)	11188(3)	62(1)
C(14)	3895(5)	4592(3)	11759(4)	79(1)
C(15)	2896(5)	3986(3)	11589(4)	81(1)
C(16)	1800(4)	4233(3)	10852(3)	66(1)
C(17)	1698(3)	5087(2)	10280(3)	53(1)
C(18)	3881(4)	4068(3)	7907(4)	77(1)
C(19)	4048(4)	7413(3)	7579(4)	69(1)
C(20)	328(3)	6138(2)	6997(2)	43(1)
C(21)	-459(3)	7202(2)	5525(2)	46(1)
C(22)	-1281(2)	7282(2)	6496(3)	47(1)
C(23)	-590(3)	6716(3)	7544(3)	53(1)
C(24)	-40(4)	8098(3)	5049(3)	59(1)
C(25)	1269(3)	9346(3)	5848(3)	60(1)
C(26)	1691(3)	9938(2)	6895(3)	54(1)
C(27)	2505(3)	10663(3)	6797(4)	67(1)
C(28)	2868(3)	11279(3)	7722(4)	69(1)
C(29)	2417(3)	11202(3)	8785(4)	62(1)
C(30)	1629(4)	10458(3)	8888(4)	68(1)
C(31)	1254(3)	9845(3)	7972(4)	66(1)
C(32)	2760(4)	11901(3)	9775(4)	81(1)
C(33)	-3349(3)	7352(2)	5368(3)	48(1)
C(34)	-4553(3)	6857(2)	5010(3)	48(1)
C(35)	-4743(3)	5947(2)	5338(3)	52(1)
C(36)	-5887(3)	5521(3)	4977(3)	60(1)
C(37)	-6878(3)	5995(3)	4298(3)	59(1)

## Anhang

C(38)	-6691(3)	6899(3)	3974(3)	65(1)
C(39)	-5546(3)	7331(3)	4318(3)	59(1)
C(40)	-8144(3)	5533(4)	3907(4)	80(1)

**Tabelle A3.** Wasserstoffatomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und isotrope Temperaturfaktoren ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ). ( $U_{\text{eq}} = \frac{1}{4} \sum_i \Sigma_j U_{ij} a_i^* a_j^* a_i a_j$ ). Für isotrope Atome haben die Temperaturfaktoren die Form  $e^{-T}$  mit  $T = 8\pi^2 U \cdot (\sin \theta / \lambda)^2$ .

Atom	x	y	z	U(eq)
H(2)	1828	7252	8162	49
H(7)	544	6700	10753	67
H(8)	-230	7825	11855	76
H(9)	848	9190	12344	77
H(10)	2697	9446	11655	90
H(11)	3455	8336	10504	73
H(13)	4490	5844	11309	75
H(14)	4635	4425	12265	95
H(15)	2965	3412	11973	97
H(16)	1123	3825	10737	80
H(17)	947	5254	9790	63
H(18A)	3428	3732	7234	93
H(18B)	3817	3744	8633	93
H(18C)	4746	4115	7834	93
H(19A)	3719	7276	6753	82
H(19B)	4947	7410	7706	82
H(19C)	3761	8016	7776	82
H(20)	-82	5565	6658	52
H(21)	-911	6836	4854	55
H(22)	-1373	7932	6725	57
H(23A)	-154	7120	8169	64
H(23B)	-1164	6322	7879	64
H(24A)	577	7977	4549	70
H(24B)	-748	8415	4569	70
H(27)	2813	10736	6090	81
H(28)	3425	11756	7634	83
H(30)	1346	10373	9606	82
H(31)	706	9364	8066	79
H(32A)	2644	12519	9451	97
H(32B)	3621	11817	10147	97
H(32C)	2234	11813	10361	97
H(35)	-4092	5620	5806	63
H(36)	-5995	4906	5194	72
H(38)	-7349	7226	3515	78
H(39)	-5438	7943	4085	71
H(40A)	-8733	5786	4357	96
H(40B)	-8064	4874	4048	96
H(40C)	-8436	5644	3069	96

## Anhang

**Tabelle A4.** Anisotrope Temperaturfaktoren ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ). Für anisotrope Atome haben die Faktoren die Form  $T = -2 \pi^2 \sum_{ij} [h_i h_j U_{ij} a_i^* a_j^*]$ .

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
O(1)	36(1)	64(1)	53(1)	-17(1)	10(1)	-11(1)
O(2)	63(1)	48(1)	80(2)	-22(1)	5(1)	-9(1)
O(3)	44(1)	93(2)	114(2)	-36(2)	16(1)	4(1)
O(4)	46(1)	57(1)	45(1)	7(1)	15(1)	5(1)
O(5)	71(2)	51(1)	60(1)	2(1)	21(1)	-12(1)
O(6)	108(2)	126(3)	64(2)	10(2)	26(2)	-48(2)
O(7)	35(1)	49(1)	61(1)	2(1)	1(1)	1(1)
O(8)	58(1)	61(2)	100(2)	23(2)	-2(1)	-6(1)
N(1)	42(1)	41(1)	43(1)	-4(1)	0(1)	-4(1)
N(2)	50(1)	46(1)	55(1)	-6(1)	8(1)	6(1)
C(1)	32(1)	47(2)	45(1)	-6(1)	4(1)	-3(1)
C(2)	41(1)	39(1)	43(1)	-7(1)	8(1)	-3(1)
C(3)	51(2)	42(2)	47(2)	-4(1)	9(1)	-2(1)
C(4)	44(2)	66(2)	56(2)	-13(2)	15(1)	0(2)
C(5)	42(2)	51(2)	54(2)	-14(2)	13(1)	-10(1)
C(6)	45(2)	47(2)	38(1)	-5(1)	2(1)	1(1)
C(7)	45(2)	61(2)	61(2)	-18(2)	9(1)	-2(2)
C(8)	53(2)	74(2)	63(2)	-16(2)	11(2)	11(2)
C(9)	63(2)	65(2)	63(2)	-19(2)	8(2)	17(2)
C(10)	84(3)	45(2)	96(3)	-23(2)	16(2)	-3(2)
C(11)	57(2)	56(2)	71(2)	-19(2)	16(2)	-8(2)
C(12)	49(2)	48(2)	42(1)	-7(1)	9(1)	6(1)
C(13)	54(2)	69(2)	60(2)	-5(2)	0(2)	13(2)
C(14)	83(3)	80(3)	72(2)	12(2)	9(2)	35(2)
C(15)	114(4)	67(3)	67(2)	15(2)	35(2)	26(3)
C(16)	84(3)	53(2)	71(2)	-2(2)	36(2)	1(2)
C(17)	56(2)	54(2)	49(2)	-4(2)	12(1)	3(2)
C(18)	80(3)	53(2)	96(3)	-9(2)	9(2)	19(2)
C(19)	66(2)	70(2)	74(2)	-3(2)	27(2)	-18(2)
C(20)	41(1)	48(2)	38(1)	0(1)	0(1)	-6(1)
C(21)	44(2)	51(2)	40(1)	-2(1)	2(1)	1(1)
C(22)	37(1)	54(2)	50(2)	-8(2)	5(1)	-5(1)
C(23)	39(1)	79(2)	42(2)	-5(2)	8(1)	-2(2)
C(24)	60(2)	63(2)	51(2)	10(2)	6(1)	1(2)
C(25)	50(2)	68(2)	64(2)	19(2)	13(2)	-4(2)
C(26)	47(2)	51(2)	63(2)	16(2)	11(1)	3(2)
C(27)	59(2)	73(2)	73(2)	16(2)	18(2)	-13(2)
C(28)	59(2)	64(2)	83(3)	14(2)	7(2)	-12(2)
C(29)	46(2)	56(2)	81(2)	7(2)	1(2)	7(2)
C(30)	71(2)	67(2)	73(2)	-1(2)	27(2)	-2(2)
C(31)	59(2)	60(2)	81(2)	7(2)	22(2)	-11(2)
C(32)	69(2)	81(3)	89(3)	-11(2)	1(2)	0(2)
C(33)	45(2)	48(2)	51(2)	0(2)	10(1)	4(1)
C(34)	41(1)	58(2)	44(2)	-2(1)	8(1)	4(1)
C(35)	49(2)	56(2)	53(2)	-1(2)	12(1)	2(2)
C(36)	56(2)	61(2)	62(2)	-8(2)	13(2)	-7(2)
C(37)	47(2)	79(3)	52(2)	-17(2)	11(2)	-8(2)



## Anhang

C(38)	44(2)	85(3)	62(2)	5(2)	-1(1)	4(2)
C(39)	48(2)	67(2)	61(2)	10(2)	3(1)	2(2)
C(40)	49(2)	103(3)	87(3)	-34(3)	11(2)	-18(2)

*Tabelle A5. Bindungslängen (Å).*

Bindung	Länge	Bindung	Länge
O(1)-C(5)	1.455(4)	C(13)-C(14)	1.376(6)
O(1)-C(1)	1.470(3)	C(14)-C(15)	1.375(7)
O(2)-C(3)	1.203(4)	C(15)-C(16)	1.370(6)
O(3)-C(4)	1.203(4)	C(16)-C(17)	1.384(5)
O(4)-C(20)	1.414(4)	C(20)-C(23)	1.514(4)
O(4)-C(21)	1.425(4)	C(21)-C(24)	1.498(5)
O(5)-C(25)	1.336(4)	C(21)-C(22)	1.544(4)
O(5)-C(24)	1.438(4)	C(22)-C(23)	1.521(4)
O(6)-C(25)	1.206(4)	C(25)-C(26)	1.465(5)
O(7)-C(33)	1.346(4)	C(26)-C(27)	1.383(5)
O(7)-C(22)	1.454(3)	C(26)-C(31)	1.396(5)
O(8)-C(33)	1.200(4)	C(27)-C(28)	1.375(6)
N(1)-C(3)	1.374(4)	C(28)-C(29)	1.387(6)
N(1)-C(2)	1.436(4)	C(29)-C(30)	1.387(5)
N(1)-C(20)	1.452(4)	C(29)-C(32)	1.502(6)
N(2)-C(4)	1.368(4)	C(30)-C(31)	1.367(6)
N(2)-C(3)	1.402(4)	C(33)-C(34)	1.478(4)
N(2)-C(18)	1.469(5)	C(34)-C(35)	1.385(5)
C(1)-C(6)	1.515(4)	C(34)-C(39)	1.391(4)
C(1)-C(12)	1.521(4)	C(35)-C(36)	1.378(5)
C(1)-C(2)	1.579(4)	C(36)-C(37)	1.383(5)
C(2)-C(5)	1.518(4)	C(37)-C(38)	1.374(6)
C(4)-C(5)	1.523(5)	C(37)-C(40)	1.518(5)
C(5)-C(19)	1.502(5)	C(38)-C(39)	1.381(5)
C(6)-C(11)	1.374(5)		
C(6)-C(7)	1.388(4)		
C(7)-C(8)	1.375(5)		
C(8)-C(9)	1.368(6)		
C(9)-C(10)	1.377(6)		
C(10)-C(11)	1.385(5)		
C(12)-C(17)	1.382(4)		
C(12)-C(13)	1.395(4)		

*Tabelle A6. Bindungswinkel(°).*

Bindung	Winkel	Bindung	Winkel
C(5)-O(1)-C(1)	92.89(18)	C(12)-C(17)-C(16)	120.6(3)
C(20)-O(4)-C(21)	108.9(2)	O(4)-C(20)-N(1)	106.6(2)
C(25)-O(5)-C(24)	116.8(3)	O(4)-C(20)-C(23)	104.7(3)

## Anhang

C(33)-O(7)-C(22)	115.9(2)	N(1)-C(20)-C(23)	116.4(2)
C(3)-N(1)-C(2)	121.7(2)	O(4)-C(21)-C(24)	107.9(3)
C(3)-N(1)-C(20)	116.6(2)	O(4)-C(21)-C(22)	105.7(2)
C(2)-N(1)-C(20)	118.5(2)	C(24)-C(21)-C(22)	116.5(3)
C(4)-N(2)-C(3)	126.0(3)	O(7)-C(22)-C(23)	107.3(3)
C(4)-N(2)-C(18)	117.7(3)	O(7)-C(22)-C(21)	111.3(2)
C(3)-N(2)-C(18)	116.0(3)	C(23)-C(22)-C(21)	104.6(2)
O(1)-C(1)-C(6)	110.2(2)	C(20)-C(23)-C(22)	103.9(2)
O(1)-C(1)-C(12)	110.2(2)	O(5)-C(24)-C(21)	107.9(3)
C(6)-C(1)-C(12)	112.8(2)	O(6)-C(25)-O(5)	122.6(4)
O(1)-C(1)-C(2)	87.2(2)	O(6)-C(25)-C(26)	124.1(3)
C(6)-C(1)-C(2)	117.0(2)	O(5)-C(25)-C(26)	113.3(3)
C(12)-C(1)-C(2)	116.3(2)	C(27)-C(26)-C(31)	117.8(3)
N(1)-C(2)-C(5)	116.9(2)	C(27)-C(26)-C(25)	118.8(3)
N(1)-C(2)-C(1)	122.5(2)	C(31)-C(26)-C(25)	123.3(3)
C(5)-C(2)-C(1)	86.4(2)	C(28)-C(27)-C(26)	121.4(4)
O(2)-C(3)-N(1)	123.1(3)	C(27)-C(28)-C(29)	121.0(4)
O(2)-C(3)-N(2)	120.0(3)	C(30)-C(29)-C(28)	117.1(4)
N(1)-C(3)-N(2)	116.9(3)	C(30)-C(29)-C(32)	121.6(4)
O(3)-C(4)-N(2)	121.7(3)	C(28)-C(29)-C(32)	121.2(4)
O(3)-C(4)-C(5)	121.0(3)	C(31)-C(30)-C(29)	122.3(4)
N(2)-C(4)-C(5)	117.3(3)	C(30)-C(31)-C(26)	120.2(3)
O(1)-C(5)-C(19)	113.2(3)	O(8)-C(33)-O(7)	122.2(3)
O(1)-C(5)-C(2)	90.1(2)	O(8)-C(33)-C(34)	125.2(3)
C(19)-C(5)-C(2)	118.4(3)	O(7)-C(33)-C(34)	112.6(3)
O(1)-C(5)-C(4)	107.3(3)	C(35)-C(34)-C(39)	118.4(3)
C(19)-C(5)-C(4)	112.4(3)	C(35)-C(34)-C(33)	123.2(3)
C(2)-C(5)-C(4)	113.0(3)	C(39)-C(34)-C(33)	118.4(3)
C(11)-C(6)-C(7)	118.1(3)	C(36)-C(35)-C(34)	120.7(3)
C(11)-C(6)-C(1)	120.5(3)	C(35)-C(36)-C(37)	120.9(4)
C(7)-C(6)-C(1)	121.3(3)	C(38)-C(37)-C(36)	118.5(3)
C(8)-C(7)-C(6)	120.7(3)	C(38)-C(37)-C(40)	120.4(4)
C(9)-C(8)-C(7)	121.0(3)	C(36)-C(37)-C(40)	121.1(4)
C(8)-C(9)-C(10)	118.9(3)	C(37)-C(38)-C(39)	121.2(3)
C(9)-C(10)-C(11)	120.3(4)	C(38)-C(39)-C(34)	120.3(4)
C(6)-C(11)-C(10)	121.0(3)	C(15)-C(14)-C(13)	120.7(4)
C(17)-C(12)-C(13)	118.7(3)	C(16)-C(15)-C(14)	119.8(4)
C(17)-C(12)-C(1)	122.9(3)	C(15)-C(16)-C(17)	120.1(4)
C(13)-C(12)-C(1)	118.4(3)	C(14)-C(13)-C(12)	120.1(4)

*Tabelle A7. Torsionswinkel (°).*

Bindung	Winkel	Bindung	Winkel
C5 O1 C1 C6	-132.0(2)	C11 C6 C7 C8	-0.7(5)
C5 O1 C1 C12	102.8(2)	C1 C6 C7 C8	177.8(3)
C5 O1 C1 C2	-14.2(2)	C6 C7 C8 C9	-0.7(5)
C3 N1 C2 C5	27.3(4)	C7 C8 C9 C10	1.2(6)
C20 N1 C2 C5	-131.4(3)	C8 C9 C10 C11	-0.4(6)
C3 N1 C2 C1	-76.5(3)	C7 C6 C11 C10	1.6(5)
C20 N1 C2 C1	124.8(3)	C1 C6 C11 C10	-176.9(3)
O1 C1 C2 N1	133.5(3)	C9 C10 C11 C6	-1.1(6)

## Anhang

C6 C1 C2 N1	-115.2(3)	O1 C1 C12 C17	-151.6(3)
C12 C1 C2 N1	22.3(4)	C6 C1 C12 C17	84.6(3)
O1 C1 C2 C5	13.6(2)	C2 C1 C12 C17	-54.5(4)
C6 C1 C2 C5	124.9(3)	O1 C1 C12 C13	9.9(3)
C12 C1 C2 C5	-97.6(3)	C6 C1 C12 C13	-93.8(3)
C2 N1 C3 O2	174.7(3)	C2 C1 C12 C13	127.0(3)
C20 N1 C3 O2	-26.3(4)	C17 C12 C13 C14	0.9(5)
C2 N1 C3 N2	-4.2(4)	C1 C12 C13 C14	179.4(3)
C20 N1 C3 N2	154.9(3)	C12 C13 C14 C15	0.1(6)
C4 N2 C3 O2	164.1(3)	C13 C14 C15 C16	-0.6(6)
C18 N2 C3 O2	-9.4(5)	C14 C15 C16 C17	0.1(6)
C4 N2 C3 N1	17.1(4)	C13 C12 C17 C16	-1.4(5)
C18 N2 C3 N1	169.4(3)	C1 C12 C17 C16	-179.8(3)
C3 N2 C4 O3	-169.9(3)	C15 C16 C17 C12	0.9(5)
C18 N2 C4 O3	3.5(5)	C21 O4 C20 N1	-160.1(2)
C3 N2 C4 C5	12.3(5)	C21 O4 C20 C23	-36.2(3)
C18 N2 C4 C5	-174.3(3)	C3 N1 C20 O4	-95.0(3)
C1 O1 C5 C19	136.0(3)	C2 N1 C20 O4	64.8(3)
C1 O1 C5 C2	14.8(2)	C3 N1 C20 C23	148.7(3)
C1 O1 C5 C4	-99.4(2)	C2 N1 C20 C23	-51.5(4)
N1 C2 C5 O1	-138.6(3)	C20 O4 C21 C24	150.9(3)
C1 C2 C5 O1	-13.8(2)	C20 O4 C21 C22	25.5(3)
N1 C2 C5 C19	104.8(3)	C33 O7 C22 C23	166.0(2)
C1 C2 C5 C19	-130.4(3)	C33 O7 C22 C21	-80.1(3)
N1 C2 C5 C4	-29.7(4)	O4 C21 C22 O7	-120.0(3)
C1 C2 C5 C4	95.1(3)	C24 C21 C22 O7	120.1(3)
O3 C4 C5 O1	-68.8(4)	O4 C21 C22 C23	-4.5(3)
N2 C4 C5 O1	109.0(3)	C24 C21 C22 C23	-124.4(3)
O3 C4 C5 C19	56.3(4)	O4 C20 C23 C22	31.5(3)
N2 C4 C5 C19	-125.9(3)	N1 C20 C23 C22	148.8(3)
O3 C4 C5 C2	-166.5(3)	O7 C22 C23 C20	102.2(3)
N2 C4 C5 C2	11.3(4)	C21 C22 C23 C20	-16.0(3)
O1 C1 C6 C11	5.4(4)	C25 O5 C24 C21	159.3(3)
C12 C1 C6 C11	129.2(3)	O4 C21 C24 O5	-68.4(3)
C2 C1 C6 C11	-91.9(3)	C22 C21 C24 O5	50.4(4)
O1 C1 C6 C7	-173.0(3)	C24 O5 C25 O6	-2.5(5)
C12 C1 C6 C7	-49.3(4)	C24 O5 C25 C26	175.3(3)
C2 C1 C6 C7	89.6(3)	O6 C25 C26 C27	-2.7(6)
O5 C25 C26 C27	179.5(3)	O7 C33 C34 C35	-4.3(4)
O6 C25 C26 C31	173.2(4)	O8 C33 C34 C39	-5.0(5)
O5 C25 C26 C31	-4.6(5)	O7 C33 C34 C39	175.2(3)
C31 C26 C27 C28	-0.5(5)	C39 C34 C35 C36	0.5(5)
C25 C26 C27 C28	175.6(3)	C33 C34 C35 C36	-180.0(3)
C26 C27 C28 C29	-0.8(6)	C34 C35 C36 C37	-1.1(5)
C27 C28 C29 C30	2.5(5)	C35 C36 C37 C38	0.9(5)
C27 C28 C29 C32	-176.9(4)	C35 C36 C37 C40	-179.4(3)
C28 C29 C30 C31	-3.0(6)	C36 C37 C38 C39	-0.2(5)
C32 C29 C30 C31	176.4(4)	C40 C37 C38 C39	-179.8(3)
C29 C30 C31 C26	1.8(6)	C37 C38 C39 C34	-0.4(6)
C27 C26 C31 C30	0.0(5)	C35 C34 C39 C38	0.2(5)
C25 C26 C31 C30	-175.9(4)	C33 C34 C39 C38	-179.3(3)
C22 O7 C33 O8	-0.2(4)	O7 C33 C34 C35	-4.3(4)
C22 O7 C33 C34	179.6(2)	O8 C33 C34 C39	-5.0(5)
O8 C33 C34 C35	175.4(3)	O7 C33 C34 C39	175.2(3)

## B. Zusammenstellung der verwendeten Puffersysteme

**ET-Belichtungspuffer:** 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl

**Photoaffinity labeling-Belichtungspuffer :** 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Nonidet P-40, 0.2 µg/mL BSA, 50 ng/µL *calf thymus* DNA (*Sigma*) bzw. Poly-dI:dC (*Fluka*)

**SDS-Auftragspuffer:** 62.5 mM Tris·HCl (pH 6.8), 4.0 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS), 20 % (w/v) Glycerin, 5.0 % β-Mercaptoethanol

**10x SDS-Laufpuffer:** 0.25 M Tris, 1.92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

**Trenngelpuffer:** 3 M Tris·HCl (pH 8.8)

**Sammelgelpuffer:** 0.5 M Tris·HCl (pH 6.8)

**CE-Puffer:** 0.1 M Tris·Borat (pH 8.3), 7 M Harnstoff, 2 mM EDTA

**MonoQ-Säule Puffer A:** 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5% (v/v) Glycerin

**MonoQ-Säule Puffer B:** 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5% (v/v) Glycerin

**Heparinsäule Puffer A:** siehe MonoQ-Säule Puffer A

**Heparinsäule Puffer B:** siehe MonoQ-Säule Puffer B

**CPD-Photolyase-Assaypuffer:** 20 mM Tris·HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaCl

**Fpg-Lagerpuffer:** 10 mM HEPES·KOH (pH 7.6), 50 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin

**Fpg-Assaypuffer:** 10 mM HEPES·KOH (pH 7.4), 100 mM KCl, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA

**magnetic beads-Bindungspuffer:** 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl

**magnetic beads-Waschpuffer A:** 5 mM Tris·HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl

**magnetic beads-Waschpuffer B:** 5 mM Tris·HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 5 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Nonidet P-40

**Kernextraktionspuffer A:** 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Kernextraktionspuffer B:** 20 mM HEPES, pH 7.9, 25 % (v/v) Glycerin, 0.42 M NaCl, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF (immer frisch zugeben, Stocklösung 10 % in Isopropanol)

**Kernextraktionspuffer C:** 20 mM HEPES, pH 7.9, 20 % (v/v) Glycerin, 100 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF (immer frisch zugeben, Stocklösung 10 % in Isopropanol)

**Aktivsterkupplungspuffer:** 0.1 M Natriumtetraborat, pH 8.5

**Kathodenpuffer:** 25 mM Tris, 40 mM ε-Aminocaprinsäure, 0.1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

**Anodenpuffer I:** 300 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol

**Anodenpuffer II:** 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol

**TBST- Puffer:** 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween-20, pH 8.0

Alle verwendeten Puffersysteme wurden unter Verwendung von vollentsalztem Wasser (*Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore*) in autoklavierten *Schott™* Flaschen angesetzt und vor der Lagerung steril filtriert.

## C. Mascot-Ergebnisprotokolle der durch Trypsinverdau und *Peptide mass fingerprinting* untersuchten Proteine

*E. coli* CPD-Photolyase:

*(MATRIX)*  
*(SCIENCES)*

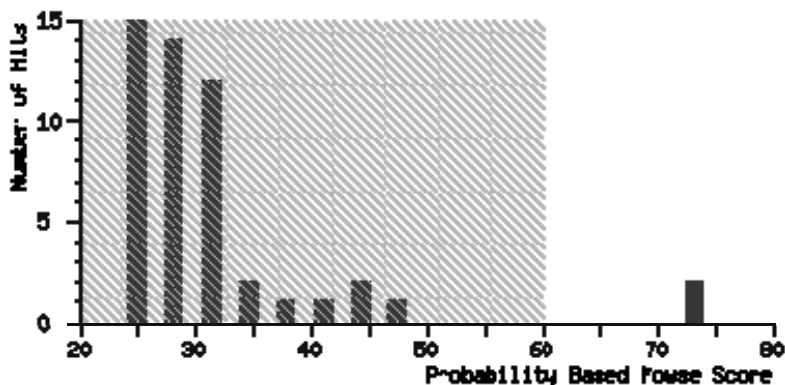
### Mascot Search Results

User : S.Breeger  
 Email : S.Breeger@gmx.de  
 Search title :  
 Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)  
 Taxonomy : Escherichia coli (54468 sequences)  
 Timestamp : 11 Dec 2006 at 18:41:57 GMT  
 Top Score : 73 for gi|1827916, Chain A, Structure Of Deoxyribodipyrimidine Photolyase

### Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 60 are significant ( $p < 0.05$ ).



### Protein View

Match to: **gi|1827916** Score: **73** Expect: **0.0026**  
**Chain A, Structure Of Deoxyribodipyrimidine Photolyase**

Nominal mass ( $M_r$ ): **53502**; Calculated pI value: **6.73**

NCBI BLAST search of [gi|1827916](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Escherichia coli](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[gi|1827917](#) from [Escherichia coli](#)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **21**

Number of mass values matched: **7**

Sequence Coverage: **19%**

## Anhang

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1  TTHLVWFRQD LRLHDNLALA AACRNSSARV LALYIATPRQ WATHNMSPRQ
51 AELINAQLNG LQIALAEKGI PLLFREVDFF VASVEIVKQV CAENSVTHLF
101 YNYQYEVNER ARDVEVERAL RNVVCEGFDD SVILPPGAVM TGNHEMYKVF
151 TPFKNAWLKR LREGMPECVA APKVRSSGSI EPSPSITLNY PRQSFDTAHF
201 PVEEKAAIAQ LRQFCQNGAG EYEQQRDFPA VEGTSRLSAS LATGGLSPRQ
251 CLHRLLAEQP QALDGGAGSV WLNELIWREF YRHLITYHPS LCKHRPFIAW
301 TDRVQWQSNP AHLQAWQEGK TGYPIVDAAM RQLNSTGWMH NRLRMITASF
351 LVKDLLIDWR EGERYFMSQL IDGDLAANNG GWQWAASTGT DAAPYFRIFN
401 PTQGEKFDH EGEFIRQWLP ELRDVPGKV V HEPWKWAQKA GVTLDYPQPI
451 VEHKEARVQT LAAYEAARKG K
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By



Residue Number



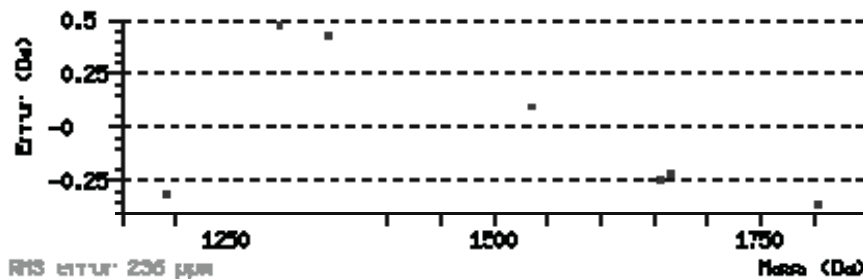
Increasing Mass



Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
176 - 192	1804.5535	1803.5462	1803.9003	-0.3541	0	R.SSGSIEPSPSITLNYPR.Q
193 - 205	1534.8152	1533.8079	1533.7099	0.0980	0	R.QSFDTAHFPVEEK.A
213 - 226	1657.4569	1656.4496	1656.6950	-0.2454	0	R.QFCQNGAGEYEQQR.D
294 - 303	1299.1542	1298.1469	1297.6680	0.4789	0	K.HRPFIAWTDR.V
321 - 331	1193.2864	1192.2791	1192.5910	-0.3119	0	K.TGYPIVDAAMR.Q
332 - 342	1344.0599	1343.0527	1342.6200	0.4326	0	R.QLNSTGWMHNR.L
440 - 454	1666.6606	1665.6534	1665.8726	-0.2192	0	K.AGVTLDYPQPIVEHK.E

No match to: 1079.3420, 1117.4286, 1150.2738, 1159.4222, 1210.2382, 1230.2959, 1517.7745, 1658.5669, 1716.4486, 1717.3665, 1733.4320, 1734.4253, 2420.3027, 2780.8926



Lactococcus lactis Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase:

(MATRIX)  
(SCIENCES)

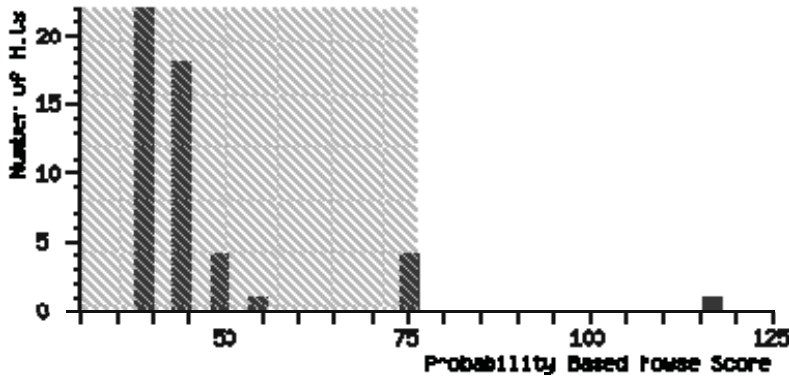
### Mascot Search Results

User : S.Breeger  
Email : S.Breeger@gmx.de  
Search title :  
Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)  
Taxonomy : Bacteria (Eubacteria) (2218830 sequences)  
Timestamp : 30 Aug 2006 at 16:51:01 GMT  
Top Score : 117 for gi|116511212, Formamidopyrimidine-DNA glycosylase  
[Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11]

### Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 76 are significant ( $p < 0.05$ ).



### Protein View

Match to: **gi|116511212** Score: 117 Expect: 4.4e-06  
**Formamidopyrimidine-DNA glycosylase [Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11]**

Nominal mass ( $M_r$ ): **31402**; Calculated pI value: **9.14**

NCBI BLAST search of [gi|116511212](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
[gi|116106866](#) from [Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **10**

Number of mass values matched: **7**

Sequence Coverage: **23%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

**1** MPELPEVETV RRELEKRIVG **QKIISIEATY** PRMVLGTGFEQ LKKELTGKII  
**51** **QGILR**RGKYL IFEIGDDFRL **ISHLR**MEGKY **RLATLDAPRE** KHDHLMKFS  
**101** **DGQLIYADV**R KFGTWELIST DQVIPYFLNK **KIGPEPTYED** **FDEKLFREKL**  
**151** RKSTKKIKPY LLEQTLVAGL GNIYVDEVLW LAKIHPEKEA NQLTESSIHL  
**201** LHDSIIIEILQ **KAIKLGSSI** RTYSALGSTG KMQNELQVYG KTGEKCSRCG  
**251** AEIQKIKVAG RGTDFCPVCQ QK

Show predicted peptides also

Sort Peptides By

Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

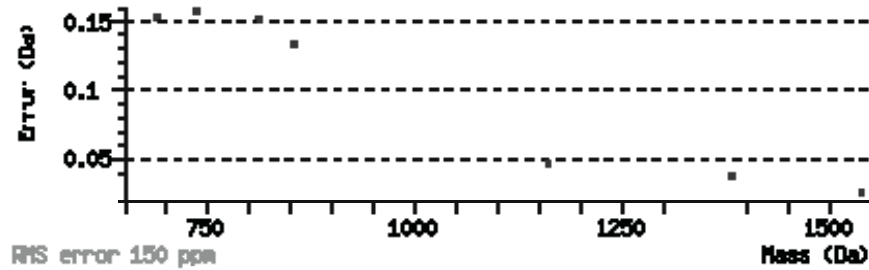
Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
23 - 32	1162.6937	1161.6865	1161.6393	0.0471	0	K.IISIEATYPR.M
49 - 55	812.6879	811.6807	811.5279	0.1527	0	K.IIQGILR.R
70 - 75	738.6197	737.6124	737.4548	0.1576	0	R.LISHLR.M



## Anhang

82 - 89	856.6227	855.6154	855.4814	0.1340	0	R.LATLDAPR.E
99 - 110	1383.7285	1382.7212	1382.6830	0.0383	0	K.FSDGQLIYADV.R.K
132 - 144	1539.7095	1538.7022	1538.6776	0.0246	0	K.IGPEPTYEDFDEK.L
215 - 221	689.5472	688.5400	688.3867	0.1532	0	K.LGGSSIR.T

No match to: 1409.6597, 1574.8030, 1590.7955



RMS error 150 ppm

*E. coli* 3-Phosphoglyceratkinase:

**(MATRIX)  
(SCIENCES)**

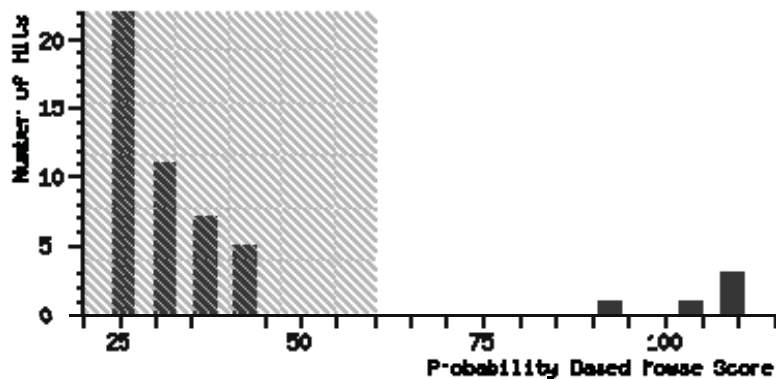
### Mascot Search Results

User : S.Breeger  
Email : S.Breeger@gmx.de  
Search title :  
Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)  
Taxonomy : Escherichia coli (54468 sequences)  
Timestamp : 15 Oct 2006 at 19:21:25 GMT  
Top Score : 109 for gi|75187641, COG0126: 3-phosphoglycerate kinase [Escherichia coli E24377A]

### Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 60 are significant ( $p < 0.05$ ).



## Protein View

Match to: **gi|75187641** Score: **109** Expect: **6.9e-07**  
**COG0126: 3-phosphoglycerate kinase [Escherichia coli E24377A]**

Nominal mass ( $M_r$ ): **40705**; Calculated pI value: **5.02**  
 NCBI BLAST search of [gi|75187641](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Escherichia coli E24377A](#)  
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
[gi|75212461](#) from [Escherichia coli B171](#)  
[gi|75228593](#) from [Escherichia coli B7A](#)  
[gi|75239507](#) from [Escherichia coli E110019](#)  
[gi|75241281](#) from [Escherichia coli F11](#)  
[gi|75258525](#) from [Escherichia coli E22](#)  
[gi|75515290](#) from [Escherichia coli 53638](#)  
[gi|83587679](#) from [Escherichia coli 101-1](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Number of mass values searched: **12**  
 Number of mass values matched: **9**  
 Sequence Coverage: **37%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MTDLDLAGKR VFIRADLNVP VKDGKVTSDA RIRASLPTIE LALKQGAKVM
51 VTSHLGRPTE GEYNEEFSLI PVVNYLKDKL SNPVRLVKDY LDGVDVAEGE
101 LVVLENVRFN KGEKKDDETL SKKYAALCDV FVMDAFGTAH RAQASTHGIG
151 KFADVACAGP LLAAELDALG KALKEPARPM VAIVGGSKVS TKLTVLDSLS
201 KIADQLIVGG GIANTFIAAQ GHDVKGSLYE ADLVDEAKRL LTTTCNIPVPS
251 DVRVATEFSE TAPATLKSVN DVKADEQILD IGDASAQELA EILKNAKTIL
301 WNGPVGVEFF PNFRKGTEIV ANAIADSEAF SIAGGGDTLA AIDLFGIADK
351 ISYISTGGGA FLEFVEGKVL PAVAMLEERA KK
    
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By



Residue Number



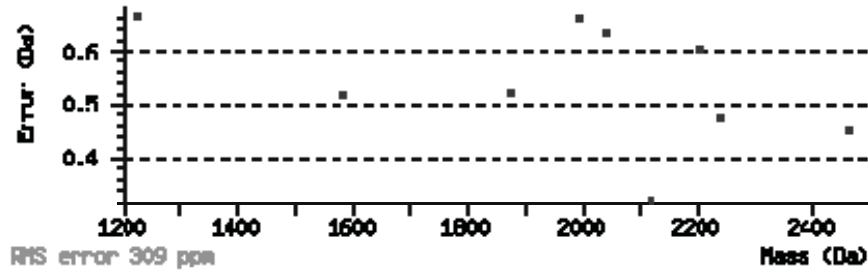
Increasing Mass



Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
89 - 108	2204.7131	2203.7059	2203.1007	0.6051	0	K.DYLDGVDVAEGELVVLENVR.F
124 - 141	2044.5742	2043.5669	2042.9342	0.6328	0	K.YAALCDVFVMDAFGTAHR.A
202 - 226	2465.7664	2464.7591	2464.3073	0.4518	0	K.IADQLIVGGGIANTFIAAQGHDVKG.S
240 - 253	1585.3607	1584.3534	1583.8341	0.5193	0	R.LLTTTCNIPVPSDVR.V
274 - 294	2242.6189	2241.6116	2241.1376	0.4741	0	K.ADEQILDIGDASAQELAEILK.N
298 - 314	1993.6916	1992.6844	1992.0257	0.6587	0	K.TILWNGPVGVEFFPNFR.K
298 - 315	2121.4514	2120.4441	2120.1206	0.3235	1	K.TILWNGPVGVEFFPNFR.G
351 - 368	1875.4755	1874.4682	1873.9461	0.5221	0	K.ISYISTGGGAFLEFVEGK.V
369 - 379	1228.3402	1227.3329	1226.6692	0.6637	0	K.VLPAVAMLEER.A

No match to: 2341.7690, 2668.1521, 3323.8865



*E. coli* CoA-linked acetaldehyde dehydrogenase:

*(MATRIX)*  
*(SCIENCES)*

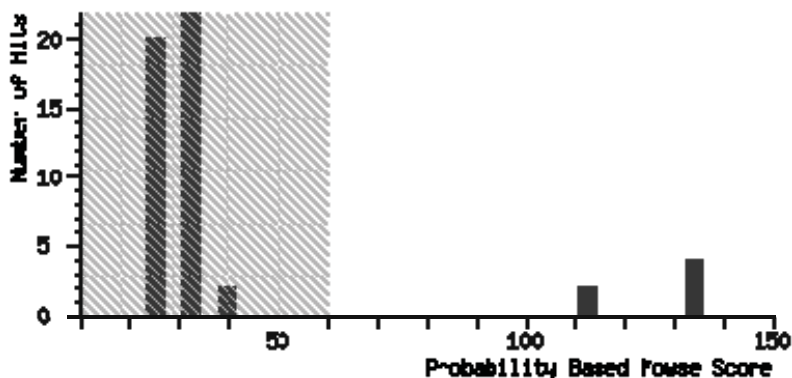
## Mascot Search Results

User : S.Breeger  
 Email : S.Breeger@gmx.de  
 Search title :  
 Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)  
 Taxonomy : Escherichia coli (54468 sequences)  
 Timestamp : 16 Oct 2006 at 19:31:12 GMT  
 Top Score : 134 for gi|15830995, CoA-linked acetaldehyde dehydrogenase  
 [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]

### Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 60 are significant ( $p < 0.05$ ).



### Protein View

Match to: [gi|15830995](#) Score: 134 Expect: 2.2e-09  
 CoA-linked acetaldehyde dehydrogenase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]

Nominal mass ( $M_r$ ): 96580; Calculated pI value: 6.32  
 NCBI BLAST search of [gi|15830995](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai](#)

## Anhang

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[gi|16129202](#) from [Escherichia coli K12](#)  
[gi|74312423](#) from [Shigella sonnei Ss046](#)  
[gi|75179164](#) from [Shigella boydii BS512](#)  
[gi|75195390](#) from [Escherichia coli HS](#)  
[gi|75212672](#) from [Escherichia coli B171](#)  
[gi|75230201](#) from [Escherichia coli B7A](#)  
[gi|75235251](#) from [Escherichia coli E110019](#)  
[gi|75257144](#) from [Escherichia coli E22](#)  
[gi|82776584](#) from [Shigella dysenteriae Sd197](#)  
[gi|83587379](#) from [Escherichia coli 101-1](#)  
[gi|89108085](#) from [Escherichia coli W3110](#)  
[gi|124528378](#) from [Escherichia coli B](#)  
[gi|71152683](#) from [Escherichia coli O157:H7](#)  
[gi|71152980](#) from [Escherichia coli](#)  
[gi|40900](#) from [Escherichia coli](#)  
[gi|145206](#) from [Escherichia coli](#)  
[gi|1651639](#) from [Escherichia coli W3110](#)  
[gi|1787493](#) from [Escherichia coli K12](#)  
[gi|4867938](#) from [Escherichia coli](#)  
[gi|13361206](#) from [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai](#)  
[gi|73855900](#) from [Shigella sonnei Ss046](#)  
[gi|81240732](#) from [Shigella dysenteriae Sd197](#)  
[gi|124500610](#) from [Escherichia coli B](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **12**

Number of mass values matched: **12**

Sequence Coverage: **21%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

<b>1</b>	<b>MAVTNVAELN</b>	<b>ALVER</b>	VKKAQ	REYASFTQEQ	VDKIFRAAAL	AAADARIPLA
<b>51</b>	KMAVAESGMG	IVEDKVIKIH	FASEYIYNAY	KDEKTCGVLS	EDDTFGTITI	
<b>101</b>	AEPIGIICGI	VPTTNPTSTA	IFKSLISLKT	<b>RNAIIFSPHP</b>	<b>RAKDATNKAA</b>	
<b>151</b>	DIVLQAAIAA	GAPKDLIGWI	DQPSVELSNA	LMHHPDINLI	LATGGPGMVK	
<b>201</b>	AAYSKGPAI	GVGAGNTPVV	IDETADIKRA	VASVLMSKTF	<b>DNGVICASEQ</b>	
<b>251</b>	<b>SVVVVDSVYD</b>	<b>AVRERFATHG</b>	<b>GYLLQKELK</b>	AVQDVILKNG	ALNAAIVGQP	
<b>301</b>	AYKIAELAGF	SVPENTKILI	<b>GEVTVDESE</b>	<b>PFAHEKLSPT</b>	LAMYRAKDFE	
<b>351</b>	DAVEKAELV	<b>AMGGIGHTSC</b>	<b>LYTDQDNQPA</b>	<b>RVSYFGQMKM</b>	TARILINTPA	
<b>401</b>	SQGGIGDLYN	FKLAPSLTLG	CGSWGNSIS	ENVGPKHLIN	KKTVAKRAEN	
<b>451</b>	MLWHKLPKSI	YFRRGSLPIA	<b>LDEVITDGHK</b>	<b>RALIVTDRFL</b>	FNNGYADQIT	
<b>501</b>	SVLK <b>AAGVET</b>	<b>EVFFEVEADP</b>	<b>TLSIVRKGAE</b>	LANSFKPDVI	IALGGGSPMD	
<b>551</b>	AAK <b>IMVWYE</b>	<b>HPETHFEELA</b>	<b>LRFMDIRKRI</b>	YKFPKMGVKA	KMIAVTTTSG	
<b>601</b>	TGSEVTPFAV	VTDDATGQKY	PLADYALTPD	MAIVDANLVM	DMPKSLCAFG	
<b>651</b>	GLDAVTHAME	AYVSVLASEF	SDGQALQALK	LLKEYLPASY	HEGSKNPVAR	
<b>701</b>	ERVHSAATIA	GIAFANAFLG	VCHSMAHKLK	SQFHIPHGLA	NALLICNVIR	
<b>751</b>	YNANDNPTKQ	TAFSQYDRPQ	ARRRY <b>YAEIAD</b>	<b>HLGLSAPGDR</b>	TAAKIEKLLA	
<b>801</b>	WLETLKAELG	IPKSIREAGV	QEADEFANVD	KLSEDAFDDQ	CTGANPRYPL	
<b>851</b>	ISELK <b>QILLD</b>	<b>TYYGRDYVEG</b>	ETAAKKEAAP	AKAEKKAKKS	A	

Show predicted peptides also

Sort Peptides By



Residue Number



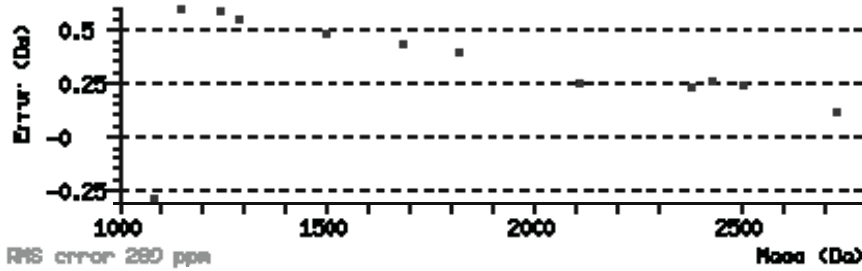
Increasing Mass



Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
2 - 15	1499.3032	1498.2959	1497.8150	0.4809	0	<b>M.AVTNVAELNALVER.V</b>

132 - 141	1152.2303	1151.2231	1150.6247	0.5984	0	R.NAIIFSPHPR.A
239 - 263	2729.4202	2728.4129	2728.3013	0.1116	0	K.TFDNGVICASEQSVVVVDSVYDAVR.E
266 - 277	1292.2321	1291.2248	1290.6720	0.5528	0	R.FATHGGYLLQGK.E
318 - 336	2112.3391	2111.3318	2111.0786	0.2533	0	K.ILIGEVTVVDESEPFQHEK.L
359 - 381	2504.4077	2503.4004	2503.1583	0.2421	0	K.LVAMGGIGHTSCLYTDQDNQPAR.V
382 - 390	1087.2778	1086.2706	1086.5531	-0.2826	1	R.VSYFGQKMK.T
465 - 481	1821.3745	1820.3672	1819.9792	0.3881	1	R.GSLPIALDEVITDGHKR.A
505 - 526	2379.4373	2378.4300	2378.2005	0.2295	0	K.AAGVETEVEFFEVEADPTLSIVR.K
554 - 572	2431.4141	2430.4068	2430.1500	0.2568	0	K.IMWVMEHPETHFEELALR.F
775 - 790	1685.2698	1684.2625	1683.8216	0.4409	0	R.YAEIADHLGLSAPGDR.T
856 - 865	1242.2358	1241.2286	1240.6452	0.5834	0	K.QILLDTYYGR.D



*Homo sapiens* Keratin 1:

*(MATRIX)*  
*(SCIENCES)*

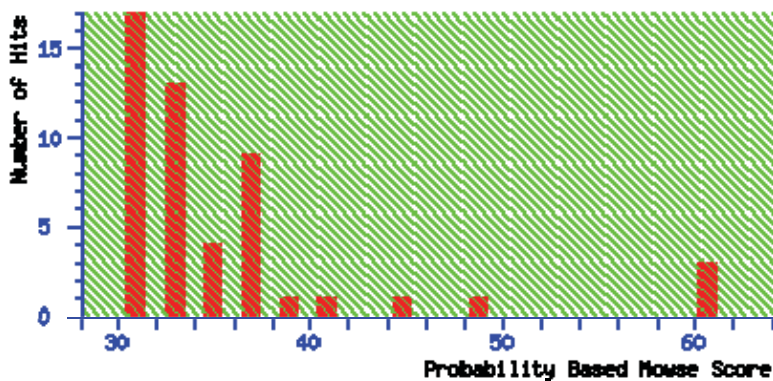
## Mascot Search Results

User : S.Breeger  
 Email : S.Breeger@gmx.de  
 Search title :  
 Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)  
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (191421 sequences)  
 Timestamp : 14 Jan 2007 at 19:41:55 GMT  
 Top Score : 61 for gi|11935049, keratin 1 [Homo sapiens]

### Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 65 are significant ( $p < 0.05$ ).



## Protein View

Match to: **gi|11935049** Score: **61** Expect: **0.17**  
**keratin 1 [Homo sapiens]**

Nominal mass ( $M_r$ ): **66198**; Calculated pI value: **8.16**  
 NCBI BLAST search of gi|11935049 against nr  
 Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Homo sapiens  
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
gi|39794653 from Homo sapiens

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Number of mass values searched: **25**  
 Number of mass values matched: **8**  
 Sequence Coverage: **16%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MSRQFSSRSRSG YRSGGGFSSG SAGIINYQRR TTSSSTRRSRSG GGGGRFSSCG
51 GGGGSFGAGG GFGSRSLVNL GGSKISISISV ARGGGRGSGF GGGYGGGGFG
101 GGGFGGGGFG GGGIGGGGFG GFGSGGGGFG GGGFGGGGYG GGYGPVCPFG
151 GIQEVNTINQS LLQPLNVEID PEIQKVKRSR REQIKSLNNQ FASFIDKVRF
201 LEQQNQVLQT KWELLQQVDT STRTHNLEPY FESFINNLR RVDQLKSDQS
251 RLDSELKNMQ DMVEDYRNKY EDEINKRTNA ENFVTIKVD VDGAYMTKVD
301 LQAKLDNLQQ EIDFLTALYQ AELSQMOTQI SETNVILSMD NNRSLLDLSI
351 IAEVKAQYED IAQKSKAEAE SLYQSKYEEL QITAGRHGDS VRNSKIEISE
401 LNRVIQRLRS EIDNVKKQIS NLQQSISDAE QRGENALKDA KNKLNLEDA
451 LQQAKEDLAR LLRDYQELMN TKLALDLEIA TYRTLLEGEE SRMSGECAPN
501 VSVSVSTSHT TISGGGSRGG GGGGYGSGGS SYGSGGGSYG SGGGGGGGRRG
551 SYGSGGSSYG SGGGSYGSGG GGGHGSYGS GSSSGGYRGG SGGGGGGSSG
601 GRGSGGGSSG GSIGGRGSSS GVKSSGGSS SVRFVSTTYS GVTR

```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By



Residue Number



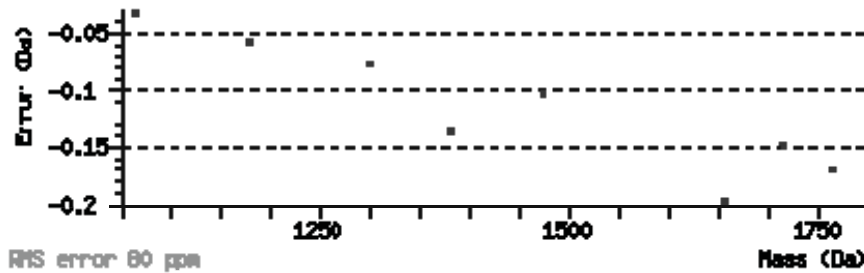
Increasing Mass



Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
13 - 29	1657.5952	1656.5879	1656.7855	-0.1976	0	R.SGGGFSSGSAGIINYQR.R
46 - 65	1765.5654	1764.5582	1764.7273	-0.1691	0	R.FSSCGGGGSGFAGGGFSGR.S
186 - 197	1383.5538	1382.5466	1382.6830	-0.1364	0	K.SLNNQFASFIDK.V
212 - 223	1475.6469	1474.6396	1474.7416	-0.1020	0	K.WELLQQVDTSTR.T
258 - 267	1300.4537	1299.4465	1299.5223	-0.0759	0	K.NMQDMVEDYR.N
270 - 277	1066.4829	1065.4756	1065.5090	-0.0334	1	K.YEDEINKR.T
377 - 386	1179.5441	1178.5368	1178.5931	-0.0563	0	K.YEELQITAGR.H
418 - 432	1716.7023	1715.6950	1715.8438	-0.1488	0	K.QISNLQQSISDAEQR.G

No match to: 1045.5420, 1118.5304, 1158.5322, 1165.4861, 1193.5684,  
 1201.6027, 1232.5402, 1235.4785, 1307.5737, 1308.5924, 1320.5067, 1365.6112,  
 1367.6306, 1699.6636, 1779.5802, 1791.6267, 2383.6873



## Belichtung von DA1:S3 mit *HCT*-Nuklearextrakt (Massenbereich 40-100 kDa)

### Mascot Search Results

User : Falk Butter  
 Email : butter@biochem.mpg.de  
 Search title : DNA\_repair\_1  
 MS data file : D:\MS\_2007\_01\_20\200701120\_FB\_LTQ-Orbitrap2\_LMU1.msm  
 Database : DEC\_IPI\_Human\_v3.24 ipi.HUMAN.v3.24.db (133869 sequences; 56489729 residues)  
 Timestamp : 20 Jan 2007 at 09:10:41 GMT  
 Significant hits: IPI00009865.1 SWISS-  
 PROT:P13645|ENSEMBL:ENSP00000269576|REFSEQ:NP\_000412|H-  
 INV:HIT000051206|VEGA:OTTHUMP00000165049;OTTHUMP00000181319 Tax\_Id=9606 Keratin, type I cy-  
 toskeletal 10  
 IPI00220327.2 SWISS-  
 PROT:P04264|ENSEMBL:ENSP00000252244|REFSEQ:NP\_006112|H-INV:HIT000261150|VEGA:OTTHUMP00000167602  
 Tax\_Id=9606 Keratin, type II cytoskeletal 1  
 IPI00019359.3 SWISS-  
 PROT:P35527|TREMBL:Q0IJ47|ENSEMBL:ENSP00000246662|REFSEQ:NP\_000217|H-  
 INV:HIT000216319|VEGA:OTTHUMP00000164967;OTTHUMP00000181348 Tax\_Id=9606 Keratin, type I cy-  
 toskeletal 9  
 IPI00011654.2 SWISS-  
 PROT:P07437|TREMBL:Q5SU16;Q6LC01|ENSEMBL:ENSP00000259925;ENSP00000339001;ENSP00000365579;ENSP00  
 00373058|REFSEQ:NP\_821133|H-  
 INV:HIT000033326|VEGA:OTTHUMP00000014646;OTTHUMP00000029069;OTTHUMP00000029477;OTTHUMP000000624  
 45 Tax\_Id=9606 Tubulin beta ch  
 IPI00007752.1 SWISS-  
 PROT:P68371|TREMBL:Q8IWP6;Q8IZ29;Q8N6N5;Q96HX0|ENSEMBL:ENSP00000341289|REFSEQ:NP\_006079|H-  
 INV:HIT000009868|VEGA:OTTHUMP00000162590 Tax\_Id=9606 Tubulin beta-2C chain  
 IPI00021304.1 SWISS-  
 PROT:P35908|TREMBL:Q4VAQ2|ENSEMBL:ENSP00000310861|REFSEQ:NP\_000414|H-  
 INV:HIT000197028|VEGA:OTTHUMP00000167603 Tax\_Id=9606 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal  
 IPI00023598.2 SWISS-  
 PROT:P04350|ENSEMBL:ENSP00000264071|REFSEQ:NP\_006078|H-  
 INV:HIT000020057|VEGA:OTTHUMP00000066909;OTTHUMP00000078206 Tax\_Id=9606 Tubulin beta-4 chain  
 IPI00013475.1 SWISS-  
 PROT:Q13885|ENSEMBL:ENSP00000259799;ENSP00000369703|REFSEQ:NP\_001060|H-  
 INV:HIT000289258|VEGA:OTTHUMP00000015956;OTTHUMP00000039158 Tax\_Id=9606 Tubulin beta-2A chain  
 IPI00384444.4 SWISS-  
 PROT:P02533|ENSEMBL:ENSP00000167586|REFSEQ:NP\_000517|H-  
 INV:HIT000052692|VEGA:OTTHUMP00000164624;OTTHUMP00000183330 Tax\_Id=9606 Keratin, type I cy-  
 toskeletal 14  
 IPI00217963.2 SWISS-  
 PROT:P08779|ENSEMBL:ENSP00000301653|REFSEQ:NP\_005548|H-  
 INV:HIT000052148|VEGA:OTTHUMP00000164740;OTTHUMP00000183331 Tax\_Id=9606 Keratin, type I cy-  
 toskeletal 16  
 IPI00387144.4 SWISS-  
 PROT:P68363|TREMBL:Q27I68;Q53GA7|ENSEMBL:ENSP00000336799|REFSEQ:NP\_006073|VEGA:OTTHUMP000001650  
 35;OTTHUMP00000167386;OTTHUMP00000167388 Tax\_Id=9606 Tubulin alpha-ubiquitous chain  
 IPI00218343.4 SWISS-  
 PROT:Q9BQE3|ENSEMBL:ENSP00000301072|REFSEQ:NP\_116093|H-INV:HIT000279007|VEGA:OTTHUMP00000167330  
 Tax\_Id=9606 Tubulin alpha-6 chain  
 IPI00013683.2 SWISS-  
 PROT:Q13509|TREMBL:Q3ZCR3|ENSEMBL:ENSP00000320295|REFSEQ:NP\_006077|H-  
 INV:HIT000277220|VEGA:OTTHUMP00000081633;OTTHUMP00000107347;OTTHUMP00000176846 Tax\_Id=9606 Tu-  
 bulin beta-3 chain

## Anhang

IPI00180675.4 SWISS-  
PROT:Q71U36|TREMBL:Q9UQM3|ENSEMBL:ENSP00000301071|REFSEQ:NP\_006000|H-  
INV:HIT000272358|VEGA:OTTHUMP00000167385 Tax\_Id=9606 Tubulin alpha-3 chain

IPI00007750.1 SWISS-  
PROT:P68366|ENSEMBL:ENSP00000248437|REFSEQ:NP\_005991|H-INV:HIT000011345|VEGA:OTTHUMP00000164167  
Tax\_Id=9606 Tubulin alpha-1 chain

IPI00300725.6 SWISS-  
PROT:P02538|TREMBL:Q08AR4;Q2TAZ9|ENSEMBL:ENSP00000369317|REFSEQ:NP\_005545|H-  
INV:HIT000033986|VEGA:OTTHUMP00000082829;OTTHUMP00000167615 Tax\_Id=9606 Keratin, type II cy-  
toskeletal 6A

IPI00009867.2 SWISS-  
PROT:P13647|ENSEMBL:ENSP00000252242|REFSEQ:NP\_000415|H-  
INV:HIT000194788|VEGA:OTTHUMP00000082822;OTTHUMP00000167613 Tax\_Id=9606 Keratin, type II cy-  
toskeletal 5

IPI00293665.6 SWISS-  
PROT:P04259|ENSEMBL:ENSP00000252252|REFSEQ:NP\_005546|H-INV:HIT000051181|VEGA:OTTHUMP00000167617  
Tax\_Id=9606 Keratin, type II cytoskeletal 6B

Trypsin porcine trypsin gi:136429  
IPI00376379.3 SWISS-  
PROT:Q7Z794|TREMBL:Q0IIN1;Q147W7|ENSEMBL:ENSP00000342710|REFSEQ:NP\_778253|H-INV:HIT000248793  
Tax\_Id=9606 Keratin 77

IPI00646779.2 SWISS-  
PROT:Q9BUF5|TREMBL:Q2NKY5|ENSEMBL:ENSP00000318697|REFSEQ:NP\_115914|H-  
INV:HIT000295563|VEGA:OTTHUMP00000071701;OTTHUMP00000162473 Tax\_Id=9606 TUBB6 protein

IPI00641706.1 VEGA:OTTHUMP00000071699 Tax\_Id=9606 46 kDa protein  
IPI00745872.2 SWISS-PROT:P02768-  
1|TREMBL:Q645G4|ENSEMBL:ENSP00000295897|REFSEQ:NP\_000468|H-  
INV:HIT000051578|VEGA:OTTHUMP00000160370 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Serum albumin precursor

IPI00450768.6 SWISS-  
PROT:Q04695|TREMBL:Q8N1P6|ENSEMBL:ENSP00000319235|REFSEQ:NP\_000413|H-  
INV:HIT000029394|VEGA:OTTHUMP00000164770;OTTHUMP00000183332 Tax\_Id=9606 Keratin, type I cy-  
toskeletal 17

IPI00009866.6 SWISS-PROT:P13646-  
1|ENSEMBL:ENSP00000246635|REFSEQ:NP\_705694|H-  
INV:HIT000031075|VEGA:OTTHUMP00000164632;OTTHUMP00000181306 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Keratin,  
type I cytoskeletal 13

IPI00026215.1 SWISS-  
PROT:P39748|TREMBL:Q6FHX6|ENSEMBL:ENSP00000305480|REFSEQ:NP\_004102|H-INV:HIT000029517  
Tax\_Id=9606 Flap endonuclease 1

IPI00005024.3 SWISS-PROT:Q9BQG0-  
1|ENSEMBL:ENSP00000254718;ENSP00000370974|REFSEQ:NP\_055335|H-  
INV:HIT000071521|VEGA:OTTHUMP00000115937;OTTHUMP00000183057;OTTHUMP00000183058 Tax\_Id=9606 Iso-  
form 1 of Myb-binding protein 1A

IPI00215911.2 SWISS-  
PROT:P27695|TREMBL:Q5TZP7|ENSEMBL:ENSP00000216714|REFSEQ:NP\_001632;NP\_542379;NP\_542380|H-  
INV:HIT000023418|VEGA:OTTHUMP00000066152;OTTHUMP00000163988;OTTHUMP00000163989 Tax\_Id=9606 DNA-  
(apurinic or apyrimidinic site) lyase  
gi417200 sp|P08727|K1CS\_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 19  
(Cytokeratin 19) (K19) (CK 19)

IPI00333215.1 SWISS-PROT:P23193-1|REFSEQ:NP\_006747|H-  
INV:HIT000264903;HIT000266765|VEGA:OTTHUMP00000096539;OTTHUMP00000177674 Tax\_Id=9606 Isoform 1  
of Transcription elongation factor A protein 1

IPI00013933.2 SWISS-PROT:P15924-  
1|ENSEMBL:ENSP00000211979;ENSP00000369129|REFSEQ:NP\_004406|H-  
INV:HIT000196416|VEGA:OTTHUMP00000016000;OTTHUMP00000016001 Tax\_Id=9606 Isoform DPI of Des-  
moplakin

IPI00024618.2 SWISS-  
PROT:Q96FZ2|ENSEMBL:ENSP00000374383;ENSP00000374385|REFSEQ:NP\_001006109;NP\_064572|H-  
INV:HIT000002221|VEGA:OTTHUMP00000172698;OTTHUMP00000172699 Tax\_Id=9606 UPF0361 protein DC12

IPI00477227.3  
TREMBL:Q5HYM7;Q8N1N4|ENSEMBL:ENSP00000306261|REFSEQ:NP\_775487|H-  
INV:HIT000021274|VEGA:OTTHUMP00000167594 Tax\_Id=9606 keratin 5b

Streptavidin IPI12345678 Streptavidin (S.avidinii)  
IPI00003918.5 SWISS-  
PROT:P36578|TREMBL:Q53G74;Q59GY2|ENSEMBL:ENSP00000311430;ENSP00000346035|REFSEQ:NP\_000959|H-  
INV:HIT000304287|VEGA:OTTHUMP00000164249;OTTHUMP00000176421 Tax\_Id=9606 60S ribosomal protein  
L4

IPI00396485.3 SWISS-  
PROT:P68104|TREMBL:Q16577;Q53G85;Q53G89;Q53GA1;Q53GE9;Q53HM9;Q53HQ7;Q53HR1;Q53HR5;Q6IPN6;Q6IPS9  
;Q6IPT9;Q8IUB0;Q96REL;Q9H2I7;Q9NZS6|ENSEMBL:ENSP00000310144;ENSP000003330054;ENSP00000339053;ENS  
P00000339063|REFSEQ:NP\_001393|H-INV:HIT000279745|VEGA:OTTHU

IPI00291510.3 SWISS-  
PROT:P12268|ENSEMBL:ENSP00000321584|REFSEQ:NP\_000875|H-INV:HIT000032622|VEGA:OTTHUMP00000171078  
Tax\_Id=9606 Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2

IPI00025753.1 SWISS-  
PROT:Q02413|TREMBL:Q712V6|ENSEMBL:ENSP00000257192|REFSEQ:NP\_001933|H-  
INV:HIT000068518|VEGA:OTTHUMP00000073169;OTTHUMP00000162826 Tax\_Id=9606 Desmoglein-1 precursor

IPI00465430.5 ENSEMBL:ENSP00000352257 Tax\_Id=9606 70 kDa protein



## Anhang

IPI00179964.5 SWISS-PROT:P26599-  
1|ENSEMBL:ENSP00000014112|REFSEQ:NP\_114368|VEGA:OTTHUMP00000077908 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Polypyrimidine tract-binding protein 1

IPI00375843.2  
TREMBL:Q7Z3Q0|ENSEMBL:ENSP00000301446|REFSEQ:NP\_872313|VEGA:OTTHUMP00000167630 Tax\_Id=9606 Hypothetical protein DKFZp686J1375

IPI00335132.2 ENSEMBL:ENSP00000255320 Tax\_Id=9606 22 kDa protein  
IPI00290078.5 SWISS-

PROT:P19013|TREMBL:Q6PIN2|ENSEMBL:ENSP00000293774|REFSEQ:NP\_002263|H-  
INV:HIT000052671|VEGA:OTTHUMP00000167597 Tax\_Id=9606 keratin 4

IPI00329389.7 SWISS-

PROT:Q02878|TREMBL:Q8N5Z7|ENSEMBL:ENSP00000202773|REFSEQ:NP\_000961;NP\_001019833|H-  
INV:HIT000031725|VEGA:OTTHUMP00000082923;OTTHUMP00000082924;OTTHUMP00000169279;OTTHUMP00000169280 Tax\_Id=9606 60S ribosomal protein L6

IPI00001661.3  
TREMBL:Q16269;Q6NT97|ENSEMBL:ENSP00000362937|REFSEQ:NP\_001041659 Tax\_Id=9606 regulator of chromosome condensation 1 isoform a

IPI00021808.3 SWISS-

PROT:P12081|TREMBL:Q52NV4|ENSEMBL:ENSP00000304668|REFSEQ:NP\_002100|H-  
INV:HIT000326361|VEGA:OTTHUMP00000159884 Tax\_Id=9606 Histidyl-tRNA synthetase, cytoplasmic

IPI00013810.2 SWISS-PROT:O43709-  
1|ENSEMBL:ENSP00000265758|REFSEQ:NP\_059998|H-INV:HIT000079379|VEGA:OTTHUMP00000160499 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Putative methyltransferase WBSCR22

IPI00021536.1 SWISS-

PROT:Q9NZT1|TREMBL:Q53H37;Q5SQI3|ENSEMBL:ENSP00000315372;ENSP00000369689|REFSEQ:NP\_059118|H-  
INV:HIT000072441|VEGA:OTTHUMP00000019005;OTTHUMP00000044756 Tax\_Id=9606 Calmodulin-like protein 5

IPI00015671.3  
TREMBL:Q4QQJ5;Q9H6Z0|ENSEMBL:ENSP00000315759;ENSP00000369784|REFSEQ:NP\_079079|H-  
INV:HIT000008592|VEGA:OTTHUMP00000019000 Tax\_Id=9606 tubulin, alpha-like 3

IPI00028888.1 SWISS-PROT:Q14103-  
1|TREMBL:Q4W5A1|ENSEMBL:ENSP00000313199|REFSEQ:NP\_112738|H-  
INV:HIT000101661|VEGA:OTTHUMP00000160798 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0

IPI00465248.5 SWISS-PROT:P06733-  
1|TREMBL:Q0JSN2;Q53FT9;Q53HR3;Q96GV1;Q9BT62;Q9UCH6|ENSEMBL:ENSP00000234590;ENSP00000351745|REFSEQ:NP\_001419|H-INV:HIT000270987|VEGA:OTTHUMP00000001706;OTTHUMP00000044281 Tax\_Id=9606 enolase 1

IPI00465044.2 SWISS-

PROT:Q9P258|ENSEMBL:ENSP00000326980;ENSP00000364582;ENSP00000364585|REFSEQ:NP\_061185|H-  
INV:HIT000247901|VEGA:OTTHUMP00000002613;OTTHUMP00000002614;OTTHUMP00000044621 Tax\_Id=9606 Protein RCC2

IPI00334587.1 SWISS-PROT:Q99729-  
2|TREMBL:Q53F64|ENSEMBL:ENSP00000351108|REFSEQ:NP\_112556|H-INV:HIT000022511 Tax\_Id=9606 Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B

IPI00554711.1 SWISS-

PROT:P14923|TREMBL:Q15151;Q7KZ86;Q86W21;Q9BWC4|ENSEMBL:ENSP00000311113|REFSEQ:NP\_002221;NP\_068831|H-  
INV:HIT000327559|VEGA:OTTHUMP00000041892;OTTHUMP00000164732;OTTHUMP00000164735;OTTHUMP00000164738 Tax\_Id=9606 Junction plakoglobin

IPI00289547.3 SWISS-

PROT:P17535|TREMBL:Q53EK9|ENSEMBL:ENSP00000252818|REFSEQ:NP\_005345|H-  
INV:HIT000322041|VEGA:OTTHUMP00000077037;OTTHUMP00000083268 Tax\_Id=9606 Transcription factor jun-D

IPI00021518.1 SWISS-PROT:Q92466-  
1|ENSEMBL:ENSP00000256996|REFSEQ:NP\_000098|H-INV:HIT000218449|VEGA:OTTHUMP00000096367 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of DNA damage-binding protein 2

IPI00029795.1 SWISS-PROT:P08651-1|TREMBL:Q6FI30|ENSEMBL:ENSP00000342859 Tax\_Id=9606 Isoform 4 of Nuclear factor 1 C-type

IPI00013881.6 SWISS-

PROT:P31943|TREMBL:Q68DG4|ENSEMBL:ENSP00000349168|REFSEQ:NP\_005511|H-  
INV:HIT000192494|VEGA:OTTHUMP00000161513 Tax\_Id=9606 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1

IPI00020021.3 SWISS-

PROT:P35659|ENSEMBL:ENSP00000244776|REFSEQ:NP\_003463|H-  
INV:HIT000051357|VEGA:OTTHUMP00000016078;OTTHUMP00000039357 Tax\_Id=9606 Protein DEK

IPI00465436.3 SWISS-

PROT:P04040|TREMBL:Q2M1U4;Q8TAK2;Q9UC85|ENSEMBL:ENSP00000241052|REFSEQ:NP\_001743|H-  
INV:HIT000321009|VEGA:OTTHUMP00000041455;OTTHUMP00000042525 Tax\_Id=9606 Catalase

IPI00031812.2 SWISS-

PROT:P67809|TREMBL:Q05D43;Q6PKI6|ENSEMBL:ENSP00000163282;ENSP00000361626|REFSEQ:NP\_004550|H-  
INV:HIT000305396|VEGA:OTTHUMP00000008731;OTTHUMP00000046517 Tax\_Id=9606 Nuclease sensitive element-binding protein 1

IPI00021700.3 SWISS-

PROT:P12004|TREMBL:Q6FHF5;Q6FI35;Q7Z6A1;Q7Z6A2;Q7Z6A3|ENSEMBL:ENSP00000254983;ENSP00000368438;ENSP00000368458|REFSEQ:NP\_002583;NP\_872590|H-  
INV:HIT000298775|VEGA:OTTHUMP00000030188;OTTHUMP00000030189;OTTHUMP00000030190 Tax\_Id=9606 Proliferating cell

## Anhang

IPI00004970.3 SWISS-PROT:O75691|REFSEQ:NP\_055318|H-INV:HIT000244123  
Tax\_Id=9606 Small subunit processome component 20 homolog  
IPI00220834.7 SWISS-  
PROT:P13010|TREMBL:Q0Z7V0;Q53HH7|ENSEMBL:ENSP00000329528|REFSEQ:NP\_066964|H-  
INV:HIT000195394|VEGA:OTTHUMP00000071081;OTTHUMP00000164061 Tax\_Id=9606 ATP-dependent DNA heli-  
case 2 subunit 2  
IPI00219097.3 SWISS-  
PROT:P26583|TREMBL:Q5U071;Q5U072;Q96J53|ENSEMBL:ENSP00000296503|REFSEQ:NP\_002120|H-  
INV:HIT000279216 Tax\_Id=9606 High mobility group protein B2  
IPI00334627.3 ENSEMBL:ENSP00000329640;ENSP00000368744|H-  
INV:HIT000196047|VEGA:OTTHUMP00000000459 Tax\_Id=9606 Similar to annexin A2 isoform 1  
IPI00419424.3 TREMBL:Q6PIH6;Q8NEK0|ENSEMBL:ENSP00000315055 Tax\_Id=9606  
IGKV1-5 protein  
IPI00550021.3 SWISS-  
PROT:P39023|TREMBL:Q5I0G0;Q96QL0|ENSEMBL:ENSP00000346001|REFSEQ:NP\_000958|H-  
INV:HIT000035692|VEGA:OTTHUMP00000028935 Tax\_Id=9606 60S ribosomal protein L3  
IPI00217477.4 SWISS-  
PROT:O15347|TREMBL:Q0JS55|ENSEMBL:ENSP00000031803;ENSP00000359393|REFSEQ:NP\_005333|VEGA:OTTHUMP  
00000025865;OTTHUMP00000061768 Tax\_Id=9606 High mobility group protein B3  
IPI00302927.5 SWISS-  
PROT:P50991|TREMBL:Q53QP9|ENSEMBL:ENSP00000233836|REFSEQ:NP\_006421|H-  
INV:HIT000062814|VEGA:OTTHUMP00000041008 Tax\_Id=9606 T-complex protein 1 subunit delta  
IPI00011694.1 SWISS-  
PROT:P07477|TREMBL:Q45KI0;Q53ZF3;Q53ZV8;Q53ZX7;Q53ZX8;Q53ZX9;Q5NV57;Q7Z445;Q7Z5P3;Q7Z5Y9;Q86W17  
;Q86W18;Q86W19;Q86W20|ENSEMBL:ENSP00000290968|REFSEQ:NP\_002760|VEGA:OTTHUMP00000024975  
Tax\_Id=9606 Trypsin-1 precursor  
IPI00414235.1 SWISS-PROT:Q9UIF7-  
3|ENSEMBL:ENSP00000361187|REFSEQ:NP\_001041636|VEGA:OTTHUMP00000009096;OTTHUMP00000046441  
Tax\_Id=9606 Isoform Alpha-3 of A/G-specific adenine DNA glycosylase  
IPI00032325.1 SWISS-  
PROT:P01040|TREMBL:Q6IB90|ENSEMBL:ENSP00000264474|REFSEQ:NP\_005204|H-  
INV:HIT000321153|VEGA:OTTHUMP00000172443 Tax\_Id=9606 Cystatin A  
IPI00020956.1 SWISS-  
PROT:P51858|ENSEMBL:ENSP00000305393;ENSP00000349878|REFSEQ:NP\_004485|H-  
INV:HIT000038497|VEGA:OTTHUMP00000038721;OTTHUMP00000060345 Tax\_Id=9606 Hepatoma-derived growth  
factor  
IPI00410693.3 SWISS-PROT:Q8NC51-  
1|TREMBL:Q5VU19|ENSEMBL:ENSP00000271011;ENSP00000360034|REFSEQ:NP\_001018077|VEGA:OTTHUMP0000001  
0978;OTTHUMP00000046894 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding  
protein  
IPI00218495.3 SWISS-PROT:P29372-2 Tax\_Id=9606 Isoform 2 of DNA-3-  
methyladenine glycosylase  
IPI00032561.1 SWISS-  
PROT:Q9Y376|TREMBL:Q53RN7;Q7Z4X0|ENSEMBL:ENSP00000258418|REFSEQ:NP\_057373|H-  
INV:HIT000038831|VEGA:OTTHUMP00000164293 Tax\_Id=9606 Calcium-binding protein 39  
IPI00384938.1 TREMBL:Q7Z351 Tax\_Id=9606 Hypothetical protein  
DKFZp686N02209  
IPI00166729.4 SWISS-  
PROT:P25311|TREMBL:Q5XKQ4;Q8N4N0|ENSEMBL:ENSP00000292401|REFSEQ:NP\_001176|H-  
INV:HIT000041985|VEGA:OTTHUMP00000024684;OTTHUMP00000065635 Tax\_Id=9606 alpha-2-glycoprotein 1,  
zinc  
IPI00300786.1 SWISS-  
PROT:P04745|TREMBL:Q5T083;Q6NSB3|ENSEMBL:ENSP00000280829;ENSP00000307372;ENSP00000331903;ENSP00  
000359096;ENSP00000359097;ENSP00000359100|REFSEQ:NP\_001008219;NP\_001008220;NP\_001008222;NP\_0040  
29|H-INV:HIT000260776|VEGA:OTTHUMP00000012688;OTTHUMP000000  
IPI00219575.5 SWISS-  
PROT:Q13867|ENSEMBL:ENSP00000261714|REFSEQ:NP\_000377|H-INV:HIT000031645|VEGA:OTTHUMP00000181050  
Tax\_Id=9606 Bleomycin hydrolase  
IPI00292880.4 ENSEMBL:ENSP00000368686 Tax\_Id=9606 44 kDa protein  
IPI00031801.4 SWISS-PROT:P16989-  
1|ENSEMBL:ENSP00000228251|REFSEQ:NP\_003642|H-INV:HIT000039306|VEGA:OTTHUMP00000166640  
Tax\_Id=9606 Isoform 1 of DNA-binding protein A  
IPI00339381.3 SWISS-PROT:Q14527-  
1|TREMBL:Q05BZ6;Q05DF7;Q59GQ7|ENSEMBL:ENSP00000308944|REFSEQ:NP\_003062;NP\_620636|H-  
INV:HIT000193167|VEGA:OTTHUMP00000173216;OTTHUMP000000173217 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of SWI/SNF-  
related matrix-associated actin-dependent regulator of chroma  
IPI00550821.2 SWISS-PROT:Q8N684-  
1|ENSEMBL:ENSP00000345412|REFSEQ:NP\_079087 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Cleavage and polyadenyla-  
tion specificity factor 7  
IPI00027547.2 SWISS-  
PROT:P81605|TREMBL:Q53YJ2|ENSEMBL:ENSP00000293371|REFSEQ:NP\_444513|H-  
INV:HIT000260573|VEGA:OTTHUMP00000167817 Tax\_Id=9606 Dermcidin precursor  
IPI00018522.3 SWISS-PROT:Q99873-  
1|ENSEMBL:ENSP00000246789|REFSEQ:NP\_001527|VEGA:OTTHUMP00000076824 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of  
Protein arginine N-methyltransferase 1  
IPI00026559.1 SWISS-  
PROT:P22415|TREMBL:Q5SY46|ENSEMBL:ENSP00000289790;ENSP00000356999;ENSP00000357000|REFSEQ:NP\_009

## Anhang

053|H-INV:HIT000027031|VEGA:OTTHUMP0000029691;OTTHUMP0000029693;OTTHUMP0000060264  
Tax\_Id=9606 Upstream stimulatory factor 1  
IPI00397801.4

TREMBL:Q5D862|ENSEMBL:ENSP00000271816|REFSEQ:NP\_001014364|VEGA:OTTHUMP0000014119 Tax\_Id=9606  
Ifapsoriasisin  
IPI00000875.5 SWISS-

PROT:P26641|TREMBL:Q2F838;Q2F840;Q53YD7|ENSEMBL:ENSP00000331901|REFSEQ:NP\_001395|H-  
INV:HIT000049297 Tax\_Id=9606 Elongation factor 1-gamma  
IPI00514381.1 TREMBL:Q5STU9|ENSEMBL:ENSP00000365344 Tax\_Id=9606 HLA-B  
associated transcript 1  
IPI00001722.1 SWISS-

PROT:P78549|TREMBL:Q1MVR1|ENSEMBL:ENSP00000219066|REFSEQ:NP\_002519|H-  
INV:HIT000276811|VEGA:OTTHUMP00000081326;OTTHUMP00000107424;OTTHUMP00000158939 Tax\_Id=9606 En-  
donuclease III-like protein 1  
IPI00007425.1 TREMBL:Q9HB00|ENSEMBL:ENSP00000257197|REFSEQ:NP\_004939|H-  
INV:HIT000323355|VEGA:OTTHUMP00000073168;OTTHUMP00000162824 Tax\_Id=9606 desmocollin 1 isoform  
Dsc1b preproprotein  
IPI00009032.1 SWISS-

PROT:P05455|TREMBL:Q14730;Q15367;Q2F832;Q53XJ4;Q9UMH5;Q9UMH6;Q9UMH7|ENSEMBL:ENSP00000260956|REF  
SEQ:NP\_003133|H-INV:HIT000288232|VEGA:OTTHUMP00000163067 Tax\_Id=9606 Lupus La protein  
IPI00002939.3 SWISS-

PROT:P28360|ENSEMBL:ENSP00000295284;ENSP00000372170|REFSEQ:NP\_002439|H-  
INV:HIT000196966|VEGA:OTTHUMP00000115387 Tax\_Id=9606 Homeobox protein MSX-1  
IPI00306723.3 SWISS-

PROT:Q03701|ENSEMBL:ENSP00000234170;ENSP00000368423|REFSEQ:NP\_005751|VEGA:OTTHUMP00000126952  
Tax\_Id=9606 CCAAT/enhancer-binding protein zeta  
IPI00787362.1 REFSEQ:XP\_001127437 Tax\_Id=9606 similar to Hornerin  
IPI00017339.1 SWISS-

PROT:Q15427|TREMBL:Q53FG6;Q5SZ63|ENSEMBL:ENSP00000271628;ENSP00000358137|REFSEQ:NP\_005841|H-  
INV:HIT000299554|VEGA:OTTHUMP00000014064;OTTHUMP00000059785 Tax\_Id=9606 Splicing factor 3B su-  
bunit 4  
IPI00298860.5 SWISS-

PROT:P02788|TREMBL:Q19KS2;Q2TUW9;Q5DSM0;Q5EK51|ENSEMBL:ENSP00000231751|REFSEQ:NP\_002334|H-  
INV:HIT000217792|VEGA:OTTHUMP00000170969 Tax\_Id=9606 Growth-inhibiting protein 12  
IPI00654755.2 SWISS-

PROT:P68871|TREMBL:Q0JTD4;Q14477;Q3LR79;Q3Y9I8;Q4F786;Q4JLR8;Q4TWB7;Q4TZM4;Q52MT0;Q549N7;Q670S4  
;Q6JLZ7;Q6JLZ8;Q6R7N2;Q6VQ05;Q6VFQ6;Q8IUL9;Q8IZI0;Q9GZL9;Q9UE58;Q9UK54|ENSEMBL:ENSP00000333994;  
ENSP00000369671|REFSEQ:NP\_000509|H-INV:HIT000194975|VEGA:OT  
IPI00013439.3 SWISS-

PROT:P17275|TREMBL:Q53HP8;Q5U079|ENSEMBL:ENSP00000303315|REFSEQ:NP\_002220|H-  
INV:HIT000304475|VEGA:OTTHUMP00000077036;OTTHUMP00000083176 Tax\_Id=9606 Transcription factor  
jun-B  
IPI00220644.8 SWISS-PROT:P14618-

2|ENSEMBL:ENSP00000373742;ENSP00000373743;ENSP00000373745|REFSEQ:NP\_872270;NP\_872271|VEGA:OTTHU  
MP00000043776;OTTHUMP00000043777;OTTHUMP00000176445 Tax\_Id=9606 pyruvate kinase 3 isoform 2  
IPI00009694.1 SWISS-

PROT:P23025|TREMBL:Q5T1U9;Q6LD02|ENSEMBL:ENSP00000259463;ENSP00000364270|REFSEQ:NP\_000371|H-  
INV:HIT000036927|VEGA:OTTHUMP00000021751;OTTHUMP00000063775 Tax\_Id=9606 DNA-repair protein  
complementing XP-A cells  
IPI00219678.2 SWISS-

PROT:P05198|TREMBL:Q53XC0|ENSEMBL:ENSP00000256383|REFSEQ:NP\_004085|H-  
INV:HIT000030955|VEGA:OTTHUMP00000028404 Tax\_Id=9606 Eukaryotic translation initiation factor 2  
subunit 1  
IPI00550991.3 SWISS-PROT:P01011-

1|TREMBL:Q2TU87;Q2TU88|ENSEMBL:ENSP00000261981|REFSEQ:NP\_001076|VEGA:OTTHUMP00000028439;OTTHUMP  
00000165164 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Alpha-1-antichymotrypsin precursor  
IPI00297779.6 SWISS-

PROT:P78371|TREMBL:Q14D36;Q9H369|ENSEMBL:ENSP00000299300|REFSEQ:NP\_006422|H-  
INV:HIT000062801|VEGA:OTTHUMP00000041617;OTTHUMP00000168452 Tax\_Id=9606 T-complex protein 1  
subunit beta  
IPI00410616.2 SWISS-PROT:Q969S2-

1|ENSEMBL:ENSP00000284503;ENSP00000346591|REFSEQ:NP\_659480|VEGA:OTTHUMP00000116006;OTTHUMP00000  
177016;OTTHUMP00000177017 Tax\_Id=9606 nei-like 2  
IPI00332511.5 SWISS-

PROT:P63151|ENSEMBL:ENSP00000325074|REFSEQ:NP\_002708|H-INV:HIT000052493|VEGA:OTTHUMP00000177217  
Tax\_Id=9606 Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform  
IPI00013075.1 SWISS-PROT:O75449-

1|ENSEMBL:ENSP00000335106;ENSP00000356381|REFSEQ:NP\_008975|H-  
INV:HIT000279324|VEGA:OTTHUMP00000017392 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Katanin p60 ATPase-containing  
subunit A1  
IPI00006408.4

TREMBL:Q96FD2;Q9Y314|ENSEMBL:ENSP00000343497|REFSEQ:NP\_057037|H-  
INV:HIT000034781|VEGA:OTTHUMP00000070006;OTTHUMP00000077729;OTTHUMP00000077730 Tax\_Id=9606  
Nitric oxide synthase interacting protein  
IPI00022820.1 SWISS-

PROT:Q00403|ENSEMBL:ENSP00000260511;ENSP00000359531|REFSEQ:NP\_001505|H-  
INV:HIT000038840|VEGA:OTTHUMP00000012347;OTTHUMP00000058838 Tax\_Id=9606 Transcription initia-  
tion factor IIB

## Anhang

IPI00031549.5 SWISS-PROT:Q14574-  
1|TREMBL:Q9HAX1|ENSEMBL:ENSP00000374196;ENSP00000374197|REFSEQ:NP\_001932|H-  
INV:HIT000324013|VEGA:OTTHUMP00000073153 Tax\_Id=9606 Isoform 3A of Desmocollin-3 precursor

IPI00029095.1 SWISS-  
PROT:Q14186|TREMBL:Q5JSB4|ENSEMBL:ENSP00000352355;ENSP00000364519|REFSEQ:NP\_009042|H-  
INV:HIT000035374|VEGA:OTTHUMP00000018765;OTTHUMP00000040664 Tax\_Id=9606 Transcription factor Dp-1

IPI00423460.3 TREMBL:Q6N090 Tax\_Id=9606 Hypothetical protein  
DKFZp686G21220 (Fragment)

IPI00016928.2 SWISS-  
PROT:Q99626|TREMBL:Q5VTU7;Q9UD92|ENSEMBL:ENSP00000298359;ENSP00000370408|REFSEQ:NP\_001256|H-  
INV:HIT000036716|VEGA:OTTHUMP00000018176;OTTHUMP00000018177 Tax\_Id=9606 Homeobox protein CDX-2

IPI00007797.2 SWISS-  
PROT:Q01469|ENSEMBL:ENSP00000297258;ENSP00000300149|REFSEQ:NP\_001435;XP\_001127657;XP\_001128089|  
H-INV:HIT000264261|VEGA:OTTHUMP00000043498;OTTHUMP00000166021;OTTHUMP00000177628 Tax\_Id=9606  
Fatty acid-binding protein, epidermal

IPI00008530.1 SWISS-  
PROT:P05388|TREMBL:Q53HK9;Q53HW2;Q8NHW5|ENSEMBL:ENSP00000339027|REFSEQ:NP\_000993;NP\_444505|H-  
INV:HIT000049094|VEGA:OTTHUMP00000082938;OTTHUMP00000082939;OTTHUMP00000169513;OTTHUMP00000169514 Tax\_Id=9606 60S acidic ribosomal protein P0

IPI00219221.2 SWISS-  
PROT:P47929|TREMBL:Q6IB87|ENSEMBL:ENSP00000313571;ENSP00000367891|REFSEQ:NP\_001035972;NP\_002298  
;XP\_001128786;XP\_001133982|H-  
INV:HIT000264974|VEGA:OTTHUMP00000068268;OTTHUMP00000068273;OTTHUMP00000076991;OTTHUMP00000077184 Tax\_Id=9606 Galectin-7

IPI00027462.1 SWISS-  
PROT:P06702|TREMBL:Q6FGA1|ENSEMBL:ENSP00000295382;ENSP00000357727|REFSEQ:NP\_002956|H-  
INV:HIT000321167|VEGA:OTTHUMP00000015331;OTTHUMP00000059859 Tax\_Id=9606 Protein S100-A9

IPI00305457.5 TREMBL:Q9P173 Tax\_Id=9606 PRO2275  
IPI00003923.1 SWISS-PROT:P11172-  
1|ENSEMBL:ENSP00000232607|REFSEQ:NP\_000364|H-INV:HIT000191190|VEGA:OTTHUMP00000172523  
Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Uridine 5'-monophosphate synthase

IPI00021439.1 SWISS-  
PROT:P60709|TREMBL:Q1KLZ0;Q53G76;Q53G99;Q53GK6;Q96HG5|ENSEMBL:ENSP00000349960|REFSEQ:NP\_001092|  
H-INV:HIT000276298|VEGA:OTTHUMP00000024886 Tax\_Id=9606 Actin, cytoplasmic 1

IPI00015614.3 SWISS-PROT:P35030-1 Tax\_Id=9606 Isoform A of Trypsin-3  
precursor

IPI00291560.4 SWISS-PROT:P05089-  
1|ENSEMBL:ENSP00000237310;ENSP00000357066|REFSEQ:NP\_000036|H-  
INV:HIT000038874|VEGA:OTTHUMP00000017209;OTTHUMP00000040268 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Arginase-1

IPI00033583.3 SWISS-  
PROT:Q96P63|TREMBL:Q3SYB5|ENSEMBL:ENSP00000269491|REFSEQ:NP\_536722|H-  
INV:HIT000079229|VEGA:OTTHUMP00000073681;OTTHUMP00000163678 Tax\_Id=9606 Serpin B12

IPI00027713.1 SWISS-PROT:P16220-  
1|TREMBL:Q4ZG78;Q5U0J5|ENSEMBL:ENSP00000236996|REFSEQ:NP\_604391|H-  
INV:HIT000035024|VEGA:OTTHUMP00000070537;OTTHUMP00000163864 Tax\_Id=9606 Isoform CREB-A of cAMP  
response element-binding protein

IPI00025329.1 SWISS-  
PROT:P84098|TREMBL:Q502Y6;Q53G49;Q8IWR8|ENSEMBL:ENSP00000225430|REFSEQ:NP\_000972|H-  
INV:HIT000262206 Tax\_Id=9606 60S ribosomal protein L19

IPI00219018.6 SWISS-  
PROT:P04406|TREMBL:Q2TSD0;Q53X65|ENSEMBL:ENSP00000229239|REFSEQ:NP\_002037|H-  
INV:HIT000279789|VEGA:OTTHUMP00000082434;OTTHUMP00000082435;OTTHUMP00000082436;OTTHUMP00000166331;OTTHUMP00000174430;OTTHUMP00000174431;OTTHUMP00000174432 Tax\_Id=9606 Glycer

IPI00216873.2 SWISS-  
PROT:Q8IV48|ENSEMBL:ENSP00000250263|REFSEQ:NP\_699163|H-  
INV:HIT000051358|VEGA:OTTHUMP00000159677;OTTHUMP00000176997 Tax\_Id=9606 3' histone mRNA exonuclease 1

REV IPI00020501.1 SWISS-  
PROT:P35749|TREMBL:Q14794;Q16086;Q66K75|ENSEMBL:ENSP00000300036|REFSEQ:NP\_002465|H-  
INV:HIT000000583|VEGA:OTTHUMP00000081251;OTTHUMP00000083094;OTTHUMP00000160389 Tax\_Id=9606 Myosin-11

IPI00012066.2 EN-  
SEMBL:ENSP00000352228|REFSEQ:NP\_114366|VEGA:OTTHUMP00000167699 Tax\_Id=9606 poly(rC)-binding protein 2 isoform b

IPI00022974.1 SWISS-  
PROT:P12273|TREMBL:A0A963;A0A9C3;A0A9F3|ENSEMBL:ENSP00000291009|REFSEQ:NP\_002643|H-  
INV:HIT000035139|VEGA:OTTHUMP00000025313 Tax\_Id=9606 Prolactin-inducible protein precursor

IPI00022463.1 SWISS-  
PROT:P02787|TREMBL:Q06AH7;Q1HBA5|ENSEMBL:ENSP00000264998|REFSEQ:NP\_001054|H-  
INV:HIT000217260|VEGA:OTTHUMP00000172866;OTTHUMP00000178711 Tax\_Id=9606 Serotransferrin precursor

IPI00011229.1 SWISS-  
PROT:P07339|ENSEMBL:ENSP00000236671;ENSP00000371435|REFSEQ:NP\_001900|H-  
INV:HIT000049449|VEGA:OTTHUMP00000042282;OTTHUMP00000108390 Tax\_Id=9606 Cathepsin D precursor

IPI00001469.1 SWISS-  
PROT:Q95969|ENSEMBL:ENSP00000244926|REFSEQ:NP\_006542|H-INV:HIT000244866 Tax\_Id=9606 Lipophilin-B precursor

## Anhang

IPI00007471.2  
TREMBL:Q2VIR9;Q9H009|ENSEMBL:ENSP00000352719|REFSEQ:NP\_954984|H-  
INV:HIT000260601|VEGA:OTTHUMP00000182110 Tax\_Id=9606 alpha-NAC protein  
IPI00168235.4 TREMBL:Q8NBE6|ENSEMBL:ENSP00000326937 Tax\_Id=9606 CDNA  
FLJ33352 fis, clone BRACE2005087, weakly similar to PRE-MRNA SPLICING HELICASE BRR2  
IPI00219691.2 SWISS-  
PROT:Q9Y2Y9|ENSEMBL:ENSP00000302456|REFSEQ:NP\_057079|H-  
INV:HIT000070896|VEGA:OTTHUMP00000159587;OTTHUMP00000175585 Tax\_Id=9606 Krueppel-like factor 13  
IPI00514908.1  
TREMBL:Q5T749|ENSEMBL:ENSP00000357762|REFSEQ:NP\_001020402|VEGA:OTTHUMP00000014333;OTTHUMP000000  
59982 Tax\_Id=9606 Novel protein  
IPI00007047.1 SWISS-  
PROT:P05109|TREMBL:Q5SY70;Q9UCM6|ENSEMBL:ENSP00000271846;ENSP00000357721;ENSP00000357722|REFSEQ  
:NP\_002955|H-  
INV:HIT000321168|VEGA:OTTHUMP00000015329;OTTHUMP00000015330;OTTHUMP00000059858;OTTHUMP000000654  
60 Tax\_Id=9606 Protein S100-A8  
IPI00027350.2 SWISS-  
PROT:P32119|ENSEMBL:ENSP00000301522|REFSEQ:NP\_005800|H-  
INV:HIT000277909|VEGA:OTTHUMP00000077857;OTTHUMP00000083173;OTTHUMP00000165823 Tax\_Id=9606 Pe-  
roxiredoxin-2  
IPI00020037.1 SWISS-PROT:Q15853-  
1|TREMBL:Q6FI33|ENSEMBL:ENSP00000222305|REFSEQ:NP\_003358|H-  
INV:HIT000053374|VEGA:OTTHUMP00000078232 Tax\_Id=9606 Isoform USF2A of Upstream stimulatory fac-  
tor 2  
IPI00001716.5 SWISS-PROT:Q9Y606-  
2|ENSEMBL:ENSP00000324726|REFSEQ:NP\_001002019;NP\_001002020|VEGA:OTTHUMP00000169905 Tax\_Id=9606  
Isoform 2 of tRNA pseudouridine synthase A  
IPI00234252.2 SWISS-  
PROT:Q92922|TREMBL:Q05BW5;Q05CR1;Q17RS0|ENSEMBL:ENSP00000254480|REFSEQ:NP\_003065|H-  
INV:HIT000220955|VEGA:OTTHUMP00000164798 Tax\_Id=9606 SWI/SNF-related matrix-associated actin-  
dependent regulator of chromatin subfamily C member 1  
IPI00031425.1 SWISS-  
PROT:P42357|TREMBL:Q2PH55;Q2PH56;Q2PH57;Q2PH58;Q2PH59;Q2PH60;Q2PH61;Q4VB92;Q4VB95|ENSEMBL:ENSP0  
0000261208|REFSEQ:NP\_002099|H-INV:HIT000100610|VEGA:OTTHUMP00000168804 Tax\_Id=9606 Histidine  
ammonia-lyase  
IPI00154742.5 ENSEMBL:ENSP00000346922 Tax\_Id=9606 25 kDa protein  
IPI00066641.4 VEGA:OTTHUMP00000078226 Tax\_Id=9606 81 kDa protein  
IPI00449049.4 SWISS-  
PROT:P09874|TREMBL:Q05D33;Q5VX86;Q6PJL0;Q96P95|ENSEMBL:ENSP00000272146;ENSP00000355759|REFSEQ:N  
P\_001609|H-INV:HIT000195479|VEGA:OTTHUMP00000035663;OTTHUMP00000061192 Tax\_Id=9606 Poly [ADP-  
ribose] polymerase 1  
IPI00071509.1 SWISS-PROT:Q13835-  
1|ENSEMBL:ENSP00000263946;ENSP00000295597|REFSEQ:NP\_000290|VEGA:OTTHUMP00000033849 Tax\_Id=9606  
Isoform 2 of Plakophilin-1  
IPI00217512.2 SWISS-PROT:Q8IZF3-  
2|ENSEMBL:ENSP00000328319|REFSEQ:NP\_722580|VEGA:OTTHUMP00000016563 Tax\_Id=9606 Isoform 2 of  
Probable G-protein coupled receptor 115  
IPI00002214.1 SWISS-  
PROT:P52292|TREMBL:Q53YE3;Q6NVW7|ENSEMBL:ENSP00000332455|REFSEQ:NP\_002257;XP\_001133254;XP\_00113  
3256;XP\_001133258;XP\_001133265;XP\_001133267;XP\_001133271|H-  
INV:HIT000217918;HIT000284723|VEGA:OTTHUMP00000183339 Tax\_Id=9606 Importin alpha-2 subunit  
IPI00011590.1 SWISS-  
PROT:P15407|TREMBL:Q53GM9;Q6FG51|ENSEMBL:ENSP00000310170|REFSEQ:NP\_005429|H-  
INV:HIT000037612|VEGA:OTTHUMP00000070033 Tax\_Id=9606 Fos-related antigen 1  
IPI00026256.2 SWISS-  
PROT:P20930|ENSEMBL:ENSP00000357789|REFSEQ:NP\_002007|VEGA:OTTHUMP00000014057 Tax\_Id=9606  
Filaggrin  
IPI00009995.2 SWISS-PROT:Q15723-  
1|ENSEMBL:ENSP00000265495|REFSEQ:NP\_973728|H-INV:HIT000219835|VEGA:OTTHUMP00000164540  
Tax\_Id=9606 Isoform 1 of ETS-related transcription factor Elf-2  
IPI00215790.5 SWISS-  
PROT:P63173|ENSEMBL:ENSP00000309830|REFSEQ:NP\_000990;NP\_001030335|H-  
INV:HIT000326788|VEGA:OTTHUMP00000182261;OTTHUMP00000182262;OTTHUMP00000182264;OTTHUMP000001822  
65 Tax\_Id=9606 60S ribosomal protein L38  
IPI00221088.4 SWISS-  
PROT:P46781|ENSEMBL:ENSP00000302896|REFSEQ:NP\_001004|H-  
INV:HIT000296024|VEGA:OTTHUMP00000069577;OTTHUMP00000069584;OTTHUMP00000069585;OTTHUMP000000711  
22;OTTHUMP00000077992;OTTHUMP00000077993 Tax\_Id=9606 40S ribosomal protein S9  
IPI00179330.6 TREMBL:Q5RKT7|ENSEMBL:ENSP00000272317|REFSEQ:NP\_002945|H-  
INV:HIT000216848 Tax\_Id=9606 ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor  
IPI00017412.1 SWISS-PROT:P35250-  
1|ENSEMBL:ENSP00000055077|REFSEQ:NP\_852136|H-  
INV:HIT000305975|VEGA:OTTHUMP00000024857;OTTHUMP00000160646 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of  
Replication factor C subunit 2  
IPI00003325.2 SWISS-PROT:P36402-1 Tax\_Id=9606 Isoform 4L of  
Transcription factor 7

## Anhang

IPI00152881.5  
TREMBL:Q5QTQ3;Q8TF72;Q96IR9;Q9P247|ENSEMBL:ENSP00000264907|REFSEQ:NP\_065910|H-  
INV:HIT000059726|VEGA:OTTHUMP00000160595 Tax\_Id=9606 Shroom-related protein

IPI00101186.6 SWISS-PROT:Q5JTH9-  
1|ENSEMBL:ENSP00000266051;ENSP00000360031|REFSEQ:NP\_055994|H-  
INV:HIT000005770|VEGA:OTTHUMP0000020207;OTTHUMP0000059385 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Protein KIAA0690

IPI00011569.2 SWISS-  
PROT:Q13085|ENSEMBL:ENSP00000354565|REFSEQ:NP\_942133;NP\_942136|H-  
INV:HIT000251156|VEGA:OTTHUMP00000164076;OTTHUMP00000180727 Tax\_Id=9606 Acetyl-CoA carboxylase 1

IPI00018465.1 SWISS-  
PROT:Q99832|TREMBL:Q53HV2;Q6FI26;Q6IBT3|ENSEMBL:ENSP00000258091|REFSEQ:NP\_006420|H-  
INV:HIT000266185|VEGA:OTTHUMP0000041016 Tax\_Id=9606 T-complex protein 1 subunit eta

IPI00008822.1 SWISS-PROT:P54821-  
1|ENSEMBL:ENSP00000234744;ENSP00000356734|REFSEQ:NP\_073207|H-  
INV:HIT000265500|VEGA:OTTHUMP00000033167;OTTHUMP00000060455 Tax\_Id=9606 Isoform PMX1-B of Paired mesoderm homeobox protein 1

IPI00217465.4 SWISS-  
PROT:P16403|ENSEMBL:ENSP00000339566|REFSEQ:NP\_005310|H-INV:HIT000031065|VEGA:OTTHUMP00000017749  
Tax\_Id=9606 Histone H1.2

IPI00003739.5 SWISS-  
PROT:Q9Y6V7|TREMBL:Q9NVY6|ENSEMBL:ENSP00000247003|REFSEQ:NP\_061943|VEGA:OTTHUMP00000067841;OTTHUMP00000076347 Tax\_Id=9606 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX49

IPI00005681.5 REFSEQ:XP\_045290 Tax\_Id=9606 similar to basic leucine zipper and W2 domains 1

IPI00101659.6 SWISS-PROT:Q96P11-  
2|ENSEMBL:ENSP00000309126|REFSEQ:NP\_683759|VEGA:OTTHUMP00000025324;OTTHUMP00000160309  
Tax\_Id=9606 Isoform 2 of Putative methyltransferase NSUN5

IPI00289983.2  
TREMBL:Q96KY0;Q96QM0|ENSEMBL:ENSP00000323036|VEGA:OTTHUMP00000172823 Tax\_Id=9606 ACPD protein

IPI00023020.1 SWISS-PROT:P04279-  
1|TREMBL:Q53ZV1;Q53ZV2|ENSEMBL:ENSP00000341303;ENSP00000361867|REFSEQ:NP\_002998|H-  
INV:HIT000191260|VEGA:OTTHUMP00000031098;OTTHUMP00000031101 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Semenogelin-1 precursor

IPI00329594.4  
TREMBL:Q9H2V5;Q9NW62;Q9P031|ENSEMBL:ENSP00000256151|REFSEQ:NP\_054886|H-  
INV:HIT000002079|VEGA:OTTHUMP00000168632 Tax\_Id=9606 BR22 TTF-1 associated protein

IPI00328319.7 SWISS-  
PROT:Q09028|ENSEMBL:ENSP00000294520;ENSP00000362592|REFSEQ:NP\_005601|H-  
INV:HIT0000323434|VEGA:OTTHUMP0000009691;OTTHUMP00000045445 Tax\_Id=9606 Histone-binding protein RBBP4

IPI00300376.3 SWISS-  
PROT:Q08188|TREMBL:Q32ML9;Q32MM0|ENSEMBL:ENSP00000216934;ENSP00000370867|REFSEQ:NP\_003236|H-  
INV:HIT000192026|VEGA:OTTHUMP00000030008;OTTHUMP00000030009 Tax\_Id=9606 Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E precursor

IPI00098902.4 SWISS-  
PROT:Q02218|TREMBL:Q9UDX0|ENSEMBL:ENSP00000222673|REFSEQ:NP\_002532|H-  
INV:HIT000100430|VEGA:OTTHUMP00000025189 Tax\_Id=9606 oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide) isoform 1 precursor

IPI00011200.4 SWISS-  
PROT:O43175|ENSEMBL:ENSP00000263167;ENSP00000358417|REFSEQ:NP\_006614|H-  
INV:HIT000035203|VEGA:OTTHUMP00000013926;OTTHUMP00000059532 Tax\_Id=9606 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase

IPI00005721.1 SWISS-  
PROT:P59665|TREMBL:Q6EZF6|ENSEMBL:ENSP00000372136;ENSP00000372139|REFSEQ:NP\_004075;XP\_001127929  
|H-INV:HIT000195066|VEGA:OTTHUMP00000176942;OTTHUMP00000176943 Tax\_Id=9606 Neutrophil defensin 1 precursor

IPI00297982.6 SWISS-  
PROT:P41091|TREMBL:Q2VIR3;Q53HK3|ENSEMBL:ENSP00000253039|REFSEQ:NP\_001406|H-  
INV:HIT000038713|VEGA:OTTHUMP00000023076;OTTHUMP00000061475 Tax\_Id=9606 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3

REV IPI00030252.1 SWISS-  
PROT:Q9HB96|ENSEMBL:ENSP00000229769;ENSP00000363032|REFSEQ:NP\_068741|H-  
INV:HIT000075540|VEGA:OTTHUMP00000016254;OTTHUMP00000039600 Tax\_Id=9606 Fanconi anemia group E protein

IPI00295081.1 SWISS-  
PROT:P23258|TREMBL:Q53X79|ENSEMBL:ENSP00000251413|REFSEQ:NP\_001061|H-  
INV:HIT000029781|VEGA:OTTHUMP00000181218 Tax\_Id=9606 Tubulin gamma-1 chain

IPI00290460.3 SWISS-  
PROT:O75821|TREMBL:Q6IAM0|ENSEMBL:ENSP00000253108|REFSEQ:NP\_003746|H-  
INV:HIT000033812|VEGA:OTTHUMP00000067130;OTTHUMP00000076433 Tax\_Id=9606 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 4

IPI00220480.7 ENSEMBL:ENSP00000265385 Tax\_Id=9606 60 kDa protein  
IPI00373937.2 VEGA:OTTHUMP00000077405 Tax\_Id=9606 61 kDa protein  
IPI00452246.1 SWISS-PROT:Q96L93-  
1|ENSEMBL:ENSP00000347076|REFSEQ:NP\_078980|H-INV:HIT000084892|VEGA:OTTHUMP00000030321  
Tax\_Id=9606 Isoform 1 of Kinesin-like motor protein C20orf23

## Anhang

IPI00013537.3 TREMBL:Q9NXX5|VEGA:OTTHUMP00000077077 Tax\_Id=9606 CDNA  
FLJ20004 fis, clone ADKA02391  
REV IPI00253835.6 SWISS-PROT:Q96NH3-  
1|TREMBL:Q5SZM6|ENSEMBL:ENSP00000357449|REFSEQ:NP\_689943|H-  
INV:HIT000249734|VEGA:OTTHUMP00000040350 Tax\_Id=9606 hypothetical protein LOC221322  
IPI00031015.1 SWISS-  
PROT:Q14493|TREMBL:Q53XR2|ENSEMBL:ENSP00000316490;ENSP00000372395|REFSEQ:NP\_006518|H-  
INV:HIT000293259|VEGA:OTTHUMP00000113498 Tax\_Id=9606 Histone RNA hairpin-binding protein  
IPI00028416.1 SWISS-  
PROT:P40425|TREMBL:Q5STG8;Q7KZE5|ENSEMBL:ENSP00000364187;ENSP00000364190;ENSP00000372617;ENSP00  
000372757|REFSEQ:NP\_002577|H-  
INV:HIT000280688|VEGA:OTTHUMP00000014827;OTTHUMP00000029151;OTTHUMP00000029562;OTTHUMP000000626  
89 Tax\_Id=9606 Pre-B-cell leuk  
REV IPI00001426.1 SWISS-  
PROT:Q9Y5E3|ENSEMBL:ENSP00000231136|REFSEQ:NP\_061762|H-INV:HIT000074193|VEGA:OTTHUMP00000160023  
Tax\_Id=9606 Protocadherin beta 6 precursor  
IPI00015262.9 SWISS-  
PROT:Q99439|TREMBL:Q53GK7;Q6FHC3;Q6FHE4|ENSEMBL:ENSP00000263097|REFSEQ:NP\_004359|H-  
INV:HIT000277445|VEGA:OTTHUMP00000066396;OTTHUMP00000076292 Tax\_Id=9606 Calponin-2  
IPI00299547.4 SWISS-  
PROT:P80188|TREMBL:Q5SYW0;Q6FGL5|ENSEMBL:ENSP00000277480;ENSP00000362102;ENSP00000362108|REFSEQ  
:NP\_005555|H-  
INV:HIT000041793|VEGA:OTTHUMP00000022238;OTTHUMP00000022240;OTTHUMP00000043587;OTTHUMP000000435  
89 Tax\_Id=9606 Neutrophil gelatinase-associate  
IPI00015011.1 SWISS-PROT:Q9NXX8-  
1|ENSEMBL:ENSP00000247977|REFSEQ:NP\_060173|VEGA:OTTHUMP00000067109;OTTHUMP00000076490  
Tax\_Id=9606 Isoform 1 of F-box/LRR-repeat protein 12  
IPI00410656.1 SWISS-  
PROT:P61129|TREMBL:Q6ZNI2;Q6ZW96|ENSEMBL:ENSP00000340298|H-INV:HIT000249704 Tax\_Id=9606 Zinc  
finger CCCH domain-containing protein 6  
IPI00167985.5 SWISS-  
PROT:Q8NAF0|ENSEMBL:ENSP00000320188|REFSEQ:NP\_689813|H-  
INV:HIT000017639|VEGA:OTTHUMP00000069927;OTTHUMP00000076661 Tax\_Id=9606 Zinc finger protein 579  
REV IPI00023576.3 SWISS-  
PROT:O43300|TREMBL:AOAVL3|ENSEMBL:ENSP00000274711|REFSEQ:NP\_056379|H-INV:HIT000000133  
Tax\_Id=9606 Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 2 precursor  
IPI00013885.1 SWISS-  
PROT:P31944|ENSEMBL:ENSP00000221740|REFSEQ:NP\_036246|H-  
INV:HIT000068516|VEGA:OTTHUMP00000067274;OTTHUMP00000076199 Tax\_Id=9606 Caspase-14 precursor  
IPI00220133.2 SWISS-PROT:Q13506-2|ENSEMBL:ENSP00000349749 Tax\_Id=9606  
Isoform Short of NGFI-A-binding protein 1  
IPI00006356.3 TREMBL:Q7Z6Z6|ENSEMBL:ENSP00000216177|REFSEQ:NP\_620169|H-  
INV:HIT000013262|VEGA:OTTHUMP00000028876 Tax\_Id=9606 OTTHUMP00000028876  
IPI00178150.5 SWISS-PROT:O95239-  
1|TREMBL:Q59HG1|ENSEMBL:ENSP00000340076;ENSP00000363524|REFSEQ:NP\_036442|H-  
INV:HIT000065865|VEGA:OTTHUMP00000023473;OTTHUMP00000062032 Tax\_Id=9606 Isoform 1 of  
Chromosome-associated kinesin KIF4A  
IPI00019992.4 SWISS-  
PROT:P10243|ENSEMBL:ENSP00000332150|REFSEQ:XP\_034274|H-INV:HIT000321362|VEGA:OTTHUMP00000177643  
Tax\_Id=9606 Myb-related protein A  
IPI00179193.3 SWISS-PROT:Q8WXR4-  
2|TREMBL:Q53T08;Q96N94|ENSEMBL:ENSP00000314213|REFSEQ:NP\_620482|H-INV:HIT000078541 Tax\_Id=9606  
Isoform 2 of Myosin IIIB  
REV IPI00783879.2 SWISS-  
PROT:P15822|TREMBL:Q5MPB1;Q5VW60;Q82133|ENSEMBL:ENSP00000324040;ENSP00000368698|REFSEQ:NP\_00210  
5|H-INV:HIT000321648|VEGA:OTTHUMP00000016036;OTTHUMP00000039260 Tax\_Id=9606 human  
immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1  
IPI00017303.1 SWISS-  
PROT:P43246|TREMBL:Q0ZAI9;Q53FK0;Q53GS1;Q53RU4;Q6VBB7|ENSEMBL:ENSP00000233146|REFSEQ:NP\_000242|  
H-INV:HIT000039221|VEGA:OTTHUMP00000096163;OTTHUMP00000159084 Tax\_Id=9606 DNA mismatch repair  
protein Msh2  
IPI00010336.1 SWISS-  
PROT:P13725|TREMBL:Q6FHP8|ENSEMBL:ENSP00000215781|REFSEQ:NP\_065391|H-  
INV:HIT000035313|VEGA:OTTHUMP00000028540 Tax\_Id=9606 Oncostatin-M precursor  
REV IPI00289113.4 SWISS-PROT:Q6UWE0-  
2|ENSEMBL:ENSP00000348491;ENSP00000362421|VEGA:OTTHUMP00000022173 Tax\_Id=9606 Isoform 2 of E3  
ubiquitin-protein ligase LRSAM1  
REV IPI00005367.1 SWISS-PROT:Q9UGJ0-  
1|ENSEMBL:ENSP00000287878|REFSEQ:NP\_057287|H-INV:HIT000245957|VEGA:OTTHUMP00000042783  
Tax\_Id=9606 Isoform A of 5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2  
REV IPI00398435.3 SWISS-  
PROT:O15031|TREMBL:Q2TBE4;Q3LIB1;Q7Z2L0|ENSEMBL:ENSP00000352288|REFSEQ:XP\_371474|H-  
INV:HIT000000021|VEGA:OTTHUMP00000042156 Tax\_Id=9606 similar to Plexin-B2 precursor

**D. Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
Å	Angström
ABPP	<i>activity-based protein profiling</i>
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
aq.	wässrig
AQ	Anthrachinon
ATP	Adenosintriphosphat
ATT	6-Aza-2-thiothymin
AU	<i>arbitrary units</i>
ber.	berechnet
BER	<u>B</u> asen <u>e</u> x <u>r</u> cisions <u>r</u> eparatur
BTT	5-Benzylthiotetrazol
Bz	Benzoyl
C	Cytosin
CD	Zirkulardichroismus
CE	Kapillarelektrophorese
CED-Cl	$\beta$ -Cyanoethyl-diisopropylaminochlorophosphin
CHCA	$\alpha$ -Cyanohydroxyzimtsäure
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CPD	<u>C</u> yclobutan- <u>P</u> irimidin- <u>D</u> imer
CPG	<i>controlled pore glass</i>
cr	<i>charge recombination</i>
cs	<i>charge separation</i>
d	Tage
dA	2'-Desoxyadenosin
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytidin
DCM	Dichlormethan
dG	2'-Desoxyguanosin
Disp.	Disproportionierung
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4, 4'-Dimethoxytrityl-
DMTrCl	4, 4'-Dimethoxytritylchlorid



DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dT	Thymin
DTT	Dithiothreitol
e <sup>-</sup>	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Enzyme mobility shift assay</i>
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i> , Elektronenspinresonanz
eq	Äquivalente
ESI	<i>electron spray injection</i> , Elektronensprayinjektion
ET	Elektronentransfer
EtOAc	Essigsäureethylester
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FADH	reduziertes, deprotoniertes Flavin-Adenin-dinukleotid
β-cFaPydG	carbozyklisches β-FaPydG
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FTICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
FT-IR	Fourier Transform-Infrarotspektroskopie
G	Guanin
G	freie Enthalpie
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunden
8-HDF	8-Hydroxydesazaflavin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Hochaufgelöstes Massenspektrum
HUGO	<i>human genome project</i>
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
I	Intensität
ICAT	<i>isotope-coded affinity tagging</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	isoelektrischer Punkt

I <sub>p</sub>	Ionisierungspotential
iPr	Isopropyl
iPr-Pac	Isopropyl-phenoxyacetyl
ISC	<i>intersystem crossing</i>
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
k	Geschwindigkeitskonstante
k	Boltzmannkonstante
kcal	Kilokalorien
konz.	konzentriert
L	Liter
LED	<i>light emitting diode</i>
LIF	<i>Laser-induced fluorescence</i>
Ll	<i>Lactococcus lactis</i>
M	molar
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute
MPI	Max-Planck-Institut
MS	Massenspektrometrie
MS	Molekularsieb
MTHF	Methenyltetrahydrofolat
MudPIT	<i>multidimensional protein identification technology</i>
MW	Molekulargewicht
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-dinukleotid
n-BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NER	<u>N</u> ukleotid <u>e</u> xcisions <u>r</u> eparatur
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetresonanz
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
Nu <sup>-</sup>	Nukleophil
5-OH-dU	5-Hydroxydesoxyuridin
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster

8-Oxo-dA	8-Hydroxydesoxyadenosin
8-Oxo-dG	8-Hydroxydesoxyguanosin
Ox.	Oxidation, oxidiert
Pac <sub>2</sub> O	Phenoxyessigsäureanhydrid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pK <sub>a</sub>	Säurekonstante
PMF	<i>peptide mass fingerprinting</i>
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
ppm	<i>parts per million</i>
<i>p</i> -TsCl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
<i>Py</i>	Pyridin
quant.	quantitativ
Red.	Reduktion, reduziert
rel.	relativ
<i>R<sub>f</sub></i>	<i>retention factor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
<i>rp</i>	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
RPA	<i>replication protein A</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAX	<i>strong anion exchange</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	gesättigte Kalomel-Elektrode
SCX	<i>strong cation exchange</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	<i>stable isotope labeling of amino acids in cell culture</i>
Smp.	Schmelzpunkt
T	Thymin
T	Temperatur
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>TF</i>	<i>transcription factor</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

TMS-OMe	Methoxytrimethylsilan
TOF	<i>time of flight</i> , Flugzeit
Tol	Toluol
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
tRNA	<i>transport-RNA</i>
U	<i>units</i>
UV	ultraviolett
ü. N.	über Nacht
Vis	<i>visible</i>
W	Watt
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum A complementing protein</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum C complementing protein</i>



## Curriculum vitae

Sascha Breeger

Geburtsdatum: 21.06.1978  
Geburtsort: Fulda  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulausbildung

August 1984 – Juni 1988                      Grundschule Haimbach  
August 1988 – Juni 1997                      Winfriedschule (Gymnasium) Fulda, Ø 1.5

## Grundwehrdienst

November 1997 – August 1998              Grundwehrdienst beim AFSBw in Eschborn/Frankfurt

## Studium

Oktober 1998 – Juli 2003                      Chemiestudium an der Philipps-Universität Marburg  
Oktober 2000                                      Vordiplomprüfungen, Ø 1.2  
Dezember 2002                                    Diplomprüfungen  
Januar 2003 – Juli 2003                      Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Carell „Untersuchung von Überschusselektronentransferprozessen in Nukleinsäuren“, Note 1.0  
Juli 2003    Diplom, Ø 1.1

## Promotion

Oktober 2003 – Mai 2007                      Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München







