






Ulrich Hennecke



**DNA Photoschäden:
Untersuchungen zur Synthese,
enzymatischen Erkennung und Reparatur**



Cuvillier Verlag Göttingen

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

**DNA Photoschäden:
Untersuchungen zur Synthese,
enzymatischen Erkennung und Reparatur**

Ulrich Hennecke

aus

Stadtdorf

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
978-3-86727-205-6

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 selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 20.01.2007



(Ulrich Hennecke)

Dissertation eingereicht am 23.01.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

Mündliche Prüfung am 15.2.2007

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2007

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

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

978-3-86727-205-6

Danksagung

Prof. Dr. Thomas Carell danke ich für die sehr interessante Themenstellung, die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Prof. Dr. Patrick Cramer danke ich für die Übernahme des Koreferats und die hervorragende Zusammenarbeit auf dem Gebiet der RNA Polymerase II.

Ina Pinnschmid und *Slava Gärtner* danke ich für die unbürokratische Unterstützung in allen organisatorischen Belangen.

Den Mitarbeitern der Abteilungen für NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie an den Universitäten Marburg und München danke ich für die Aufnahme von NMR- und Massenspektren. *Uwe Linne* danke ich für HPLC-MS/MS Experimente.

Mein Dank gilt auch meinen Kooperationspartnern *Prof. Dr. Lars-Oliver Essen* und seinen Mitarbeitern *Petra Gnau* und *Tobias Klar* und, wie schon erwähnt, *Prof. Dr. Patrick Cramer* und seinem Mitarbeiter *Florian Brückner* für die hervorragende Zusammenarbeit und die hochinteressanten Einblicke in ihre Themengebiete. Ebenso danke ich *Jochen Klages* (AK *Kessler*) für die NMR-spektroskopischen Messungen an DNA mit einem (6-4)-Schaden.

Meinen F-Praktikanten *Christoph Nolte*, *Chris Kuffer* und *Martin Zeuner* danke ich für ihren großen Einsatz und die hohe Motivation im Labor.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises Carell danke ich für die sehr angenehme und inspirierende Arbeitsatmosphäre. Besonders erwähnt werden müssen *Katja Krähling* (für die Labororganisation in Marburg), *Sabine Voß* (für die Überlassung des Carbazylus **133**) und *Claudia Gräf* (für die Synthese des CPD Schadens und anderer Vorstufen).

Wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit haben auch *Eva Jahn*, *Carsten Pieck*, *Sascha Breeger* und *David Hammond* beigetragen, die das Manuskript sorgfältig Korrektur gelesen haben.

Außerdem schulde ich Dank: *Johannes Gierlich* (für gute Nachbarschaft in und außerhalb des Labors und Unterstützung in allen Computerfragen), meinen Laborkollegen aus F4.001B, die auch meine nicht immer gute Laune ertrugen: *Marcus Friedel* (für sehr gute Musikauswahl), *Friederike Grolle* (für ihr charmantes Lächeln und die Toleranz gegenüber der guten Musikauswahl), *Philipp Gramlich* und *Christian Wirges* (für weiterhin gute Laboratmosphäre mit angemessener Musikauswahl), *Melanie Maul* (für die gemeinsame Arbeit an den Photolyasen), *Guido Clever* (für angeregte Diskussionen über Chemie und den größten, möglichen Unsinn), *Christoph Behrens* (für die gemeinsame Arbeit am Elektronentransfer und trockene Kommentare) und *Glenn Burley* (für angeregte Diskussionen über Chemie und Humor).

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mich während meines Studiums und auch danach immer in allen Belangen großzügig unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit sind publiziert oder wurden auf Kongressen präsentiert:

Veröffentlichungen in rezensierten Zeitschriften

U. Hennecke, D. Kuch, T. Carell, *Synthesis* **2007**, angenommen. A general route to 4-C-substituted pyrimidine nucleosides.

F. Brückner, U. Hennecke, T. Carell, P. Cramer, *Science* **2007**, angenommen. CPD damage recognition by transcribing RNA polymerase II.

T. Klar, G. Kaiser, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer, L.-O. Essen, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1798-1806. Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA Photolyase from *Thermus Thermophilus*.

S. Breeger, M. von Meltzer, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6469-6477. Investigation of the Pathways of Excess Electron Transfer in DNA with Flavin-Donor and Oxetane-Acceptor Modified DNA Hairpins.

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.

B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1848-1851. Excess electron transport through DNA: a single electron repairs more than one UV-induced lesion.

S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am Chem. Soc.* **2004**, 126, 1302-1303. Excess electron-transfer-based repair of a cis-syn Thymine Dimer in DNA is not sequence dependent.

Buchbeiträge

C. Behrens, M. K. Cichon, F. Grolle, U. Hennecke, T. Carell, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 187-204. Excess electron transfer in defined donor-nucleobase and donor-DNA-acceptor systems.

Konferenzbeiträge

Posterpresentationen

- 10-11.10.2005 “Asymmetric synthesis of a DNA (6-4) photo lesion analogue”
9. SFB-Symposium des SFB 380 “Asymmetrische Synthesen mit chemischen und biologischen Methoden“, Aachen.
- 20-25.2.2005 “Excess electron transfer in DNA”
NanoTech Insight Conference, Luxor, Ägypten.
- 22-24.3.2004 “Excess electron transfer in DNA”
Heraeus Seminar “Nanophysics of DNA”, Bad Honnef.

Vorträge

- 8.10.2005 “Repair of DNA Photo Lesions Observed at an Atomic Level”
4. Internationales Symposium der Volkswagen Stiftung zu “Interplay between Molecular Conformations and Biological Function”, EMBL, Heidelberg.
- 10.10.2003 “Excess electron transport in dsDNA”
Internationales Symposium des DFG Graduiertenkollegs “Protein function at the atomic level”, Rauschholzhausen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	5
Inhaltsverzeichnis	9
Zusammenfassung	13
Summary	16
1. Einleitung	19
1.1 DNA und DNA Schäden	19
1.2 Oxidative Schäden und oxidativer Ladungstransport in DNA	20
1.3 DNA Photoschäden	22
1.3.1 Cyclobutanpyrimidindimere (CPD Schäden).....	24
1.3.2 (6-4)-Photoschäden und ihre Dewarvalenzisomere.....	25
1.3.3 DNA Photophysik und Photochemie.....	27
1.4 Die Auswirkungen von DNA Photoschäden in der Zelle.....	29
1.4.1 DNA Photoschäden und DNA Polymerasen	30
1.4.2 DNA Photoschäden und RNA Polymerasen	33
1.5 Die Reparatur von DNA Photoschäden.....	34
1.5.1 Photoschäden und BER	34
1.5.2 Photoschäden und NER.....	36
1.5.3 Transkriptions-gekoppelte DNA Reparatur.....	37
1.5.4 DNA Photolyasen	38
1.6 DNA Photoschäden und Mutagenität	43
1.7 CPD Schäden und der reduktive Ladungstransport in DNA	45
2. Aufgabenstellung	47
3. Überschusselektronentransfer in DNA	48
3.1 Einleitung.....	48
3.2 Überschusselektronentransfer in DNA-Doppelsträngen mit Donor 26 und Akzeptor 28	50
3.2.1 Herstellung und Charakterisierung der modifizierten DNA Stränge ...	50
3.2.2 Elektronentransferexperimente.....	53
3.3 Überschusselektronentransfer in DNA-Haarnadeln mit Donor 27 und Akzeptor 28	60

3.4	Experimente zum Überschusselektronentransfer in DNA Doppelsträngen der Gruppe Rokita.....	61
3.5	Überschusselektronentransferexperimente mit einem Einelektronendonator 38 und dem CPD Schaden 28	62
3.6	Überschusselektronentransferexperimente mit Oxetanen als Akzeptor	64
3.6.1	Synthese des Bausteins 46	67
3.6.2	Einbau von Oxetan 46 in DNA-Flavin-Haarnadeln und Charakterisierung der erhaltenen DNA-Stränge	69
3.6.3	Elektronentransferexperimente mit Flavin-Oxetan-Haarnadeln.....	71
3.7	Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	74
4.	Die CPD Photolyase – Substrat- und Kofaktorbindung	77
4.1	Einleitung.....	77
4.2	Die Substrat-Enzyme Kokristallstruktur.....	78
4.2.1	Vorarbeiten	78
4.2.2	Analyse der CPD Schaden enthaltenden DNA aus Photolyasekristallen.	80
4.2.3	Die CPD Photolyase Struktur mit gebundenem Substrat	83
4.2.4	Weitere Kokristallisationsversuche	87
4.3	Die CPD-Photolyase und modifizierte Kofaktoren	89
4.3.1	Synthese von 8-substituierten Flavinderivaten.....	90
4.3.2	Einbau von synthetischen Kofaktoren in <i>T. thermophilus</i> CPD Photolyase.....	94
5.	Die eukaryotische RNA Polymerase II und der CPD Schaden.....	96
5.1	Einleitung.....	96
5.2	Aufbau der verwendeten Nukleinsäurekonstrukte.....	97
5.3	Biochemische Experimente	98
5.4	Kokristallstrukturen der RNA Polymerase II mit CPD Dimer DNA	100
5.4.1	Die RNA Polymerase II Struktur mit RPK1 (Struktur A).....	102
5.4.2	Die RNA Polymerase II Struktur mit RPK2 (Struktur B)	102
5.4.3	Die RNA Polymerase II Struktur mit RPK3 (Struktur C)	103
5.4.4	Die RNA Polymerase II Struktur mit RPK4 (Struktur D).....	105
5.5	Die Blockade der RNA Polymerase II durch die CPD Schaden-Uridin Fehlpaarung	107

5.6	Der Transkriptionsfaktor TFIIS und die durch den CPD Schaden blockierte RNA Polymerase	110
5.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	111
6.	Methoden zur Herstellung des (6-4)-Schadens	114
6.1	Einleitung.....	114
6.2	Studien zur Totalsynthese des (6-4)-Schadens	116
6.2.1	1,4-Additionen von Cupraten an Uridinderivate	117
6.2.2	Kreuzkupplungen mit 4-Arylsulfonaten von 2-Pyrimidinonukleosiden	119
6.2.3	Synthesestudien zum (6-4)-Schaden.....	126
6.3	Die direkte Belichtung kurzer DNA Stränge.....	133
6.3.1	Die Belichtung von 5'-AATTAA-3' (DS22)	133
6.3.2	Die Belichtung von 5'-GGTTGG-3' (DS23) und 5'-GGTCGG-3' (DS24).....	137
6.3.3	Ein neuer, einfacher Assay für die (6-4)-Photolyase.....	140
6.3.4	Die Synthese eines exocyclisch ¹⁵ N-markierten (6-4)-Schadens für NMR-Untersuchungen.....	142
6.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	148
7.	Experimenteller Teil.....	151
7.1	Material und Methoden.....	151
7.2	Spezielle Methoden	157
7.2.1	Überschusselektronentransferexperimente	157
7.2.2	Transkript-Verlängerungsexperimente mit der RNA Polymerase II..	158
7.2.3	Belichtungen zur Herstellung des (6-4)-Schadens	158
7.2.4	(6-4)-Photolyaseassay.....	159
7.3	Synthesvorschriften.....	160
7.3.1	Synthese des Oxetan-Uridin-Konjugates.....	160
7.3.2	Synthese von 8-Demethyl-8-iodriboflavin	164
7.3.3	Synthesestudien zur Herstellung des (6-4)-Schadens: 1,4-Addition ..	166
7.3.4	Synthesestudien zur Herstellung des (6-4)-Schadens: Kreuzkupplungen	168
7.3.5	Synthesestudien zur Herstellung des (6-4)-Photoschadens: Untersuchungen zur Einführung von funktionellen Gruppen.....	180

7.3.6	Synthese eines ^{15}N -markierten Cytosinphosphoramidites-Bausteins für die DNA Synthese	186
8.	Literaturverzeichnis	190
9.	Anhang.....	203
9.1	Kristallstrukturdaten für 8-Demethyl-8-aminoriboflavin (60)	203
9.2	NMR-Spektren der Verbindungen 134 und 135	205
9.3	Abkürzungsverzeichnis.....	207

Zusammenfassung

UV-Strahlung führt in der DNA zur Entstehung von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPDs) und (6-4)-Photoschäden. Diese Schäden sind stark cytotoxisch, mutagen und wesentlich an der Entstehung von Hautkrebs beteiligt. Die Wechselwirkung dieser Schäden mit den wichtigsten DNA-abhängigen Prozessen in der Zelle, wie der Replikation, Transkription und DNA Reparatur, ist bisher nur in wenigen Fällen auf atomarer Ebene untersucht worden. Diese Arbeit umfasst mechanistische Untersuchungen zur reduktiven Reparatur dieser Photoschäden und ihrer Analoga in DNA Strängen, die von grundlegender Bedeutung für das Verständnis des reduktiven Elektronentransfers in DNA sind. Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Erkennung des häufigsten Photoschadens, des Cyclobutanpyrimidin-dimers (CPD), durch Enzyme wie der CPD Photolyase oder der eukaryotische RNA Polymerase II. Außerdem wurden Arbeiten zur Synthese des (6-4)-Photoschadens und eines ^{15}N -markierten Derivats durchgeführt, um den Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyase zu untersuchen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Sequenzabhängigkeit des Überschusselektronentransfers in DNA untersucht. Dazu wurden Modellsysteme verwendet, die aus einem Elektronendonator und einem DNA Photoschaden als Elektronenakzeptor bestanden. Mit einem Flavinnukleotid als Donor und dem CPD Photoschaden konnte keine Sequenzabhängigkeit des Überschusselektronentransfer in DNA nachgewiesen werden. In Zusammenarbeit mit der Gruppe *Giese* konnte dann allerdings gezeigt werden, dass die Spaltung des Dimers wahrscheinlich zu langsam ist, um eine Sequenzabhängigkeit nachzuweisen. Experimente mit einem α -Hydroxyketonnukleosid als Elektronendonator ergaben, dass ein Elektron mehr als ein Dimer reparieren kann. Die beobachtete Selektivität in einem Strang mit zwei Dimeren konnte aber nur erklärt werden, wenn die Öffnung des Dimers ratenbestimmend ist. Daher wurde als alternativer Elektronenakzeptor ein Thyminbenzophenonoxetannukleosid, ein Analog des (6-4)-Photoschadens, synthetisiert. Diese Oxetane spalten sehr viel schneller als die Cyclobutanschäden. In DNA Haarnadeln mit einem Flavin als Elektronendonator und dem Oxetan als Akzeptor konnte nun eine leichte Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers nachgewiesen werden. Der Überschusselektronentransfer erfolgte effektiver über AT- als über GC- Basenpaare, womit ähnliche Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden konnten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit strukturbioologischen Arbeitsgruppen die Erkennung des CPD Schadens durch Enzyme studiert. In Zusammenarbeit mit der Gruppe *Essen* wurde dabei die Bindung des CPD Schadens an die CPD Photolyase untersucht. Die Kokristallstruktur des Enzyms mit einem den Schaden enthaltenden DNA Strang zeigte, dass dieses Enzym den Schaden aus der DNA Doppelhelix heraus in die aktive Tasche des Enzyms dreht („dinucleotide flipping“, Abbildung 1). Dort wird der Schaden durch seine Größe, Form und Wasserstoffbrücken zu den Pyrimidinringen erkannt. Die bekannte Endonuklease T4 Endo V dreht im Gegensatz dazu eine dem Schaden gegenüberliegende Base aus der DNA heraus und belässt den Schaden in der DNA. Zusammen mit der Gruppe *Cramer* wurden die strukturellen Ursachen für die Blockade der RNA Polymerase II durch den CPD Schaden untersucht (Abbildung 1). Dabei kamen sowohl kristallographische als auch biochemische Methoden zum Einsatz. Interessanterweise zeigen diese Untersuchungen, dass nicht der Schaden an sich die Blockade dieses Enzyms hervorruft. Stattdessen erfolgt gegenüber der 5'-Base des Schadens ein selektiver, Templat-abhängiger Fehleinbau eines Uridins. Durch diesen Fehleinbau wird die Polymerase an der Translokation des Schadens gehindert, da sonst eine Fehlpaarung des Schadens im DNA/RNA Hybrid erfolgen würde. Auch in diesem Fall konnte ein neuartiger Mechanismus der Schadenserkenkung nachgewiesen werden, der sich deutlich von dem Verhalten der vergleichbaren DNA Polymerasen unterscheidet.

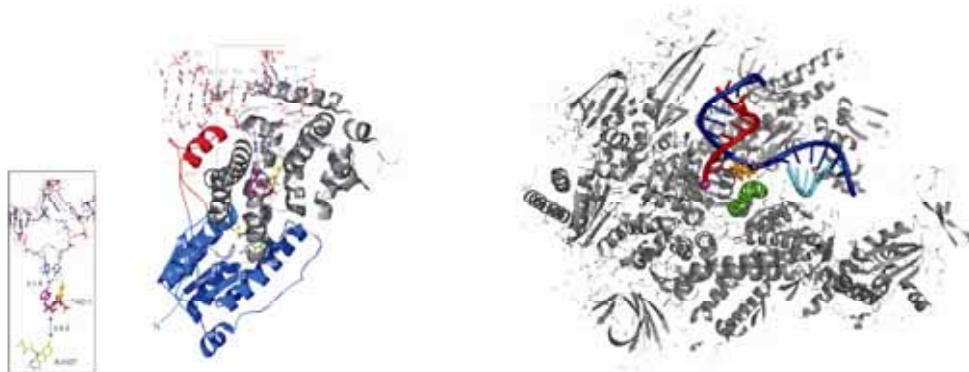
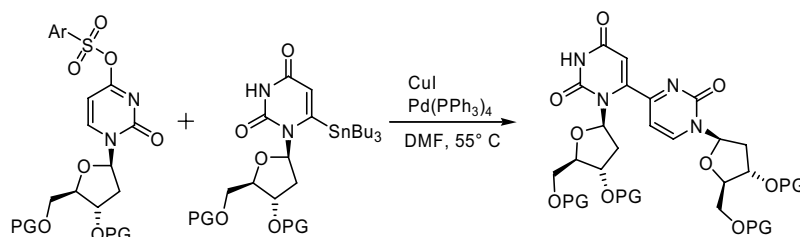


Abbildung 1: Die Kokristallstrukturen der DNA Photolyase (links) und der RNA Polymerase II aus Hefe (rechts) mit DNA Strängen, die einen CPD Photoschaden enthalten.

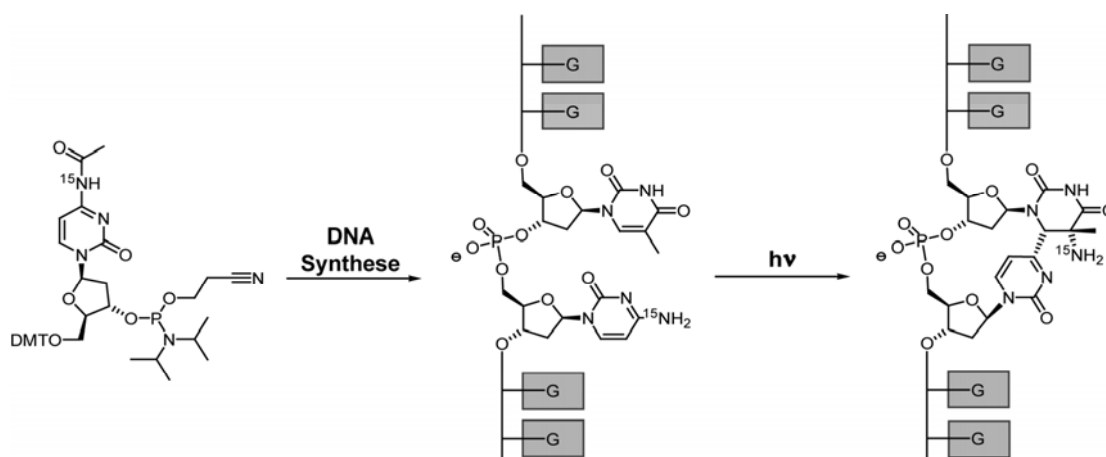
Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem (6-4)-Photoschaden, da bisher zu diesem Schaden nur relativ wenige Untersuchungen durchgeführt worden sind. Ein wichtiger Grund hierfür ist, dass bisher nur ineffiziente Methoden zur Herstellung des Schadens existierten. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Wege zur Totalsynthese des (6-4)-Schadens untersucht. Es zeigte sich, dass 4-Arylsulfonate des Uridins sehr gute

Ausgangsverbindungen für Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen mit Zinn- und Zinknucleophilen (Stille- und Negishikupplungen) sind und so die Synthese von 4-substituierten 2-Pyrimidinonnucleosiden ermöglichen (Schema 1).



Schema 1: Kreuzkupplung eines 4-Arylsulfonates des Uridins mit einem 6-Tributylstannyluridin.

Bei Verwendung von 6-Tributylstannyluridin kann so in wenigen Schritten das Kohlenstoffgerüst des (6-4)-Schadens erhalten werden. Alternativ wurde eine Methode zur Herstellung eines ¹⁵N-markierten (6-4)-Schadens in kurzen Oligonucleotiden entwickelt. Hierzu wurde ein selektiv am exocyclischen Stickstoff ¹⁵N-markierter DNA-Synthesebaustein des Cytosins hergestellt, in kurze Oligonucleotide eingebaut und mit UV-Licht in den (6-4)-Schaden überführt (Schema 2). Die Belichtungsreaktion konnte für kurze Oligonucleotide so gut optimiert werden, dass ausreichend Material für NMR-Untersuchungen gewonnen werden konnte. Mit den so erhaltenen Oligonucleotiden wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe *Kessler* erste NMR-Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der (6-4)-Photolyase durchgeführt.



Schema 2: Darstellung eines kurzen Oligonucleotides mit einem ¹⁵N-markierten (6-4)-Photoschaden.

Summary

UV irradiation of DNA strands leads to the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and (6-4) photo lesions. These lesions are highly cytotoxic, mutagenic and the main cause of most skin cancers. The interaction of these lesions with the most important, DNA depending cellular processes, such as replication, transcription and DNA repair, was, however, only studied at atomic resolution in a few cases. Therefore, this thesis contains mechanistic investigations into the reductive repair of DNA photo lesions and their analogues, a process that gives fundamental insight into excess electron transfer processes in DNA. A second part deals with the recognition of the most common lesion, the TT-CPD lesion, by enzymes such as the CPD photolyase and the RNA polymerase II. The third part contains studies towards the total synthesis of the (6-4) photo lesion and a new method for the generation of a ^{15}N -labelled derivative of this highly interesting lesion.

The first part of this thesis describes investigations on the sequence dependence of excess electron transfer in DNA. To study this process, model systems were synthesized consisting of an electron donor and a DNA photo lesion as the electron acceptor. Using a flavin nucleotide as donor and a CPD lesion as acceptor no sequence dependence could be observed. Afterwards, together with the *Giese* group, it could be shown that the cleavage of the dimer is too slow for the detection of any sequence dependence. This was retrieved by using a α -hydroxy ketone nucleoside as a single electron donor, thereby demonstrating that a single electron can cleave more than one CPD lesion. The observed selectivity in a strand with two lesions could only be explained if the cleavage is the rate-determining step of the reaction. To circumvent this problem a new electron donor, a thymidine benzophenone oxetane, which is an analogue of the (6-4) lesion, was synthesized. Oxetanes like this are cleaved much more rapidly by excess electrons than CPD lesions. Finally, using the oxetane as electron acceptor incorporated into flavin containing Haarnadeln, it could be shown that there is a slight sequence dependence in excess electron transfer in DNA. The transfer is more effective through AT-base pairs than through GC-base pairs.

In the second part of this work the recognition of the TT-CPD lesion was studied at atomic resolution together with structural biology groups. In cooperation with the *Essen* group the binding of the lesion to CPD photolyase was investigated. The crystal structure of a CPD containing DNA/protein complex showed that the lesion is flipped out of the double helix into the active site of the protein (“dinucleotide flipping”, Figure 1). In the active site, the lesion is

recognized through its size, shape and by specific hydrogen bonds. This process is clearly in contrast to the lesion recognition by the endonuclease T4 endo V. This enzyme flips out a base opposite the lesion instead of the lesion itself. In cooperation with the *Cramer* group the structural reasons for the blockage of RNA Polymerase II from bakers yeast by the CPD lesion were elucidated (Figure 1). Using structural as well as biochemical methods it could be shown that the lesion itself is not responsible for the blockage but the selective, template directed misincorporation of a uridine. This misincorporation prevents the further translocation of the polymerase because otherwise the DNA/RNA hybrid would be strongly destabilized by the resulting mismatched base pair. This novel recognition mechanism is highly interesting and of great importance for the understanding of transcription coupled repair.

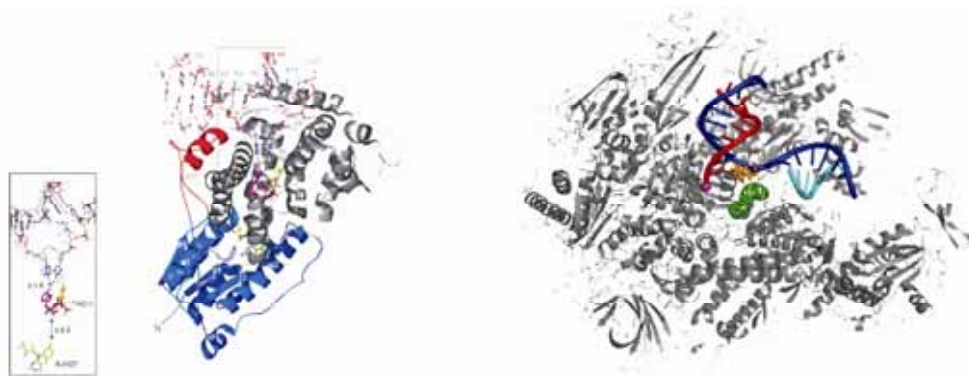
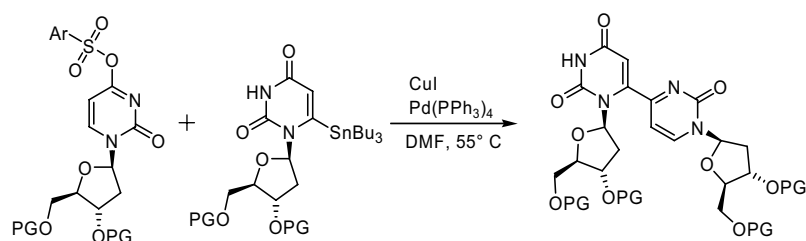


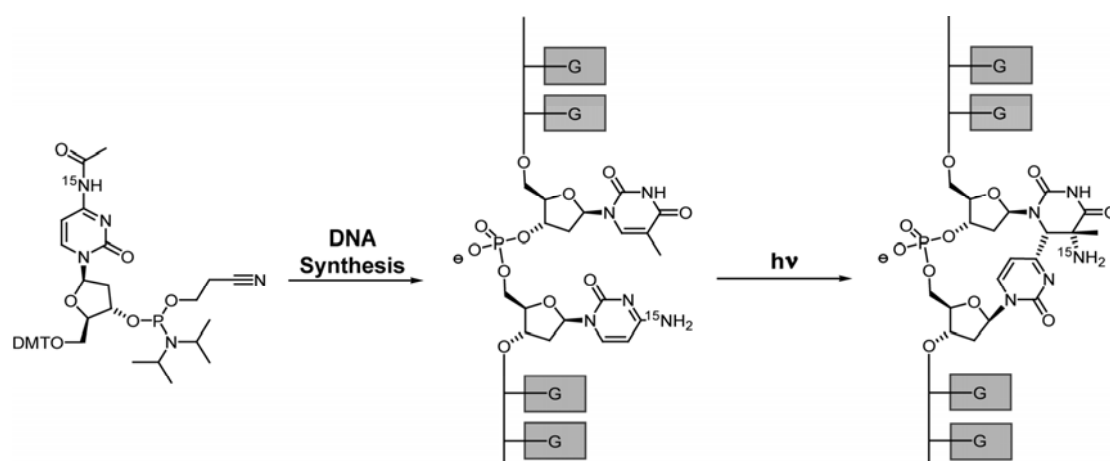
Figure 1: Crystal structures of DNA photolyase (left side) and RNA polymerase II from bakers yeast in complex with DNA strands containing the TT-CPD lesion.

The third part is dedicated to the (6-4) photo lesion. This lesion is much less studied than the CPDs at least partly because the methods for its preparation are comparably inefficient. Therefore efforts were undertaken to establish new ways for the total synthesis of this lesion. It could be demonstrated that 4-aryl sulfonates of uridine are very good starting materials for palladium catalysed cross-coupling reactions with tin and zinc nucleophiles. This method allows the synthesis of otherwise difficult to prepare 4-substituted 2-pyrimidinones (Scheme 1). If a 6-tributyl tin uridine is used as the nucleophile the carbon skeleton of the (6-4) lesion is accessible in just a few steps with high efficiency.



Scheme 1: Cross-coupling of a 4-aryl sulfonate of uridine with a 6-tributyl tin uridine.

Alternatively a novel method for the generation of a ¹⁵N-labelled (6-4) lesion in short oligo nucleotides was developed. In the first step a ¹⁵N-labelled cytosine building block for DNA synthesis was prepared. This building block was incorporated into a short oligo nucleotide followed by UV irradiation to give the lesion. The irradiation step could be optimized to yield large quantities of damaged DNA. The labelled (6-4) lesion was used in cooperation with the *Kessler* group to set up initial NMR experiments for the investigation of the mechanism of (6-4) photolyases.



Scheme 2: Preparation of short oligo nucleotides containing a ¹⁵N-labelled (6-4)-lesion.

1. Einleitung

1.1 DNA und DNA Schäden

Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird von fast allen bekannten Lebewesen zum Speichern der genetischen Information genutzt. Die Abfolge der Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) legt dabei den Aufbau aller Proteine und RNA Moleküle in der Zelle und damit, letztendlich, den Aufbau des gesamten Organismus fest. Dieses zentrale Dogma der Molekularbiologie und Genetik behält wohl bis auf weiteres seine Gültigkeit, auch wenn insbesondere in jüngster Zeit über einige Ausnahmen berichtet worden ist.^[1, 2] Alle Lebewesen müssen somit bestrebt sein, ihre DNA und damit die genetische Information vor Schäden zu schützen, um keine Informationen zu verlieren. Die DNA ist hierfür ein besonders gut geeignetes, relativ stabiles Molekül und hat viele Eigenschaften, die die gespeicherte Information vor dem Verlust schützen. So ist zum Beispiel die prinzipiell entropisch begünstigte Depolymerisation des Polymers DNA in Form der Hydrolyse der Phosphordiesterbindung in Wasser bei neutralem pH-Wert eine sehr langsame Reaktion, so lange sie nicht effizient katalysiert wird.^[3, 4] Außerdem ist die Information in der DNA durch die spezifische Paarung der einzelnen Basen mit ihrer komplementären Gegenbase und die so erfolgende Ausbildung der berühmten DNA-Doppelhelix zweifach vor Verlust gesichert.^[5]

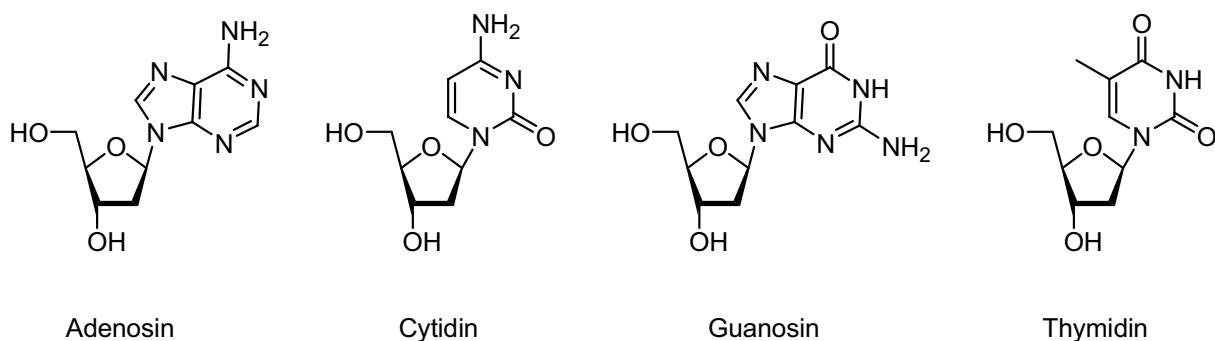


Abbildung 2: Die vier Nucleoside der DNA.

Trotzdem kann kein Lebewesen die Schädigung der DNA und damit die Möglichkeit eines Informationsverlustes verhindern. In der Zelle können ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, Radikale und toxische Chemikalien die DNA eines Lebewesens schädigen. Dazu kommen aber auch potenziell gefährliche Substanzen aus dem Stoffwechsel des Organismus selbst, wie zum Beispiel „reactive oxygen species“ (ROS). Dies alles führt dazu, daß in einer Zelle jeden

Tag eine hohe Zahl von DNA-Schäden entsteht. Schätzungen zu Folge können dies bis zu 10^6 Schäden pro Tag und Zelle sein.^[6] Alle Lebewesen waren daher gezwungen, Mechanismen zu entwickeln, um Schäden in der DNA zu erkennen und sie zu beseitigen. Jede Zelle enthält deshalb eine große Zahl von Enzymen, die mit der Erkennung und Reparatur der unterschiedlichsten DNA-Schäden befasst sind. Hinzu kommen weitere Proteine, die Reparaturenzyme unterstützen oder ihre Aktivität regulieren. Jedes Lebewesen ist daher gezwungen, einen gewissen Teil seines Genoms zur Kodierung von Proteinen für dessen Erhalt zu verwenden.

Abhängig davon, durch welche Art von Reagenz die DNA geschädigt wird, können sehr unterschiedliche DNA Schäden entstehen. Prinzipiell können einzelne Basen oder Nucleoside, mehrere Nucleoside gleichzeitig oder auch das Zucker-Phosphatrückgrat der DNA geschädigt werden, bis hin zu dessen Zerfall in zwei Teile (Strangbruch). DNA Schäden werden daher nach der Art der Schädigung in viele Klassen eingeteilt. Zu den wichtigsten Schäden gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche^[7], UV-Dimere^[8], oxidative Schäden^[9] und so genannte „Bulky adducts“^[10] (Abbildung 3). Insgesamt sind allein mehr als 50 verschiedene, oxidative Schäden beschrieben.^[11] Jeder dieser Defekte an der DNA hat spezifische Auswirkungen auf die Zelle und kann cytotoxisch oder mutagen sein.

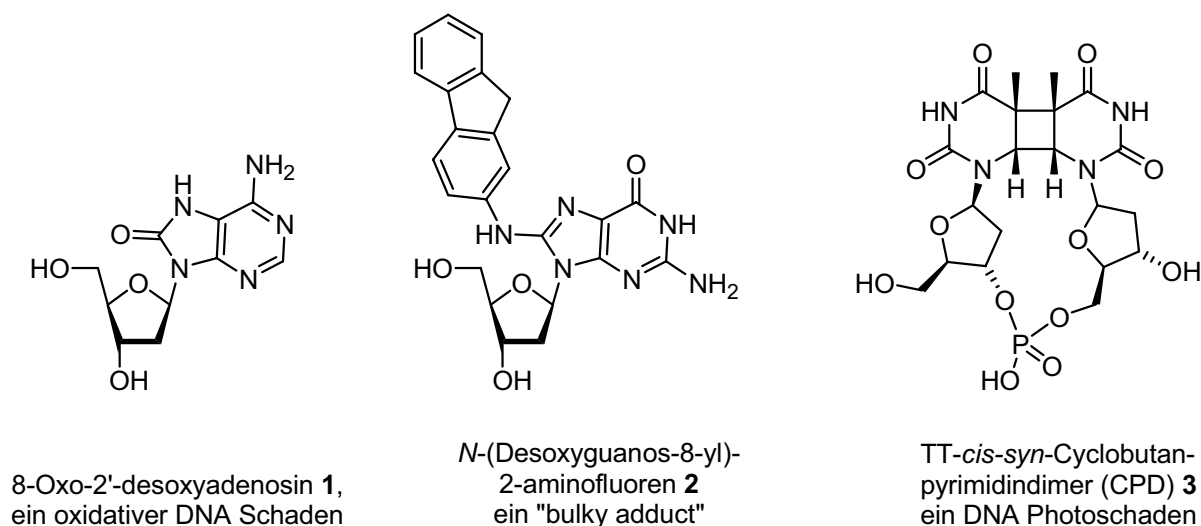
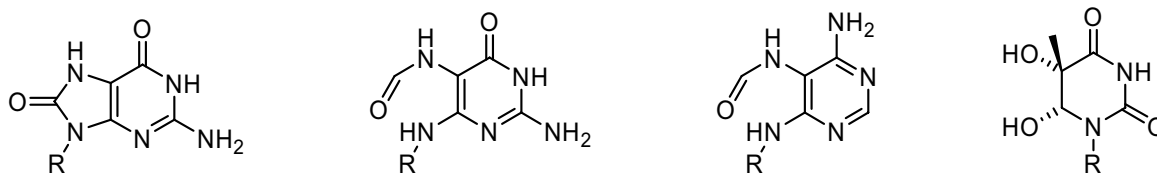


Abbildung 3: Einige häufige DNA Schäden.

1.2 Oxidative Schäden und oxidativer Ladungstransport in DNA

Oxidative DNA Schäden können durch eine Reihe von unterschiedlichen Oxidationsprozessen und Oxidationsmitteln hervorgerufen werden. Neben externen Oxidationsmittel

sind auch Hydroxylradikale und „reactive oxygen species“ aus dem zellinternen Sauerstoffstoffwechsel von großer Bedeutung.^[11] Im Rahmen dieser Arbeit, die sich mit DNA Photoschäden befasst, muss auch besonders auf Photooxidationsprozesse hingewiesen werden. Dabei erfolgt die Oxidation der DNA durch Photosensibilisatoren, die nach Lichtanregung entweder die DNA direkt durch Eielektronenoxidation (SET, Photoreaktion Typ 1) oder durch Bildung von reaktiven Singulett-Sauerstoff und dessen Reaktion mit einer DNA Base (Photoreaktion Typ 2) schädigen.^[12] Als zelluläre Chromophore kommen hierbei zum Beispiel Riboflavinderivate und Porphyrine in Frage, deren Eignung als Photosensibilisatoren gut untersucht ist. Generell kann die Oxidation der DNA über verschiedene Mechanismen wie Eielektronenoxidation, H-Abstraktion oder Addition eines Sauerstoffradikals erfolgen. Entsprechend sind eine große Anzahl von oxidativen DNA Schäden aller Basen bekannt. Am häufigsten kommen allerdings die Schäden des Guanins vor, da diese Base das niedrigste Redoxpotential besitzt.^[13, 14] Der häufigste Schaden des Guanins, das 8-Oxoguanosin **4**, ist daher auch einer der am besten untersuchten DNA Schäden überhaupt. Neben Studien zu seiner Entstehung durch Oxidation des Guanins, sind auch zahlreiche Studien zur Mutagenität, Reparatur und Interaktion mit DNA abhängigen Enzymen veröffentlicht.^[15, 16]



8-Oxo-2'-desoxyguanosin **4** Formamidopyrimidin-dG **5** Formamidopyrimidin-dA **6** Thymidinglykol **7**

Abbildung 4: Einige weitere, wichtige, oxidative DNA Schäden ($R = 2'$ -desoxyribofuranosyl).

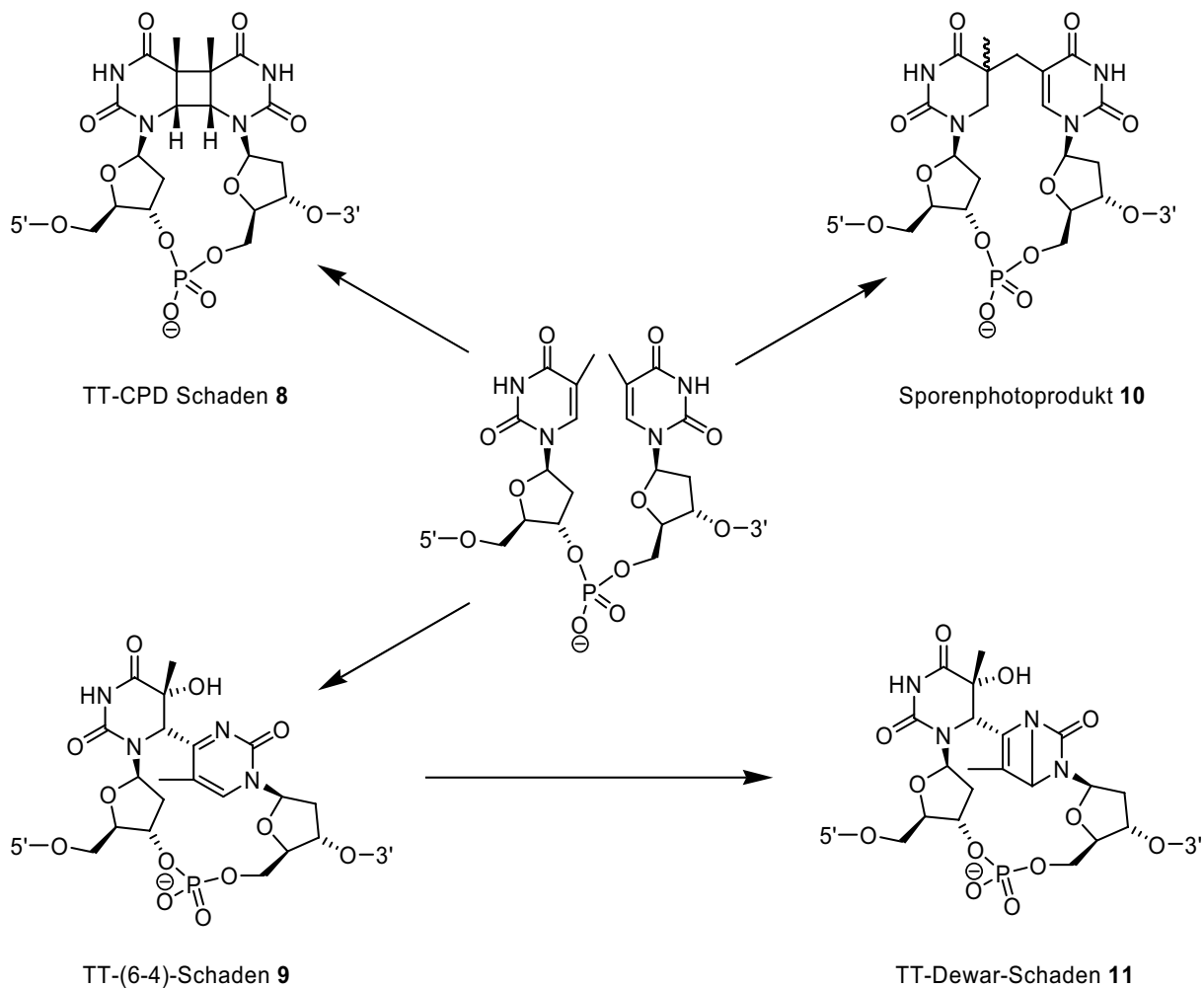
Bei Versuchen zur Oxidation von DNA wurde 1996 zum ersten Mal die Entstehung von oxidativen Schäden in größerer Entfernung von der Stelle des eigentlichen Oxidationsereignisses festgestellt.^[17] Diese Beobachtung konnte nur durch Elektronentransferprozesse in der DNA erklärt werden. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus dieses Elektronentransfers führten in den 90er Jahren zu großen Diskussionen über die Leitfähigkeit von DNA. Schon sehr früh hatte es Vermutungen gegeben, dass die Stapelung der DNA Basen und die dadurch erfolgende Interaktion ihrer π -Systeme zu einer außergewöhnlichen Leitfähigkeit bis hin zu Supraleitung entlang des Basenstapels führen könnte.^[18, 19] Einige Wissenschaftler sahen daher neue Experimente zum Elektronentransfer in DNA als Bestätigung für diese Theorie an. Auch erste direkte Leitfähigkeitsmessungen an

DNA ergaben relativ hohe Werte für die Leitfähigkeit von DNA Doppelsträngen.^[20, 21] Um die Jahrtausendwende konnte dann die Arbeitsgruppe Giese zeigen, dass es sich bei den oxidativen Elektronentransferprozessen in der DNA keineswegs um außergewöhnliche Phänomene handelt.^[22] Stattdessen lässt sich der oxidative Elektronentransfer entlang des Basenstapels am besten als Hüpfprozess über die Guanine beschreiben.^[23, 24] Mit ähnlichen Hüpfprozessen wird auch Elektronentransfer in Proteinen beschrieben. Diese Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe Schuster im Wesentlichen bestätigt.^[25, 26] Die Gruppe Schuster benutzt allerdings zur Beschreibung der Elektronentransferprozesse eine Theorie, die die Wechselwirkung der ladungstragenden Basen mit ihren Nachbarn mit einbezieht. Wertvolle Beiträge wurden auch von Lewis und Wasielewski geleistet, die Hüpfprozesse in DNA mit Kurzpulspektroskopie untersuchten.^[27, 28] Einen abweichenden Standpunkt zur Theorie des oxidativen Elektronentransportes in DNA vertritt weiterhin Barton, auch wenn sie sich seit den 90er Jahren den herkömmlichen Theorien angenähert hat.^[29] Außerdem zeigte sich in den letzten Jahren, dass die ersten Leitfähigkeitsmessungen an DNA, die auf eine hohe Leitfähigkeit entlang des Basenstapels hingewiesen hatten und damit zur aufgeregten Diskussion beitrugen, nicht bestätigt werden konnten.^[30] Vermutlich wurde in den ersten Messungen statt der Leitfähigkeit der DNA die Leitfähigkeit des die DNA umgebenden Puffersystems gemessen.

1.3 DNA Photoschäden

Eine weitere, sehr wichtige Klasse von DNA Schäden sind die DNA Photoschäden, die durch den UV-Anteil des Sonnenlichtes entstehen.^[8, 31] Die aus biologischer Sicht bei weitem wichtigsten, photochemischen Reaktionen sind die Dimerisierungen von zwei benachbarten Pyrimidinbasen über photochemische [2+2] Cycloadditionen, die durch UV-B-Strahlung und UV-C-Strahlung ausgelöst werden. Die dabei entstehenden Schäden, die Cyclobutanpyrimidindimere (CPD Schäden), die (6-4)-Photoschäden ((6-4)-Schäden) und ihre Folgeprodukte, die Dewarvalenzisomere (Dewar-Schäden), sind die häufigsten Photoschäden und für den Großteil der Wirkung von UV-Strahlung auf DNA-Ebene in der Zelle verantwortlich. Im UV-A Bereich entstehen die CPD Schäden nicht mehr direkt, sondern unter Beteiligung von Triplettensensibilisatoren. Der UV-A Anteil des Sonnenlichtes schädigt die DNA auch über die schon kurz beschriebenen Photooxidationsprozesse und führt damit zu den bekannten, oxidativen Schäden. Diese oxidativen Schädigungen tragen zur Gesamtwirkung der UV-

Strahlung auf die Zelle bei, sind aber gegenüber den Pyrimidindimeren von geringerer Bedeutung.^[32]

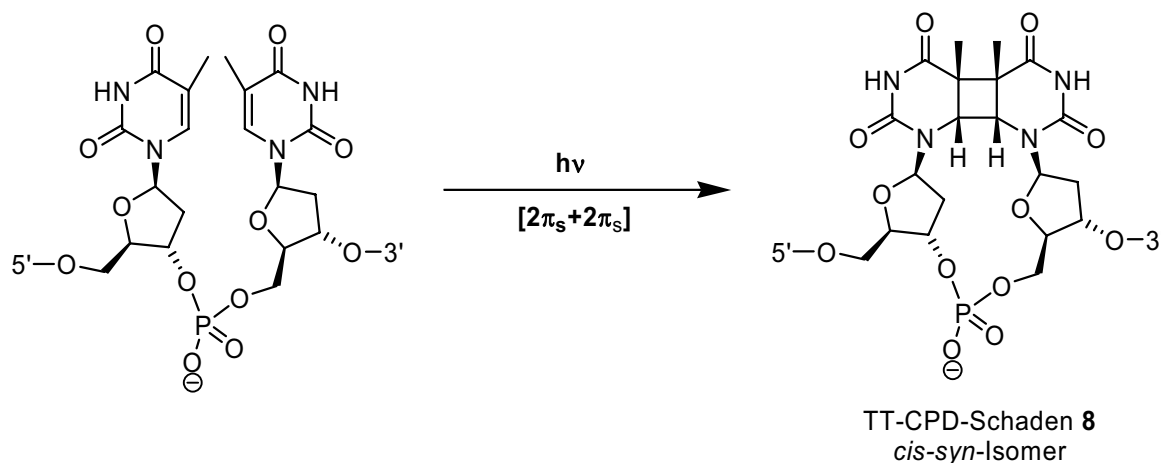


Schema 3: DNA Photochemie und die DNA Photoschäden.

Des Weiteren sind vielfältige, photochemische Reaktionen der DNA Basen im Bereich der UV-C-Strahlung bekannt. Hierzu zählen die Bildung von Hydraten (Cytosin und Thymin)^[31], [2+2]-Cycloaddition zwischen Adenin und Thymin^[33] oder zwei Adeninen^[34], die zu Dimeren führen, oder auch die direkt Photooxidation von Guanin. Die biologische Bedeutung dieser Reaktionen ist allerdings sehr gering, da die UV-C-Strahlung der Sonne fast vollständig von der Ozonschicht absorbiert und damit von der Erdoberfläche ferngehalten wird. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass diese Photoschäden früh in der Entwicklung des Lebens von größerer Bedeutung waren, als sich noch keine Ozonschicht ausgebildet hatte, oder daß diese Schäden wieder an Bedeutung gewinnen, falls die Größe des Ozonloches auf der Südhalbkugel doch noch weiter zunimmt. Zusätzlich zu den gerade beschriebenen Schäden ist noch ein weiterer Photoschaden bekannt, der allerdings nur in bakteriellen Sporen auftritt.^[35]

In diesen Sporen ist die DNA mit den so genannten „small acid soluble proteins“ (SASPs) speziell verpackt und weitgehend dehydratisiert.^[36] Außerdem enthalten Sporen große Menge Dipicolinsäure. Dadurch ändert sich die Photochemie der DNA vollständig und die bekannten Photoschäden treten nicht mehr auf. Stattdessen entsteht, mit deutlich verringerter Häufigkeit, aus zwei Thyminen das Sporenphotoprodukt.

1.3.1 Cyclobutanpyrimidindimere (CPD Schäden)



Schema 4: Bildung des TT-CPD-Photoschadens **8**.

Cyclobutanpyrimidindimere (CPD Schäden) entstehen aus zwei benachbarten Pyrimidinen durch eine photochemische [2+2]-Cycloaddition zwischen den jeweiligen C5-C6-Doppelbindungen (Schema 4).^[8] Durch die in der DNA-Doppelhelix vorgegebene Konformation der Basen (*anti* um die glycosidische Bindung) entsteht nur eines der möglichen Cyclobutanstereoisomere, das so genannte *cis-syn*-Isomer. CPD Schäden können in DNA aus allen denkbaren Kombinationen der beiden Pyrimidinnukleoside Thymin und Cytidin entstehen, allerdings ist die Bildungswahrscheinlichkeit nicht für alle Isomere gleich hoch. Bei Belichtung von DNA mit UV-B Strahlung oder simulierten Sonnenlicht nimmt die Bildungstendenz der CPD Schäden in DNA in der Reihenfolge 5'-T=T-3' > 5'-T=C-3' > 5'-C=T-3' > 5'-C=C-3' ab.^[37, 38] Das TT-Dimer entsteht dabei etwa dreimal häufiger als das TC-Dimer und wird mit einer Quantenausbeute von etwa 2-3 % gebildet (*in vitro* in HomodT-Oligomeren).^[39, 40] In zellulärer DNA (*in vivo*) sind die relativen Häufigkeiten der CPD Schäden ähnlich.^[41, 42]

Durch die kovalente Verknüpfung von zwei benachbarten Basen sind CPD Dimere sterisch anspruchsvolle DNA Schäden, die jedoch nur zu einer kleinen Verzerrung der DNA Doppelhelix führen. Die Basenpaarungen der beteiligten Pyrimidinbasen werden geschwächt,

bleiben aber erhalten. Die Kristallstruktur eines ein CPD Dimer enthaltendes Oligonukleotides zeigt zu dem einem Knick von etwa 30° in der DNA Doppelhelix (Abbildung 5).^[43]

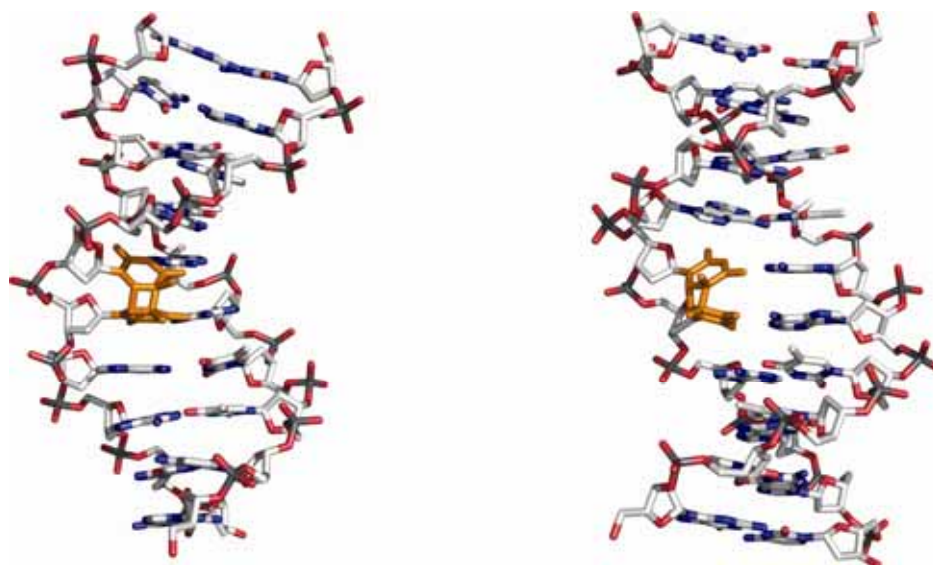


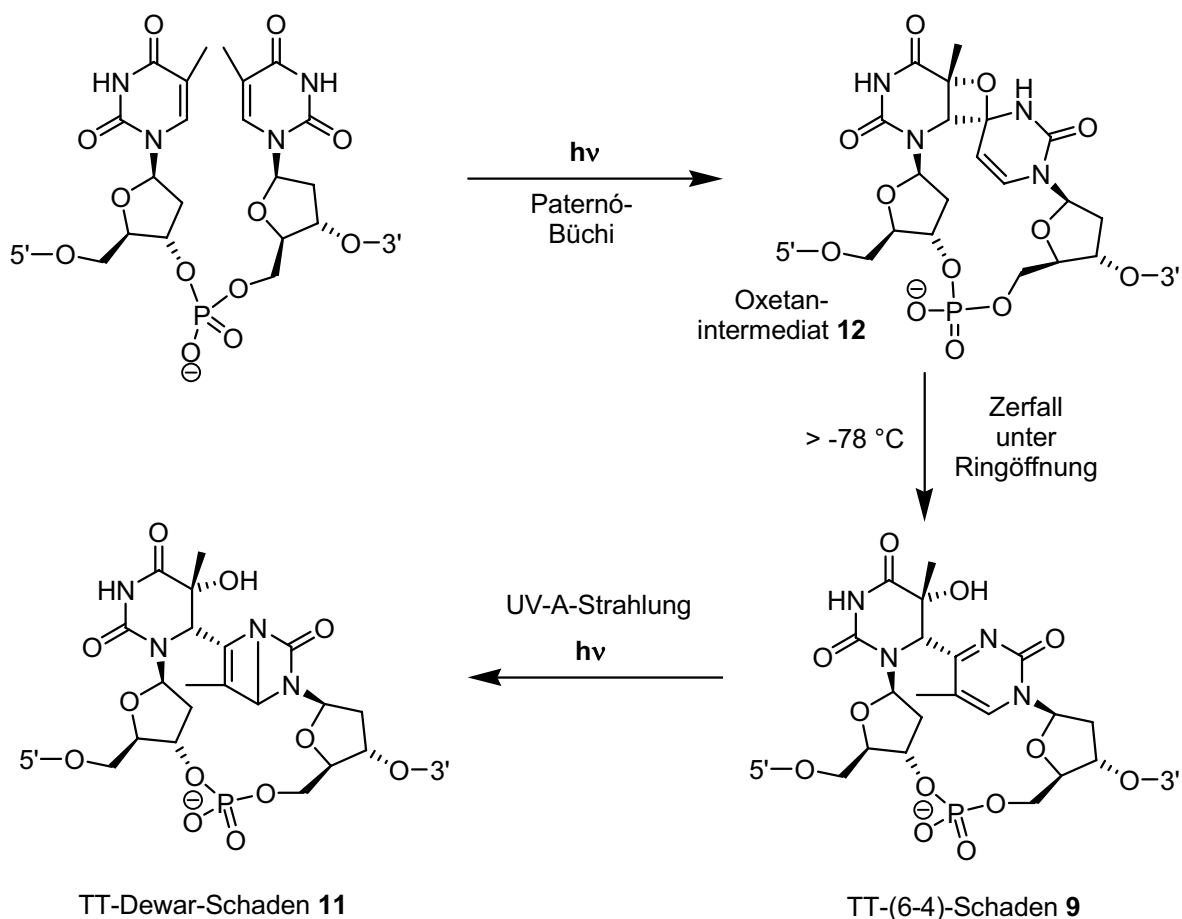
Abbildung 5: Die Kristallstruktur eines DNA Decamers mit einem TT-CPD Schaden. Die Struktur ist aus zwei unterschiedlichen Perspektiven dargestellt mit dem CPD Schaden in der Mitte (orange).

Im Vergleich zu anderen, sterisch anspruchsvollen DNA Schäden wie den „bulky adducts“ oder den im nächsten Abschnitt behandelten (6-4)-Photoschäden sind die Auswirkungen eines CPD Dimers auf die DNA Struktur allerdings nicht so groß. UV-Denaturierungsexperimente mit CPD-enthaltender DNA zeigen, dass ein CPD Schaden die DNA Doppelhelix nur um etwa 6 kJ/mol destabilisiert.^[44]

1.3.2 (6-4)-Photoschäden und ihre Dewarvalenzisomere

(6-4)-Photoschäden entstehen wie die CPD Dimere ebenfalls durch eine photochemische [2+2]-Cycloaddition.^[8, 31] In diesem Fall allerdings reagiert die C5-C6-Doppelbindung des 5'-Nucleosids mit der C4-Carbonylgruppe des 3'-Nucleosides in einer Paternó-Büchi Reaktion zu einem Oxetan. Dieses Oxetan ist in der Zelle nicht stabil und reagiert unter Ringöffnung zum (6-4)-Schaden (Schema 5). Handelt es sich im Fall des 3'-Nucleosids um ein Cytidin, so erfolgt die Reaktion formal aus dem Imin-Tautomer des Cytosin und das entstehende Intermediat ist ein Azetidin, das ebenso wie das Oxetan nicht stabil ist und unter Ringöffnung den (6-4)-Photoschaden bildet. Insgesamt entstehen (6-4)-Photoschäden in der Zelle deutlich seltener als CPD Dimere, das Verhältnis ist ungefähr 1:3 (bei UV-B Belichtung).^[37, 38] An spezifischen Dipyrimidinstellen in der DNA ist dieses Verhältnis aber nicht überall gleich, da die Entstehung von (6-4)-Schäden eine andere Sequenzabhängigkeit

aufweist als im Fall der CPD Schäden. Während zum Beispiel das TT-CPD Dimer zehnmal häufiger entsteht als der entsprechende (6-4)-Schaden, ist das Verhältnis der beiden Schäden zueinander an 5'-Thymidin-3'-Cytidin-Stellen in der DNA etwa gleich. (6-4)-Schäden mit einem 5'-Cytidin entstehen generell nur sehr selten.



Schema 5: Bildung des TT-(6-4)-Schadens 9 und des TT-Dewar-Schadens 11.

Im Gegensatz zum CPD Schaden konnte bisher keine Kristallstruktur eines DNA Stranges mit einem (6-4)-Schaden erhalten werden. Die aus UV-Denaturierungsexperimenten erhaltene Destabilisierung eines DNA Doppelstranges durch den (6-4)-Schaden von 24 kJ/mol und Strukturuntersuchungen in Lösung mit NMR weisen allerdings auf eine viel stärkere Störung der DNA-Doppelhelix als im Fall des CPD Schadens hin.^[45-48] Der aus dem 3'-Pyrimidin entstehende Pyrimidinonring scheint nicht mehr an einer Basenpaarung beteiligt zu sein und statt Adenin wird hier Guanin als Gegenbase energetisch leicht bevorzugt.^[48] Aus den NMR-Untersuchungen wurde eine Verbiegung des Doppelstranges von 44° an der Stelle des Schadens abgeschätzt.^[45] Andere experimentelle und theoretische Untersuchungen konnten diesen Wert allerdings nicht bestätigen.^[48, 49]

Unter Einwirkung von weiterer UV-A Strahlung können die (6-4)-Schäden in ihre Dewar-Valenzisomere umgewandelt werden.^[8, 31] Während sich gezeigt hat, dass dieser Prozess im UV-B Spektralbereich sehr ineffektiv ist und kaum Dewar-Schäden in Zellen nach UV-B Belichtung gefunden werden, erfolgt die Umwandlung mit UV-A Strahlung deutlich effizienter. In Hamsterzellen, die simuliertem Sonnenlicht (UV-B:UV-A 5:95) ausgesetzt worden waren, konnten signifikant mehr Dewar-Schäden als (6-4)-Schäden beobachtet werden.^[41] Die Auswirkungen des Dewar-Schadens auf die DNA Doppelhelix sind in etwa mit denen des (6-4)-Schadens vergleichbar. Ein Dewar-Schaden bewirkt ebenso wie der (6-4)-Schaden eine Destabilisierung eines Doppelstranges um etwa 24 kJ/mol.^[46, 47] Dabei ist eine Basenpaarung mit Guanin gegenüber dem 3'-Pyrimidinonring energetisch etwas günstiger als das kanonische Adenin. NMR-Untersuchungen lassen allerdings auf eine andersartige Verzerrung der DNA Doppelhelix schließen.^[50] Während im Fall des (6-4)-Schadens die strukturellen Veränderungen insbesondere die 3'-Seite betreffen, scheint im Fall des Dewar-Schadens die 5'-Seite ebenfalls stark gestört zu sein, ohne dass sich aus den derzeit vorliegenden Daten weitergehende Aussagen treffen lassen.

1.3.3 DNA Photophysik und Photochemie

Die ersten spektroskopischen Studien an DNA Basen, Nucleosiden und DNA wurden schon in den fünfziger Jahren durchgeführt.^[31] Diese Studien waren aber physiologisch nicht relevant, da sie bei tiefen Temperaturen erfolgten. Erst 1971 wurden die ersten Fluoreszenzmessungen an Nucleobasen in wässriger Lösung und bei Raumtemperatur publiziert, die sehr kleine Quantenausbeuten ($\Phi_f \approx 10^{-4}$) für die Fluoreszenz ergaben. Aus diesen und folgenden Experimenten wurde auf eine sehr effektive und schnelle Desaktivierung der Anregungsenergie über strahlungslose, interne Prozesse in monomeren Nucleobasen und Nucleosiden geschlossen.^[31] Neueste zeitaufgelöste Messungen ergaben Lebensdauer der S_1 -Zustände von Nucleobasen und Nucleosiden im subpicosekunden Bereich.^[51] Die Quantenausbeute für die Bildung des Triplettzustandes ist für alle Basen und Nucleoside relativ klein (Φ_{ISC} ca. $8 \cdot 10^{-3}$ für TMP, für andere Nucleoside kleiner), die Lebensdauern der Triplettzustände liegen im microsekunden Bereich.^[51]

Geht man von den DNA Monomeren, den Nucleotiden, zu dimeren oder gar oligomeren Nucleotiden über, so wird die Photophysik sehr viel komplizierter und ist bis heute nicht vollständig verstanden. Durch die in einem Doppelstrang erfolgende Stapelung der Basen übereinander, muss für jede Base die Wechselwirkung der Base mit den Nachbarbasen berücksichtigt werden. Schon kurz nach den ersten Fluoreszenzmessungen an monomeren Nucleotiden wurden auch Dimere vermessen.^[31] Neben der schon bekannten Fluoreszenz der

Monomere, konnte auch eine längerwellige Emission um 400 nm gemessen werden, die der Bildung von excimerartigen Komplexen zugeschrieben wurde. Diese Emission wurde auch an synthetischen Oligomeren (poly dC, poly d(A-T)) gefunden und weist eine deutlich längere Fluoreszenzlebensdauer auf. Sorgfältig gereinigte DNA aus biologischen Quellen scheint diese excimerartige Emission bei 400 nm allerdings nicht zu zeigen. In den letzten Jahren wurden vermehrt neueste Femtosekundenspektroskopietechniken auf DNA Oligomere angewandt, um die Dynamik der angeregten Zustände besser zu charakterisieren.^[52, 53] Nach diesen Untersuchungen ist davon auszugehen, dass die elektronische Anregungsenergie über mehrere Basen delokalisiert werden kann und sich in Abhängigkeit von der Basensequenz langlebige (im ps-ns Bereich) excimerartige Zustände bilden. Die Bildung dieser langlebigen Zustände scheint für die Deaktivierung des Anregungsenergie wichtiger zu sein, als Protonentransfer zur gegenüberliegenden Base, wie in Modellsystemen beobachtet wurde.^[54] Allerdings müssen diese Ergebnisse noch als vorläufig angesehen werden, da bisher überwiegend Homopolymere untersucht worden sind und auch über diese Ergebnisse nicht in allen Fällen Einigkeit herrscht.^[55, 56]

Wie letztendlich die Absorption eines Photons in der DNA zu den bekannten Pyrimidindimeren führt ist nicht klar. Die Entstehung der CPD Dimere konnte bis jetzt nicht mit schnellen, spektroskopischen Techniken beobachtet werden. Die effektive Bildung von TT-CPDs mit Ketonen wie Acetophenon als Triplettensensibilisator hat zu der Theorie geführt, dass diese Schäden aus dem Triplettzustand heraus entstehen. Für die in Zellen unter UV-A Strahlung gebildeten Schäden gibt es experimentelle Hinweise auf diesen Mechanismus.^[41, 42] Allerdings trifft dies wohl nicht auf den Großteil der in DNA gebildeten CPD Schäden zu, die nach Absorption eines Photons aus dem UV-B Bereich entstehen. Insbesondere scheint die Quantenausbeute für das ISC zum Triplettzustand in DNA deutlich kleiner als die Quantenausbeute der Bildung von CPD Schäden zu sein.^[40] Ob eventuell die langlebigen excimerartigen Singulettzustände an der Bildung der Schäden beteiligt sind, ist unklar. Die Entstehung des (6-4)-Schadens konnte von der Gruppe *Markovitsi* zeitaufgelöst an Hand der charakteristischen Absorption bei 325 nm verfolgt werden und war nach 4 ms abgeschlossen.^[40] Da aber der (6-4)-Schaden nicht direkt, sondern über eine nicht beobachtete Zwischenstufe entsteht, konnten auch hier keine Aussagen zum Entstehungsmechanismus gemacht werden.

1.4 Die Auswirkungen von DNA Photoschäden in der Zelle

Die DNA ist der zentrale Informationsspeicher der Zelle. Um die Information in der DNA nutzen zu können, muss die Zelle diese ablesen. Dies geschieht im Rahmen der Transkription, wobei die DNA einer RNA Polymerase als Templat für die Herstellung eines neuen RNA Stranges dient. Der neusynthetisierte RNA Strang erfüllt entweder schon selbst eine Funktion in der Zelle (tRNA, rRNA) oder wird von den Ribosomen als Vorlage für die Synthese von Proteinen verwendet (mRNA, „Translation“). Für jede dieser Aufgaben gibt es in der eukaryotischen Zelle eine eigene RNA Polymerase, RNA Polymerase I synthetisiert die rRNA, RNA Polymerase II die mRNA und RNA Polymerase III alle anderen, benötigten RNA Oligomere wie die tRNA. Der zweite wichtige, von der DNA abhängige Prozess ist die Replikation, das Kopieren der DNA. Dies ist für die Zelle notwendig, um bei der Zellteilung an jede Tochterzelle die komplette genetische Information in Form der genomischen DNA weitergeben zu können. Das Kopieren der DNA wird von den replikativen oder auch „high fidelity“ DNA Polymerasen der Familien A und B durchgeführt, die einen DNA Strang als Templat für die Synthese eines neuen DNA Stranges verwenden.

Sowohl die Replikation als auch die Transkription müssen mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden, da Fehler in der Sequenz der neu hergestellten Polynukleinsäuren zur Veränderung der Erbinformation, also zu einer Mutation, oder zu nicht funktionellen Nukleinsäuren und Proteinen führen können. Daher sind die replikativen DNA Polymerasen und die RNA Polymerasen auf eine sehr hohe Genauigkeit hin optimiert.^[57, 58] Diese hohe Genauigkeit wird bei DNA Polymerasen unter anderem dadurch erzielt, dass in die aktive Tasche der Enzyme genau ein Watson-Crick Basenpaar passt.^[59] Auf diese Art „überprüft“ das Enzym die Form des neu gebildeten Basenpaars und kann Fehlpaarungen und Schäden erkennen. Außerdem verfügen diese Polymerasen über eine Exonuklease-Untereinheit, die eine zusätzlich Fehlererkennung und –korrektur ermöglicht. Da in DNA Photoschäden zwei aufeinander folgende Pyrimidine kovalent verknüpft sind, sind diese Schäden sterisch anspruchsvoll und passen nicht oder nur sehr schlecht in die aktive Tasche. DNA Photoschäden blockieren daher im Regelfall replikative DNA Polymerasen und auch RNA Polymerasen.^[60-63] Das gilt sowohl für CPD als auch für (6-4)-Schäden. Da sie damit zwei der wichtigsten, zellulären Prozesse stoppen, sind DNA Photoschäden in hohem Maße cytotoxisch. Die Entfernung von Photoschäden aus dem Genom und ihre Reparatur oder zumindest ihre Umgehung ist daher für alle dem Sonnenlicht ausgesetzten Lebewesen lebensnotwendig.

Im folgenden Teil soll die Interaktion von DNA Photoschäden mit Polymerasen und Reparaturproteinen etwas genauer betrachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass die meisten Untersuchungen zu diesem Themen exemplarisch mit dem Thymidin-Thymidin-CPD Dimer durchgeführt worden sind, da dieser Schaden einerseits der häufigste Photoschaden ist und andererseits verhältnismäßig einfach hergestellt werden kann. Die (6-4)-Schäden und ihre Dewar-Isomere sind bisher dagegen viel zu selten untersucht worden, da ihre Herstellung sehr aufwendig ist. Die Daten zu diesen Schäden, insbesondere in struktureller Hinsicht, sind leider noch sehr lückenhaft.

1.4.1 DNA Photoschäden und DNA Polymerasen

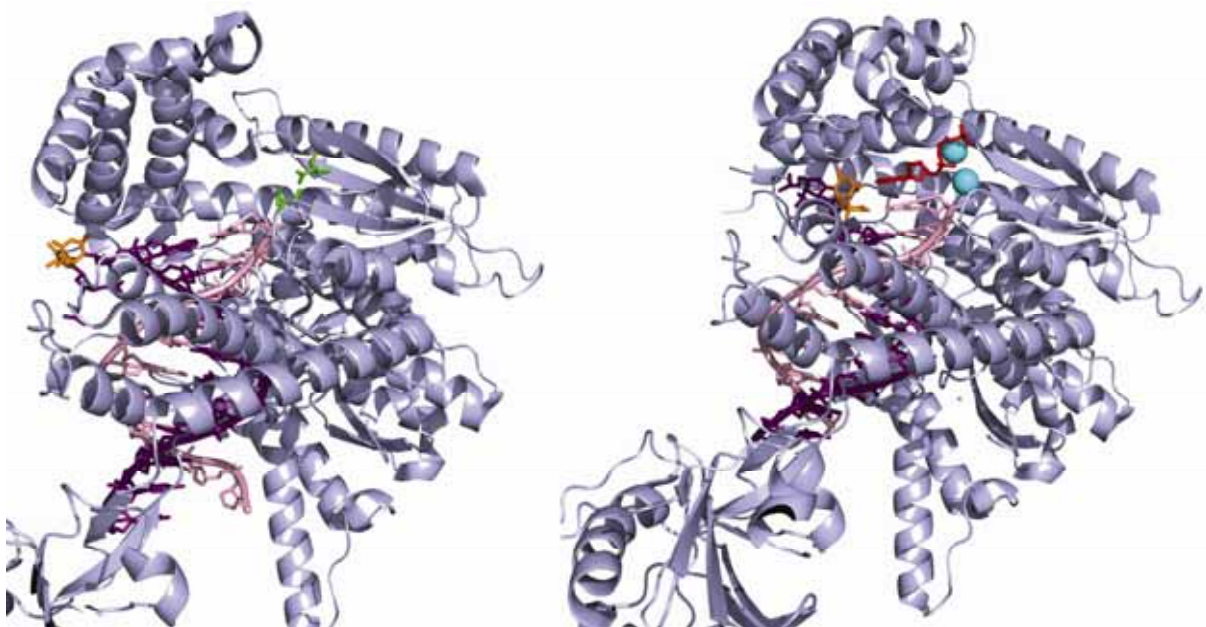


Abbildung 6: Kristallstrukturen der T7 DNA Polymerase mit einem gebundenen CPD Schaden. Links außerhalb der aktiven Tasche (markiert durch die Aminosäuren Asp 475 und Asp 654 in grün), rechts in der aktiven Tasche (Protein: hellblau, T-DNA: violett, NT-DNA: rosa, CPD Schaden: orange, Magnesiumionen: cyan, ddATP: rot).

Sowohl CPD als auch (6-4)-Photoschäden sind für replikative DNA-Polymerasen im Regelfall ein Stopp. Dies gilt sowohl für prokaryontische Enzyme wie die *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA Polymerase (A Familie) als auch für die entsprechenden eukaryotischen Enzyme wie die Polymerasen δ und ϵ aus der B Familie.^[60, 61] Da alle diese Polymerasen strukturell und mechanistisch verwandt sind, kann die von der Gruppe *Ellenberger* gelöste Struktur der T7 DNA Polymerase mit einem TT-CPD Schaden als Modell für diese Klasse von Enzymen dienen (Abbildung 6).^[64] Die Gruppe *Ellenberger* konnte zeigen, dass im Fall der

Nukleotidinkorporation gegenüber dem 3'-Thymidin der CPD Schaden in der aktiven Tasche keinen Platz findet und um 90° herausgedreht wird (Abbildung 6, links). Die Polymerase verhält sich daher gegenüber dem 3'-Thymidin des Schadens ähnlich wie gegenüber einer abasischen Stelle und baut mit mehr als dreitausendfach reduzierter Effizienz im Vergleich zu einem ungeschädigtem Strang ein Adenosinnukleotid ein (A-rule).^[65] Daher blockiert der Schaden praktisch die DNA Synthese und verhindert eine weitere Verlängerung. Sollte doch einmal eine Verlängerung stattfinden, so zeigt eine weitere Struktur der Gruppe *Ellenberger*, dass in diesem Fall sogar Platz für den CPD Schaden in der aktiven Tasche ist (Abbildung 6, rechts). Trotzdem ist auch bei der Nukleotidinkorporation gegenüber dem 5'-Thymidin des Dimers die Umgebung des Schadens stark verzerrt und das Basenpaar mit dem einzubauenden Adenosintriphosphat ist stark verdreht, da beide Basen nicht in einer Ebene liegen (Propellertwist). Die Verlängerung gegenüber dem 5'-Thymidin des Dimers erfolgt also templatabhängig, ist aber ebenfalls nur sehr ineffektiv.

Neben den replikativen DNA Polymerasen wurde im letzten Jahrzehnt eine neue Klasse von Polymerasen entdeckt, die so genannten „low-fidelity“ Polymerasen. Diese Polymerasen kommen in der Zelle zum Einsatz, wenn die replikativen Polymerasen an einem DNA Schaden feststecken und die Zelle nicht auf die Reparatur des Schadens warten kann.^[66] Mit ihrer Hilfe kann die Zelle, wenn es nicht anders geht, auch geschädigte DNA kopieren und somit das Überleben sichern („trans lesion synthesis“, TLS). Um Schäden überlesen zu können, besitzen die „low-fidelity“ Polymerasen im Regelfall eine deutlich flexiblere, größere aktive Tasche, machen unter anderem dadurch aber auch deutlich mehr Fehler. Die Klasse der „low fidelity“ Polymerasen besteht im wesentlichen aus den Polymerasen der Y-Familie wie DinB, Pol η, Pol κ und Pol ι. Dazu kommt noch Pol ζ, eine Polymerase der B-Familie.^[66] Im Gegensatz zu den replikativen Polymerasen sind die „low-fidelity“ Polymerasen auf bestimmte Schäden spezialisiert und haben sehr unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um ihre Aufgabe zu erfüllen.

Der Gruppe um Wei Yang gelang es, die Kristallstruktur von Dpo4 aus *Sulfolobus solfataricus* P2 in Komplex mit einem, ein CPD Dimer enthaltenden Templatstrang zu lösen.^[67] Dpo4 besitzt im Gegensatz zu den replikativen Polymerasen eine „offenere“, aktive Tasche und hat somit Platz für den sterisch anspruchsvollen CPD Schaden (Abbildung 7). Während die Verlängerung des Primers gegenüber dem 3'-Thymidin des Schadens, wie zu erwarten war, durch Paarung des einzubauenden Triphosphates über ein Watson-Crick Basenpaar erfolgt, erfordert der Einbau gegenüber dem 5'-Thymidin ein Hoogsteen-Basenpaar mit dem einzubauenden Adenosintriphosphat in der *syn*-Konformation.

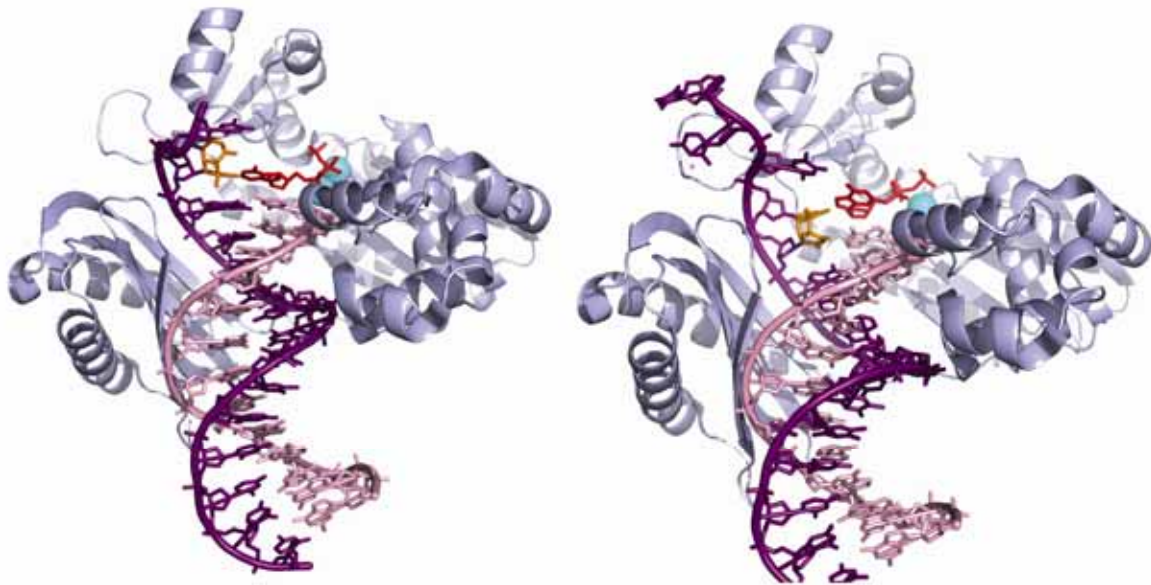


Abbildung 7: Kristallstrukturen von Dpo4 aus *S. solfataricus* mit einem gebundenen CPD Schaden. Links mit der 3'-Base des CPDs in der aktiven Tasche, rechts mit der 5'-Base (Protein: hellblau, T-DNA: violett, NT-DNA: rosa, CPD Schaden: orange, Magnesiumionen: cyan, ddATP: rot).

Während somit der Mechanismus für die TLS über den CPD Schaden in *Sulfolobus solfataricus* P2, einem Archaeon, verstanden ist, so muss doch die postulierte, generelle Anwendung dieses Mechanismus bezweifelt werden. Dpo4 gehört zur Klasse der DinB Homologen, wie auch *E. coli* Pol IV und humane Pol κ .^[66] Sowohl Pol IV als auch Pol κ können aber nur sehr ineffizient über CPD Schäden lesen und *in vivo* Studien lassen auf keine oder nur eine sehr seltene Beteiligung dieser Polymerasen an der TLS über Photoschäden schließen. In *E. coli* werden Photoschäden stattdessen, wie die meisten anderen DNA Schäden auch, von Pol V (umuDC) überlesen, die dabei nicht ganz fehlerfrei arbeitet.^[68] In Eukaryoten wie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und dem Menschen ist Pol η für das Überlesen von CPD Schäden verantwortlich.^[66, 69] Während hier strukturelle Daten fehlen, zeigen biochemische Arbeiten von Prakash et al., dass Pol η gegenüber beiden Thyminiden des CPD Schadens fehlerfrei Adenosine über Watson-Crick Basenpaarungen einbaut und sich somit mechanistisch von Dpo4 unterscheidet.^[70] Eine neue Arbeit von Taylor et. al. zeigt, dass auch (Methyl-) Cytosin enthaltende CPD Schäden korrekt erkannt und fehlerfrei repliziert werden.^[71] Unklar ist, welche Polymerase die TLS in Eukaryonten gegenüber dem (6-4)-Schaden durchführt. Während viele Daten auch hier auf Pol η hindeuten, so ist auch Pol ι ein möglicher Kandidat. In jedem Fall ist aber auch Pol ζ beteiligt.^[66] Im Gegensatz zu den anderen „low-fidelity“ Polymerasen gehört Pol ζ zur B Familie der Polymerasen. Pol ζ ist im Regelfall wohl nicht für den Einbau einer Base gegenüber eines Schadens verantwortlich,

sondern verlängert auf Grund eines Schadens schlecht paarende Primer. Für (6-4)-Schäden vermutet man daher, dass im ersten Schritt Pol η die Basen gegenüber den geschädigten Basen einbaut, bevor dann im zweiten Schritt Pol ζ den nun schlecht gepaarten Primer weiter verlängert. Im allgemein gilt aber, dass die genaue Rolle der unterschiedlichen „low-fidelity“ Polymerasen *in vivo* noch der genaueren Untersuchung bedarf.

1.4.2 DNA Photoschäden und RNA Polymerasen

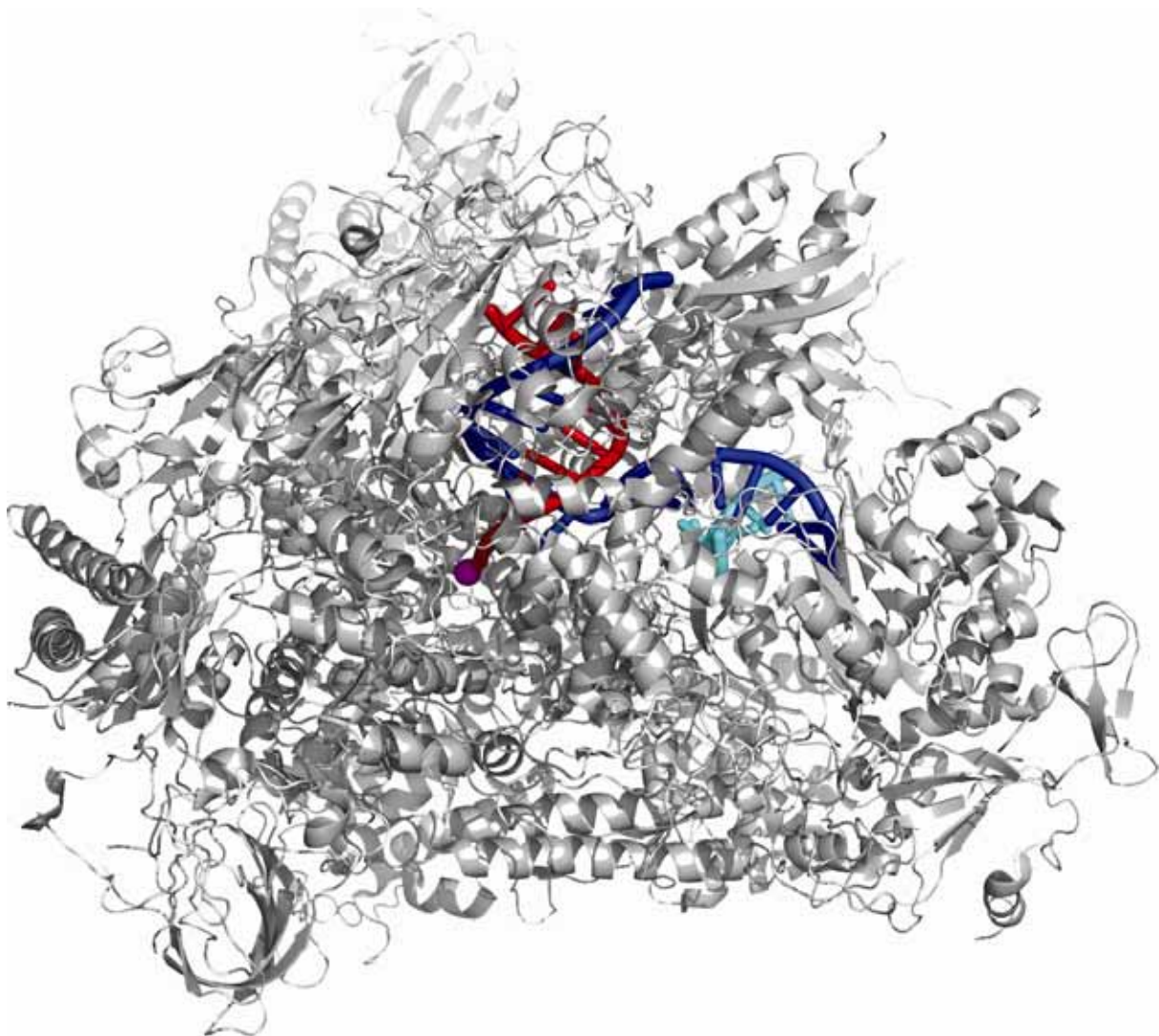


Abbildung 8: Der RNA Polymerase II Elongationskomplex (*S. cerevisiae* Pol II: grau, T-DNA: blau, NT-DNA: cyan, RNA: rot, Mg: magenta).

Im Gegensatz zu den DNA Polymerasen ist die Interaktion von RNA Polymerasen mit DNA Photoschäden relativ schlecht untersucht. Ein Grund hierfür ist der deutlich komplexere Aufbau dieser Polymerasen, die teilweise aus mehr als zehn verschiedenen Untereinheiten (= Polypeptiden) bestehen. Generell werden aber alle bisher untersuchten RNA Polymerasen

sowohl durch CPD als auch (6-4)-Photoschäden im Templatstrang gestoppt (ein Schaden im Gegenstrang hat keinen Einfluss^[72]).^[62, 73] Selbst mit hohen Triphosphatkonzentrationen und langen Reaktionszeiten konnte kein Überlesen von Photoschäden beobachtet werden. Eine Ausnahme scheint nur die häufig studierte RNA Polymerase aus dem T7 Phagen darzustellen.^[61] Diese nur aus einer Untereinheit bestehende und daher auch einfach zugängliche Polymerase kann, wenn auch langsam, beide Arten von Photoschäden überlesen. Andere RNA Polymerasen, wie die humane RNA Pol II oder die RNA Polymerase aus *E. coli* bleiben stecken und bilden einen stabilen Komplex mit dem Schaden.^[63, 74] Die humane Pol II baut dabei gegenüber dem jeweiligen Photoschaden noch Nukleotide ein, bevor die mRNA Synthese beendet wird.^[73]

Da die meisten RNA Polymerasen, insbesondere die eukaryotischen, aus vielen Untereinheiten aufgebaut sind, ist ihre strukturelle Charakterisierung deutlich schwieriger als die der DNA Polymerasen. Die erste, hochaufgelöste Kristallstruktur der RNA Pol II aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde von der Gruppe *Kornberg* 2001 gelöst, der für diese Leistung 2006 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.^[75-78] Strukturelle Untersuchungen zu ihrer Interaktion mit DNA Photoschäden stehen aber, abgesehen von biochemischen „footprinting“ Studien, noch aus.^[74, 79]

1.5 Die Reparatur von DNA Photoschäden

Die DNA Reparatur ist für alle Lebewesen von zentraler Bedeutung, um sich vor den cytotoxischen und mutagenen Auswirkungen von DNA Schäden zu schützen. Im Laufe der Evolution sind daher mehrere, unterschiedliche Pfade zur DNA Reparatur entstanden. Die für Schäden an den Nukleotiden wichtigsten Reparatursysteme sind die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und direkte Reparaturproteine, die spezifische Schäden direkt zu den Ausgangsnukleotiden zurückverwandeln.^[80, 81] Alle diese Reparatursysteme werden in der Natur von Organismen auch zur Reparatur von Photoschäden genutzt, allerdings wird nicht jeder Pfad von jedem Organismus verwendet. Im Menschen zum Beispiel können Photoschäden nur über NER repariert werden, während Pflanzen zusätzlich noch direkte Reparaturproteine, die Photolyasen, besitzen.

1.5.1 Photoschäden und BER

Die Basenexzisionsreparatur ist ein in allen bekannten Lebensformen nachgewiesener DNA Reparaturpfad, der insbesondere für die Beseitigung von oxidativen Schäden und

desaminierten Basen (Uracil aus Cytosin) verantwortlich ist. Die geschädigte Base wird dabei durch eine DNA Glykosylase erkannt, die die *N*-glykosidische Bindung zwischen der Base und der Ribose des DNA Rückgrates hydrolysiert.^[80] Anschließend wird die so gebildete abasische Stelle in der DNA von einer AP Endonuklease aus dem Strang entfernt und die Lücke wird durch eine DNA Polymerase aufgefüllt. Die Reparatur wird dann durch das Verschließen der Lücke durch eine DNA Ligase beendet. Einige der DNA Glykosylasen sind multifunktionell und besitzen auch eine AP-Endonuklease Aktivität. Der hier geschilderte Reparaturweg wird auch als „short patch“ BER bezeichnet. In einigen Fällen ist aber auch eine „long patch“ BER beschrieben, die sich von der „short patch“ BER dadurch unterscheidet, dass zusätzlich zum geschädigten Nukleotid 2-6 weitere Nukleotide in 3'-Richtung des Schadens ersetzt werden.

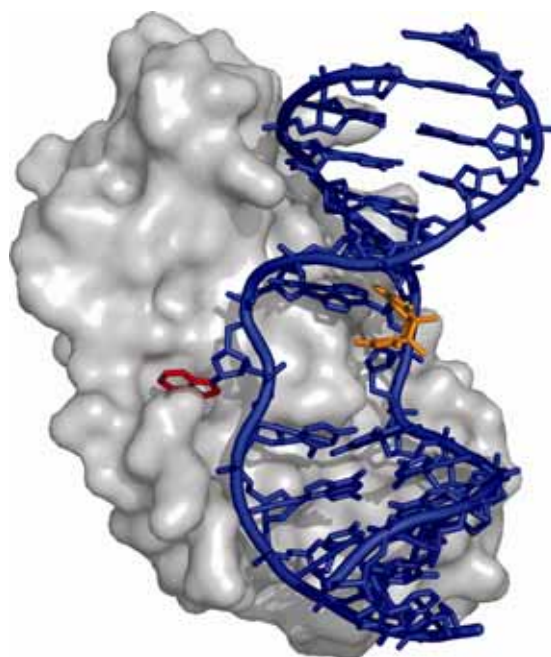


Abbildung 9: Die DNA Glykosylase T4 Endo V gebunden an einen DNA Doppelstrang mit einem TT-CPD Schaden (Enzym: grau, DNA: blau, CPD Schaden: orange, herausgedrehtes Adenin: rot).

Einige Bakterien und niedere Eukaryonten besitzen DNA Glykosylasen, die spezifisch den CPD Photoschaden erkennen und so die Reparatur dieses Schadens durch BER ermöglichen. Ein gut untersuchtes Beispiel für eine CPD-spezifische Glykosylase ist das Enzym Endo V aus dem T4 Phagen (Abbildung 9).^[82] Dieses Enzym katalysiert im ersten Schritt die Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen dem 5'-Thymidin des CPDs und der 5'-Ribose. Die so entstehende abasische Stelle ist über eine Schiffssche Base kovalent mit der *N*-terminalen Aminogruppe des Enzyms verknüpft. Nach der nun anschließenden Eliminierung des 3'-Phosphates an der abasischen Stelle, wird die Schiffssche Base hydrolysiert und so das

Enzym wieder freigesetzt. Die Kokristallstruktur des Enzyms mit einem, einen CPD Schaden enthaltenden DNA Doppelstrang zeigt, wie sich das Enzym Zugang zu der tief im Doppelstrang liegenden, glykosidischen Bindung verschafft. Durch das Herausklappen der Adeninbase gegenüber dem 5'-Thymidin und die Erzeugung eines Knicks von 60° entsteht neben dem CPD Dimer ein großes Loch im DNA Doppelstrang, das von den katalytisch aktiven Resten des Enzyms genutzt wird. Für die Erkennung des Schadens scheint die lokale Destabilisierung des Doppelstranges durch den CPD Schaden und die damit energetisch einfachere Deformierung des Doppelstranges durch das Enzym wichtig zu sein. Außerdem bildet Endo V spezifische Wechselwirkungen zum Zuckerphosphatrückgrat um den Schaden aus.^[83] Direkte Wechselwirkungen mit den geschädigten Basen sind interessanterweise von geringer Bedeutung.

1.5.2 Photoschäden und NER

Die Nukleotidexzisionsreparatur ist ein allgemeines DNA Reparatursystem mit großer Substratbandbreite, das in allen bekannten Lebewesen vorhanden ist. Obwohl der genaue Aufbau und die beteiligten Enzyme zum Teil sehr unterschiedlich sind, ist der Ablauf der NER in allen Organismen ähnlich.^[80] Im ersten Schritt wird der Schaden erkannt und anschließend zusammen mit 15-30 benachbarten Basen aus dem geschädigten DNA Strang geschnitten. Die entstehende Lücke wird durch eine Polymerase wieder aufgefüllt und von einer Ligase geschlossen. An der NER sind also viele Proteine beteiligt, im allgemeinen in Prokaryoten weniger, in Eukaryoten mehr. In menschlichen Zellen zum Beispiel ist das XPC Protein für den ersten Schritt der Schadenserkennung zuständig.^[80] Es rekrutiert den Transkriptionsfaktor TFIIH, dessen Helicasen XPB und XPD eine Blase um den Schaden öffnen. Das XPA Protein ist nun wahrscheinlich für die Verifizierung des Schadens verantwortlich. Anschließend schneiden die Endonukleasen XPF-ERCC1 und XPG ein 24-32 Basen langes Fragment mit dem Schaden aus dem Strang, bevor die Replikationsmaschinerie die Lücke füllt und DNA Ligase I den Nick verschließt. Das hier geschilderte, vereinfachte Model der NER beschreibt die globale Genomreparatur (GGR), die Schäden im gesamten Genom eines Lebewesens repariert. Die Namen der menschlichen NER Proteine XPA-XPG leiten sich von *Xeroderma Pigmentosa* ab, einer Erbkrankheit, die durch Defekte in der NER hervorgerufen wird und sich in einer stark erhöhten (Haut-) Krebswahrscheinlichkeit und starker (UV-) Lichtempfindlichkeit äußert.^[84, 85] Ursache der Krankheit ist die fehlerhafte Reparatur von (UV)-Schäden, so dass dem UV Licht ausgesetzte Gewebe sehr schnell degenerieren.

Während der prinzipielle Ablauf der NER und die meisten beteiligten Enzyme bekannt sind, so wenig sind der genaue Mechanismus der Schadenserkennung und die darauf folgenden Schritte verstanden. Im Fall des menschlichen NER Systems ist noch nicht einmal vollständig geklärt, welches Protein die UV-Schäden letztendlich erkennt. Außerdem gibt es viele Hinweise, dass zwar (6-4)-Schäden und ihre Dewarismere gute Substrate für die NER sind, aber CPD-Schäden im menschlichen Genom nur sehr langsam erkannt und damit von der NER repariert werden. Unklar ist auch die Rolle des XPE Proteins.^[86] Dieses Protein bindet DNA Schäden mit hoher Affinität und mutierte Varianten lösen *Xeroderma Pigmentosa* aus. Für den NER Prozess wird dieses Protein aber anscheinend nicht benötigt und seine Rolle bei der DNA Reparatur ist nicht bekannt.

Strukturelle Untersuchungen zur Wechselwirkung von UV-Schäden mit NER-Proteinen und damit zu ihrer Erkennung sind bis auf eine NMR-Studie zur Bindung des (6-4)-Schadens an XPA nicht durchgeführt worden.^[87-89] Eine neue Kristallstruktur eines Homologen der XPB Helikase (Mitglied des TFIIH Transkriptionsfaktors) aus einem Archaeon enthält interessanterweise aber eine mögliche DNA-Schaden Bindungsstelle.^[90] Da die Helikaseaktivität dieses Enzyms abhängig von der Anwesenheit von DNA Schäden wie dem CPD Dimer oder dem (6-4)-Schaden ist, könnte überraschenderweise auch dieses Enzym an der Schadenserkennung oder Verifizierung beteiligt sein.

In einigen Organismen wie der Hefe *Saccharomyces pombe* existiert ein weiteres Exzisionsreparatursystem, das DNA Photoschäden erkennt und repariert. Sowohl CPD Schäden als auch (6-4)-Schäden werden hier durch die UVDE Endonuklease erkannt, die anschließend die Phosphordiesterbindung auf der 5'-Seite des Schadens hydrolysiert.^[91, 92] Der Strangbruch neben dem Schaden führt wahrscheinlich zur Bindung von Nukleasen wie den FEN-1 Homologen, die daraufhin auf der 3'-Seite des Schadens eine weitere Phosphordiesterbindung spalten und so den Schaden entfernen.^[93] Weitergehende Details sind aber auch für dieses Reparatursystem nicht bekannt.

1.5.3 Transkriptions-gekoppelte DNA Reparatur

Mitte der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts machte die Gruppe *Hanawalt* die Beobachtung, dass in aktiv transkribierten DNA Strängen Schäden deutlich schneller repariert werden als in ihren Gegensträngen.^[94-96] Diese Beobachtung konnte nur durch eine Beteiligung der RNA Polymerase II an der DNA Reparatur erklärt werden. DNA Schäden wie das CPD Dimer blockieren die RNA Pol II nicht nur, sondern werden von dieser auch erkannt. Anschließend aktiviert die RNA Pol II auf auch heute noch nicht genau bekannte Weise Enzyme der NER und trägt so zur schnelleren Reparatur der Schäden bei. Dieser

Mechanismus, Transkriptions-gekoppelte Reparatur (TCR) genannt, wurde seitdem sowohl in Prokaryoten wie auch in Eukaryoten nachgewiesen.^[97] Im Menschen ist dieser Mechanismus insbesondere für die Reparatur von CPD-Dimeren von großer Bedeutung, da diese Schäden sonst von den Reparaturenzymen des NER Systems nur schlecht erkannt werden.

Für die Funktion der Transkriptions-gekoppelten Reparatur sind die so genannten Kopplungsfaktoren mfd (in *E. coli*), rad26 (in *S. cerevisiae*) und CSA und CSB (im Menschen) von großer Bedeutung.^[97, 98] Diese Proteine werden wahrscheinlich von der RNA Polymerase nach der Schadenserkenkung aktiviert und rekrutieren die Reparaturproteine des NER Systems. Da die Schadenserkenkung durch die RNA Polymerase erfolgt, werden allerdings nicht alle NER Proteine benötigt. Im Menschen ist XPC zum Beispiel an der TCR nicht beteiligt.^[99] Mutationen in CSA oder CSB können zu einer nicht funktionellen TCR führen und rufen im Menschen das Cockayne Syndrom, eine Erbkrankheit, hervor.^[85]

Nicht bekannt ist, welche Rolle der Transkriptionsfaktor TFIIS im Rahmen der TCR spielt und ob er überhaupt an dieser beteiligt ist. TFIIS kann die RNA Pol II zum Zurückweichen vom Schaden und Kürzen der synthetisierten RNA veranlassen.^[98, 100] Eine direkte Beteiligung am Reparaturprozess erfolgt aber wohl nicht, TFIIS ist für die TCR nicht essentiell. Insgesamt gesehen ist das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Reparaturenzyme und Transkriptionsfaktoren mit RNA Pol II aber als ganzes bisher nur sehr schlecht verstanden und bedarf weiterer Untersuchungen.

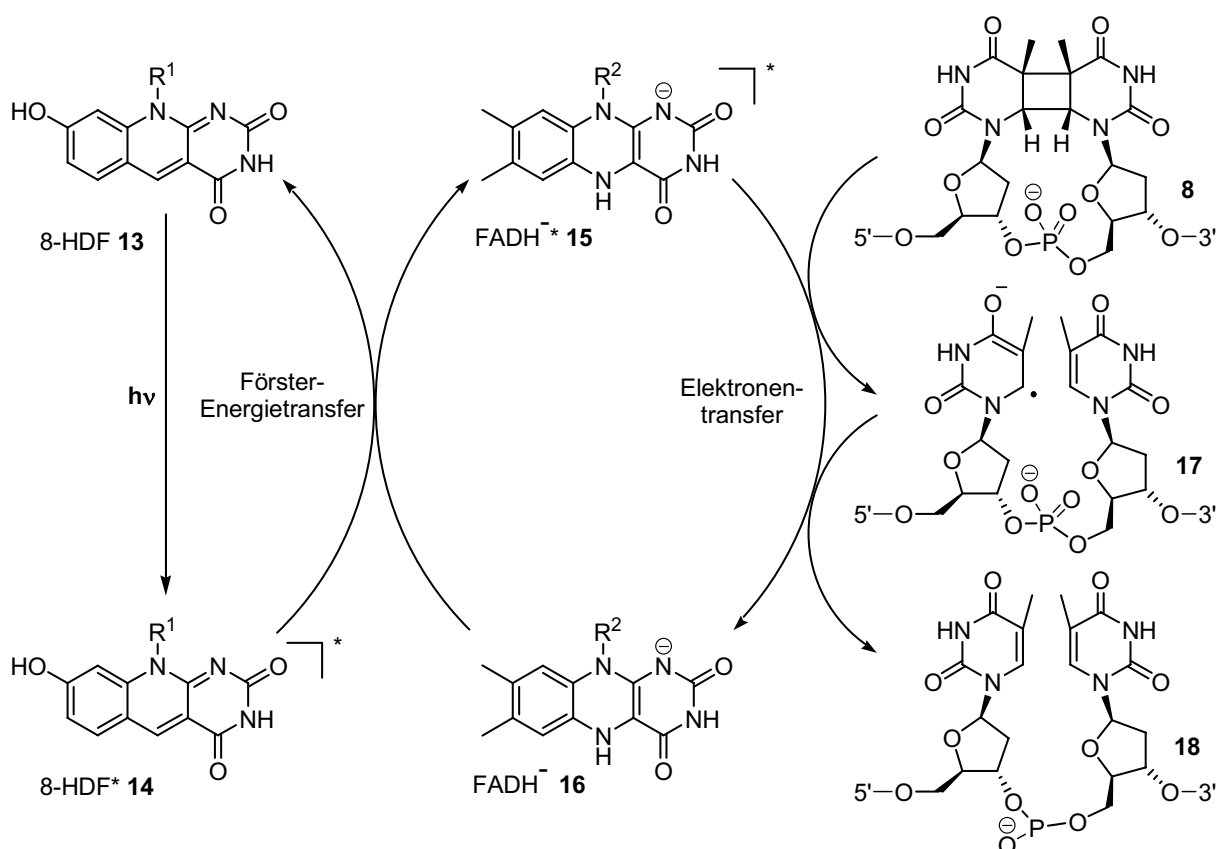
1.5.4 DNA Photolyasen

In vielen Bakterien, niederen Eukaryonten und Pflanzen können Photoschäden nicht nur über BER und NER Pfade repariert werden, sondern auch direkt durch spezifische Reparaturenzyme, die DNA Photolyasen.^[101] Die Photolyasen sind monomere Enzyme mit einem Molekulargewicht von ca. 55-60 kDa und einem katalytischen Flavinkofaktor, die die Photodimere direkt zurück in ihre Ausgangsbasen spalten können. Die Energie für diesen Prozess liefert paradoxerweise blaues Licht, so dass die Photoschäden durch eine Photoreaktion repariert werden. Photolyasen sind jeweils spezifisch für eine Klasse von Photodimeren, so dass CPD Dimere von CPD Photolyasen und (6-4)-Schäden von (6-4)-Photolyasen repariert werden.

CPD Photolyasen

CPD Photolyasen sind sehr weit verbreitete Enzyme und wurden schon in Bakterien, Archaeen, Pflanzen, Tieren und sogar Viren gefunden. Interessanterweise fehlen sie aber in

Säugetieren und damit auch im Menschen. Auf Sequenzebene können die bakteriellen Photolyasen von denen der höheren Eukaryoten unterschieden werden. Die bakteriellen Photolyasen gehören wohl zu den am besten untersuchten Enzymen überhaupt und sind schon mit fast allen, denkbaren und geeigneten Methoden untersucht worden.^[101-105] Sie enthalten ein Flavinadenindinukleotid (FAD) und einen zweiten Kofaktor, bei dem es sich entweder um ein Pterin wie Methylentetrahydrofolatpolyglutamat (MTHF) oder um ein 8-Hydroxy-5-deazaflavinderivat (8-HDF, **13**) handeln kann.



Schema 6: Der Reparaturmechanismus der CPD Photolyasen, in diesem Fall mit einem 8-Hydroxy-5-deazaflavin als zweitem Kofaktor ($R^1 = \text{Ribityl}$, $R^2 = 5'-(\text{ADP})\text{-ribityl}$).

Der Reaktionsmechanismus der CPD Photolyase ist vielfach an Modellsystemen und am Enzym selbst untersucht worden (Schema 6). Nach Absorption eines Photons durch den zweiten Kofaktor wird die Anregungsenergie über einen Förstertransfer auf das reduzierte und deprotonierte FAD übertragen. Das angeregte Flavin ist einer der stärksten bekannten biologischen Elektronendonoren ($E_{\text{Red}} = -2.6 \text{ eV}^{[106]}$) und überträgt ein Elektron in das LUMO des CPD Dimers. Das gebildete Dimerradikalanion zerfällt daraufhin sofort unter Spaltung des Cyclobutanringes und bildet so die ungeschädigten Ausgangsbasen zurück.^[105] Anschließend wird das überschüssige Elektron zurück auf das Flavin übertragen. Der ganze

Prozess ist extrem schnell und nach etwa einer Nanosekunde beendet. Außerdem ist die Quantenausbeute mit Werten zwischen 0.7 (*E. coli* Photolyase) und 0.95 (*A. nidulans* Photolyase) für ein Enzym extrem hoch. CPD Schäden werden sowohl in DNA Einzel- als auch Doppelsträngen erkannt. Nachdem vor kurzem auch das intermediäre, neutrale Flavinradikal kurzpulsspektroskopisch nachgewiesen wurde, darf der Mechanismus als weitgehend gesichert gelten.^[107] Unklar ist nur, ob im CPD Dimerradikalanion beide Bindungen des Cyclobutans gleichzeitig oder nacheinander gespalten werden. Außerdem fehlt bisher ein experimenteller Nachweis der Rückübertragung des Elektrons, obwohl ohne diese die hohe Quantenausbeute nicht zu erklären wäre.

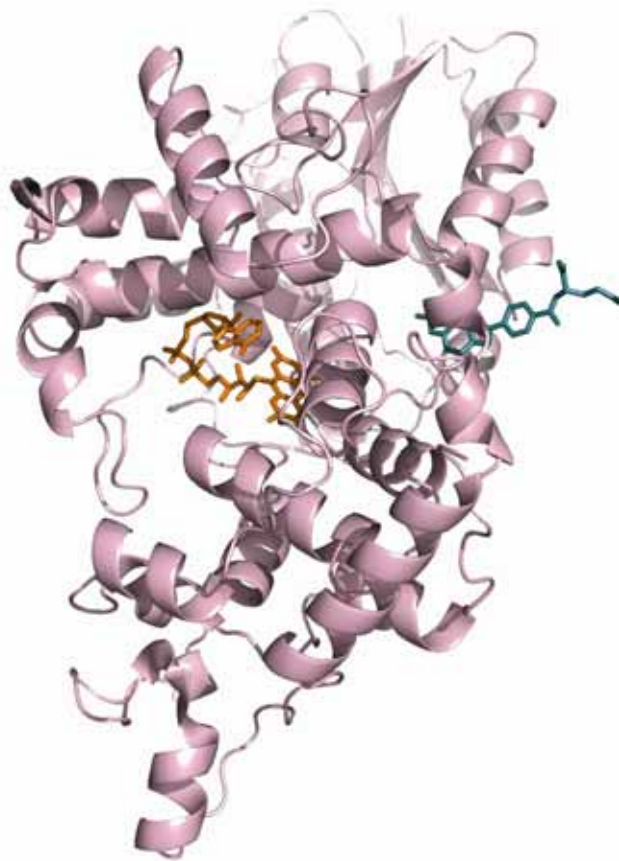


Abbildung 10: Die Kristallstruktur der CPD Photolyase aus *E. coli*
(Protein: rosa, FAD: orange, MTHF: türkis).

Die Kristallstruktur der *E. coli* CPD Photolyase (enthält MTHF als zweiten Kofaktor) wurde 1995 von *Sancar* und *Deisenhofer* gelöst (Abbildung 10).^[108] Während das MTHF in einer flachen Tasche an der Oberfläche des Enzyms gebunden wird, befindet sich das FAD tief im Inneren. Das FAD nimmt dabei eine sehr ungewöhnliche, U-förmige Konformation ein. Von der Oberfläche des Enzyms reicht eine relativ große Tasche bis hinab zum FAD. Diese

Öffnung besitzt ziemlich genau die richtige Größe, um einen CPD Schaden zu binden. Daher wurde vermutet, dass die Photolyase das CPD Dimer aus dem DNA Doppelstrang heraus- und in diese Tasche hinein dreht (base-flipping), um so die Elektronenübertragung zu ermöglichen. Die in den letzten Jahren veröffentlichten Kristallstrukturen der *A. nidulans* und der *T. thermophiles* sind der *E. coli* Struktur sehr ähnlich und haben das allgemeine Bild bestätigt.^[109-111]

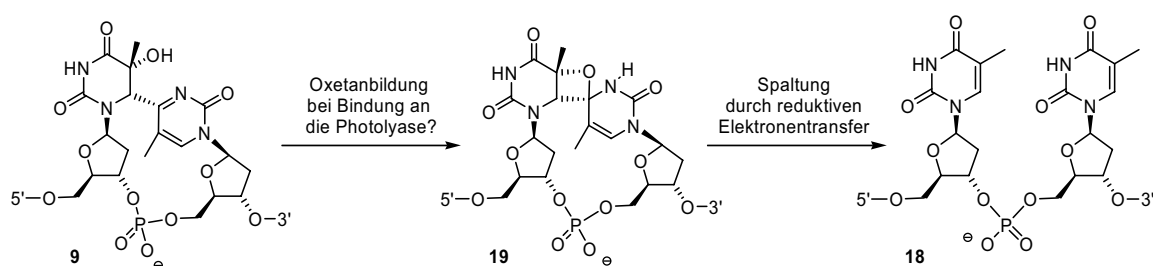
Während die bakteriellen CPD Photolyasen also sehr gut charakterisiert sind, gibt es zu den CPD Photolyasen höherer Organismen nur sehr wenige Untersuchungen. Sequenzvergleiche ergeben deutliche Unterschiede zu den bakteriellen und auch zu den (6-4)-Photolyasen, die insbesondere außerhalb der FAD Bindungsregion auftreten.^[101] Genauere Untersuchungen zu diesen Enzymen wären daher wünschenswert, insbesondere da Mutationen in den Photolyasegenen einen großen Einfluss auf die UV-Resistenz und damit auch auf den Ertrag von Nutzpflanzen haben.^[112-114]

Kürzlich ist von der Arbeitsgruppe *Sancar* eine neue Klasse von CPD Photolyasen identifiziert worden.^[115] Sancar et al. konnten nachweisen, dass die sogenannten DASH Cryptochrome CPD Schäden in DNA Einzelsträngen, aber nicht in Doppelsträngen reparieren können. Bisher hatte man diese Enzyme auf Grund der fehlenden Affinität zu CPD Schäden in Doppelsträngen den Cryptochromen zugeordnet, den Photolyasen eng verwandten Photorezeptoren. Die genaue Funktion dieser Enzyme *in vivo* ist aber noch nicht geklärt und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hauptfunktion dieser Enzyme außerhalb der DNA Reparatur liegt. Die Kristallstruktur eines dieser Enzyme zeigt aber, dass die Ähnlichkeit zu den bisher bekannten Photolyasen, mit Ausnahme der fehlenden Affinität zu Doppelsträngen, sehr hoch ist.^[116]

(6-4)-Photolyasen

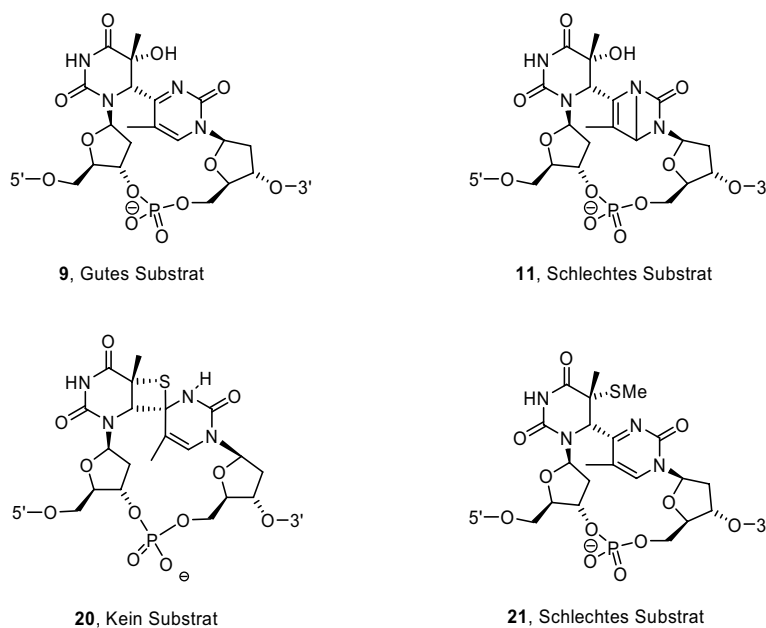
Die erste Photolyase für den (6-4)-Schaden wurde erst 1993 in *Drosophila melanogaster* identifiziert.^[117] Im Gegensatz zu den CPD Photolyasen sind diese Enzyme relativ selten und konnten bisher nur in höheren Organismen wie *Arabidopsis thaliana* und *Xenopus laevis* nachgewiesen werden.^[101] Erstaunlicherweise besitzen (6-4)-Photolyasen eine sehr große Sequenzhomologie zu den CPD Photolyasen und enthalten ebenso FAD als Kofaktor, obwohl sie eine deutlich andere Reaktion katalysieren müssen. Daher wurde von *Sancar* und *Taylor* ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, der wie im Fall der CPD Photolyase die Spaltung eines Vierrings durch reduktiven Elektronentransfer postuliert.^[118] Im Gegensatz zur CPD

Photolyase ist aber ein vorgelagerter Schritt notwendig, in dem der (6-4)-Schaden durch das Enzym zu einem Oxetan **19** (oder Azetidin) umgelagert wird.



Schema 7: Postulierter Reaktionsmechanismus für die (6-4)-Photolyase.

Der zweite Schritt des postulierten Mechanismus konnte seitdem durch einige Experimente bestätigt werden. Die Gruppen *Falvey* und *Miranda* konnten zeigen, dass Modelloxetane durch reduktiven Elektronentransfer spaltbar sind.^[106, 119] Anschließend gelang es der Gruppe *Carell* nachzuweisen, dass ein reduziertes und deprotoniertes Flavin wie im Fall des CPD Schadens als Elektronendonator geeignet ist, um ein Modelloxetan zu spalten.^[120] Rechnungen und Experimente zur Untersuchung der Umlagerung des Schadens zum Vierringintermediat ergaben allerdings keine klaren Ergebnisse. Nach Rechnungen der Gruppe *Heelis* erfordert dieser Schritt ca. 60 kJ/mol und ist damit für eine Enzym-katalysierte Reaktion energetisch sehr ungünstig.^[121] Widersprüchliche Ergebnisse lieferten zudem Versuche mit unterschiedlichen Derivaten des (6-4)-Schadens als Modellsubstrate. Während wie erwartet TT- und TC-(6-4)-Schäden repariert wurden, wurde ein Thioanalog **20** des Vierringintermediates **19** nicht vom Enzym gebunden.^[122, 123] Das Dewarisisomer **11** und ein *S*-Methylderivat **21** des (6-4)-Schadens wurden überraschenderweise, wenn auch sehr langsam, repariert, obwohl diese Substrate nicht so einfach ein Vierringintermediat bilden können. Die Gruppe *Clivio* führte später ähnliche Untersuchungen an Thioanalogen des (6-4)-Schadens durch, konnte aber keine weiteren Erkenntnisse gewinnen.^[124, 125] Von der Gruppe *Todo* wurden durch Mutageneseversuche zwei konservierte Histidine als mögliche katalytische Reste identifiziert, die an der Bildung des Vierringintermediates beteiligt sein sollen.^[126] Insgesamt sind die Belege für die Bildung eines Intermediates und dessen eventuelle Struktur aber eher spärlich und eine Kristallstruktur des Enzyms ist bisher nicht veröffentlicht. Weitere Untersuchungen sind auf jeden Fall notwendig, um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur CPD Photolyase besser zu verstehen.



Schema 8: Modellsubstrate zur Untersuchung des Mechanismus der (6-4)-Photolyase.

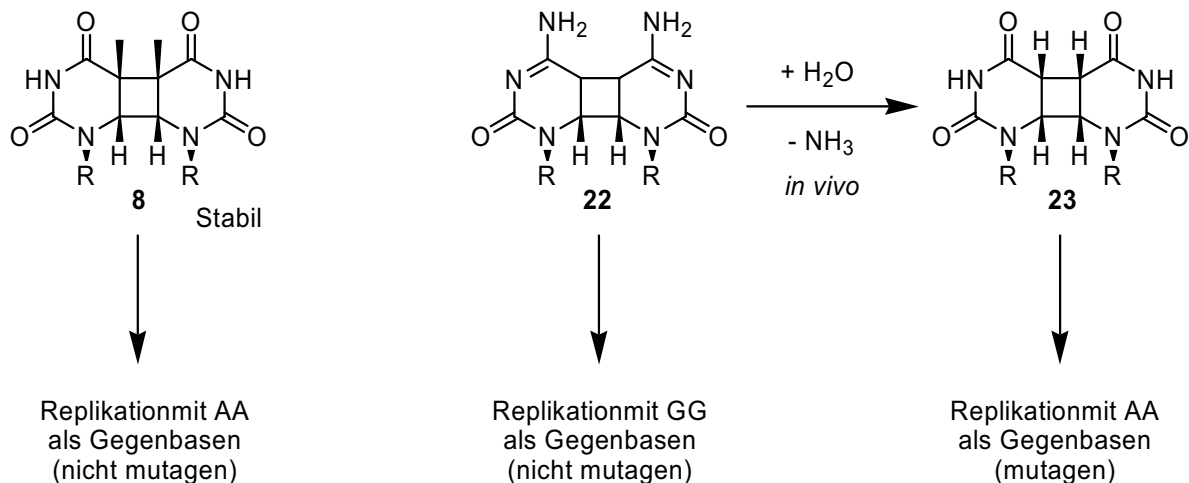
1.6 DNA Photoschäden und Mutagenität

CPD und (6-4)-Photoschäden werden in der Literatur, insbesondere von eher „fachfremden“ Wissenschaftlern, gerne generell als mutagen und carcinogen bezeichnet. Dieses unkritische Urteil ist häufig auf die widersprüchlichen Daten zur Mutagenität der einzelnen Schäden und die daraus abgeleiteten Theorien zur Mutagenität von UV-Schäden zurückzuführen. Im folgenden soll kurz versucht werden, die Mutagenität der Photoschäden im Licht der neusten Daten etwas genauer zu beleuchten.

Unzweifelhaft besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der Entstehung der häufigsten Hautkrebsformen, wie dem Plattenepithel- und dem Basalzellkarzinom, und der empfangenen UV-Strahlendosis.^[127-129] Eine Ausnahme bildet nur das Melanom, dessen Entstehung durch UV-Strahlung nicht nachgewiesen worden ist, aber zumindest vermutet wird. Die Analyse von Plattenepithelkarzinomzellen ergab, dass in 90 % dieser Tumore das p53-Gen mutiert war.^[130, 131] Eine genaue Untersuchung der einzelnen Mutationen führte zu einer sehr interessanten Verteilung der Mutationen über das Gen, mit C-T Einzel- und CC-TT Doppeltransitionen als häufigsten Mutationen. Diese Verteilung der Mutationen ist typisch für Hautkrebs im allgemeinen und deutlich von anderen Krebsarten abzugrenzen. Außerdem scheint es eine auffällige Häufung von Mutationen an PyCG-Sequenzen im Gen zugegeben, die *in vivo* häufig ein methyliertes Cytosin, also ein 5-Methylcytosin enthalten.^[132] Jede

Theorie zur Mutagenität von UV-Schäden muss also in der Lage sein, dieses Mutationsspektrum zu erklären.

Frühe Untersuchungen mit UV-Schäden enthaltenden Vektoren führten zu der Erkenntnis, dass TT-CPD Schäden nicht sehr mutagen sind.^[133-135] (6-4)-Schäden und ihre Dewarisiomere erwiesen sich hingegen als hochmutagen, insbesondere gegenüber dem 3'-Pyrimidinonring.^[135, 136] Generell wurde aber meistens nur mit Thymidin-Thymidin Dimeren gearbeitet und die Cytosin enthaltenden Schäden wurden vernachlässigt. Erst in den letzten Jahren hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass wahrscheinlich Cytosin-enthaltende CPD Schäden die Hauptursache von Mutationen in eukaryontischen Zellen sind. Die Gruppe *Pfeifer* konnte mit transgenen Mäusezellen, die entweder das CPD oder das (6-4)-Photolyasegen enthielten, zeigen, dass nur die Reparatur der CPD Schäden *in vivo* eine deutliche verringerte Mutationsrate und ein verändertes Mutationspektrum erzeugt.^[137] Die wesentlichen Mutationen in Zellen ohne Photolyase konnten auf Cytosin-enthaltende CPD Schäden zurückgeführt werden. Durch die Aufhebung der Aromatizität des Cytosins im Dimer wird die Hydrolyse des Amins/Imins des Cytosins begünstigt. Die Halbwertszeit für diese Reaktion liegt dann im Bereich von wenigen Stunden.^[138, 139] Dadurch entstehen aus Cytosin-enthaltenden Dimeren solche, die Uracil enthalten, und Uracil wird von Polymerasen wie Thymidin kopiert.



Schema 9: Die Mutagenität von CPD Schäden.

Zur Mutagenität der Cytosin-enthaltenden CPD Schäden trägt auch die allgemein sehr langsame Reparatur dieser Schäden im Genom bei. Diese Beobachtung, die schon recht lange bekannt ist, konnte durch neue, HPLC-MS/MS basierte Daten von Cadet eindrucksvoll bestätigt werden.^[42] Nach den neuen Daten tragen die prinzipiell zwar mutagenen (6-4)-

Schäden und ihre Dewarisonomere nur in geringem Umfang zur Mutagenität von UV-Strahlung bei, wahrscheinlich weil diese Schäden sehr schnell repariert werden und, im Fall des TC-(6-4)-Schadens, durch „low-fidelity“ Polymerasen fehlerfrei kopiert werden. Die hohe Mutagenität von Cytosin-enthaltenden CPD Schäden erklärt auch das typische Mutationspektrum in Hautkrebszellen mit ihren häufigen C-T-Transitionen. Eine besondere Rolle könnte hierbei auch das 5-Methylcytosin spielen.^[71] Es besitzt eine längerwellige UV-Absorption als die anderen Pyrimidine und könnte daher im Bereich der biologisch relevanten UV-B-Strahlung besonders gefährdet sein.^[140] Dadurch könnte die besonders hohe Mutationsrate an PyCG-Sequenzen im Genom erklärt werden.

Die Daten zur Mutagenität der UV-Schäden zeigen also, dass nur einige dieser Schäden, die Cytosin enthaltenden CPD Schäden, *in vivo* hoch mutagen sind. Der häufigste UV-Schaden, das TT-CPD Schäden, ist hingegen kaum mutagen. Außerdem zeigen die Daten, dass die Mutagenität eines DNA-Schadens von vielen Faktoren abhängt. Dazu gehören insbesondere sein Potenzial, von Polymerasen falsch kopiert zu werden, und die Effizienz, mit der dieser Schaden im Genom repariert wird.

1.7 CPD Schäden und der reduktive Ladungstransport in DNA

Während der oxidative Ladungstransport in DNA in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts in vielen Studien untersucht wurde und mittlerweile in vielen Punkten gut verstanden ist, wurden nur sehr wenige Untersuchungen zum Verhalten eines Überschusselektrons in der DNA veröffentlicht. Ein Grund hierfür könnte die nur geringe Bedeutung von reduktiven DNA Schäden wie den Dihydropyrimidinen in biologischen Systemen sein. Die ersten, systematischen Untersuchungen führte die Arbeitsgruppe *Sevilla* durch, die Überschusselektronen in DNA durch Gammadiolyse erzeugte.^[141-144] Die entstehenden Radikale wurden durch ESR charakterisiert und waren, wie auf Grund der Redoxpotentiale der Basen zu vermuten, auf den Pyrimidinen Thymin und Cytosin lokalisiert. Aus den temperatur-abhängigen Reaktionen dieser Radikale mit statistisch in der DNA verteilten Akzeptoren wie Mitoxantron konnten Rückschlüsse auf die Beweglichkeit der Ladungen in der DNA gewonnen werden. Während bei tiefen Temperaturen ($T > 150$ °K) nur Tunnelprozesse nachgewiesen werden konnten, setzte bei höheren Temperaturen ($T > 150$ °K) ein Hüpfprozess ein.^[141]

Da auch die Photolyase zur Reparatur des CPD Dimers quasi ein Überschusselektron in die DNA injiziert, entwickelte die Gruppe *Carell* auf Basis des Photolyasekofaktors Flavin als

Donor und des CPD Dimers als Akzeptor ein Modellsystem für die die Untersuchung des Überschusselektronentransfers.^[145, 146] Mit dem Riboflavinbaustein **24** und dem TT-CPD Schaden **25** konnten DNA Oligomere mit genau definiertem Abstand zwischen Donor und Akzeptor synthetisiert werden. Dieses Modellsystem verwendete *C. Behrens*, um zum ersten Mal den Überschusselektronentransfer in wässriger Lösung bei annähernd Raumtemperatur zu untersuchen. Aus der Abstandsabhängigkeit des Elektronentransfers konnten Rückschlüsse auf den Mechanismus gezogen werden, und wie im Fall des oxidativen Elektronentransfers in DNA, können die Daten durch einen Hüpfprozess erklärt werden. Diese Untersuchungen wurden aber bisher nur mit AT-Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor durchgeführt. Vermutungen von Giese, dass der Überschusselektronentransfer genauso gut über Thymin wie Cytosin Basen möglich ist, und damit keine Sequenzabhängigkeit aufweist, konnten damit noch nicht bestätigt werden.^[22] Zu Beginn dieser Arbeit Ende 2002 waren keine wesentlichen, weiteren Untersuchungen zum Überschusselektronentransfer in DNA bekannt. Die seitdem recht zahlreich erschienen Arbeiten werden an passender Stelle im Ergebnisstil diskutiert.

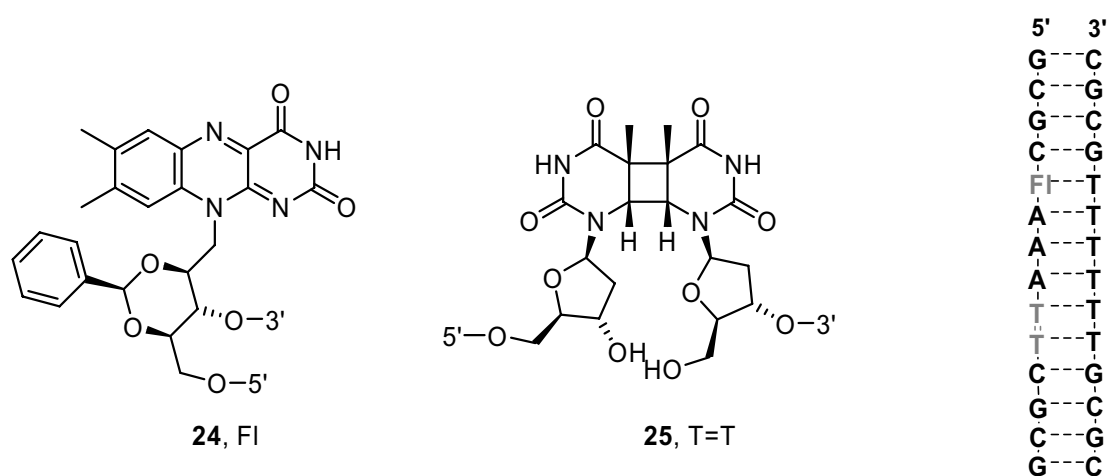


Abbildung 11: Von der Photolyase abgeleitetes Elektronendonator- und -akzeptorsystem zur Untersuchungen des reduktiven Elektronentransportes in DNA. Mit dem Riboflavinderivat **24** als Donor und einem TT-CPD Schaden **25** mit offenem Rückgrat als Akzeptor.

2. Aufgabenstellung

UV-Licht erzeugt in DNA die CPD und (6-4)-Photoschäden. Diese Schäden sind cytotoxisch und potenziell mutagen. Die Auswirkungen dieser Schäden auf DNA-abhängige Enzyme sind bisher nur für einige wenige Fälle und insbesondere überwiegend mit dem CPD Schaden in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher mechanistische Untersuchungen zu den Auswirkungen der DNA Photoschäden auf wichtige DNA-abhängige Enzyme und insbesondere zur Reparatur der Photoschäden durch die DNA Photolyasen durchgeführt werden. Ziel war es, ein möglichst genaues Verständnis dieser Prozesse, wenn möglich auf atomarer Ebene, zu erreichen.

Für den ersten Teil der Arbeit, der sich mit den Cyclobutanpyrimidindimeren (CPDs) beschäftigt, konnte auf Phosphoramiditbausteine von Derivaten des CPD Schadens zurückgegriffen werden. Die Synthesen dieser Bausteine waren von *J. Butenandt* und *L. Burgdorf* in der Arbeitsgruppe *Carell* entwickelt worden. Mit diesen Bausteinen sollte möglichst umfassend die Erkennung und Reparatur des CPD Schadens untersucht werden. Dazu gehört der reduktive Elektronentransfer in DNA, die Blockade von Transkription und Replikation und natürlich die DNA Reparatur. Wenn nötig, sollte dazu versucht werden, in Zusammenarbeit mit strukturbioologischen Arbeitsgruppen (Gruppe *Essen*, Gruppe *Cramer*), Komplexe aus geschädigter DNA und den betroffenen Enzymen kristallographisch zu charakterisieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Untersuchungen auf den (6-4)-Schaden ausgedehnt werden. Da im Gegensatz zum CPD Schaden keine effiziente Methode zur Herstellung von DNA Strängen mit diesem Schaden zur Verfügung stand, war die Etablierung eines soliden Zugangs zu diesem Schaden ein grundlegendes Ziel. Zu diesem Zweck sollten sowohl Versuche zur Totalsynthese des Schadens unternommen, als auch bestehende Methoden zur Herstellung von DNA mit einem (6-4)-Schaden auf mögliche Verbesserungen überprüft werden. Ein weiteres grundlegendes Ziel war es, den hoch interessanten Mechanismus der (6-4)-Photolyase besser zu untersuchen. Insbesondere Methoden zum Nachweis einer möglichen, Enzym gebundenen Vierringzwischenstufe sollten dazu entwickelt werden.

3. Überschusselektronentransfer in DNA

3.1 Einleitung

Während die Reaktionen und der Transport von positiven Ladungen, also Elektronenlöchern, in DNA in den letzten Jahren ausführlich untersucht worden ist, ist über überschüssige Elektronen in DNA wenig bekannt. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen von *C. Behrens* aufgegriffen werden, der zum ersten Mal den Überschusselektronentransfer in DNA an Hand eines definierten Donor-Akzeptor Systems untersucht hatte. Als Donor wurden dabei die Flavinbausteine **26** oder **27** verwendet, als Akzeptor diente das CPD Photoschaden-derivat **28** (Abbildung 12).^[145-149]

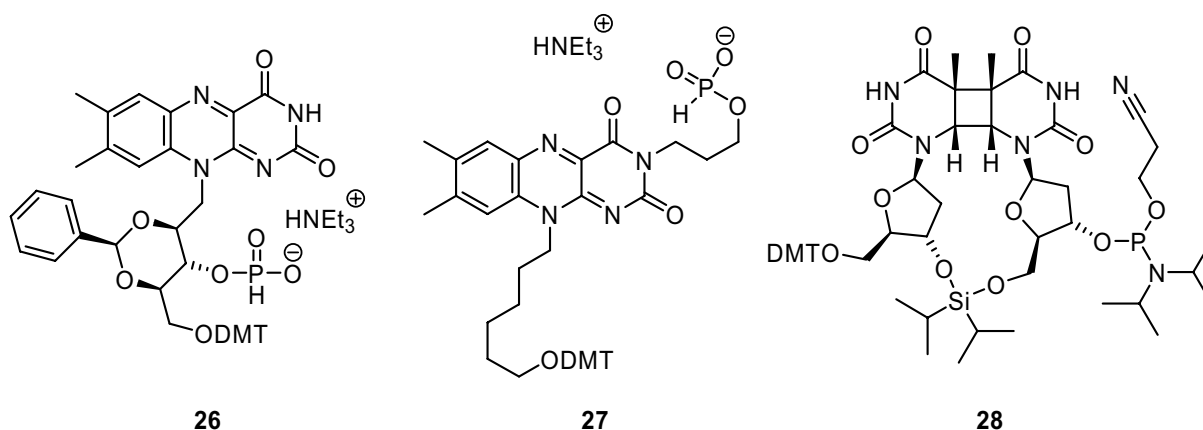
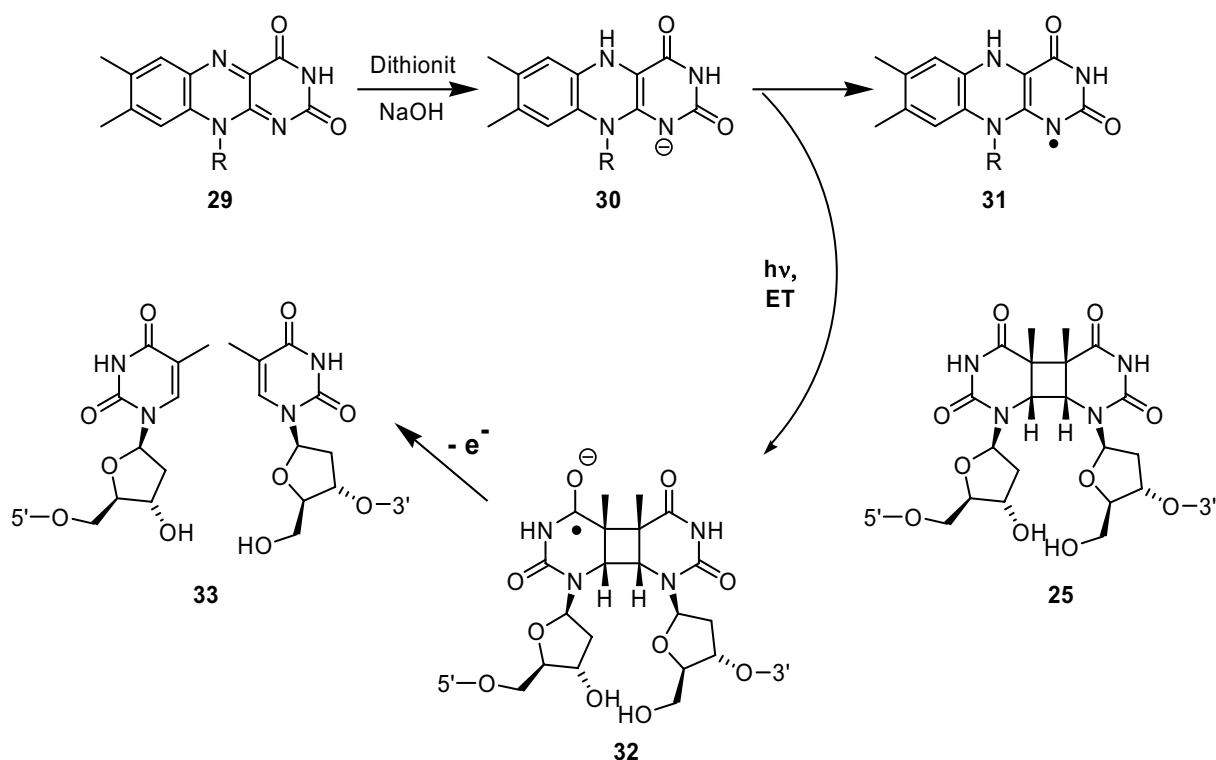


Abbildung 12: Bausteine für die Synthese von DNA-basierten Donor-Akzeptor Systemen zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA.

Das reduzierte, lichtangeregte und deprotonierte Flavin **30** kann in diesem System ein Elektron in den DNA-Basenstapel injizieren. Erreicht dieses Elektron den CPD Schaden, so kann es eine Cycloreversion des Cyclobutanrings auslösen. Durch das nach der Entschützung der Silylgruppe fehlende Phosphatrückgrat zwischen den beiden Thymidinen des Schadens **25** wird diese Cycloreversion in einen Strangbruch übersetzt, so dass der reduktive Elektronentransfer detektiert werden kann (Schema 10).

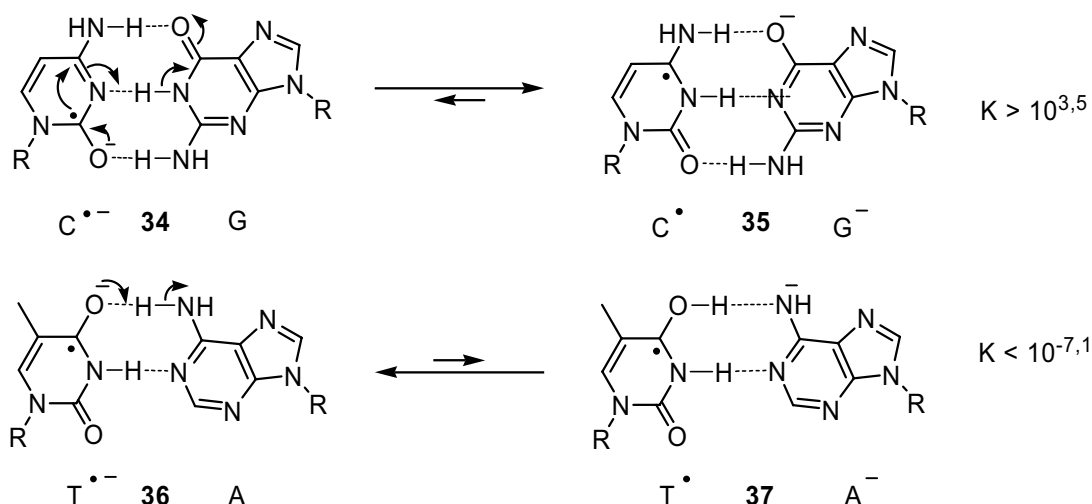
Mit diesem System konnte *C. Behrens* eine nur schwache Abstandsabhängigkeit des Überschusselektronentransfers in AT-Sequenzen nachweisen. Diese Abstandsabhängigkeit kann nur durch einen Hüpfprozess zwischen Donor und Akzeptor erklärt werden. *C. Behrens* Untersuchungen befassten sich aber fast ausschließlich mit AT-Sequenzen zwischen Donor

und Akzeptor und lassen daher nur geringe Rückschlüsse auf das Verhalten eines Elektrons in natürlicher DNA zu. Über den Einfluss von GC-Basenpaaren auf den Überschusselektronentransport ist in der Literatur schon mehrfach spekuliert worden. *Giese* postulierte, dass der reduktive Elektronentransfer im Gegensatz zum oxidativen Ladungstransfer keine Sequenzabhängigkeit aufweisen sollte, da die Reduktionspotentiale der beiden potentiellen Ladungsträger, des Thymins und des Cytosins, fast identisch sind.^[22]



Schema 10: Mechanismus des Donor-Akzeptor Systems zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA bestehend aus Flavin und CPD Schaden.

Allerdings ist unklar, welchen Einfluss die mögliche, rasche Protonierung des Cytosinradikalanions durch ein gegenüberliegendes Guanin hat (Schema 11).^[150] Diese Protonierung des Cytosins zum Cytosinradikal könnte potentiell die weitere Übertragung des Überschusselektrons durch die Trennung von Ladung und Spin verhindern und so den Ladungstransfer stoppen. Experimente der Gruppe *Sevilla* zeigten, dass bei tiefen Temperaturen (77 K) nur Ladungstransfer zu Thyminen nachgewiesen werden kann. Bei höheren Temperaturen scheinen aber auch Cytosine am Hüpfprozess beteiligt zu sein.^[141-143, 150] Auch Rechnungen wurden zu dieser Problematik angefertigt, welche aber keine entscheidenden Hinweise lieferten.^[151]



Schema 11: Die Protonierung der Pyrimidinradikalanionen durch die gegenüberliegende Nucleobasen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die von *C. Behrens* etablierten Donor-Akzeptor-Systeme genutzt werden, um den Überschusselektronentransfer in DNA in gemischten und in reinen GC-Sequenzen zu untersuchen.

3.2 Überschusselektronentransfer in DNA-Doppelsträngen mit Donor 26 und Akzeptor 28

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung der modifizierten DNA Stränge

Die Ergebnisse von *C. Behrens* hatten gezeigt, dass der Überschusselektronentransfer in DNA Doppelsträngen relativ effektiv ist und auch über 5-6 Basenpaare sehr gut beobachtet werden kann. Um den Einfluss von GC-Basenpaaren auf den Überschusselektronentransfer möglichst frei von Störungen durch die unterschiedliche Umgebung von Donor und Akzeptor zu untersuchen, wurden daher Sequenzen mit großen Abstand zwischen Donor und Akzeptor als Modellsysteme ausgewählt. Diese Systeme erlauben den Einbau der GC-Basenpaare in die Sequenz, ohne dass eine Veränderung der direkten Umgebung von Donor und Akzeptor eintritt. Auf Grund der Erfahrungen von *C. Behrens* mit den beiden Donor-Akzeptor-Systemen Flavin 26-CPD Schaden 28 und Flavin 27-CPD Schaden 28 wurde das erste System für diese Studien gewählt. Dieses System hatte sich in *C. Behrens* Studien zur Abstandsabhängigkeit bewährt, und die benötigten DNA Stränge sind einfach zu synthetisieren. Das zweite System mit Hairpinflavin 27 erschien hierfür unnötig kompliziert, da es die Synthese

sehr langer Stränge (> 25 Basen) erfordert hätte. Insbesondere die Aufreinigung dieser Stränge erschien nach den Erfahrungen von *C. Behrens* als zu kompliziert.

Strang	Sequenz (5'-3')	Masse (berechnet)	Masse (gefunden)	Smp. (°C)
DS1	GCGCFIAAAAAAT=TCGCG (<i>C. Behrens</i>)	5364,8 ¹	5364,7 ¹	31/56 ^{2,3}
DS2	GCGCFIAAGAAAT=TCGCG	5378,8	5378,1	40,2 ³
DS3	GCGCFIAAGGAAT=TCGCG	5394,4	5394,8	44,4 ³
DS4	GCGCFIAGGGGAT=TCGCG	5426,8	5426,0	50,9 ³
DS5	GCGCFIAAAAAGT=TCGCG	5378,8	5379,3	43,4 ³
DS6	GCGCFIAAAAAAAT=TCACGCG	6591,6	6591,0	48,9 ⁴
DS7	GCGCFIAAAGAAAAT=TCACGCG	6607,6	6605,9	49,3 ⁴
DS8	GCGCFIAAAGGAAAT=TCACGCG	6623,5	6623,6	51,6 ⁴
DS9	GCGCFIAAAGGGAAT=TCACGCG	6639,6	6639,1	53,1 ⁴
DS10	GCGCFIAAGGGGAAT=TCACGCG	6657,6 ¹	6660,3 ¹	56,8 ⁴
DS11	GCGCFIAAGAAGAAT=TCACGCG	6623,5	6624,8	52,0 ⁴
DS12	GCGCFIAAAAAAAAAT=TCACGCG	7218,0	7217,3	52,6 ⁴
DS13	GCGTTCFIATTGCG	4177,8	4183,0	46,2 ³

Tabelle 1: Synthetisierte DNA Stränge mit Flavin **26** und CPD Schaden **28** (Fl: Flavin, T=T: CPD Schaden, alle Massen m/z sind als $[M-H]$ angeben, ¹ $[M+H]^+$, ² **DS1** zeigt zwei Schmelzpunkte, ³ $3 \mu\text{M}$ DNA (Strang: Gegenstrang 1:1), 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, ⁴ $2 \mu\text{M}$ DNA sonst wie vorher). Mit Flavin **26** und CPD Schaden **28** wurden daher eine Reihe von Strängen mit 6, 8 oder 10 Basen zwischen Flavin und CPD Schaden hergestellt (Tabelle 1). Die Sequenzen zur Stabilisierung an den Enden der Stränge wurden von *C. Behrens* übernommen, während zwischen Donor und Akzeptor systematisch einige der mittleren Basenpaare durch GC-Basenpaare ersetzt wurden.

Die Synthese der Bausteine **26** und **28** erfolgte nach den bewährten Vorschriften von *A. Schwögler* und *L. Burgdorf*.^[149, 152] Die folgende DNA Synthese wurde nach einem schon von *C. Behrens* verwendeten, von *A. Schwögler* entwickelten, gemischten Phosphoramidit-*H*-Phosphonat Protokoll durchgeführt.^[145, 147, 149, 152] Die anschließende Abspaltung der Stränge von Träger und die Entschützung erfolgten analog zu Vorschriften von *C. Behrens* mit Ammoniak/Ethanol 3/1 über drei Tage.^[147] Diese Bedingungen erwiesen sich, wie bei *C. Behrens*, als nicht vollständig zufriedenstellend, da die Silylschutzgruppe des CPD Bausteins nur unvollständig abgespalten wurde. Die Aufreinigung der Stränge allein über einen Anionentauscher, wie von *C. Behrens* beschrieben, erwies sich daher als nicht ausreichend. Die Stränge wurden stattdessen zweistufig gereinigt, erst über eine C18-RP- und

dann über eine SAX-Anionentauschersäule. Mit diesem Protokoll wurden die Stränge in hoher Reinheit erhalten. Eine Ausnahme bildeten nur der Strang **DS4** mit hohem GC-Gehalt. Die Reinigung dieses Stranges auf der Anionentauschersäule war nicht möglich, da nur sehr breite, „hügelige“ Peaks von kleiner Intensität beobachtet wurden. Strang **DS4** konnte stattdessen alleine mit einem optimierten C18-RP-Protokoll gereinigt werden. Alle Stränge wurden vor ihrer Verwendung über C18-SepPak-Kartuschen entsalzt und mit MALDI-ToF-MS und analytischer HPLC analysiert.

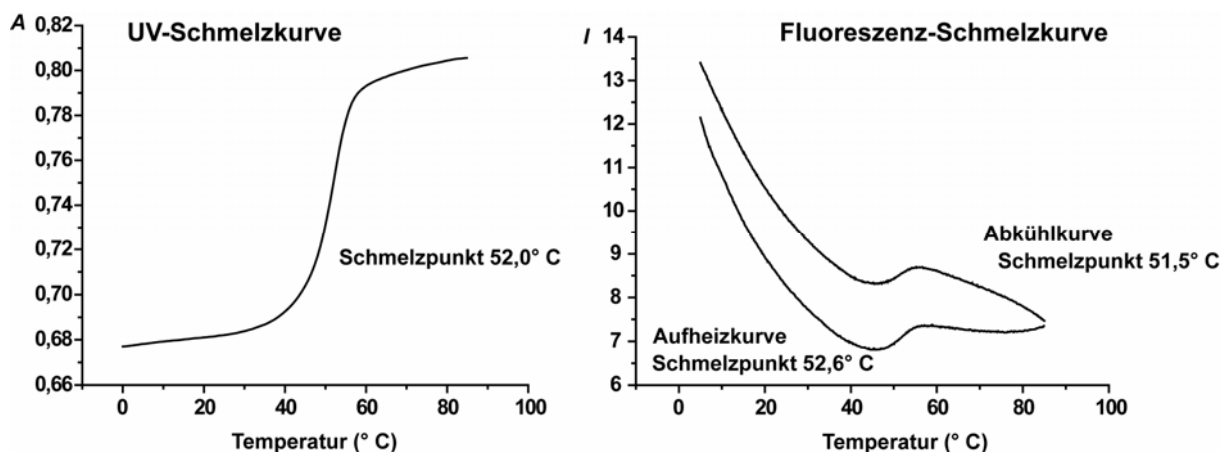


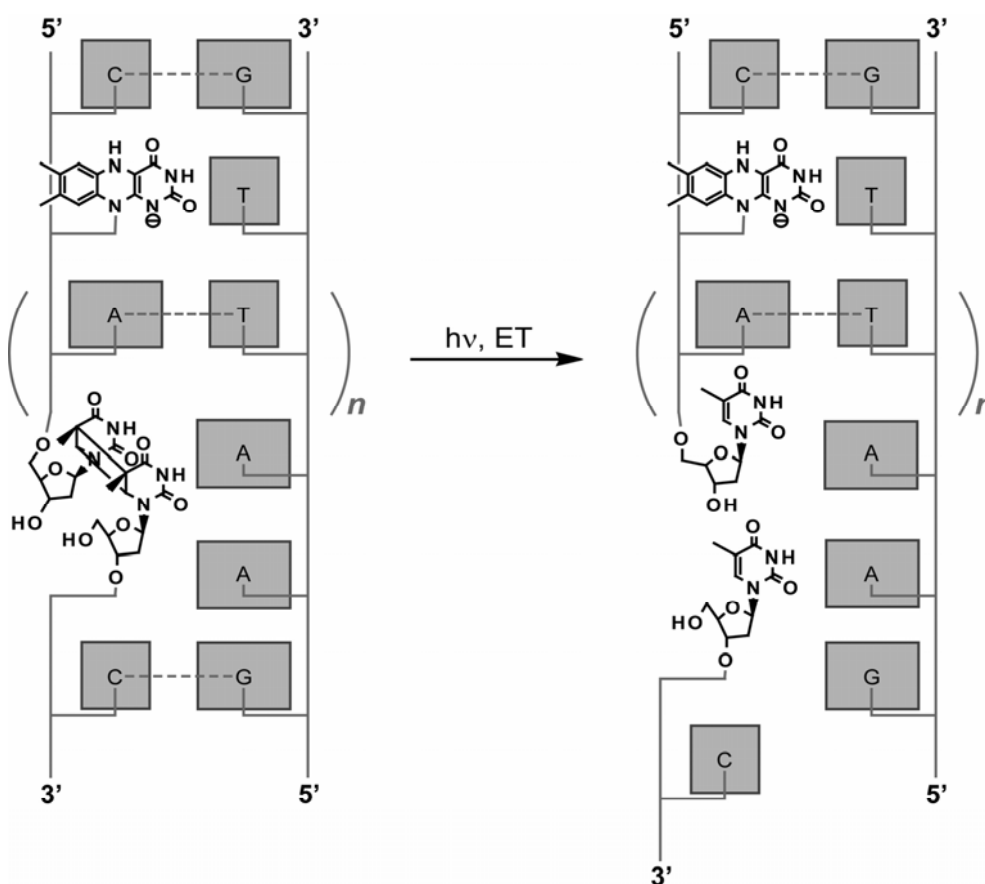
Abbildung 13: UV- und Fluoreszenzschmelzkurven von Strang **DS 11** ($2 \mu\text{M}$ DNA, 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl).

Um sicher zu gehen, dass alle synthetisierten Stränge **DS2-DS13** mit den gekauften Gegensträngen stabile Doppelstränge bilden, wurden UV-Denaturierungsexperimente (UV-Schmelzkurven) durchgeführt (Abbildung 13). Als Gegenbase gegenüber dem Flavin wurde, wie von *C. Behrens*, ein Thymin verwendet.^[145, 147] Die UV-Schmelzkurven aller Stränge zeigen ein für DNA-Doppelstränge typisches, sigmoidales Schmelzverhalten und einen definierten Schmelzpunkt weit über Raumtemperatur. Ein zweiphasiges Schmelzverhalten, wie von *C. Behrens* für **DS1** und ähnliche, kürzere Stränge beobachtet wurde, konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.^[147] Da *C. Behrens* den unteren Schmelzpunkt auf die Bildung einer Blase zwischen Flavin und CPD Schaden zurückführt, ist das Fehlen dieses zweiten Schmelzpunktes nicht verwunderlich. In den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Strängen befinden sich mehr und/oder stabilere Basenpaare zwischen Flavin und Dimer, die dem Mittelteil des Stranges mehr Stabilität verleihen und somit das Entstehen einer Blase verhindern. Für die beabsichtigten Elektronentransferexperimente ist diese Beobachtung sehr wichtig, da die hohe Stabilität der neu hergestellten Doppelstränge zur Bildung einer möglichst ungestörten B-DNA Helix führen sollte.

Von Strang **DS11** wurde auch eine Fluoreszenzschmelzkurve gemessen (Abbildung 13). Die Schmelzkurve zeigt, dass sich die Fluoreszenz des Flavins bei der aus den UV-Schmelzkurven bekannten Schmelztemperatur deutlich verändert. Demnach ist das Flavin unterhalb dieser Temperatur in den Basenstapel einbezogen und ändert seine Fluoreszenzeigenschaften, wenn der Basenstapel aufschmilzt. Die niedrigere Fluoreszenzintensität des Flavins im Basenstapel ist durch die effektivere Fluoreszenzlöschung durch das benachbarte GC-Basenpaar zu erklären.

3.2.2 Elektronentransferexperimente

Durchführung



Schema 12: Erzeugung von Strangbrüchen durch reduktiven Elektronentransfer.

Für die Elektronentransferexperimente wurden Strang und Gegenstrang in Puffer gelöst (10 μM DNA, 10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl). 100 μL dieser Lösung wurden in einer Fluoreszenzküvette unter anaeroben Bedingungen mit alkalischer Natriumdithionitlösung reduziert. Anschließend wurde die Lösung mit einer Handlampe (2 * 15 W, 366 nm) bei 4° C belichtet. In definierten Zeitintervallen wurden Proben aus der Küvette entnommen, unter

Lichtausschluss für zwei Stunden an der Luft reoxidiert und mit Anionenaustauschchromatographie und MALDI-Tof-MS analysiert. Durch UV-Detektion bei 366 nm konnten selektiv die Flavin-enthaltenden Stränge und Strangbruchstücke analysiert werden. Die ersten Experimente ergaben für den Großteil der belichteten Doppelstränge eine Spaltungsausbeute des Dimers in der gleichen Größenordnung wie nach den Ergebnissen von *C. Behrens* zu erwarten (ca. 0,3 % Dimerspaltung/min).^[145, 147] Stränge mit GC-Basenpaaren wiesen meistens ähnliche Spaltungsausbeuten wie gleich lange Stränge mit reinen AT-Sequenzen zwischen Flavin und Dimer auf. Problematisch war allerdings die Reproduzierbarkeit der Experimente. Während in einigen Chargen eines Stranges gar keine Dimerspaltung nachgewiesen werden konnte, spalteten andere Chargen effizient.

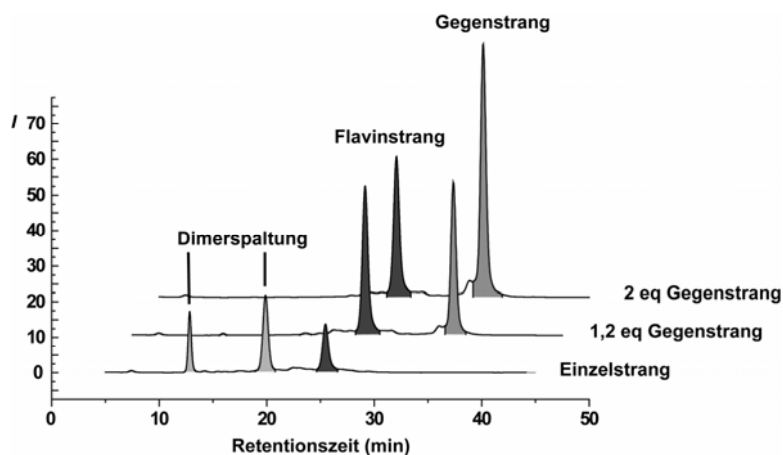


Abbildung 14: Spaltung des CPD Dimers im Strang **DS7** in Abhängigkeit von der Gegenstrangkonzentration (Anionenaustausch-HPLC, UV-Detektion bei 260 nm).

Dieses Verhalten konnte erst durch Kontrollexperimente erklärt werden, in denen die Gegenstrangkonzentration systematisch variiert wurde (Abbildung 14). Die Spaltungsausbeute des Dimers in Strang **DS7** wurde hierzu ohne Gegenstrang (Einzelstrang), mit 1,0, mit 1,2 und 2,0 Äquivalenten Gegenstrang untersucht. Die Spaltungsausbeute des Einzelstranges war mit 69 % in einer Stunde extrem hoch. Mit 1,2 und 2,0 Äquivalenten Gegenstrang konnte hingegen nur eine gerade noch nachweisbare Spaltung (< 2 %) gemessen werden. Die Experimente mit einem Äquivalent Gegenstrang ergaben von Charge zu Charge ein unterschiedliches Bild. Ein ähnliches, von der Gegenstrangkonzentration abhängiges Spaltungsverhalten zeigte sich auch für weitere, untersuchte Stränge. Für den Einzelstrang **DS5** mit zwei Basen weniger zwischen Flavin und Dimer zum Beispiel konnten 58 % Dimerspaltung pro Stunde nachgewiesen werden, während der Doppelstrang mit einem Äquivalent Gegenstrang eine Spaltungsausbeute von 8 % und mit zwei Äquivalenten

Gegenstrang nur noch weniger als 2 % pro Stunde lieferte. Im Einzelstrang **DS3** wurde das Dimer sogar mit 91 % Ausbeute pro Stunde gespalten.

Die extrem schnelle Dimerspaltung in den Einzelsträngen führt sehr wahrscheinlich zu den kaum reproduzierbaren Ergebnissen für „Doppelstränge“, die mit einem Äquivalent Gegenstrang hergestellt wurden. Da die Bestimmung der Konzentration eines DNA Stranges, die hier wie allgemein üblich mit UV-Spektroskopie durchgeführt wurde, fehlerbehaftet ist, wird bei Verwendung „eines“ Äquivalentes von jedem Strang mit hoher Wahrscheinlichkeit kein genaues eins zu eins Verhältnis erreicht. Ist bei den beschriebenen Experimenten der Flavin-Dimer Strang im Überschuss vorhanden, so wird der überschüssige Flavin-Dimer Einzelstrang durch seine sehr viel höhere Spaltungsgeschwindigkeit die Ergebnisse für den Doppelstrang verfälschen. Da schon die Verwendung eines kleinen Überschusses Gegenstrang (1,2 eq) nur noch zu einer kaum nachweisbaren Dimerspaltung führt, sind wahrscheinlich alle hohen, mit „einem“ Äquivalent Gegenstrang gemessenen Spaltungsgeschwindigkeiten auf Flavin-Dimer-Einzelstränge zurückzuführen. Die Ergebnisse der Experimente mit mehr als einem Äquivalent Gegenstrang zeigen eine unter den verwendeten Bedingungen kaum noch nachweisbare Spaltung des Dimers und ermöglichen daher keine Untersuchung der Sequenzabhängigkeit des Ladungstransportes. Eine mögliche Erklärung für die extrem schnelle Dimerspaltung in Einzelsträngen ist ihre hohe Flexibilität gegenüber der relativ starren Doppelhelix der Doppelstränge. Diese Flexibilität könnte eine „Rückfaltung“ der Einzelstränge ermöglichen und so das Dimer sehr nah an das Flavin bringen. Über die dann kleine Distanz wäre ein direkter, schneller Elektronentransfer auf das Dimer möglich, ohne dass ein Hüpfprozess notwendig ist.

Um die synthetisierten Stränge dennoch vermessen zu können, war eine deutliche Steigerung der Spaltungsausbeute erforderlich. Da es sich bei der Dimerspaltung um eine photochemische Reaktion handelt, sollte die Ausbeute durch eine Erhöhung der eingestrahnten Photonenzahl möglich sein. Folglich wurden die oben beschriebenen Experimente mit zwei Äquivalenten Gegenstrang und einer speziell konstruierten Belichtungsapparatur mit einer 1000 W Quecksilberdampfampe wiederholt. Die zwei Äquivalente Gegenstrang sollten zu einer vollständigen Einbindung der Flavin-Dimerstränge in DNA Doppelstränge führen, und die deutlich erhöhte Photonenzahl sollte die Spaltungsausbeute auf ein gut nachweisbares Niveau erhöhen. Die neue Belichtungsapparatur ermöglichte zusätzlich eine effektivere, besser kontrollierbare Kühlung der Probe durch einen wassergekühlten Probenhalter.

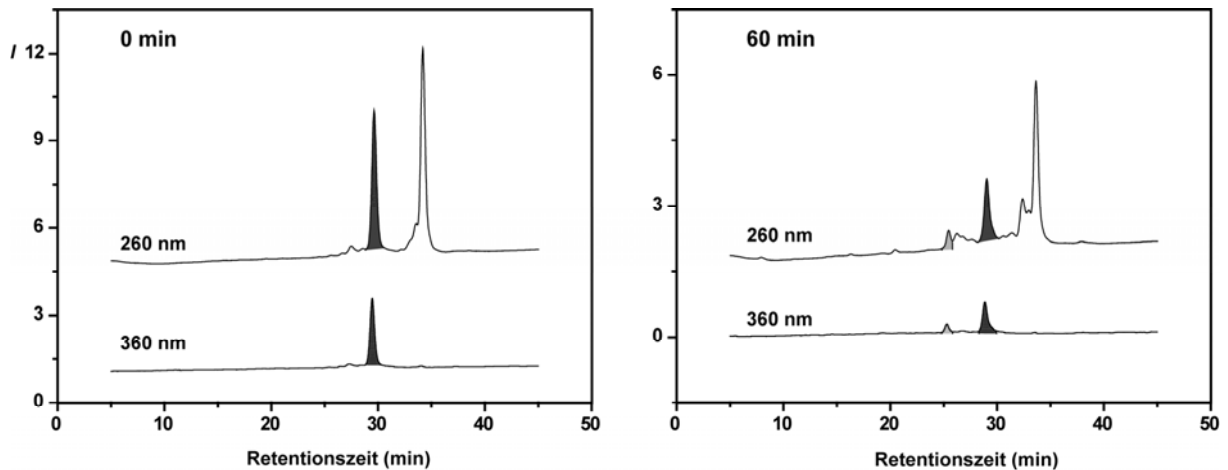


Abbildung 15: *DS11* vor und nach 60 min Belichtung (10 μM *DS11*, 20 μM Gegenstrang, 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, Anionenaustausch-HPLC, UV-Detektion bei 260 und 360 nm).

Tatsächlich konnte für alle Doppelstränge mit Anionenaustauschchromatographie das Auftreten eines neuen Peaks in dem für das Dimerspaltprodukt zu erwartenden Bereich nachgewiesen werden (Abbildung 15). Leider gelang es allerdings nicht, die Spaltung des Dimers mit MALDI-Tof-MS zu bestätigen.

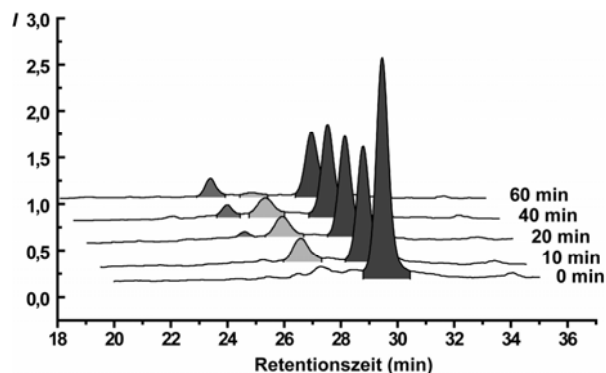


Abbildung 16: *Zeitabhängige Spaltung von DS11* (10 μM *DS11*, 20 μM Gegenstrang, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, Anionenaustausch-HPLC, UV-Detektion 360 nm).

Im Gegensatz zu den Experimenten mit der lichtschwächeren Lampe lief die potentielle Spaltung allerdings nicht mehr ohne die Bildung von Nebenprodukten ab (Abbildung 15). So konnte bei UV-Detektion mit 260 nm eine Schädigung der Gegenstränge nachgewiesen werden, deren Ursache nicht ermittelt werden konnte. Häufig traten auch noch weitere, kleinere neue Peaks in den Chromatogrammen nach der Belichtung auf, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, aber wohl auf Abbauprodukte der DNA Stränge zurückzuführen sind. Noch problematischer ist die in mindestens einem Fall (*DS11*) nachgewiesene Bildung von zwei unterschiedlichen, neuen Produkten. Während kurz nach Beginn der Belichtung ein

erstes Spaltprodukt entsteht, ist nach 20 Minuten ein weiteres nachweisbar, in das sich das erste Spaltprodukt langsam umwandelt (Abbildung 16). Für andere Doppelstränge als **DS11** ist dieses Phänomen nicht eindeutig nachzuweisen, allerdings ist in vielen Fällen eine ungewöhnliche, teilweise sehr breite Form des HPLC-Peaks für das Spaltprodukt zu beobachten. Unter diesen Voraussetzungen sollten die im folgenden geschilderten Ergebnisse zur Dimerspaltung durch Überschuss-elektronentransfer in DNA-Doppelsträngen mit großer Vorsicht betrachtet werden.

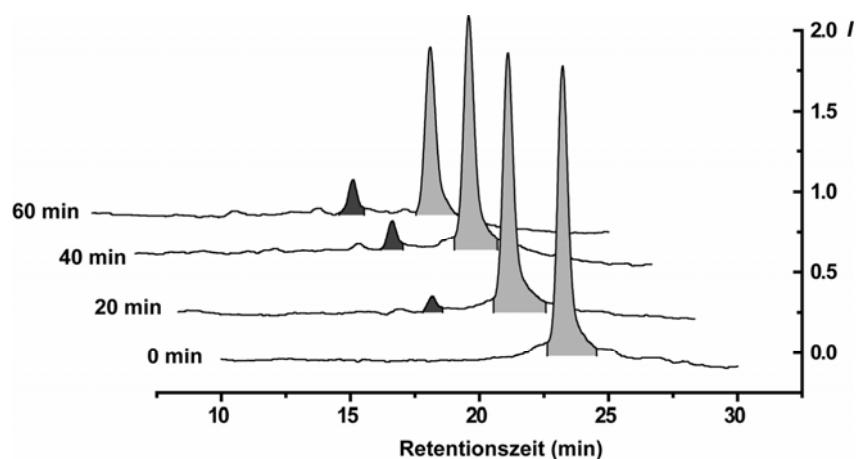


Abbildung 17: Zeitabhängige Spaltung von **DS12** ($10 \mu\text{M}$ **DS12**, $20 \mu\text{M}$ Gegenstrang, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, Anionenaustausch-HPLC, UV-Detektion 360 nm).

Trotz der gerade geschilderten Probleme gelang es, die Dimerspaltung in Strang **DS12** mit zehn AT-Basenpaaren zwischen Flavin und Dimer nachzuweisen (Abbildung 17). Die Spaltungsausbeute war mit 21 % in einer Stunde für die große Distanz (zehn Basenpaare entsprechen in etwa 37 \AA) sogar vergleichsweise hoch. Ein Überschusselektronentransfer in DNA über eine vergleichbare Distanz ist bisher noch nicht beobachtet worden.

In Abbildung 18 sind die Spaltungsausbeuten für DNA Doppelstränge mit acht Basenpaaren zwischen dem Flavin und dem CPD Dimer gezeigt. Die höchste Spaltungsausbeute konnte zwar für den Strang **DS6** ohne ein GC-Basenpaar beobachtet werden, allerdings ist diese Spaltungsausbeute nur unwesentlich höher als die von Strang **DS10** mit immerhin vier GC-Basenpaaren in Folge. Eine Korrelation zwischen Ausbeute an Dimerspaltung und GC-Gehalt ist eindeutig nicht möglich. Da auch die Stränge mit sechs Basenpaaren zwischen Flavin und CPD Dimer einen ähnlichen Trend zeigen, scheint der Elektronentransfer über GC-Basenpaare in diesen Experimenten ähnlich effektiv wie über AT-Basenpaare zu sein. Die möglichen Ursachen für diese Beobachtung werden im nächsten Kapitel zusammen mit den von *S. Breeger* erhaltenen Ergebnissen an Flavin-Dimer-Haarnadeln besprochen.

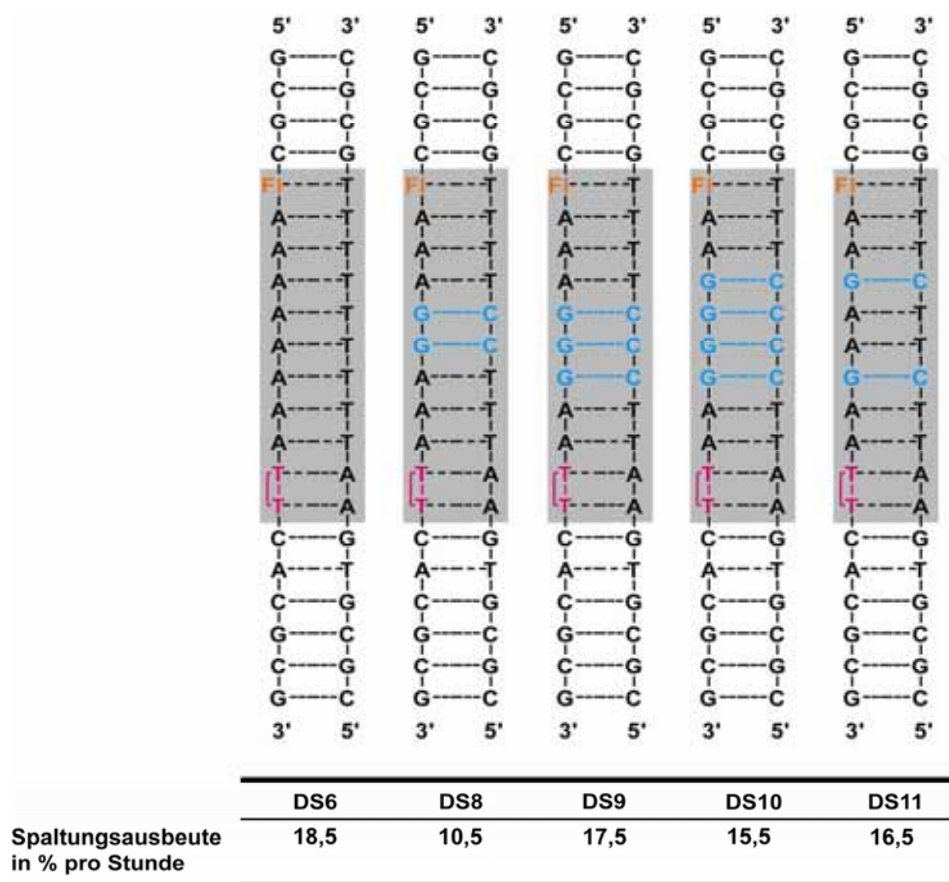


Abbildung 18: Spaltungsausbeute der Doppelstränge **DS6** und **DS8-DS11**.

Belichtung von Flavin-enhaltender DNA unter reduktiven Bedingungen

Um die bei der Belichtung der Stränge **DS1-DS12** auftretenden Effekte besser zu verstehen, wurde der Strang **DS13** hergestellt, der nur einen Flavinbaustein **26** aber keinen CPD Schaden enthält. Mit diesem Strang sollte versucht werden, die eventuell während der Belichtungen entstehenden DNA-Schäden nachzuweisen und zu identifizieren. Hierzu wurde der Doppelstrang **DS13** unter den gleichen Bedingungen wie die Stränge **DS1-DS12** belichtet (2 eq Gegenstrang, Natriumdithionit als Reduktionsmittel). Nach 60 Minuten Belichtung wurde der Strang mit RP-HPLC untersucht (Abbildung 17). Ganz klar ist hier bei kürzeren Retentionszeiten die Bildung von Zerfallsprodukten zu erkennen. Da zumindest ein Teil dieser Produkte noch die typische Fluoreszenz des Flavins aufweist, erfolgt die Schädigung auch im Flavinstrang. Ein zum Vergleich unter den gleichen, reduktiven Bedingungen belichteter DNA Strang ohne Flavin wurde kaum geschädigt.

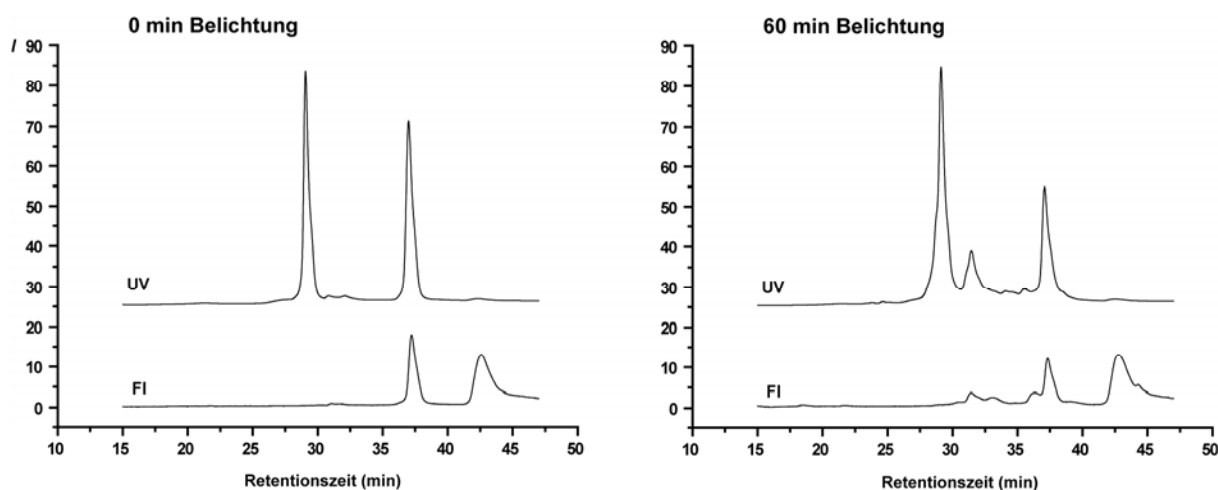


Abbildung 17: Belichtung von **DS13** ($10 \mu\text{M}$ **DS13**, $20 \mu\text{M}$ Gegenstrang, 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, RP-HPLC, UV-Detektion: 260 nm , Fluoreszenzdetektion: 520 nm (Anregung 360 nm)). Um einen genaueren Einblick in die Art der entstandenen Schäden zu erhalten, wurden die 60 Minuten belichteten Proben enzymatisch verdaut. Die Nukleosidmischung wurde anschließend mit HPLC-MS/MS auf DNA Schäden untersucht. Neben den vier unmodifizierten Standardnukleosiden konnte aber nur noch ein Trinukleotid aus Cytosin, dem Flavin **26** und Adenin nachgewiesen werden, das auf eine nicht erfolgte Spaltung des Phosphatrückgrates neben dem Flavin **26** zurückzuführen ist. DNA Schäden wie Dihydropyrimidine (ein reduktiver Schaden) oder Pyrimidindimere wie das CPD oder (6-4)-Dimer wurden dagegen nicht gefunden. Damit bleibt unklar, um was für Zerfallsprodukte es sich in den HPL-Chromatogrammen handelt, und auf welche Weise sie entstehen. In Frage kommen zum Beispiel Addukte von Schwefeloxiden an die basischen Stickstoffatome der Nukleoside, die während des Zerfalls des Dithionits entstehen könnten. Solche Addukte an basische Amine sind zum Beispiel für SO_2 bekannt.^[153] Eine andere Möglichkeit wäre die Entstehung von Strangbrüchen. In einer aktuellen Publikation beschreiben *Fukuzumi* und Mitarbeiter, dass NADH in Verbindung mit UV-A Strahlung zu Strangbrüchen in der DNA führen kann.^[154] Eine ähnliche Reaktivität kann auch für das reduzierte Flavin nicht ausgeschlossen werden, da es sich in beiden Fällen um potentielle Zweielektronendonoren handelt. Da auch in den oben beschriebenen Experimenten UV-A Strahlung verwendet wurde, kann die Möglichkeit von Strangbrüchen nicht ausgeschlossen werden, auch wenn keine Nukleosidschäden, die zu Strangbrüchen führen, nachgewiesen werden konnten.

3.3 Überschusselektronentransfer in DNA-Haarnadeln mit Donor 27 und Akzeptor 28

Da sich im Laufe der oben beschriebenen Experimente gezeigt hatte, dass DNA Doppelstränge basierend auf dem Flavin **26** zur Untersuchung des Elektronentransfers in DNA wenig geeignet sind, wurden von *S. Breeger* im Rahmen seiner Diplomarbeit Flavin-Dimer-Haarnadeln basierend auf Flavin **27** hergestellt.^[155] Durch die kovalente Verknüpfung von Strang und Gegenstrang ist immer ein eins zu eins Verhältnis zwischen „Strang“ und „Gegenstrang“ sichergestellt. Da außerdem durch diese Verknüpfung die intramolekulare Bildung eines Doppelstranges entropisch begünstigt ist, weisen DNA Haarnadeln einen verhältnismäßig hohen Schmelzpunkt auf. Damit sollte dieses System deutlich besser zur Untersuchung des Überschusselektronentransfers in DNA geeignet sein.

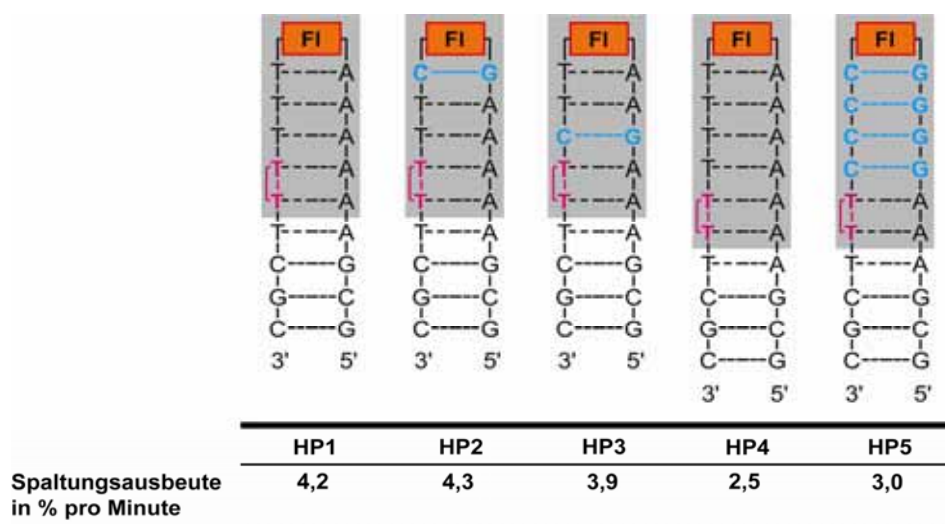


Abbildung 20: Spaltungsausbeute der DNA Haarnadeln **HP1-HP5**.

S. Breeger konnte zeigen, dass nach Reduktion des Flavins und Belichtung der Haarnadeln **HP1-HP5** eine saubere Spaltung des Dimers beobachtet werden kann.^[155] Während sich analog zu *C. Behrens* Experimenten eine leichte Abnahme der Spaltungsausbeute mit Vergrößerung der Distanz feststellen ließ, zeigte sich auch in diesen Experimenten kein Einfluss der Sequenz auf die Spaltungsausbeute. Auch hier scheint der Ladungstransport durch einen Hüpfprozess ungefähr gleich effektiv über GC- wie AT-Basenpaare zu verlaufen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die potenzielle Protonierung des Cytosinradikalanions reversibel ist und/oder den Elektronentransfer nicht behindert. Eine andere mögliche Erklärung könnte aber auch in der Unzulänglichkeit des Modellsystems liegen. Falls die Spaltung des Dimers im Modellsystem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, so

wäre die Beobachtung eines langsameren Elektronentransfers über GC- als über AT-Basenpaare nicht möglich. Damit könnte aus den obigen Experimenten nur auf die prinzipielle Möglichkeit eines Hüpfprozesses über ein GC-Basenpaar, aber nicht auf die zugehörige Effizienz oder Geschwindigkeit geschlossen werden. Leider sind keine genauen Daten über die Geschwindigkeit der Spaltung eines CPD Dimerradikalanions in DNA bekannt. *Falvey* und Mitarbeiter schätzten die Spaltungsgeschwindigkeit eines Thymin-Thymin-CPD Schadens außerhalb der DNA mit Fluoreszenzlöschungsmethoden auf 10^6 s^{-1} ab.^[156] Andererseits zeigen kurzpuls-spektroskopische Messungen, dass die Dimerspaltung im Enzym DNA Photolyase sehr schnell ($> 10^{10} \text{ s}^{-1}$) ist.^[105] Nimmt man für den Überschusselektronentransfer eine Rate im Bereich von 10^8 - 10^9 s^{-1} an (analog zum Lochtransfer in DNA), dann spricht vieles für eine Spaltungsgeschwindigkeit die zumindest im Bereich der Elektronentransfergeschwindigkeit liegt. Somit ist die Interpretation der mit einem CPD Schaden erhaltenen Ergebnisse zum Überschusselektronentransfer in DNA schwierig. Festzuhalten bleibt allerdings, dass GC-Basenpaare kein Stopp für den Elektronentransfer sind. Da ein Elektronentransfer auch in längeren, reinen GC-Sequenzen beobachtet werden kann und auch hier nur eine flache Abstandsabhängigkeit zeigt, muss das Cytosin als intermediärer Ladungsträger beteiligt sein.

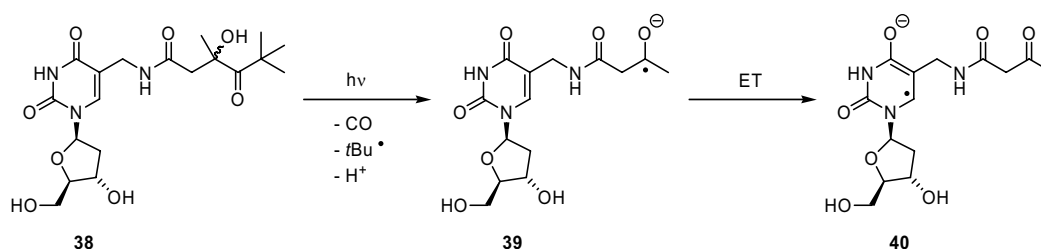
3.4 Experimente zum Überschusselektronentransfer in DNA Doppelsträngen der Gruppe Rokita

Etwa zur selben Zeit wie die Arbeiten von *S. Breeger* erschienen einige Publikation der Gruppe *Rokita* zum Überschusselektronentransfer in DNA.^[157-159] In diesen Arbeiten wurde ein Donor-Akzeptor System bestehend aus einem Diaminonaphthalen und einem Bromuracil verwendet. Das lichtangeregte Diaminonaphthalen ($E_{\text{red}} = -2.8 \text{ V}$) fungierte dabei als Donor, während das Bromuracil als Akzeptor nach Bildung des Bromuracilradikalanions ein Bromidion abspaltet. Das neu gebildete Bromuracilradikal abstrahiert ein Wasserstoffradikal von der Nachbarbase und führt so zur Bildung eines DNA Schadens, der nach Piperidinbehandlung als Strangbruch detektiert werden kann. Die Gruppe *Rokita* konnte auch mit diesem System eine geringe Abstandsabhängigkeit des Überschusselektronentransfers in DNA nachweisen und damit den vermutlichen Ladungstransfer über einen Hüpfprozess bestätigen.^[157] Andererseits zeigte ein Experiment mit einer GC-Sequenz einen deutlichen Einfluss der Sequenz auf den Ladungstransfer.^[159] Zwei GC- statt AT-Basenpaare führten zu einer Verringerung der Ausbeute an Strangbrüchen auf ein Viertel. Dieses Ergebnis steht im

Widerspruch zu den Ergebnissen von *Breeger*, sofern die Dimeröffnung nicht Ratenbestimmend ist.

3.5 Überschusselektronentransferexperimente mit einem Einelektronendonator **38** und dem CPD Schaden **28**

Um die Widersprüche zwischen den Experimenten von *S. Breeger* und der Gruppe *Rokita* aufzuklären und mehr über das Spaltverhalten des CPD Schadens zu erfahren, sollten Elektronentransferexperimente mit einem alternativen Elektronendonator durchgeführt werden. Hierzu bot sich ein von der Gruppe *Giese* entwickelter Elektronendonator **38** an, der im Gegensatz zum Flavin und zum Diaminonaphthalen genau ein Elektron irreversibel an die DNA abgibt.^[160] Damit kann eine Verzerrung der Ergebnisse durch die mehrfache Injektion von Elektronen oder schnelle Rekombinationsprozesse des Donors mit dem Elektron ausgeschlossen werden.



Schema 12: Der Einelektronendonator **38** und sein photochemischer Zerfall.

Die Experimente mit Strängen, die den Donor **38** und ein oder zwei CPD Schäden **28** als Akzeptor enthielten, wurden in Kooperation mit *C. Behrens* (Gruppe *Carell*) und *T.* und *B. Carl* (Gruppe *Giese*) durchgeführt.^[161] Das in der Gruppe *Giese* hergestellte Phosphoramidit des Bausteins **38** wurde dazu mit einem Standardprotokoll zusammen mit dem CPD Schaden **28** in Oligonukleotide eingebaut. In diesen Synthesen wurden dann gute Ausbeuten erzielt, wenn das Phosphoramidit des Bausteins **38** in Dichlormethan statt des üblichen Acetonitril gelöst und ebenso wie der CPD Schaden **28** für 15 Minuten gekuppelt wurde. Die synthetisierten Stränge wurden anschließend nach Basel zur Gruppe *Giese* gesandt, wo die Aufreinigung und Charakterisierung durchgeführt wurde.

Neben den Strängen **DS14-DS17**, in denen der Donor **38** durch eine unterschiedliche Zahl von AT-Basenpaaren vom CPD Schaden **28** getrennt war, wurde auch ein Strang **DS18** mit zwei Dimeren hergestellt, zwischen denen ein A-T-Basenpaar eingefügt war. Die Belichtung

und Bestimmung der Spaltungsausbeute des Dimers ergab für die Stränge **DS14-DS17** ähnliche Ergebnisse wie schon in den Experimenten von *C. Behrens* (Abbildung 21).^[161] Es konnte eine nur relativ schwache Abhängigkeit der Dimerspaltungsausbeute von der Distanz beobachtet werden, was im guten Einklang mit den *C. Behrens* Ergebnissen steht und mit einem Ladungstransfer durch einen Hüpfprozess erklärt werden kann.

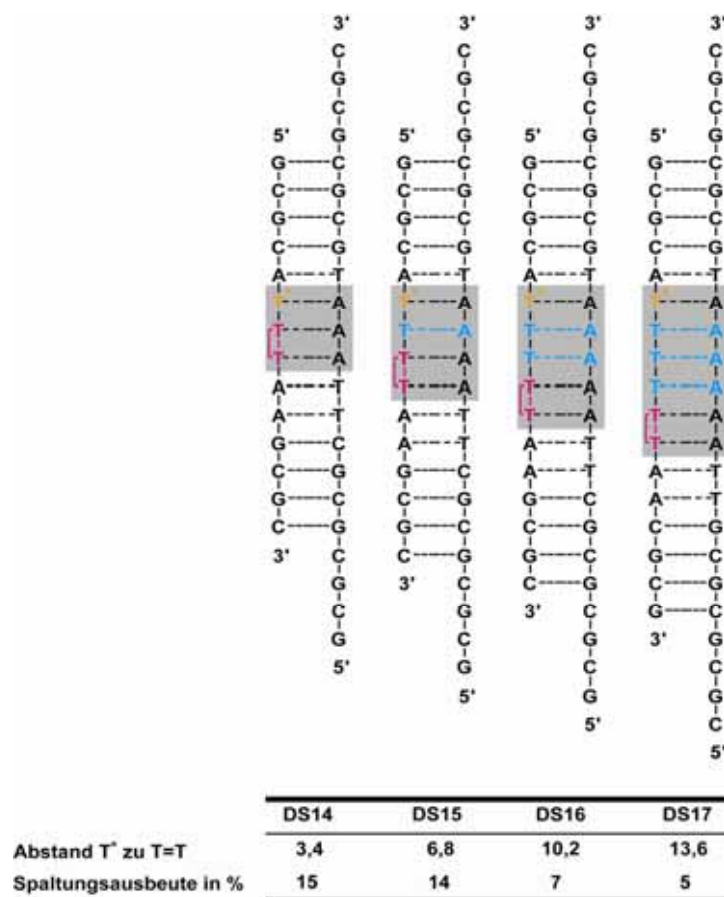


Abbildung 21: Die DNA Doppelstränge **DS14-DS17** und ihre Spaltungsausbeuten bei Belichtungsexperimenten.

Sehr interessant waren aber die Ergebnisse für den zwei Dimere enthaltenden Strang **DS18** (Abbildung 22). Neben der zu erwartenden Spaltung des nah zum Donor gelegenen CPD Schadens konnte auch die Spaltung beider Schäden und die ausschließliche Spaltung des entfernteren Schadens nachgewiesen werden. Die Spaltung beider Schäden bestätigt die Theorie, dass nach der Spaltung eines Schadens das Elektron im DNA Strang verbleibt und somit potentiell weitere Schäden spalten kann. Die sogar bevorzugte Spaltung des entfernteren Schadens ist, unter Annahme eines Hüpfprozesses für den Überschusselektronentransfer, eigentlich nur zu erklären, wenn das nah am Donor gelegene Schaden intermediär als Ladungsträger fungiert, ohne dass eine Spaltung dieses Schadens eintritt.

Somit müsste die Geschwindigkeit des Ladungstransfers höher oder zumindest ähnlich groß sein, wie die Geschwindigkeit der Spaltung des CPD Schadens. Eine genauere Auswertung des Experimentes ist leider nur schwer möglich, da die gefundenen Mengen an Spaltprodukten niedrig waren und sich anscheinend auch prozentual nicht zu 100 % ergänzen. Während die beiden Spaltprodukte der 5'-Seite zusammen 7,5 % Gesamtspaltausbeute ergeben, addieren sich die Spaltprodukte auf der 3'-Seite zu 13,2 %.

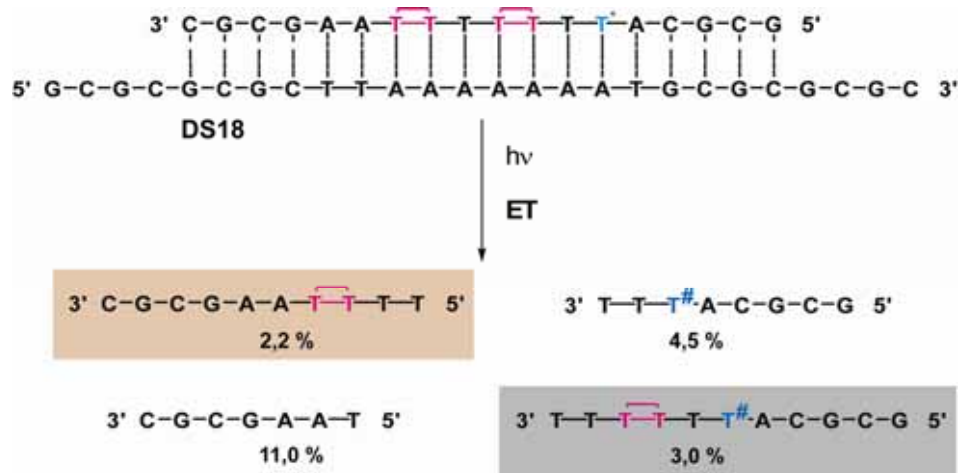


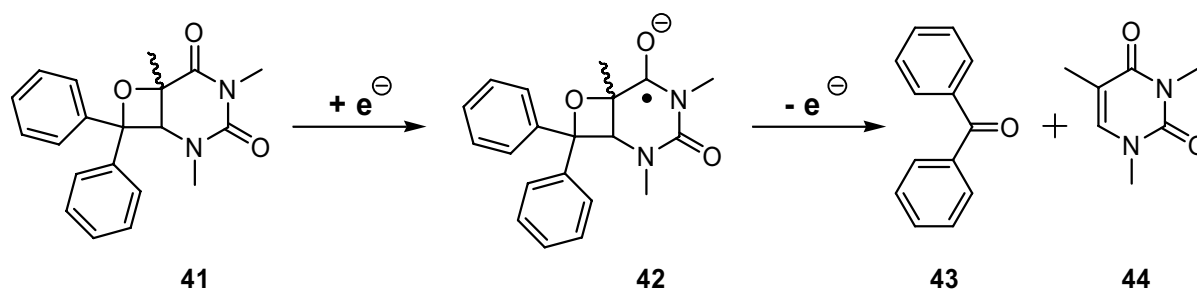
Abbildung 22: Belichtung des Doppelstranges **DS 18**: Zerfall in vier Spaltprodukte.

Trotz der beschriebenen Probleme lassen sich aus dem Experiment mit zwei Dimeren wichtige Schlussfolgerungen ziehen. Anscheinend führt nicht jede Reduktion des Dimers zum Dimerradikalanion automatisch zur Spaltung des Dimers. Vermutlich ist stattdessen der weitere Ladungstransfer schneller. Unter diesen Voraussetzungen ist das Dimer kaum für die Unterscheidung des Elektronentransportes durch GC- oder AT-Basenpaare geeignet, da die langsame Spaltung eventuelle, kinetische Unterschiede während des Elektronentransfers verwischt.

3.6 Überschusselektronentransferexperimente mit Oxetanen als Akzeptor

Da sich die Spaltung des TT-CPD Schadens als zu langsam für die effektive, schnelle Detektion eines Überschusselektrons in DNA erwiesen hatte, sollte ein neuer, schnellerer Akzeptor für Elektronentransferexperimente getestet werden. Eine interessante Möglichkeit wäre die Verwendung von Bromuridin analog zu den Arbeiten der Gruppe *Rokita*.^[157] Allerdings hatten erste Experimente von *C. Behrens* gezeigt, dass die Kombination von Bromuridin und einem Flavin in DNA Schwierigkeiten bei der Detektion von Strangbrüchen verursacht.^[147] Eine viel versprechende Alternative als Elektronenakzeptoren sollten

Pyrimidinoxetane sein. Diese Oxetane werden als Intermediate bei der Bildung und Reparatur von (6-4)-Photoschäden angesehen und sind daher bereits auf ihre Spaltbarkeit durch ein Überschusselektron untersucht worden (Schema 13).^[106, 119] Insbesondere zeigen Arbeiten der Gruppe *Falvey*, dass Pyrimidinbenzophenonoxetane durch ein Überschusselektron deutlich schneller gespalten werden als TT-CPD Schäden. Außerdem konnte *M. Cichon* zeigen, dass ein reduziertes und deprotoniertes Flavin, wie es in den Elektronentransferexperimenten mit den Doppelsträngen **DS1-DS13** und den Haarnadeln **HP1-HP5** verwendet wurde, ein gut geeigneter Elektronendonator für die Oxetanspaltung ist.^[120] Daher konnte angenommen werden, dass Pyrimidinbenzophenonoxetane zusammen mit dem Flavin **27** ein einfach herzustellendes Donor-Akzeptor-Paar bilden und sich besser für die Untersuchung der Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfer in DNA eignen, als der TT-CPD Schaden.



Schema 13: Spaltung eines Thyminbenzophenonoxetans durch ein Überschusselektron.

Da die Verwendung eines Thyminoxetans als Elektronenakzeptor die Entwicklung einer neuen Synthese zu einem entsprechenden Baustein für die DNA Synthese erfordert, wurde in Kooperation mit *S. Breeger* beschlossen, gleich zwei ähnliche Bausteine, **45** und **46**, herzustellen (Abbildung 23).

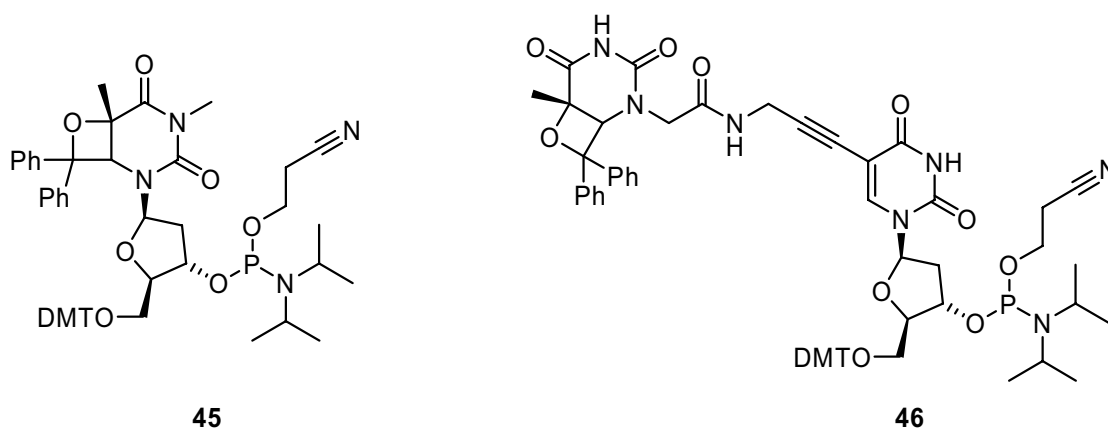
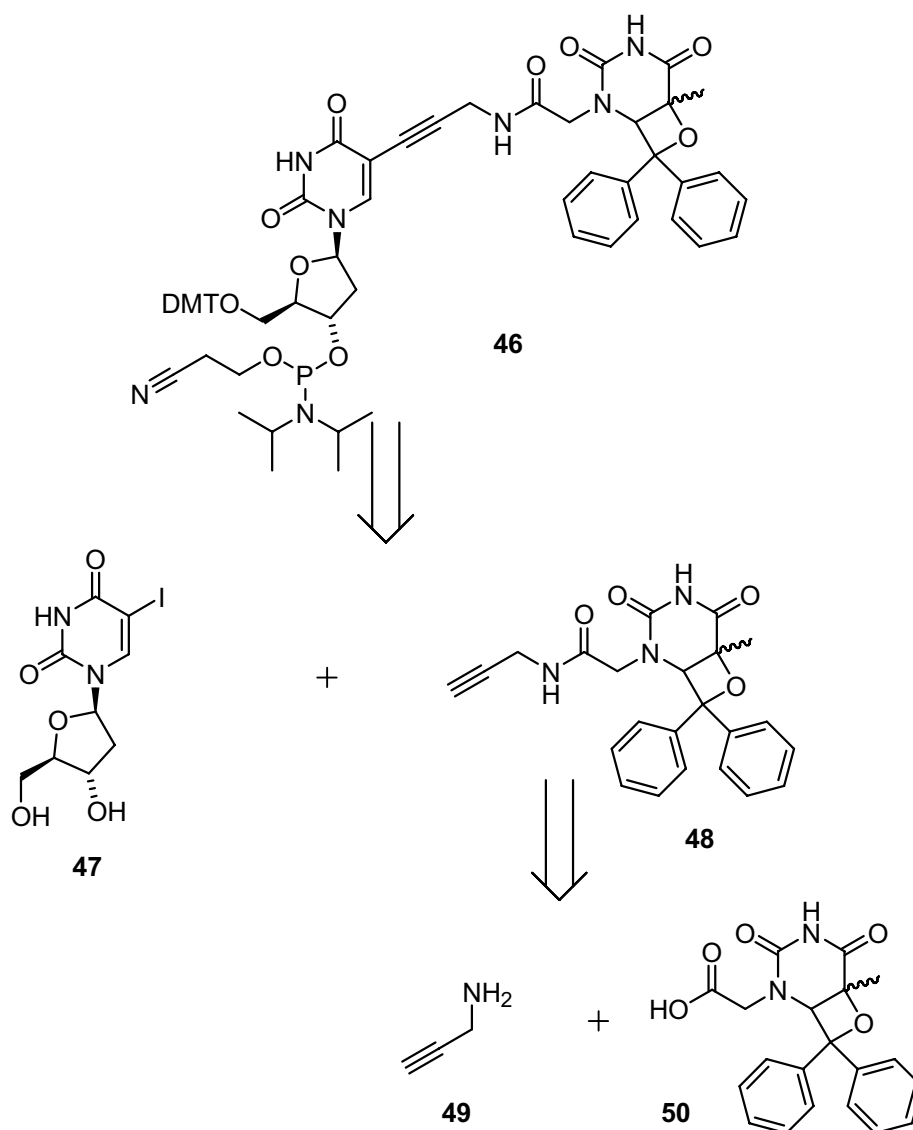


Abbildung 23: Die Oxetanbausteine **45** und **46**.

Durch die Positionierung von Baustein **45** in und Baustein **46** außerhalb der Doppelhelix sollte zusätzlich zur Sequenzabhängigkeit auch gleichzeitig der genaue Elektronentransferweg präziser bestimmt werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob, wie von einzelnen Physikern vorgeschlagen, eventuell auch Elektronentransferprozesse in den Furchen oder in der Hydrathülle der DNA ablaufen können. Während die Synthese von **45** von *S. Breeger* entwickelt und durchgeführt wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit Baustein **46** hergestellt werden.

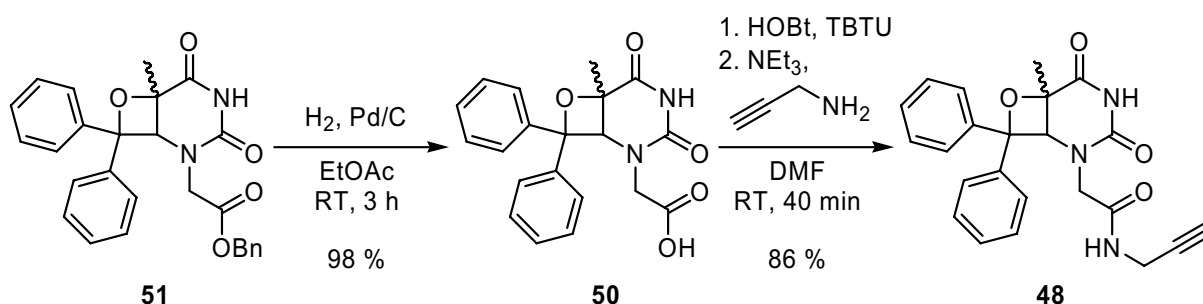


Schema 14: Retrosynthese von Baustein **46**.

Als Thyminoxetan Baustein wurde **50** ausgewählt, der schon von *M. Cichon* verwendet wurde (Schema 14).^[120] Dieser Baustein ist einfach und effektiv herzustellen, seine Spaltung durch reduktiven Elektronentransfer ist nachgewiesen und die Spaltungsgeschwindigkeit wurde von

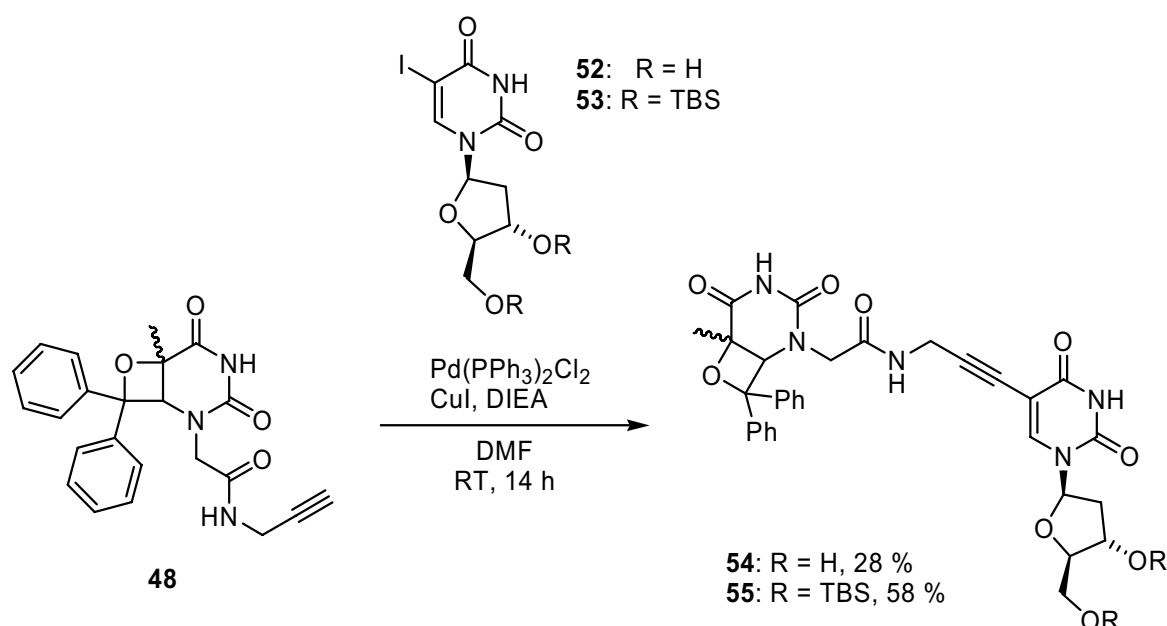
Falvey et al. an einem sehr ähnlichen Oxetan gemessen.^[106] Außerdem sollte die Abspaltung von Benzophenon die Retentionszeit eines DNA Stranges auf einer RP-C18-Säule ausreichend verändern, so dass die Detektion der Spaltung einfach möglich ist. Als Anknüpfungspunkt für Baustein **48** wurde die 5-Position eines Uracils gewählt. In dieser Position wurden schon verschiedenste Bausteine mit der DNA verknüpft, so dass geeignete synthetische Methoden zur Modifizierung vorhanden waren.^[162-164] Außerdem zeigt diese Position in die große Furche der DNA. Große Reste wie der Oxetanbaustein **48** stören so die DNA Doppelhelix nicht, sondern führen sogar häufig zur Stabilisierung von Doppelsträngen.^[163] Zur Verknüpfung der Bausteine sollte die Sonogashira-Kupplung verwendet werden, da sich diese Reaktion an Ioduridin schon hervorragend bewährt hat.^[162-164] Außerdem wird so ein starrer Alkinlinker erhalten, der den Oxetanbaustein präzise in der Furche positioniert und ihm wenig Bewegungsfreiheit lässt. Eventuelle Probleme, die durch unterschiedliche Konformationen oder Positionen eines sehr flexiblen Bausteins entstehen könnten, sollten so vermieden werden können.

3.6.1 Synthese des Bausteins **46**



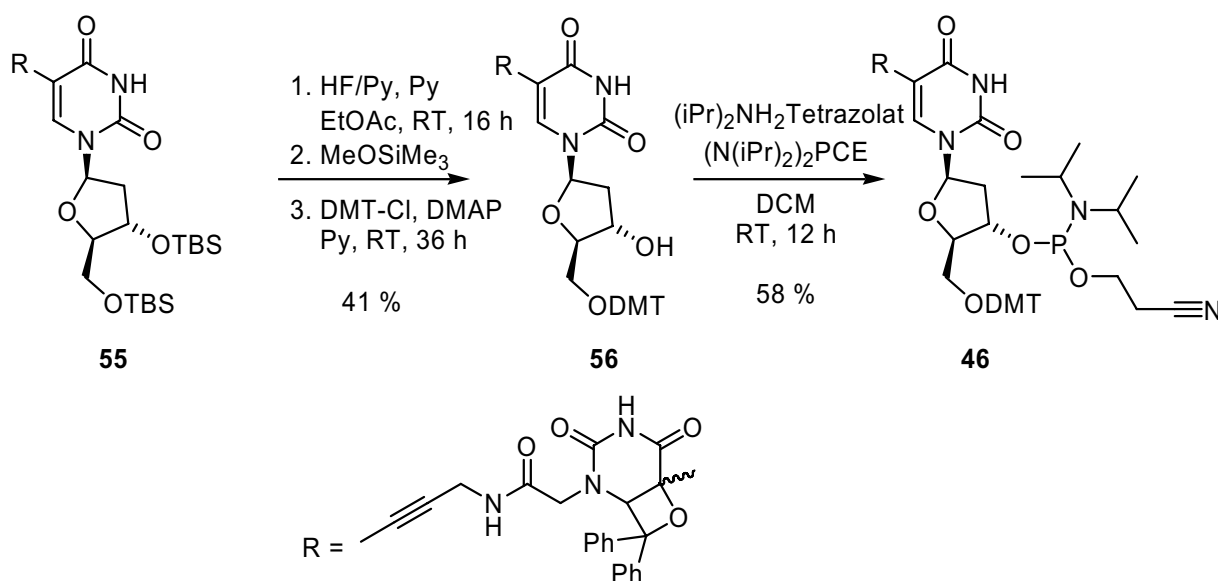
Schema 15: Umsetzung von Oxetan **51** zu Oxetan **48**.

Die Synthese des Bausteins **46** erfolgte ausgehend von Oxetan **51**, das photochemisch nach einer Literaturvorschrift in guter Ausbeute aus Thyminessigsäurebenzylester und Benzophenon hergestellt wurde (Schema 15).^[120] Die Entschützung des Benzylesters durch Hydrierung nach *M. Cichon* erwies sich als nicht immer gut reproduzierbar und ergab keine sehr hohen Ausbeuten.^[120] Der Wechsel des Lösungsmittels von Essigsäure zu Essigsäureethylester führte stattdessen zu einer einfachen, reproduzierbaren und vollständigen Umsetzung. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels wurde Oxetan **50** in fast quantitativer Ausbeute erhalten. Die freie Säure des Thymin-Oxetans wurde nun unter Standardbedingungen mit HOBt und TBTU aktiviert und mit Propargylamin zum Amid umgesetzt. Das Alkin **48** konnte so mit nicht optimierten 86 % Ausbeute erhalten werden.



Schema 16: Sonogashira Kupplungen mit Alkin **48**.

Der nun folgende Schlüsselschritt, die Sonogashira-Kupplung von Alkin **50** mit Ioduridin **52**, erwies sich als nicht einfach (Schema 16). Im Gegensatz zu publizierten Verfahren konnten unter Verwendung von ungeschütztem Ioduridin **52** nur schlechte Ausbeuten erzielt werden.^[162] Da *G. Burley* und *J. Gierlich* ähnliche Erfahrungen mit Sonogashira-Kupplungen an ungeschütztem Ioduridin **52** gemacht hatten, wurde stattdessen TBS-geschütztes Ioduridin **53** verwendet.^[163] Erfreulicherweise erfolgte die Kupplung an diesem Baustein unter Standardbedingungen mit 58 % Ausbeute. Damit konnte der Elektronenakzeptorbaustein **55** effizient und im Grammmaßstab hergestellt werden.



Schema 17: Umwandlung von **55** in den Phosphoramiditbaustein **46**.

Die nun noch notwendigen Schutzgruppenoperationen wurden nach Standardvorschriften durchgeführt. Die Entschützung der TBS-Gruppen mit HF/Pyridin ergab den ungeschützten Baustein, der ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet wurde. Die selektive Schützung der primären 5'-OH-Gruppe mit Dimethoxytritylchlorid führte zu Baustein **56** in nicht optimierten 41 % Ausbeute über zwei Stufen. Das Cyanoethyl geschützte Phosphoramidit wurde anschließend mit Bis-(diisopropylamino-)cyanoethylphosphordiamidit eingeführt. Gegenüber dem Standardreagenz CED-Cl hat dieses Reagenz den Vorteil, ausschließlich und selektiv mit der 3'-OH-Gruppe und nicht mit der O4-Carbonylgruppe zu reagieren. So konnte der für die DNA-Synthese geeignete Phosphoramiditbaustein **46** in 58 % Ausbeute erhalten werden (Gesamtausbeute: 11,6 % über 6 Stufen).

3.6.2 Einbau von Oxetan **46** in DNA-Flavin-Haarnadeln und Charakterisierung der erhaltenen DNA-Stränge

Zur Untersuchung der Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers mit dem Oxetan **46** als Elektronenakzeptor sollte das Hairpinflavin **27** als Elektronendonator verwendet werden, da sich dieses Flavin in den Untersuchungen von *S. Breeger* als besonders gut geeignet für Elektronentransferexperimente erwiesen hatte. Daher sollten als erstes die Haarnadeln **HP6a-HP7a** (Haarnadeln mit dem Oxetanbaustein **46** werden mit dem Zusatz a für a-Serie gekennzeichnet, Haarnadeln mit dem Baustein **45** mit b für b-Serie) mit Flavin-Donor **27** und Oxetan-Akzeptor **46** hergestellt werden. Die Sequenz dieser Stränge wurde an die von *S. Breeger* verwendeten Sequenzen angelehnt, um die Ergebnisse mit dem Oxetanakzeptor möglichst mit den Ergebnissen mit dem CPD Schaden als Akzeptor vergleichen zu können.

Die Festphasensynthese der Haarnadeln **HP6a-HP7a** erfolgte nach dem schon bewährten, gemischten Phosphoramidit-*H*-Phosphonat Protokoll, wobei das Oxetanphosphoramidit bis auf die erhöhte Kupplungszeit (15 min) unter Standardbedingungen gekuppelt wurde.^[147, 149]

Der nachfolgenden Detritylierung zufolge (UV-spektrometrisch verfolgt an Hand der Absorption des Dimethoxytritylkations) wurde eine ähnlich gute Kupplungsausbeute wie mit den Standardbasen erreicht. Als problematisch erwies sich allerdings die Abspaltung der Stränge vom Träger und die Entschützung der Schutzgruppen. Unter den üblicherweise im Arbeitskreis *Carell* verwendeten, ultramilden Bedingungen (25 % NH₄OH/EtOH 3/1, 12 h, RT) wurde überraschenderweise die Amidbindung zwischen Oxetan und Uridin größtenteils gespalten. Ähnliche Amidbindungen hatten sich zuvor als relativ stabil erwiesen. Durch Verkürzung der Entschützungszeit auf fünf Stunden und Verwendung von 25 %igen Ammoniak in reinem Wasser konnte diese Spaltung aber in ausreichendem Maße unterdrückt

werden. Ebenfalls problematisch war die Aufreinigung der Stränge. Die nicht ganz vollständige Entschützung und die durch die Haarnadelstruktur der Stränge hervorgerufenen breiten Peaks in den HPL-Chromatogrammen erforderten eine doppelte Reinigung der Stränge. Wie schon im Fall der Stränge mit Flavin **26** und CPD Schaden **28** erfolgte eine erste Reinigung mittels RP-C18-HPLC und eine zweite Reinigung über eine Anionentauschersäule. Nach Entsalzen über C18SepPak-Kartuschen wurden die Stränge durch HPLC, MALDI-ToF-MS, UV- und CD-Spektroskopie charakterisiert (Tabelle 2).

Strang	Sequenz (5'-3')	Masse (berechnet)	Masse (gefunden)	Smp. (°C)
HP6a	CGCTOxTTTTFIAAAAAGCG	5729,1	5729,8	72,3 ¹
HP7a	CGCTOxCCCCFIGGGAAGCG	5732,0	5732,8	86,0 ¹

Tabelle 2: Synthetisierte DNA Haarnadeln mit Flavin **27** und Oxetan **46** (Ox: Oxetan, Fl: Flavin, alle Massen m/z sind als $[M-H]$ angegeben, ¹ 3 μ M DNA in 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl).

Die Schmelzpunkte der Stränge und damit die Stabilität der Doppelhelix erwiesen sich als außergewöhnlich hoch. Dies ist zum einen auf die besondere Stabilität von Haarnadeln im allgemeinen zurückzuführen. Aber selbst im Vergleich zu den sehr ähnlichen, den CPD-Schaden-enthaltenden Haarnadeln von *S. Breeger* war eine sehr deutliche Erhöhung des Schmelzpunktes um etwa 27° C (Vergleich **HP1**: 45 °C, **HP6a**: 72 °C) zu beobachten.

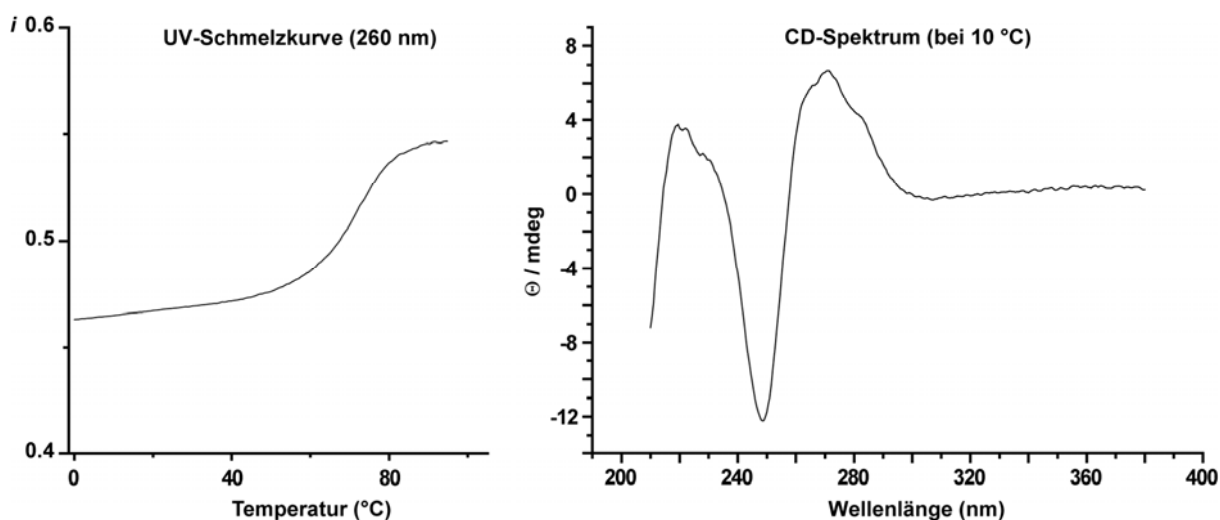


Abbildung 24: UV-Schmelzkurve (links) und CD-Spektrum von Haarnadel **HP6a** (3 μ M DNA, 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl).

Wahrscheinlich ist dieser Effekt auf eine stabilisierende Wirkung des Oxetansubstituenten in der großen Furche der Doppelstränge zurückzuführen, während der CPD Schaden den Strang

destabilisiert. Große Substituenten in dieser Position tragen generell zur Stabilisierung von B-DNA bei.^[163] Ein von *M. von Meltzer* gemessenes CD-Spektrum des Haarnadels **HP6a** zeigt deutlich die für B-DNA typischen Banden bei 270 nm (positiv), 250 nm (negativ) und 225 nm (positiv).

3.6.3 Elektronentransferexperimente mit Flavin-Oxetan-Haarnadeln

Die hervorragende Stabilität macht die Flavin-Oxetan-Haarnadeln mit Oxetan **46** zu einem bestens geeigneten Modellsystem für die Untersuchung des Überschusselektronentransfers in DNA Doppelsträngen. Auch das von *S. Breeger* hergestellte Oxetan **45** konnte in DNA eingebaut werden. Stränge mit diesem Oxetan sind zwar weniger stabil als Stränge mit Oxetan **46**, aber immer noch stabiler als die entsprechenden Haarnadeln mit dem TT-CPD Schaden und damit ausreichend stabil für Elektronentransferexperimente. Zu diesem Zweck wurden in Kooperation mit *S. Breeger* und *M. von Meltzer* eine Reihe von DNA Haarnadeln mit den Oxetanen **45** und **46** als Akzeptor und dem Flavin **27** als Donor hergestellt und aufgereinigt (Tabelle 3, a-Serie mit Oxetan **46**, b- Serie mit Oxetan **45**).

Strang	Sequenz (5'- 3')	Masse (berechnet)	Masse (gefunden)	Smp. (°C)
HP6b	CGCTOx(45)TTTTFIAAAAAGCG	5537,9	5537,4	53,3
HP7b	CGCTOx(45)CCCFIGGGAAGCG	5540,9	5542,7	65,1
HP8b	CGCTOx(45)TTTTFIAAAAAGCG	6155,3	6155,4	56,1
HP9b	CGCTOx(45)CCCCFIGGGGAAGCG	6159,3	6159,9	69,6
HP6a	CGCTOx(46)TTTTFIAAAAAGCG	5729,1	5729,8	72,3
HP7a	CGCTOx(46)CCCFIGGGAAGCG	5732,0	5732,8	86,0
HP8a	CGCTOx(46)TTTTFIAAAAAGCG	6346,5	6348,4	75,2
HP9a	CGCTOx(46)CCCCFIGGGGAAGCG	6350,4	6351,9	89,2

Tabelle 3: Synthetisierte DNA Haarnadeln mit Flavin **27** und den Oxetanen **45** und **46** (Ox: Oxetan, Fl: Flavin, alle Massen m/z sind als [M-H]⁻ angegeben, ¹ Bedingungen: 3 µM DNA in 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl).

Die Sequenz zwischen Flavin und Oxetan wurde dabei jeweils von ausschließlich AT- oder GC-Basenpaaren gebildet, um so einen möglichst deutlichen Unterschied zwischen Elektronentransfer über GC- und AT-Basenpaare messen zu können. Außerdem wurden für beide Oxetane die jeweils gleichen Sequenzen gewählt, um einen möglichen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Positionen des Akzeptors feststellen zu können. Die Belichtungsexperimente wurden in Fluoreszenzküvetten in der schon bewährten

Belichtungsapparatur durchgeführt. Hierzu wurden die Lösungen der Haarnadeln in Puffer (20 μ M DNA, 10 mM TrisHCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) gelöst, mit alkalischer Natriumdithionitlösung reduziert und belichtet. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen, reoxidiert und mit RP-HPLC analysiert. Für alle Haarnadeln konnte eine saubere, Belichtungszeit abhängige Spaltung des Oxetans nachgewiesen werden. Das Spaltprodukt, die DNA Haarnadeln ohne Benzophenon, wurde mit MALDI-Tof-MS eindeutig identifiziert (Abbildung 25).

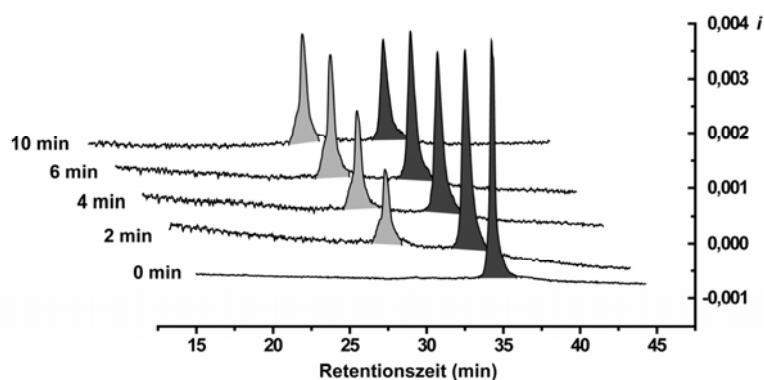


Abbildung 25: Zeitabhängige Spaltung von **HP6a** (20 μ M **HP6a**, 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, Anionenaustausch-HPLC, UV-Detektion 360 nm).

Um eventuelle Probleme mit dem Reduktionsmittel Dithionit ausschließen zu können, wurden viele Belichtungen mit EDTA als Photoreduktionsmittel wiederholt. Da EDTA Flavine nur photochemisch reduzieren kann, wurde hierzu die EDTA-haltige Haarnadellösung vor der eigentlichen Belichtung eine Minute mit einem Diaprojektor bestrahlt. Anschließend konnte durch Fluoreszenzspektroskopie kein oxidiertes Flavin mehr nachgewiesen werden. Mit den so reduzierten Lösungen wurden im Rahmen der Messgenauigkeit die gleichen Spaltungsausbeuten erhalten wie mit Dithionit als Reduktionsmittel, so dass eine mögliche Verzerrung der Ergebnisse durch das Reduktionsmittel ausgeschlossen werden kann.

Um die Ergebnisse genauer zu analysieren, wurden aus den HPL-Chromatogrammen die Spaltungsausbeuten bestimmt und gegen die Belichtungszeit aufgetragen. Den so erhaltenen Messpunkten wurde mit dem Programm Microcal Origin eine Exponentialfunktion angenähert und aus dieser die Spaltungsausbeute pro Minute zu Beginn der Belichtung bestimmt. Da die Spaltung des Benzophenons nur nach Bildung des Oxetanradikalanions erfolgt und somit einen erfolgreichen Elektronentransfer voraussetzt, kann die Spaltungsausbeute pro Zeiteinheit als Messwert für die Effizienz des Elektronentransfers angesehen werden (Abbildung 26).

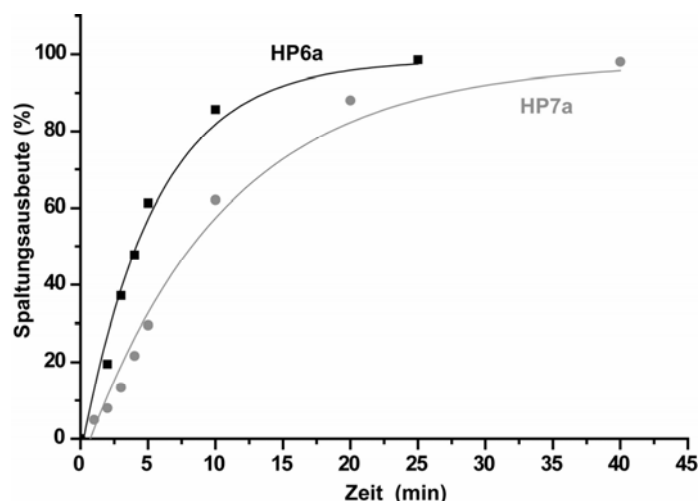


Abbildung 26: Spaltungsausbeuten in Abhängigkeit von der Zeit für die Haarnadeln **HP6a** und **HP7a**. Ein erster Blick auf die Daten bestätigt die schon vorher gemachte Beobachtung, dass das Benzophenonoxetan in allen Haarnadeln effizient gespalten wird (Abbildung 27). Die schnell spaltenden Haarnadeln erreichen Spaltungsausbeuten, die größer sind als 10 % pro Minute! Außerdem ist wie schon in vielen vorher verwendeten Modellsystemen nur eine geringe Abstandsabhängigkeit des Elektronentransfers erkennbar.

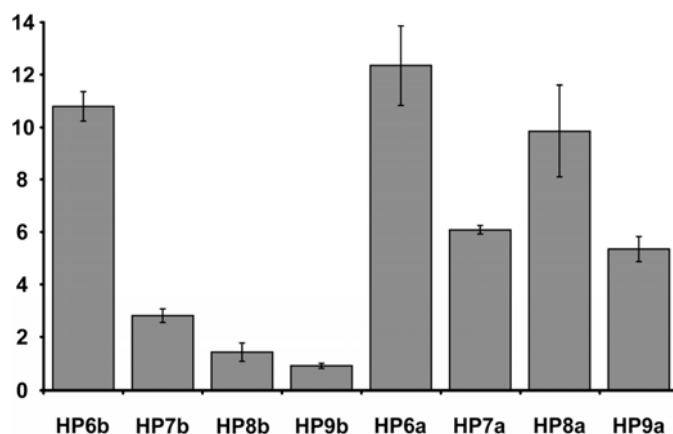


Abbildung 27: Spaltungsausbeute der Haarnadeln **HP6a-HP9a** und **HP6b-HP9b**.

Auffällig ist auch, dass die Spaltungsausbeuten in den Haarnadeln der a-Serie (mit Oxetan **46**) generell deutlich höher sind als in den entsprechenden Strängen der b-Serie mit (Oxetan **45**). Dies könnte auf die vergleichsweise starke Störung des Basenstapels durch das sterisch anspruchsvolle Oxetan **45**, das innerhalb des Stranges liegt, zurückzuführen sein. Hierzu würde auch die im Vergleich zu den anderen Haarnadeln der b-Serie extrem hohe Spaltungsausbeute des Haarnadeln **HP6b** passen. Dieser Hairpin mit nur drei AT-Basenpaaren ist der am wenigsten stabile. Das destabilisierende Oxetan **45** ermöglicht daher

in diesem Fall wahrscheinlich die Ausbildung einer DNA Konformation, in der der Elektronentransfer vom Flavin zum Oxetan über weniger oder vielleicht gar keine DNA Base als „Trittbrett“ erfolgt.

Mit den Spaltungseffizienzen der Haarnadeln kann aber die Frage nach den Auswirkungen eines GC-Basenpaares auf den Überschusselektronentransfer in DNA gut beantwortet werden. In allen Fällen ist die Effizienz des Elektronentransfers über GC-Basenpaare deutlich geringer als in den entsprechenden Haarnadeln mit AT-Basenpaaren. Dieser Effekt ist in den Haarnadeln der α -Serie besonders deutlich. Hier führt der Austausch der AT- gegen GC-Basenpaare zu einer Abnahme der Spaltungsausbeute um etwa 50 %. Dieser Effekt ist ungefähr mit dem von *Rokita* gefundenen Wert im Diaminonaphthalen/Bromuridin-Modell vergleichbar.^[159]

Sehr interessant ist auch, dass das Oxetan **46**, das sich weit außerhalb des Basenstapels befindet, sehr effizient gespalten wird. Trotzdem lässt sich deutlich der Einfluss der Sequenz zwischen Donor (Flavin) und Akzeptor (Oxetan) nachweisen. Dies spricht für einen Elektronentransfer über einen Hüpfprozess durch den Basenstapel zwischen dem Flavin und dem Alkynyluridin, an das das Oxetan geknüpft ist. Anschließend erfolgt ein sehr effizienter Transfer des Überschusselektrons auf das Oxetan. Um sicherzugehen, dass der Transfer des Elektrons zum Oxetan **46** durch den Basenstapel und nicht in Form eines mehr oder minder freien Elektrons durch die Lösung erfolgt, wurden die Elektronentransferexperimente mit den Haarnadeln **HP6a/b**, **HP7a/b** und **HP9a** in einer N_2O Atmosphäre wiederholt. N_2O reagiert mit freien Elektronen in Lösung und sollte so den Elektronentransfer in Lösung unterbinden. Zu diesem Zweck wurde vor jeder Belichtung die Lösung in der Fluoreszenzküvette entweder mit Argon oder N_2O gesättigt und anschließend belichtet. In allen Fällen, ob nun mit EDTA oder mit Dithionit als Reduktionsmittel verwendet wurde und egal ob die Lösungen mit Argon oder N_2O gesättigt wurden, wurden im Rahmen der Messgenauigkeit dieselben Spaltungsausbeuten erhalten. Da N_2O als „Fänger“ von freien Elektronen keinen Einfluss auf die Spaltung der Oxetane hat, ist die Beteiligung von freien Elektronen an den beobachteten Elektronentransferprozessen auszuschließen. Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis, dass der Elektronentransfer als Hüpfprozess durch den Basenstapel erfolgt.

3.7 Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Mit den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten sollte der Einfluss von GC-Basenpaaren auf den Überschusselektronentransfer in DNA untersucht werden. In den ersten

Experimenten wurde hierzu ein von *C. Behrens* und *A. Schwögler* entwickeltes System aus einem Flavin und einem CPD Schaden verwendet.^[145, 147, 149] Dieses System bewährte sich nur begrenzt und gemeinsam mit der Gruppe *Giese* konnte nachgewiesen werden, dass der TT-CPD Schaden als Elektronenakzeptor zu langsam ist.^[161] Daher wurden in Kooperation mit *S. Breeger* mit den Oxetanen **45** und **46** neue Akzeptoren hergestellt, die sich in den folgenden Experimenten bewährten. Mit diesen Akzeptoren konnte gezeigt werden, dass der Überschusselektronentransfer über GC-Basenpaaren gut möglich, aber etwas weniger effizient als über AT-Basenpaare ist.^[165] Diese Ergebnisse sind gut mit denen von *Rokita* vergleichbar, der seine Aussage allerdings nur auf einen Datenpunkt stützen konnte.^[159]

Etwa zur selben Zeit wie diese Untersuchungen wurden weitere Experimente zum Überschusselektronentransfer in DNA von *A. Manetto* und *S. Breeger* in der *Carell* Gruppe und von der Gruppe *Wagenknecht* durchgeführt.^[166-168] Beide Gruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. *A. Manetto* und *S. Breeger* konnten mit einem Modellsystem aus Flavin **27** und halogenierten Nukleosiden zeigen, wie wichtig die richtige Wahl des Elektronenakzeptors ist.^[166] Während mit Bromuridin eine deutliche, den hier erzielten Ergebnissen ähnliche Sequenzabhängigkeit beobachtet werden konnte, war dieses mit Bromadenosin und Bromguanosin kaum der Fall. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich das ungünstige Redoxpotential der beiden Purinnukleoside. Dadurch wird der Transfer eines Überschusselektrons von den intermediären Ladungsträgern Thymidin und Cytidin zum Akzeptor endotherm, somit langsam und zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Auch die Gruppe *Wagenknecht* benutzte Bromuridin als Elektronenakzeptor. Als Donor wurde hingegen ein Phenothiazinderivat verwendet.^[167, 168] Auch mit diesem System wurde ein Unterschied zwischen Elektronentransfer über AT- und GC-Basenpaare beobachtet. In diesem Fall war der Unterschied in der Effizienz von AT- und GC-Basenpaaren als intermediäre Ladungsträger sogar noch deutlicher. *Wagenknechts* darauf basierendes Postulat, dass in unmodifizierter DNA daher Cytosin nur eine untergeordnete Rolle als Ladungsträger spielt, wird allerdings nicht durch Experimente anderer Gruppen gestützt.^[167, 168] Insbesondere würde solch ein Postulat auch die Untersuchung längerer und gemischter Sequenzen erfordern, was bisher mit dem Phenothiazin/Bromuridin Modellsystem nicht erfolgt ist.

Basierend auf den bisher publizierten Arbeiten zum Überschusselektronentransfer in DNA soll daher folgendes Modell postuliert werden: Der Überschusselektronentransfer in DNA erfolgt durch einen thermisch aktivierten Hüpfprozess. Als Ladungsträger fungieren die beiden Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin. Der Ladungstransfer über Thymin ist effizienter als über Cytosine. Die wahrscheinliche Ursache für die geringere Effizienz des

Ladungstransfers über Cytosin ist die reversible Protonierung des Cytosinradikalanions durch das gegenüberliegende Guanosin im Basenpaar. Im Vergleich zum oxidativen Ladungstransfer ist trotzdem eine nur verhältnismäßig geringe Sequenzabhängigkeit feststellbar. Außerdem konnte für den reduktiven Ladungstransfer bisher keine Schädigung der DNA festgestellt werden. Die in Flavin modifizierter DNA in einigen Fällen zu beobachtenden Schäden, sind auf das Flavin selbst zurückzuführen.

Trotz aller oben angeführten Untersuchungen sind insgesamt bisher nur wenige Studien zum Überschusselektronentransfer in DNA veröffentlicht worden, und es bleiben viele Unklarheiten. Wünschenswert wäre insbesondere eine genaue Bestimmung der Redoxpotentiale oder Elektronenaffinitäten der einzelnen Nucleoside in Wasser oder noch besser innerhalb der DNA. Viele Aussagen werden noch immer mit entsprechenden Werten, die in organischen Lösungsmitteln gemessen wurden, gestützt. Dabei zeigen gerade die Untersuchungen von *A. Manetto* und *S. Breeger* oder auch die Bedeutung der GGG-Triplets im Fall des oxidativen Transfers, wie wichtig das Redoxpotential der Nucleoside ist. So könnte neben der langsamen Spaltung auch das Redoxpotential des TT-CPD Schadens für sein Verhalten in den Elektronentransferexperimenten verantwortlich sein. Dann wäre nicht die Spaltung des Dimers sondern der Elektronentransfer zum Dimer der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Diese Vermutung könnte an Bedeutung gewinnen, da neueste, noch nicht veröffentlichte Messungen von *C. Chatgililoglu* eine Spaltungsgeschwindigkeit im Bereich von 10^8 s^{-1} für das Dimer ergeben haben. Damit ist die Spaltung des CPD Schadens in etwa so schnell wie die Elektronenhüpfprozesse. Ob damit die Spaltung des Schadens der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, ist nicht ganz klar. Wichtig wäre auch die Untersuchung der verwendeten Modellsysteme mit Kurzpulsspektroskopie, da nur so echte Raten für den Elektronentransfer erhalten werden können. Bisher sind hierzu nur sehr wenige Untersuchungen publiziert worden, die sich im wesentlichen mit der Elektroneninjektion, aber nicht dem weiteren Transfer beschäftigen.^[169-172] Vermutlich ist aber die direkte spektroskopische Verfolgung des Elektronentransfers nur möglich, wenn hierfür spezielle besser spektroskopierbare Nucleoside hergestellt werden. Eine große Hilfe könnte in Zukunft die theoretische Untersuchung der hier beschriebenen Prozesse sein. Mit den in der Zwischenzeit zur Verfügung stehenden Rechnerkapazitäten könnte auch ein komplexes System wie DNA möglicherweise mit hinreichender Genauigkeit berechnet werden.

4. Die CPD Photolyase – Substrat- und Kofaktorbindung

4.1 Einleitung

Die CPD Photolyase ist ein sehr weit verbreitetes Protein, das die direkte Reparatur der CPD Photoschäden katalysiert.^[101] Obwohl die CPD Photolyasen wohl zu den am meisten untersuchten Proteinen gehören und die Kristallstrukturen von CPD Photolyasen aus drei unterschiedlichen Organismen gelöst worden sind, konnten zwei wichtige Fragen bisher noch nicht beantwortet werden. Ein ungelöstes Problem ist, wie die Photolyase ihr Substrat, die CPD Photoschäden, erkennt und bindet. Dieser Prozess war bis zu dieser Arbeit nur mit biochemischen Methoden untersucht worden. Außerdem konnte die Gruppe *Miki* die Kristallstruktur des Enzyms aus *Thermus thermophilus* mit einem Thymidin im vermeintlichen, aktiven Zentrum lösen, doch genaue strukturelle Information zur Bindung des Schadens selber sind unbekannt.^[109] Auf Grund von biochemischen Daten und dem Auffinden eines großen Lochs in der Kristallstruktur aller CPD Photolyasen wurde davon ausgegangen, dass die Photolyase den Dimerschaden aus der DNA Doppelhelix herausdreht und in ihr aktives Zentrum klappt (*base-flipping*), aber exakte Daten zu diesem Prozess fehlten. Auch war unklar, wie die Photolyase in der Lage ist, selektiv alle CPD Photoschäden und nur diese zu erkennen, obwohl je nach den beteiligten Pyrimidinen der Schaden jeweils andere Wasserstoffbrückenmuster ausbilden kann. Das zweite ungelöste Problem war die Art und Weise des Elektronentransfers vom reduzierten Flavinkofaktor auf den Schaden und, insbesondere, der Weg des Elektrons. Die ungewöhnliche, U-förmige Konformation des FAD Kofaktors hatte zu Spekulationen geführt, dass das Elektron gar nicht direkt auf den Schaden übertragen wird, sondern zuerst auf das Adenin des Kofaktors. Experimentelle Belege für diese Theorie aber fehlten. Ein grundsätzliches Problem der meisten spektroskopischen und theoretischen Studien zu diesem Thema war wiederum die unbekannte Distanz und Orientierung des an das Enzyms gebundenen Schadens, da Distanz und Orientierung großen Einfluss auf den Elektronentransfer zwischen zwei Partnern haben. In vielen Studien wurden daher Annahmen zur Distanz zwischen Flavin und Dimer gemacht, die zum Teil sehr stark voneinander abwichen und so zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Untersuchungen von *A. Mees* aufgegriffen werden, die in Kooperation mit *A. Eker* und der Gruppe *Essen* die Kokristallisation des Substrates, einem

DNA Doppelstrang mit TT-CPD Schadens, mit dem Enzym, der CPD Photolyase aus *Anacystis nidulans*, zum Ziel hatten.

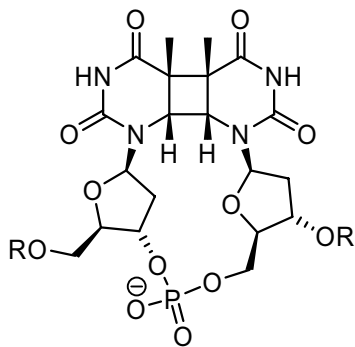
In einem zweiten Teil des Projektes sollte in Zusammenarbeit mit der Gruppe *Essen* die Kofaktorbindung in der *Thermus thermophiles* CPD Photolyase untersucht werden. Ein Ziel war es insbesondere, herauszufinden, ob es prinzipiell möglich ist, sowohl den katalytischen (das FAD) als auch den zweiten, als Photoantenne dienenden Kofaktor (in diesem Fall noch unbekannt), gegen synthetische Kofaktoren auszutauschen. Durch den Einbau von synthetischen Kofaktoren könnte die Möglichkeit eröffnet werden, Photolyasen mit erweiterten oder sogar neuartigen, katalytischen Fähigkeiten zu generieren. Dies könnte eventuell für die Züchtung neuer Nutzpflanzen von Interesse sein, da die Photolyase einen wesentlichen Einfluss auf die UV-Resistenz von Nutzpflanzen hat.^[112-114]

4.2 Die Substrat-Enzyme Kokristallstruktur

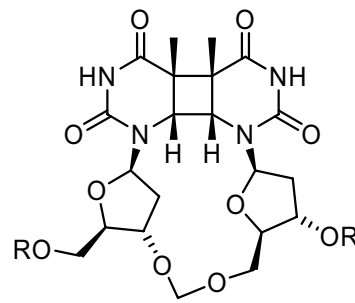
4.2.1 Vorarbeiten

Um eine Substrat-Enzym Kokristallstruktur zu erhalten, benötigt man einerseits das Enzym, in diesem Fall die CPD Photolyase, und andererseits das Substrat, in diesem Fall einen DNA Strang mit einem CPD Photoschaden an einer definierten Stelle. Eine geeignete CPD Photolyase konnte von *A. Eker* zur Verfügung gestellt werden. Die von ihm verwendete *A. nidulans* CPD Photolyase wurde aus mehreren Gründen gewählt: Diese Photolyase kann in großen Mengen in *E. coli* überexprimiert und zur Homogenität gereinigt werden. Der FAD Kofaktor ist im gereinigten Enzym in stöchiometrischen Mengen enthalten. Außerdem handelt es sich um eine der am besten untersuchten CPD Photolyasen und die Kristallstruktur des Enzyms ohne Substrat wurde 1997 gelöst.^[110, 111] Nur der zweite, lichtsammelnde Kofaktor fehlte in dieser Struktur. Die *A. nidulans* CPD Photolyase bindet normalerweise 8-Hydroxydeazaflavin (F₀) **13** als zweiten Kofaktor. Doch da dessen Biosynthese in *E. coli* nicht erfolgt, fehlt dieser Kofaktor im rekombinanten Protein. Dieser Kofaktor wurde daher von *A. Mees* synthetisiert, zu *A. Eker* geschickt und von diesem nachträglich in das Enzym eingebaut.

Als Substrat wurde statt des natürlichen CPD Schadens ein in der Gruppe *Carell* schon früher hergestelltes Analogon des TT-CPD Photoschadens verwendet, in dem die Phosphatgruppe zwischen den beiden Nukleosiden durch ein bioisosteres Formacetal ersetzt worden ist (Abbildung 28).^[173-175] Diese Substitution hat keinen Einfluss auf die Bindung und Reparatur des Schadens, vereinfacht aber die Synthese erheblich und ermöglicht dessen Herstellung in großen Mengen.



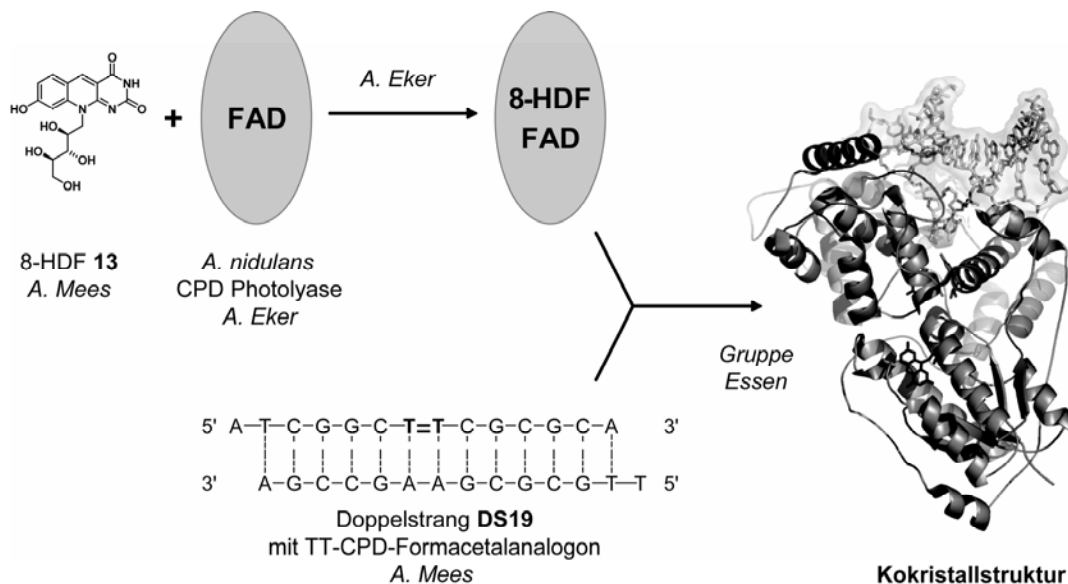
Natürliches *cis-syn*-TT-CPD **8**



Formacetal-verbrücktes *cis-syn* TT-CPD **57**
(bioisoster)

Abbildung 28: Der *cis-syn*-TT CPD Schaden **8** und der bioisostere CPD Schaden **57**.

Für die Kokristallisationsstudien wurde der Schaden von *A. Mees* in die Mitte von 14 Basen langen DNA-Strängen mit GC-reicher Sequenz eingebaut. Der hohe GC-Anteil sollte die Bildung von stabilen Doppelsträngen garantieren, auch wenn der Schaden durch das Enzym aus dem Doppelstrang herausgedreht wird. Die den CPD Schaden **57** enthaltenden Stränge wurden mit einem Äquivalent eines gleich langen Gegenstranges hybridisiert, wobei der Gegenstrang so gewählt wurde, dass an beiden Seiten ein Ein-Basen Überhang entstand.



Schema 18: Kokristallisation der CPD-Photolyase mit Substrat DNA **DS19**.

Die Kokristallisationsexperimente mit dem Holoenzym und den den CPD Schaden enthaltenden DNA Doppelsträngen wurden von der Gruppe *Essen* durchgeführt (Schema 18). Um jegliche enzymatische Reparatur des Schadens zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte ab dem Zusammengeben von Substrat und Enzym unter Rotlicht durchgeführt. Nach zwei bis

drei Monaten wurden die ersten Kokristalle unter den optimierten Kristallisationsbedingungen (1,1 eq DNA, 12,5 -17,5 % PEG4000, 100 mM MgCl₂, 50 mM TrisHCl, pH 7,5-8,0, 4° C) erhalten. Die Kristalle wurden an einer Synchrotron-Strahlungsquelle vermessen und die Struktur konnte gelöst und bis zu einer Auflösung von 1,8 Å verfeinert werden ($R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$: 0.206/0.226). Dabei stellte sich überraschenderweise heraus, dass die Elektronendichte für den vermeintlichen CPD Schaden besser zu zwei einzelnen Thymidinbasen passte als zu dem Schaden selbst (Abbildung 29).^[176] Allerdings war unklar, ob sich die Reparatur des Schadens schon vor oder während des Kristallwachstums ereignet hatte oder auf die Messung am Synchrotron zurückzuführen war. Findet die Öffnung des Cyclobutanrings erst während der Messung am Synchrotron statt, so zeigt die Struktur wahrscheinlich noch die Interaktion zwischen dem ursprünglichen Schaden und dem Enzym. Falls allerdings die Spaltung des Cyclobutans, also die Reparaturreaktion, schon während der Kristallisation erfolgte, zum Beispiel durch vorhandenes Restlicht, dann zeigt die Struktur nur die Wechselwirkung der Photolyase mit ungeschädigter DNA.

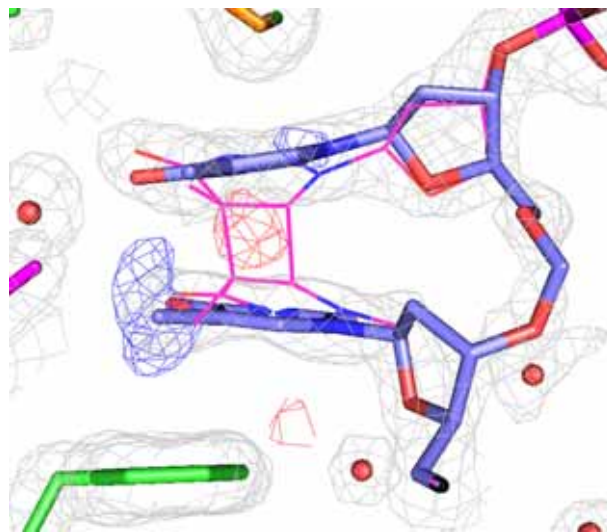


Abbildung 29: Der CPD Schaden in der Kokristallstruktur (Als zwei Thymidine: blau, als CPD: rosa, in rot die negative Elektronendichte bei Verwendung eines Modells mit Cyclobutanring).

4.2.2 Analyse der CPD Schaden enthaltenden DNA aus Photolyasekristallen

Um zu klären, ob die erhaltenen Cokristalle DNA mit repariertem oder unrepariertem CPD Schaden enthalten, ist eine sehr empfindliche Analysemethode notwendig. Einerseits muss diese Methode empfindlich genug sein, um die kleinen Mengen DNA aus einem einzelnen Kristall nachzuweisen. Andererseits ist auch eine sehr hohe Trennleistung notwendig, um einen 14mer DNA Strang mit einem TT-CPD Schaden von einem Strang mit zwei

gewöhnlichen Thymidinen zu unterscheiden. Diese Voraussetzungen erfüllt eigentlich nur die Kapillargelelektrophorese (CGE). HPLC-Methoden sind zu unempfindlich, während die normale Gelelektrophorese nicht über die notwendige Auflösung verfügt, um DNA mit Schaden von DNA ohne Schaden zu trennen.

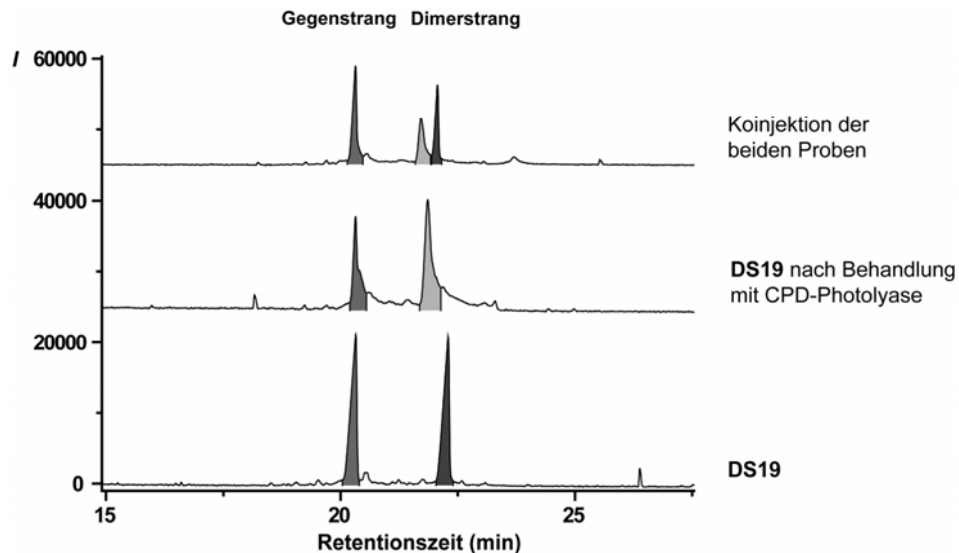


Abbildung 30: Trennung von **DS19** mit intaktem CPD Cyclobutanring von **DS19** ohne CPD Cyclobutanring (d. h. mit zwei Thymidinen, Injektionsspannung: 10 kV für 4 s, Trennungsspannung: 9 kV für 45 min, sonstige Bedingungen: siehe experimentellen Teil).

Zur Etablierung einer Kapillargelelektrophorese basierten Nachweismethode wurde im ersten Schritt versucht, DNA Doppelstränge mit CPD Schaden von solchen ohne (d.h. mit repariertem) CPD Schaden zu trennen (Abbildung 30). Da für die Kristallisation mit der Photolyase ein Formacetal-CPD Schadensanalogon verwendet wurde, musste die entsprechende DNA mit zwei durch ein Formacetal verknüpften Thymidinen erst hergestellt werden. Dies geschah durch die Spaltung des Dimers in der Kristallisations DNA durch Behandlung mit CPD Photolyase oder UV-Belichtung bei 254 nm. Anschließend wurden die beiden doppelsträngigen Referenz DNAs durch Dialyse auf einer schwimmenden Dialysemembran entsalzt und unter denaturierenden Bedingungen mit Kapillargelelektrophorese untersucht. Die Trennung des DNA Stranges mit Schaden vom Strang ohne Schaden erwies sich in diesen Experimenten als ausreichend. Der Retentionszeitunterschied betrug etwa 0,4 Minuten, so dass eine fast vollständige Trennung der entsprechenden Signale erreicht wurde. Anschließend wurden die erhaltenen Kokristalle untersucht (Abbildung 31). Dazu wurden die Kristalle in Wasser aufgelöst, die Lösung wurde wieder durch Dialyse entsalzt und anschließend mit Kapillargelelektrophorese analysiert. Generell konnte in allen untersuchten Kristallen nur eine Art von DNA nachgewiesen werden, egal ob die Kristalle

direkt aus den Kristallisationsansätzen „gefischt“ wurden oder ob Kristalle, die schon eine Sekunde im Synchrotron bestrahlt worden waren, verwendet wurden. Leider konnte allerdings aus den längere Zeit vermessen Kristallen (600 Sekunden) keine DNA mehr extrahiert werden, vermutlich weil die Schädigung der DNA durch die harte Synchrotronstrahlung zu stark war.

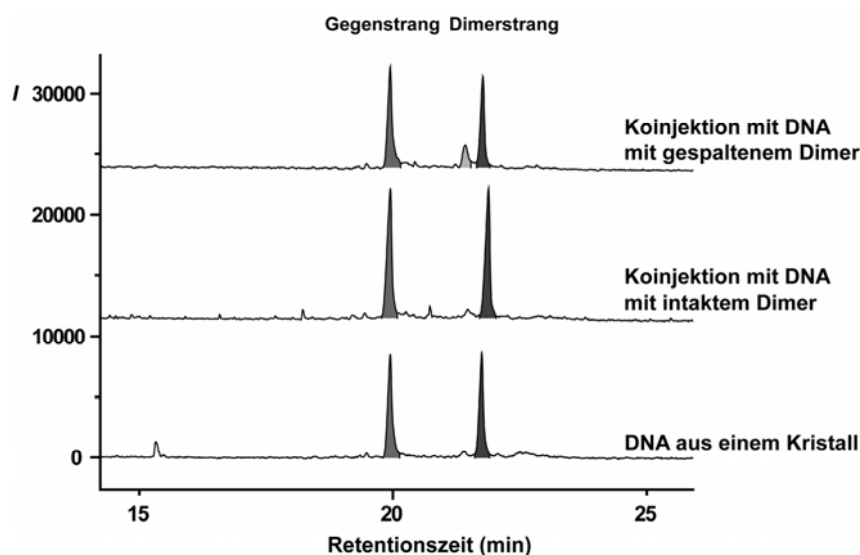


Abbildung 31: Analyse von DNA aus Photolyasekristallen.

Der Abstand in den Retentionszeiten zwischen Dimerstrang und Gegenstrang entsprach dem Abstand zwischen dem Strang mit ungeöffnetem Dimer und Gegenstrang. Um die genaue Zuordnung der DNA aus den Kristallen zu ermöglichen, wurden Koinjektionsexperimente durchgeführt. Wenn die DNA aus den Kristallen mit intakter Schadens DNA gemischt und vermessen wurde, wurde nur zwei Signale erhalten. Umgekehrt führte die Koinjektion mit DNA mit geöffnetem Dimer zu drei Signalen. Damit konnte deutlich nachgewiesen werden, dass die erhaltenen Kokristalle einen intakten CPD Schaden enthalten und die Öffnung/Reparatur des Schadens erst während der Messung am Synchrotron erfolgt.

Unklar ist allerdings, ob die Spaltung des Dimers durch die Synchrotronstrahlung oder durch echte Katalyse erfolgt. Die intensive Röntgenstrahlung des Synchrotrons führt zur Bildung von freien Elektronen in den Kristallen, die als Überschusselektronen zur Bildung des Dimerradikalanions und somit zur Spaltung führen könnten. Dieser Effekt ist allerdings in den schon früher vermessenen und veröffentlichten Proteinkristallstrukturen mit Dimer DNA noch nicht beobachtet worden. Es ist es allerdings gut möglich, dass dieser Effekt bei der teilweise deutlich schlechteren Auflösung dieser Strukturen nicht sichtbar ist oder eventuell auch einfach übersehen wurde. Prinzipiell ist auch die katalytische Öffnung des Dimers durch das

Protein nicht auszuschließen. Für die *A. nidulans* CPD Photolyase ist die Reduktion des Flavinkofaktors zum vollreduzierten, aktiven Zustand während der Vermessung durch Synchrotronstrahlung nachgewiesen worden.^[110] Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Spaltung des Dimers durch das Enzym in Verbindung mit der Synchrotronstrahlung erfolgt.

4.2.3 Die CPD Photolyase Struktur mit gebundenem Substrat

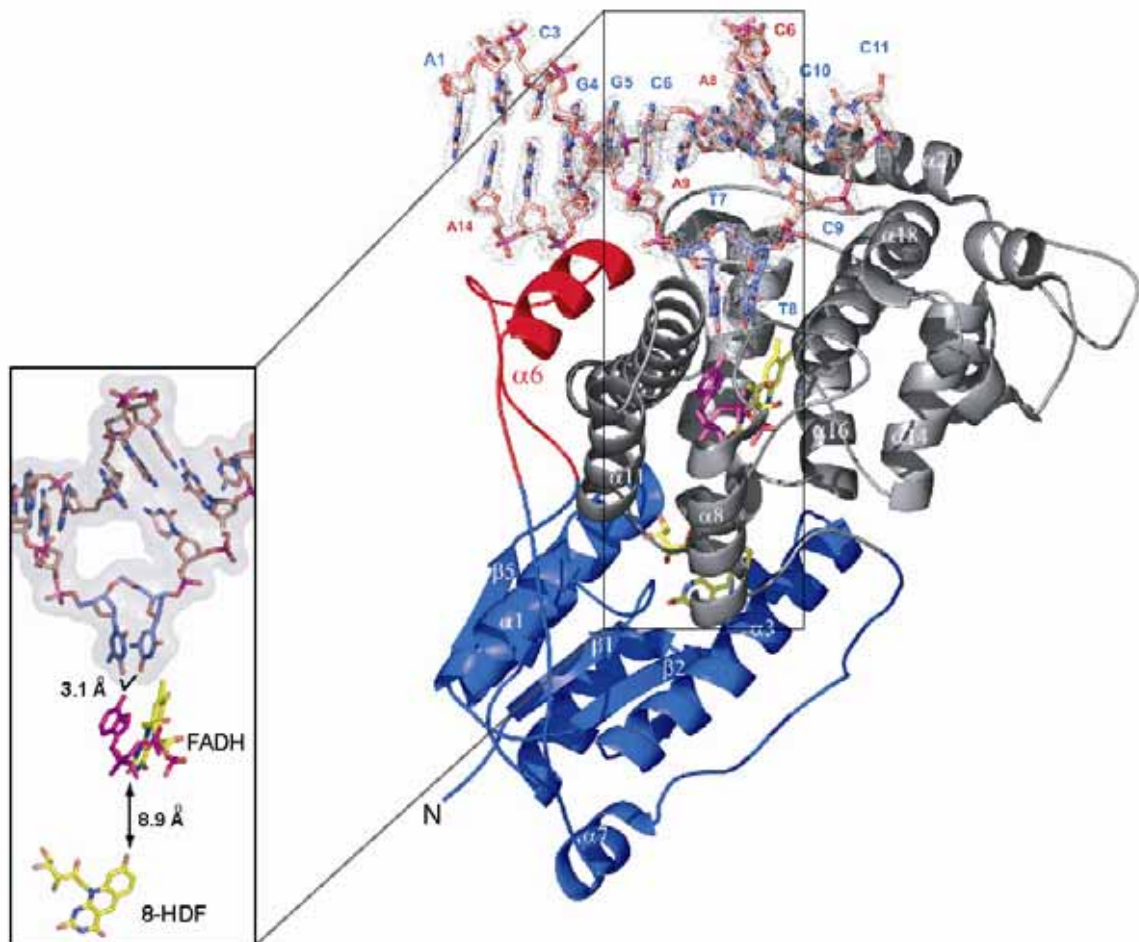


Abbildung 32: Die *A. nidulans* CPD Photolyase Kristallstruktur mit gebundener DNA **DS19**.

Da durch die Messung mit Kapillargelelektrophorese deutlich nachgewiesen werden konnte, dass die Öffnung des Cyclobutanrings des Schadens erst während der Messung am Synchrotron erfolgt, sollte die erhaltene Kokristallstruktur die Bindung des Enzyms an den Schaden widerspiegeln. Unter den während der Messung herrschenden Tieftemperaturbedingungen (ca. 100 K) erfolgt zwar wohl die Spaltung des Cyclobutanrings, aber weitergehende Strukturänderungen des Enzym-Substrat-Komplexes wurden nicht beobachtet.

Die asymmetrische Einheit des Kristalls enthält vier Photolyase/DNA-Komplexe in zwei unterschiedlichen Bindungszuständen. Zwei Komplexe (A und B) sind an Duplex DNA gebunden und enthalten den CPD Schaden im aktiven Zentrum, während die anderen beiden Komplexe (C und D) nur kurze Stücke von einzelsträngiger DNA und keinen Schaden im aktiven Zentrum aufweisen. Die folgenden Ausführungen zur Interaktion des Enzyms mit dem CPD Schaden beziehen sich auf den Komplex A (Abbildung 32).

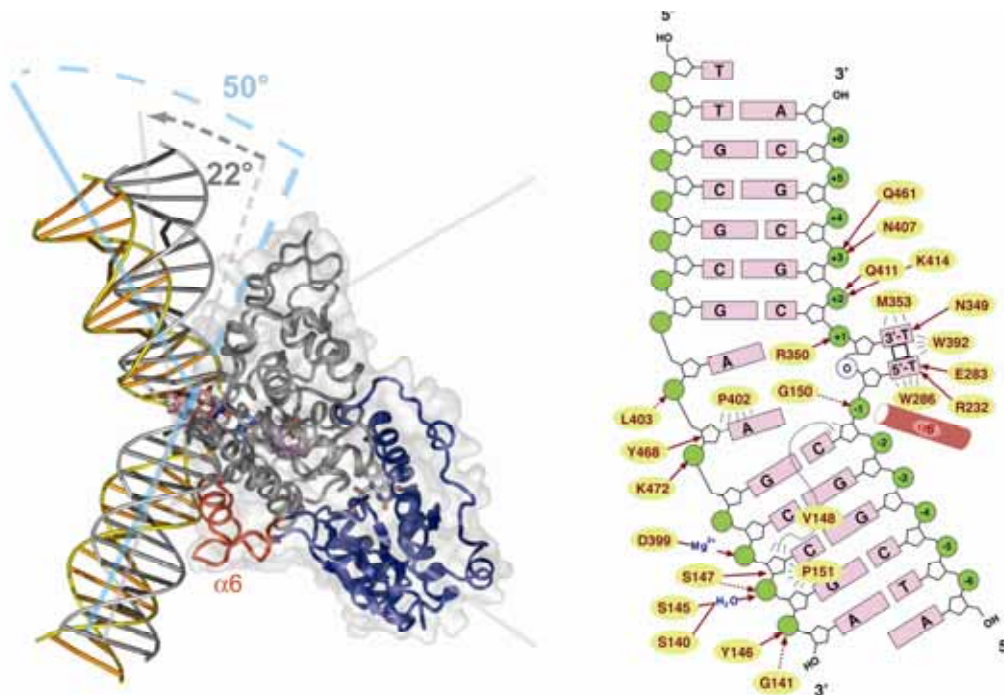


Abbildung 33: Schematische Darstellung der DNA Bindung durch die CPD Photolyase.

Die Struktur des Proteins im Komplex ist der Struktur der unkomplexierten Photolyase sehr ähnlich. Signifikante Abweichungen treten im wesentlichen nur im Bereich der Protein/DNA-Schnittstelle auf. Die Struktur der DNA Doppelhelix ändert sich hingegen nach Bindung an die Photolyase sehr stark. Während der CPD Schaden allein nur einen moderaten Knick von etwa 22° in der Doppelhelix hervorruft, wird dieser nach Bindung an die Photolyase auf etwa 50° vergrößert.^[43] Außerdem wird der Schaden aus der Doppelhelix heraus in das aktive Zentrum des Enzyms gedreht („base flipping“) und hinterlässt ein etwa $10 \times 10 \text{ \AA}$ großes Loch, dass teilweise von den Aminosäuren G397 bis F406 gefüllt wird. Außerhalb der direkten Schadenbindungsstelle liegt die DNA in der normalen B-Konformation vor. Die Wechselwirkungen zwischen DNA und Enzym beschränken sich hier auf Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Zuckern und Phosphaten des DNA Rückgrates, wie es für ein Sequenz unabhängiges Reparaturenzym zu erwarten ist (Abbildung 33). Insbesondere werden

Salz- und Wasserstoffbrücken zu den Phosphaten P^{-1} , P^{+1} , P^{+2} und P^{+3} gebildet. Die ist in guter Übereinstimmung mit biochemischen Daten, nach denen eine kurze DNA, die die entsprechenden Phosphate und die zugehörigen Basen enthält, schon mit maximal möglicher Effizienz vom Enzym gebunden und repariert wird.^[177] Mögliche Aminosäurereste, die das Phosphat P^0 , das in dieser Struktur durch das Formacetal ersetzt ist, binden könnten, sind nicht zu erkennen und werden auch nach Untersuchungen von Sancar und Mitarbeitern nicht erwartet. Insgesamt gesehen ist die Bindung der DNA an das Enzym in der Kristallstruktur in guter Übereinstimmung mit schon früher gewonnenen Daten aus biochemischen und NMR-Experimenten.^[178]

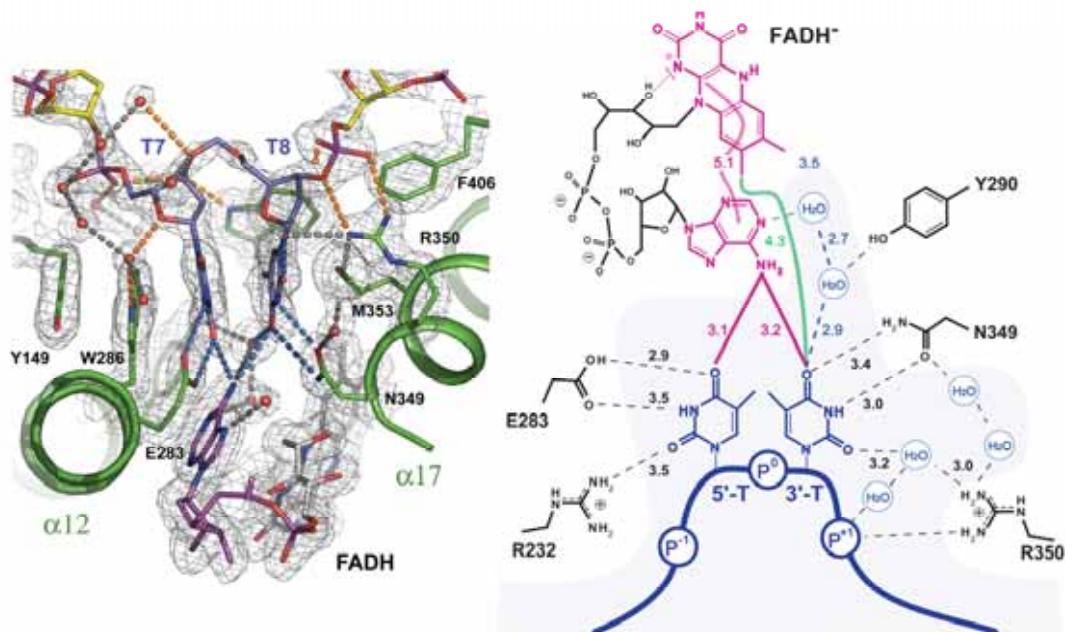


Abbildung 34: Die Bindung des CPD Schadens in der aktiven Tasche (links) und die schematische Darstellung möglicher Elektrontransferwege.

Obwohl der Cyclobutanring des Dimers gespalten wurde, weichen die Positionen der entstandenen Thymidine wahrscheinlich kaum von der Position der entsprechenden Basen im Dimer ab (Abbildung 34). Daher kann angenommen werden, dass die Wechselwirkungen mit den umgebenden Aminosäuren auch erhalten geblieben sind. Die Tryptophane W286 und W392 bilden van-der-Waals Wechselwirkungen mit der Ringebene des 5'-Thymidins bzw. den 6-Positionen der Thymidine und schirmen das Dinukleotid so auf zwei Seiten ab. Die C4-Carbonylgruppen und die Imidprotonen der N3-Stickstoffe bilden Wasserstoffbrücken zu einer Glutaminsäure- (E283, 5'-Thymidin) und einer Asparaginseitenkette (N349, 3'-Thymidin) aus. Beide Seitenketten sind beweglich und können daher wohl auch das andersartige Wasserstoffbrückenmuster von Cytosin haltigen Dimeren erkennen. Die

protonierte Asparaginsäureseitenkette könnte während der Katalyse auch zur Stabilisierung des Dimerradikalanions beitragen. Eine Mutation zu Alanin jedenfalls ermöglicht weiterhin die Bindung des Dimers mit unverminderter Stärke, senkt aber die Quantenausbeute des Reparaturprozesses von 0.98 auf 0.60.^[179] Zusätzlich zu den Wasserstoffbrücken zu den Aminosäureseitenketten bilden die C4-Carbonylgruppen auch noch Wasserstoffbrücken zur NH₂-Gruppe des Adenins des FADH Kofaktors aus.

Die Wasserstoffbrücken der C4-Carbonylgruppen des Dimers zur NH₂-Gruppe des Kofaktoradenins sind besonders interessant vor dem Hintergrund des Elektronentransferweges in der Photolyase. Da der FADH Kofaktor in der Photolyase eine sehr ungewöhnliche U-förmige Konformation einnimmt, so dass das Adenin fast schon auf dem Isoalloxazinring zu liegen kommt, wurde häufig über einen Elektronentransferweg mit dem Adenin als Zwischenstation spekuliert. Unterstützung für diese Theorie wurde aus theoretischen Untersuchungen abgeleitet.^[180] Die Wasserstoffbrücken des Adenins zu den C4-Carbonylgruppen des Dimers könnten eine solche Theorie stützen. Allerdings ist nach den gewonnenen Strukturdaten auch ein direkter Elektronentransfer vom Isoalloxazinring zum Dimer möglich. Der Abstand zwischen der C8-Methylgruppe des Isoalloxazins und der C4-Carbonylgruppe des 3'-Thymidin beträgt auch nur 4,3 Å, der Abstand zwischen dem Zentren der Ringe 7 Å. In einer vor kurzem erschienen Veröffentlichung mit neuen kurzpuls-spektroskopischen Daten wird die Beteiligung des Adenins am Elektronentransfer nahezu ausgeschlossen, aber wahrscheinlich sind noch weitere Untersuchungen und Berechnungen zu diesem Thema notwendig.^[107] Insbesondere über den Rücktransfer des Elektrons zum Flavin ist bisher fast nichts bekannt. An diesem Prozess könnte eventuell auch das Adenin des FADs beteiligt sein.

Sehr interessant ist auch ein Vergleich der beiden bisher veröffentlichten Strukturen von CPD Reparaturproteinen mit CPD enthaltender DNA. Während die T4 Endonuklease V den CPD Schaden in der DNA-Doppelhelix belässt und stattdessen ein gegenüberliegendes Adenin herausklappt, dreht die Photolyase gleich das ganze Dimer heraus (Abbildung 35).^[43, 82] In beiden Fällen entsteht dadurch ein großer Knick in der Doppelhelix, allerdings in genau entgegengesetzte Richtungen. Im Fall der Photolyase wird das Dimer vermutlich durch das Herausdrehen in eine spezifische Tasche der richtigen Größe und mit geeigneten Wasserstoffbrückenmuster (Seitenketten der Aminosäuren E 283, N349) erkannt. Für T4 Endo V ist hingegen bis heute nicht klar, wie das Enzym den Schaden und damit die herauszuklappende Base erkennt.

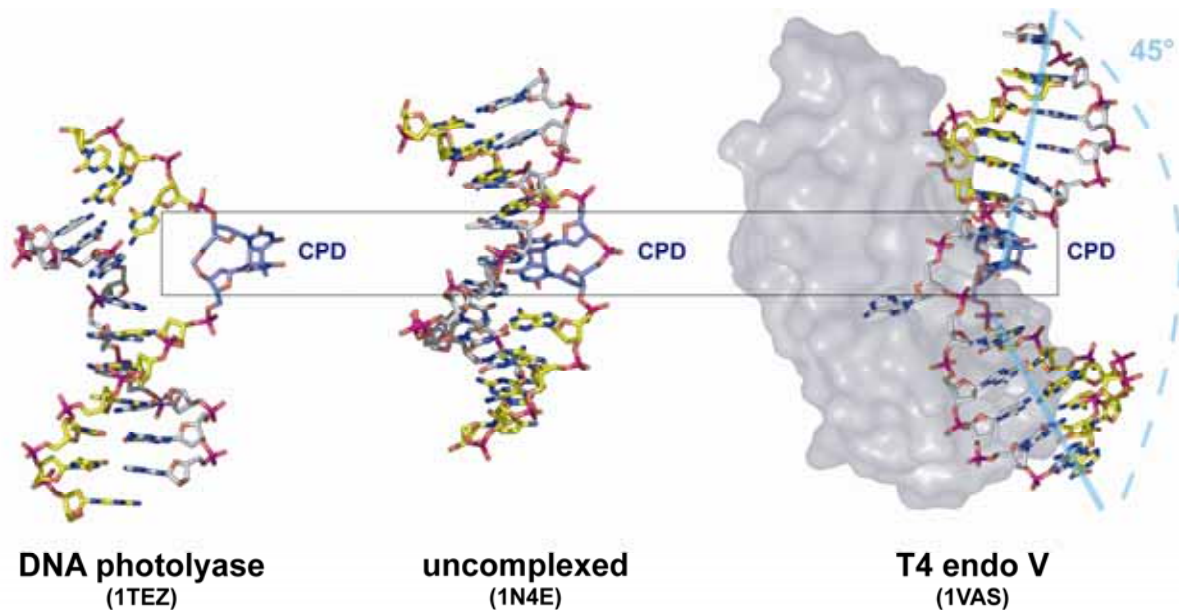


Abbildung 35: Vergleich der Strukturen der CPD Photolyase, des CPD Schadens im nicht gebundenen DNA Strang und der Glykosylase T4 Endo V (von links nach rechts).

4.2.4 Weitere Kokristallisationsversuche

Die Kokristallstruktur der *A. nidulans* Photolyase gebunden an ein während der Messung repariertes Substrat ermöglicht weitgehende, neue Einblicke in die Wechselwirkung zwischen DNA Schäden und Reparaturenzymen. Trotzdem bleiben einige Fragen ungeklärt. So wäre weiterhin eine Kokristallstruktur mit einem intakten CPD Schaden wünschenswert, da dann die für den Elektronentransfer sehr wichtige Geometrie der Dimerbindung präziser bestimmt werden könnte. Eine Struktur mit einem intakten Schaden könnte vielleicht sogar zeitaufgelöste Kristallographieexperimente möglich machen. Die Photolyase sollte hierfür gut geeignet sein, da der Reparaturschritt photochemisch ausgelöst wird. Daher sollte sich die Reparatur im Kristall mit einem Laserplus fast zeitgleich in allen Molekülen auslösen und damit auch synchronisieren lassen. Diese Synchronisation der Reaktion in allen Molekülen des Kristalls könnte dann die Verfolgung der Reaktion mit kurzen Röntgenpulsen am Synchrotron ermöglichen. Ein großes Problem ist aber der Aufbau der vorhandenen Photolyasekristalle. Sie enthalten vier Moleküle Photolyase in der asymmetrischen Einheit, die wiederum unterschiedliche Mengen an DNA enthalten. Dies führt zu einer kompliziert zu lösenden Struktur, die nicht für zeitaufgelöste Kristallographie geeignet ist. Ziel der neuen Kristallisationsversuche war daher einerseits, eine Struktur mit intaktem Schaden zu erhalten, und andererseits, die Kristallform und -zusammensetzung zu modifizieren.

In einem ersten Versuch sollte ein einfaches, möglichst kurzes Substrat hergestellt und mit der Photolyase kristallisiert werden. Arbeiten von Sancar hatten schon früh gezeigt, dass die

Photolyase auch kurze Einzelstränge repariert. Ein nur sechs Basen langes Substrat mit einem CPD Schaden an Position zwei und drei (aus 5'-Richtung) wird genauso gut gebunden, wie ein CPD Schaden in langen Doppelsträngen.^[177] Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Kokristallstruktur, in der insbesondere Wechselwirkungen des Enzyms zu den Phosphaten P⁻¹, P⁺¹, P⁺² und P⁺³ zu beobachten sind. Für einen ersten Versuch wurde daher ein Substrat mit der Sequenz **DS20** 5'-T T=T_f TT-3' ausgewählt. Es enthält die drei für die Bindung wichtigsten Phosphate (P⁻¹, P⁺¹ und P⁺²) und ist gleichzeitig möglichst einfach aufgebaut. Als CPD Schaden wurde wieder das Formacetalanalogon verwendet, das in großen Mengen hergestellt werden kann.^[173] Um genug Material für intensive Kristallisationsstudien zu erhalten, wurde die DNA Synthese im 15 µmol-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde das auf dem Expedite 8909 vorhandene Herstellerprotokoll für DNA Synthese in diesem Maßstab benutzt und für die Kupplung des Dimers modifiziert. Die Kupplungszeit für das Dimer wurde analog zum Syntheseprotokoll im 1 µmol Maßstab auf 15 Minuten erhöht. Außerdem wurde eine 0.11 M Lösung des Formacetalanalogonphosphoramidites verwendet. Die Synthese verlief unter Verwendung von 15 µmol CPG-Trägerkartuschen (Abi), die schon mit dem ersten Thymidin beladen waren, in sehr guter Ausbeute. Nach Abspaltung vom Träger, Entschützung und Reinigung über RP-HPLC wurden 2,2 µmol des Minimalsubstrat **DS20** 5'-T T=T_f TT -3' erhalten. Die Charakterisierung erfolgte über MALDI-Tof-MS und analytische HPLC.

T. Klar und *P. Gnau* (AK Essen) führten in der Folge Kristallisationsexperimente mit der *A. nidulans* CPD Photolyase und dem Minimalsubstrat durch. Innerhalb eines deutlichen kürzeren Zeitraumes als mit dem doppelsträngigen Substrat gelang es, Kokristalle zu erhalten. Nach Vermessung der Kristalle am Synchrotron und Lösen der Struktur zeigte sich ein überraschendes Ergebnis. Das verwendete Minimalsubstrat wurde nicht wie erwartet im aktiven Zentrum gebunden, sondern auf der anderen Seite des Enzyms in einer flachen Tasche an der Oberfläche in der Nähe des Deazaflavinkofaktors. Die kurze DNA bildete dabei eine Haarnadel-artige Loopstruktur aus. Die eigentliche Bindungsstelle des CPD Schadens, die geräumige Tasche in der Nähe des FAD Kofaktors, war hingegen unbesetzt.

Die biologische Bedeutung dieser Struktur ist unklar. Vermutlich handelt es sich bei der ungewöhnlichen Bindungsstelle des Minimalsubstrates um ein Artefakt, das durch die Kristallisationsbedingungen hervorgerufen wird. Biochemische Daten, die auf eine alternative Bindungsstelle zum Beispiel für kurze, einzelsträngige Substrate hindeuten, sind nicht bekannt. Allerdings gibt es einige Hinweise auf eine zweite, lichtunabhängige Funktion der Photolyase, die bisher kaum untersucht worden ist.^[101] Daher kann nicht völlig

ausgeschlossen werden, dass der hier gefundene Bindungsmodus nicht doch von biologischer Bedeutung, zum Beispiel im Rahmen eines lichtunabhängigen Prozesses ist.

Neben dem Versuch, einfacher aufgebaute Kristalle zu erhalten, wurde auch ein Versuch unternommen, eine Struktur mit intaktem Schaden zu erhalten. Hierzu wurde ein DNA Strang hergestellt, der statt des Thymidin-Thymidin Dimers ein Desoxyuridin-desoxyuridin Dimer enthielt.^[173, 174] Zur Synthese wurde hier wieder das Phosphoramidit eines Formacetal-analogons dieses Schaden verwendet, dessen Synthese von *J. Butenandt* entwickelt worden war. Die Synthese eines Stranges mit derselben Sequenz wie **DS19** gelang problemlos. Die anschließende Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte trotz der Verwendung der beschriebenen, sehr milden Bedingungen (NH₃ in trockenem Methanol) nur unter Bildung von etwa 10 % eines Nebenproduktes, dessen Masse um 18 größer als die des Produktes war. Vermutlich handelt es sich hierbei um einen Strang, in dem eines der Diimide des Dimers nukleophil durch Wasser (oder Ammoniak) geöffnet wurde.^[173, 174] Das Nebenprodukt konnte aber bei der Reinigung mit RP-HPLC vollständig abgetrennt werden. Nach einer weiteren Reinigung des Stranges mit Anionentauscher-HPLC und Entsalzen mit einer SepPak-Kartusche konnte der Strang **DS21** in hoher Reinheit erhalten werden. Der Strang wurde mit einem passenden Gegenstrang analog zu **DS19** hybridisiert und der Arbeitsgruppe *Essen* übergeben. Wie schon mit Doppelstrang **DS19** dauerte das Wachstum von zur Strukturanalyse geeigneten Kokristallen mit der *A. nidulans* CPD Photolyase sehr lange (> 6 Monate). Die erhaltenen Kristalle konnten von der Gruppe Essen erst vor kurzem am Synchrotron vermessen werden, so dass die Strukturlösung noch nicht abgeschlossen ist. Erste Analysen zeigen aber, dass Raumgruppe und asymmetrische Einheit den schon bekannten Kristallen mit dem TT-CPD Schaden entsprechen. Aussagen über den Zustand des UU-CPD Schadens können allerdings wohl nicht getroffen werden, da die Auflösung der Struktur (2.6 Å) zu niedrig ist.

4.3 Die CPD-Photolyase und modifizierte Kofaktoren

Schon in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde am Beispiel der *E. coli* CPD Photolyase gezeigt, dass der Austausch des katalytisch aktiven Flavinkofaktors gegen synthetische Flavinderivate möglich ist.^[181, 182] Diese Untersuchungen trugen zum Verständnis des Reparaturmechanismus bei, hatten allerdings nicht das Ziel, die Eigenschaften der Photolyase zu verändern. Dass der Austausch eines Kofaktors zu einem Enzym mit neuen Eigenschaften führen kann, konnte zum Beispiel die Gruppe *Massey* zeigen.^[183] Der Austausch von FAD gegen ein 8-CyanoFAD in einer Reduktase führte dazu,

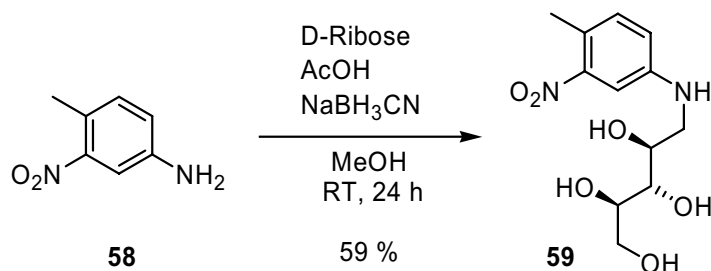
dass dieses Enzym statt der Reduktion einer Doppelbindung nun die Oxidation von Ketonen zu α,β -ungesättigten Ketonen katalysierte. Damit katalysiert das Enzym mit dem modifizierten Kofaktor die Rückreaktion des unmodifizierten Enzyms.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun versucht werden, durch den Austausch eines Kofaktors eine CPD Photolyase mit veränderten spektralen Eigenschaften herzustellen. In einem ersten Schritt sollten daher Kofaktorderivate hergestellt und ihre Bindung an die Photolyase untersucht werden. Als Photolyase sollte die *Thermus thermophilus* CPD Photolyase verwendet werden, da dieses sehr stabile Enzym von der Gruppe Essen in großer Menge überexprimiert und aufgereinigt werden konnte. Da der zweite Kofaktor dieses Enzyms bis dahin nicht bekannt war, sollten diese Untersuchungen auch zur Identifizierung dieses Kofaktors beitragen. Anschließend sollte versucht werden, einen geeigneten, synthetischen Kofaktor zu identifizieren, der eine Reparatur des CPD Schadens mit möglichst langwelliger Strahlung ermöglicht.

4.3.1 Synthese von 8-substituierten Flavinderivaten

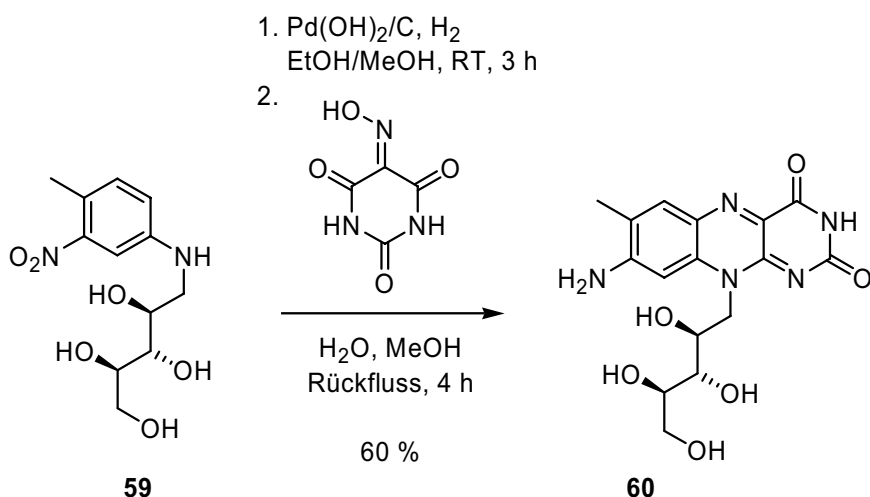
Obwohl die Isolierung und Charakterisierung des zweiten Kofaktors (neben dem FAD) aus der nativen *Thermus thermophilus* Photolyase bis heute aussteht, so konnte das Enzym an Hand der Kristallstruktur doch der Klasse der 8-Hydroxydeazaflavin **13** enthaltenden Photolyasen zugeordnet werden. Als Ziel für die Synthese erster artifizieller Kofaktoren wurden daher Riboflavinderivate ausgewählt. Flavine sind den Deazaflavinen sehr ähnlich, im Gegensatz zu diesen aber synthetisch meistens besser zugänglich. Um eine möglichst große Bandbreite von spektralen Eigenschaften zu erhalten, wurden 8-substituierte Flavine gewählt. Substituenten in dieser Position stehen in Konjugation zum Pyrimidinteil des Isoalloxazinsystems und üben so den größten Einfluss auf die elektronischen Eigenschaften aus. Außerdem waren schon Sandmeyerreaktionen am 8-Aminoriboflavin beschrieben worden, so dass über dieses einfach herzustellende Flavin ein Reihe weitere Derivate zugänglich sein sollte.^[184]

In der Literatur sind schon mehrere Synthesen von 8-Amino-8-demethylriboflavin beschrieben worden. Die effizienteste ist wohl die von *Kasai* und Mitarbeitern, die dieses Flavin in drei Stufen aus D-Ribose und 3-Nitro-4-methylanilin herstellten.^[185] Die ersten beiden Stufen ihrer Synthese, die Bildung des gemischten N,O-Acetals aus Ribose und 3-Nitro-4-methylanilin und die darauf folgende Reduktion des Acetals, sollten sich allerdings in Form einer reduktiven Aminierung auch in einem Schritt durchführen lassen.



Schema 19: Reduktive Aminierung von **58** mit D-Ribose.

Die reduktive Aminierung von D-Ribose mit 3-Nitro-4-methylanilin **58** gelang in Methanol bei Raumtemperatur trotz des relativ elektronenarmen Anilins ohne Probleme. Als Reduktionsmittel erwies sich Natriumcyanoborhydrid als besonders geeignet. Das Produkt **59**, das sich auf Grund seiner Wasserlöslichkeit nicht durch Extraktion reinigen ließ, konnte durch Säulenchromatographie gereinigt und in 59 % Ausbeute erhalten werden.



Schema 20: Synthese von 8-Amino-8-demethylriboflavin **60**.

Die anschließende Umsetzung des Ribitylanilins **59** zum 8-Amino-8-demethylriboflavin **60** erfolgte nach einer leicht modifizierten Vorschrift von Kasai und Mitarbeitern.^[185] Statt Raney-Nickel wurde Palladium auf Kohle als Katalysator für die Hydrierung verwendet. Das Produkt kristallisiert in hoher Reinheit aus der Reaktionslösung aus. Die Ausbeute von 60 % entspricht ziemlich genau der in der Literatur beschriebenen Ausbeute nach dem ersten Kristallisationsschritt (63 %). Obwohl die Mutterlauge noch weiteres Produkt enthält, konnte im Gegensatz zu den Literaturangaben kein weiteres Produkt kristallisiert werden.

Durch langsames Eindampfen einer verdünnten Lösung von 8-Amino-8-demethylriboflavin **60** in einem Gemisch aus verdünnter Salzsäure und Methanol konnten geeignete Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse erhalten werden. Die Messung und das Lösen der

Struktur wurden von *M. Marsch* durchgeführt. Die Struktur zeigt deutlich den großen Einfluss der Aminogruppe auf das Isoalloxazinsystem, der auch im Absorptionsspektrum des Moleküls deutlich wird. Insbesondere die Bindungslängen im Benzenteil des Isoalloxazins weichen stark voneinander ab. Dies ist auf die Konjugation der Aminogruppe und damit auf die signifikante Beteiligung der Grenzstrukturen **60b** und **60c** am Grundzustand des Moleküls zurückzuführen. Im UV/Vis-Spektrum führt dies zur bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums (478 nm gegenüber etwa 450 nm für unsubstituiertes Riboflavin).

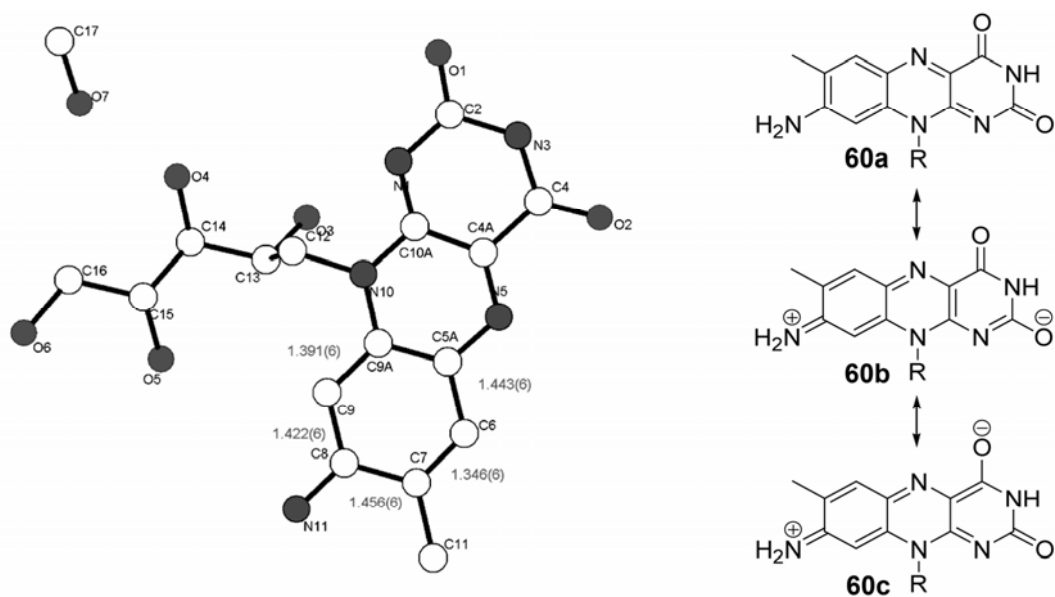
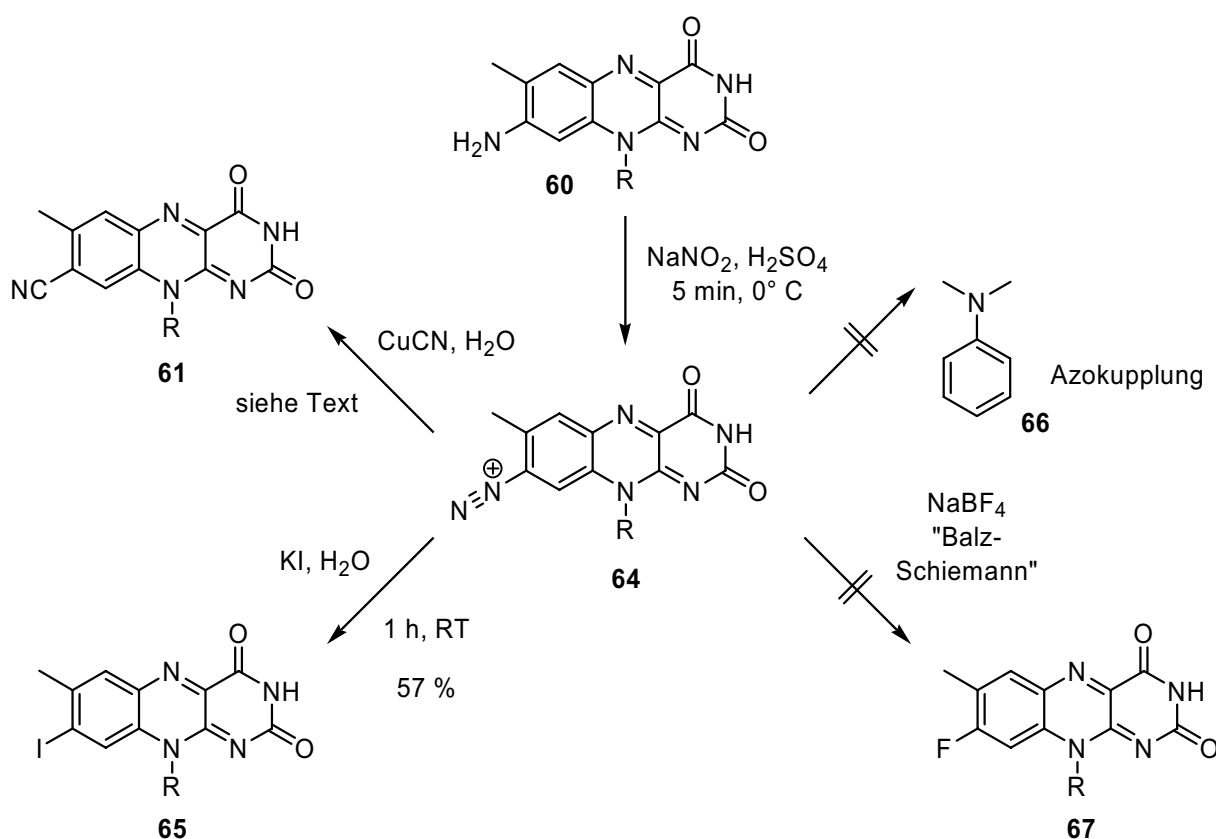


Abbildung 36: Die Kristallstruktur von 8-Amino-8-demethylriboflavin **60** (Wasserstoffatome sind zugunsten einer übersichtlicheren Abbildung nicht dargestellt).

Sandmeyerreaktionen an 8-Amino-8-demethylriboflavin **60** sind in der Literatur schon mehrfach beschrieben worden. Eine Reaktionsvorschrift und weitergehende spektroskopische Daten sind allerdings nur für 8-Cyano-8-demethylriboflavin **61** publiziert worden.^[184] Diese Reaktion ergab, wie in der Literatur beschrieben, eine Mischung aus dem gewünschten 8-Cyano-8-demethylriboflavin **61**, 8-Chlor-8-demethylriboflavin **62** und 8-Demethylriboflavin **63**. Die Bildung des 8-Chlorderivates **62** konnte einfach durch Verwendung von Schwefelsäure (statt Salzsäure) unterdrückt werden, allerdings war die Trennung der verbleibenden Flavine **61** und **63** nur mit präparativer HPLC möglich. Versuche, durch Modifizierung der Reaktionsbedingungen die Bildung von 8-Demethylriboflavin **63** zu unterdrücken, misslangen. Da sich das 8-Cyano-8-demethylriboflavin **61** außerdem als ziemlich instabil herausstellte und sich in Anwesenheit von Licht und Sauerstoff sehr schnell zersetzte, konnten nur wenige Milligramm isoliert werden. Die Sandmeyer-artige Reaktion

des Diazoniumsalzes **64** mit Kaliumiodid zu 8-Iod-8-demethylriboflavin **65** hingegen verlief glatt und ergab das Produkt nach Umkristallisation in 57 % Ausbeute. 8-Iod-8-demethylriboflavin **65** erwies sich als relativ stabil und kann einige Tage bei Raumtemperatur und Licht gelagert werden. Nach einigen Wochen ist aber selbst im Kühlschrank die Zersetzung der Substanz zu beobachten, so dass die Lagerung besser bei -78°C erfolgt. Weitere Reaktionen mit dem aus **60** gewonnenen Diazoniumsalz **64** waren nicht erfolgreich. Der Versuch einer Balz-Schiemann Reaktion scheiterte, da das benötigte Diazoniumtetrafluorboratsalz wasserlöslich ist und nicht durch Kristallisation isoliert werden konnte. Auch der Versuch einer Azokupplung mit *N,N*-Dimethylanilin **66** war nicht erfolgreich.



Schema 21: Reaktionen des Diazoniumsalzes **64**.

Für die ersten Experimente mit synthetischen Kofaktoren konnten auf diesem Weg 8-Amino-8-demethyl-riboflavin **60** und 8-Iod-8-demethyl-riboflavin **65** hergestellt werden. Die Synthese der Ausgangsverbindung **60** konnte durch die Verwendung einer reduktiven Aminierung auf nur noch zwei Stufen verkürzt werden, so dass **60** einfach und in großen Mengen hergestellt werden kann.

4.3.2 Einbau von synthetischen Kofaktoren in *T. thermophilus* CPD Photolyase

Der Einbau der verschiedenen Kofaktorderivate in die *Thermus thermophilus* Photolyase wurde von *T. Klar* in der Gruppe *Essen* untersucht. Neben den synthetisierten 8-Cyano-, 8-Iod- und 8-Amino-8-demethylriboflavinen wurden ebenfalls noch Roseoflavin (8-Dimethylamino-8-demethylriboflavin, kommerziell erhältlich), 8-Hydroxy-5-deazaflavin **13** (von A. Mees zur Verfügung gestellt) und F420 (8-HDF an der 5'-Hydroxygruppe mit einem Oligoglutamylrest verestert, von S. Shima zu Verfügung gestellt) für diese Untersuchungen verwendet.

Eine genauere Untersuchung der in *E. coli* überexprimierten *T. thermophilus* Photolyase ergab, dass diese Photolyase doch einen zweiten Kofaktor enthielt. Überraschenderweise handelt es sich dabei um FMN, dass durch HPLC-MS Experimente eindeutig identifiziert werden konnte.^[186] Diese Beobachtung wurde etwa zur gleichen Zeit auch von einer japanischen Arbeitsgruppe gemacht, die eine Steigerung der Reparatureffizienz durch diesen Kofaktor nachwies.^[187] Die Funktion von FMN als zweiter Kofaktor in der *T. thermophilus* CPD Photolyase ist damit wahrscheinlich, aber, da bisher nur am rekombinanten Protein untersucht, nicht sicher. *In vivo* ist auch ein anderer, verwandter Kofaktor noch nicht völlig auszuschließen.

Um die Bindung der synthetischen Kofaktoren zu untersuchen, wurden Kristalle der Photolyase in Lösungen der Flavine getaucht (mit den Flavinen „gesoaked“) und anschließend kristallographisch untersucht. Während die 8-Aminoderivate, 8-Cyanoflavin und F420 nicht gebunden wurden, konnten Kristallstrukturen mit 8-HDF **13** und Iodflavin **65** erhalten werden.^[186] In beiden Fällen war die Bindungsstelle des zweiten Kofaktor in etwa zu 100 % mit dem entsprechenden Flavin besetzt. Die Orientierung der Kofaktoren war mit der des nativen FMNs weitgehend identisch, allerdings wurden die synthetischen Flavine in etwas geringerer Entfernung zum katalytischen aktiven FAD-Kofaktor gebunden (15,4 Å (8-HDF **13**) und 16,7 Å (8-Iodflavin **65**) gegenüber 17,2 Å (FMN)).

Wieso ausgerechnet diese beiden Flavine gut gebunden wurden, und die anderen nicht, ist bisher unklar. Eine Vermutung ist, dass die bei neutralem pH-Wert möglicherweise protonierten 8-Aminoderivate, elektrostatisch von einem Arginin (R46) in der Bindungstasche abgestoßen werden. Leider ist der pK_a dieser Verbindungen nicht bekannt, aber die Erfahrungen während der Kristallisation des 8-Aminoflavins **60** lassen vermuten, dass die Aminogruppe auf Grund der Konjugation mit dem Isoalloxazingerüst wenig basisch ist. Die Substanz kristallisiert als neutrale Verbindung aus verdünnter Salzsäure. Eventuell ist im Fall des Iodflavin der große, hydrophobe Iodreste für die gute Bindung verantwortlich. Dies wäre für zukünftige Synthesen sehr interessant, da der Austausch dieses Restes gegen

unterschiedliche Aromaten durch Palladium katalysierte Kreuzkupplungen leicht möglich sein sollte. Diese neuartigen Flavine hätten dann ebenfalls hydrophobe Reste in der 8-Position und wahrscheinlich gleichzeitig durch das größere π -System Absorptionsmaxima bei längeren Wellenlängen. Mit diesen Flavinderivaten könnte die Konstruktion von Photolyasen mit einem längerwellig erweiterten Aktionsbereich möglich sein.

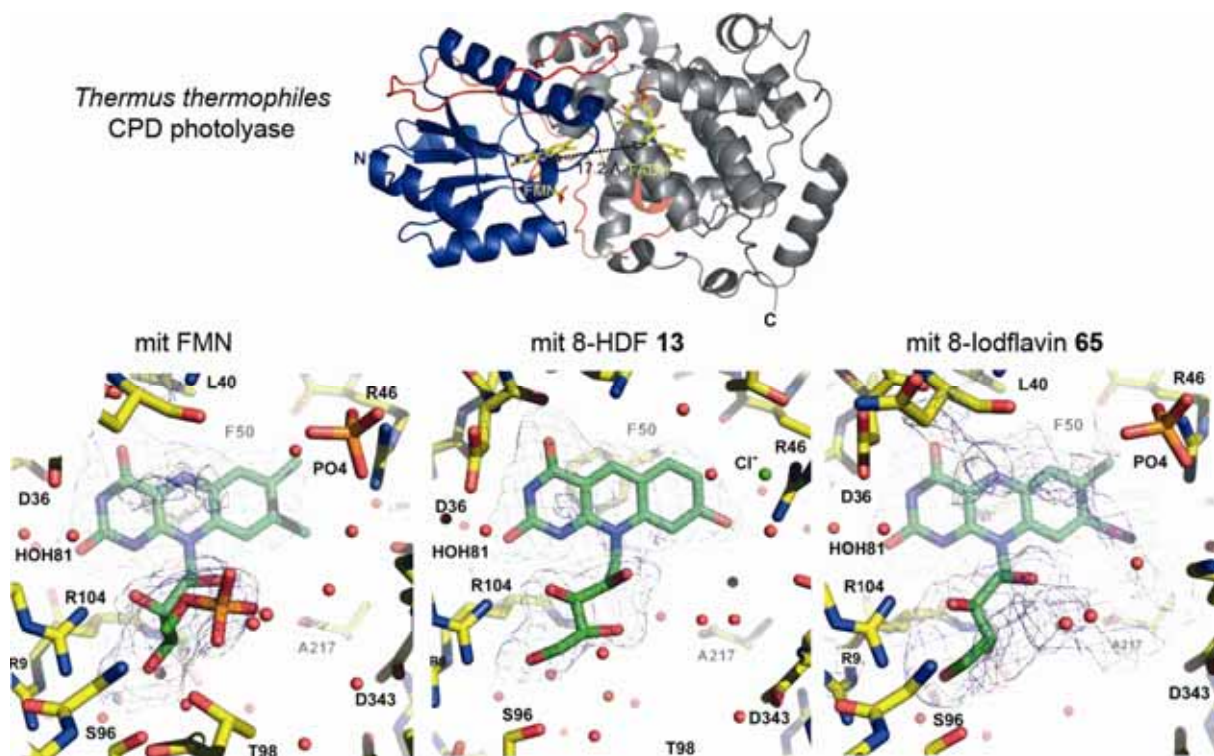


Abbildung 37: Kristallstrukturen der *T. thermophilus* CPD Photolyase mit verschiedenen Riboflavinderivaten als zweiten Kofaktoren.

Eine wichtige Voraussetzung für diese Experimente steht aber noch aus. Bisher konnte leider noch nicht überprüft werden, ob die neuen Photolyasen mit den synthetischen Kofaktoren noch katalytisch aktiv sind und DNA Schäden reparieren. Dies wäre höchst interessant, da diese Photolyasen dann auch weitergehende spektroskopische Untersuchungen zu Energie- und Elektronentransferprozessen ermöglichen würden.

5. Die eukaryotische RNA Polymerase II und der CPD Schaden

5.1 Einleitung

Die Gruppe *Hanawalt* konnte schon 1994 zeigen, dass der CPD Schaden ein Stopp für die eukaryotische RNA Pol II ist.^[63] Da der Schaden somit die Transkription unterbindet, ist er cytotoxisch für die Zelle. Die RNA Pol II bildet mit der geschädigten Templat-DNA und der mRNA einen stabilen, ternären Komplex, der die Transkriptions gekoppelte DNA Reparatur aktiviert.^[74, 79] Auf atomarer Ebene ist aber über diese Prozesse nur sehr wenig bekannt. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die RNA Pol II gegenüber den Basen des CPD Schadens zumindest teilweise noch Nukleotide in die mRNA einbaut.^[73, 97] Die Sequenzierung der entsprechenden Abbruchtranskripte ergab, dass nur gegenüber dem 3'-Thymidin des CPD Schadens wie üblich Adenosin eingebaut wurde. Gegenüber dem 5'-Thymidin wurde entweder kein Einbau oder der Einbau von fehlgepaarten Nukleotiden, insbesondere Uridin, beobachtet.^[73] Im gebildeten, ternären Komplex bedeckt die RNA Pol II etwa 35 Nukleotide der Templat-DNA und damit genauso viele wie in Komplexen, in denen die RNA Pol II durch eine spezifische Stoppssequenz zum halten gebracht wurde.^[74, 79] Der Transkriptionsfaktor TFIIS kann an diese Komplexe binden und ein Zurückweichen der RNA Pol II vom CPD Schaden um mindestens 25 Nukleotide auslösen.^[63, 79] Die mRNA wird hierbei schrittweise wieder abgebaut. Durch dieses Zurückweichen wird der Schaden wieder zugänglich und kann zum Beispiel durch eine Photolyase repariert werden.^[79]

In diesem Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte die Blockade der RNA Pol II durch den CPD Schaden möglichst präzise auf atomarer Ebene untersucht werden. Dies sollte in Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppe *Cramer* erfolgen, die die RNA Pol II aus Hefe als Modellpolymerase untersucht und mit einer vollständigen Transkriptionsblase kristallisiert hat.^[78] Insbesondere sollte dabei mit biochemischen Methoden die Bildung des gestoppten ternären Komplexes untersucht und anschließend mit kristallographischen Methoden seine Struktur gelöst werden. Ziel dieser Experimente sollte einerseits ein genaues Verständnis der molekularen Ursachen der Blockade der RNA Polymerase II sein. Andererseits sollten die Kristallstrukturen der ternären Komplexe mit dem CPD Schaden wichtige Hinweise auf den Mechanismus der Aktivierung der Transkriptions gekoppelten DNA Reparatur liefern.

5.2 Aufbau der verwendeten Nukleinsäurekonstrukte

Der Gruppe *Cramer* gelang die Kristallisation der vollständigen, aus zwölf Untereinheiten bestehenden RNA Pol II aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit einer Transkriptionsblase, die aus Oligonukleotiden assembliert wurde.^[78] Für die Experimente mit dem CPD Schaden wurde das Transkriptionskonstrukt deutlich verkleinert, um die Synthese des geschädigten Oligonukleotides möglichst unproblematisch zu halten. Insbesondere wurden die Oligonukleotide um die in der Kristallstruktur außerhalb der Polymerase liegenden Nucleotide verkürzt, so dass die Templatstränge mit dem CPD Dimer nur noch eine Länge von 26 Basenpaaren hatten (Abbildung 38). Im Gegensatz zu den Templat- und Nicht-Templatsträngen wurde die Länge der RNA je nach Experiment unterschiedlich gewählt. Für Kristallisationsexperimente wurden nur kurze RNAs mit Längen von 11 oder 12 Basen verwendet. Diese RNAs wurden für biochemische Untersuchungen um fünf Basen verlängert, um eine Wechselwirkung des Fluoreszenzmarkers am 5'-Ende mit der Polymerase zu verhindern.

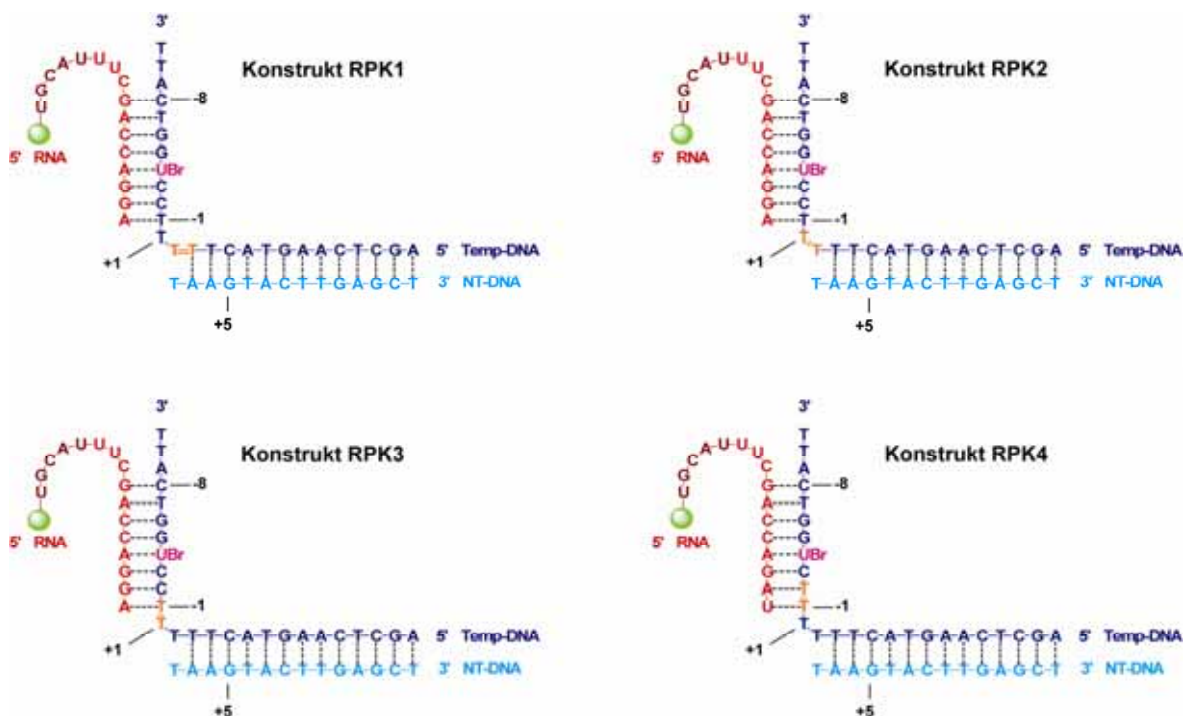


Abbildung 38: Die verwendeten Nukleinsäurekonstrukte **RPK1-RPK4** (Templat-DNA: dunkelblau, Non-templat-DNA: hellblau, RNA: rot (in dunkelrot die nur für biochemische Experimente verwendeten, verlängerten RNAs mit Fluoreszenzlabel in hellgrün), Bromuridin: pink, CPD Schaden: orange, angezeichnet in schwarz die Nummerierung der Basen in der Kristallstruktur).

Während alle Nicht-Templat-DNA Stränge und die RNA Stränge bei kommerziellen Herstellern erworben wurden, wurden die Templatstränge unter Verwendung des Formacetal-

CPD Schadenbausteins **57** hergestellt.^[173, 174] Außerdem wurde in allen Templatsträngen ein Thymidin durch ein Bromuridin ersetzt, um in den Kokristallstrukturen durch anomale Röntgenbeugungsexperimente das Register der Nukleinsäuren bestimmen zu können. Die Synthese der Stränge erfolgte unter Verwendung eines Standardprotokolls, wobei die Kupplungszeiten der Dimer- und Bromuridinphosphoramidite großzügig auf 15 min erhöht wurden. Nach Abspaltung von der festen Phase und Entschützung der Stränge mit wässrigem Ammoniak bei Raumtemperatur wurden die gewünschten Rohstränge ohne Zersetzung oder Bildung von Nebenprodukten erhalten. Um die für die Kokristallisationsexperimente notwendige hohe Reinheit der Stränge zu garantieren, erfolgte die Reinigung erst über RP- und dann über Anionenaustausch-HPLC. Alle Stränge wurden anschließend in hoher Reinheit und befriedigenden Ausbeuten erhalten (Tabelle 4).

Strang	Sequenz (5'-3')	Masse (berechnet)	Masse (gefunden)
TDNA-RPK1	ACG TCA AGT ACT T=TT TCC U^{Br} GG TCA TT	7916,1	7917,2
TDNA-RPK2	ACG TCA AGT ACT TT=T TCC U^{Br} GG TCA TT	7916,1	7918,3
TDNA-RPK3	ACG TCA AGT ACT TTT=TCC U^{Br} GG TCA TT	7916,1	7914,2
TDNA-RPK4	ACG TCA AGT ACT TTT T=TC U^{Br} GG TCA TT	7931,1	7932,3

Tabelle 4: Synthetisierte DNA Template mit CPD Schaden **57** und Bromuridin (T=T: CPD

Schaden **57**, U^{Br}: Bromuridin, alle Massen m/z sind als [M-H] angegeben, gemessen: MALDI-ToF-MS).

Die RNA Polymerase II wurde von der Gruppe *Cramer* bereitgestellt. Dazu wurde eine zehn Untereinheiten enthaltende Polymerase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aufgereinigt.^[188] Für Experimente mit der vollständigen Polymerase wurden die beiden fehlenden Untereinheiten in *E. coli* überexprimiert und gereinigt.^[188] Der Transkriptionsfaktor TFIIS wurde ebenfalls durch heterologe Expression in *E. coli* gewonnen.

5.3 Biochemische Experimente

Die biochemischen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit *F. Brückner* (AG *Cramer*) durchgeführt. Für die ersten biochemischen Experimente wurde das Konstrukt **RPK1** ausgewählt, in dem das Dimer auf den Positionen +2/+3 sitzt. Ähnlich zu Primer Extension Experimenten mit DNA Polymerasen sollte die Verlängerung der RNA durch die RNA Pol II über den CPD Schaden hinweg verfolgt werden. Das Konstrukt **RPK1** enthält hierzu den Schaden ein Nukleotid von der aktiven Tasche entfernt, so dass die Polymerase schon aktiv ist

(ein Nukleotid eingebaut hat), bevor Nukleotide gegenüber dem Dimer einzubauen sind (hot start). Für die Experimente wurden stöchiometrische Komplexe aus der kompletten RNA Polymerase II und dem Konstrukt **RPK1** mit einem Gemisch aus den natürlichen Nukleotidtriphosphaten inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen von einer bis zu 60 Minuten wurden Proben entnommen und mit CE und MALDI-Tof-MS analysiert (Abbildung 39).

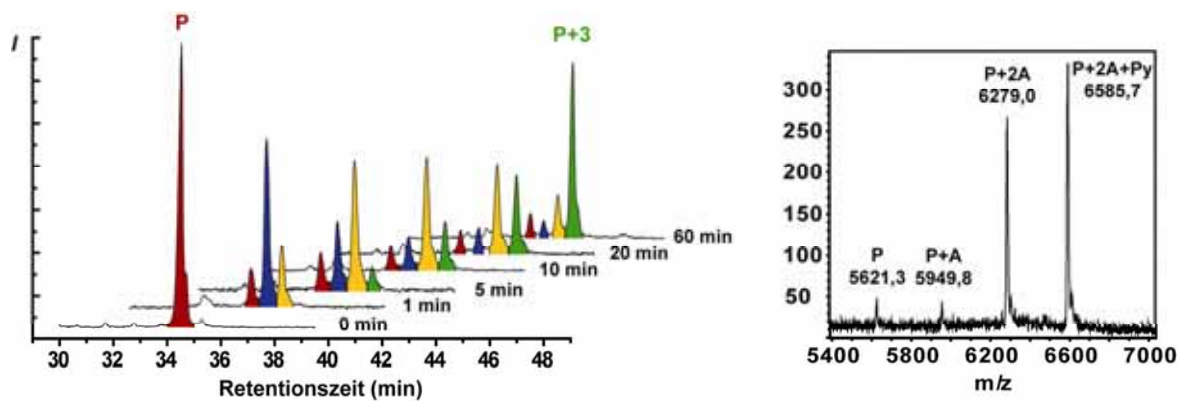


Abbildung 39: Verlängerung von Konstrukt **RPK1** durch die RNA Pol II (RNA Primer: rot, Primer + 1 Nukleotid: blau, Primer + 2 Nukleotide: gelb, Primer + drei Nukleotide: grün).

Abbildung 39 zeigt deutlich, dass die RNA Polymerase II die RNA in Konstrukt **RPK1** um drei Nukleotide verlängert, bevor kein weiterer Einbau mehr erfolgt. Der erste Einbau, gegenüber der Base vor dem Dimer, wird mit sehr hoher Geschwindigkeit durchgeführt (Abbildung 40). Im Gegensatz dazu sind die nächsten beiden Schritte sehr langsam. Der Einbau der Nukleotide gegenüber dem Dimer erfolgt nur noch mit einem Bruchteil der Geschwindigkeit des vorherigen Schrittes.

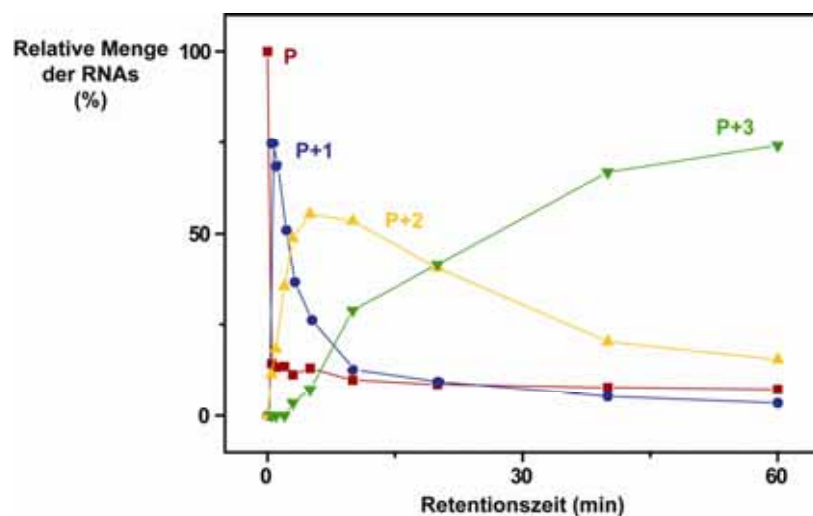


Abbildung 40: Die Verlängerung des Konstruktes **RPK1** in Abhängigkeit von der Zeit (Farben wie in Abbildung 39).

Eine Verlängerung der RNA um mehr als drei Nukleotide, also der Einbau eines Nukleotides nach dem Dimer, wurde nicht beobachtet. Sehr interessant ist das Massenspektrum des Konstruktes nach 60 Minuten. Die Verlängerung der RNA um genau drei Nukleotide ist deutlich zu erkennen, aber während es sich bei den beiden ersten, eingebauten Nukleotiden wie erwartet um Adenosine handelt, wird gegenüber der 5'-Base des CPD Schadens dem Massenspektrum nach ausschließlich ein Pyrimidin eingebaut. Ob es sich um Cytosin oder Uridin handelt, ist aus dem Massenspektrum auf Grund der sehr ähnlichen Massen nicht zu erkennen. Wurde für die Verlängerungsexperimente nur ATP als Triphosphat verwendet, konnte nur eine Verlängerung um 2 Basen beobachtet werden.

Um dieses Verhalten genauer zu überprüfen, wurde das Konstrukt **RPK3**, in dem das Dimer auf den Positionen +1/-1 sitzt und das damit dem um zwei Basen verlängertem Konstrukt **RPK1** entspricht, untersucht. Das Konstrukt **RPK3** wurde parallel jeweils nur mit einem Triphosphat inkubiert (Abbildung 41). Nur mit Uridintriphosphat konnte eine Verlängerung der RNA beobachtet werden, mit den anderen Triphosphaten erfolgte keine Verlängerung. Eine zeitabhängige Messung des Uridineinbaus ergab eine ähnliche Zeitabhängigkeit und eine ähnliche Geschwindigkeitskonstante wie für die dritte Verlängerung im Fall des Konstruktes **RPK1**. Die RNA Polymerase baut demnach gegenüber dem 5'-Thymidin des CPD Schadens selektiv Uridin als fehlgepaartes Nukleotid ein.

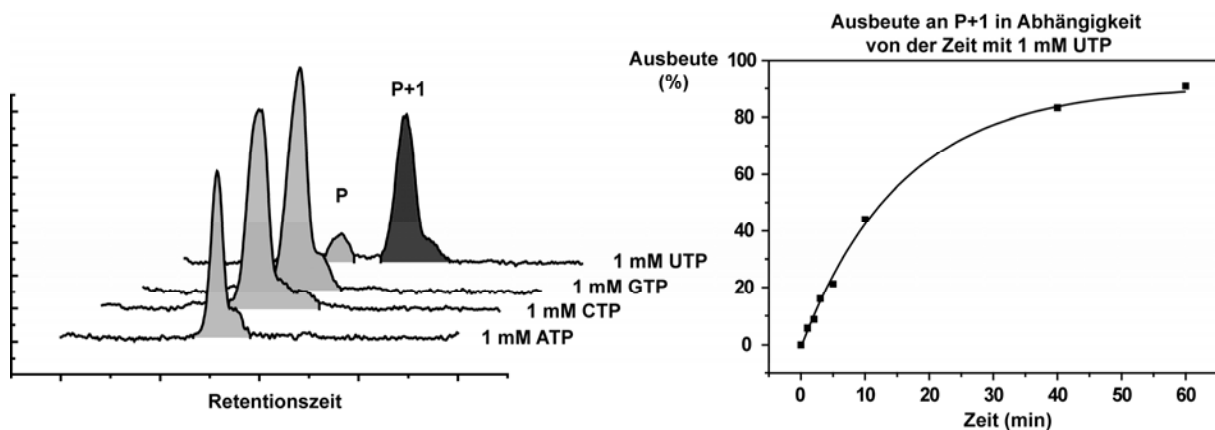


Abbildung 41: Verlängerung von **RPK3** (links in Abhängigkeit vom Nukleotidtriphosphat, rechts mit 1 mM UTP in Abhängigkeit von der Reaktionszeit).

5.4 Kokristallstrukturen der RNA Polymerase II mit CPD Dimer DNA

Um ein möglichst vollständiges Verständnis der Blockade durch den CPD Schaden zu erhalten, wurden die Konstrukte **RPK1-RPK4** von *F. Brückner* mit der kompletten, 12

Untereinheiten enthaltenden RNA Polymerase II aus Hefe kristallisiert.^[78] Es gelang, von allen vier Komplexen Kristallstrukturen mit Auflösungen um 4 Å zu erhalten. Alle vier Strukturen zeigten im Vergleich zum ungeschädigten Elongationskomplex nur sehr geringe Veränderungen an den Proteinuntereinheiten (Abbildung 42, dargestellt ist beispielhaft die Struktur mit **RPK3**). Die Nukleinsäurekonstrukte **RPK1-RPK4** wurden trotz der vorgenommen Kürzungen an den einzelnen Strängen analog zu einer vollständigen Transkriptionsblase gebunden. Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten wurden erst bei der genauen Betrachtung der Struktur der Nukleinsäuren deutlich. Hier wurden Abweichungen zu der bekannten Struktur des Elongationskomplexes erkennbar, die auf die Präsenz des CPD Schadens zurückgeführt werden können.

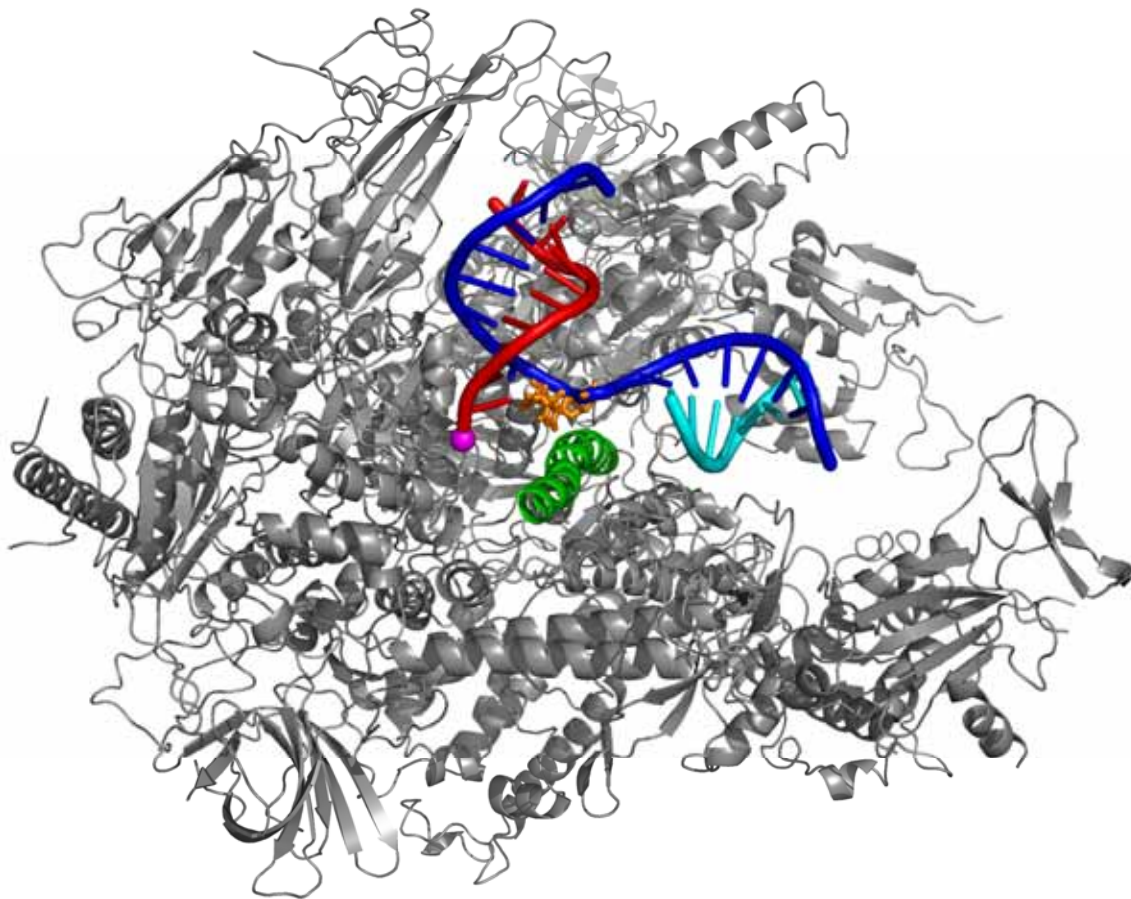


Abbildung 42: Die Kristallstruktur von RNA Pol II mit Konstrukt **RPK3**, Struktur **C**
(Proteinuntereinheiten: grau, „Bridge-helix“: grün, Templat-DNA: dunkelblau, Non-templat-DNA: cyan,
RNA: rot, CPD Schaden: orange, Magnesiumion in der aktiven Tasche: pink).

5.4.1 Die RNA Polymerase II Struktur mit RPK1 (Struktur A)

Im Nukleinsäurekonstrukt **RPK1** sitzt der CPD Schaden im Templatstrang auf den Positionen +2/+3, also eine Base vom aktiven Zentrum entfernt. Die Positionen der Nukleinsäuren in der Kristallstruktur, das Register, konnten durch das Bromuridin eindeutig bestimmt werden und stimmen mit der beabsichtigten Anordnung überein. Der CPD Schaden selber war in Struktur A allerdings nicht sichtbar (Abbildung 43, links). Stattdessen scheint die Präsenz des Schadens zu einer hohen Flexibilität der downstream-DNA zu führen, so dass die Konstruktion eines Modells für diesen Teil des Nukleinsäurekonstruktes aus der erhaltenen Elektronendichte nicht möglich war. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Störung der T-DNA/NT-DNA Doppelhelix durch den CPD Schaden zurückzuführen. Ab der Position +1, also der Base neben dem CPD Schaden, war die Elektronendichte für die Nukleinsäuren definiert und zeigte, im Vergleich zur Struktur des Elongationskomplexes keine wesentlichen Abweichungen.^[78]

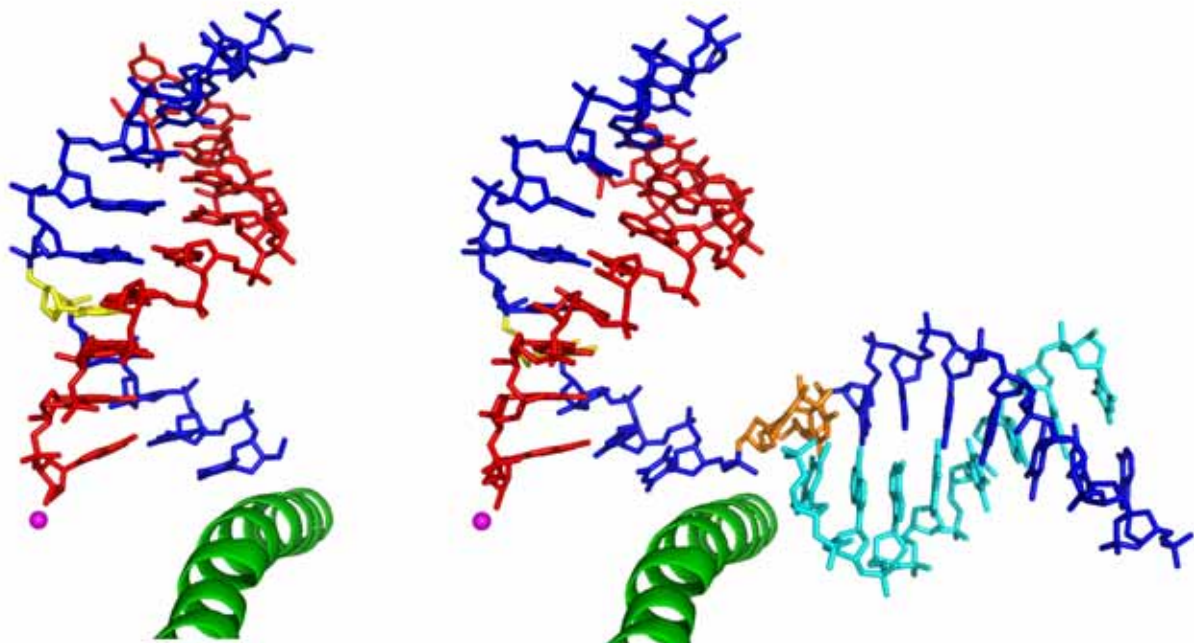


Abbildung 43: Die Struktur der Nukleinsäurekonstrukt in Struktur **A** (**RPK1**) und Struktur **B** (**RPK2**) (Proteinuntereinheiten: nicht sichtbar, „Bridge-helix“: grün, Templat-DNA: dunkelblau, Non-templat-DNA: cyan, RNA: rot, CPD Schaden: orange, Magnesiumion in der aktiven Tasche: pink).

5.4.2 Die RNA Polymerase II Struktur mit RPK2 (Struktur B)

Die Kokristallstruktur **B** mit dem Nukleinsäurekonstrukt **RPK2** zeigte ein überraschendes Ergebnis. Eigentlich war dieses Konstrukt so gewählt worden, dass der CPD Schaden auf den

Positionen +1/+2 sitzen hätte sollen. Die Analyse der Position des Bromatoms des Bromuridins ergab aber, dass sich dieses Konstrukt um eine Position verschoben hatte, so dass der CPD Schaden nun wiederum auf den Positionen +2/+3 zu finden war (Abbildung 43, rechts). Der Grund für dieses „Zurückrutschen“ ist wahrscheinlich, dass ein CPD Schaden auf den Positionen +1/+2 nicht ohne Verzerrung des Proteins oder der Nukleinsäuren platzt findet. Im Elongationskomplex sind die entsprechenden Nukleotide durch die „bridge“-Helix getrennt und die Basen stehen im 90° Winkel zueinander. Der CPD Schaden kann durch die kovalente Verknüpfung der Basen keine ähnliche Konformation einnehmen, so dass er auf den Positionen +1/+2 energetisch nicht stabil gebunden wird. Das Zurückrutschen ist sogar energetisch so vorteilhaft, dass die zwei, im Konstrukt entstehenden Basenfehlpaarungen dieses nicht verhindern. Dieses Verhalten erklärt vermutlich auch, wieso der Einbau eines Nukleotids gegenüber der 3'-Base des CPD Dimers so langsam ist. Nachdem gegenüber der Base vor dem CPD Schaden ein Nukleotid eingebaut worden ist, müsste eigentlich die Translokation der Nukleinsäuren folgen, so dass das Dimer von den Positionen +2/+3 auf die Positionen +1/+2 wechselt. Dieser Vorgang ist aber energetisch sehr ungünstig, so dass die Translokation sehr langsam ist und damit der folgende Einbau eines Nukleotides gegenüber der 3'-Base auch.

Im Vergleich zu einem ungeschädigten Komplex ändert sich im zurück gerutschten Komplex auch die Struktur der downstream-DNA. Dieses Verhalten wird später (in 5.4.4) ausführlicher behandelt.

5.4.3 Die RNA Polymerase II Struktur mit RPK3 (Struktur C)

Das Konstrukt **RPK3** enthält den CPD Schaden auf den Positionen +1/-1 und dort befindet sich der Schaden auch in der Kokristallstruktur **C** mit der RNA Polymerase II (Abbildung 42 und 46, links). Die Struktur **C** zeigt den CPD Schaden somit im aktiven Zentrum der Polymerase. Die 3'-Base des Schadens bildet ein Basenpaar mit dem Adenin am 5'-Ende der RNA, während sich gegenüber der 5'-Base (Position +1) der freie Raum für das einzubauende Nukleotidtriphosphat befindet (Abbildung 44). Da im Kristallisationspuffer keine Triphosphate oder Triphosphatanaloga enthalten waren, ist die NTP-Bindungsstelle, wie für eine Struktur im „pretranslocated“ Zustand erwartet, unbesetzt. Direkte Kontakte von Aminosäuren der RNA Polymerase II zu den Basen des CPD Schadens sind nicht zu beobachten.

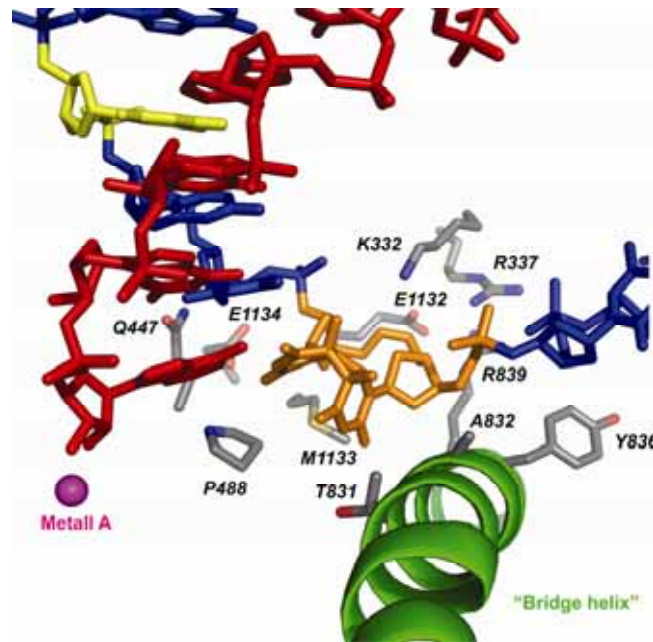


Abbildung 44: Die aktive Tasche der RNA Pol II mit dem Dimer auf den Positionen +1/-1, Struktur C (ausgewählte Aminosäuren: grau, „Bridge-helix“: grün, Templat-DNA: dunkelblau, RNA: rot, CPD Schaden: orange, Magnesiumion in der aktiven Tasche: pink).

Die Struktur der Nukleinsäuren unterscheidet sich kaum von der eines ungeschädigten Elongationskomplexes.^[78] Deutliche Abweichungen sind nur am Dimer selbst festzustellen. Während die 3'-Base die gleiche Position wie in einem ungeschädigten Elongationskomplex einnimmt, ist die 5'-Base durch die kovalente Verknüpfung der beiden Basen um etwa 40 ° verdreht und um 2 Å verschoben. Damit befindet sich das O4 in etwa auf der Position, die normalerweise von N3 eingenommen wird. Das Wasserstoffbrückenmuster ist um genau eine Position verschoben, so dass das 5'-Thymin jetzt in einer Art „wobble“-Position befindet (Abbildung 45).

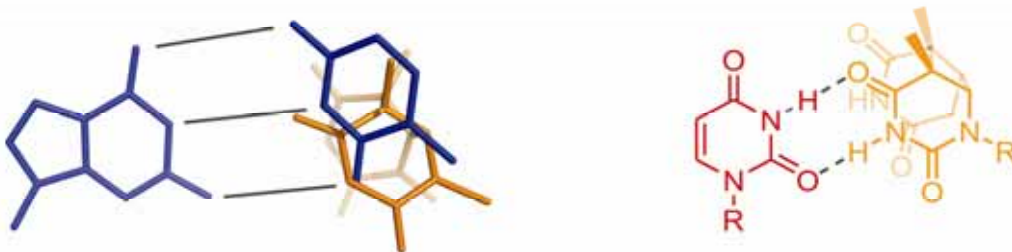


Abbildung 45: Links: Überlagerung der Paarung der Templatbase mit einem NTP-Analog in einem ungeschädigten Elongationskomplex mit dem CPD Schaden aus Struktur C. Rechts: Potentielles UTP-CPD Schaden „wobble“-Basenpaar (CPD Schaden: orange, Basenpaar aus dem ungeschädigten Elongationskomplex: blau, UTP: rot).

Der sehr langsame Einbau eines fehlgepaarten Uridin kann sehr gut durch diese Struktur erklärt werden. Im Gegensatz zu allen anderen Nukleotiden kann nur Uridin zwei Wasserstoffbrücken zum 5'-Thymin in der „wobble“-Position bilden. Da es sich aber auch dann nur um ein „wobble“-Basenpaar handelt, erfolgte der selektive Fehleinbau des Uridintriphosphates nur sehr langsam.

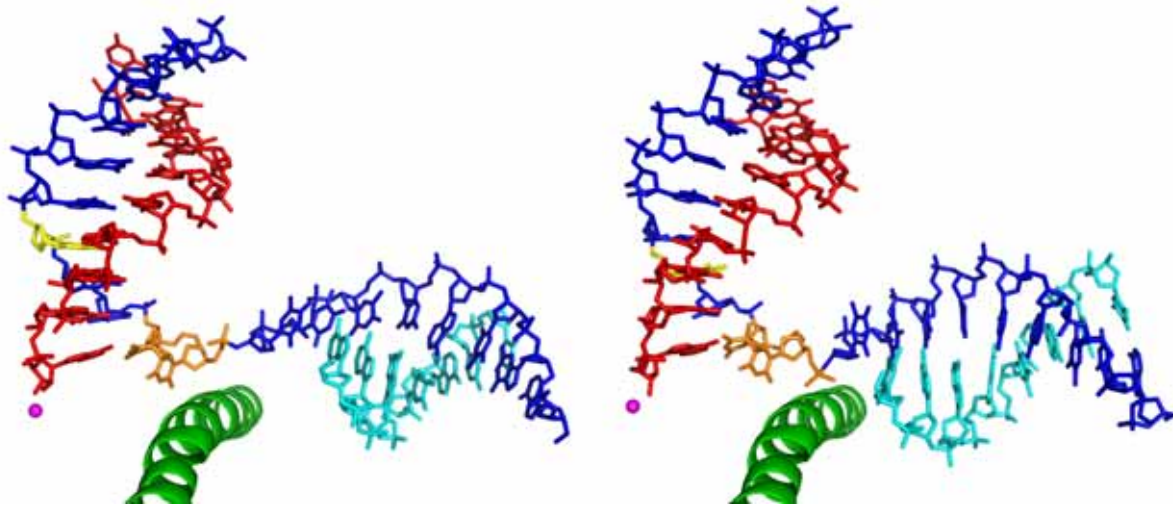


Abbildung 46: Die Struktur der Nukleinsäurekonstrukt in Struktur **C** (RPK3) und Struktur **D** (RPK4) (Proteinuntereinheiten: nicht sichtbar, „Bridge-helix“: grün, Templat-DNA: dunkelblau, Non-templat-DNA: cyan, RNA: rot, CPD Schaden: orange, Magnesiumion in der aktiven Tasche: pink).

5.4.4 Die RNA Polymerase II Struktur mit RPK4 (Struktur D)

Das Konstrukt **RPK4** wurde so gewählt, dass der CPD Schaden die Positionen -1/-2 belegt und somit an den beiden ersten Basenpaaren des DNA/RNA-Hybrids beteiligt ist. Als Gegenbasen wurden ein Adenin für das 3'-Thymin und ein Uracil für das 5'-Thymin gewählt, also die Basen die die Polymerase gegenüber dem Dimer einbaut. In der Kokristallstruktur **D** mit der RNA Polymerase wurde das Dimer allerdings wieder auf den Positionen +1/-1 gefunden (Abbildung 46, rechts). Analog zur Struktur **B** mit **RPK2** war die Polymerase zurück gerutscht. Da dieses Zurückrutschen auch diesmal durch die Wahl des Konstruktes zu zwei Fehlpaarungen im Nukleinsäurekonstrukt führt, scheint der CPD Schaden gepaart mit einem Adenin und einem Uridin im DNA/RNA-Hybrid nicht stabil zu sein. Dieses Verhalten ist in guter Übereinstimmung mit den biochemischen Experimenten. Diese zeigen, dass nach dem Fehleinbau des Uridins keine weitere Verlängerung der RNA mehr erfolgt.^[73] Die wahrscheinliche Ursache hierfür ist, dass der CPD Schaden nach der Translokation auf die Positionen -1/-2 das DNA/RNA-Hybrid zu stark stören und verzerren würde. Daher ist die

Translokation energetisch so ungünstig, dass die RNA Polymerase II an dieser Stelle stoppt und keine weitere Verlängerung nach dem Fehleinbau mehr erfolgt.

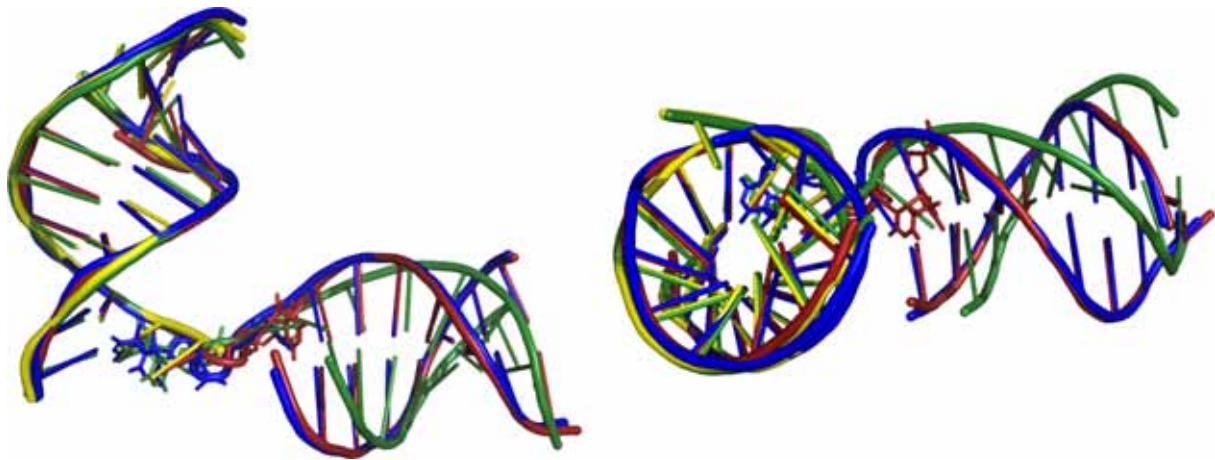


Abbildung 47: Schematische Überlagerung der Nukleinsäurestrukturen aus den Strukturen **A-D** (Struktur **A**: gelb, Struktur **B**: braun, Struktur **C**: grün, Struktur **D**: blau).

Interessant ist, dass auch die zurück gerutschte Struktur **D** eine veränderte Anordnung der downstream-DNA zeigt (Abbildung 46 und 47). Die downstream-DNA in den zurück gerutschten Strukturen **B** und **D** nimmt in beiden Strukturen die gleiche Position und Struktur ein, die sich deutlich von anderen Elongationskomplexen unterscheidet. Die Ursache für dieses Verhalten ist nicht klar, insbesondere weil das Zurückrutschen auch zu einer Fehlpaarung am Anfang der downstream-DNA führt.

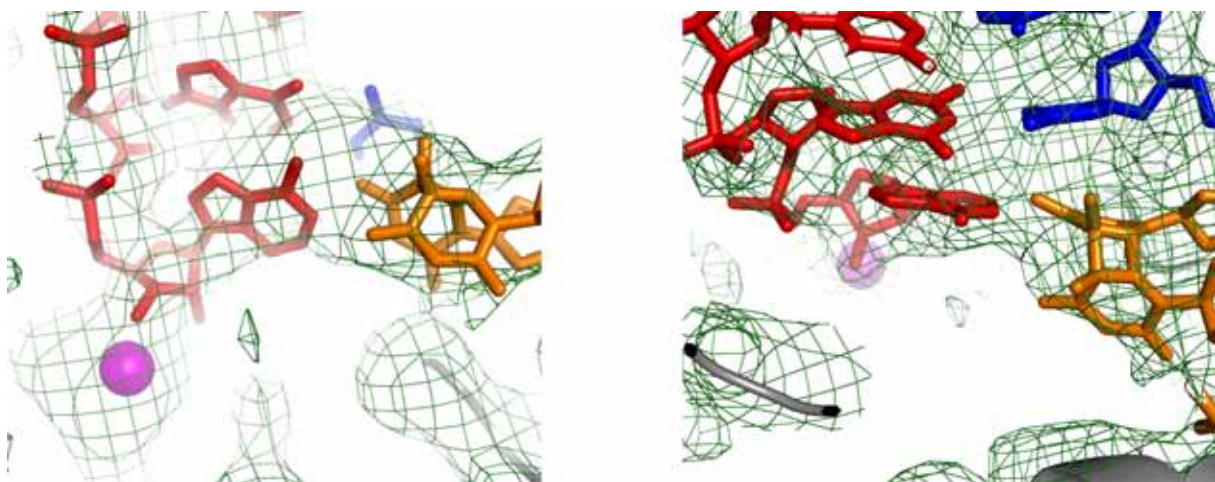


Abbildung 48: Die aktive Tasche von Struktur **D** (Proteinuntereinheiten: grau, Templat-DNA: dunkelblau, RNA: rot, CPD Schaden: orange, Magnesiumion in der aktiven Tasche: pink, Elektronendichte (0.8σ): grün).

Eine Möglichkeit wäre, dass die zurück gerutschen Komplexe die RNA Polymerase II in der „pretranslocated“ Form zeigen, während die anderen Komplexe eine freie NTP-Bindungsstelle haben, also die „posttranslocated“ Form zeigen. Nicht völlig auszuschließen ist aber auch, dass die veränderte Bindung der downstream-DNA eine Funktion bei der Aktivierung von Reparaturproteinen hat.

Ein weiteres interessantes Problem ist das „Verschwinden“ des letzten Nukleotides auf der 3'-Seite der RNA. Eigentlich müsste sich dieses Nukleotid nach dem Zurückrutschen auf der Position des einzubauenden Nukleotidtriphosphates befinden. Die Elektronendichtekarte zeigt an dieser Stelle aber keine verbleibende Restelextronendichte (Abbildung 48). Wahrscheinlich wird daher dieses Nukleotid unter den Kristallisationsbedingungen von der RNA Polymerase vom RNA Strang abgeschnitten. Eine derartige, schwache Exonukleaseaktivität ist für die RNA Polymerase schon beschrieben worden. Nicht völlig auszuschließen ist allerdings auch, dass dieses Nukleotid sehr beweglich ist und daher nicht in der Elektronendichtekarte zu finden ist.

5.5 Die Blockade der RNA Polymerase II durch die CPD Schaden-Uridin Fehlpaarung

Zusammengenommen zeigen die biochemischen und kristallographischen Experimente sehr klar, wie die RNA Polymerase ein Templat mit dem CPD Schaden abliest (Abbildung 49).

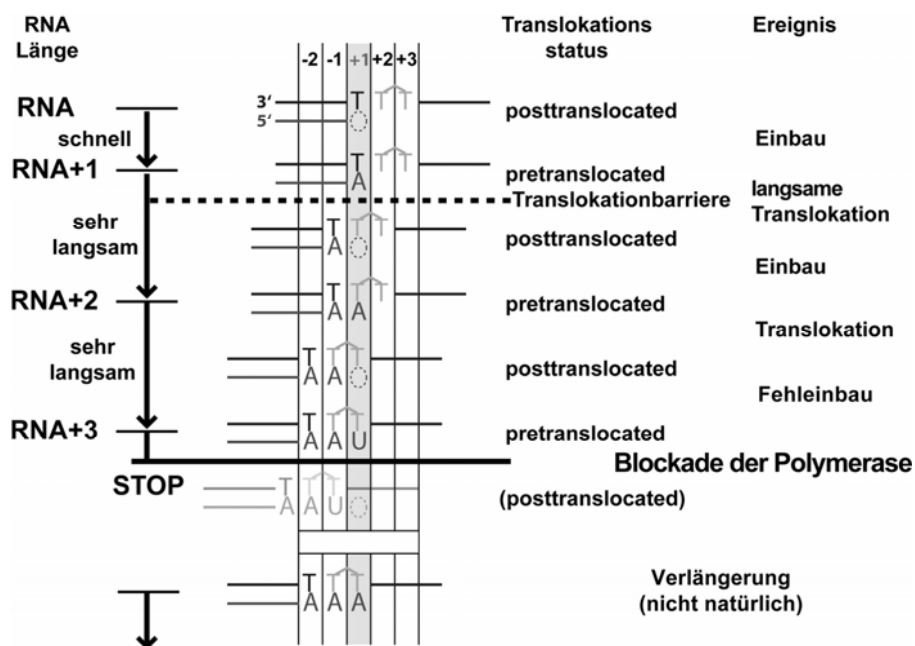


Abbildung 49: Modell für die Replikation des CPD Schadens durch die RNA Pol II.

Bis einschließlich eine Base vor dem Schaden erfolgt die Transkription des Templatstranges mit normaler Geschwindigkeit. Die dann notwendige Translokation würde zu der energetische sehr ungünstigen Positionierung des CPD Schadens auf den Positionen +1/+2 führen und ist daher sehr langsam. Dies führt zu dem sehr langsamen Einbau eines Adenins gegenüber der 3'-Base des Dimers. Nach einer weiteren Translokation befindet sich der Schaden auf den Positionen +1/-1. Da das 5'-Thymin nicht korrekt ausgerichtet ist, erfolgt der ebenfalls sehr langsame Fehleinbau eines Uridins. Die entstandene Uridin-CPD Schaden Fehlpaarung passt nicht in das DNA/RNA-Hybrid und verhindert den folgenden Translokationsschritt. Dies führt zur völligen Blockade der Polymerase.

Die Experimente zeigen deutlich, dass die Uridin-CPD Schaden Fehlpaarung zur Blockade der Polymerase führt. Aus den Experimenten geht aber nicht hervor, ob der CPD Schaden alleine für diese Blockade verantwortlich ist, nur die Fehlpaarung oder beide Effekte zusammen. Denkbar wäre, dass erst der Einbau der Fehlpaarung zur Blockade führt und so eventuell die Erkennung und Reparatur des Schadens ermöglicht.

Sequenz	Schmelzpunkt ungeschädigt (XX: TT, in °C)	Schmelzpunkt mit Formacteal-CPD (XX: T=T, in °C)
DNA: 5'- ACA GCG GXX GCA GGT A -3' RNA: 3'- UGU CGC CAA CGU CCA U -5'	63,6	60,1
DNA: 5'- ACA GCG GXX GCA GGT A -3' RNA: 3'- UGU CGC CAU CGU CCA U -5'	53,5	47,5
DNA: 5'- ACA GCG GXX GCA GGT A -3' RNA: 3'- UGU CGC CUA CGU CCA U -5'	54,0	50,1

Tabelle 5: Schmelzpunktdaten zur (Fehl-)paarung des CPD Schadens in DNA/RNA Hybriden (3 µM DNA, 3 µM RNA, 10 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl).

Schmelzpunktstudien von *J. Butenandt* hatten gezeigt, dass der CPD Schaden, gepaart mit zwei Adeninen, ein DNA/RNA Hybrid nur geringfügig destabilisiert und daher wohl auch dessen Struktur nur wenig stört.^[189] Um den Effekt der Fehlpaarung in der RNA Polymerase genauer zu untersuchen, wurden daher ähnliche Schmelzpunktstudien mit dem fehlgepaarten CPD Schaden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass ein fehlgepaarter CPD Schaden zu einer sehr starken Destabilisierung des Hybrids führt (Tabelle 5). Bei Paarung des 5'-Thymins des CPD Schadens mit einem Uridin, wie in der RNA Polymerase, sinkt die Schmelztemperatur des Hybrid um etwa 10 °C ab. Die Fehlpaarung des 3'-Thymin hat sogar noch ein deutlicheres Absinken der Schmelztemperatur zur Folge (um 12,6 °C). Interessant ist

der Vergleich zu ungeschädigten DNA/RNA Hybriden. Hier führt der Einbau einer T-U Fehlpaarung zu einer ähnlich starken Destabilisierung wie ein fehlgepaarter CPD Schaden. Die Schmelzpunktstudien zeigen also, dass ein korrekt gepaarter CPD Schaden in einem DNA/RNA-Hybrid nur geringe Störungen hervorruft. Erst die Fehlpaarung mit einem Uridin führt zu einer starken, für die Fehlpaarung und nicht den Schaden typischen Störung des Hybrides.

Da die Schmelzpunktstudien zeigen, dass die Fehlpaarung hauptsächlich für die Störung des DNA/RNA Hybrids verantwortlich ist, wurde mit einem leicht veränderten Konstrukt **RPK4** die Transkription eines korrekt gepaarten CPD Schadens untersucht. Dazu wurde im RNA Strang dieses Konstruktes das Uridin am 3'-Ende durch ein Adenosin ersetzt (Konstrukt **RPK4A**). Auf diesem Weg wurde die RNA Polymerase quasi „gezwungen“ ein Adenosin statt eines Uridins einzubauen. Das Konstrukt **RPK4A** wurde mit der 10 Untereinheiten RNA Polymerase assembliert und anschließend unter den üblichen Bedingungen mit Nukleotidtriphosphaten inkubiert (Abbildung 50). Das Elektropherogramm zeigt deutlich, dass im Gegensatz zu Konstrukt **RPK4** mit der Fehlpaarung, eine Verlängerung der RNA bis zum Ende des Templates beobachtet werden kann. Ähnliche Experimente wurden auch mit einem, um ein Adenosin verlängerten Konstrukt **RPK3A** durchgeführt. Auch hier konnte die Verlängerung der RNA bis zum Ende beobachtet werden.

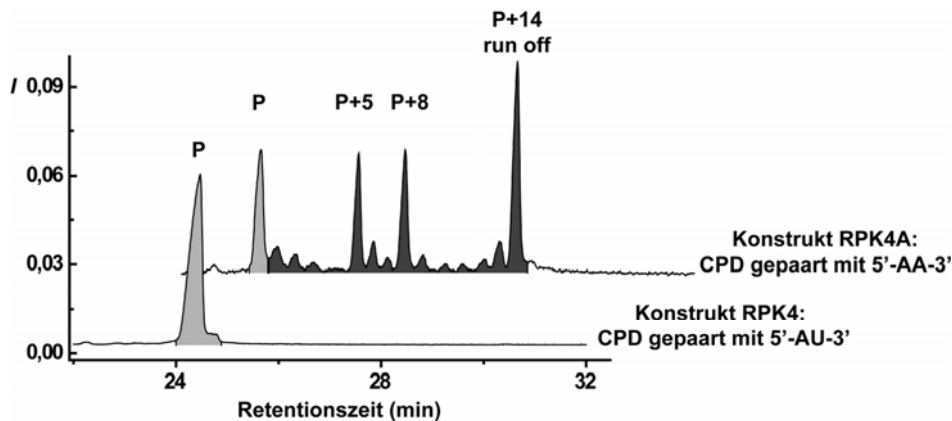


Abbildung 50: Verlängerung des CPD Schaden in Abhängigkeit von der Gegenbase
(1 mM NTPs, 20 min Reaktionszeit).

Die Verlängerungsexperimente zeigen sehr deutlich, dass die eigentliche Ursache für die Blockade der RNA Polymerase nicht der CPD Schaden ist, sondern die durch den Fehleinbau eines Uridins erzeugte Fehlpaarung des Schadens. Ein korrekt gepaarter CPD Schaden hingegen ist kein Block für die Transkription. Besonders deutlich wird die Bedeutung der Fehlpaarung bei Verlängerungsexperimenten mit ungeschädigten Templaten. Hierfür wurden

zwei weitere Versionen des Konstruktes **RPK4** verwendet, die statt des CPD Schadens zwei Thymidine enthielten (Abbildung 51). Waren die Thymidine korrekt mit zwei Adeninen gepaart, konnte die vollständige Verlängerung des Templates beobachtet werden. Wurde aber stattdessen das 5'-Thymidin analog zum CPD Schaden mit einem Uridin fehlgepaart, wurde nur noch ein kleiner Bruchteil der Konstrukte verlängert. Eine gewöhnliche T-U Fehlpaarung stoppt also die Transkription ähnlich effektiv wie der CPD Schaden.

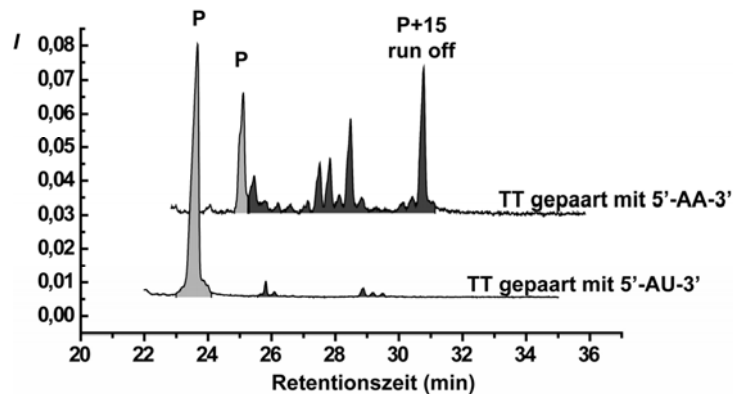


Abbildung 51: Replikationstopp durch eine T-U-Fehlpaarung im DNA/RNA Hybrid
(1 mM NTPs, 20 min Reaktionszeit).

5.6 Der Transkriptionsfaktor TFIIS und die durch den CPD Schaden blockierte RNA Polymerase

Eine RNA Polymerase, die zum Beispiel durch eine natürliche Stoppssequenz zum Halten gezwungen wurde, kann vom Transkriptionsfaktor TFIIS wieder aktiviert werden.^[100] Nach Bindung von TFIIS weicht die RNA Polymerase von der Stoppssequenz zurück. Dabei wird die RNA entsprechend gekürzt und das 3'-Ende neu positioniert, so dass eine Wiederaufnahme der Transkription möglich ist. Auch für Polymerasen, die durch einen CPD Schaden zum Halten gezwungen wurden, ist das Zurückweichen durch TFIIS beschrieben worden.^[63, 79]

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch an dem verwendeten *in vitro* Transkriptionssystem nachzuweisen ist, wurde das Konstrukt **RPK3U** verwendet. Bei diesem Konstrukt handelt es sich um ein modifiziertes Konstrukt **RPK3**, dessen RNA um ein Uridin auf der 3'-Seite verlängert worden war. Damit entspricht das Konstrukt den Nukleinsäuren in einer durch den CPD Schaden gestoppten Polymerase nach dem Einbau des fehlgepaarten Uridins. Das Konstrukt **RPK3U** wurde mit der RNA Polymerase II assembliert und anschließend für zehn

Minuten mit einem oder zwei Äquivalenten TFIIS inkubiert (Abbildung 52). Die Ergebnisse zeigen sehr schön, dass durch TFIIS die intrinsische Exonukleaseaktivität der RNA Polymerase aktiviert und ein Zurückweichen der Polymerase ausgelöst wird. Die RNA wird hierbei in Dinukleotidschritten abgebaut und stoppt dem Abbau von insgesamt sechs Nukleotiden. Dieser vergleichsweise frühe Stopp ist wahrscheinlich auf die relativ kurze Länge der downstream-DNA zurück zu führen. Trotzdem zeigen die Experimente sehr schön, dass TFIIS ein Zurückweichen der RNA Polymerase vom CPD Schaden auslösen kann.

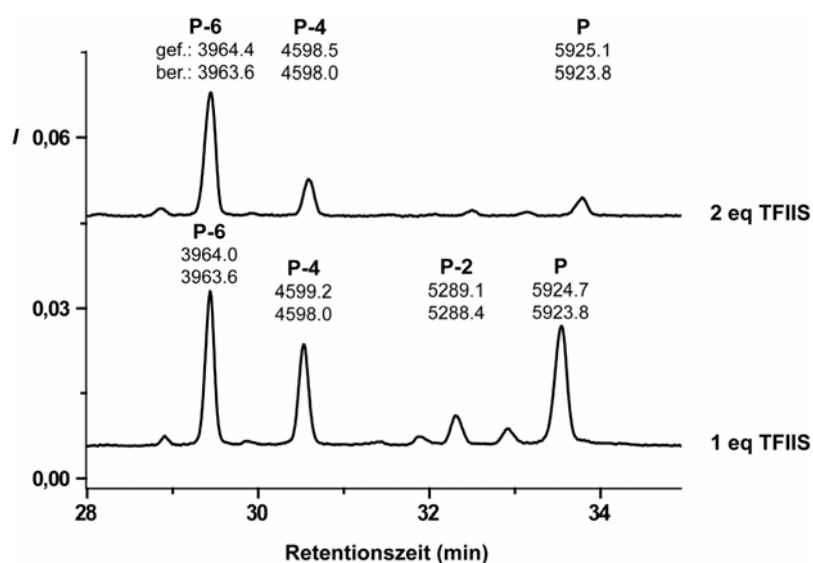


Abbildung 52: Zurückweichen der RNA Pol II vom CPD Schaden durch TFIIS.

5.7 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Teil der Arbeit gelang es, mit biochemischen und strukturellen Methoden die Blockade der RNA Polymerase durch den CPD Schaden zu verstehen. Dabei zeigte sich, dass der Schaden an sich nur zu einer sehr starken Verlangsamung der RNA Polymerase führt. Erst der selektive Fehleinbau eines Uridins gegenüber dem 5'-Thymin des Schadens führt zu einer Fehlpaarung, die dann die Polymerase vollständig blockiert. Die Ursache für diesen Fehleinbau ist wahrscheinlich die durch den Cyclobutanring des Schadens ausgelöste Verschiebung der 5'-Base auf eine Art „wobble“-Position. Dieser Mechanismus ist höchst ungewöhnlich und zeigt, wie wichtig ein detailliertes Verständnis der Interaktion von einzelnen Polymerasen mit einem definierten DNA Schaden ist.

Im Fall des CPD Schadens ist dieses Verständnis von besonderer Bedeutung, da die Erkennung des Schadens durch die Polymerase die Grundlage der Transkriptions gekoppelten Reparatur bildet.^[94, 96] Die Fehlpaarung des Schadens könnte hier sehr wichtig sein, da hierdurch ein Stopp der Polymerase an einer definierten Stelle erreicht wird und so die Erkennung und Reparatur des Schadens erleichtert werden könnte. Die Kokristallstrukturen zeigen aber auch, dass einige Modelle für den Mechanismus der Transkriptions gekoppelten Reparatur noch einmal überdacht werden müssen.^[190, 191] Der CPD Schaden ist tief im Inneren der Polymerase verborgen und daher für weitere Enzyme nicht ohne weiteres zugänglich. Andererseits zeigen die Strukturen aber auch keine auffälligen Veränderungen der RNA Polymerase Struktur, so dass nicht erkennbar ist, wie eine allosterische Aktivierung der Transkriptions gekoppelten Reparatur erfolgen sollte. Die erhaltenen Ergebnisse sprechen eher dafür, dass die Polymerase während des Reparaturprozesses auf dem Schaden gebunden bleibt. Die Reparatur wird stattdessen vielleicht eher durch den Stopp der Polymerase an sich ausgelöst. Interessant ist, dass der Transkriptionsfaktor TFIIS ein Zurückweichen der Polymerase vom CPD Schaden unter Kürzung der RNA auslösen kann. Ein dadurch eingeleiteter Reparaturprozess ist aber wohl auszuschließen, da TFIIS für die Transkriptionsgekoppelte Reparatur nicht essentiell ist.^[192] Vielleicht spielt dieser Faktor daher eher eine Rolle in einer, der Reparatur nachgelagerten Reaktivierung der RNA Polymerase.

Das Bild der Blockade der RNA Polymerase durch den CPD Schaden ist annähernd komplett, nur an einigen wenigen Stellen sind noch offene Fragen vorhanden. Zum besseren Verständnis des (nichtnatürlichen) Überlesens des Schadens bei korrekter Paarung mit zwei Adeninen würde eine Kokristallstruktur mit dem Schaden im DNA/RNA-Hybrid (auf den Positionen -1/-2) beitragen. Diese Struktur sollte mit dem Konstrukt **RPK4A** erhalten werden können, das keine Fehlpaarung enthält. Interessant ist auch die Frage, was beim Zurückrutschen in den Strukturen **B** und **D** mit dem letzten 3'-RNA Nukleotid in der aktiven Tasche passiert. Dazu könnten CE oder MALDI-Tof-MS Messungen an aus den Kristallen isolierter RNA durchgeführt werden. Diese würden zeigen, ob diese Base wirklich, wie vermutet, von der RNA Polymerase abgeschnitten wird. Andererseits könnte die Verwendung eines nicht-hydrolysierbaren RNA Analogs zu einer Struktur in der „pretranslocated“ Form führen, mit dem letzten 3'-Nukleotid der RNA in der aktiven Tasche des Enzyms. Entsprechende Versuche mit einer RNA mit Phosphorthioatbindung zum letzten 3'-Nukleotid werden derzeit von *F. Brückner* (Gruppe *Cramer*) durchgeführt.

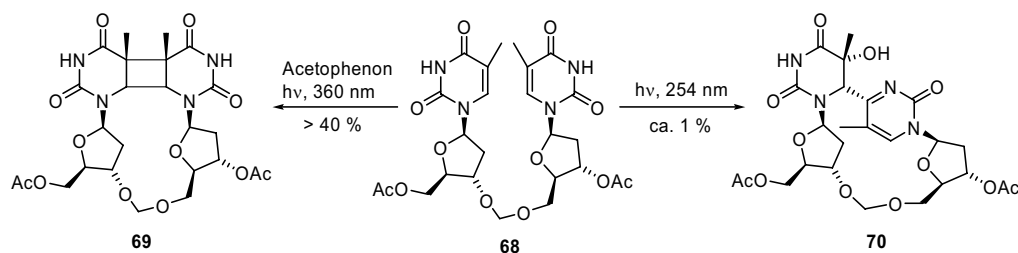
Die Untersuchungen dieses Kapitels zeigen, was mit dem CPD Schaden in der RNA Polymerase passiert. Unklar bleibt aber, wie nach der Blockade die Aktivierung der DNA

Reparatur erfolgt. *In vivo* und *in vitro* Studien zeigen, dass Rad 26 (im Menschen das CSB Protein) hier eine entscheidende Rolle spielt.^[97, 193] Erste experimentelle Untersuchungen lassen vermuten, dass dieses Protein die Transkription des CPD Schadens und den Einbau der Fehlpaarung beschleunigt, bevor die Aktivierung der DNA Reparatur erfolgt. Versuche, diesen Prozess mit dem hier verwendeten Transkriptionssystem zu untersuchen, könnten eine genauere Bestimmung der Funktion dieses Proteins ermöglichen. Mit Blick auf den sehr langsamen Nukleotideinbau gegenüber den Basen des CPD Schadens, könnten diese Untersuchungen auch Fragen über die Relevanz dieses Prozesses *in vivo* beantworten, falls das RAD 26 Protein diesen Einbau deutlich beschleunigt. Entsprechende Untersuchungen sind derzeit in Zusammenarbeit mit den Gruppen *Cramer* (RNA Polymerase) und *Hopfner* (RAD 26) geplant.

6. Methoden zur Herstellung des (6-4)-Schadens

6.1 Einleitung

Die Auswirkungen des (6-4)-Schadens auf DNA abhängige Enzyme, und damit auf den gesamten Organismus sind bisher, insbesondere im Verhältnis zum CPD Schaden gesehen, wenig untersucht worden. Insbesondere strukturelle Studien an Komplexen aus Enzymen zusammen mit geschädigter DNA sind bisher nicht bekannt. Ein wichtiger Grund für das Fehlen von derartigen Untersuchungen ist die sehr problematische Herstellung von geeigneter DNA mit einem spezifisch positionierten Schaden. Methoden zur Herstellung von Phosphoramiditbausteinen des (6-4)-Schadens für die DNA Synthese sind zwar bekannt, allerdings ist keine dieser Methoden besonders effizient.^[194-197] Ein gutes Beispiel hierfür ist die Synthese eines Formacetalanalogons des Schadens durch *M. Friedel*.^[198]



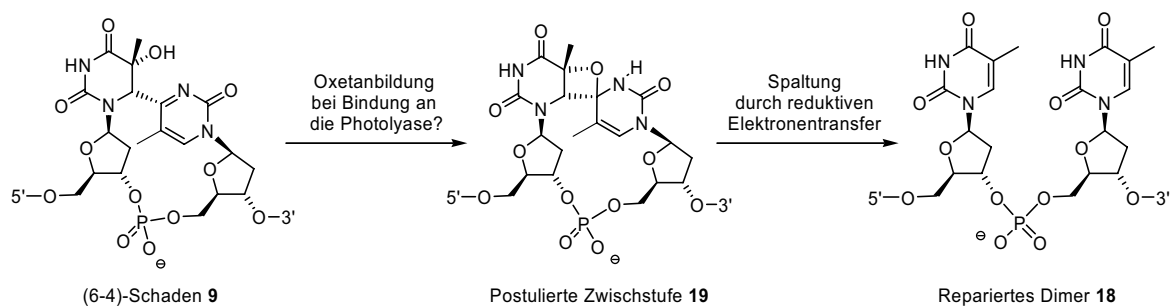
Schema 22: Belichtung des Formacetaldimers **68**.

Das von ihm verwendete Dinukleotidanalogen **68** ist ein guter Vorläufer für den CPD Schaden **69** und kann unter Verwendung eines Triplettensensibilisators photochemisch in guter Ausbeute in diesen umgewandelt werden. Bei Belichtung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm hingegen, wie für die Entstehung des (6-4)-Schadens notwendig, war nur ein sehr geringer Umsatz zu Photoprodukt **70** zu beobachten (Schema 22). Auch bei langen Belichtungszeiten konnte nur eine maximale Ausbeute von ca. einem Prozent erzielt werden, da sich unter diesen Belichtungsbedingungen das Produkt wieder zersetzte. *Komatsu* und Mitarbeiter berichteten hingegen darüber, dass sie eine sehr ähnliche Belichtung mit etwa 30 % Ausbeute an (6-4)-Schaden durchgeführt hätten.^[197] Jedoch zeigen die von ihnen publizierten HPLC-Chromatogramme auch nur sehr geringe Ausbeuten. Unter Verwendung eines geschützten, Phosphat verbrückten Dinukleotides ist die Ausbeute zwar etwas höher, allerdings ist auch in diesem Fall eine sehr aufwendige HPLC Reinigung erforderlich.^[194, 196]

Basierend auf diesem Dinukleotid wurde vor kurzem auch die Synthese eines Phosphoramiditbausteins des Dewar-Schaden für die DNA Synthese veröffentlicht.^[199]

Da die bisherigen Synthesewege zu Phosphoramiditbausteinen des (6-4)-Schadens nur wenig effizient sind, ist die Synthese von DNA mit einem (6-4)-Schaden aufwendig und kann nicht ohne weiteres in großem Maßstab erfolgen. Für biochemische Untersuchungen wurde den (6-4)-Schaden enthaltende DNA daher häufig durch direkte Belichtung von kurzen Oligonukleotiden gewonnen.^[200, 201] Diese Methode ist effizienter, erfordert aber ebenfalls eine aufwendige HPLC Reinigung. Außerdem ist die vollständige Abtrennung von DNA mit anderen UV-Schäden nicht gewährleistet. Der größte Nachteil ist aber, dass dieses Belichtungsverfahren auf sehr kurze Oligonukleotide beschränkt ist (bis etwa 10 Nukleotide). Sowohl für die meisten biochemischen Experimente als auch für strukturelle Untersuchungen werden aber längere Stränge benötigt, so dass die kurzen, belichteten Oligonukleotide mit enzymatischen Methoden verlängert werden müssen. Die verwendeten Methoden, wie die Templat vermittelte Ligation der kurzen Oligonukleotide an längere DNA Strängen, sind jedoch ineffizient und nicht ohne weiteres in großem Maßstab durchführbar. Die Herstellung von großen Mengen an DNA mit einem spezifisch platziertem (6-4)-Schaden ist demnach auch auf diesem Weg kaum möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher versucht werden, einen effizienteren Weg zur Darstellung von DNA mit einem selektiv eingebauten (6-4)-Schaden zu finden. Insbesondere sollte die auf diesem Weg gewonnene DNA geeignet sein, das Enzym (6-4)-Photolyase, das spezifisch den (6-4)-Photoschaden repariert, genauer zu untersuchen. Für dieses Enzym ist ein sehr ungewöhnlicher Reparaturmechanismus postuliert worden, der die Bildung eines Zwischenproduktes in Form eines Oxetans oder Azetidins vorschlägt.^[118] Experimentelle Beweise für die enzymatische Umlagerung des (6-4)-Schadens und die vorgeschlagene Zwischenstufe **19** sind allerdings bisher unbekannt, so dass mechanistische Untersuchungen interessante neue Erkenntnisse ergeben sollten.

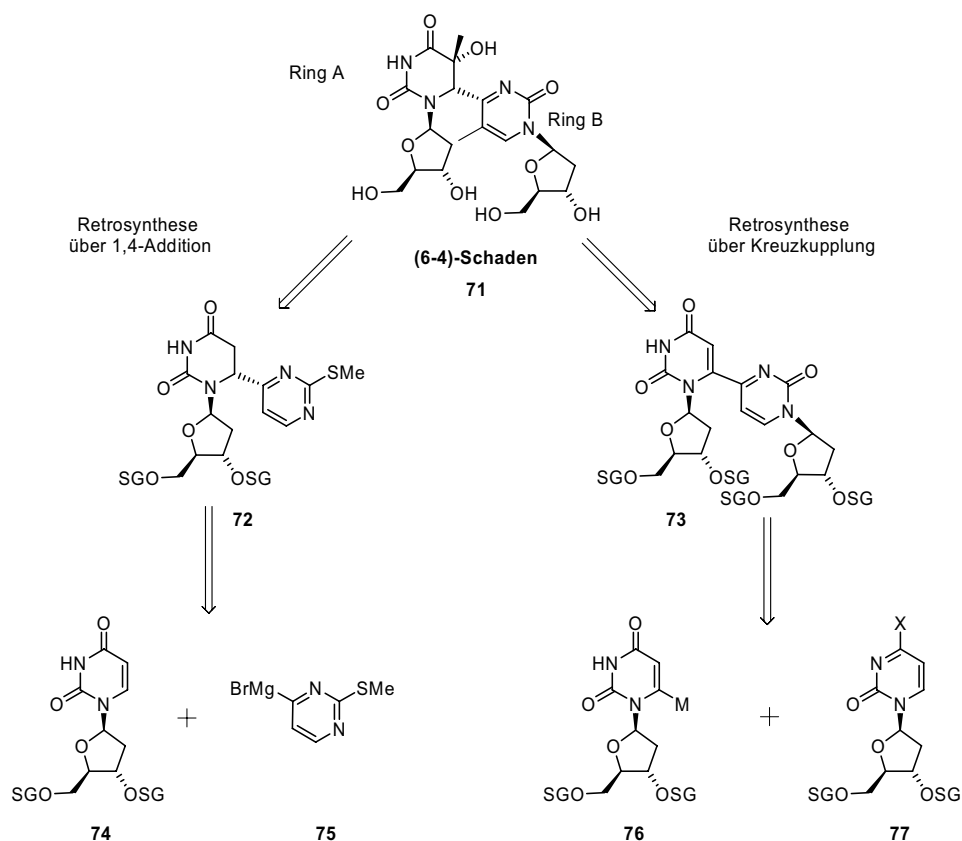


Schema 23: Postulierter Reaktionsmechanismus für die (6-4)-Photolyase.

6.2 Studien zur Totalsynthese des (6-4)-Schadens

Die beste und flexibelste Möglichkeit zur Herstellung von DNA Strängen mit einem genau definierten und positionierten DNA Schaden ist die Festphasensynthese. Ein einfach und in guter Ausbeute herstellbarer Phosphoramiditbaustein des (6-4)-Schadens wäre demnach die Ideallösung zur Darstellung geschädigter Stränge. Da sich die bisherigen, photochemischen Methoden zur Herstellung eines solchen Bausteins nicht bewährt haben, sollten im Rahmen dieser Arbeit andere Möglichkeiten zu dessen Synthese untersucht werden.

Aus Sicht des organischen Chemikers besteht der (6-4)-Schaden aus zwei Pyrimidinnukleosiden, die durch eine Bindung zwischen der 6-Position des Pyrimidinrings **A** mit der 4-Position des 2-Pyrimidinonrings **B** verknüpft sind. Zusätzlich ist der Pyrimidinring **A** teilweise gesättigt und hydroxyliert und enthält daher zwei Stereozentren, deren Aufbau in einer potentiellen Synthese berücksichtigt werden muss.



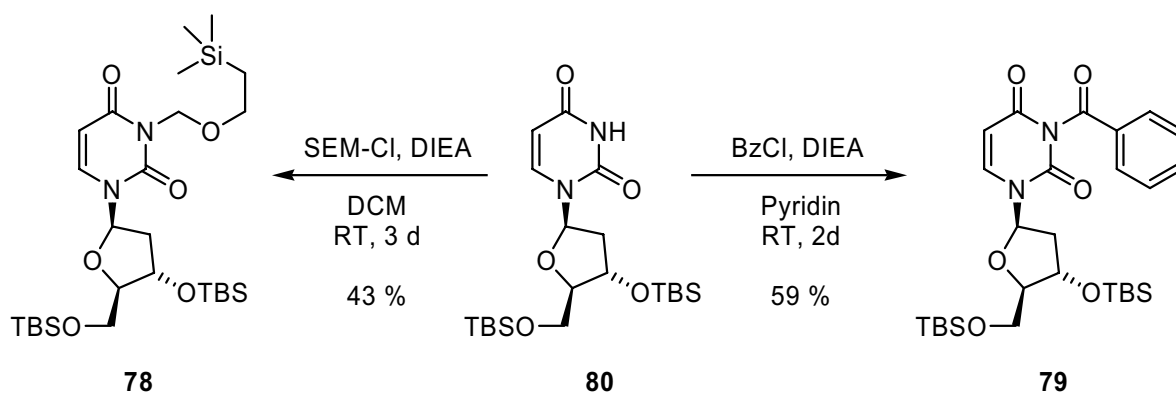
Schema 24: Retrosyntheschema des (6-4)-Photoschadens **71**.

Aus strategischer Sicht erscheint der Aufbau des Schadens aus zwei Pyrimidinnucleosidbausteinen, die unter Bildung der 6-4-Bindung verknüpft werden, am sinnvollsten. Dadurch ist im besten Fall weder eine Glykosylierung noch der Aufbau eines der Pyrimidinringe

notwendig, so dass mit einer kurzen und effizienten Synthese gerechnet werden kann. Als Methoden zur Verknüpfung der Ringe kommen sowohl die 1,4-Addition eines 4-Pyrimidinon-nukleophils an ein Uridinderivat als auch verschiedene Kreuzkupplungen in Frage.

6.2.1 1,4-Additionen von Cupraten an Uridinderivate

Die Knüpfung der (6-4)-Bindung durch die 1,4-Addition eines Pyrimidinnukleophiles an Uridin erfordert zwei Bausteine: Ein *N*- und *O*-geschütztes Uridin und eine 4-Pyrimidinorganometallverbindung. Während die Herstellung eines geschützten Uridins einfach ist, ist die Auswahl an metallierten Pyrimidinen eingeschränkt. Lithierte Pyrimidine sind häufig sehr instabil und können, wenn überhaupt, nur bei sehr tiefen Temperaturen hergestellt werden. Bei höheren Temperaturen erfolgt häufig eine Addition an ein zweites Pyrimidin, da der Heterozyklus sehr elektrophil ist. Auch Grignard-Reagenzien aus Pyrimidinen waren lange Jahre kaum bekannt, da auch hier die Reaktion mit sich selbst ein Problem darstellt. Seit kurzem können sie aber nach der Methode von *Knochel* durch Halogen-Magnesiumaustausch hergestellt werden.^[202-204] 2-Thiomethyl-pyrimidin-4-magnesiumbromid könnte daher ein geeignetes Grignard-Reagenz für die 1,4-Addition sein.

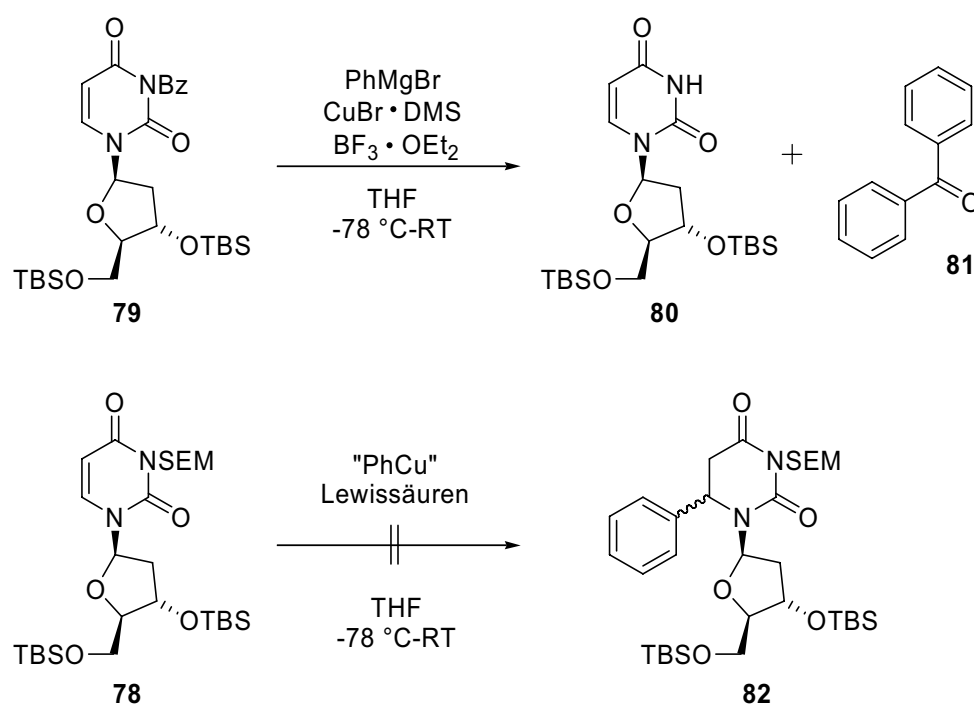


Schema 25: Schützung von **80**.

Die 1,4-Addition von Organometallverbindungen an Uridin ist bisher nicht beschrieben worden. Problematisch könnte insbesondere die Aufhebung der Aromatizität im Produkt dieser Reaktion sein, da dadurch die Reaktion energetisch ungünstig wird. Außerdem handelt es sich bei Uridin formal um ein Amid, die keine guten 1,4-Akzeptoren sind. Andererseits ist der Pyrimidinring sehr elektronenarm und begünstigt daher die Addition von Nukleophilen, typischerweise in 4- oder 6-Position. Um die Reaktivität von Uridinen als 1,4-Akzeptoren zu untersuchen, wurden daher die geschützten Uridine **78** und **79** hergestellt und ihre Reaktion mit Phenylmagnesiumcupraten als Modellcuprat untersucht (Schema 25). Uridin **79** wurde am

Stickstoff mit einer Benzoylgruppe geschützt, um den Heterozyklus elektronenärmer und damit reaktiver zu machen, während für **78** die sehr stabile SEM-Schutzgruppe ausgewählt wurde.

Die Uridine **78** und **79** wurden ausgehend von dem bekannten, 3',5'-TBS-geschütztem Uridin **80** hergestellt.^[205] Umsetzung mit Benzoylchlorid unter Standardbedingungen führte zu dem *N*-Benzoyl geschützten Uridin **79**, während die Umsetzung mit SEM-Cl und Hünig-Base das *N*-SEM geschützte Uridin **78** ergab. Die Ausbeuten sind nicht optimiert und insbesondere im Fall des Uridins **78** ist eine Verbesserung möglich, da nur ein unvollständiger Umsatz beobachtet wurde.



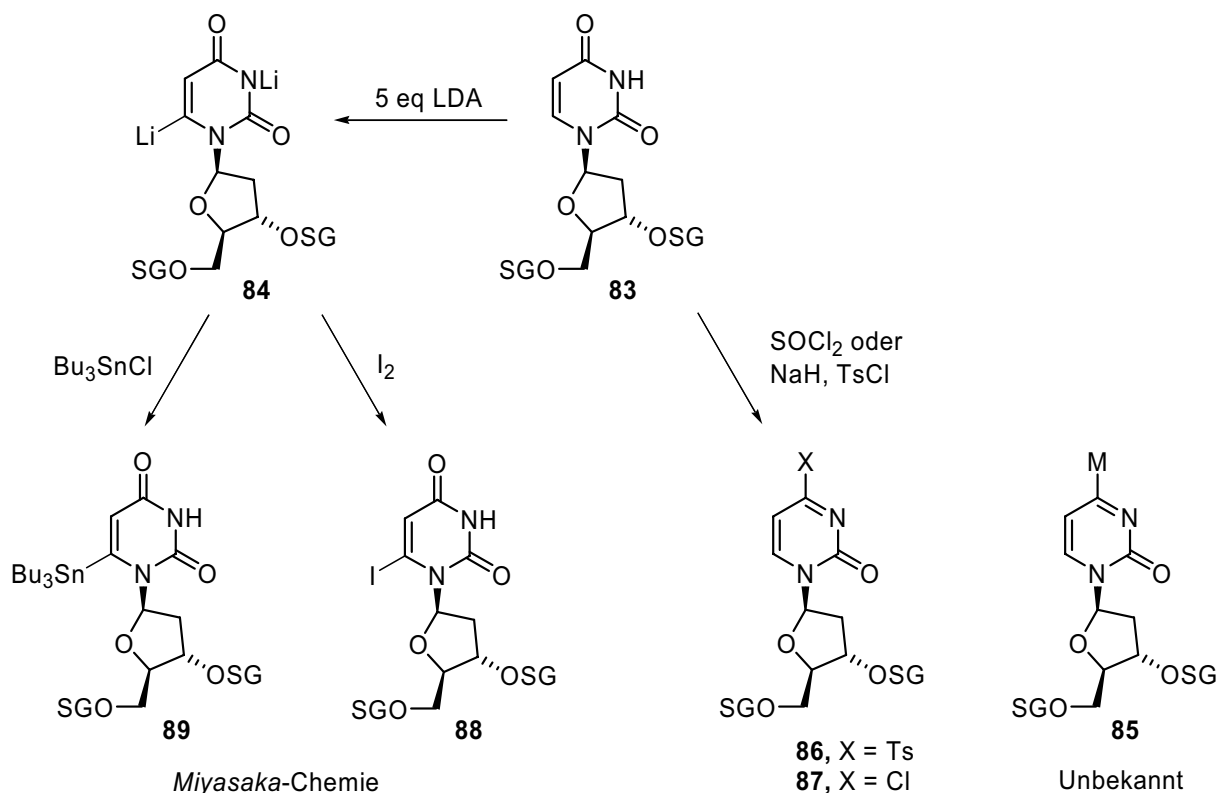
Schema 26: 1,4-Addition an geschützte Uridine.

Die Umsetzung von Uridin **79** mit einem Phenylcuprat ergab nicht das gewünschte 1,4-Additionsprodukt (Schema 26). Statt eines 1,4-Angriffs addierte das Cuprat an die Carbonylgruppe der Schutzgruppe unter Bildung von Benzophenon und dem Uridin **80**. Auch alle Versuche das *N*-SEM geschützte Uridin **78** mit einem Cuprat unter 1,4-Addition umzusetzen waren erfolglos. Obwohl verschiedene Cuprate unterschiedlicher Stöchiometrien (CuX: PhMgBr 1:1, 1:2, CuX = CuBr·DMS, LiCl₂·CuCN) mit oder ohne Zusatz von Lewisäuren (TMS-Cl, BF₃OEt₂) untersucht wurden, erfolgte keine Reaktion. Nur bei Verwendung von BrMg(CuPh₂) (hergestellt aus LiCl₂·CuCN und 2 eq BrMgPh) unter Zusatz von TMS-Cl und DMAP konnte die Bildung neuer Verbindungen beobachtet werden. Leider

wurden auch hier nur ein geringer Umsatz und die Entstehung mehrerer Produkte beobachtet. Eines dieser Produkte konnte in kleinen Mengen in etwa 80 %iger Reinheit isoliert werden. Das Produkt hat die für die Addition eines Phenylrings erwartete Masse 664 und wohl auch die entsprechende Summenformel (HRMS für $C_{33}H_{60}N_2NaO_6Si_3$: 687,3648 (gef.); 687,3651 (ber.)). Das 1H -NMR-Spektrum zeigt aber, dass es sich bei dieser Verbindung nicht um ein 5,6-Dihydropyrimidin handelt, sondern dass die Addition wahrscheinlich an einer Carbonylgruppe erfolgt ist. Leider konnte die Verbindung, auch wegen der geringen erhaltenen Menge, nicht weiter gereinigt und daher auch nicht endgültig identifiziert werden. Da diese ersten Versuche sehr schnell zeigten, dass die 1,4-artige Addition an die 6-Position von Uridin nur sehr schwer zu erreichen ist, wurde die Versuche zugunsten der gleichzeitig erfolgreich verlaufenden Kreuzkupplungen eingestellt.

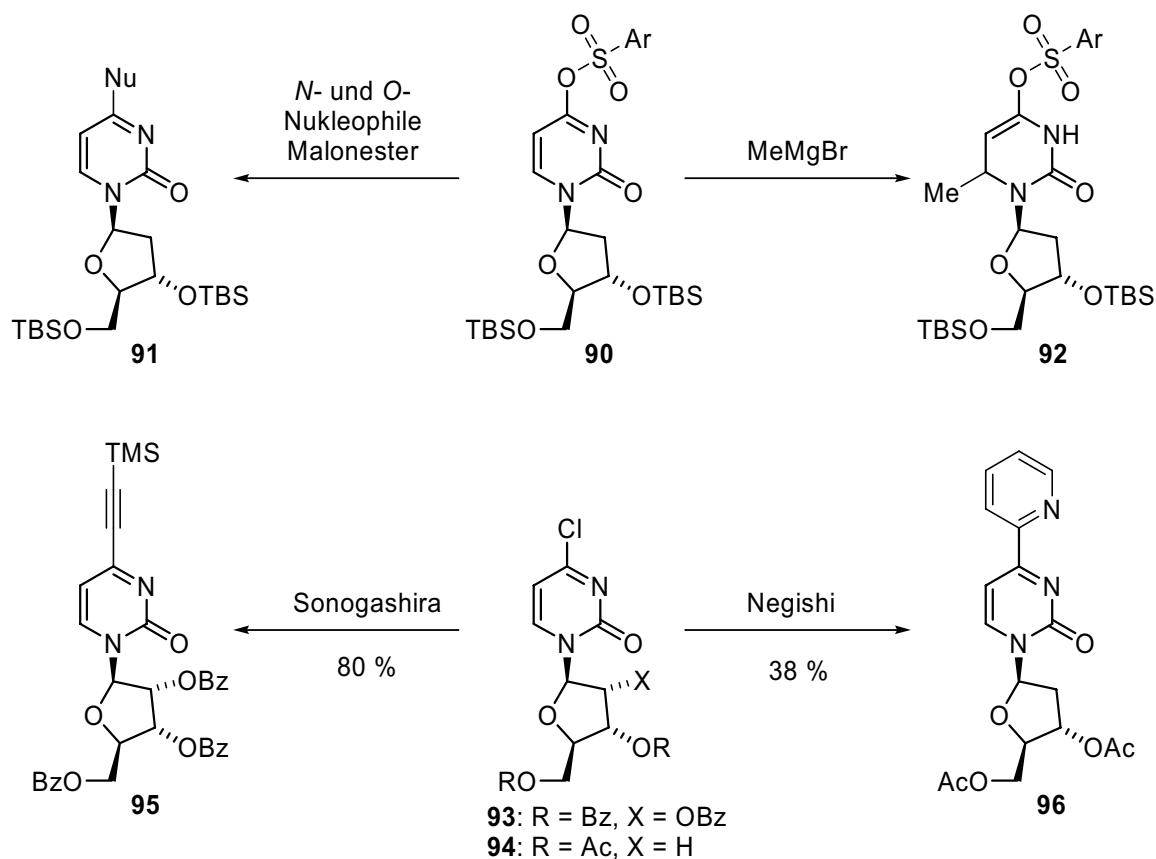
6.2.2 Kreuzkupplungen mit 4-Arylsulfonaten von 2-Pyrimidinonnukleosiden

Eine Alternative zur Knüpfung der (6-4)-Bindung sind Kreuzkupplungsreaktionen. Palladium katalysierte Kreuzkupplungsreaktionen wie die Suzuki oder die Stille Kupplung sind schon häufig zur Synthese von modifizierten Nucleosiden, insbesondere von Purinnucleosiden, eingesetzt worden.^[206-210] Diese Reaktionen zeichnen sich oft durch hohe Selektivität und milde Bedingungen aus.



Schema 27: Substituierte Uridine als Ausgangsmaterialien für Kreuzkupplungen.

Zur Knüpfung der (6-4)-Bindung durch eine Kreuzkupplung werden ein metalliertes Nucleosid (Boronsäure, Organozinn- oder Organozinkverbindung) und ein Nucleosid mit einer geeigneten Abgangsgruppe (Halogen, Triflat, Tosylat) benötigt. In 6-Position substituierte Uridine als Vorläufer des Dihydropyrimidinrings **A** sind in großer Anzahl bekannt und können durch direkte Lithierung hergestellt werden.^[211-214] Für den Pyrimidinonring **B** sind allerdings nur wenige geeignete Vorläufermoleküle bekannt (Schema 24 und 27). In 4-Position metallierte Pyrimidinnucleoside **85** wurden bisher noch nicht hergestellt. Als Abgangsgruppen in dieser Position kommen nur Arylsulfonate **86**^[215, 216] und Chloride **87**^[217] in Frage, da die reaktiveren Bromide und Iodide schon zu instabil sind. Daher wurden bisher auch die meisten 4-C-substituierten Pyrimidinnucleoside aufwendig über die Glykosylierung der entsprechend substituierten Heterozyklen hergestellt.^[218, 219]

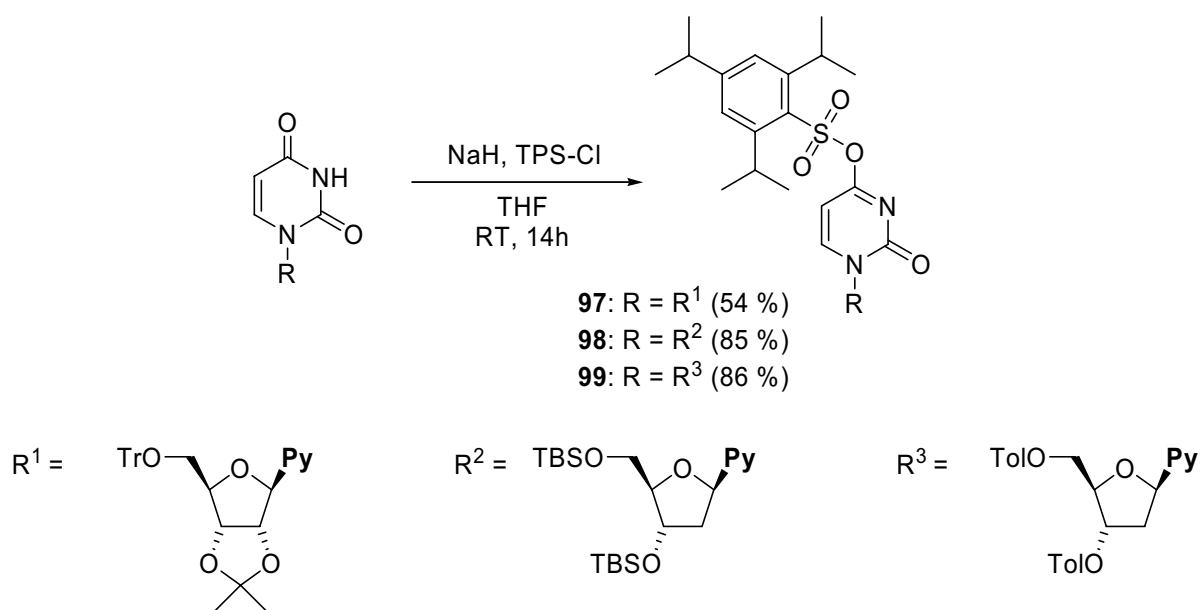


Schema 28: Reaktionen von Uridinen mit einer Abgangsgruppe in 4-Position.

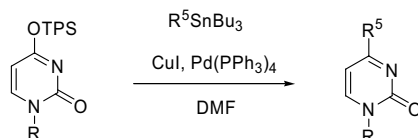
Die 4-*O*-Arylsulfonate des Uridins **90** wurden schon häufig für die Synthese von in 4-Position substituierten Pyrimidinnucleosiden benutzt. Mit *N*- und *O*- Nucleophilen erfolgt eine glatte Reaktion zu den entsprechenden, *N*- oder *O*-substituierten 2-Pyrimidinonen **91**.^[220, 221] Die einzigen *C*-Nucleophile, die eine ähnliche Reaktivität zeigen, sind hoch nucleophile Malonester und ihre Derivate.^[215] Organometallverbindungen reagieren interessanterweise

unselektiv oder unter Addition an die 6-Position.^[222] Die den Arylsulfonaten entsprechenden Chloride zeigen eine ähnliche Reaktivität, sind aber deutlich instabiler. Chlorid **93** wurde von *Acevedo* et al. schon in Sonogashira Kupplungen eingesetzt.^[223] Außerdem verwendete die Gruppe *Switzer* **94** als Substrat für eine Negishi-Kupplung mit Pyridylzinkbromid.^[224] Die Ausbeute war mit 38 % allerdings gering.

Für Kreuzkupplungsreaktionen erwiesen sich die *O*-Arylsulfonate des Uridins als geeigneter als die Chloride, insbesondere auf Grund der höheren Stabilität. Während die Chloride sich schon bei säulenchromatographischer Reinigung teilweise zersetzen, gelang die Chromatographie der 2,4,6-Diisopropylbenzonsulfonate problemlos. Auch die längerfristige Lagerung dieser Verbindungen bei -20°C ist möglich. Die Synthese der *O*-Arylsulfonate erfolgte am besten nach einer bekannten Vorschrift mit Natriumhydrid und 2,4,6-Triisopropylbenzonsulfonylchlorid in THF.^[215] Nach säulenchromatographischer Reinigung wurden die Ausgangsverbindungen **94-96** in guten Ausbeuten erhalten (Schema 29).



Schema 29: Darstellung von 4-Uridinarylsulfonaten (TPS-Cl: 2,4,6-Triisopropylbenzonsulfonylchlorid). Erste Versuche die Arylsulfonate **97-99** in Suzukikupplungen oder Heckreaktionen einzusetzen, waren nicht erfolgreich. Die für diese Reaktionen notwendige Base führte zur raschen Hydrolyse der Arylsulfonate. Daher wurden anschließend Stille- und Negishikupplungen untersucht, die ohne eine Base auskommen. Die Reaktion von (Phenylethynyl)-tributylzinn mit dem Arylsulfonat **97** erfolgte mit Pd(PPh₃)₄ als Katalysator und unter Zusatz von Kupferiodid in DMF problemlos (Tabelle 6). Bei 55 °C konnte nach 24 h eine annähernd vollständige Umsetzung des Arylsulfonates erreicht werden.

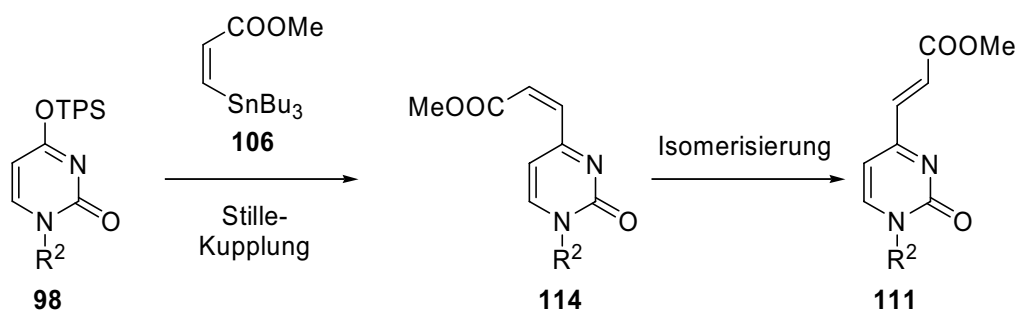


Eintrag	Substrat	Nukleophil	Produkt	Ausbeute
1	97	 101	 108	64 %
2	98	 102	 109	76 %
3	99	 103	 110	48 % ^a
4	99	 104	 110	71 %
5	98	 105	 111	71 % ^a
6	98	 106	 111	76 %
7	98	 107	 112	64 % ^b
8	 100	 107	 113	93 % ^{b,c}

Tabelle 6: Sille-Kreuzkupplungen mit 4-Uridarylsulfonaten (Bedingungen: Arylsulfonat 1 eq, Nukleophil 1,5 eq, CuI 0,2 eq, Pd(PPh₃)₄ 0,1 eq, DMF, 55 °C, 14 h (R⁴ = 2'-desoxy-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-ribofuranosyl, ^a 2,5 eq Nukleophil, ^b 1 eq Nukleophil, °RT).

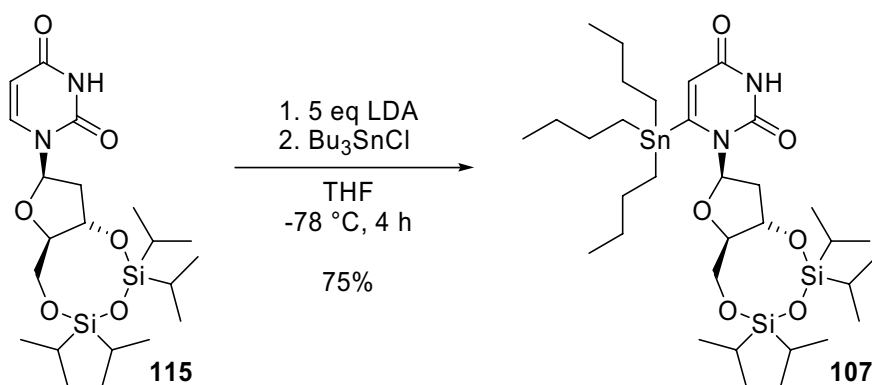
Nach Entfernung des Lösungsmittels und Säulenchromatographie wurde das Produkt **108** in 64 % Ausbeute erhalten. Ähnlich gut gelang auch die Umsetzung der anderen Substrate mit den unterschiedlichsten Zinnnukleophilen (Tabelle 6). Ethinyl-, ethenyl- und heterozyklische Zinnnukleophile können mit den Arylsulfonaten in guter Ausbeute umgesetzt werden.

Sehr interessant verlief die Umsetzung mit Acrylesterderivaten. Egal ob *E*- oder *Z*-3-Tributylstannylacrylsäure-*tert*-butylester als Nukleophil verwendet wurde, das Produkt **110** wies immer eine *E*-konfigurierte Doppelbindung auf (Tabelle 6, Eintrag 3 und 4). Bei Verwendung des *E*-konfigurierten Nukleophils konnte allerdings nur eine sehr langsame Umsetzung zum Produkt beobachtet werden und nur die Verwendung von 2,5 Äquivalenten des Esters ergab eine befriedigende Ausbeute. Um diese interessante Reaktion genauer zu untersuchen und den Einfluss des sterisch anspruchsvollen *tert*-Butylesters zu studieren, wurden die Kupplungen mit *E*- und *Z*-3-Tributylacrylsäuremethylester wiederholt. Das Ergebnis war sehr ähnlich (Tabelle 6, Eintrag 5 und 6). Wieder konnte in beiden Fällen nur das *E*-konfigurierte Produkt **111** isoliert werden und die Reaktion mit dem *E*-Nukleophil war deutlich langsamer. In einem Fall allerdings wurde aus der Reaktion von **98** mit **106** ein Produktgemisch erhalten, das laut ¹H-NMR-Spektrum neben dem *E*- auch das *Z*-konfigurierte Produkt **114** enthielt. Das Produkt **114** isomerisierte anschließend im Lauf von zwei Tagen in Chloroformlösung zum *E*-konfigurierten **111**. Diese Beobachtung könnte die ungewöhnlichen Ergebnisse mit den Acrylsäurenukleophilen erklären (Schema 30): Die Stillekupplung erfolgt wie in den meisten Fällen an allen Substraten unter Retention der Konfiguration der Doppelbindung.^[225] Anschließend erfolgt für die Produkte mit einer thermodynamisch ungünstigen, *Z*-konfigurierten Doppelbindung eine Isomerisierung zur günstigeren *E*-Konfiguration. Über den Mechanismus des Isomerisierungsschrittes kann nur spekuliert werden. Einerseits sollten die stark elektronenziehenden Substituenten der Doppelbindung eine Basen-katalysierte Isomerisierung begünstigen. Andererseits kann auch eine photochemische Reaktion nicht ausgeschlossen werden.



Schema 30: Vorgeschlagener Mechanismus für die Bildung von Alken **111** durch eine Stille-Kreuzkupplung von **98** mit Nukleophil **106**.

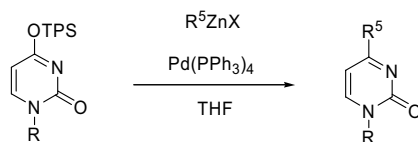
Da das Ziel dieser Arbeiten die Synthese des (6-4)-Schadens war, wurde das heterozyklische Zinnnukleosid **107** hergestellt. Die Synthese erfolgte über die von *Miyasaka* entwickelte, direkte Lithierung der 6-Position von geschützten Uridin mit LDA und anschließender Reaktion mit Tributylzinnchlorid.^[213, 214] Das Nukleosid **107** konnte auf diesem Weg in guten 75 % Ausbeute erhalten werden (Schema 31). Wichtig war allerdings die Reaktion schon bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu stoppen, da sich sonst ein Teil des gebildeten Nukleosids **107** wieder zersetzte. Außerdem erfolgte eine Lithierung der 6-Position von Uridin interessanterweise nur mit der zyklischen Tetraisopropylidisiloxanschutzgruppe. Sind die Hydroxygruppen TBS geschützt, gelingt die Lithierung in Einklang mit den meisten Literaturangaben nicht (Groziak et al. berichten allerdings über eine gelungene Lithierung der 6-Position von TBS-geschütztem 2'-Deoxyuridin).^[226, 227]



Schema 31: Herstellung des Nukleosids **107** durch Lithierung des geschützten Uridins **115**.

Die Umsetzung des Nukleosids **107** mit dem Arylsulfonat **98** erfolgte ebenso problemlos wie alle vorherigen Stillekupplungen (Tabelle 6, Eintrag 7). Für diese Reaktion mit dem wertvollen Nukleosid **107** konnte sogar auf einen Überschuss dieser Verbindung verzichtet werden. Das Dinukleosid **112**, das schon das komplette Kohlenstoffgerüst des UC-(6-4)-Schadens enthält, wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in 64 % Ausbeute erhalten. Das Zinnnukleosid **107** wurde ebenfalls mit dem Chlorid **100** zu Dinukleosid **113** umgesetzt, um eine alternative Schutzgruppenstrategie in der Synthese des (6-4)-Schadens zu ermöglichen (Tabelle 6, Eintrag 8). Hier wurde ausnahmsweise das Chlorid verwendet, da das Chlorid **100** kristallin und als solches relativ stabil ist. Unter Verwendung der Standardbedingungen konnte eine exzellente Ausbeute von 93 % erzielt werden. Diese Versuche zeigen, dass die Stillekupplung hervorragend zur Synthese von 4-substituierten 2-Pyrimidinonen geeignet ist und damit eine gute Möglichkeit zum Aufbau des Gerüsts des (6-4)-Schadens bildet.

Eine interessante Alternative zur Stillekupplung ist die Negishikupplung, da statt der giftigen Zinnorganyle Zinkverbindungen eingesetzt werden. Daher wurde auch die Reaktion der Arylsulfonate **97-99** mit Organozinkverbindungen untersucht.



Eintrag	Substrat	Nukleophil	Produkt	Ausbeute
1	97	116	121	74 %
2	117	116	122	68 % ^a
3	98	BuZnX 118	123	48 %
4	98	Me ₂ Zn 119	124	61 % ^b
5	99	120	113	11 %

Tabelle 7: Negishi-Kreuzkupplungen mit 4-Uridarylsulfonaten (Bedingungen: Arylsulfonat 1 eq, Nukleophil 2 eq, Pd(PPh₃)₄ 10 mol%, THF, RT, 14 h (R⁴ = 2'-desoxy-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-ribofuranosyl, ^a Reaktionszeit 3 d, 2,5 mol% Pd(dppf)₂Cl₂, ^b 0,5 mol% Pd(PPh₃)₄).

Phenylzinkchlorid **116**, hergestellt durch die Transmetallierung von Phenylmagnesiumbromid auf Zinkchlorid, konnte unter Katalyse durch Pd(PPh₃)₄ in THF mit dem Arylsulfonat **97** gekuppelt werden (Tabelle 7). Im Gegensatz zur Stillekupplung führt hier sogar die Reaktion bei Raumtemperatur zu einer Ausbeute von 74 %. Daher wurde auch das sterisch

anspruchsvolle Thymidinarylsulfonat **117** als Ausgangsmaterial in einer Negishikupplung getestet. Auch dieses schwierige Substrat konnte mit Phenylzinkchlorid **116** umgesetzt und das Produkt **122** in 68 % Ausbeute erhalten werden. Allerdings wurde in diesem Fall eine Reaktionszeit von drei Tagen benötigt und statt Pd(PPh₃)₄ wurde Pd(dppf)Cl₂ als Katalysator benutzt.^[228] Die Negishikupplung mit Uridinarylsulfonaten eignet sich auch zur Knüpfung von sp³-sp²-Bindungen. So konnten auch Butylzinkchlorid **118** und Dimethylzink **119** mit dem Arylsulfonat **98** gekuppelt werden. Mit Dimethylzink gelang dieses sogar mit nur 0,5 mol% Pd(PPh₃)₄ Katalysator. Die Ausbeuten waren in beiden Fällen allerdings etwas niedriger, eventuell wegen der in sp³-sp²-Kupplungen problematischen β -Hydrideliminierung. Die Verwendung von Pd(dppf)Cl₂, einem Katalysator der diese Nebenreaktion unterdrücken soll, führte allerdings nur zu ähnlichen und nicht zu besseren Ausbeuten als Pd(PPh₃)₄.^[228]

Eine interessante Alternative zur Synthese der Dinukleoside **112** und **113** könnte die direkte Transmetallierung von 6-lithierten Uridinen auf Zink mit folgender Negishikupplung sein. Dieses Verfahren würde eine Stufe gegenüber der Route über die Zinnverbindung **107** einsparen und insbesondere auch ohne giftige Zinnorganyle auskommen. Versuche zu dieser Reaktion zeigten allerdings, dass nur eine geringe Ausbeute (11 %) an Dinukleosid erhalten wird. Stattdessen wurde der größte Teil des Arylsulfonates **99** zu Uridin hydrolysiert. Die vermutliche Ursache für diese Reaktion ist der große Überschuss an Base (vier Äquivalente LDA), der für die Lithiierung von Uridin benötigt wird.

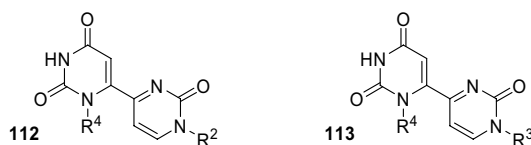
Sowohl Stille- als auch Negishikupplungen ermöglichen die effiziente und einfache Synthese einer Vielzahl von 2-Pyrimidinonnukleosiden mit einem C-Substituenten in 4-Position. Über diese Reaktionen können sp³-, sp²- und sp-hybridisierte Kohlenstoffsubstituenten eingeführt werden. Die resultierenden Produkte sind nicht nur wertvolle Bausteine für die Synthese des (6-4)-Schadens, sondern auch potenziell für die Medizinalchemie von großem Interesse. Die Palladium katalysierten Kreuzkupplungen ermöglichen somit erstmals, Bibliotheken dieser Verbindungen herzustellen und auf ihre potentiellen pharmakologischen Eigenschaften zu untersuchen.

6.2.3 Synthesestudien zum (6-4)-Schaden

Die Stillekreuzkupplungen mit 4-Arylsulfonaten des Uridins ermöglichen die effiziente Herstellung der Moleküle **110-113**, die als Ausgangspunkt für die Synthese des (6-4)-Schadens geeignet sein sollten. Insbesondere **109** und **110** enthalten schon alle Kohlenstoffatome eines UC-(6-4)-Schadens mit der richtigen Verknüpfung untereinander. Daher wurden mit diesen Verbindungen Versuche zur Synthese des Schadens unternommen.

112 und 113 als Vorläufer für den (6-4)-Schaden

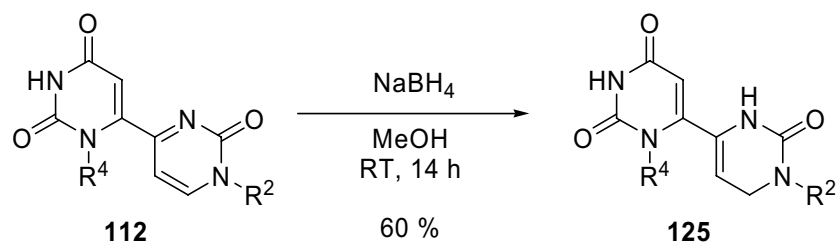
Für die Synthese des (6-4)-Schadens aus **112** oder **113** ist eine selektive Modifikation des 6-substituierten Pyrimidinrings **A** notwendig. Dieser muss in einen Dihydropyrimidinring mit einer Hydroxylgruppe in 5-Position umgewandelt werden. Wenn möglich sollte dabei der Aufbau der neu entstehenden Stereozentren stereoselektiv erfolgen.



Reaktion	Substrat	Reagenz	Katalysator	Ergebnis
Hydrierungen				
Heterogen	112,113	H ₂	Rh/Al ₂ O ₃ , Pd/C,	Produktgemische
Homogen	112,113	H ₂	(PPh ₃) ₃ RhCl, (BINAP)Rh(COD)BF ₄	Keine Reaktion
Reduktionen				
Hydrosilylierung	113	PhMe ₂ SiH, (MeO) ₃ SiH	(BINAP)Rh(COD)BF ₄	Keine Reaktion
	112	PhSiH ₃	H ₂ PtCl ₆	Produktgemisch
Mit Hydriden	112	NaBH ₄	- , Co(Salen) ^[229, 230]	Siehe Text
„CuH“	112	PhSiH ₃ , (MeO) ₃ SiH	Cu(BINAP)Br ^[231]	Keine Reaktion
Elektrophile aromatische Substitutionen				
Nitrierung	113	NO ₂ BF ₄ NH ₄ NO ₃ /TFAA	-	Zersetzung Keine Reaktion
Diazotierung	113	4-BrPhN ₂ BF ₄	-	Keine Reaktion
Bromierung	112,113	NBS	-	Bromierung an Ring B
Sonstige Reaktion				
Bishydroxylierung	113	NMO, AD-Mix	K ₂ OsO ₄ ^[232, 233]	Keine Reaktion
Hydroborierung	112	9-BBN	-	Zersetzung

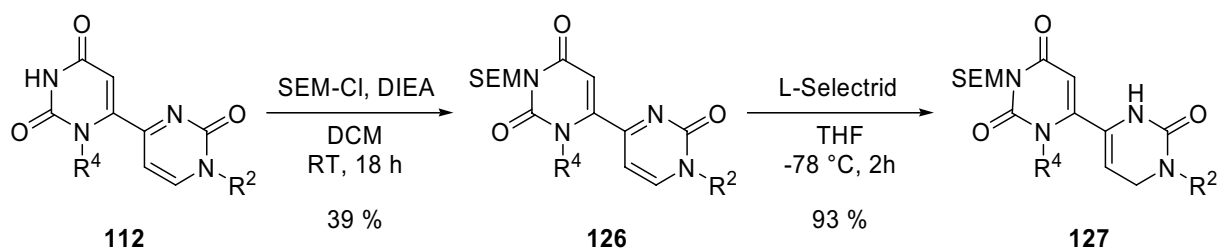
Tabelle 8: Versuche zur selektiven Modifikation der Verbindungen **112** und **113**.

Zur selektiven Modifizierung von **112** und **113** wurden sehr viele Versuche durchgeführt. Trotzdem konnte keine Methode gefunden werden, die als Grundlage für die Umwandlung einer dieser beiden Verbindungen in den (6-4)-Schaden geeignet wäre. Die Verbindung **112** und **113** erwiesen sich in vielen Fällen als reaktionsträge (Tabelle 8). Wenn doch eine Reaktion erfolgte, wurden in den meisten Fällen komplexe Produktgemische erhalten. Außerdem reagierte häufig der Pyrimidinonring **B** zuerst.



Schema 32: Die Reduktion von **112** mit Natriumborhydrid ($R^4 = 2'$ -desoxy-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-ribofuranosyl, R^2 siehe Schema 29).

So scheiterten alle Versuche zur selektiven Reduktion der 5-6-Doppelbindung des Pyrimidinringes **A**. Entweder erfolgte gar keine Reaktion (homogene Hydrierung, Hydrosilylierung mit allen Katalysator bis auf H_2PtCl_6) oder es wurde ein Produktgemisch erhalten (heterogene Hydrierung, Hydrosilylierung mit H_2PtCl_6 als Katalysator). Nur die Reduktion von **112** mit Natriumborhydrid ergab in guter Ausbeute selektiv ein einziges Produkt, das 3,6-Dihydropyrimidinon **125** (Schema 32). Die Reduktion erfolgte hier vermutlich durch Addition des Hydrids an die 6-Position des Pyrimidinonringes.



Schema 33: Die SEM-Schützung von **112**, gefolgt von der Reduktion von mit Natriumborhydrid ($R^4 = 2'$ -desoxy-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-ribofuranosyl, R^2 siehe Schema 29).

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Selektivität könnte in diesem Fall die Deprotonierung des NH-Protons des Pyrimidinringes **A** durch das Natriumborhydrid sein. Dadurch ist der Pyrimidinring **A** weniger elektrophil, so dass der Pyrimidinonring **B** bevorzugt reduziert wird. Um dies zu überprüfen, wurde die NH-Gruppe von **112** mit SEM

geschützt. Dies gelang problemlos unter Standardbedingungen. Die Ausbeute war allerdings niedrig, da bei der verwendeten, kurzen Reaktionszeit noch kein vollständiger Umsatz erreicht wurde. Die geschützte Verbindung **126** wurde mit einem Borhydrid umgesetzt. In diesem Fall wurde L-Selectrid statt Natriumborhydrid verwendet, um die Stöchiometrie in den kleinen Ansätzen besser kontrollieren zu können.^[234] Aber auch hier wurde wieder die Reduktion des Pyrimidinonringes zur 3,6-Dihydroverbindung **127** beobachtet.

In weiteren Experimenten wurde versucht, die Verbindungen **112** und **113** in elektrophilen aromatischen Substitutionsreaktionen einzusetzen. Auch hier konnte mit verschiedenen Elektrophilen keine selektive Umsetzung beobachtet werden. Mit NBS erfolgte immerhin eine sehr langsame Umsetzung von **112** zu einem Produkt, das durch Massenspektrometrie als monobromiert identifiziert werden konnte. So weit allerdings aus dem ¹H-NMR-Spektrum der sehr kleinen Menge des isolierten Produktes ersichtlich, erfolgt auch hier die Bromierung am Pyrimidinonring B. Versuche, die Verbindungen **112** und **113** zu nitrieren oder zu diazotieren, ergaben keine Umsetzung, oder, bei Nitrierung mit NO₂BF₄ in Sulfolan, führten zur Zersetzung.

Die Verbindung **112** wurde auch als Substrat in Hydroborierungen und Bishydroxylierungen eingesetzt. Die Hydroborierung mit 9-BBN zeigte eine rasche Umsetzung von **112** mit dem Reagenz zu einer Vielzahl von Produkten schon vor der Oxidation des Borans. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und Natronlauge und folgender Aufarbeitung konnte keines der vielen Produkte identifiziert werden. Die Bishydroxylierung von **112** gelang ebenso wenig.^[235] Weder unter Standardbedingungen noch unter den von Greenberg beschriebenen Bedingungen für die Bishydroxylierung von Uridin konnte eine Umsetzung von beobachtet werden.^[232, 233, 235]

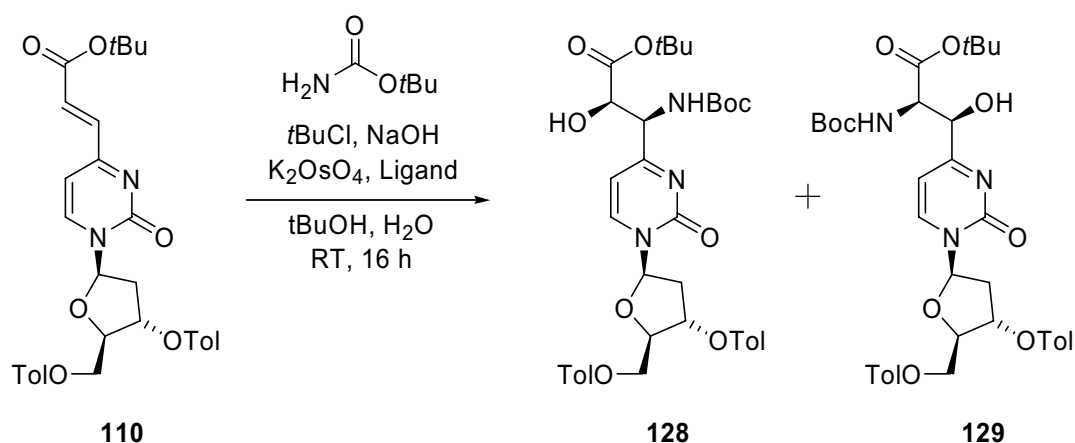
Die vielen, beschriebenen Versuche zeigen, dass die selektive Modifikation der Verbindungen **112** und **113** sehr schwierig ist. Mit keiner der angewandten Methoden konnte eine selektive Reaktion beobachtet werden. Daher wurden die Versuche zur Modifikation dieser beiden Verbindungen zugunsten alternativer Synthesewege abgebrochen.

110 und 111 als Vorläufer für den (6-4)-Schaden

Eine mögliche Alternative zu den Verbindungen **112** und **113** als Startmaterial für die Synthese des (6-4)-Schadens sind die Acrylsäurederivate **110** und **111**. Diese Verbindungen bestehen formal aus dem Pyrimidinonteil des (6-4)-Schadens mit einem Acrylsäurerest in 4-Position. Die drei Kohlenstoffatome des Acrylsäurerestes sind als C3-Baustein für den Aufbau eines Dihydropyrimidinringes geeignet. Formal gesehen sollte die Kondensation mit

einem Harnstoffderivat zu einem Dihydrouracil führen. Die Verbindungen **110** und **111** sollten sich im Vergleich zu **112** und **113** sehr leicht regioselektiv an der exocyclischen Doppelbindung modifizieren lassen, da die C5-C6-Doppelbindung in das aromatische Ringsystem eingebunden ist. Der Nachteil dieser Strategie ist, dass relativ spät in der Synthese eine Glykosylierung des Pyrimidinringes **A** durchgeführt oder der Zucker durch ein Analog ersetzt werden müsste.

Die direkte Umsetzung von 3-substituierten Acrylsäureestern mit Harnstoffen zu Dihydrouracilen ist bekannt, erfordert aber sehr hohe Reaktionstemperaturen und ergibt häufig nur niedrige Ausbeuten.^[236, 237] Außerdem ist auf diesem Weg die Kontrolle der Stereochemie an C-6 des Dihydrouracils nicht möglich. Zur Modifikation der Doppelbindung wurden daher andere Methoden getestet, die bei Raumtemperatur durchgeführt werden können und eventuell die Kontrolle der Stereochemie erlauben.

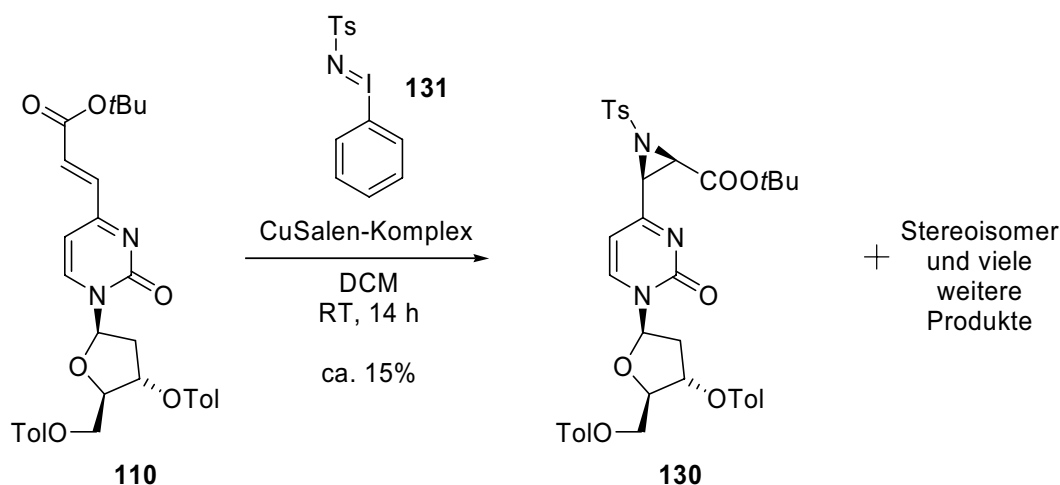


Schema 34: Sharpless-Aminhydroxylierung von Acrylsäurederivat **110**.

Eine interessante Methode ist die Sharpless-Aminhydroxylierung von Doppelbindungen.^[238, 239] Diese Reaktion erlaubt den stereokontrollierten Aufbau von α -Aminoalkoholen aus Doppelbindungen und würde damit, angewandt auf Verbindung **110**, die gleichzeitige Einführung der C5-Hydroxy- und der C6-Aminofunktion erlauben. Für Zimtsäureester, die Verbindung **110** sehr ähnlich sind, ist diese Reaktion beschrieben worden, da die entsprechenden Produkte häufig als Seitenketten für Taxolderivate benutzt worden sind.^[239, 240] Die Verwendung von **110** als Substrat in der Sharpless-Aminhydroxylierung erwies sich aber als problematisch (Schema 34). Unter den üblichen Reaktionsbedingungen ist **110** nur wenig löslich in dem verwendeten Lösungsmittelgemisch (*t*BuOH/Wasser) und häufig wurden nur geringe Umsätze erzielt. Der Zusatz anderer Lösungsmittel wie DMF oder Chloroform erhöhte zwar die Löslichkeit, aber nicht den Umsatz. Außerdem war die

Isolierung eines reinen Produktes schwierig. Auch nach Säulenchromatographie wurden braun-schwarze Stoffgemische erhalten, die vermutlich Reste von metallischem Osmium enthielten. Die Analyse der Hauptfraktionen mit HPLC-MS zeigte allerdings, dass das/die Hauptprodukt/e die Summenformel des Produktes besitzt/en. Das wichtigste Nebenprodukt ist um zwei Masseneinheiten leichter. Es könnte beispielsweise durch eine weitere Oxidation des Produktes zum α -Aminoketon entstehen. Die zugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen komplexe Produktgemische, so dass eine Analyse kaum möglich ist. Eine Erklärung für diese Gemische könnte die fehlende Regioselektivität der Reaktion sein. Die hohen Selektivitäten für Zimtsäureester werden nur für Derivate mit einem elektronenreichen Aromat erreicht, während ähnliche Beispiele für elektronenarme Aromaten fehlen.

Statt der Aminhydroxylierung wurde auch die Sharpless-Bishydroxylierung getestet.^[235] Aber auch hier konnten nur Produktgemische isoliert werden, die überraschenderweise eher noch komplexer als im Fall der Aminhydroxylierung waren.

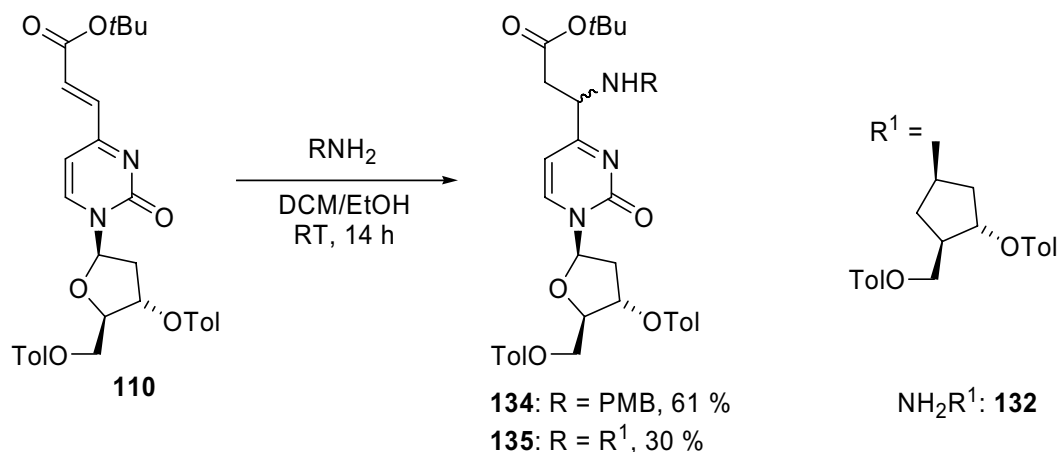


Schema 35: Aziridinierung von **107**.

Auch die asymmetrische Aziridierung von **110** wurde getestet.^[241] Mit einem Kupfersalenkomplex als Katalysator entstand eine komplexe Produktmischung, die auch das gewünschte Aziridin **130** in schlechter Ausbeute enthielt. Zahlreiche Nebenprodukte, darunter vermutlich auch das dem Aziridin entsprechende Epoxid konnten mit HPLC-MS nachgewiesen werden. Interessanterweise führte die Reaktion ohne einen Liganden am Kupfer nur zur Zersetzung des Eduktes.

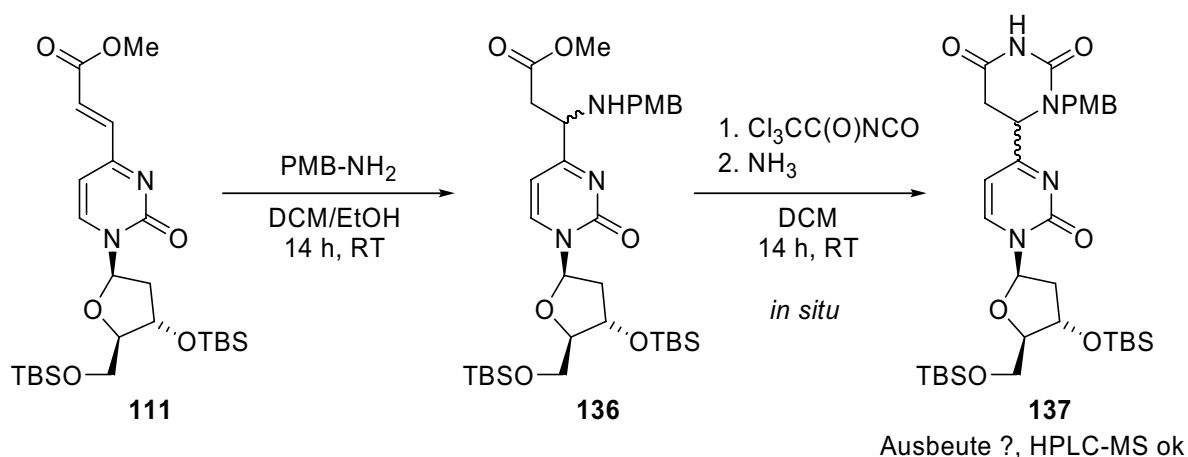
Da die getesteten, asymmetrischen Methoden zur Modifizierung der Doppelbindung sich als ungeeignet erwiesen hatten, wurde die einfache 1,4-Addition von Aminen an den Acrylsäurerest untersucht (Schema 36). Diese Reaktionen verliefen ungewöhnlich sauber. Sowohl 4-Methoxybenzylamin als auch das carbazyklische Ribosylaminanalogon **132**

addierten bei Raumtemperatur an die Doppelbindung (Das Ribosylaminanalogon **132** konnte durch doppelte Toluoylschützung und Boc-Entschützung aus dem bekannten Carbazyklus **133**^[242] gewonnen werden, Experimenteller Teil).



Schema 36: Michaeladdition von Aminen an **110**.

Leider verliefen beide Reaktionen nicht stereoselektiv, so dass die Produkte in etwa als 1:1 Mischung der beiden Diastereomere erhalten wurden. Selbst das Stereozentrum α zur Aminogruppe in **132** hatte keinen Einfluss auf die Reaktion. Außerdem erwiesen sich beide Produkte als oxidationsempfindlich. Deshalb wurde versucht, Verbindung **136** *in situ* zum Dihydropyrimidin **137** zu zyklisieren (Schema 37). Die durchgeführten Versuche verliefen allerdings wenig erfolgreich. Die Isolierung von **137** gelang in keinem Fall, egal mit welchem Reagenz die Reaktion durchgeführt wurde.^[243-245] Nach der Methode von Weinreb (Trichloracetylisocyanat gefolgt von Ammoniak) konnte aber mit HPLC-MS zumindest eine teilweise Bildung des Dihydropyrimidinpyrimidinons **134** gezeigt werden.^[243]



Schema 37: Michaeladdition an **111** gefolgt von einer Ringschlussreaktion.

Nach den geschilderten, ausführlichen Versuchen wurden die Studien zur Synthese des (6-4)-Schadens vorläufig eingestellt. Diese Experimente zeigten, dass der totalsynthetische Aufbau des Dihydropyrimidinpyrimidinonringsystems des Schadens deutlich schwieriger ist, als vorher angenommen wurde. Etablierte Verfahren wie die stereoselektive Reduktion von Doppelbindungen oder die Sharpless-Aminhydroxylierung waren auf die komplizierten, heterozyklischen Substrate nicht ohne weiteres übertragbar. Darüberhinaus konnten in der Zwischenzeit große Fortschritte bei der direkten Belichtung kurzer DNA-Stränge erzielt werden. Dieser Weg erschien daher deutlich geeigneter, um geschädigte DNA in angemessener Zeit herzustellen.

6.3 Die direkte Belichtung kurzer DNA Stränge

6.3.1 Die Belichtung von 5'-AATTAA-3' (DS22)

Die Herstellung des (6-4)-Schadens durch die Belichtung kurzer Oligonukleotide mit UV-C-Strahlung ist eine lange bekannte Methode und wird häufig verwendet.^[200, 201] Gegenüber der Festphasensynthese geschädigter DNA hat diese Methode einige Nachteile. So kann im Regelfall die vollständige Abtrennung von Strängen, die andere Photoschäden enthalten, nicht gewährleistet werden. Außerdem ist diese Methode durch die schwierige Aufreinigung auf kurze Oligonukleotide (bis etwa zum 11mer) beschränkt, so dass häufig in einem zweiten Schritt eine Verlängerung der DNA mit enzymatischen Verfahren notwendig ist.

Da sich aber gezeigt hat, dass im Fall des (6-4)-Schadens auch die Synthese von geeigneten Festphasenbausteinen sehr komplex ist, sollte die direkte Erzeugung von (6-4)-Schäden in DNA nochmals untersucht und, wenn möglich, verbessert werden. Insbesondere sollten so geeignete Substratstränge für die (6-4)-Photolyase hergestellt werden, um den Mechanismus dieses Enzyms genauer untersuchen zu können.

Als Ausgangsmaterial wurde das sehr einfache Oligonukleotid 5'-AATTAA-3' (**DS22**) ausgewählt, das schon von *Taylor* und Mitarbeitern zur Herstellung verschiedener Photoschäden einschließlich des (6-4)-Schadens benutzt worden ist.^[201] Für die Belichtung wurde das Oligonukleotid in Wasser gelöst (50 µmol/L) und die Lösung in einer Petrischale aus Plastik in 10 cm Abstand unter einer UV-Lampe (254 nm, Vilber Lourmat VL-215C, 2 * 15 W 254 nm Röhren) platziert. Zur Kühlung wurde unter die Petrischale ein Kühlakku gelegt. Um Oxidationsprozesse zu vermeiden, wurde dieser Belichtungsaufbau unter Stickstoffatmosphäre in einer Glove Box installiert. Nach Beginn der Belichtung wurden in

regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen und mit RP-HPLC analysiert (Abbildung 53).

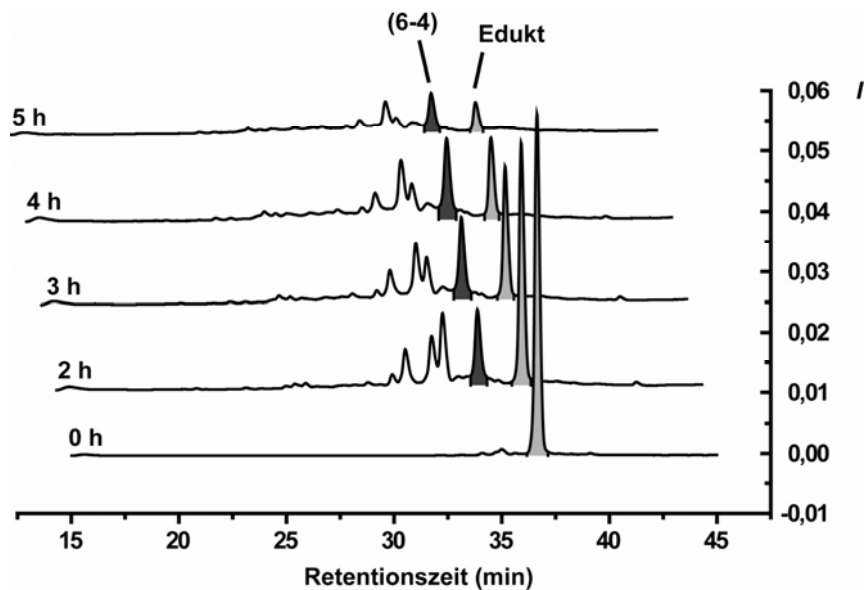


Abbildung 53: Die Belichtung von 5'-AATTAA-3' (DS22) (50 μ M DNA in Wasser, 254 nm).

Die Chromatogramme zeigen deutlich den zeitabhängigen Umsatz des Substrates unter Bildung verschiedener Produkte. Das Hauptprodukt konnte an Hand der charakteristischen Absorption bei 320 nm als Oligonukleotid mit einem (6-4)-Schaden identifiziert werden. Neben diesem gewünschten Oligonukleotid entstehen aber noch mindestens drei weitere Produkte. Weitere Belichtungen zeigten, dass die Mengenverhältnisse der einzelnen Schäden zueinander nicht exakt reproduzierbar waren und häufig nicht so günstige Ergebnisse für den (6-4)-Schaden zeigten, wie in Abbildung 53.

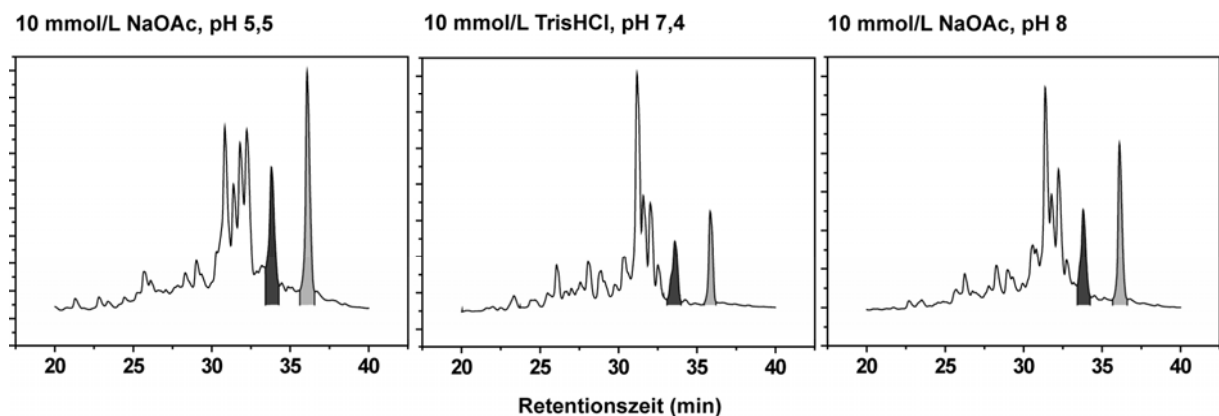


Abbildung 54: Die Belichtung von DS22 in Puffern mit unterschiedlichem pH-Wert (DNA: 50 μ M).

Um den möglichen Einfluss des pH-Wertes auf die Photoreaktion zu untersuchen, wurde die Belichtung in verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten wiederholt (Abbildung 54). Im Vergleich zu ungepufferten DNA-Lösungen ist eine gewisse Verschiebung der Produktverhältnisse zu beobachten, abhängig von Puffer und pH-Wert. In keinem Fall begünstigt aber der Zusatz eines Puffers die Entstehung des (6-4)-Schadens. Weitere Versuche zeigten, dass auch die DNA-Konzentration keinen wesentlichen Einfluss auf die Produktverhältnisse hat. Die günstigsten Bedingungen für die Belichtung der Sequenz 5'-AATTAA-3' waren somit eine DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{mol/L}$ und eine Belichtungszeit von ungefähr 150 Minuten. Laut HPLC konnte unter diesen Bedingungen eine Ausbeute von etwa 12-20 % an (6-4)-Schaden erzielt werden. Interessant ist der Vergleich zu den Ergebnissen der Gruppe *Taylor*.^[201] Den publizierten Chromatogrammen nach erhielt diese Gruppe eine ähnliche Anzahl an Produkten, konnte jedoch nicht mehr als 5 % Ausbeute an (6-4)-Schaden erzielen. Auf den ersten Blick ist kein Grund für diese niedrige Ausbeute zu erkennen. Die verwendete DNA-Konzentration (213 $\mu\text{mol/L}$) ist höher, kann aber nach den hier beschriebenen Experimenten nicht die Ursache für den großen Unterschied sein. Denkbar wäre allerdings, dass die von *Taylor et al.* benutzten Schutzgastechiken (Petrischalen in mit Argon gespülten Gefrierbeuteln) nicht ausreichend waren, so dass eine größere Menge an Photooxidationsprodukten entstand. Demnach wäre die Belichtung unter anaeroben Bedingungen in einer Glove Box ein entscheidender Fortschritt. Obwohl die oben gefundenen Belichtungsbedingungen schon eine deutliche Verbesserung darstellen, kann von einer hohen Selektivität nicht die Rede sein. Um Möglichkeiten zur Verbesserung zu finden, wurden die Produkte der Belichtung mit präparativer RP-HPLC isoliert und mit massenspektrometrischen Methoden untersucht. Während die Isolierung des DNA Stranges mit dem (6-4)-Schadens in hoher Reinheit gelang, konnten die weiteren Produkte nicht alle vollständig getrennt werden. Trotzdem waren schon MALDI-TOF Messungen aufschlussreich. Die DNA der ersten Fraktion war um 18 schwerer als für ein Photoprodukt erwartet. Für eine genauere Bestimmung der Photoprodukte wurde die DNA der Fraktionen enzymatisch verdaut und die entstehenden Nukleoside mit HPLC-MS/MS untersucht (Abbildung 55).^[37, 38, 246] Auf diesem Weg konnte die Identität des (6-4)-Schadens noch einmal eindeutig bestätigt werden. Das Dinukleotid-Photoprodukt aus der (6-4)-Fraktion (bei 36 min Retentionszeit) konnte durch hoch aufgelöste Massenspektrometrie als TT-Photoprodukt identifiziert werden und zeigte das von *Cadet* gefundene, typische Fragmentierungsmuster des (6-4)-Photoschadens.^[246] In einer weiteren Fraktion (Retentionszeit 34,5 min) konnten ebenfalls TT-Photoprodukte nachgewiesen werden. In

diesem Fall aber erfolgte die Fragmentierung im Massenspektrometer auf die für CPD Dimere beschriebene Art und Weise.^[246] Diese Fraktion enthält daher wahrscheinlich die zwei in DNA Einzelsträngen zu beobachtenden Stereoisomere (*cis-syn* und *trans-syn* I) des CPD Schadens.

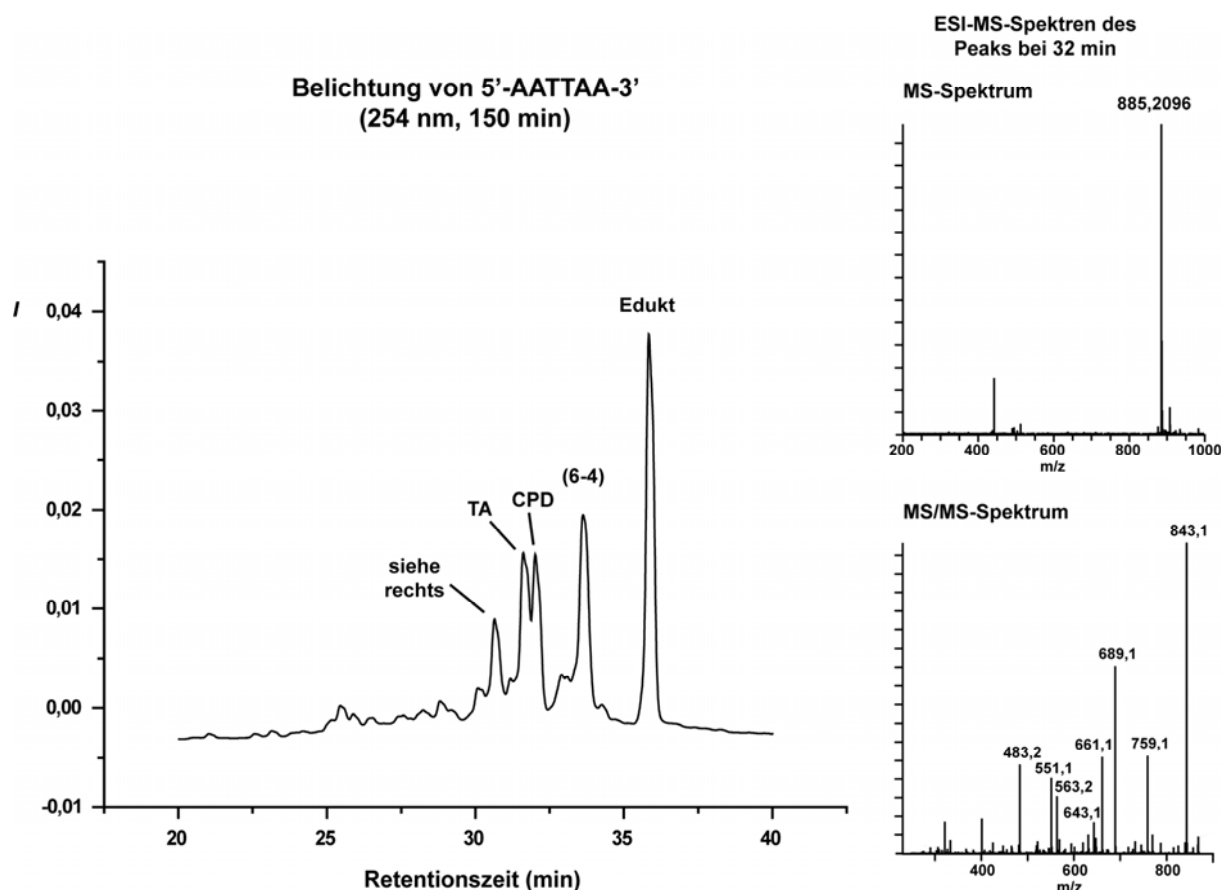


Abbildung 55: Identifizierung der verschiedenen Photoprodukte von **DS22**

(Belichtung: 50 μ M DNA in Wasser, Verdau und HPLC-MS/MS nach Cadet/siehe auch 7.1).

Die verbleibenden beiden Fraktionen enthielten nur Spuren von TT-Photoprodukten. Stattdessen konnte jeweils ein Trinukleotid als Hauptprodukt beobachtet werden. Das Trinukleotid aus der Fraktion bei einer Retentionszeit von 34 min hat die Zusammensetzung TTA (oder ATT, HR-MS ber.: 858,1877; gef.: 858,1866) und enthält, der Fragmentierung im MS/MS-Spektrum nach, ein TA-Photoprodukt.^[247, 248] Die Entstehung dieses Photoproduktes bei Belichtung von DNA mit UV-C Licht ist bekannt und schon mehrfach untersucht worden. Eine mögliche biologische Bedeutung dieser Photoreaktion ist unklar. Das Trinukleotid der letzten Fraktion (Retentionszeit 32 min) hat vermutlich die Zusammensetzung TAA + 18 (oder AAT + 18, HR-MS ber.: 885,2096; gef.: 885,2088), lässt sich aber keinem DNA Photoschaden eindeutig zuordnen. Die Fragmentierung im MS/MS-Spektrum (M-Thymin, M-

Thymidin) könnte ein Hinweis auf ein Adenin-Adenin-Dimer sein.^[247] Ein solches Dimer ist bekannt, aber schlecht charakterisiert.^[34] In Übereinstimmung mit der gefundenen Masse für das Trinukleotid ist für dieses Photoprodukt die Reaktion mit Wasser ($M + 18$) typisch.^[34, 247] Für das TA-Photoprodukt ist allerdings auch eine relativ schnelle Hydratisierung beschrieben worden, aber im MS/MS-Spektrum konnte keines der erwarteten Fragmente (M-Adenin, M-dAdenosin, dTpdA) beobachtet werden.^[33]

Die Belichtung des kurzen Oligonukleotids zeigt, dass die Photochemie von einzelsträngigen Oligonukleotiden sehr kompliziert sein kann. Aus präparativer Sicht ist insbesondere die so nicht erwartete, hohe Reaktivität des Adenosins unter UV-C Einstrahlung ein Problem. Dadurch erhöht sich die Anzahl an erhaltenen DNA Schäden deutlich. Dies führt sowohl zu einer Reduktion der Ausbeute an TT-Schäden als auch zu einem komplexen Trennproblem. Wir folgern daraus, dass Sequenzen ohne Adenosine besser zur Herstellung des (6-4)-Schadens geeignet sein könnten.

6.3.2 Die Belichtung von 5'-GGTTGG-3' (DS23) und 5'-GGTCGG-3' (DS24)

Da die Photoreaktion von Thymidin mit Adenin zur Bildung von nicht gewünschten Nebenprodukten führt, wurden Sequenzen mit Guanosinen neben der Pyrimidin-Pyrimidin-Position für weitere Belichtungsexperimente verwendet. Photochemische Dimerisierungen sind für Guanosin nicht bekannt. Außerdem wurde nicht nur eine Sequenz mit zwei benachbarten Thymidinnukleosiden verwendet, sondern auch eine mit einem 5'-Thymidin-3'-Cytosin-Dinukleotid. Dieses Dinukleotid bildet relativ zum CPD Dimer sehr viel häufiger den (6-4)-Schaden als eine TT-Sequenz (TT: Verhältnis CPD/6-4 ca. 10/1, TC 1/1).^[37, 38, 246] Die Belichtung der Oligonukleotide erfolgte wieder in einer Glove Box unter den beschriebenen Bedingungen (50 $\mu\text{mol/L}$ DNA in Wasser). Für die beiden verwendeten Sequenzen, 5'-GGTTGG-3' (**DS23**) und 5'-GGTCGG-3' (**DS24**), wurde die Bildung des (6-4)-Schadens in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (Abbildung 56).

Wie erhofft erfolgte die photochemische Bildung des (6-4)-Schadens mit beiden Oligonukleotiden sehr viel selektiver als mit dem Oligonukleotid **DS22**. Oligonukleotid **DS23** wurde nur zu zwei Produkten umgesetzt, von denen das Hauptprodukt durch seine charakteristische UV-Absorption als Oligonukleotid mit einem (6-4)-Schaden identifiziert werden konnte. Das Nebenprodukt enthält ein Stereoisomer des CPD-Schadens, eventuell auch beide. Auch aus **DS24** wurde mit guter Selektivität der Strang mit dem (6-4)-Photoprodukt gebildet. In diesem Fall entstanden allerdings weitere Nebenprodukte, die teilweise nur sehr schwer vom Hauptprodukt abgetrennt werden konnten (in den dargestellten analytischen HPLC-Chromatogrammen nur schwer zu erkennen).

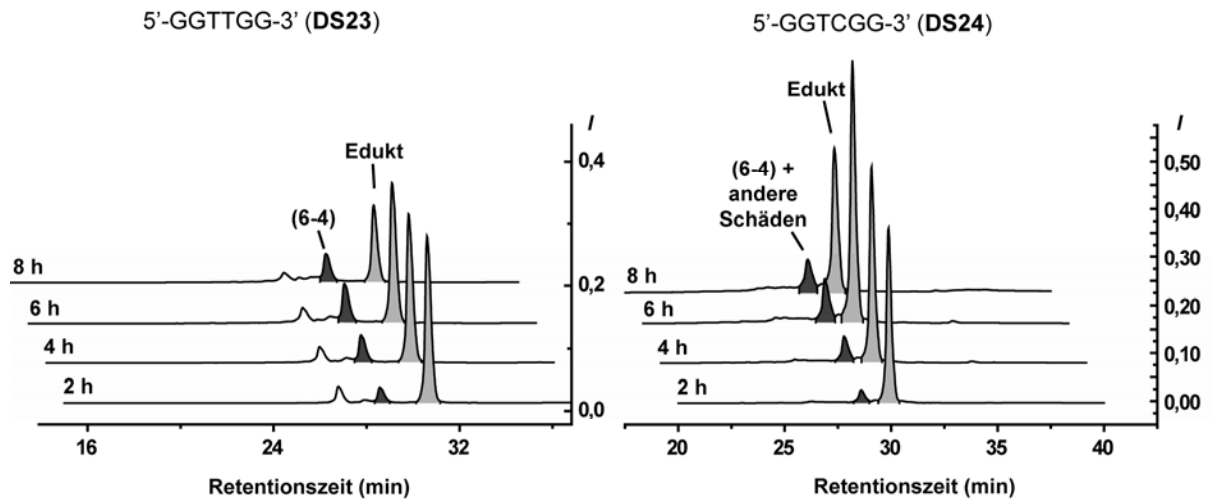


Abbildung 56: Belichtung von **DS23** und **DS24** (50 μ M DNA in Wasser, 254 nm).

Interessant ist auch, dass die Bildung des (6-4)-Schadens in **DS23** und **DS24** etwas langsamer erfolgt als in **DS22**. Die Guanosine neben den Dipyrimidinstellen scheinen die Reaktivität herabzusetzen. Eine ähnliche Beobachtung wurde schon von *L. Kundu* in Doppelsträngen gemacht.^[249, 250] Eine Erklärung für diesen Effekt ist, insbesondere in Einzelsträngen, nicht leicht zu geben. In den flexiblen Einzelsträngen sind sterische Gründe unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung könnte die niedrige Singulettenergie des Guanosins sein, welche die niedrigste aller natürlichen Nukleoside ist. Anstatt einer Cycloaddition wäre von einem angeregten Thymidin im Singulettzustand daher auch ein Singulettenergietransfer zu Guanosin möglich. Dies könnte die Quantenausbeute der Cycloaddition senken und zu der beobachteten niedrigeren Reaktivität führen.

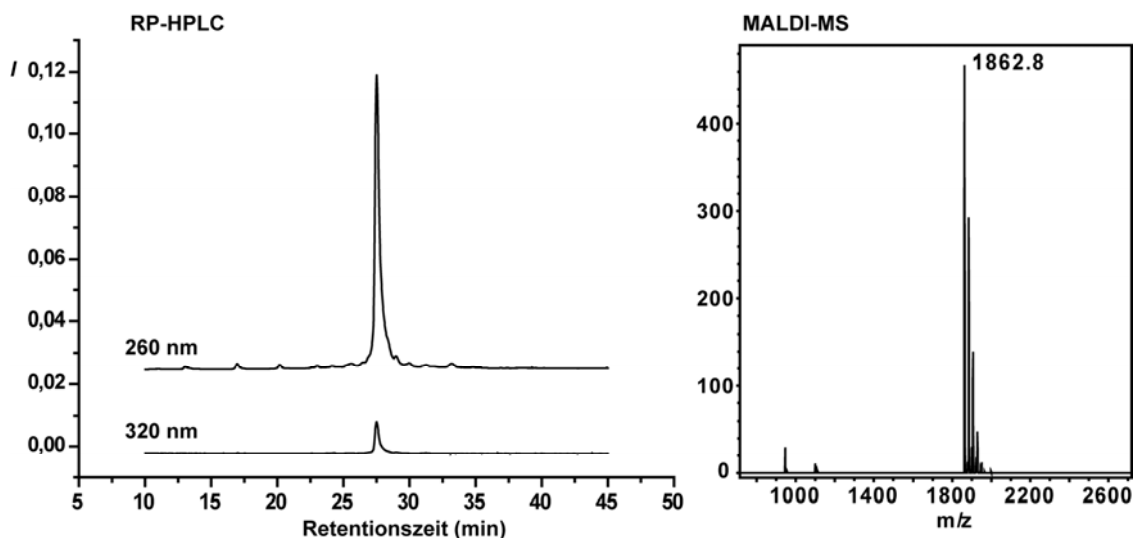


Abbildung 57: Der DNA Strang 5'-GGT(6-4)TGG-3' (**DS23(64)**) nach präparativer Reinigung.

Das Oligonukleotid **DS23** eignet sich trotzdem hervorragend zur Herstellung des (6-4)-Schadens. Durch Erhöhung der Belichtungszeit auf 13-15 Stunden können Umsätze von etwa 30 % (RP-HPLC) erzielt werden. Die Isolierung des Produktes **DS23(64)** ist mit RP-HPLC auch auf Grund der wenigen Nebenprodukte sehr einfach und ergibt das gewünschte Oligonukleotid mit dem (6-4)-Schaden in 18 % Ausbeute und hoher Reinheit.

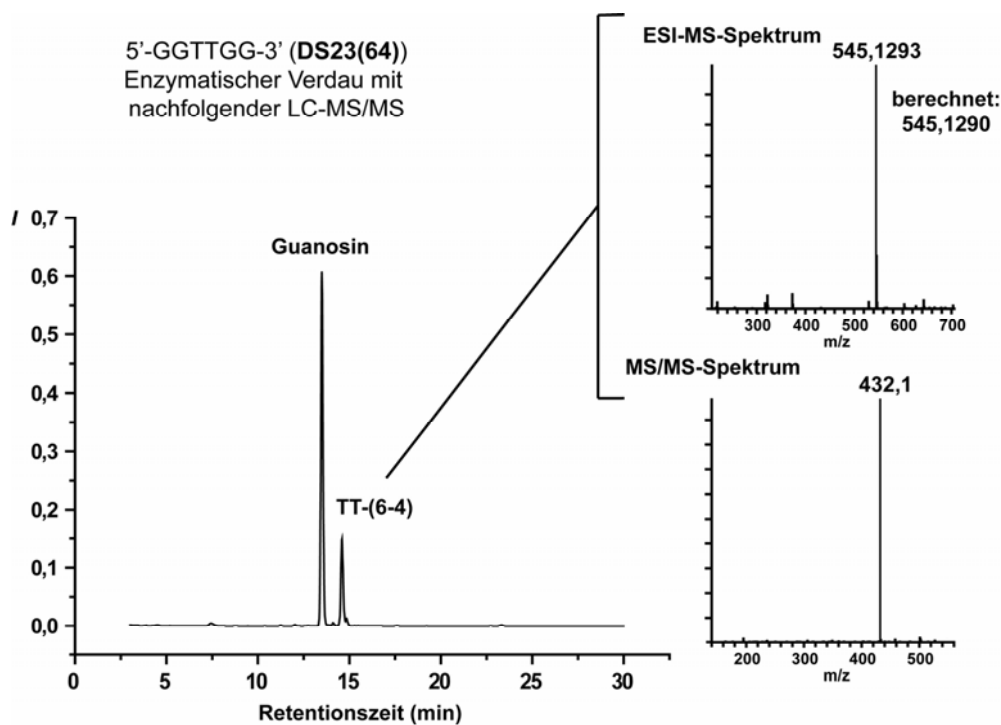


Abbildung 58: HPL-Chromatogramm (links) und MS-Spektren (rechts) von **DS23(64)** nach enzymatischem Totalverdau (Bedingungen: siehe Experimenteller Teil).

Zur eindeutigen Identifizierung des Schadens und zur Kontrolle der Reinheit wurde ein Aliquot des Produktes enzymatisch verdaut und mit RP-HPLC-MS/MS untersucht. Im LC-Chromatogramm konnten nur Guanosin und der (6-4)-Schaden nachgewiesen werden (Abbildung 58). Der Schaden selbst wurde durch MS/MS-Experimente nach *Cadet* identifiziert.^[246] Durch MS-Detektion konnte auch die Menge des Dewarisoners im Produkt abgeschätzt werden. Sie liegt unter 5 %.

Mit **DS24** wurden ähnliche, aber präparativ weniger befriedigende Ergebnisse erhalten. Generell ist der Umsatz hier etwas niedriger (ca. 15-20 % Ausbeute an TC-(6-4)-Schaden in 15 h) und die RP-HPLC Trennung des erhaltenen Produktgemisches deutlich schwieriger. Insbesondere die Abtrennung des Dewarisoners ist hier nicht immer vollständig möglich, so dass unter Umständen eine zweite Trennung erforderlich ist. Der Nachweis des Dewarisoners gelingt hier sehr gut nach enzymatischen Verdau des Produktes und RP-HPLC-MS/MS

(Abbildung 59).^[38] Auf diesem Weg wurde auch der TC-(6-4)-Schaden in **DS24(64)** nochmals eindeutig identifiziert.

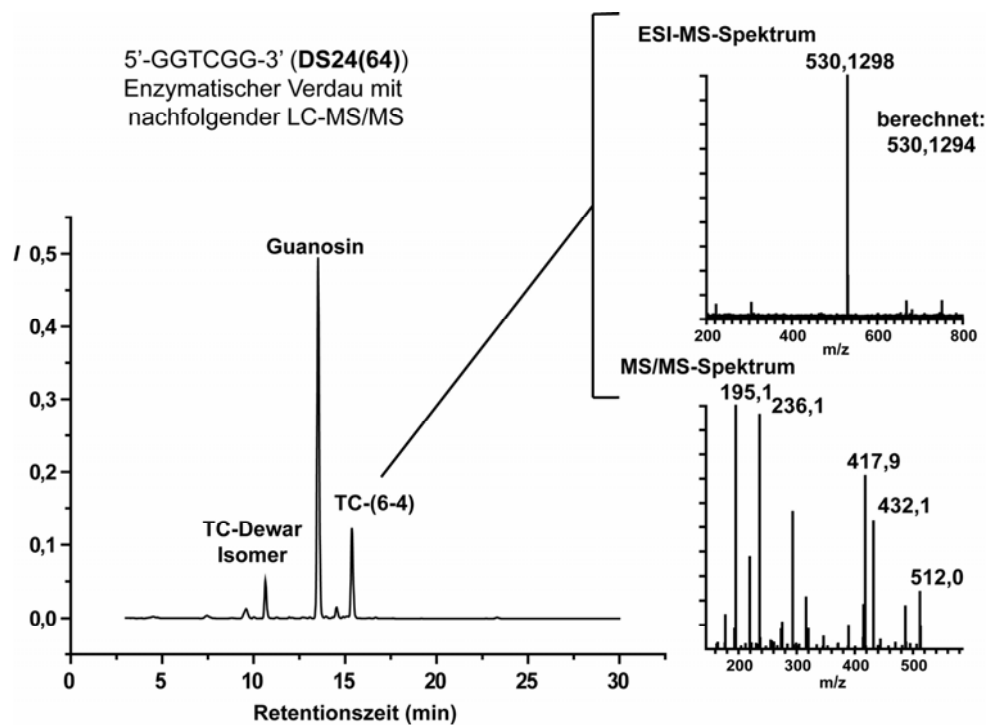


Abbildung 59: HPL-Chromatogramm (links) und MS-Spektren (rechts) von **DS24(64)** nach enzymatischem Totalverdau (Bedingungen: siehe Experimenteller Teil).

Durch die Verwendung kurzer Oligonukleotide mit Guanosinen neben der Dipyrimidinstelle konnte die Herstellung des (6-4)-Schadens in kurzen Oligonukleotiden entscheidend verbessert werden. Die Belichtung von Oligonukleotiden wie **DS23** ergibt selektiv und in guter Ausbeute den DNA Strang **DS23(64)** mit dem (6-4)-Schaden. Im Vergleich zu dem bekannten Belichtungsverfahren mit **DS22** ist dies ein entscheidender Fortschritt, da die Bildung von Nebenprodukten weitgehend vermieden werden kann.

6.3.3 Ein neuer, einfacher Assay für die (6-4)-Photolyase

Durch das verbesserte Belichtungsverfahren und die Wahl einer geeigneten Sequenz ist eine effektive Herstellung von kurzen, den (6-4)-Schaden enthaltenden Oligonukleotiden möglich. Um daraus Substrate für Reparaturassays mit der (6-4)-Photolyase zu gewinnen, wurden solche Oligonukleotide bisher enzymatisch auf etwa 50 Nukleotide verlängert.^[201] Diese Stränge wurden dann für Photoreaktivierungsassays (= Reparaturassays) eingesetzt und dienen als Standardsubstrat für Untersuchungen an der (6-4)-Photolyase.^[118] Dieses Vorgehen ist allerdings nicht unproblematisch. Einerseits ist die Ligation der kurzen, geschädigten

Oligonukleotide zu längeren Strängen komplex und ergibt nur geringe Ausbeuten.^[201] Andererseits ist auch der Nachweis der Reparatur in den langen Strängen aufwendig und erfordert den Einsatz eines Restriktionsenzym.^[118, 122] Dieses Enzym schneidet die DNA spezifisch zwischen den beiden Basen des (6-4)-Schadens, falls dieser repariert worden ist. Nur dieser Schnitt kann anschließend mit Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Prinzipiell sollten sich die kurzen Oligomere wie **DS23(64)** aber auch direkt in einem Assay einsetzen lassen. Arbeiten der Gruppe *Todo* zum Beispiel zeigen, dass der (6-4)-Schaden auch im Einzelstrang von *Xenopus laevis* (6-4)-Photolyase repariert wird.^[122] Außerdem konnten Sancar und Mitarbeiter an der nah verwandten CPD Photolyase nachweisen, dass auch sehr kurze Oligomere mit einem CPD Schaden mit hoher Affinität repariert werden.^[177] Schon ein CPD Schaden mit einer Base auf der 5'-Seite und drei Basen auf der 3'-Seite wird von der *E. coli* CPD Photolyase mit maximal möglicher Affinität gebunden. Im Vergleich dazu fehlt Oligonukleotid **DS23(64)** nur eine Base auf der 3'-Seite, so dass dieses Oligonukleotid ein mögliches Substrat für die engverwandte (6-4)-Photolyase sein sollte.

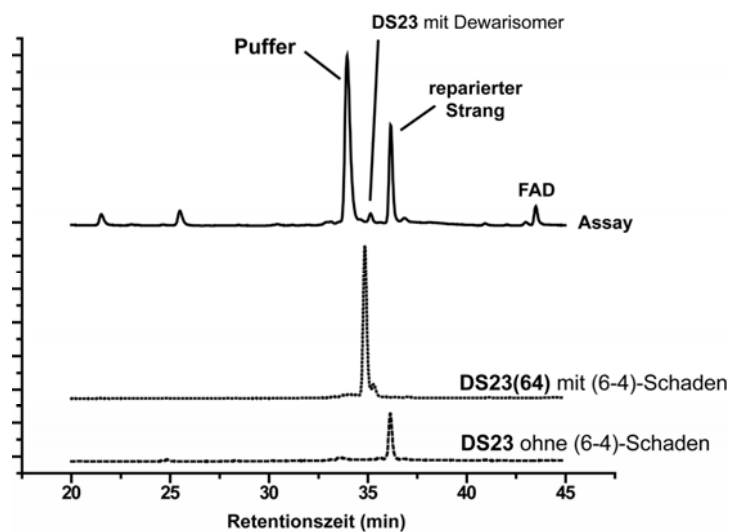


Abbildung 60: Reparatur von **DS23(64)** durch die (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster* (20 μ M DNA, 1,6 μ g Enzym, 50 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 h Belichtung mit Weisslicht).

Für die Reparaturexperimente wurde das Oligonukleotid **DS23(64)** in Assaypuffer gelöst (20 μ mol/L in Assaypuffer) und mit der (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster* versetzt (1,6 μ g in Assaypuffer). Anschließend wurde die Lösung 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Weißlichtlampe belichtet. Nach der Denaturierung des Proteins (10 min bei 95 °C) wurde die Reaktionslösung mit RP-HPLC untersucht. Im Chromatogramm ist leicht die vollständige Umsetzung des Oligonukleotids **DS23(64)** mit dem (6-4)-Schaden

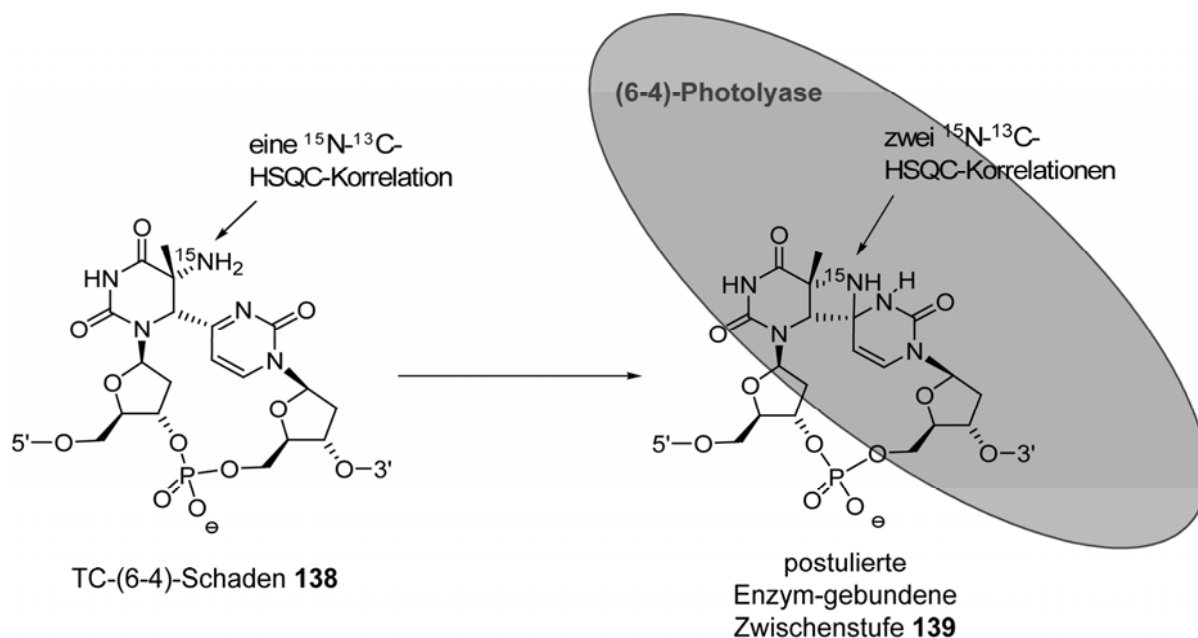
zu erkennen. Das Hauptprodukt bei einer Retentionszeit von 37 Minuten ist mit dem ungeschädigten Oligonukleotid **DS23** identisch. Die Reparatur des (6-4)-Schadens durch die (6-4)-Photolyase erfolgt also auch in sehr kurzen Einzelsträngen. Außerdem entsteht ein weiteres Produkt, das durch zusätzliche Belichtungsexperimente als Oligonukleotid **DS23** mit einem Dewar-Schaden identifiziert werden konnte. Die Entstehung ist auf das Spektrum der Weißlichtlampe zurückzuführen, die auch Licht im UV-A Bereich emittiert. Die Bildung des Dewar-Isomers ist ein Artefakt, das sich aber kaum vermeiden lässt. Die in den Experimenten verwendete (6-4)-Photolyase enthält keinen lichtsammelnden Kofaktor und ist daher für die Reparaturreaktion auf Blaulicht nahe dem UV-A Bereich angewiesen. In diesem Wellenlängenbereich kommt es aber auch zur photochemischen Isomerisierung des (6-4)-Schadens.

Die Versuche zeigen, das **DS23(64)** von der (6-4)-Photolyase als Substrat akzeptiert und mit relativ hoher Effizienz repariert wird. Gleiches gilt auch für die Oligonukleotide **DS22(64)** und **DS24(64)**, die ebenfalls von der (6-4)-Photolyase repariert werden. Für so kurze und einfache Oligonukleotide ist das sehr erstaunlich. Die Reparatur kann leicht durch RP-HPLC nachgewiesen und zuverlässig quantifiziert werden. Der hier entwickelte Assay ermöglicht damit eine sehr einfache Bestimmung der Reparaturrate von unterschiedlichen (6-4)-Photolyasen und ihren Mutanten. Im Vergleich zu dem bisher überwiegend verwendeten Assay von Sancar und Mitarbeitern ist die Herstellung des Substrates viel effizienter und die spätere Analyse deutlich einfacher. Ein sehr ähnlicher Assay wird auch von der Gruppe Iwai verwendet, die geeignete Oligonukleotide durch Festphasensynthese herstellt.^[195] Allerdings ist in diesem Fall, wie schon oben beschrieben, die Synthese des benötigten Phosphoramidites des (6-4)-Schadens sehr komplex und aufwendig. Die Verwendung von kurzen, direkt zu belichtenden Oligonukleotiden ist demgegenüber entscheidend einfacher.

6.3.4 Die Synthese eines exocyclisch ¹⁵N-markierten (6-4)-Schadens für NMR-Untersuchungen

Die oben beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass sehr kurze Oligonukleotide wie **DS23(64)** gute Substrate für die (6-4)-Photolyase sind. Mit Ihnen lässt sich die katalytische Aktivität der Photolyase bestimmen. Über den Mechanismus der Reparatur sagen diese Untersuchungen allerdings sehr wenig aus. Um diesen genauer zu studieren, ist der Einsatz von spektroskopischen oder kristallographischen Verfahren notwendig. Insbesondere der Nachweis der postulierten Oxetan/Azetidinzwischenstufe wäre ein großer Erfolg.^[118, 123] Hierzu würde eine Kristallstruktur neue Einblicke ermöglichen. Die Kristallisation der (6-4)-

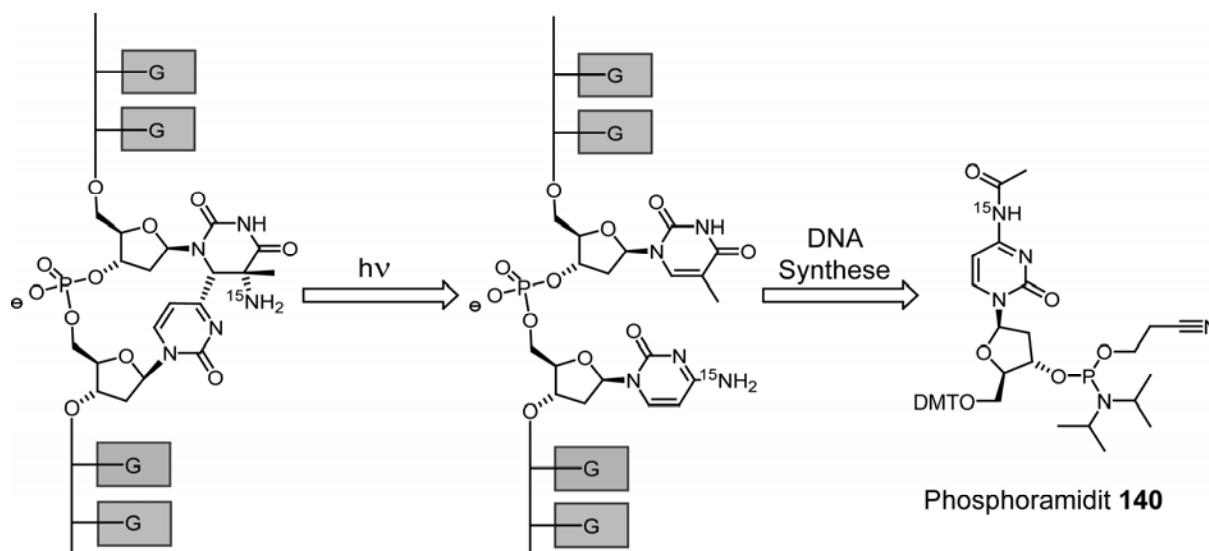
Photolyase ist allerdings bisher weder mit noch ohne Substrat gelungen. Der Vergleich mit den Arbeiten an der CPD Photolyase zeigt, dass dies ein langwieriges Problem ist. Außerdem weisen die Erfahrungen mit dem Minimalsubstrat **DS20** darauf hin, dass solch kurze Einzelstränge nicht optimal für die Kristallisation geeignet sind.



Schema 38: Mögliche NMR-Experimente zum Nachweis der postulierten Vierringzwischenstufe.

Eine Alternative ist der Nachweis der Zwischenstufe durch spektroskopische Verfahren, wie der IR- oder NMR-Spektroskopie. Insbesondere die NMR-Spektroskopie ist in der Lage, ausreichend Informationen zur Ermittlung der Struktur einer potentiellen Zwischenstufe zu liefern. Ein Experiment, das den TC-(6-4)-Schaden **138** von einer potentiellen Vierringzwischenstufe unterscheiden könnte, wäre ein ^{13}C - ^{15}N -HSQC. Im TC-(6-4)-Schaden **138** ist das exocyclische Amin nur an ein Kohlenstoffatom gebunden und sollte daher nur eine scalare Kopplung zeigen. In der Zwischenstufe **139** hingegen ist der Aminstickstoff an zwei Kohlenstoffe gebunden und muss daher auch scalare Kopplungen zu zwei Kohlenstoffatomen zeigen. Experimentell gibt es allerdings ein großes Problem: Die Detektion dieser Kopplungen muss an einem Komplex aus einem 60 kDa großen Protein und einem kurzem DNA Strang erfolgen. Um die selektive Detektion des exocyclischenamins zu ermöglichen, ist daher eine Markierung diesesamins notwendig. Für die NMR-Spektroskopie bietet sich dazu die Isotopenmarkierung mit ^{15}N an. Damit sieht ein potentielles Experiment zum Nachweis der postulierten Vierringzwischenstufe folgendermaßen aus: Von einem kurzen Oligonukleotid mit einem ^{15}N -markierten (6-4)-Schaden wird ein ^{13}C - ^{15}N -HSQC Spektrum gemessen. Anschließend wird das Oligonukleotid mit einer äquimolaren Menge

(6-4)-Photolyase unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dem postulierten Mechanismus sollte das Enzym unter Bildung der Vierringzwischenstufe an den Schaden binden, aber diesen nicht reparieren. Die Messung eines weiteren ^{13}C - ^{15}N -HSQC Spektrum sollte nun die Bildung des Vierrings durch ein zusätzliches Kreuzsignal im Spektrum nachweisen.



Schema 39: Retrosyntheseschema für einen ^{15}N -markierten (6-4)-Schaden in einem DNA Strang.

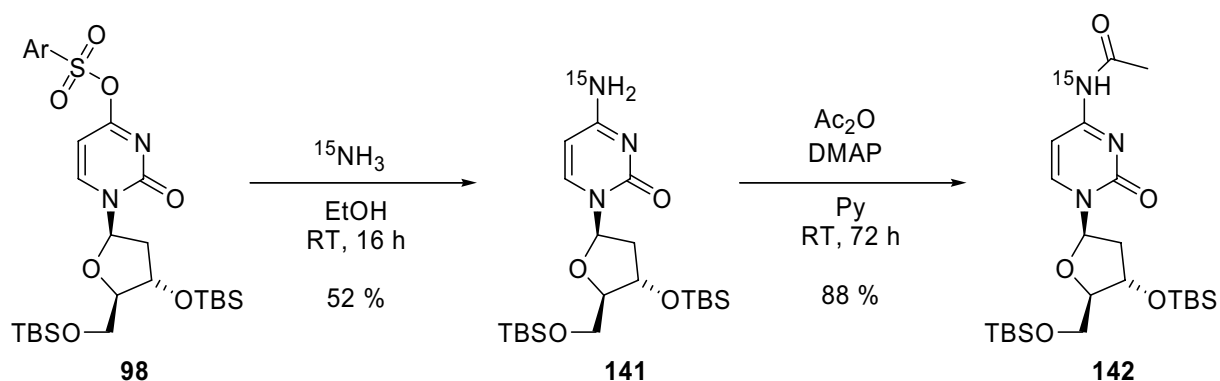
Die Herstellung eines Substrates für das beschriebene NMR-Experiment erfordert eine Isotopenmarkierung der exocyclischen Aminogruppe des (6-4)-Schadens. Während der Belichtung bildet sich diese Aminogruppe aus der exocyclischen Aminogruppe eines Cytosins. Damit wird für die Herstellung ein exocyclisch ^{15}N -markiertes Phosphoramidit **140** des 2'-Desoxycytidins benötigt. Entsprechende 2'-Desoxycytidine mit einer ^{15}N -Aminogruppe sind bekannt.^[251, 252]

Synthese eines ^{15}N -markierten Cytidinphosphoramidites

Die Synthese von Cytidinen mit einer ^{15}N -markierten, exocyclischen Aminogruppe erfolgt am einfachsten ausgehend von Uridinderivaten. Nach Einführung einer Abgangsgruppe an O4 kann diese mit ^{15}N -markiertem Ammoniak oder einem entsprechenden Ammoniakäquivalent substituiert werden. Als Abgangsgruppe wurde bisher das Triazolol eingesetzt, als Ammoniakquelle ^{15}N -markiertes Ammoniumchlorid.^[252] In Rahmen dieser Arbeit wurde das bereits vorhandene Desoxyuridarylsulfonat **98**^[216] als Ausgangssubstanz verwendet. Diese Verbindung ist besonders gut zur Synthese eines Phosphoramidites geeignet, da die TBS-Schutzgruppen orthogonal zur benötigten Aminoschutzgruppe abgespalten werden können.

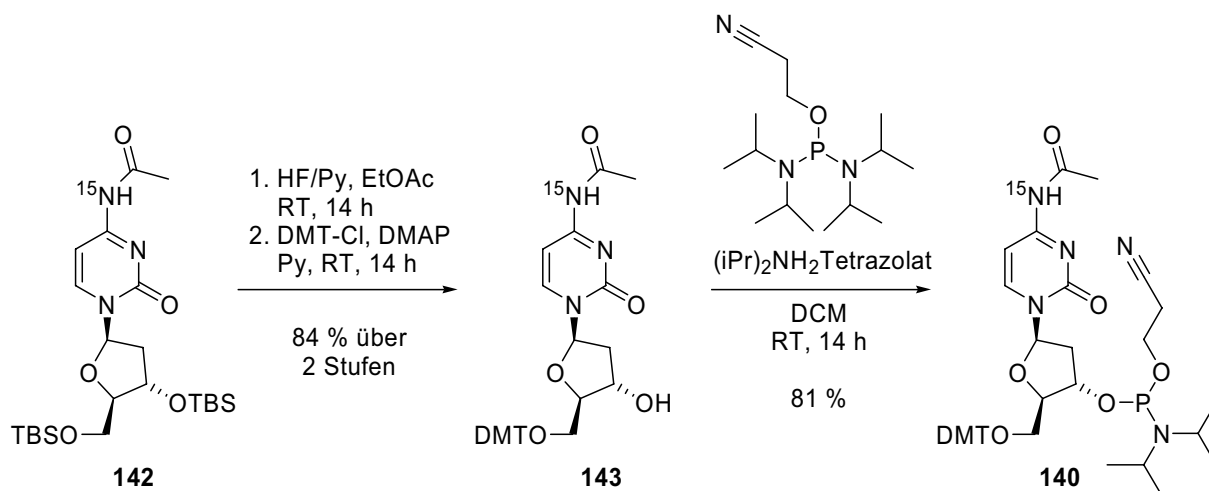
Die markierte Aminogruppe sollte durch ^{15}N -Ammoniak eingeführt werden, eines der günstigsten ^{15}N -markierten Stickstoffreagenzien.

Die Umsetzung von **98** mit trockenem ^{15}N -Ammoniak ergab direkt das TBS-geschützte ^{15}N -markierte 2'-Deoxycytidin **141** in 52 % Ausbeute. Versuche mit wässrigem Ammoniak waren weniger erfolgreich und führten überwiegend zur Hydrolyse des Arylsulfonates. Die Aminogruppe des Cytidins **141** wurde anschließend mit einer für die DNA Synthese geeigneten Acetylgruppe geschützt. Das Acetyl-geschützte Cytidin **142** konnte unter Verwendung von Standardbedingungen in 88 % Ausbeute isoliert werden.



Schema 40: Synthese des geschützten, ^{15}N -markierten Cytosins **142** ($\text{Ar} = 2,4,6$ -Triisopropylbenzen).

Die Einführung der weiteren, für die DNA Synthese benötigten Schutzgruppen erfolgte nach bewährtem Muster. Die TBS-Schutzgruppen der Verbindung **142** wurden mit HF/Pyridin entfernt, bevor anschließend die 5'-Hydroxygruppe selektiv mit DMT-Cl geschützt wurde. Das DMT-geschützte Cytidin **143** wurde in exzellenten 84 % Ausbeute über beide Stufen erhalten.



Schema 41: Synthese des Phosphoramidites **140**.

Für die anschließende Einführung des Phosphoramidits erwies sich wieder einmal das 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit als das selektivste Reagenz. Die Umsetzung mit **143** ergab das gewünschte ¹⁵N-Cytidin-Phosphoramidit **140** als Mischung der Diastereomere in sehr guten 81 % Ausbeute. Mit dem normalerweise verwendeten 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropyl-chlorphosphoramidit (CED-Cl) wurde hingegen ein Nebenprodukt erhalten, so dass kein reines Produkt isoliert werden konnte. Wahrscheinlich wird in diesem Fall auch der Acetyl-Sauerstoff phosphoryliert.

Das ¹⁵N-markierte Cytidinphosphoramidit **140** konnte auf dem beschriebenen Weg in fünf Stufen mit sehr guter Gesamtausbeute (31 % über fünf Stufen) hergestellt werden. Einzig die Einführung der markierten Aminogruppe ergab eine weniger gute Ausbeute, so dass an dieser Stelle vermutlich die Verwendung des Triazolates an Stelle des Arylsulfonates vorzuziehen ist. Insgesamt konnte allerdings eine große Menge des Phosphoramidites hergestellt werden und die effiziente Synthese sollte sich ohne weiteres in größeren Mengen durchführen lassen.

Herstellung eines ¹⁵N-markierten (6-4)-Schadens in kurzen DNA Strängen

Der Einbau des ¹⁵N-markierten Cytidins in DNA Stränge erfolgte wie erwartet ohne jegliche Probleme. Auch DNA Synthesen im großen Maßstab (15 µmol) konnten unter Verwendung von Standardprotokollen mit hohen Ausbeuten durchgeführt werden. Für die NMR-Experimente wurde die schon bewährte Sequenz von **DS24** ausgewählt und unter Verwendung des ¹⁵N-markierten Cytidin hergestellt (**DS25**: 5'-GGT¹⁵NCGG-3'). Ein DNA Syntheseansatz von 15,0 µmol ergab 2,2 µmol dieses Oligonukleotides. Die anschließende Belichtung dieses Stranges wurde nochmals optimiert. Verschiedene Tests zeigten, dass für dieses Oligonukleotid der Zusatz von 10 mmol/L Hepes-Puffer (pH 7,0) zu der Belichtungslösung günstig ist. Die gepufferte Lösung erhöhte zwar nicht die Ausbeute an (6-4)-Schaden (ca. 13 % bei 14 h Belichtung, bestimmt durch RP-HPLC), aber unterdrückte die Bildung einiger Nebenprodukte. Dadurch wurde insbesondere die RP-HPLC-Reinigung des Produktes vereinfacht und ein effektiveres Recycling des nicht geschädigten Stranges ermöglicht. Die HPLC-Reinigung wurde gegenüber **DS24** ebenfalls nochmals verbessert, um eine vollständige Abtrennung des Dewarisoners zu gewährleisten. Ein entscheidender Schritt war hier die Verwendung einer neuen Generation von HPLC-Säulen (*Macherey-Nagel* VP250/10 Nucleodur C18ec, 5 µm Partikeldurchmesser), die für dieses Trennproblem deutlich bessere Ergebnisse zeigten als Nucleosil C18-Säulen. Unter den optimierten Bedingungen (50 µmol/L DNA, 10 mmol/L Hepes pH 7,0, 14 h Belichtungszeit) wurde **DS25** belichtet, der entstandene (6-4)-Schaden isoliert und der Eduktstrang für weitere Belichtungen

wieder verwendet. Nach drei Zyklen konnten insgesamt 0,28 μmol des Oligonukleotids **DS25(64)** mit dem TC-(6-4)-Schaden isoliert werden. Mit HPLC- und MS-Methoden konnten die hohe Reinheit des Stranges und die ^{15}N -Markierung am Schaden nachgewiesen werden.

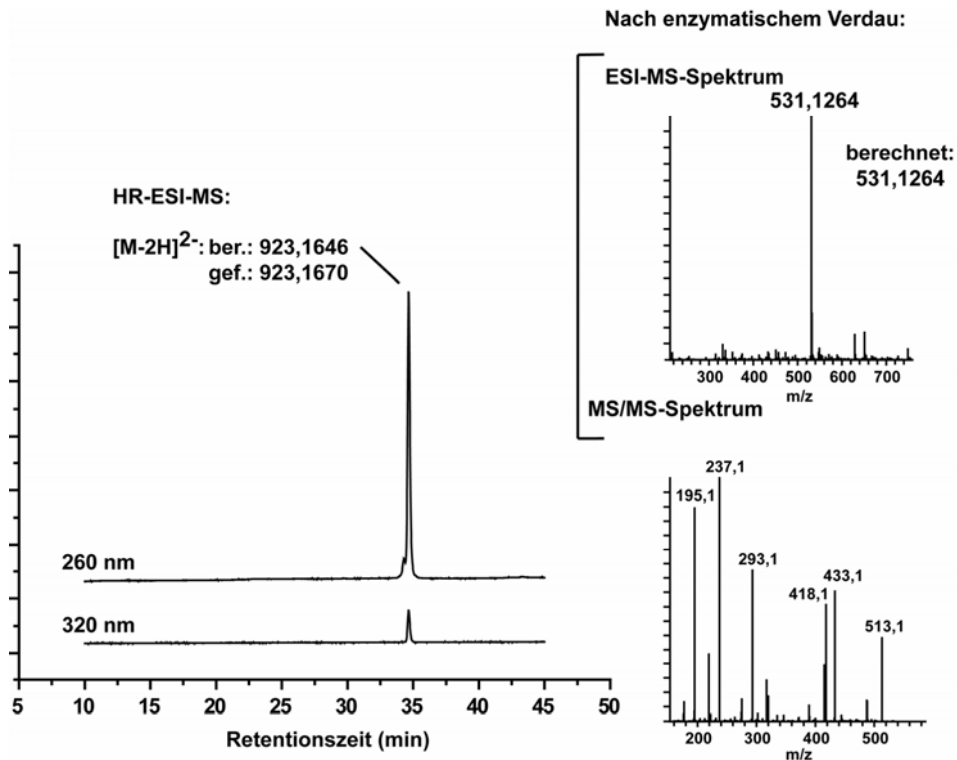


Abbildung 61: Oligonukleotid **DS25(64)** nach Reinigung
(Experimentelle Bedingungen: Siehe experimenteller Teil).

NMR-Experimente an DNA Strang **DS25(64)**

NMR-Experimente wie ein ^{13}C - ^{15}N -HSQC sind an Biomolekülen wie dem Oligonukleotid ONS3N15(64) nicht trivial, insbesondere da meistens nur kleine Mengen Substanz zur Verfügung stehen. Auch wenn im Oligonukleotid, wie hier der Fall, ein Stickstoffatom mit ^{15}N markiert ist, so ist die Empfindlichkeit der NMR-Experimente auf Grund der magnetischen Eigenschaften des ^{15}N -Isotop nicht sehr hoch. Daher wurde die erste Charge des Oligonukleotids **DS25(64)** zur Erprobung der beabsichtigten NMR-Experimente verwendet. Das Oligonukleotid wurde dazu in 500 μL einer Mischung aus Wasser und deuteriertem Wasser (9:1, Endkonzentration 0,5 mmol/L) gelöst und an *J. Klages* (AK Kessler, TU München) übergeben. *J. Klages* studierte an dieser Probe verschiedene Pulssequenzen, die später zum Nachweis der Enzym-gebundenen Zwischenstufe geeignet sein könnten. Ein erstes, gemessenes ^1H -NMR-Spektrum mit Wasserunterdrückung zeigte, dass das Oligonukleotid gut messbar ist und aus nur einer Spezies besteht.

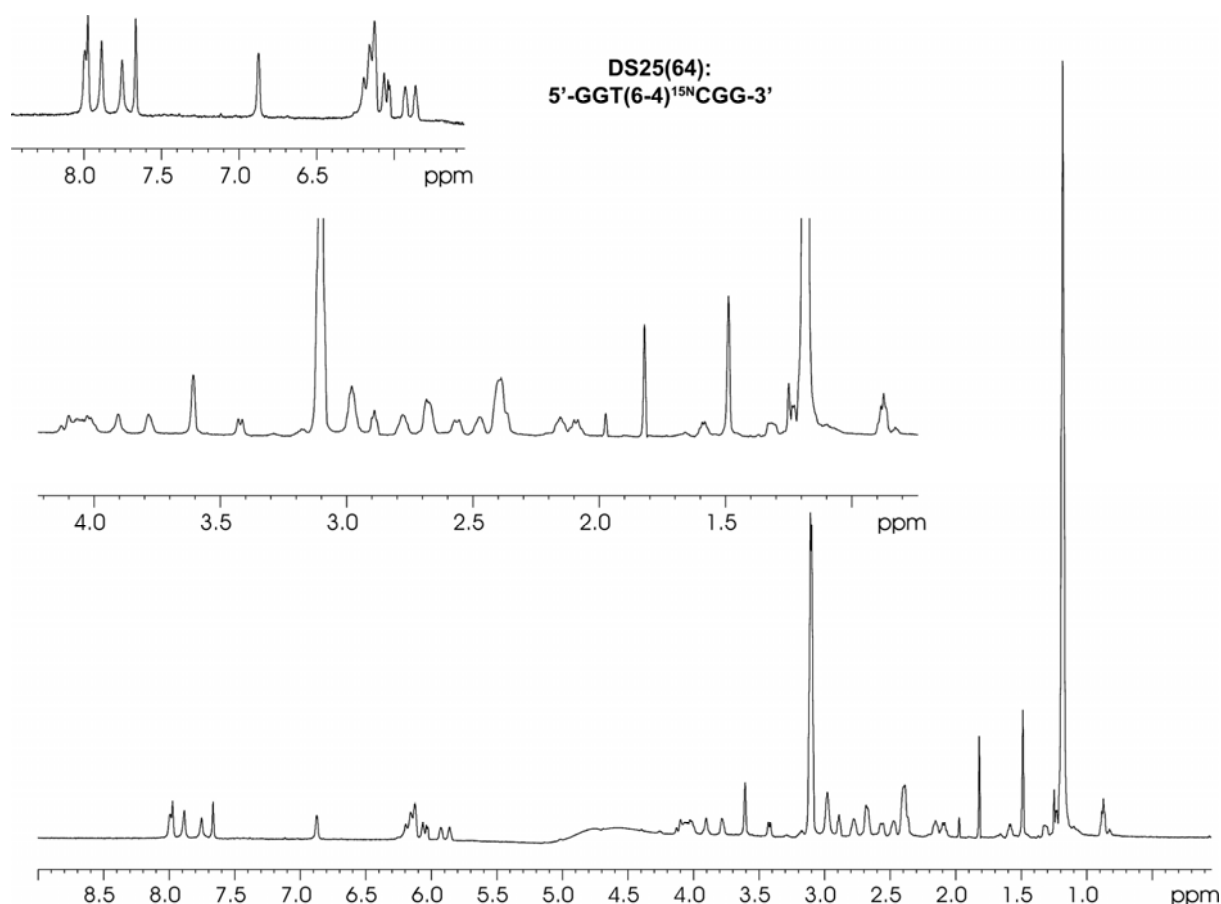


Abbildung 62: ^1H -NMR-Spektrum von **DS25(64)** ($50\ \mu\text{M}$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1).

Leider waren die weiteren Messungen weniger erfolgreich. Außer einem ^1H - ^{13}C -HSQC konnte kein weiteres Spektrum erfolgreich gemessen werden. Die Ursache hierfür ist unklar, da zumindest einige der durchgeführten NMR-Experimente an Peptiden im verwendeten Konzentrationsbereich anwendbar waren. Problematisch ist insbesondere, dass die Lösung des Oligonukleotids **DS25(64)** nach einigen Monaten nur noch Fragmente des Oligonukleotids und einen unlöslichen Niederschlag enthielt. Daher ist nicht klar, ob die Empfindlichkeit der NMR-Experimente zu gering war oder ob bereits vor den Messungen die (mikrobielle?) Zersetzung der Probe begonnen hatte.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im vorherigen Kapitel wurden neuartige Wege zur Herstellung des (6-4)-Schadens und zur Untersuchung der (6-4)-Photolyase beschrieben. Diese Arbeiten führten auf organisch-synthetischem Gebiet zur Entwicklung einer einfachen, generell anwendbaren Methode zur Synthese 4-substituierter 2-Pyrimidinonnucleoside. Aus dieser möglicherweise auch pharmakologisch interessanten Substanzklasse sind bisher nur sehr wenige Verbindungen

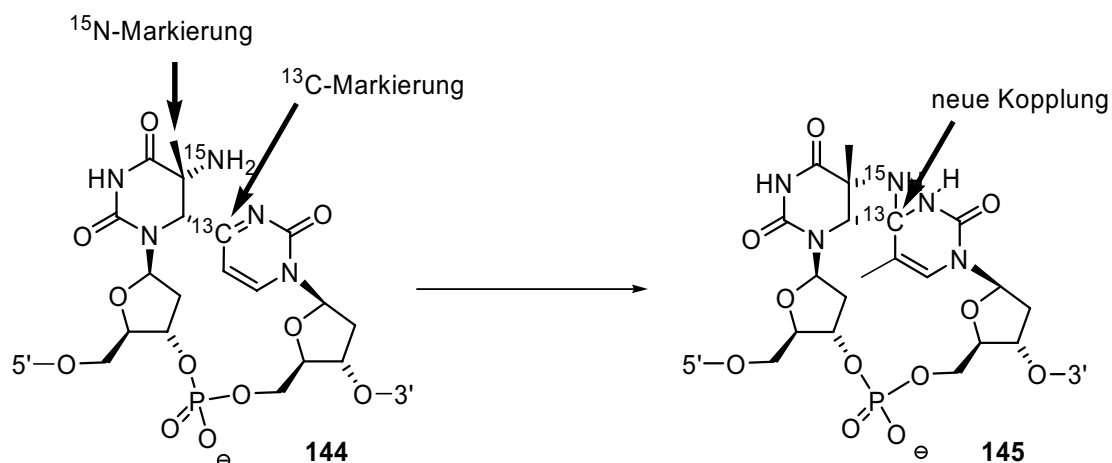
hergestellt worden, da keine einfache Synthemethode zur Verfügung stand.^[253-255] Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Kreuzkupplungen an 4-Uridinarylsulfonaten sollte die Synthese einer Vielzahl dieser Verbindungen oder sogar ganzer Bibliotheken möglich sein. Dies wird zum ersten Mal eine systematische Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften dieser interessanten Substanzklasse erlauben.

Zur Herstellung des (6-4)-Schadens, die sich totalsynthetisch als schwierig herausgestellt hat, konnte die direkte Belichtung von kurzen Oligonukleotiden entscheidend verbessert werden. Durch die geschickte Wahl der Sequenz und der anaerobe Belichtungsbedingungen gelang es, die Entstehung von Nebenprodukten weitgehend zu unterdrücken und die Ausbeute deutlich zu steigern. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich diese kurzen Oligonukleotide hervorragend als Substrat für (6-4)-Photolyase Assays eignen. Auf diesem Weg ist die Untersuchung der katalytischen Aktivität von (6-4)-Photolyasen deutlich einfacher und schneller als bisher möglich.

Mit den nun in großen Mengen herstellbaren Oligonukleotiden kann in Zukunft das eigentliche Ziel, die Untersuchung des Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyase, in Angriff genommen werden. Dazu kann einerseits versucht werden, die Photolyase zusammen mit den geschädigten Oligonukleotiden zu kristallisieren. Unter Lichtausschluss wäre so die direkte strukturelle Charakterisierung des Komplexes mit der Enzym gebundenen Form des (6-4)-Schadens möglich. Erste Versuche mit dem Oligonukleotid **DS23(64)** und einer verkürzten Form der (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster* werden derzeit von *M. Maul* (AK *Carell*) durchgeführt. Für diese Kristallisationsexperimente sind aber wahrscheinlich längere als die hier verwendeten Oligonukleotide notwendig. Diese können vielleicht wieder einfach durch direkte Belichtung hergestellt werden. Die HPLC-Reinigungen von **DS23** zeigen, dass sich prinzipiell auch deutlich längere Stränge belichten und mit RP-HPLC auftrennen lassen sollten. Entsprechende Versuche werden derzeit von *A. Glas* (AK *Carell*) durchgeführt. Alternativ könnten die Oligonukleotide auch durch enzymatische Ligation verlängert werden. Ein genauer Blick in bisherige Veröffentlichungen zeigt aber, dass hierfür eine deutliche Optimierung dieses Verfahrens notwendig ist.

Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Enzym gebundenen Form des (6-4)-Schadens wurde schon im Rahmen dieser Arbeit erprobt. Durch die selektive Isotopenmarkierung der möglicherweise in der Reparaturreaktion beteiligten Gruppen des (6-4)-Photoproduktes sollte sich ein Umlagerungsschritt auch mit NMR-Spektroskopie verfolgen lassen. Ein hierfür geeigneter, Isotopen markierter (6-4)-Schaden konnte im Rahmen dieser Arbeit in größerer Menge hergestellt werden. Das dazu synthetisierte und verwendete ¹⁵N-markierte Cytosin-

phosphoramidit **140** könnte auch für NMR-Untersuchungen an anderen Oligonukleotiden interessant sein. Die ersten NMR-Untersuchungen zeigten, dass die Detektion des Schadens möglich sein sollte. Sie zeigten aber auch, dass noch Optimierungsbedarf besteht, sowohl im Bereich des Substrat- als auch Experimentdesigns. Sollte ein ^{13}C - ^{15}N -HSQC zum Nachweis der Vierringzwischenstufe verwendet werden, ist wahrscheinlich eine weitere Isotopenmarkierung notwendig. Dazu müsste das C4 des Cytosins ^{13}C -markiert werden. Dies würde die Empfindlichkeit des Experimentes deutlich erhöhen.



Schema 42: Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit des ^{13}C - ^{15}N -HSQC durch doppelte Isotopenmarkierung.

Die hier durchgeführten Studien zur Darstellung des (6-4)-Schadens und seiner Verwendung als Substrat zur Untersuchung der (6-4)-Photolyase sind ein guter Startpunkt für weitere Untersuchungen. Die großen, einfach herzustellenden Mengen an kurzen Oligonukleotiden mit einem (6-4)-Photoschaden sollten auch eine gute Grundlage für die Herstellung von längeren, den (6-4)-Schaden enthaltenden Oligonukleotiden sein. Mit diesen Substraten könnten dann nicht nur die Photolyase, sondern auch viele weitere Enzyme, die mit diesem Schaden interagieren, studiert werden. Bisher konnte keine einzige Struktur eines Komplexes zwischen einem Enzym und dem Schaden erhalten werden. Über die Erkennung und Reparatur des Schadens durch das menschliche NER-Reparatursystem ist zum Beispiel sehr wenig bekannt. Auch die strukturellen Gründe, die zur Blockade von DNA und RNA Polymerasen durch den Schaden führen, lassen sich nur vermuten. Aufgaben für die Zukunft sind daher noch genug vorhanden.

7. Experimenteller Teil

7.1 *Material und Methoden*

Allgemeines: Sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in mehrfach evakuierten und mit Stickstoff rückbefüllten Schlenkkolben durchgeführt. Wenn notwendig (z.B. bei Palladium katalysierten Kreuzkupplungen) wurden die Reaktionslösungen vor dem Start der Reaktion durch mehrfaches Einfrieren mit Flüssigstickstoff, Auftauen unter Hochvakuum und Rückbefüllen mit Stickstoff von Sauerstoff befreit. Die verwendeten Lösungsmittel wurden entweder als „absolute“ Lösungsmittel über Molekularsieb in Flaschen mit Septum von *Fluka* gekauft oder waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung nach Standardverfahren getrocknet und destilliert. Molekularsieb wurde vor der Verwendung mit Wasser staubfrei gewaschen, im Trockenschrank vorgetrocknet und dann unter Hochvakuum im Sandbad (ca. 350° C) für mindestens 12 h getrocknet. Bidestilliertes Wasser (Bidest. H₂O) wurde mit einer *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* erzeugt. Das Entfernen von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde mit einem Rotationsverdampfer der Firma *Büchi* im Membranpumpenvakuum (Pumpenstand der Firma *vacuubrand*) durchgeführt. Die Flüssigkeit von wässrigen- und acetonitrilhaltigen DNA-Lösungen wurde mit *SpeedVac* Geräten der Firma *Savant* oder einem ähnlichem Gerät (RVC 2-25 mit CT 02-50 Kühlfalle) der Firma *Christ* entfernt.

Alle übrigen **Lösungsmittel** und **Chemikalien** wurden, falls nicht anders erwähnt, in einer geeigneten, kommerziell erhältlichen Qualität von den Firmen *Fluka*, *Aldrich*, *Acros*, *Merck* oder *Lancaster* bezogen und so verwendet, wie erhalten. Die folgenden Verbindungen wurden nach Literaturvorschriften hergestellt: 2',3'-*O*-Isopropyliden-5'-*O*-trityl-uridin^[256], 2'-Desoxy-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-uridin^[257], Thyminessigsäurebenzylesterbenzophenonoxetan **51**^[120], 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-ioduridin **53**^[258], 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin **80**^[205], 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-*O*-[(2,4,6-triisopropylbenzen)-sulfonyl]-uridin **98**^[216], 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-4-chlor-uridin **100**^[217] (aus 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-uridin^[259]), (E)- und (Z)-3-Tributylstannyl-acrylsäure-*tert*-butylester **103** und **104**^[260], (Z)-3-Tributylstannyl-acrylsäuremethylester **105** und **106**^[260] und 3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-*O*-[(2,4,6-triisopropyl-benzen)sulfonyl]-thymidin **117**^[215]. Carbazyklus

133 wurde von *S. Voß* zur Verfügung gestellt und nach einer Literaturvorschrift hergestellt.^[242]

Belichtungsexperimente zum Elektronentransfer in DNA wurden mit einer 1000 W Xe-Mitteldruckbogenlampe der Firma *Thermo-Oriel* mit einer Strahlungsdichte von ca. 15 mW/cm^2 bei 360 nm Wellenlänge durchgeführt. Die Apparatur bestand aus einem Rückreflektor und F/1 UV Quarzkondensator, einem Wasserfilter mit externer Kühlung (10 °C, Länge: 96 mm, Apertur: 48 mm), einem dichroitischen Spiegel (280-400 nm) und einer Plankonvexlinse (Durchmesser: 50.8 mm, Brennweite: 175.0 mm, Mittendicke: 6.4 mm). Um eine direkte Schädigung der DNA zu verhindern, wurde zusätzlich ein Langpassfilter (>360 nm, 50 x 50 mm, Dicke: 3 mm, Firma Schott) verwendet, der durch aktive Wasserkühlung auf 20° C temperiert wurde. Ebenso wurde der Küvettenhalter für die Probe auf 10° C gekühlt.

CD-Spektren wurden mit einem J-810 Spektropolarimeter der Firma *Jasco* und einem CDF 426 S Temperatur Controller aufgenommen.

DNA Synthese erfolgte auf einem *Expedite™ 8909 Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *Applied Biosystems*. Die Phosphoramidite für ultramilde Entschützungsbedingungen *Ultramild CE* stammten von den Firmen *Pharmacia* und *Glen Research*. Die mit Nucleotid beladenen CPG-Träger wurden von *Applied Biosystems* bezogen. Als Lösungsmittel für den Aktivator, sowie für alle Phosphoramidite wurde Acetonitril der Firma *Fluka* mit einem maximalen Wassergehalt von 0.001 % verwendet. Für alle anderen Lösungen wurde Acetonitril der Firmen *VWR*, *Roth* oder *Fluka* mit einem maximalen Wassergehalt von 0.003 % eingesetzt. Die verwendeten Aktivatoren (Nitrophenyl)-tetrazol und Benzylthiotetrazol wurden nach Standardprotokollen hergestellt.^[261, 262] Alle weiteren verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Fluka* oder *Aldrich* bezogen. Die Durchführung der Oligonukleotidsynthese erfolgte nach Protokollen des Geräteherstellers mit kleinen Änderungen: Statt Tetrazol wurden eine (Nitrophenyl)-tetrazol-Tetrazol-Mischung (4:1) oder Benzylthiotetrazol als Aktivator verwendet und die Capping-Reagenzien wurden in Acetonitril gelöst. Für Sonderbasen (BrU, TT-CPD-Schaden, etc.) wurde die Kupplungszeit auf 15 min erhöht. Flavinbausteine wurden nach einem publizierten *H*-Phosphonat-Protokoll eingebaut.^[145, 147, 149]

Dünnschichtchromatographie wurde auf Aluminium-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* durchgeführt. Die jeweils verwendeten Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen angegeben. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Betrachtung unter einer UV-Lampe (254 nm bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit einem geeigneten Tauchreagenz, z. B. auf Basis von Anisaldehyd oder Kaliumpermanganat. Die Herstellung der Tauchreagenzien erfolgte gemäß Organikum.

Enzymatische DNA-Totalverdaue von Oligonukleotiden wurden nach einem Standardprotokoll durchgeführt.^[38] Im ersten Schritt wurde die DNA (20 µM in 100 µL H₂O) mit 10 µL Ammoniumacetatpuffer (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM Calciumchlorid, 1 mM ZnSO₄, pH = 5.7), Nuclease P1 (Firma *Sigma*, 22 units) und Calf Spleen Phosphodiesterase II (Firma *Calbiochem*, 0.05 units) 3 h bei 37° C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 12 µL Tris-Puffer (500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0), Alkaline Phosphatase (Firma *BioLabs*, 10 units) und Snake Venom Phosphodiesterase I (Firma *USB*, 0.1 units). Die Lösung wurde weitere 3 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde mit HCl neutralisiert (0.1 M, 6 µL) und 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die erhaltene Mischung von Nukleosiden wurde mit HPLC-MS/MS analysiert.

Fluoreszenz-Spektren wurden mit einem FP-750 Spektrofluorometer der Firma *Jasco* mit Peltier-Element aufgenommen.

HPL-Chromatographie wurde auf Anlagen der Hersteller *Waters* und *Merck-Hitachi* durchgeführt. Für analytische Trennungen standen zwei Anlagen der LaChrom-Serie der Firma *Merck-Hitachi* und zwei Anlagen der Alliance-Serie der Firma *Waters* zur Verfügung. Alle Anlagen verfügten über Gradientenpumpensysteme, Autosampler für die Probenaufgabe und UV/Vis-Detektoren. Teilweise verfügten die Anlagen auch über Diode-Array- und Fluoreszenz-Detektoren. Für semipreparative Trennungen standen eine Anlage der LaChrom-Serie der Firma *Merck-Hitachi* und eine Anlage der Breeze-Serie der Firma *Waters* zur Verfügung. Beide Anlagen verfügten über ein Gradientenpumpensystem, ein Mehrwegeventil zur manuellen Probenaufgabe (Firma *Rheodyne*) und einen UV/Vis-Detektor. Reversed Phase-Säulen (RP-Säulen) verschiedener Art und Anionentauschersäulen wurden von der Firma *Macherey-Nagel* bezogen. Das benötigte Wasser wurde durch eine *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* von Verunreinigungen und Salzen befreit. „Gradient

grade“ Acetonitril wurde von den Firmen *Fisher* oder *VWR*, alle sonstigen Chemikalien (z.B. Salze und Reagenzien für Puffer) von der Firma *Fluka* (Qualität Biochemika) bezogen.

Infrarot-Spektren (IR) wurden durch den IR-Service des Departments Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München, mit einem FT-IR spectrum 100 der Firma *Perkin-Elmer* aufgenommen oder mit einem *Perkin-Elmer* Spectrum BX mit DuraSampl IR II ATR-Einheit (ATR = attenuated total reflection, Firma *Smiths*) gemessen. Die Art der Probenpreparation ist vor dem Spektrum in Klammern vermerkt, die Lage der Absorptionsbanden ist in cm^{-1} angegeben. Die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen *vs* (sehr stark), *s* (stark), *m* (mittel), *w* (schwach) und, wenn notwendig, *br* (breit) gekennzeichnet.

Kapillar-Gel-Elektrophorese wurde mit einem P/ACE™ MDQ DNA System der Firma *Beckman-Coulter* durchgeführt. Es wurden innen mit Polyacrylamid beschichtete Silica-kapillaren (Länge bis zum Detektionsfenster 20 cm), lineares Polyacrylamid als stationäre Phase und ein denaturierender Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, 0.1 M TrisBorat, 1 mM EDTA) mit 7 M Harnstoff verwendet. Die Proben wurden elektrokinetisch injiziert und durch Anlegen einer Trennungsspannung zwischen 8 und 10 kV, je nach Probe, über 45-55 min getrennt.

Kernresonanzspektren (NMR) wurden auf den Geräten *Bruker* DRX 200, *Bruker* AMX 300, *Bruker* ARX 300, *Bruker* AMX 400, *Bruker* AMX 500, *Bruker* AMX 600, *Varian* Oxford 200 und *Varian* XL 400 aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte bei Raumtemperatur, die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel sind in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung δ für ^1H - und ^{13}C -NMR ist in ppm relativ zu Tetramethylsilan ($\delta = 0$), für ^{31}P -NMR relativ zu Phosphorsäure (85 % in Wasser, $\delta = 0$) und für ^{15}N -NMR relativ zu Nitromethan ($\delta = 0$) angegeben. Kopplungskonstanten *J* sind in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten sind mit den Symbolen *s* (Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplet), *q* (Quadruplett), *m* (Multiplet) sowie ggf. deren Kombination gekennzeichnet.

Massenspektren (MS) wurden auf den Geräten *Finnigan* MAT 95 Q (EI, FAB), *Finnigan* LTQ-FT (ESI, APCI), *Finnigan* TSQ 7000 (ESI), *Finnigan* MAT 95 S (ESI), *Applied Biosystems* Q-Star Pulsar i (ESI) und *Finnigan* MAT 90 (EI, FAB) gemessen. Die wichtigsten Signale *m/z* werden in *u* angegeben, wenn möglich mit einer Zuordnung und der Intensität in Prozent, bezogen auf das intensivste Signal, in Klammern. Es wird das Monoisotopensignal

angegeben. Hochauflösende Massenspektren (HR-MS) wurden auf den Geräten *Finnigan* LTQ-FT (ESI, APCI), *Applied Biosystems* Q-Star Pulsar i (ESI) und *Finnigan* MAT 95 S (ESI) gemessen. LC-MS und LC-MS/MS Messungen erfolgten auf den Geräten *Finnigan* LTQ-FT und *Applied Biosystems* Q-Star Pulsar i (ESI) mit einer Uptisphere 3 HDO Säule (150 x 2.1 mm) der Firma *Interchim*. MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem *Bruker* Flex III und einem *Bruker* Autoflex II gemessen. Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von 3-Hydroxypicolinsäure (HPA) in Wasser/Acetonitril 1/1 verwendet. Salzhaltige Proben wurden vor der Messung durch Dialyse auf MF-*Millipore*TM Membranfiltern (Porengröße 0.025 µm) oder durch „Zip-Tips C18“ der Firma *Millipore* entsalzt.

Säulenchromatographie wurde nach der Flash-Methode mit N₂-Überdruck durchgeführt. Es wurde Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 µm) der Firma *Merck* oder Kieselgel H der Firma *Fluka* (Korngröße 5-40 µm) verwendet. Für die säulenchromatographische Reinigung von Phosphoramiditen wurde Kieselgel 60 durch Röhren mit Pyridin, Entfernung des Pyridins *in vacuo*, Trocknung und Lagerung im Trockenschrank (80° C) deaktiviert. Die verwendeten Lösungsmittel waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung destilliert, Chloroform und Dichlormethan unter Zusatz von Calciumchlorid und Kaliumcarbonat. Im Text sind jeweils das verwendete Kieselgel und das Lösungsmittelgemisch in Volumenanteilen angegeben.

Schmelzpunkte wurden mit einem *Büchi Smp 20* in offenen Glaskapillaren oder einem *Leica Galen III* Mikroheiztisch gemessen und sind nicht korrigiert.

UV/Vis-Spektren wurden mit einem *Varian Cary 100 Bio* mit Cary Temperature Controller und Sample Transport Accessory mit Multi Cell Block gemessen. Dieses Gerät wurde auch für die Bestimmung von DNA/RNA-Konzentrationen und die Messung von UV-Schmelzkurven von DNA- und RNA-Strängen verwendet. Für die Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption des entsprechenden DNA-/RNA-Stranges bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Temperatur von 85° C gemessen. Nach einer geeigneten Korrektur der Hintergrundabsorption (z.B. durch die Messung der Absorption bei 320 nm) wurde mit Hilfe des berechneten Absorptionskoeffizienten des entsprechenden DNA/RNA-Stranges die Konzentration bestimmt. Die zur Berechnung des Absorptionskoeffizienten notwendigen Absorptionskoeffizienten der einzelnen Basen wurden vom Hersteller der DNA-Synthesebausteine erhalten oder der Literatur entnommen (für Flavinbausteine **26** und **27**

aus).^[147] Die Absorptionskoeffizienten des CPD als auch des (6-4)-Schaden wurden vernachlässigt, da beide Schäden bei 260 nm näherungsweise keine Strahlung absorbieren. Für UV-Schmelzkurven wurde die Absorption bei drei verschiedenen Wellenlängen (260 nm, 280 nm und 320 nm) in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Der Temperaturgradient betrug $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, die Temperaturmessung erfolgte in einer Referenzküvette. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gespült und die Oligonukleotidlösungen in den Küvetten wurden mit Dimethylpolysiloxan überschichtet. Die Auswertung der Schmelzkurven erfolgte in Origin (Firma *Microcal*). Dazu wurden die erhaltenen Schmelzkurven gemittelt und durch die Verwendung der gemittelten Schmelzkurve bei 320 nm basislinienkorrigiert. Der so erhaltenen Kurve wurde ein Polynom der neunten Ordnung angenähert und aus der Nullstelle der zweiten Ableitung des Polynoms der Schmelzpunkt (= Wendepunkt des Polynoms) bestimmt.

7.2 Spezielle Methoden

7.2.1 Überschusselektronentransferexperimente

Herstellung der DNA Stränge

Die DNA Stränge für Überschusselektronentransferexperimente wurden nach den oben beschriebenen Methoden hergestellt.^[145, 147, 149] Für die verwendeten Spezialphoramidite (CPD Schaden **28** und Oxetan **46**) wurde die Kupplungszeit auf 15 min verlängert. Die Flavine **26** und **27** wurden nach beschriebenen *H*-Phosphonatprotokollen gekuppelt. Die Abspaltung der Stränge mit dem CPD Schaden **28** erfolgte in ges. NH₄OH/EtOH 3/1 für 3 d. Stränge mit dem Oxetan **46** wurden mit 25% NH₄OH für 5 h abgespalten. Alle Stränge wurden anschließend mit RP-HPLC (*Macherey-Nagel* VP250/10 Nucleosil 100-7 C18, Puffer A: 0,1 M TEAA in H₂O, Puffer B: 0,1 M TEAA in H₂O/MeCN 20/80, Flussrate 5 mL/min, Gradient 0 % B- 30 % B in 45 min für Stränge mit CPD Schaden **28**, optimierte Gradienten für Haarnadeln mit Oxetan **46**) und SAX-HPLC (*Macherey-Nagel* VA 50/7,7 Nucleogel SAX 1000-8, Puffer A: 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, Puffer B: 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 M NaCl) gereinigt und mit SepPak-C18 Kartuschen (*Waters*) nach Herstellerprotokoll entsalzt. Die Reinheit wurde mit RP-HPLC (*Macherey-Nagel* CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Puffer A: 0,1 M TEAA in H₂O, Puffer B: 0,1 M TEAA in H₂O/MeCN 20/80, Flussrate 0,7 mL/min, Gradient 0 % B- 30 % B in 45 min für Stränge mit CPD Schaden **28**, optimierte Gradienten für Haarnadeln mit Oxetan **46**) und MALDI-Tof-MS überprüft.

Spaltungsassays

Für DNA Spaltungsassays wurden die DNA Stränge (10 oder 20 µM) in Puffer gelöst (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl) und hydridisiert (Erhitzen auf 90 °C für 5 min gefolgt von Abkühlen über Nacht).

100 µL DNA-Lösung wurden in eine mit Inertgas gespülte Fluoreszenzküvette mit Septum gefüllt. Anschließend wurden unter Lichtausschluss 10 µL Reduktionslösung (87 mg Na₂S₂O₄ in 5 mL 0,01 M NaOH-Lösung) zugegeben. Die Fluoreszenzküvette wurde in die Belichtungsapparatur (siehe oben) gestellt und belichtet. In festen Zeitintervallen wurden Proben (20-25 µL) entnommen, zwei Stunden unter Lichtausschluss an der Luft reoxidiert und mit SAX-HPLC analysiert (*Macherey-Nagel* VA 50/4,6 Nucleogel SAX 1000-8, Puffer A: 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, Puffer B: 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 M NaCl).

7.2.2 Transkript-Verlängerungsexperimente mit der RNA Polymerase II^[263]

Allgemeines

Die Primer-Verlängerungsexperimente mit RNA Polymerase II aus *S. cerevisiae* wurden in Zusammenarbeit mit *F. Brückner* (AK *Cramer*) durchgeführt. Die Experimente erfolgten alle in Transkriptionspuffer (20 mM HEPES pH 7.6, 60 mM Ammoniumsulfat, 8 mM Magnesiumsulfat, 10 µM Zinkchlorid, 10 mM DTT, 10 % Glycerin). Die native, zehn Untereinheiten RNA Polymerase II aus *S. cerevisiae* wurde nach bekannten Protokollen gereinigt.^[188] Die Untereinheiten Rpb 4/7 wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und nach bekannten Protokollen gereinigt.^[188] Die Nukleinsäurekonstrukte **RPK1-RPK4** wurden durch Mischen der einzelnen Oligonukleotide in Transkriptionspuffer (Endkonzentration 100 µM), Erhitzen auf 95 °C (2 min) und langsames Abkühlen assembliert. Um stöchiometrische, 12 Untereinheiten RNA Polymerase II-Nukleinsäurekomplexe zu erhalten, wurde die Polymerase für 10 min mit 1,5 Äquivalenten Nukleinsäurekonstrukt und dann für 20 min mit 5 Äquivalenten Rpb 4/7 bei 20 °C inkubiert. Die Komplexe wurden durch „size exclusion“-Chromatographie (Superose 6 10/300 GL) in Transkriptionspuffer gereinigt. Nicht-stöchiometrische Komplexe der 10 Untereinheiten RNA Polymerase wurden durch Inkubation der Polymerase mit 1,5-2 Äquivalenten der Nukleinsäurekonstrukte für 20 min bei 20 °C in Transkriptionspuffer erhalten.

Transkriptionsassay

Für Transkriptverlängerungsexperimente wurden 0.2-0.4 µM Lösungen der RNA Polymerase II mit NTPs oder TFIIS in Transkriptionspuffer bei 28 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 mM EDTA-Lösung gestoppt und durch Erhitzen auf 95 °C (12 min Aufheizen, 4 min bei 95 °C) denaturiert. Nach Abzentrifugieren des ausgefallenen Proteins wurden die Lösungen mit ZipTips (*Millipore*) nach Herstellerangaben entsalzt und mit CE (Injektion mit 10 kV für 10 s, Trennung mit 8 kV für 50 min) und MALDI-Tof MS (Matrix: Hydroxypicolinsäure/Pyrazindicarbonsäuremischung) analysiert.

7.2.3 Belichtungen zur Herstellung des (6-4)-Schadens

Für die Herstellung des (6-4)-Schadens wurden die verwendeten Oligonukleotide (**DS22-DS25**, 50 µM) in Wasser (oder 10 mM HEPES pH 7.0 für **DS25**) gelöst. Die Lösungen wurden mit Stickstoff gesättigt und in eine Golve Box eingeschleust. Dort wurden die Lösungen in Petrischalen aus Plastik verteilt. Die Petrischalen wurden auf Kühllakus unter eine UV-Lampe (Vilber Lourmat VL-215C, 2*15W 254 nm, Abstand Lampe-Schale 10 cm)

gestellt und belichtet (2-3 h für **DS22**, 13-15 h für **DS23-DS25**). Die Lösungen wurden mit einer *SpeedVac* bis zur Trockenheit eingedampft. Der Rückstand wurde in 900 µL Wasser aufgenommen und durch präparative RP-HPLC (*Macherey-Nagel* VP250/10 Nucleodur 100-5 C18ec, Puffer A: 0,1 M TEAA in H₂O, Puffer B: 0,1 M TEAA in H₂O/MeCN 20/80, Flussrate 5 mL/min, Gradient: 4 % B- 18 % B in 45 min für **DS22**, 4 % B- 14 % B in 45 min für **DS23-DS25**) gereinigt.

7.2.4 (6-4)-Photolyaseassay

Assaypuffer^[122]

50 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin in Wasser.

(6-4)-Photolyase

Für den Assay wurde eine von *M. Maul* (AK *Carell*) klonierte, verkürzte Version der *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase verwendet. Das Enzym enthält einen *Strep-Tag* und wurde in *E. coli* überexprimiert.

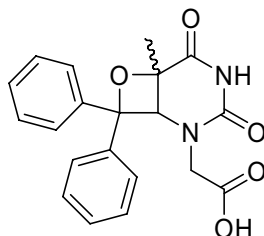
Assay

Das Oligonukleotid (**DS22-DS24**, 20 µM) und *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (2-20 µM) werden unter Lichtausschluss in 100 µL Assaypuffer gelöst. Die Lösung wird eine Stunde mit Weisslicht (2 Leuchtstoffröhren, *Osram* 8W) belichtet. Anschließend wird die Lösung für 10 min auf 95 °C erhitzt und abzentrifugiert. Der Überstand wird mit RP-HPLC (*Macherey-Nagel* CC 250/4 Nucleodur 110-3 C18ec, Puffer A: 0,1 M TEAA in H₂O, Puffer B: 0,1 M TEAA in H₂O/MeCN 20/80, Flussrate 0,5 mL/min, Gradient: 0 % B- 25 % B in 45 min für **DS22**, 0 % B- 20 % B in 45 min für **DS23** und **DS24**) analysiert.

7.3 Synthesevorschriften

7.3.1 Synthese des Oxetan-Uridin-Konjugates

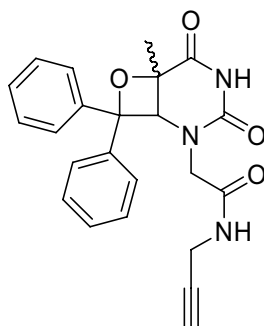
Thyminessigsäurebenzophenonoxetan (**50**)^[120]



In einem Schlenkkolben (250 mL) wurde Thyminessigsäurebenzylesterbenzophenonoxetan **51** (1.000 g, 2.20 mmol) in Ethylacetat (20 mL) gelöst und mit Palladium auf Kohle (10 % Pd, 100 mg, 0.09 mmol) versetzt. Die Suspension wurde unter H₂-Atmosphäre (1 bar) 3 h auf höchster Stufe gerührt. Anschließend wurde über Kieselgur filtriert, mit 50 mL heißem Ethylacetat nachgewaschen und das Filtrat *in vacuo* eingengt. **50** (790 mg, 98%) wurde als weißer Feststoff erhalten.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d⁶): δ = 12.93 (s, br, 1H, COOH), 10.49 (s, 1H, NH), 7.47-7.28 (m, 10H, H_{Ph}), 4.94 (s, 1H, H₆), 4.30 (d, 1H, J = 17.6 Hz, NCHH_A), 3.91 (d, 1H, J = 17.6 Hz, NCHH_B), 1.63 ppm (s, 3H, H_{Me}).

Oxetanalkin (**48**)

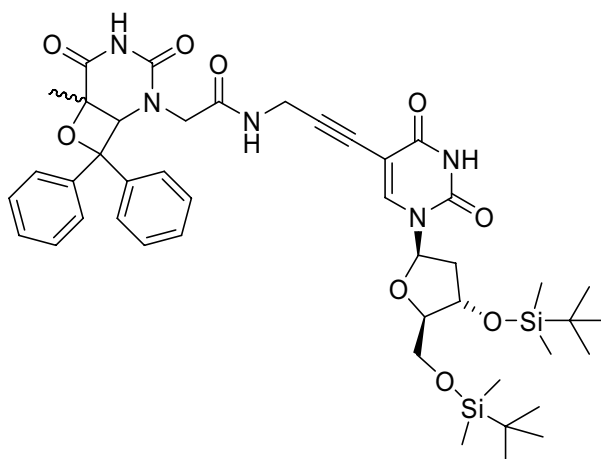


Zu einer Lösung von **50** (1.500 g, 4.1 mmol) in Dimethylformamid (30 mL) wurden nacheinander HOBt (682 mg, 5.0 mmol) und TBTU (1.610 g, 5.0 mmol) gegeben und die Lösung wurde 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurden Propargylamin (0.53 mL, 8.2 mmol) und Triethylamin (3.4 mL) zugegeben und die Lösung wurde weitere 30 min bei RT gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat (150 mL) wurde die Lösung dreimal mit wässriger, gesättigter Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden dreimal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die gesammelten, organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel wurde

in vacuo entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, EtOAc/Isohexan: 1/1) gereinigt und **48** (1.420 g, 86%) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.18$ (EtOAc/Isohexan: 1/1); $M. p.$: 231° C; IR (ATR): $\nu = 3366w, 3224w, 3062w, 2872w, 1724m, 1693m, 1669s, 1533m, 1492m, 1448w, 1411w, 1388w, 1369w, 1290m, 1237w, 1216m, 980m, 785m, 750m, 700vs \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.48$ (s, 1H, CONHCO), 8.55 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, CONH), 7.40-7.26 (m, 10H, H_{Ph}), 4.77 (s, 1H, H6), 4.26 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz, NCHH_ACO), 3.96-3.85 (m, 2H, $H_{\text{Propargyl}}$), 3.61 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz, NCHH_BCO), 3.15-3.12 (m, 1H, H_{Alkin}), 1.59 (s, 3H, H_{Me}); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 169.6, 167.0, 151.1, 144.3, 139.4, 128.3$ (2C), 128.0 (2C), 127.5, 127.4, 125.4 (2C), 124.9 (2C), 90.6, 80.7, 76.0, 73.0, 65.2, 48.1, 27.9, 23.0; MS (ESI⁺): m/z : 426 [M + Na]⁺, 404 [M + H]⁺; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ [M + Na]⁺: 426.1424; gef.: 426.1423.

Oxetan-3',5'-Di-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyuridin-Konjugate (**55**)

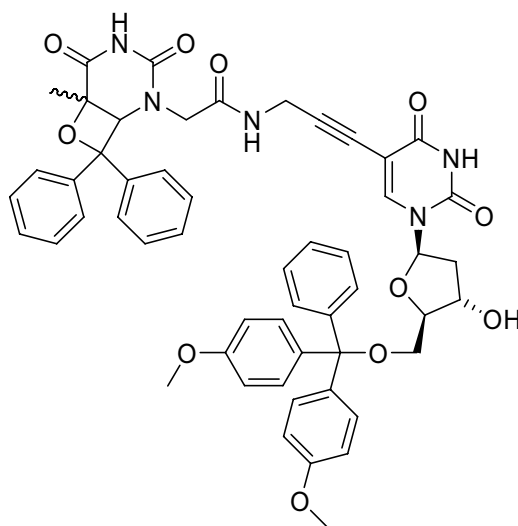


In einem Schlenkkolben wurden **50** (600 mg, 1.50 mmol) und DIEA (0.72 mL, 4.14 mmol) in Dimethylformamid (4 mL) gelöst. In einem weiteren Schlenkkolben wurden Kupferiodid (57 mg, 0.30 mmol), 3',5'-di-*O*-TBS-5-ioddesoxyuridin **53** (728 mg, 1.25 mmol) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (104 mg, 0.15 mmol) ebenfalls in Dimethylformamid (4 mL) gelöst. Anschließend wurden beide Lösungen nach der freeze/thaw-Methode (drei Durchgänge) entgast und dann vereinigt. Die resultierende Lösung wurde 14 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (30 mL) versetzt, mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert und die organische Phase mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten, wäßrigen Phasen wurden nochmals mit Ethylacetat (30 mL) extrahiert und die organische Phase mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch

(Kieselgel 60, EtOAc/Isohexan: 1.5/1) gereinigt und **55** (706 mg, 66%) als gelblicher Feststoff erhalten.

$R_f = 0.13$ (EtOAc/Isohexan: 1/1); *M. p.*: 147 °C (dec.); IR (ATR): $\nu = 3207_w, 3065_w, 2952_w, 2929_w, 2856_w, 1682_{vs}, 1532_w, 1463_m, 1448_m, 1279_s, 1253_s, 1205_m, 1104_s, 1029_w, 968_w, 833_{vs}, 777_s, 750_m, 701_s \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.00$ (s, br, 1H, $\text{NH}_{\text{Uridin}}$), 8.43-8.37 (m, br, 1H, $\text{NH}_{\text{Thymin}}$), 7.89 (s, 1H, $\text{H6}_{\text{Uridin}}$), 7.58-7.51 (m, 1H, CONH), 7.29-7.09 (m, 10H, H_{Ph}), 6.12 (t, 1H, $J = 6.6 \text{ Hz}$, $\text{H1}'$), 4.80 (s, 1H, $\text{H6}_{\text{Thymin}}$), 4.42 (d, 1H, $J = 16.3 \text{ Hz}$, NCHH_ACO), 4.29-4.25 (m, 1H, $\text{H3}'$), 4.08-3.92 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Propargyl}}$), 3.86-3.82 (m, 1H, $\text{H4}'$), 3.79-3.74 (m, 1H, $\text{H5}'_A$), 3.66-3.61 (m, 1H, $\text{H5}'_B$), 3.37-3.31 (m, 1H, NCHH_BCO), 2.22-2.17 (m, 1H, $\text{H2}'_A$), 1.92-1.85 (m, 1H, $\text{H2}'_B$), 1.61 (s, 3H, $\text{H}_{\text{Me-Thymin}}$), 0.81 (s, 9H, H_{tBu}), 0.77 (s, 9H, H_{tBu}), 0.01 (s, 3 $\text{H}_{\text{Me-TBS}}$), 0.00 (s, 3 $\text{H}_{\text{Me-TBS}}$), -0.04 (s, 3 $\text{H}_{\text{Me-TBS}}$), -0.04 (s, 3 $\text{H}_{\text{Me-TBS}}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 169.7, 167.2, 162.8, 151.8, 149.1, 143.8, 143.0, 138.7, 128.6$ (2C), 128.4 (2C), 128.1, 127.9, 126.0 (2C), 125.3 (2C), 99.0, 91.1, 89.3, 88.4, 85.9, 76.4, 74.7, 72.1, 65.9, 62.8, 48.7, 42.0, 29.9, 25.9 (3C), 25.7 (3C), 23.3, 18.4, 18.0, -4.6, -4.9, -5.5, -5.5; MS (FAB $^+$): m/z : 880 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 858 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 536, 514; HRMS (ESI $^+$): m/z : ber. für $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{N}_5\text{O}_9\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 858.3924; gef.: 858.3923.

5'-(Dimethoxytrityl)-Oxetan-desoxyuridin-Konjugate (**56**)

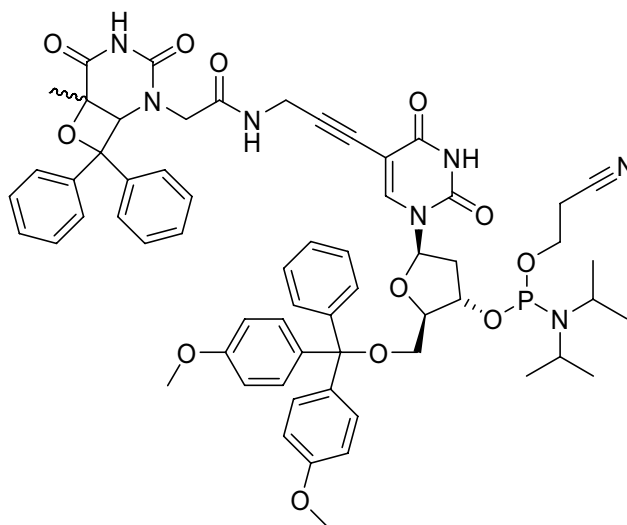


In einem Polypropylen-Rohr wurde **55** (234 mg, 0.27 mmol) in Ethylacetat (12 mL) gelöst. HF·Pyridin-Komplex (70% HF, 0.10 mL, 3.85 mmol) und Pyridin (0.10 mL, 1.02 mmol) wurden vorsichtig zugegeben, das Rohr wurde dicht verschlossen und bei RT 16 h geschüttelt. Die sich ergebende Suspension wurde mit Methoxytrimethylsilan (0.60 mL, 4.35 mmol) versetzt und weitere 2 h geschüttelt. Der entstandene Feststoff wurde abzentrifugiert, zweimal mit kaltem Ethylacetat gewaschen und getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt **54** wurde in

Pyridin (8 mL) gelöst, mit Molekularsieb 4Å und einer katalytischen Menge DMAP versetzt und für 12 h bei RT gerührt. 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (102 mg, 0.30 mmol) wurde hinzugegeben und die Suspension wurde weitere 36 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum entfernt, das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60, DCM/MeOH/Py: 94/6/0.5) gereinigt und **56** (103 mg, 41%) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.15$ (DCM/MeOH/Py: 95/5/0.5); IR (ATR): $\nu = 3407s, 3057w, 2818w, 2254w, 1698s, 1541w, 1508w, 1465w, 1448w, 1282m, 1249m, 1178w, 1049m, 1023vs, 1002vs, 822s, 759s, 702w \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.67$ (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Uridin}}$), 10.47 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Thymin}}$), 8.57 (s, br, 1H, CONH), 7.91 (s, 1H, H6), $7.41\text{-}7.33$ (m, 8H, H_{DMT}), $7.32\text{-}7.20$ (m, 11H, H_{DMT} , H_{Ph}), $6.92\text{-}6.87$ (m, 4H, H_{DMT}), $6.12\text{-}6.07$ (m, 1H, H1'), 5.33 (s, 1H, OH), 4.77 (s, 1H, $\text{H6}_{\text{Thymin}}$), $4.34\text{-}4.24$ (m, 2H, H3', $\text{NCHH}_{\text{A}}\text{CO}$), $4.03\text{-}3.97$ (m, 1H, H4'), $3.96\text{-}3.90$ (m, 2H, $\text{H}_{\text{Propargyl}}$), 3.73 (s, 6H, H_{OMe}), $3.63\text{-}3.57$ (m, 1H, $\text{NCHH}_{\text{B}}\text{CO}$), $3.28\text{-}3.23$ (m, 1H, H5' $_{\text{A}}$); $3.11\text{-}3.06$ (m, 1H, H5' $_{\text{B}}$), $2.30\text{-}2.24$ (m, 1H, H2' $_{\text{A}}$), $2.21\text{-}2.15$ (1H, m, H2' $_{\text{B}}$), 1.60 (s, 3H, H_{Me}); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 169.7, 166.9, 161.4, 158.0$ (2C), $151.1, 149.2, 144.7, 144.3, 143.3, 139.4, 135.5, 135.1, 129.6$ (2C), 129.5 (2C), 128.3 (2C), 128.0 (2C), 127.8 (2C), $127.6, 127.5, 127.4$ (2C), $126.5, 125.4$ (2C), 124.9 (2C), 113.1 (4C), $98.1, 90.6, 89.0, 85.7$ (2C), $85.0, 76.1, 74.3, 70.3, 65.2, 63.7, 54.9$ (2C), $48.1, 40.0, 28.7, 23.0$; MS (ESI $^+$): m/z : 954 [M + Na] $^+$, 303; HRMS (ESI $^+$): m/z : ber. für $\text{C}_{53}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{Na}$ [M + Na] $^+$: 954.3321; gef.: 954.3329.

Oxetan-Uridin-Konjugat-Phosphoramidit (**46**)



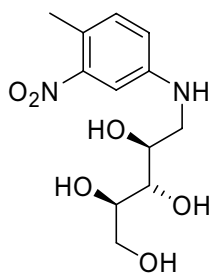
56 (103 mg, 0.11 mmol) und Diisopropylammoniumtetrazolat (10 mg, 0.055 mmol) wurden in Dichlormethan gelöst (2 mL). Zu dieser Lösung wurde (β -Cyanoethyl)-tetrakispropylphosphordiamidit (44 mg, 0.15 mmol) getropft und die Lösung wurde 12 h bei

RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum entfernt, das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (deaktiviertes Kieselgel 60, DCM/MeOH/Py: 95/5/0.5) gereinigt und **46** (72 mg, 58%) als farbloses Öl erhalten. Für analytische Zwecke wurde ein Teil des Produktes in Ethylacetat (1 mL) gelöst und aus kaltem Isohexan (100 mL) gefällt. Es wurde **46** als weißer, amorpher Feststoff erhalten.

$R_f = 0.26$ (DCM/MeOH/Py: 95/5/0.5); ^{31}P NMR (81 MHz, Benzen- d^6): $\delta = 149.6, 149.5$ ppm; MS (ESI): m/z : 1193.4 [M + NO $_3$] $^-$, 1166.4 [M + Cl] $^-$, 1130.5 [M - H] $^-$; HRMS (ESI): m/z : ber. für C $_{62}$ H $_{65}$ N $_7$ O $_{12}$ P $_1$ [M - H] $^-$: 1130.4434; gef.: 1130.4505.

7.3.2 Synthese von 8-Demethyl-8-iodriboflavin

3-Nitro-4-methyl-*N*-ribitylanilin (**59**)

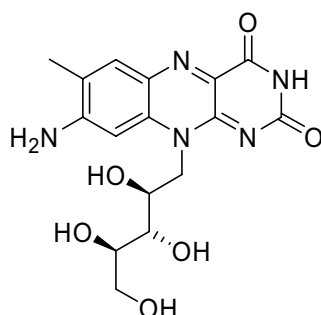


4-Methyl-3-nitroanilin **58** (0.98 g, 6.4 mmol), *D*-Ribose (0.96 g, 6.4 mmol) und Essigsäure (0.37 mL, 6.4 mmol) wurden in Methanol (20 mL) gelöst und 30 min bei 0° C gerührt. Anschließend wurde Natriumcyanoborhydrid (1.00 g, 15.9 mmol) unter starkem Rühren portionsweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und für 24 h gerührt. Die Lösung wurde mit Salzsäure (1 M) auf pH 1 angesäuert und entstehende Gase durch eine wässrige, gesättigte Natriumhydroxidlösung geleitet, um entstehendes HCN zu vernichten. Nach 15 min Rühren bei RT wurde die Lösung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, mit Kieselgel 60 versetzt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das auf Kieselgel aufgezogene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, CHCl $_3$ /MeOH 9:1; später 6:1) und **59** (1.07 g, 59 %) als rotes Öl erhalten.

$R_f = 0.22$ (DCM/MeOH: 9/1); IR (KBr): $\nu = 3494_w, 3427_w/br, 3256_m/br, 2964_w, 2929_w, 2859_w, 2586_w, 2524_w, 2414_m, 1628_m, 1526_s, 1443_m, 1411_s, 1389_s, 1324_{vs}, 1307_s, 1250_m, 1205_m, 1167_m, 1062_{vs}, 849_m, 820_m, 754_w, 651_m$ cm $^{-1}$; ^1H -NMR (400 MHz, D $_2$ O): $\delta = 7.09$ (s, 1H, H $_6$), 6.84 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz H $_3$), 6.73 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz H $_2$), 3.99-3.92 (m, 1H, H $_2'$), 3.88-3.81 (m, 2H, H $_4'$, H $_5'_A$), 3.78-3.68 (m, 2H, H $_3'$, H $_5'_B$), 3.37 (dd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J =$

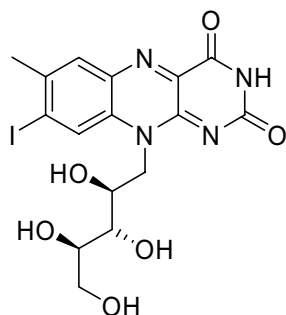
2.5 Hz $H1'_A$), 3.11 (dd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz $H1'_B$), 2.14 (s, 3H, H_{Me}); ^{13}C -NMR (75 MHz, D_2O): $\delta = 149.0, 147.4, 133.5, 122.7, 119.8, 108.5, 73.5, 72.7, 70.5, 63.1, 46.0, 19.3$; MS (ESI⁺): m/z : 287 [M + H]⁺, 265, 241, 239, 223, 201, 102; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $C_{12}H_{19}N_2O_6$ [M + H]⁺: 287.1238; gef.: 287.1226.

8-Demethyl-8-aminoriboflavin (**60**)^[185]



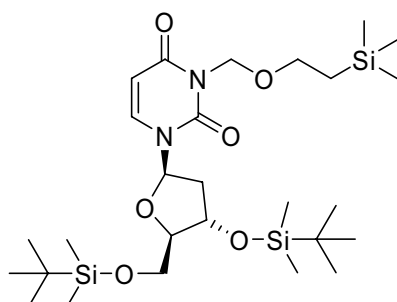
3-Nitro-4-methyl-*N*-ribitylanilin **59** (1.36 g, 4.8 mmol) wurde in einem Gemisch aus Methanol (10 mL) und Ethanol (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Palladiumhydroxid auf Kohle (0.25 g) wurde unter Wasserstoffatmosphäre gerührt bis sich die Lösung vollständig entfärbt hatte (ca. 3 h). Die Suspension wurde über Kieselgur in eine heiße Lösung (ca. 60° C) von Violursäuremonohydrat (1.1 g, 6.3 mmol) in H_2O /Methanol 1:1 (80 mL) filtriert. Die entstandene, tiefviolette Lösung wurde für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das ausgefallene Produkt heiß abfiltriert und mehrfach mit Wasser gewaschen. **60** (1.08 g, 60 %) wurde als rötlich-brauner, mikrokristalliner Feststoff erhalten. Zur Gewinnung von zur Kristallstrukturbestimmung geeigneten Kristallen wurde eine Lösung von **60** in verdünnter Salzsäure mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt und offen stehen gelassen.

IR (ATR): $\nu = 3388w, 3335w, 3153m, 1668s, 1614s, 1501s, 1451s, 1378s, 1316m, 1269s, 1237m, 1200m, 1151m, 1099w, 1073w, 1015s, 880w, 788w, 742s, 680m, 620s$ cm^{-1} ; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 10.92$ (s, 1H, NH), 7.64 (s, 1H, H6), 7.16 (s, br, 2H, NH_2), 6.97 (s, 1H, H9), 5.06 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz 3'OH), 4.87 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz 4'OH), 4.85 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz 2'OH), 4.79-4.70 (m, 1H, $H1'_A$), 4.51 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, 5'OH), 4.52-4.44 (m, 1H, $H1'_B$), 4.29-4.22 (m, 1H, $H2'$), 3.70-3.62 (m, 2H, $H4', H5'_A$), 3.59-3.53 (m, 1H, $H3'$), 3.46-3.38 (m, 1H, $H5'_B$), 2.25 (s, 3H, H_{Me}); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 160.9, 155.7, 155.2, 151.2, 136.1, 132.7, 130.6, 127.5, 125.1, 95.6, 73.9, 72.7, 68.9, 63.6, 47.4, 16.9$; MS (ESI⁺): m/z : 378 [M + H]⁺, 317, 265, 241, 223, 102; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $C_{16}H_{18}N_5O_6$ [M - H]: 376.1263; gef.: 376.1276. UV/VIS (0.033 M HCl in H_2O): $\lambda_{max} (\epsilon) = 478$ (33407), 303 (9888), 252 (34658).

8-Demethyl-8-iodriboflavin (65)

8-Demethyl-8-aminoriboflavin **60** (300 mg, 0.8 mmol) wurde in verdünnter Schwefelsäure (2.5 M, 9 mL) gelöst und die tiefrote Lösung wurde auf 0° C gekühlt. Festes Natriumnitrit (66 mg, 1 mmol) wurde in einer Portion zugegeben und die Lösung wurde 5 min bei 0° C gerührt. Dann wurde Harnstoff (30 mg) zugegeben und weitere 5 min bei 0° C gerührt. Die tiefrote Lösung wurde nun in ein Becherglas mit einer sehr stark gerührten Lösung von Kaliumiodid (633 mg, 3.8 mmol) in Wasser (9 mL) bei RT überführt (Achtung, starke Gasentwicklung!). Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt. Das ausgefallene Rohprodukt wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und aus Wasser umkristallisiert. **63** (221 mg, 57 %) wurde als dunkelroter, mikrokristalliner Feststoff erhalten.

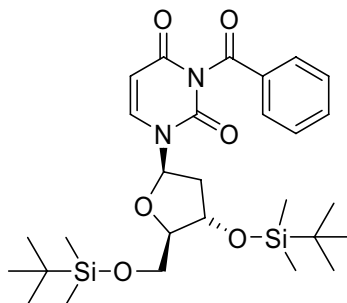
IR (ATR): 3301_{w/br}, 3167_w, 3051_w, 2826_w, 1724_s, 1652_s, 1572_s, 1528_{vs}, 1418_m, 1338_m, 1252_m, 1200_m, 1035_s, 976_m, 843_s, 806_w, 768_m; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d⁶): δ = 11.43 (s, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, H9), 8.02 (s, 1H, H6), 4.81-4.73 (m, 1H, H1'_A), 4.66-4.61 (m, 1H, H1'_B), 4.23-4.19 (m, 1H, H2'), 3.65-3.60 (m, 3H, H3', H5'), 3.48-3.44 (m, 1H, H4'), 2.53 (s, 3H, H_{Me}); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d⁶): δ = 159.6, 155.3, 150.7, 138.7, 138.4, 134.7, 132.1, 130.1, 127.3, 110.5, 73.4, 72.6, 68.6, 63.2, 47.3, 26.8; MS (ESI⁺): *m/z*: 489 [M+H]⁺, 457, 331; HR-MS (ESI⁺): *m/z*: ber. für C₁₆H₁₈IN₄O₆ [M + H]⁺: 489.0266, gef.: 489.0266; UV/VIS (H₂O): λ_{max} (ε) = 447 (10220), 386 (8277), 266 (21377), 232 (20537).

7.3.3 Synthesestudien zur Herstellung des (6-4)-Schadens: 1,4-Addition***N*-[2-(Trimethylsilyl)ethoxymethyl]-2'-desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin (78)**

2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin **80** (1.07 g, 2.3 mmol) wurde in Dichlormethan (5 mL) gelöst. DIEA (1.33 mL, 7.6 mmol) und 2-(Trimethylsilyl)-ethoxymethylchlorid (0.5 mL, 2.9 mmol) wurden zugetropft und die resultierende Lösung wurde 3 d bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und mehrfach mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mehrfach mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert, und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 4/1) gereinigt und **78** (590 mg, 43 %) als farbloses Öl erhalten. Außerdem wurde ein Teil des Eduktes (173 mg, 16 %) zurückgewonnen.

$R_f = 0.73$ (Isohexan/EtOAc: 3/1); IR (ATR): $\nu = 3095w, 2953m, 2929m, 2857m, 1717m, 1668vs, 1457m, 1359w, 1276w, 1250m, 1196w, 1089s, 1030w, 834s, 777s \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.88$ (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H6), 6.28 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz, H1'), 5.72 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H5), 5.39 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, NCHH_AO), 5.36 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, NCHH_BO), 4.42-4.37 (m, 1H, H3'), 3.93-3.87 (m, 2H, H4', H5'_A), 3.78-3.73 (m, 1H, H5'_B), 3.70-3.64 (m, 2H, OCH₂), 2.33 (ddd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J = 6.2$ Hz, $J = 4.6$ Hz, H2'_A), 2.09-2.01 (m, 1H, H2'_B), 0.99-0.94 (m, 2H, CH₂TMS), 0.91 (s, 9H, H_{tBu}), 0.88 (s, 9H, H_{tBu}), 0.10 (s, 6H, 2*H_{Me}), 0.07 (s, 3H, H_{Me}), 0.06 (s, 3H, H_{Me}), -0.01 (s, 9H, H_{TMS}); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.7, 150.9, 138.6, 101.7, 87.7, 85.8, 71.1, 69.8, 67.5, 62.3, 41.9, 25.9$ (3C), 25.7 (3C), 18.3, 18.2, 17.9, -1.4 (3C), -4.6, -4.9, -5.5, -5.6; MS (FAB⁺): m/z : 587 [M + H]⁺, 529, 339, 287, 215, 185, 145, 89, 73; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für C₂₇H₅₅N₂O₆Si₃ [M + H]⁺: 587.3363; gef.: 587.3368.

N-Benzoyl-2'-desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin (**79**)



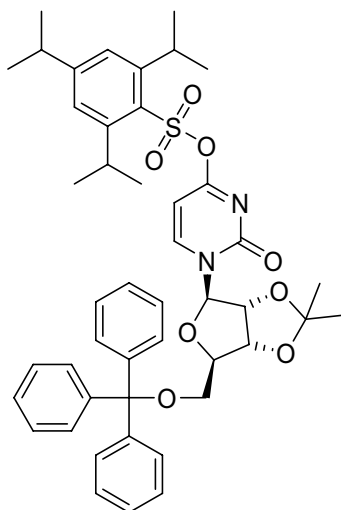
2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin **80** (1.000 g, 2.2 mmol) und DMAP (30 mg, 0.2 mmol) wurden in Pyridin (20 mL) gelöst. DIEA (0.55 mL, 3.3 mmol) und Benzoylchlorid (0.33 mL, 2.8 mmol) wurden langsam bei RT zugetropft und die resultierende Lösung wurde 2 d bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt und mehrfach mit

Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert, und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 5/1) gereinigt und **79** (723 mg, 59 %) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.56 (Isohexan/EtOAc: 3/1); IR (KBr): ν = 3091 w , 2955 m , 2930 m , 2858 m , 1749 s , 1710 s , 1678 vs , 1471 w , 1449 m , 1372 m , 1280 m , 1255 s , 1103 m , 1030 m , 886 w , 837 s , 781 m cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 8.02 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H6), 7.96-7.92 (m, 2H, H_{Bz}), 7.51-7.47 (m, 1H, H_{Bz}), 7.66-7.62 (m, 2H, H_{Bz}), 6.28 (t, 1H, J = 6.3 Hz, H1'), 5.80 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H5), 4.45-4.41 (m, 1H, H3'), 3.96-3.94 (m, 1H, H4'), 3.93 (dd, 1H, J = 11.4 Hz, J = 2.4 Hz, H5'_A), 3.79 (dd, 1H, J = 11.4 Hz, J = 1.8 Hz, H5'_B), 2.37-2.31 (m, 1H, H2'_A), 2.14-2.08 (m, 1H, H2'_B), 0.94 (s, 9H, H_{tBu}), 0.88 (s, 9H, H_{tBu}), 0.13 (s, 6H, 2*H_{Me}), 0.08 (s, 6H, 2*H_{Me}); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ = 168.8, 162.2, 149.2, 139.9, 135.0, 131.6, 130.5 (2C), 129.1 (2C), 102.1, 88.0, 85.6, 71.3, 62.5, 42.0, 25.9 (3C), 25.7 (3C), 18.4, 17.9, -4.6, -4.9, -5.5, -5.5; MS (FAB⁺): m/z : 561 [M + H]⁺, 529, 371, 343, 217, 145, 73; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für C₂₈H₄₅N₂O₆Si₂ [M + H]⁺: 561.2811; gef.: 561.2815.

7.3.4 Synthesestudien zur Herstellung des (6-4)-Schadens: Kreuzkupplungen

2',3'-*O*-isopropyliden-5'-*O*-trityl-4-*O*-[(2,4,6-triisopropylbenzen)-sulfonyl]-uridin (**97**)

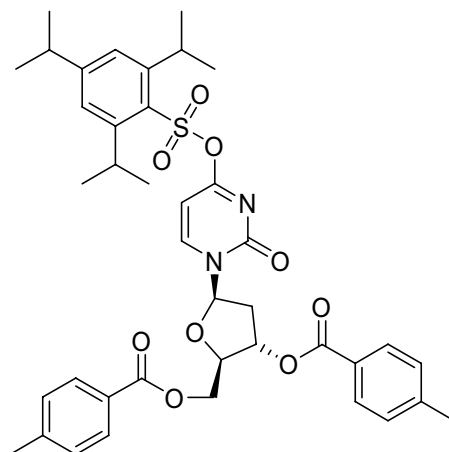


2',3'-*O*-Isopropyliden-5'-*O*-trityl-uridin (1.00 g, 1.9 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (25 mL) gelöst. Natriumhydrid (60 %ig als Suspension in Öl, 360 mg, 9.0 mmol) wurde vorsichtig zugegeben (Schaumbildung) und die erhaltene Suspension 45 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 2,4,6-Triisopropylbenzensulfonylchlorid (983 mg, 3.2 mmol) zugegeben

und die Suspension weitere 14 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Ethylacetat: 4/1) gereinigt und **97** (820 mg, 54 %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.21$ (Isohexan/EtOAc: 4/1); IR (KBr): $\nu = 3059_w, 2962_s, 2932_m, 2872_w, 1693_s, 1631_s, 1599_m, 1543_s, 1450_m, 1384_m, 1279_m, 1196_m, 1187_m, 1157_m, 1113_w, 1074_s, 809_m, 777_m, 706_s, 558_m \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.07$ (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H6), 7.36-7.26 (m, 15H, H_{Trityl}), 7.20 (s, 2H, H_{Ph}), 5.89 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 5.64 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H5), 4.80-4.73 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{3'}$), 4.47-4.42 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.29-4.18 (m, 2H, $\text{H}_{\text{orthoiPr}}$), 3.48 (dd, 1H, $J = 10.8$ Hz, $J = 2.7$ Hz, $\text{H}_{5'_A}$), 3.36 (dd, 1H, $J = 10.8$ Hz, $J = 4.8$ Hz, $\text{H}_{5'_B}$), 2.96-2.85 (m, 1H, $\text{H}_{\text{paraiPr}}$), 1.55 (s, 3H, $\text{H}_{\text{isopropylidenMe}}$), 1.33 (s, 3H, $\text{H}_{\text{isopropylidenMe}}$), 1.29-1.23 (m, 18H, H_{iPrMe}); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.1, 154.5, 153.7, 151.2$ (2C), 146.1, 142.9 (3C), 130.6, 128.6 (6C), 128.0 (6C), 127.5 (3C), 124.0 (2C), 114.1, 94.7, 93.8, 87.6, 87.0, 85.9, 80.0, 63.3, 34.3, 29.6 (2C), 27.2, 25.3, 24.6 (2C), 24.5 (2C), 23.5 (2C); HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $\text{C}_{52}\text{H}_{68}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M} + \text{HNEt}_3]^+$: 894.4722; gef.: 894.4717.

2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-4-*O*-[(2,4,6-triisopropylbenzen)-sulfonyl]-uridin (**99**)

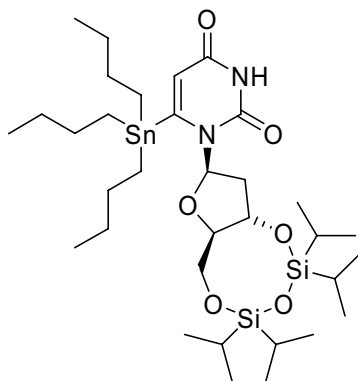


2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-uridin (300 mg, 0.65 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (20 mL) gelöst. Natriumhydrid (60 %ig als Suspension in Öl, 129 mg, 3.23 mmol) wurde vorsichtig zugegeben (Schaumbildung) und die erhaltene Suspension 45 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 2,4,6-Triisopropylbenzensulfonylchlorid (392 mg, 1.29 mmol) zugegeben und die Suspension weitere 14 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen,

über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Etylacetat: 4/1) gereinigt und **99** (407 mg, 86 %) als weißer, amorpher Feststoff erhalten.

IR (KBr): $\nu = 2962m, 2871w, 1717s, 1688s, 1628w, 1611m, 1543w, 1463m, 1382m, 1273s, 1180m, 1101m, 1020w, 754m, 691w, 556w \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.07$ (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H₆), 7.93-7.90 (m, 2H, H_{Tol}), 7.83-7.80 (m, 2H, H_{Tol}), 7.27-7.22 (m, 4H, H_{Tol}), 7.20 (s, 2H, H_{Ph}), 6.21 (dd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J = 5.4$ Hz, H_{1'}), 5.94 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H₅), 5.57-5.54 (m, 1H, H_{3'}), 4.75 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 3.0$ Hz, H_{5'A}), 4.65 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 3.6$ Hz, H_{5'B}), 4.62-4.59 (m, 1H, H_{4'}), 4.28-4.22 (m, 2H, H_{orthoiPr}), 3.05 (ddd, 1H, $J = 14.4$ Hz, $J = 5.7$ Hz, $J = 1.5$ Hz, H_{2'A}), 2.94-2.86 (m, 1H, H_{paraiPr}), 2.42 (s, 6H, H_{Me}), 2.20-2.14 (m, 1H, H_{2'B}), 1.32-1.23 (m, 18H, H_{iPrMe}); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.1, 166.0, 166.0, 154.5, 153.6, 151.2$ (2C), 144.6, 144.5 (2C), 130.5, 129.8 (2C), 129.4 (4C), 129.2 (2C), 126.3, 126.2, 124.0 (2C), 95.0, 88.0, 84.0, 74.8, 63.9, 39.3, 34.2, 29.6 (2C), 24.6 (2C), 24.4 (2C), 23.4 (2C), 21.7 (2C); HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{NaO}_9\text{S}$ [$\text{M} + \text{Na}$]⁺: 753.2816; gef.: 753.2829.

2'-Desoxy-[3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-ribofuranosyl]-6-(tributylstannyl)-uridin (107)



Diisopropylamin (0.35 mL, 2.5 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (6 mL) gelöst und die Lösung auf 0° C gekühlt. *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 1.58 mL, 2.5 mmol) wurde langsam zugetropft und die Lösung 1 h bei 0° C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf -78° C gekühlt, 2'-Desoxy-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-uridin (295 mg, 0.6 mmol) in Tetrahydrofuran (4 mL) zugetropft und die Lösung 2 h bei -78° C gerührt. Tributylzinnchlorid (0.34 mL, 1.3 mmol) wurde zugetropft und die Lösung 100 min bei -78° C gerührt. Die Lösung wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt und mit Ethylacetat mehrfach extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter

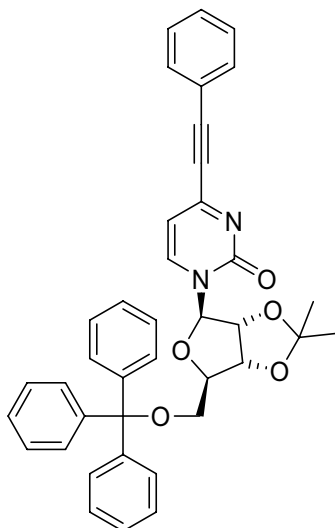
Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Etylacetat: 6/1) gereinigt und **107** (357 mg, 75 %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.69$ (Isohexan/EtOAc: 4/1); IR (ATR): $\nu = 3261w/br, 2924m, 2868w, 1712m, 1680s, 1558w, 1462w, 1428w, 1368m, 1336m, 1231w, 1158w, 1088s, 1065m, 1029s, 962w, 886m, 864m, 825m, 784w, 690m \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.09$ (s, br, 1H, NH), 5.70-5.58 (m, 1H, H5), 5.32 (dd, 1H, $J = 9.0 \text{ Hz}, J = 3.3 \text{ Hz}, \text{H1}'$), 5.04-4.94 (m, 1H, H3'), 4.03-3.97 (m, 2H, H5'), 3.81-3.73 (m, 1H, H4'), 3.02-2.91 (m, 1H, H2'_A), 2.35-2.24 (m, 1H, H2'_B), 1.69-0.87 (m, 55H, H_{Bu}, H_{iPr}); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.8, 161.6, 149.6, 110.7, 94.0, 85.9, 73.6, 64.1, 39.8, 28.7$ (3C), 27.1 (3C), 17.6, 17.5, 17.4 (2C), 17.3, 17.2, 17.0 (2C), 13.6 (3C), 13.3 (2C), 12.7, 12.6, 11.6 (3C); HRMS (ESI): m/z : ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{63}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}_2\text{Sn}$ [M + H]⁺: 759.3252; gef.: 759.3250.

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) für Stille-Kupplungen mit den Arylsulfonaten **97**, **98** und **99** (AAV 1)

Arylsulfonat (1 eq), Zinnreagenz (0.9-2.5 eq), Kupferiodid (0.2 eq) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (0.1 eq) wurden in Dimethylformamid (1 mL pro 0.1 mmol Arylsulfonat, bei kleinen Ansätzen mehr) gelöst. Die Lösung wurde entgast und für 1-2 d (DC-Kontrolle) auf 55° C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Dimethylformamid am Hochvakuum entfernt und die Reaktionsmischung säulenchromatographisch gereinigt.

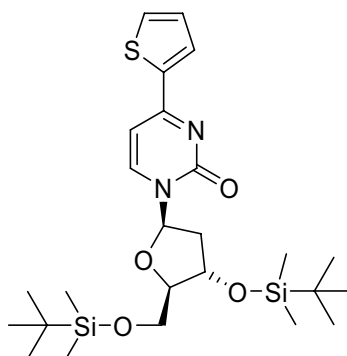
1-(2',3'-*O*-isopropyliden-5'-*O*-trityl-ribofuranosyl)-4-(phenylethynyl)-2-(1*H*)-pyrimidinon (**108**)



97 (150 mg, 0.19 mmol), (Phenylethynyl)-tributylstannan (98 μ L, 0.28 mmol), Kupferiodid (8 mg, 0.04 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (23 mg, 0.02 mmol) wurden in Dimethylformamid (6 mL) nach AAV 1 umgesetzt (Reaktionszeit 16 h). Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Etylacetat: 1/1) gereinigt und **108** als farbloses Öl (74 mg, 64 %) erhalten.

$R_f = 0.30$ (EtOAc/Isohexan: 1/1); IR (Film): $\nu = 3086_w, 3060_w, 2988_w, 2931_m, 2871_w, 2217_s, 1661_s, 1611_s, 1505_s, 1492_s, 1448_s, 1383_m, 1374_m, 1314_w, 1271_m, 1213_m, 1158_w, 1114_m, 1078_s, 910_m, 876_w, 791_m, 759_m, 732_s, 707_s, 632_m, 541_w \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.10$ (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, H6), 7.62-7.58 (m, 2H, H_{Ph}), 7.45-7.25 (m, 18H, H_{Ph} , H_{Trityl}), 6.15 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, H5), 5.97 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, H1'), 4.91 (dd, 1H, $J = 6.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz, H2'), 4.76 (dd, 1H, $J = 6.2$ Hz, $J = 3.5$ Hz, H3'), 4.52-4.47 (m, 1H, H4'), 3.51 (dd, 1H, $J = 10.8$ Hz, $J = 2.9$ Hz, H5'A), 3.40 (dd, 1H, $J = 10.8$ Hz, $J = 5.1$ Hz, H5'B), 1.59 (s, 3H, H_{Me}), 1.36 (s, 3H, H_{Me}); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 159.2, 154.6, 143.7, 143.1$ (3C), 132.7 (2C), 130.3, 128.5 (8C), 128.0 (6C), 127.4 (3C), 120.8, 114.0, 106.4, 95.8, 94.5, 87.5, 87.2, 87.1, 85.9, 80.3, 63.5, 27.2, 25.3; MS (FAB $^-$): m/z : 610.2 [M - H] $^-$, 316.6, 279.8, 208.0, 194.9, 165.8, 126.7, 121.9; HRMS (FAB $^+$): m/z : ber. für $\text{C}_{39}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5$ [M + H] $^+$: 611.2541; gef.: 611.2555.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-4-thienyl-2-(1*H*)-pyrimidinon (109)

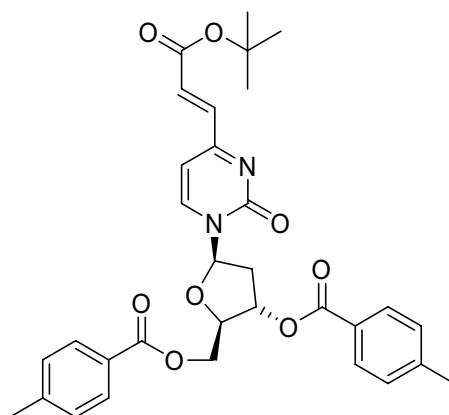


98 (144 mg, 0.2 mmol), 2-Tributylstannyl-thiophen (100 μ L, 0.3 mmol), Kupferiodid (8 mg, 0.04 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (23 mg, 0.02 mmol) wurden in Dimethylformamid (2 mL) nach AAV 1 umgesetzt (Reaktionszeit 16 h). Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Etylacetat: 2/1) gereinigt und **109** als farbloses Öl (79 mg, 76 %) erhalten.

$R_f = 0.76$ (EtOAc/Isohexan: 1/1); IR (ATR): $\nu = 3087_w, 2954_m, 2929_m, 2856_m, 1646_s, 1608_s, 1530_m, 1512_m, 1446_m, 1417_w, 1336_w, 1308_m, 1249_m, 1179_m, 1095_s, 1065_w, 1032_s,$

947_w, 878_w, 832_{vs}, 776_{vs}, 706_s, 668_m cm⁻¹; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.41 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, H₆), 7.76 (dd, 1H, *J* = 3.6 Hz, *J* = 1.2 Hz, H_{5^{Thienyl}}), 7.57 (dd, 1H, *J* = 5.1 Hz, *J* = 1.2 Hz, H_{3^{Thienyl}}), 7.13 (dd, 1H, *J* = 5.1 Hz, *J* = 3.6 Hz, H_{4^{Thienyl}}), 6.61 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, H₅), 6.25 (dd, 1H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 4.5 Hz, H_{1'}), 4.42-4.33 (m, 1H, H_{3'}), 4.00-3.92 (m, 2H, H_{4'}, H_{5'_A}), 3.82-3.74 (m, 1H, H_{5'_B}), 2.61-2.50 (m, 1H, H_{2'_A}), 2.18 (ddd, 1H, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.6 Hz, *J* = 4.5 Hz, H_{2'_B}), 0.93 (s, 9H, H_{tBu}), 0.87 (s, 9H, H_{tBu}), 0.12 (s, 3H, H_{Me}), 0.11 (s, 3H, H_{Me}), 0.05 (s, 3H, H_{Me}), 0.04 (s, 3H, H_{Me}); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 165.4, 155.3, 143.0, 141.8, 132.5, 129.8, 128.3, 99.6, 87.7, 87.0, 69.7, 61.6, 42.2, 25.9 (3C), 25.7 (3C), 18.3, 17.9, -4.6, -5.0, -5.5, -5.5; MS (ESI⁺): *m/z*: 624.4 [M + HNEt₃]⁺, 523.2 [M + H]⁺, 312.2; HRMS (ESI⁺): *m/z*: ber. für C₃₁H₅₈N₃O₄SSi₂ [M + HNEt₃]⁺: 624.3681; gef.: 624.3660.

(*E*)-3-{1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-ribofuranosyl]-2-(1*H*)-pyrimidinon-4-yl}-acrylsäure-*tert*-butylester (110)

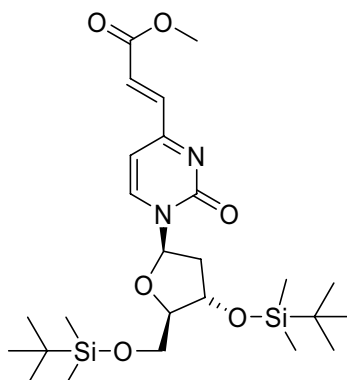


99 (730 mg, 1.0 mmol), (*Z*)-3-Tributylstannyl-acrylsäure-*tert*-butylester (670 mg, 1.6 mmol), Kupferiodid (38 mg, 0.2 mmol) und Tetrakis(triphenyl)phosphinpalladium(0) (116 mg, 0.1 mmol) wurden in Dimethylformamid (10 mL) nach AAV 1 umgesetzt (Reaktionszeit 40 h). Im Gegensatz zur AAV 1 wurde die Reaktion nach zwei Tagen mit ammoniakalischer EDTA-Lösung (ca. 0.1 M EDTA in 2,5 %igem Ammoniak) versetzt und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Etylacetat: 1/1) gereinigt und **110** als weißer, amorpher Feststoff (405 mg, 71 %) erhalten.

R_f = 0.46 (EtOAc/Isohexan: 1/1); IR (KBr): ν = 2978_w, 1718_s, 1664_s, 1612_m, 1518_m, 1452_m, 1370_w, 1312_w, 1272_s, 1179_m, 1154_m, 1106_s, 1020_w, 976_w, 843_w, 794_w, 754_m, 692_w cm⁻¹; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.13 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₆), 7.98-7.93 (m, 2H, H_{Ph}), 7.82-

7.78 (m, 2H, H_{Ph}), 7.30-7.19 (m, 5H, H_{Ph}, H_{Vinyl}), 6.85 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H_{Vinyl}), 6.36-6.33 (m, 1H, H1'), 6.30 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H5), 5.62-5.59 (m, 1H, H3'), 4.79 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz, H5'_A), 4.70-4.67 (m, 1H, H4'), 4.66 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 3.0$ Hz, H5'_B), 3.24-3.19 (m, 1H, H2'_A), 2.44 (s, 3H, H_{Me}), 2.40 (s, 3H, H_{Me}), 2.33-2.27 (m, 1H, H2'_B), 1.52 (s, 9H, H_{tBu}); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 168.4, 166.1, 166.0, 164.6, 155.1, 144.5$ (2C), 142.7, 139.4, 131.2, 129.8 (2C), 129.4 (4C), 129.3 (2C), 126.3, 126.2, 103.0, 88.5, 84.2, 81.7, 75.0, 64.1, 39.6, 28.0 (3C), 21.7, 21.6; MS (ESI⁺): m/z : 575.2 [M + H]⁺, 353.1, 303.1, 223.1; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für C₃₂H₃₅N₂O₈ [M + H]⁺: 575.2388; gef.: 575.2379.

(E)-3-{1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-2-(1*H*)-pyrimidinon-4-yl}-acrylsäuremethylester (111**)**

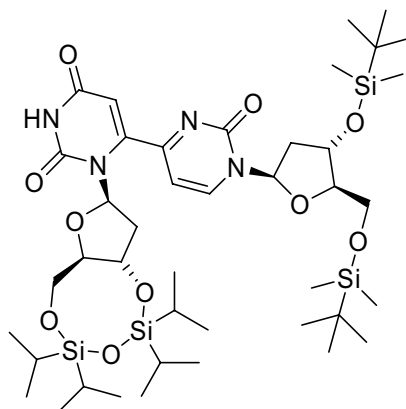


98 (620 mg, 0.86 mmol), (*Z*)-3-Tributylstannyl-acrylsäuremethylester (810 mg, 2.16 mmol), Kupferiodid (33 mg, 0.17 mmol) und Tetrakis(triphenyl)phosphinpalladium(0) (116 mg, 0.10 mmol) wurden in Dimethylformamid (10 mL) nach AAV 1 umgesetzt (Reaktionszeit 48 h). Im Gegensatz zur AAV 1 wurde die Reaktion nach zwei Tagen mit ammoniakalischer EDTA-Lösung (ca. 0.1 M EDTA in 2,5 %igem Ammoniak) versetzt und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Etylacetat: 1/1) gereinigt und **111** als gelbliches Öl (340 mg, 76 %) erhalten.

$R_f = 0.69$ (Isohexan/EtOAc: 1/1); IR (ATR): $\nu = 2953m, 2929m, 2857m, 1728m, 1664s, 1608w, 1520m, 1461m, 1390w, 1362w, 1300w, 1252s, 1110s, 1077m, 1029w, 980w, 965w, 882w, 833vs, 776vs, 673w$ cm⁻¹; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.53$ (d, 1H, $J = 6.6$ Hz, H6), 7.39 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_{Vinyl}), 7.02 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_{Vinyl}), 6.37 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz, H5), 6.19 (dd, 1H, $J = 6.6$ Hz, $J = 4.2$ Hz, H1'), 4.37-4.33 (m, 1H, H3'), 3.98-3.94 (m, 2H, H4', H5'_A), 3.80 (s, 3H, H_{OMe}), 3.79-3.76 (m, 1H, H5'_B), 2.60-2.54 (m, 1H, H2'_A),

2.17 (ddd, 1H, $J = 13.5$ Hz, $J = 6.6$ Hz, $J = 4.2$ Hz, H2'B), 0.90 (s, 9H, H_{tBu}), 0.86 (s, 9H, H_{tBu}), 0.10 (s, 3H, H_{Me}), 0.09 (s, 3H, H_{Me}), 0.04 (s, 3H, H_{Me}), 0.03 (s, 3H, H_{Me}); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 167.4, 166.1, 155.2, 144.4, 140.7, 128.3, 103.1, 87.9, 87.4, 69.6, 61.5, 52.1, 42.2, 25.9$ (3C), 25.6 (3C), 18.3, 17.9, -4.6, -5.0, -5.5, -5.5; MS (ESI⁺): m/z : 626.4 [M + HNEt₃]⁺, 525.3 [M + H]⁺, 313.2, 208.8; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für C₂₅H₄₅N₂O₆Si₂ [M + H]⁺: 525.2811; gef.: 525.2827.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-6-uridyl]-2-(1*H*)-pyrimidinon (112)

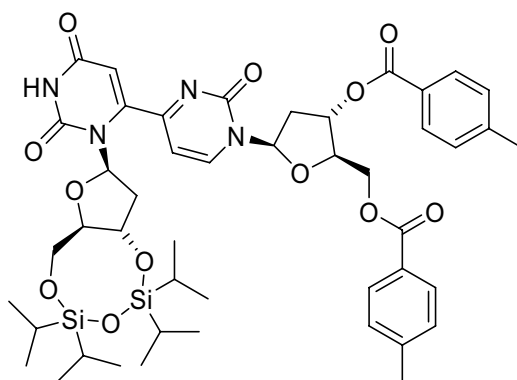


98 (876 mg, 1.2 mmol), **107** (920 mg, 1.2 mmol), Kupferiodid (46 mg, 0.2 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (140 mg, 0.1 mmol) wurden in Dimethylformamid (30 mL) nach AAV 1 umgesetzt (Reaktionszeit 48 h). Im Gegensatz zur AAV 1 wurde die Reaktion nach zwei Tagen mit ammoniakalischer EDTA-Lösung (ca. 0.1 M EDTA in 2,5 %igem Ammoniak) versetzt und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Etylacetat: 1/1) gereinigt und **112** als farbloser, amorpher Feststoff (706 mg, 64 %) erhalten.

$R_f = 0.72$ (Isohexan/EtOAc: 1/1); IR (ATR): $\nu = 2950m, 2930m, 2865m, 1672s, 1518w, 1463m, 1387w, 1364w, 1279w, 1263m, 1091s, 1029s, 916w, 884m, 833s, 776s, 692s$ cm⁻¹; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.69$ (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, H6B), 8.15 (s, 1H, NH), 6.54 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, H5B), 6.22-6.18 (m, 1H, H1'B), 5.79 (s, 1H, H5A), 5.67 (dd, 1H, $J = 9.0$ Hz, $J = 3.0$ Hz, H1'A), 4.98-4.92 (m, 1H, H3'A), 4.44-4.39 (m, 1H, H3'B), 4.05-4.02 (m, 1H, H4'B), 4.02-3.98 (m, 1H, H5'BA), 3.97-3.93 (m, 2H, H5'A), 3.82-3.78 (m, 1H, H5'BB), 3.73-3.69 (m, 1H, H4'A), 2.99-2.93 (m, 1H, H2'AA), 2.69-2.63 (m, 1H, H2'BA), 2.42-2.36 (m, 1H,

H₂'A_B), 2.26-2.20 (m, 1H, H₂'B_B), 1.38-0.97 (m, 28H, H_{iPr}), 0.92 (s, 9H, H_{tBu}), 0.90 (s, 9H, H_{tBu}), 0.12 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.11 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.09 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.08 (s, 3H, H_{TBS-Me}); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 167.0, 161.5, 154.1, 152.1, 149.1, 145.8, 104.4, 102.7, 88.4, 88.0, 87.4, 86.4, 73.6, 70.0, 64.1, 61.7, 42.4, 40.2, 25.9 (3C), 25.7 (3C), 18.3, 17.9, 17.6, 17.5, 17.4 (2C), 17.3, 17.1, 17.0 (2C), 13.6, 13.2, 12.6, 12.5, -4.5, -4.9, -5.5 (2C); MS (ESI⁺): *m/z*: 1010.6 [M + HNEt₃]⁺, 909.5 [M + H]⁺, 824.5; HRMS (ESI⁺): *m/z*: ber. für C₄₂H₇₇N₄O₁₀Si₄ [M + H]⁺: 909.4711; gef.: 909.4734.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-6-uridyl]-2-(1*H*)-pyrimidinon (113)

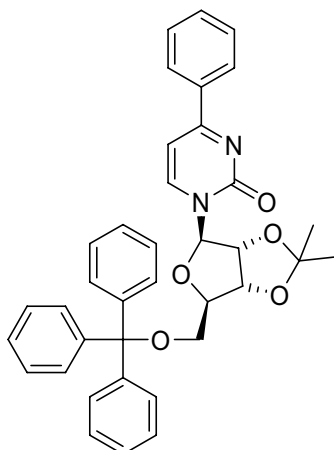


Für die Herstellung von **113** wurde statt des entsprechenden Pyrimidinarylsulfonates das Pyrimidinchlorid **100** verwendet. 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-4-chlor-uridin **100** (140 mg, 0.30 mmol), **107** (200 mg, 0.26 mmol), Kupferiodid (10 mg, 0.06 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (31 mg, 0.03 mmol) wurden in Dimethylformamid (20 mL) nach AAV 1, allerdings bei RT, umgesetzt (Reaktionszeit 16 h). Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/Etylacetat: 1/2) gereinigt und **113** als weißer, amorpher Feststoff (248 mg, 93 %) erhalten.

R_f = 0.36 (EtOAc/Isohexan: 1/1); IR (KBr): ν = 2945_w, 2867_w, 1713_s, 1691_s, 1672_s, 1611_m, 1514_w, 1462_m, 1379_m, 1310_w, 1266_s, 1177_m, 1090_{vs}, 1032_s, 1020_m, 910_w, 885_m, 839_w, 793_w, 752_s, 732_m, 691_m cm⁻¹; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.57 (s/br, 1H, NH), 8.31 (d, 1H, *J* = 6.6 Hz, H_{6B}), 7.98-7.94 (m, 2H, H_{Ph}), 7.85-7.81 (m, 2H, H_{Ph}), 7.30-7.24 (m, 4H, H_{Ph}), 6.49 (d, 1H, *J* = 6.6 Hz, H_{5B}), 6.31 (dd, 1H, *J* = 7.2 Hz, *J* = 5.7 Hz, H_{1'B}), 5.70 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H_{5A}), 5.64-5.61 (m, 1H, H_{3'B}), 5.56 (dd, 1H, *J* = 9.0 Hz, *J* = 3.6 Hz, H_{1'A}), 4.96-4.91 (m, 1H, H_{3'A}), 4.84 (dd, 1H, *J* = 12.0 Hz, *J* = 2.4 Hz, H_{5'BA}), 4.73-4.70 (m, 1H, H_{4'B}), 4.68 (dd, 1H, *J* = 12.0 Hz, *J* = 3.6 Hz, H_{5'B}), 3.95-3.91 (m, 2H, H_{5'A}), 3.71-3.67 (m, 1H, H_{4'A}), 3.21 (ddd, 1H, *J* = 14.5 Hz, *J* = 5.7 Hz, *J* = 2.0 Hz, H_{2'BA}), 2.93 (ddd, 1H, *J* = 13.5 Hz, *J* = 9.0 Hz, *J* = 3.2 Hz, H_{2'BA}), 2.44 (s, 3H, H_{Tol-Me}), 2.42 (s, 3H, H_{Tol-Me}), 2.38-

2.32 (m, 2H, H2'A_B, H2'B_B), 1.22-0.85 (m, 28H, H_{iPr}); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 167.6, 166.1, 166.0, 161.6, 153.9, 151.8, 149.2, 144.9, 144.7, 144.4, 129.8 (2C), 129.5 (2C), 129.4 (2C), 129.3 (2C), 126.2, 126.1, 104.4, 103.1, 88.7, 87.4, 86.3, 84.3, 74.6, 73.7, 64.1, 63.8, 40.2, 39.5, 21.7, 21.7, 17.5, 17.4, 17.4, 17.3, 17.3, 17.1, 17.0 (2C), 13.2, 13.2, 12.6, 12.5; MS (ESI⁺): *m/z*: 1018.5 [M + HNEt₃]⁺, 632.4, 239.2; HRMS (ESI⁺): *m/z*: ber. für C₅₂H₇₆N₅O₁₂Si₂ [M + HNEt₃]⁺: 1018.5024; gef.: 1018.5017.

1-(2',3'-*O*-isopropyliden-5'-*O*-trityl-ribofuranosyl)-4-phenyl-2-(1*H*)-pyrimidinon (121)

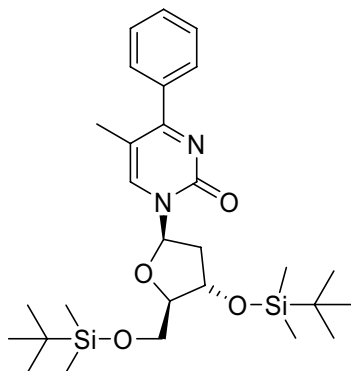


Phenylmagnesiumbromid (1 M in THF, 0.38 mL, 0.38 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (3 mL) gelöst und auf 0° C gekühlt. Zinkchloridlösung (1 M in Diethylether, 0.38 mL, 0.38 mmol) wurde langsam zugetropft und die Lösung wurde 40 min bei 0° C gerührt. Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (23 mg, 0.02 mmol) und eine Lösung von **97** (141 mg, 0.18 mmol) in Tetrahydrofuran (3 mL) wurden zugegeben, die Lösung wurde auf RT erwärmt und 14 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 1/3) gereinigt. **121** wurde als farbloses Öl (77 mg, 74 %) erhalten.

R_f = 0.71 (EtOAc/Isohexan: 3/1); IR (Film): ν = 3059_w, 2986_w, 2934_w, 2871_w, 1674_{vs}, 1621_s, 1519_m, 1494_m, 1449_m, 1382_w, 1374_w, 1272_m, 1214_m, 1158_w, 1120_m, 1079_s, 874_w, 765_s, 706_s, 632_w cm⁻¹; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.16 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, H6), 8.05-8.00 (m, 2H, H_{Ph}), 7.54-7.19 (m, 18H, H_{Ph}, H_{Trityl}), 6.45 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, H5), 6.06-6.03 (m, 1H, H1'), 4.95 (dd, 1H, *J* = 6.1 Hz, *J* = 1.4 Hz, H2'), 4.83 (dd, 1H, *J* = 6.1 Hz, *J* = 4.0 Hz, H3'), 4.50-4.44 (m, 1H, H4'), 3.52 (dd, 1H, *J* = 10.8 Hz, *J* = 3.0 Hz, H5'_A), 3.46 (dd, 1H, *J* = 10.8 Hz, *J* = 5.1 Hz, H5'_B), 1.59 (s, 3H, H_{Me}), 1.36 (s, 3H, H_{Me}); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171.7, 155.5, 144.0, 143.2 (3C), 135.8, 132.0, 128.7 (2C), 128.6 (6C), 127.9 (8C), 127.3 (3C), 114.0, 100.8, 94.2, 87.4 (2C), 85.8, 80.2, 63.6, 27.2, 25.4; MS (FAB⁺): *m/z*:

609.8 [M + Na]⁺, 587.9 [M + H]⁺, 343.4, 339.3, 327.4, 243.2, 173.1, 165.1, 105.0, 91.0, 77.0;
HRMS (FAB⁺): *m/z*: ber. für C₃₇H₃₄N₂NaO₅ [M + Na]⁺: 609.2360; gef.: 609.2397.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-4-phenyl-5-methyl-2-(1*H*)-pyrimidinon (122)

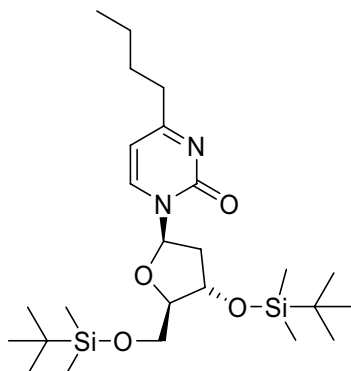


Zinkchloridlösung (1 M in Diethylether, 1.94 mL, 1.94 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (2.0 mL) gelöst und auf 0° C gekühlt. Phenylmagnesiumbromidlösung (0.5 M in THF, 3.52 mL, 1.76 mmol) wurde langsam zugetropft und die Lösung wurde 60 min bei 0° C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von Pd(dppf)Cl₂ (18 mg, 0.02 mmol) und **98** (649 mg, 0.88 mmol) in Tetrahydrofuran (4 mL) zugetropft und die Lösung für 2 h bei 0° C gerührt. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und 3 d bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter, wässriger Ammoniumchloridlösung beendet und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 1/1) gereinigt und **122** wurde als farbloses Öl (316 mg, 68 %) erhalten.

R_f = 0.67 (Isohexan/EtOAc: 1/1); IR (ATR): ν = 2953*m*, 2929*m*, 2857*m*, 1659*s*, 1489*m*, 1471*m*, 1462*m*, 1390*w*, 1326*w*, 1252*s*, 1190*w*, 1076*s*, 1029*m*, 1003*m*, 990*m*, 968*w*, 885*w*, 831*vs*, 775*vs*, 711*m*, 698*m*, 670*m* cm⁻¹; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.06 (s, 1H, H₆), 7.61-7.57 (m, 2H, H_{Ph}), 7.46-7.40 (m, 3H, H_{Ph}), 6.19 (t, 1H, *J* = 6.3 Hz, H1'), 4.43-4.37 (m, 1H, H3'), 4.05-4.00 (m, 1H, H4'), 3.95 (dd, 1H, *J* = 11.5 Hz, *J* = 2.6 Hz, H5'_A), 3.80 (dd, 1H, *J* = 11.5 Hz, *J* = 2.6 Hz, H5'_B), 2.65 (ddd, 1H, *J* = 13.5 Hz, *J* = 6.2 Hz, *J* = 3.9 Hz, H2'_A), 2.16-2.04 (m, 1H, H2'_B), 2.12 (s, 3H, H_{5Me}), 0.92 (s, 9H, H_{Bu}), 0.89 (s, 9H, H_{Bu}), 0.12 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.11 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.08 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.07 (s, 3H, H_{TBS-Me}); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 174.5, 155.1, 142.0, 137.9, 129.8, 128.5 (2C), 128.1 (2C), 111.0, 88.4,

87.3, 71.6, 62.6, 42.6, 25.9 (3C), 25.7 (3C), 18.4, 18.0, 16.7, -4.5, -4.9, -5.4 (2C); HRMS (ESI⁺): *m/z*: ber. für C₃₄H₆₂N₃O₄Si₂ [M + HNEt₃]⁺: 632.4273; gef.: 632.4271.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-4-butyl-2-(1*H*)-pyrimidinon (123)



Zinkchloridlösung (1 M in Diethylether, 0.44 mL, 0.44 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (2 mL) gelöst und auf 0° C gekühlt. *n*-Butyllithiumlösung (1.6 M in Hexan, 0.40 mL, 0.4 mmol) wurde langsam zugetropft und die Lösung wurde 90 min bei 0° C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (23 mg, 0.02 mmol) und **98** (144 mg, 0.20 mmol) in Tetrahydrofuran (2 mL) zugegeben und die Lösung für 2 h bei 0° C gerührt. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und 14 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter, wässriger Ammoniumchloridlösung beendet und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 2/1, später 1/1) gereinigt und **123** wurde als farbloses Öl (48 mg, 48 %) erhalten.

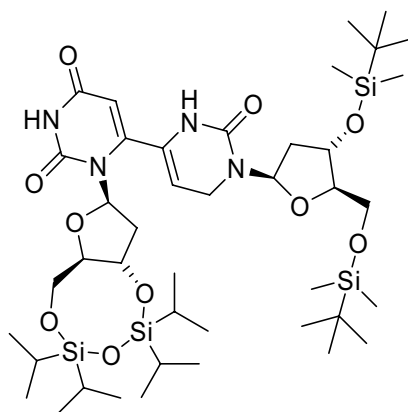
$R_f = 0.66$ (Isohexan/EtOAc: 1/1); IR (ATR): $\nu = 2954m, 2929m, 2857m, 1660s, 1620w, 1520m, 1462m, 1390w, 1361w, 1276w, 1252s, 1191w, 1110s, 1076s, 1029s, 1006m, 965w, 883w, 833vs, 776vs, 671m \text{ cm}^{-1}$; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.28$ (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, H6), 6.19 (dd, 1H, $J = 6.6$ Hz, $J = 4.5$ Hz, H1'), 6.14 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, H5), 4.39-4.31 (m, 1H, H3'), 3.97-3.90 (m, 2H, H4', H5'_A), 3.75 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 2.7$ Hz, H5'_B), 2.61-2.48 (m, 3H, ArCH₂-, H2'_A), 2.13 (ddd, 1H, $J = 13.5$ Hz, $J = 6.6$ Hz, $J = 4.5$ Hz, H2'_B), 1.73-1.61 (m, 2H, ArCH₂CH₂-), 1.42-1.29 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.93-0.86 (m, 3H, CH₂CH₃), 0.90 (s, 9H, H_{TBSu}), 0.85 (s, 9H, H_{TBSu}), 0.09 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.08 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.03 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.03 (s, 3H, H_{TBS-Me}); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 179.6, 155.5, 142.1, 103.7, 87.7, 86.9, 69.8, 61.6, 42.2, 38.4, 30.0, 25.8$ (3C), 25.6 (3C), 22.4, 18.3, 17.9, 13.8, -4.6, -5.0, -5.5,

-5.6; MS (ESI⁺): m/z : 598.4 [M + HNEt₃]⁺, 497.3 [M + H]⁺, 299.2; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für C₃₁H₆₄N₃O₄Si₂ [M + HNEt₃]⁺: 598.4430; gef.: 598.4425.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-4-methyl-2-(1*H*)-pyrimidinon (124) wurde von D. Kuch (Gruppe Carell) hergestellt.^[264]

7.3.5 Synthesestudien zur Herstellung des (6-4)-Photoschadens: Untersuchungen zur Einführung von funktionellen Gruppen

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-6-uridyl]-3,6-dihydro-2-(1*H*)-pyrimidinon (125)

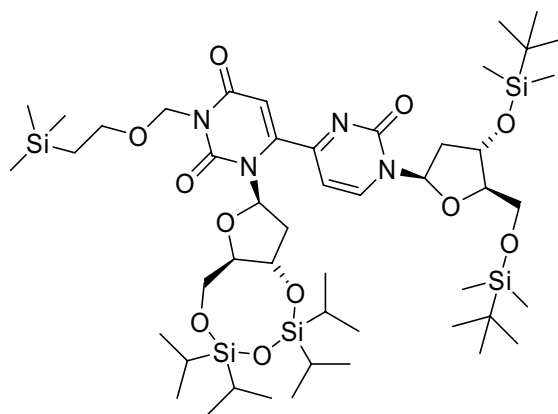


112 (200 mg, 0.22 mmol) wurde in Methanol (5 mL) gelöst. Natriumborhydrid (21 mg, 0.55 mmol) wurde zugegeben und die Lösung für 14 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter, wässriger Ammoniumchloridlösung beendet und anschließend mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 2/1) gereinigt und **125** wurde als farbloses, hochviskoses Öl (120 mg, 60 %) erhalten.

$R_f = 0.85$ (Isohexan/EtOAc: 1/1); IR (ATR): $\nu = 2948m, 2930m, 2865m, 1722m, 1679s, 1462m, 1388m, 1371m, 1285w, 1252m, 1088s, 1028s, 908w, 885m, 833vs, 776s, 731s, 692m$ cm⁻¹; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 9.37$ (s, 1H, NH_{RingA}), 7.37 (s/br, 1H, NH_{RingB}), 6.44 - 6.40 (m, 1H, H1'B), 5.73 - 5.68 (m, 2H, H5A, H1'A), 5.16 - 5.12 (m, 1H, H5B), 5.00 - 4.94 (m, 1H, H3'A), 4.37 - 4.33 (m, 1H, H3'B), 4.22 (dd, 1H, $J = 16.2$ Hz, $J = 3.9$ Hz, H6B_A), 4.02 - 3.94 (m, 2H, H5'A), 3.85 (dd, 1H, $J = 16.2$ Hz, $J = 3.0$ Hz, H6B_B), 3.79 - 3.67 (m, 4H, H4'A, H4'B),

H5'B), 2.93-2.88 (m, 1H, H2'A_A), 2.36-2.29 (m, 1H, H2'A_B), 2.10-2.03 (m, 1H, H2'B_A), 1.98-1.92 (m, 1H, H2'B_B), 1.18-0.93 (m, 28H, H_{iPr}), 0.89 (s, 9H, H_{tBu}), 0.88 (s, 9H, H_{tBu}), 0.12 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.07 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.07 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.05 (s, 3H, H_{TBS-Me}); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 162.9, 152.6, 149.7, 149.1, 130.4, 103.7, 101.5, 87.0, 86.2, 85.8, 83.2, 73.3, 71.5, 63.7, 62.6, 39.2, 39.2, 36.1, 25.9 (3C), 25.7 (3C), 18.3, 18.0, 17.5, 17.4, 17.4, 17.3, 17.3, 17.1, 17.0 (2C), 13.3, 13.2, 12.6, 12.5, -4.7, -4.8, -5.4, -5.6; MS (ESI): *m/z*: 972.5 [M + NO₃]⁻, 945.4 [M + Cl]⁻, 909.5 [M - H]⁻, 909.5 [M + H]⁺, 454.7, 303.2; HRMS (ESI): *m/z*: ber. für C₄₂H₇₇N₄O₁₀Si₄ [M - H]⁻: 909.4722; gef.: 909.4711.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-4-[1-(2-Trimethylsilyl-ethoxymethyl)-2'-desoxy-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-6-uridyl]-2-(1*H*)-pyrimidinon (126)

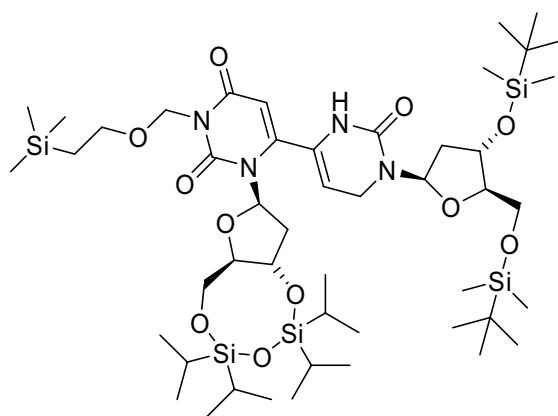


112 (195 mg, 0.21 mmol) wurde in Dichlormethan (4 mL) gelöst. Diisopropylethylamin (0.15 mL, 0.86 mmol) und 2-(Trimethylsilyl)-ethoxymethylchlorid (0.10 mL, 0.57 mmol) wurden zugegeben und die Lösung wurde 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter, wässriger Ammoniumchloridlösung beendet und anschließend mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 3/1) gereinigt und **126** wurde als farbloses Öl (86 mg, 39 %) erhalten.

R_f = 0.83 (Isohexan/EtOAc: 1/1); IR (KBr): ν = 2952_m, 2929_m, 2866_w, 1726_m, 1678_s, 1462_m, 1452_w, 1384_m, 1251_w, 1093_s, 1032_s, 885_w, 837_m, 779_w, 695_w cm⁻¹; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.67 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, H6B), 6.52 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, H5B), 6.19 (dd, 1H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 4.6 Hz, H1'B), 5.83 (s, 1H, H5A), 5.69 (dd, 1H, *J* = 9.1 Hz, *J* = 3.5 Hz, H1'A), 5.38 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, NCHH_AO), 5.34 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, NCHH_BO),

4.99-4.94 (m, 1H, H3'A), 4.43-4.39 (m, 1H, H3'B), 4.04-4.01 (m, 1H, H4'B), 3.99 (dd, 1H, $J = 11.6$ Hz, $J = 2.5$ Hz, H5'BA), 3.96 (dd, 1H, $J = 11.3$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H5'AA), 3.91 (dd, 1H, $J = 11.3$ Hz, $J = 3.5$ Hz, H5'AB), 3.80 (dd, 1H, $J = 11.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, H5'BB), 3.72 (ddd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 6.3$ Hz, $J = 3.5$ Hz, H4'A), 3.68-3.64 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.01-2.96 (m, 1H, H2'AA), 2.68-2.62 (m, 1H, H2'BA), 2.39 (ddd, 1H, $J = 13.9$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 6.5$ Hz, H2'AB), 2.22 (ddd, 1H, $J = 13.6$ Hz, $J = 6.3$ Hz, $J = 4.6$ Hz, H2'BB), 1.16-0.86 (m, 30H, H_{iPr}, CH₂CH₂TMS), 0.91 (s, 9H, H_{tBu}), 0.89 (s, 9H, H_{tBu}), 0.11 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.10 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.08 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.07 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.04 (s, 9H, H_{TMS}); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 167.2, 161.6, 154.1, 150.5, 150.1, 145.7, 104.2, 102.7, 88.3, 88.1, 87.9, 86.6, 73.4, 70.0, 69.9, 67.7, 64.1, 61.7, 42.3, 40.3, 25.9$ (3C), 25.7 (3C), $18.3, 18.1, 17.9, 17.5, 17.4, 17.4, 17.3, 17.3, 17.1, 17.0$ (2C), $13.2, 13.2, 12.6, 12.5, -1.4$ (3C), $-4.5, -4.9, -5.5$ (2C); HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für C₅₄H₁₀₆N₅O₁₁Si₅ [M + HNEt₃]⁺: 1140.6730; gef.: 1140.6731.

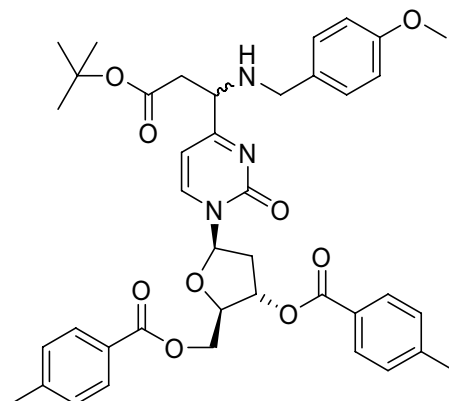
1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl]-4-[1-(2-Trimethylsilyl-ethoxymethyl)-2'-desoxy-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-6-uridyl]-3,6-dihydro-2-(1*H*)-pyrimidinon (127)



126 (84 mg, 0.08 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (4 mL) gelöst und auf -78° C gekühlt. L-Selektridlösung (1 M in Tetrahydrofuran, 100 μ L, 0.1 mmol) wurde langsam zugetropft und die Lösung für 2 h bei -78° C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter, wässriger Ammoniumchloridlösung beendet und anschließend mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 3/1) gereinigt und **127** wurde als farbloses Öl (78 mg, 93 %) erhalten.

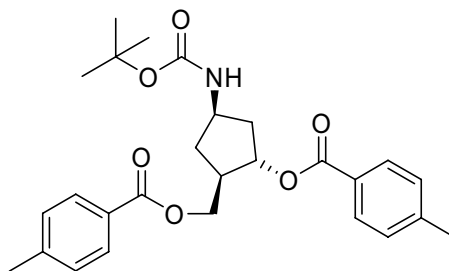
$R_f = 0.77$ (Isohexan/EtOAc: 1/1); IR (KBr): $\nu = 2950m, 2930m, 2895w, 2866m, 1723m, 1678s, 1462m, 1453w, 1402w, 1390w, 1349w, 1251m, 1091s, 1030s, 886m, 836s, 777m, 692w$ cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.42$ (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H1'B), 6.39 (s/br, 1H, NH), 5.76 (s, 1H, H5A), 5.69 (dd, 1H, $J = 9.2$ Hz, $J = 2.8$ Hz, H1'A), 5.33 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, NCHH_AO), 5.31 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, NCHH_BO), 5.18-5.14 (m, 1H, H5B), 5.08-5.02 (m, 1H, H3'A), 4.37-4.34 (m, 1H, H3'B), 4.23 (dd, 1H, $J = 16.2$ Hz, $J = 4.2$ Hz, H6B_A), 4.03 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 7.2$ Hz, H5'A_A), 3.98 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 3.5$ Hz, H5'A_B), 3.86 (dd, 1H, $J = 16.2$ Hz, $J = 3.3$ Hz, H6B_B), 3.81-3.76 (m, 2H, H4'A, H4'B), 3.73-3.70 (m, 2H, H5'B), 3.69-3.64 (m, 2H, OCH₂CH₂), 2.91-2.86 (m, 1H, H2'A_A), 2.37-2.31 (m, 1H, H2'A_B), 2.10-2.05 (m, 1H, H2'B_A), 1.95 (ddd, 1H, $J = 13.2$ Hz, $J = 6.6$ Hz, $J = 4.2$ Hz, H2'B_B), 1.17-0.87 (m, 30H, H_{iPr}, CH₂CH₂TMS), 0.90 (s, 9H, H_{tBu}), 0.89 (s, 9H, H_{tBu}), 0.08 (s, 6H, 2*H_{TBS-Me}), 0.07 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.07 (s, 3H, H_{TBS-Me}), 0.00 (s, 9H, H_{TMS}); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.0, 152.7, 151.9, 149.9, 130.5, 103.7, 101.7, 87.4, 86.2, 86.0, 83.5, 72.7, 71.7, 70.0, 67.8, 63.2, 62.7, 39.2$ (2C), 36.1, 25.9 (3C), 25.8 (3C), 18.3, 18.1, 18.0, 17.5, 17.4, 17.4, 17.4, 17.3, 17.2, 17.0, 17.0, 13.4, 13.2, 12.6, 12.6, -1.4 (3C), -4.6, -4.8, -5.4, -5.5; HRMS (ESI): m/z : ber. für $\text{C}_{48}\text{H}_{91}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{Si}_5$ [M - H]⁻: 1039.5536; gef.: 1039.5530.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-3-{1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-Toluoyl)-ribofuranosyl]-2-(1*H*)-pyrimidinon-4-yl}-3-aminopropionsäure-*tert*-butylester (134)**



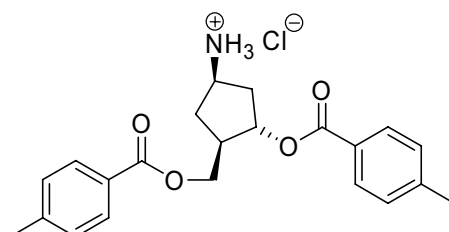
110 (140 mg, 0.24 mmol) wurde in Dichlormethan (2 mL) gelöst. 4-Methoxybenzylamin (40 μL , 0.30 mmol) wurde zugegeben und die Lösung 14 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60, EtOAc) gereinigt. Die Mischung der Diastereomere **134** und **134ds** (ungefähr 1 zu 1 nach NMR) wurde als farbloses Öl (106 mg, 61 %) erhalten.

$R_f = 0.61$ (EtOAc); HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_9$ [M + H]⁺: 712.3229; gef.: 712.3208. Die $^1\text{H-NMR}$ - (600 MHz, CDCl_3) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren (150 MHz, CDCl_3) der Diastereomerenmischung befinden sich im Anhang.

(1R, 3S, 4R)-N-(tert-Butylcarbamoyl)-3-(4-toluoyloxy)-4-[(4-toluoyloxy)-methyl]-cyclopentylamin (133a)

Carbazyklus **133** (334 mg, 1.4 mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (25 mg, 0.2 mmol) wurden in Pyridin (8 mL) gelöst. 4-Toluoylchlorid (0.42 mL, 3.2 mmol) wurde langsam zugetropft und die Lösung 14 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter, wässriger Ammoniumchloridlösung beendet und anschließend mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Isohexan/EtOAc: 2/1) gereinigt und **133a** wurde als weißer, amorpher Feststoff (564 mg, 83 %) erhalten.

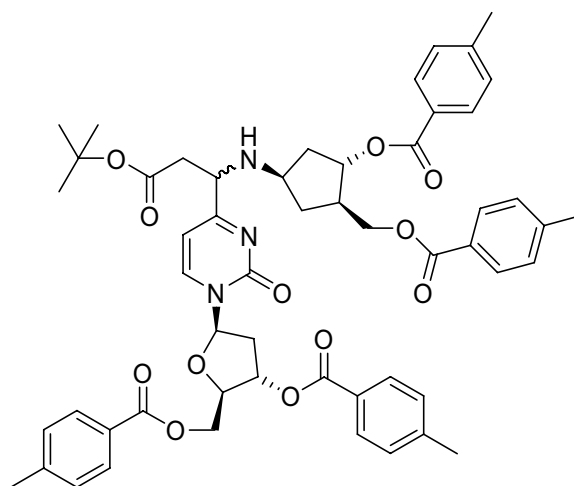
$R_f = 0.89$ (Isohexan/EtOAc: 1/1); IR (ATR): $\nu = 3361w, 2971w, 2955w, 2866w, 1710vs, 1682s, 1672s, 1612m, 1516s, 1456w, 1366m, 1265vs, 1170s, 1132m, 1102s, 1040w, 1020m, 1011w, 916m, 840s, 780w, 751vs, 732m, 690m \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.91\text{--}7.86$ (m, 4H, H_{Ar}), $7.23\text{--}7.16$ (m, 4H, H_{Ar}), $5.36\text{--}5.31$ (m, 1H, H3), $4.62\text{--}4.52$ (m/br, 1H, NH), $4.47\text{--}4.37$ (m, 2H, CH_2OTol), $4.35\text{--}4.22$ (m, 1H, H1), $2.68\text{--}2.57$ (m, 1H, H4), $2.53\text{--}2.43$ (m, 1H, $\text{H}_{5\text{A}}$), 2.41 (s, 3H, H_{Me}), 2.39 (s, 3H, H_{Me}), $2.33\text{--}2.24$ (m, 1H, $\text{H}_{2\text{A}}$), $1.97\text{--}1.87$ (m, 1H, $\text{H}_{2\text{B}}$), 1.44 (s, 9H, H_{tBu}), $1.37\text{--}1.27$ (m, 1H, $\text{H}_{5\text{B}}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 166.4, 166.0, 155.3, 143.5$ (2C), 129.5 (2C), 129.5 (2C), 128.9 (2C), 128.9 (2C), $127.2, 127.1, 79.3, 76.1, 65.6, 49.7, 43.7, 39.4, 34.9, 28.3$ (3C), 21.2 (2C); HRMS (ESI): m/z : ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{NO}_6$ [M - H] $^-$: 466.2235; gef.: 466.2238.

(1R, 3S, 4R)-3-(4-toluoyloxy)-4-[(4-toluoyloxy)-methyl]-cyclopentylammoniumchlorid (132)

133a (500 mg, 1.1 mmol) wurde in Ethylacetat (10 mL) gelöst und mit einer Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan (4M, 1.5 mL, 3.2 mmol) versetzt. Nach Zugabe von Wasser (3 Tropfen) wurde die Lösung 9 h bei RT gerührt. Nach 9 h konnte etwas weißer Niederschlag beobachtet werden. Die Lösung wurde mit Isohexan (5 mL) versetzt und über Nacht stehengelassen. Anschließend wurde der weiße Niederschlag abfiltriert, mit Isohexan gewaschen und getrocknet. **132** (206 mg, 48 %) wurde als weißer, amorpher Feststoff erhalten.

$R_f = 0.32$ (DCM/MeOH: 9/1); IR (ATR): $\nu = 2951_{w/br}$, 1710_{vs} , 1611_m , 1501_w , 1450_w , 1379_w , 1368_w , 1310_w , 1267_{vs} , 1177_s , 1111_{vs} , 1019_m , 841_m , 755_{vs} , 691_m cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.39$ (d/br, 3H, $J = 2.4$ Hz, NH_3), 7.85-7.79 (m, 4H, H_{Ar}), 7.31-7.27 (m, 2H, H_{Ar}), 7.25-7.21 (m, 2H, H_{Ar}), 5.34-5.29 (m, 1H, H_3), 4.43-4.23 (m, 2H, CH_2O), 3.81-3.69 (m, 1H, H_1), 2.66-2.56 (m, 1H, H_4), 2.40-2.30 (m, 1H, H_{5A}), 2.35 (s, 3H, H_{Me}), 2.33 (s, 3H, H_{Me}), 2.28-2.19 (m, 1H, H_{2A}), 2.16-2.08 (m, 1H, H_{2B}), 1.63-1.54 (m, 1H, H_{5B}); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 165.5$, 165.2 , 143.5 , 143.4 , 129.2 (2C), 129.1 (4C), 129.0 (2C), 126.7 , 126.6 , 75.5 , 64.7 , 48.1 , 43.1 , 36.2 , 31.6 , 21.0 , 20.9 ; HRMS (ESI $^+$): m/z : ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{NO}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 368.1856; gef.: 368.1856.

Carbazyklus-Uridinarcylsäure-*tert*-butylesteraddukt (**135**)

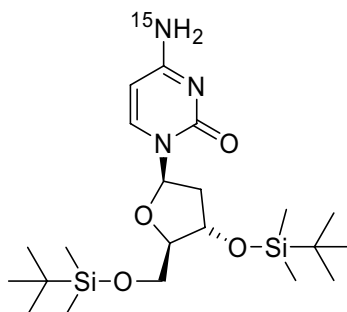


110 (247 mg, 0.43 mmol), **132** (190 mg, 0.47 mmol) und Disopropylethylamin (0.1 mL, 0.57 mmol) wurden in Dichlormethan (2.5 mL) und Ethanol (2.5 mL) gelöst. Die Lösung wurde 14 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, EtOAc) gereinigt. Die Mischung der Diastereomere **135** und **135ds** (ungefähr 1 zu 1 nach NMR) wurde als farbloses Öl (120 mg, 30 %) erhalten.

$R_f = 0.71$ (EtOAc); HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für C₅₄H₆₀N₃O₁₂ [M + H]⁺: 942.4172; gef.: 942.4177. Die ¹H-NMR- (600 MHz, CDCl₃) und ¹³C-NMR-Spektren (150 MHz, CDCl₃) der Diastereomerenmischung befinden sich im Anhang.

7.3.6 Synthese eines ¹⁵N-markierten Cytosinphosphoramidites-Bausteins für die DNA Synthese

2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-[¹⁵N]-cytidin (**141**)

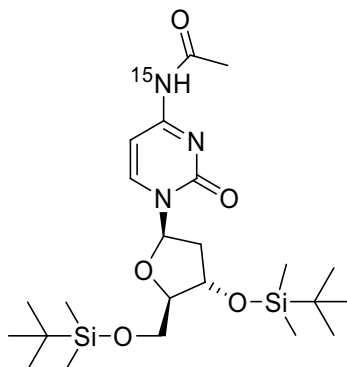


Ein Glaskolben mit angesetztem Glasrohr mit ¹⁵NH₃ (Aldrich, Bestell-Nr. 29,922-7, 100 mL) wurde mit einem PVC-Schlauch, in dem sich ein Rührfisch befand, mit einem Schlenkkolben verbunden. Der Schlenkkolben wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt und anschließend zusammen mit dem PVC-Schlauch evakuiert. Nun wurde mit Hilfe einer Rührfischangel der Rührfisch im PVC-Schlauch angehoben und auf der Seite des Ammoniakkolbens in das angesetzte Glasrohr fallen gelassen, so dass dort die abgeschmolzene Kapillare brach und der Ammoniak aus dem Kolben in den Schlenkkolben strömen konnte und dort kondensierte. Nach 10 min wurde der Schlenkkolben mit Stickstoff befüllt, aus dem flüssigen Stickstoff genommen, und möglichst schnell wurde eine Lösung von **98** (1.54 g, 2.13 mmol) in Ethanol (15 mL) zugegeben. Die Lösung wurde nun unter Rühren auf RT erwärmt und weitere 16 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, DCM/MeOH: 15/1). **141** (508 mg, 52 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.32$ (DCM/MeOH: 9/1); IR (ATR): $\nu = 3183w/br, 2954m, 2929m, 2857m, 1646s, 1488m, 1472m, 1361w, 1282w, 1255m, 1114s, 1030m, 885w, 836vs, 778s, 668w$ cm⁻¹; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.94$ (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H6), 6.24 (t, 1H, $J = 5.8$ Hz, H1'), 5.67 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H5), 4.39-4.32 (m, 1H, H3'), 3.92-3.85 (m, 2H, H4', H5'_A), 3.78-3.71 (m, 1H, H5'_B), 2.44-2.33 (m, 1H, H2'_A), 2.10-2.00 (m, 1H, H2'_B), 1.32-1.20 (m, 2H, NH₂), 0.91 (s, 9H, H_{tBu}), 0.86 (s, 9H, H_{tBu}), 0.09 (s, 6H, 2*H_{Me}), 0.04 (s, 6H, 2*H_{Me}); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 165.6$ (d, $^1J(^{13}C-^{15}N) = 20$ Hz, C4), 155.8, 141.2, 93.8, 87.2, 85.9, 70.3, 62.0, 42.1, 25.9 (3C), 25.7 (3C), 18.3, 17.9, -4.6, -4.9, -5.5, -5.6; MS (ESI⁺): m/z : 935 [2M +

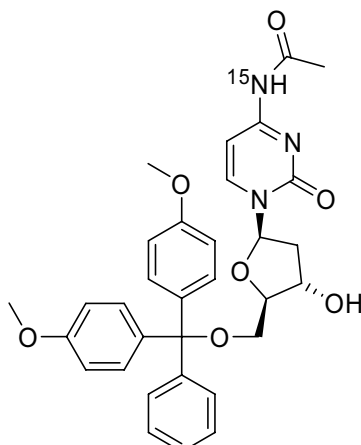
$\text{Na}]^+$, 913 $[\text{2M} + \text{H}]^+$, 479 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 113; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_2^{15}\text{NO}_4\text{Si}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 457.2679; gef.: 457.2686.

***N*4-Acetyl-2'-desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-[¹⁵N]-cytidin (142)**



141 (508 mg, 1.11 mmol) und DMAP (5 mg) wurden in Pyridin (6.5 mL) gelöst. Essigsäureanhydrid (180 μL , 1.90 mmol) wurde langsam zutropft und die Lösung wurde 72 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit Ammoniumchloridlösung versetzt und dreimal mit Ethylacetat (je 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, EtOAc/Isohexan: 1/1) und **142** (490 mg, 88 %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.25$ (EtOAc/Isohexan: 2/1); IR (ATR): $\nu = 3230_{w/br}$, 2929 w , 2858 w , 1704 w , 1668 s , 1557 w , 1490 s , 1472 w , 1388 m , 1311 w , 1238 s , 1112 s , 1098 s , 1044 m , 884 w , 835 vs , 775 vs , 678 m , 661 m cm^{-1} ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 10.58$ (d, 1H, ¹ $J(\text{H}-^{15}\text{N}) = 88.2$ Hz, NH), 8.34 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H6), 7.37 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H5), 6.18 (dd, 1H, $J = 6.3$ Hz, $J = 4.8$ Hz, H1'), 4.38-4.31 (m, 1H, H3'), 3.95-3.88 (m, 2H, H4', H5'_A), 3.74 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 2.7$ Hz, H5'_B), 2.51-2.40 (m, 1H, H2'_A), 2.27 (d, 3H, ³ $J(\text{H}-^{15}\text{N}) = 1.2$ Hz, H_{Me(OAc)}), 2.12-2.02 (m, 1H, H2'_B), 0.89 (s, 9H, H_{tBu}), 0.84 (s, 9H, H_{tBu}), 0.09 (s, 3H, H_{Me}), 0.07 (s, 3H, H_{Me}), 0.02 (s, 6H, 2*H_{Me}); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.4$ (d, ¹ $J(^{13}\text{C}-^{15}\text{N}) = 11$ Hz, CO), 163.0 (d, ¹ $J(^{13}\text{C}-^{15}\text{N}) = 18$ Hz, C4), 154.9, 144.5, 96.5, 87.7, 86.7, 69.8, 61.6, 42.2, 25.8 (3C), 25.6 (3C), 24.7 (d, ¹ $J(^{13}\text{C}-^{15}\text{N}) = 9$ Hz, Me_{Ac}), 18.3, 17.8, -4.7, -5.0, -5.5, -5.6; MS (ESI⁺): m/z : 997 $[\text{2M} + \text{H}]^+$, 600 $[\text{M} + \text{HNEt}_3]^+$, 499 $[\text{M} + \text{H}]^+$; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_2^{15}\text{NO}_5\text{Si}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 499.2784; gef.: 499.2788.

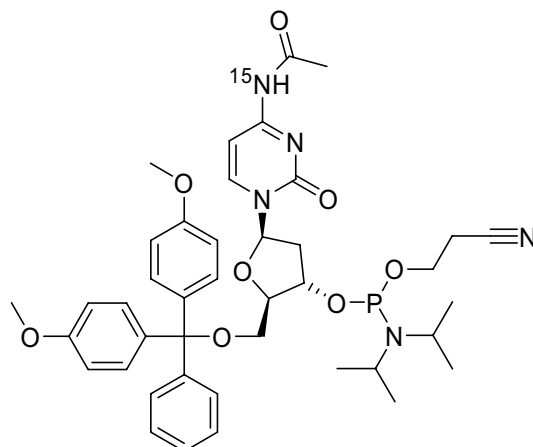
N4-Acetyl-2'-desoxy-5'-dimethoxytrityl-4-[¹⁵N]-cytidin (143)

142 (488 mg, 0.98 mmol) wurde in einem Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen in Ethylacetat (7 mL) gelöst. Pyridin (250 μ L) und Pyridin-HF-Komplex (250 μ L) wurden vorsichtig zugesetzt, das Röhrchen wurde dicht verschlossen und 14 h bei RT geschüttelt. Die erhaltene Suspension wurde zentrifugiert und der klare Überstand verworfen. Der Feststoff wurde in Ethylacetat (5 mL) resuspendiert, die Suspension mit Methoxytrimethylsilan (0.8 mL) versetzt und für weitere 2 h geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension in einen Kolben überführt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Pyridin (3 mL) gelöst, mit DMAP (5 mg) und etwas Molekularsieb 4Å versetzt und 45 min bei RT gerührt. Dimethoxytritylchlorid (364 mg, 1.08 mmol) wurde hinzugegeben und die Lösung wurde 14 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel 60, DCM/MeOH/Py: 15/1/0.5) gereinigt und **143** (469 mg, 84 %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.25$ (DCM/MeOH/Py: 15/1/0.5); IR (ATR): $\nu = 3301_{s/br}$, 3165 w , 3048 w , 2827 w , 1722 m , 1650 s , 1572 s , 1526 vs , 1418 m , 1337 m , 1249 m , 1200 m , 1033 s , 975 w , 841 m , 768 w cm^{-1} ; ¹H-NMR (400 MHz, Pyridin-d⁵): $\delta = 11.68$ (d, 1H, ¹J(H-¹⁵N) = 89.2 Hz, NH), 8.42 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H6), 7.58-7.54 (m, 2H, H_{DMT}), 7.45-7.38 (m, 5H, H5, H_{DMT}), 7.28-7.22 (m, 2H, H_{DMT}), 7.17-7.11 (m, 1H, H_{DMT}), 6.87-6.81 (m, 4H, H_{DMT}), 6.61 (dd, 1H, $J = 6.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, H1'), 4.80-4.74 (m, 1H, H3'), 4.40-4.35 (m, 1H, H4'), 3.59-3.57 (m, 2H, H5'), 3.57 (s, 3H, H_{OMe}), 3.57 (s, 3H, H_{OMe}), 2.84-2.76 (m, 1H, H2'_A), 2.47-2.40 (m, 1H, H2'_B), 2.15 (d, 3H, ³J(H-¹⁵N) = 0.8 Hz, H_{Me(OAc)}); ¹³C-NMR (100 MHz, Pyridin-d⁵): $\delta = 171.1$ (d, ¹J(¹³C-¹⁵N) = 11 Hz, CO), 163.4 (d, ¹J(¹³C-¹⁵N) = 18 Hz, C4), 159.2 (2C), 155.7, 145.5, 144.6, 136.3, 136.2, 130.6 (2C), 130.5 (2C), 128.7 (2C), 128.4 (2C), 127.3, 113.8 (4C), 96.4, 87.3, 87.1, 87.1, 70.0, 63.6, 55.2 (2C), 42.3, 24.9 (d, ¹J(¹³C-¹⁵N) = 9 Hz, Me_{Ac}); MS (ESI⁺):

m/z : 674 $[M + HNEt_3]^+$, 595 $[M + Na]^+$, 573 $[M + H]^+$, 303 $[Tirtyl]^+$; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $C_{32}H_{34}N_2^{15}NO_7$ $[M + H]^+$: 573.2362; gef.: 573.2361.

***N*4-Acetyl-2'-desoxy-5'-dimethoxytrityl-4-[¹⁵N]-cytidin-3'-yl-(2-cyanethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (**140**)**



143 (216 mg, 0.38 mmol) und Diisopropylammoniumtetrazolat (32 mg, 0.19 mmol) wurden in Dichlormethan (3 mL) gelöst. 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-teträisopropylphosphordiamidit (150 μ L, 0.47 mmol) wurde langsam bei RT zugetropft und die Lösung wurde 14 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum entfernt, das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (deaktiviertes Kieselgel 60, DCM/MeOH/Py: 30/1/0.5) und **140** als farbloses Öl erhalten. Das Öl wurde in EtOAc (1 mL) gelöst und in kaltes Isohexan (0° C, 100 mL) getropft. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Isohexan gewaschen und getrocknet. **140** (236 mg, 81 %, Mischung beider Diastereomere) wurde als weißer, amorpher Feststoff erhalten.

R_f = 0.12 (DCM/MeOH/Py: 30/1/0.5); ¹⁵N-NMR (40 MHz, ¹H-entkoppelt, MeCN-d³): -242.9 (s); ¹⁵N-NMR (40 MHz, ¹H-gekoppelt, MeCN-d³): -242.9 (d, ¹J(H-¹⁵N) = 82.4 Hz); ³¹P-NMR (81 MHz, MeCN-d³): 149.3, 149.2; MS (ESI⁺): m/z : 795 $[M + Na]^+$, 773 $[M + H]^+$, 667; HRMS (ESI⁺): m/z : ber. für $C_{41}H_{51}N_4^{15}NO_8P$ $[M + H]^+$: 773.3440; gef.: 773.3432.

8. Literaturverzeichnis

- [1] S. J. Lolle, J. L. Victor, J. M. Young, P. R. E., *Nature* **2005**, *434*, 505-509. Genome-wide non-mendelian inheritance of extra-genomic information in Arabidopsis.
- [2] M. Rassoulzadegan, V. Grandjean, P. Gounon, S. Vincent, I. Gillot, F. Cuzin, *Nature* **2006**, *441*, 469-474. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse.
- [3] A. J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. Soc. B* **1970**, 510-513. The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis.
- [4] G. K. Schroeder, C. Lad, P. Wyman, N. H. Williams, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4052-4055. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA.
- [5] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid.
- [6] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington D.C., **1995**.
- [7] A. J. Pierce, J. M. Stark, F. D. Araujo, M. E. Moynahan, M. Berwick, M. C. Jasin, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, S52-S59. Double-strand breaks and tumorigenesis.
- [8] M. G. Friedel, M. K. Cichon, T. Carell, in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology (2nd Edition)* (Ed.: W. M. Horspool), CRC Press, Boca Raton, **2004**, pp. 141/141-141/122.
- [9] J. Cadet, S. Bellon, M. Berger, A.-G. Bourdat, T. Douki, V. Duarte, S. Frelon, D. Gasparutto, E. Muller, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 933-943. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases.
- [10] W. Xue, D. Warshawsky, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *206*, 73-93. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review.
- [11] J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Mutat. Res.* **1999**, *424*, 9-21. Hydroxyl radicals and DNA base damage.
- [12] J. Cadet, J. L. Ravanat, G. Martinez, M. Medeiros, P. Di Mascio, *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1219-1225. Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights.
- [13] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution.
- [14] S. Fukuzumi, H. Miyao, K. Ohkubo, T. Suenobu, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 3285-3294. Electron-transfer oxidation properties of DNA bases and DNA oligomers.
- [15] J. C. Fromme, A. Banerjee, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 43-49. DNA glycosylase recognition and catalysis.
- [16] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, *431*, 217-221. Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase.
- [17] D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, *382*, 731-735. Oxidative DNA damage through long-range electron transfer.
- [18] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, *58*, 411-415. Semiconductivity of organic substances. IX. Nucleic acid in the dry state.
- [19] N. J. Turro, J. K. Barton, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 201-209. Paradigms, supermolecules, electron transfer and chemistry at a distance. What's the problem? The science or the paradigm?
- [20] H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407-410. Electrical conduction through DNA molecules.
- [21] D. Porath, A. Bezryadin, S. De Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, *403*, 635-638. Direct measurement of electrical transport through DNA molecules.

- [22] B. Giese, S. Wessely, M. Spormann, U. Lindemann, E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 996-998. On the mechanism of long-range electron transfer through DNA.
- [23] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 631-636. Long-distance charge transport in DNA: the hopping mechanism.
- [24] 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.
- [25] A. Joy, G. B. Schuster, *Chem. Commun.* **2005**, 2778-2784. Long-range radical cation migration in DNA: investigation of the mechanism.
- [26] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 253-260. Long-range charge transfer in DNA: transient structural distortions control the distance dependence.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236*, 76-115. DNA-mediated Charge Transport in Chemistry and Biology.
- [30] M. Taniguchi, T. Kawai, *Phys. E* **2006**, *33*, 1-12. DNA electronics.
- [31] J. Cadet, P. Vigny, in *Bioorganic Photochemistry, Vol. 1* (Ed.: H. Morrison), Wiley, New York, **1990**, pp. 1-272.
- [32] S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Mutat. Res.* **2004**, *556*, 135-142. Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells.
- [33] X. D. Zhao, S. Nadji, J. L. F. Kao, J. S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1554-1560. The structure of d(TpA)*, the major photoproduct of thymidylyl-(3'-5')-deoxyadenosine.
- [34] S. Kumar, N. D. Sharma, R. J. H. Davies, D. W. Phillipson, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1199-1216. The isolation and characterisation of a new type of dimeric adenine photoproduct in UV-irradiated deoxyadenylates.
- [35] J. E. Donnellan, R. B. Setlow, *Science* **1965**, *149*, 308-310. Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores.
- [36] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 163-169. Effects of binding of α/β -type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of *Bacillus subtilis* and *in vitro*.
- [37] T. Douki, M. Court, S. Sauvaigo, F. Odin, J. Cadet, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 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.
- [38] 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.
- [39] H. E. Johns, M. L. Pearson, J. C. LeBlanc, C. W. Helleiner, *J. Mol. Biol.* **1964**, *9*, 503-524. The ultraviolet photochemistry of thymidylyl-(3'->5')-thymidine.
- [40] S. Marguet, D. Markovitsi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5780-5781. Time-resolved study of thymine dimer formation.
- [41] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, *571*, 3-17. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA.
- [42] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13765-13770. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation.
- [43] H. J. Park, K. Zhang, Y. Ren, S. Nadji, N. Sinha, J.-S. Taylor, C. H. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15965-15970. Crystal structure of a DNA decamer containing a *cis-syn* thymine dimer.
- [44] J.-S. Taylor, D. S. Garrett, I. R. Brockie, D. L. Svoboda, J. Telser, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8858-8866. Proton NMR assignment and melting temperature study of *cis-syn* and *trans-syn* thymine dimer containing duplexes of d(CGTATTATGC).d(GCATAATACG).

- [45] J.-K. Kim, B. S. Choi, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 849-854. The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement.
- [46] Y. Fujiwara, S. Iwai, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1544-1550. Thermodynamic studies of the hybridisation properties of photolesions in DNA.
- [47] Y. Jing, J. F.-L. Kao, J.-S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3845-3853. Thermodynamic and base-pairing studies of matches and mismatched DNA dodecamer duplexes containing cis-syn, (6-4) and dewar photoproducts of TT.
- [48] J. H. Lee, G. S. Hwang, B. S. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 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.
- [49] T. Mizukoshi, T. S. Kodama, Y. Fujiwara, T. Furuno, M. Nakanishi, S. Iwai, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 4948-4954. Structural study of DNA duplexes containing the (6-4) photoproduct by fluorescence resonance energy transfer.
- [50] G. S. Hwang, J.-K. Kim, B. S. Choi, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 359-365. NMR structural studies of DNA decamer duplex containing the dewar photoproduct of thymidylyl(3'->5')thymidine. Conformational changes of the oligonucleotide duplex by photoconversion of a (6-4) adduct to its dewar valence isomer.
- [51] C. E. Crespo-Hernandez, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977-2019. Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids.
- [52] D. Markovitsi, D. Onidas, T. Gustavsson, F. Talbot, E. Lazzarotto, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17130-17131. Collective behavior of Franck-Condon excited states and energy transfer in DNA double helices.
- [53] C. E. Crespo-Hernandez, B. Cohen, B. Kohler, *Nature* **2005**, *436*, 1141-1144. Base stacking controls excited-state dynamics in A°T DNA.
- [54] T. Schultz, E. Samoylova, W. Radloff, I. V. Hertel, A. L. Sobolewski, W. Domcke, *Science* **2004**, *306*, 1765-1768. Efficient deactivation of a model base pair via excited-state hydrogen transfer.
- [55] D. Markovitsi, F. Talbot, T. Gustavsson, D. Onidas, E. Lazzarotto, S. Marguet, *Nature* **2006**, *441*, E7. Molecular spectroscopy: complexity of excited-state dynamics in DNA.
- [56] C. E. Crespo-Hernandez, B. Cohen, B. Kohler, *Nature* **2006**, *441*, E8. Molecular spectroscopy: complexity of excited-state dynamics in DNA (Reply).
- [57] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16895-16898. DNA replication fidelity.
- [58] T. A. Kunkel, K. Bebenek, *Ann. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 497-529. DNA replication fidelity.
- [59] E. T. Kool, *Ann. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 191-219. Active site tightness and substrate fit in DNA replication.
- [60] R.-E. Wellinger, F. Thoma, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1578-1579. *Taq* DNA polymerase blockage at pyrimidine dimers.
- [61] C. A. Smith, J. Baeten, J.-S. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21933-21940. The ability of a variety of polymerases to synthesize past site-specific *cis-syn*, *trans-syn-II*, (6-4), and Dewar photoproducts of thymidylyl-(3'->5')-thymidine.
- [62] S. Tornaletti, *Mutat. Res.* **2005**, *577*, 131-145. Transcription arrest at DNA damage sites.
- [63] B. A. Donahue, S. Yin, J.-S. Taylor, D. Reines, P. C. Hanawalt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 8502-8506. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template.
- [64] Y. Li, S. Dutta, S. Doublé, H. M. Bdour, J.-S. Taylor, T. Ellenberger, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 784-790. Nucleotide insertion opposite a *cis-syn* thymine dimer by a replicative DNA polymerase from bacteriophage T7.
- [65] J.-S. Taylor, *Mutat. Res.* **2002**, *510*, 55-70. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions.
- [66] S. Prakash, R. E. Johnson, L. Prakash, *Ann. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 317-353. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function.

- [67] H. Ling, F. Boudsocq, B. S. Plosky, R. Woodgate, W. Yang, *Nature* **2003**, *424*. Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution.
- [68] C. T. Courcelle, J. J. Belle, J. Courcelle, *J. Bacteriology* **2005**, *187*, 6953-6961. Nucleotide excision repair or Polymerase V-mediated lesion bypass can act to restore UV-arrested replication forks in *Escherichia coli*.
- [69] P. E. M. Gibbs, J. McDonald, R. Woodgate, C. Lawrence, *Genetics* **2005**, *169*, 575-582. The relative roles in vivo of *Saccharomyces cerevisiae* Pol η , Pol ζ , Rev1 protein and Pol32 in the bypass and mutation induction of an abasic site, T-T (6-4) photoadduct and T-T cis-syn cyclobutane dimer
- [70] R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 12359-12364. Distinct mechanisms of cis-syn thymine dimer bypass by Dpo4 and DNA polymerase η .
- [71] B. Vu, V. J. Cannistraro, L. Sun, J. S. Taylor, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9327-9335. DNA synthesis past a 5-methylC-containing cis-syn-cyclobutane pyrimidine dimer by yeast pol eta is highly nonmutagenic.
- [72] V. S. Kalogeraki, S. Tornaletti, P. C. Hanawalt, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19558-19564. Transcription arrest at a lesion in the transcribed DNA strand in vitro is not affected by a nearby lesion in the opposite strand.
- [73] J. S. M. Kwei, I. Kuraoka, K. Horibata, M. Ubukata, E. Kobatake, S. Iwai, H. Handa, K. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2004**, *320*, 1133-1138. Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproduct.
- [74] C. P. Selby, R. Drapkin, D. Reinberg, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 787-793. RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair.
- [75] P. Cramer, D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David, R. D. Kornberg, *Science* **2000**, *288*, 640-649. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism.
- [76] P. Cramer, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* **2001**, *292*, 1863-1876. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution.
- [77] A. L. Gnatt, P. Cramer, J. Fu, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* **2001**, *292*, 1876-1882. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 A resolution.
- [78] H. Kettenberger, K. J. Armache, P. Cramer, *Mol. Cell* **2004**, *16*, 955-965. Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS.
- [79] S. Tornaletti, D. Reines, P. C. Hanawalt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24124-24130. Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA.
- [80] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974. Chemistry and biology of DNA repair.
- [81] E. C. Friedberg, *Nature* **2003**, *421*, 436-440. DNA damage and repair.
- [82] D. G. Vassylyev, T. Kashiwagi, Y. Mikami, M. Ariyoshi, S. Iwai, E. Ohtsuka, K. Morikawa, *Cell* **1995**, *83*, 773-782. Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: structural basis for damaged DNA recognition.
- [83] H. C. Ahn, T. Ohkubo, S. Iwai, K. Morikawa, B. J. Lee, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30985-30992. Interaction of T4 endonuclease V with DNA: importance of the flexible loop regions in protein-DNA interaction.
- [84] E. C. Friedberg, *DNA Repair* **2004**, *3*, 183-187. The discovery that xeroderma pigmentosum (XP) results from defective nucleotide excision repair.
- [85] A. R. Lehmann, *Biochimie* **2003**, *85*, 1101-1111. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy.
- [86] G. Kulaksiz, J. T. Reardon, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 9784-9792. Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties.
- [87] G. W. Buchko, G. W. Daughdrill, R. de Lorimier, B. K. Rao, N. G. Isern, J. M. Lingbeck, J. S. Taylor, M. S. Wold, M. Gochin, L. D. Spicer, D. F. Lowry, M. A. Kennedy, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15116-15128. Interactions of human nucleotide excision repair protein XPA with DNA and RPA70 Delta C327: chemical shift mapping and ^{15}N NMR relaxation studies.

- [88] T. Ikegami, I. Kuraoka, M. Saijo, N. Kodo, Y. Kyogoku, K. Morikawa, K. Tanaka, M. Shirakawa, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 701-706. Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA.
- [89] T. Ikegami, I. Kuraoka, M. Saijo, N. Kodo, Y. Kyogoku, K. Morikawa, K. Tanaka, M. Shirakawa, *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)* **1999**, *125*, 495-506. Resonance assignments, solution structure, and backbone dynamics of the DNA- and RPA-binding domain of human repair factor XPA.
- [90] L. Fan, A. S. Arvai, P. K. Cooper, S. Iwai, F. Hanaoka, J. A. Tainer, *Mol. Cell* **2006**, *22*, 27-37. Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: implications for pathway selection of transcription or excision repair.
- [91] P. W. Doetsch, V. Beljanski, B. Song, in *DNA Damage Recognition* (Eds.: W. Siede, Y. W. Kow, P. W. Doetsch), Taylor & Francis, New York, **2006**, pp. 223-237.
- [92] K. K. Bowman, K. Sidik, C. A. Smith, J. S. Taylor, P. W. Doetsch, G. A. Freyer, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3026-3032. A new ATP-independent DNA endonuclease from *Schizosaccharomyces pombe* that recognizes cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts.
- [93] J. H. Yoon, P. M. Swiderski, B. E. Kaplan, M. Takao, A. Yasui, B. Shen, G. P. Pfeifer, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4809-4817. Processing of UV damage in vitro by FEN-1 proteins as part of an alternative DNA excision repair pathway.
- [94] I. Mellon, V. A. Bohr, C. A. Smith, P. C. Hanawalt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 8878-8882. Preferential DNA repair of an active gene in human cells.
- [95] I. Mellon, P. C. Hanawalt, *Nature* **1989**, *342*, 95-98. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand.
- [96] I. Mellon, G. Spivak, P. C. Hanawalt, *Cell* **1987**, *51*, 241-249. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene.
- [97] T. T. Saxowsky, P. W. Doetsch, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 474-488. RNA Polymerase encounters with DNA damage: transcription-coupled repair or transcriptional mutagenesis?
- [98] C. P. Selby, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11205-11209. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II.
- [99] D. Mu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7570-7573. Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans.
- [100] M. Wind, D. Reines, *BioEssays* **2000**, *22*, 327-336. Transcription elongation factor SII.
- [101] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.
- [102] Y. M. Gindt, E. Vollenbroek, K. Westphal, H. Sackett, A. Sancar, G. T. Babcock, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3857-3866. Origin of the transient electron paramagnetic resonance signals in DNA photolyase.
- [103] S. M. Kapetanaki, M. Ramsey, Y. M. Gindt, J. P. M. Schelvis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6214-6215. Substrate electric dipole moment exerts a pH-dependent effect on electron transfer in *Escherichia coli* photolyase.
- [104] T. Langenbacher, X. Zhao, G. Bieser, P. F. Heelis, A. Sancar, M. E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10532-10536. Substrate and temperature dependence of DNA photolyase repair activity examined by ultrafast spectroscopy.
- [105] A. W. MacFarlane IV, R. J. Stanley, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8558-8568. *Cis-syn* thymidine dimer repair by DNA Photolyase in real time.
- [106] 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.
- [107] Y.-T. Kao, C. Saxena, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 16128-16132. Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase.
- [108] H. W. Park, S. T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866-1872. Crystal structure of DNA Photolyase from *Escherichia coli*.
- [109] H. Komori, R. Masui, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, T. Shibata, Y. Inoue, K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Am.* **2001**, *98*, 13560-13565. Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism.

- [110] R. Kort, H. Komori, S. Adachi, K. Miki, A. Eker, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1205-1213. DNA apophotolyase from *Anacystis nidulans*: 1.8 Å structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction.
- [111] T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruyter, A. P. M. Eker, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 887-891. Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*.
- [112] T. Ueda, T. Sato, J. Hidema, T. Hirouchi, K. Yamamoto, T. Kumagai, M. Yano, *Genetics* **2005**, *171*, 1941-1950. qUVR-10, a major quantitative trait locus for ultraviolet-B resistance in rice, encodes cyclobutane pyrimidine dimer photolyase.
- [113] M. Teranishi, Y. Iwamatsu, J. Hidema, T. Kumagai, *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 1848-1856. Ultraviolet-B sensitivities in Japanese lowland rice cultivars: cyclobutane pyrimidine dimer photolyase activity and gene mutation.
- [114] J. Hidema, T. Kumagai, B. M. Sutherland, *Plant Cell* **2000**, *12*, 1569-1578. UV radiation-sensitive Norin 1 rice contains defective cyclobutane pyrimidine dimer photolyase.
- [115] C. P. Selby, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 17696-17700. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity.
- [116] Y. Huang, R. Baxter, B. S. Smith, C. L. Partch, C. L. Colbert, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 17701-17706. Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity.
- [117] T. Todo, H. Takemori, H. Ryo, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaïdo, K. Sato, T. Nomura, *Nature* **1993**, *361*, 371-374. A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts.
- [118] S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8535-8540. Characterization of (6-4)-photoproduct DNA Photolyase.
- [119] M. A. Miranda, M. A. Izquierdo, F. Galindo, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1965-1976. Steady-state and time-resolved studies on oxetane cycloreversion using (thia)pyrylium salts as electron-transfer photosensitizers.
- [120] M. K. Cichon, S. Arnold, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 767-770. A (6-4) Photolyase model: repair of DNA (6-4) lesions requires a reduced and deprotonated flavin.
- [121] P. F. Heelis, S. B. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2936-2937. Photoenzymic repair of the DNA 6-4 photoproduct - A density functional theory and semiempirical study.
- [122] 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 *Xenopus* (6-4)-Photolyase.
- [123] X. D. Zhao, J. Q. Liu, D. S. Hsu, S. Y. Zhao, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32580-32590. Reaction mechanism of (6-4)-Photolyase.
- [124] P. Clivio, J. L. Fourrey, *Chem. Commun.* **1996**, 2203-2204. (6-4) photoproduct DNA photolyase mechanistic studies using s⁵-(6-4) photoproducts.
- [125] S. K. A. Matus, J.-L. Fourrey, P. Clivio, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3316-3320. Synthesis of the TT pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct-thio analogue phosphoramidite building block.
- [126] K. Hitomi, H. Nakamura, S. T. Kim, T. Mizukoshi, T. Ishikawa, S. Iwai, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10103-10109. Role of two histidines in the (6-4)-Photolyase reaction.
- [127] H. N. Ananthaswamy, W. E. Pierceall, *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 1119-1136. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis.
- [128] H. S. Black, F. R. de Gruijl, P. D. Forbes, J. E. Cleaver, H. N. Ananthaswamy, E. C. de Fabo, S. E. Ullrich, R. M. Tyrrell, *J. Photochem. Photobiol., B* **1997**, *40*, 29-47. Photocarcinogenesis: an overview.
- [129] J.-S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76-82. Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer.
- [130] D. E. Brash, J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin, J. Pontén, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 10124-10128. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma.
- [131] D. Decraene, P. Agostinis, A. Pupe, P. de Haes, M. Garmyn, *J. Photochem. Photobiol., B* **2001**, *63*, 78-83. Acute response of human skin to solar radiation: Regulation and function of the p53 protein.

- [132] G. P. Pfeifer, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 270-283. Formation and processing of UV photoproducts: Effects of DNA sequence and chromatin environment.
- [133] J. E. Cleaver, *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 377-379. Mutagenic lesions in photocarcinogenesis: the fate of pyrimidine photoproducts in repair-deficient disorders.
- [134] J. E. Cleaver, F. Cortés, D. Karentz, L. H. Lutze, W. F. Morgan, A. N. Player, L. Vuksanovic, D. L. Mitchell, *Photochem. Photobiol.* **1988**, *48*, 41-49. The relative biological importance of cyclobutane and (6-4) pyrimidine-pyrimidone dimer photoproducts in human cells: evidence from a Xeroderma pigmentosum revertant.
- [135] C. A. Smith, M. Wang, N. Jiang, L. Che, X. D. Zhao, J.-S. Taylor, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4146-4154. Mutation spectra of M13 vectors containing site-specific cis-syn, trans-syn I, (6-4), and dewar pyrimidone photoproducts of thymidyl-(3'-5')-thymidine in Escherichia coli under SOS conditions.
- [136] A. Gentil, F. LePage, A. Margot, C. W. Lawrence, A. Borden, A. Sarasin, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1837-1840. Mutagenicity of a unique thymine-thymine dimer or thymine-thymine pyrimidine pyrimidone (6-4) photoproduct in mammalian cells.
- [137] Y.-H. You, D.-H. Lee, J.-H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui, G. P. Pfeifer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44688-44694. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells.
- [138] A. Burger, D. Fix, H. Liu, J. Hays, R. Bockrath, *Mutat. Res.* **2003**, *522*, 145-156. In vivo deamination of cytosine-containing cyclobutane pyrimidine dimers in E. coli: a feasible part of UV-mutagenesis.
- [139] W. Peng, B. Ramsey Shaw, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10172-10181. Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC-TT transitions.
- [140] S. Tommasi, M. F. Denissenko, G. P. Pfeifer, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4727-4730. Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases.
- [141] 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.
- [142] Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2755-2762. Excess electron transfer in DNA: effect of base sequence and proton transfer.
- [143] Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6942-6949. Electron spin resonance study of electron transfer in DNA: inter-double-strand tunneling processes.
- [144] A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1128-1136. Electron spin resonance study of electron transfer rates in DNA: determination of the tunneling constant b for single-step excess electron transfer.
- [145] 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.
- [146] C. Behrens, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 1632-1633. Excess electron transfer in flavin-capped, thymine dimer-containing DNA hairpins.
- [147] C. Behrens, Dissertation (Universität Marburg), **2003**.
- [148] C. Behrens, M. K. Cichon, F. Grolle, U. Hennecke, T. Carell, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *236*, 187-204. Model compounds for the investigation of an excess electron transfer to DNA bases.
- [149] A. Schwögler, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3918-3920. Self-repairing DNA based on a reductive electron transfer through the base stack.
- [150] S. Steenken, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1293-1297. Electron transfer in DNA? Competition by ultra-fast proton transfer.
- [151] A. A. Voityuk, M. E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *342*, 231-238. Energetics of excess electron transfer in DNA.
- [152] L. M. Kundu, L. T. Burgdorf, O. Kleiner, A. Batschauer, T. Carell, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1053-1060. Cleavable substrate containing molecular beacons for the quantification of DNA-photolyase activity.
- [153] A. V. Leontiev, D. M. Rudkevich, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14126-14127. Revisiting noncovalent SO₂-amine chemistry: an indicator-displacement assay for colorimetric detection of SO₂.

- [154] M. Tanaka, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12372-12373. Reductive DNA cleavage induced by UVA photoirradiation of NADH without oxygen.
- [155] S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1302-1303. Excess electron transfer based repair of a cis-syn thymine dimer in DNA is only weakly sequence dependent.
- [156] S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8557-8558. Model studies of DNA photorepair: radical anion cleavage of thymine dimers probed by nanosecond laser spectroscopy.
- [157] 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.
- [158] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15552-15559. Reductive electron injection into duplex DNA by aromatic amines.
- [159] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1839-1842. Criteria for efficient transport of excess electrons in DNA.
- [160] O. Schiemann, E. Feresin, T. Carl, B. Giese, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 270-274. 4'-pivaloyl substituted thymidine as a precursor for the thymyl radical: an EPR spectroscopic study.
- [161] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848-1851. Excess electron transport through DNA: a single electron repairs more than one UV-induced lesion.
- [162] F. W. Hobbs, Jr., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3420-3422. Palladium-catalyzed synthesis of alkynylamino nucleosides. A universal linker for nucleic acids.
- [163] J. D. Kahl, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 597-604. Introducing structural diversity in oligonucleotides via photolabile convertible C5-substituted nucleotides.
- [164] E. Coutouli-Argyropoulou, M. Tsitabani, G. Petrantonakis, A. Terzis, C. Raptopoulou, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1382-1388. Labeling of organic biomolecules with ethynylferrocene.
- [165] S. Breeger, M. von Meltzer, U. Hennecke, T. Carell, *Chem.--Eur. J.* **2006**, *12*, 6469-6477. Investigation of the pathways of excess electron transfer in DNA with flavin-donor and oxetane-acceptor modified DNA hairpins.
- [166] A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 318-321. Complex sequence dependence by excess-electron transfer through DNA with different strength electron acceptors.
- [167] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1636-1639. Real-time spectroscopic and chemical probing of reductive electron transfer in DNA.
- [168] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem.--Eur. J.* **2005**, *11*, 1871-1876. Reductive electron transfer in phenothiazine-modified DNA is dependent on the base sequence.
- [169] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, R. L. Letsinger, R. Sanishvili, A. Joachimiak, V. Tereshko, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9905-9906. Structure and Photoinduced Electron Transfer in Exceptionally Stable Synthetic DNA Hairpins with Stilbenediether Linkers.
- [170] 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.
- [171] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8206-8215. DNA-mediated exciton coupling and electron transfer between donor and acceptor stilbenes separated by a variable number of base pairs.
- [172] F. D. Lewis, Y. S. Wu, X. Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12165-12173. Synthesis, structure, and photochemistry of exceptionally stable synthetic DNA hairpins with stilbene diether linkers.
- [173] J. Butenandt, Dissertation (ETH Zürich), **1999**.
- [174] J. Butenandt, A. P. M. Eker, T. Carell, *Chem.--Eur. J.* **1998**, *4*, 642-653. Synthesis, crystal structure and enzymatic evaluation of a DNA-photolesion isostere.
- [175] J. Butenandt, R. Epple, E.-U. Wallenborn, A. P. M. Eker, V. Gramlich, T. Carell, *Chem.--Eur. J.* **2000**, *6*, 62-72. A comparative repair study of thymine- and uracil-photodimers with model compounds and a photolyase repair enzyme.
- [176] 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.

- [177] M. Schuman Jorns, G. B. Sancar, A. Sancar, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1856-1861. Identification of oligothymidylat as new simple substrates for *Escherichia coli* DNA photolyase and their use in a rapid spectrophotometric enzyme assay.
- [178] T. Torizawa, T. Ueda, S. Kuramitsu, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, K. Morikawa, I. Shimada, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 32950-32956. Investigation of the cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase DNA recognition mechanism by NMR analyses.
- [179] B. J. V. Berg, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20276-20284. Evidence for dinucleotide flipping by DNA-photolyases.
- [180] S. Weber, K. Möbius, G. Richter, C. W. M. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3790-3798. The electronic structure of the flavin cofactor in DNA photolyase.
- [181] M. Schuman Jorns, E. T. Baldwin, G. B. Sancar, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 486-491. Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis.
- [182] M. Schuman Jorns, A. J. Ramsey, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8437-8441. Effect of 5-Deazaflavin on energy transduction during catalysis by *Escherichia coli* DNA Photolyase.
- [183] V. S. N. Y. Murthy, Y. Meah, V. Massey, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5344-5345. Conversion of a flavoprotein Reductase to a Desaturase by manipulation of the Flavin redox potential.
- [184] Y. V. S. N. Murthy, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8975-8982. Synthesis and properties of 8-CN-Flavin nucleotide analogs and studies with flavoproteins.
- [185] S. Kasai, B. J. Fritz, K. Matsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3041-3042. An improved synthesis of 8-Amino-8-demethylriboflavin.
- [186] T. Klar, G. Kaiser, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer, L. O. Essen, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1798-1806. Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus thermophilus*.
- [187] T. Ueda, A. Kato, S. Kuramitsu, H. Terasawa, I. Shimada, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36237-36243. Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27.
- [188] K.-J. Armache, H. Kettenberger, P. Cramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 6964-6968. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II.
- [189] J. Butenandt, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 708-711. "Base flipping": photodamaged DNA-RNA duplexes are poor substrates for photoreactivating DNA-repair enzymes.
- [190] A. Tremeau-Bravard, T. Riedl, J. M. Egly, M. E. Dahmus, *J. Bio. Chem.* **2004**, *279*, 7751-7759. Fate of RNA Polymerase II stalled at a cisplatin lesion
- [191] A. H. Sarker, S. E. Tsutakawa, S. Kostek, C. Ng, D. S. Shin, M. Peris, E. Campeau, J. A. Tainer, E. Nogales, P. K. Cooper, *Mol. Cell* **2005**, *20*, 187-198. Recognition of RNA Polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne syndrome.
- [192] R. A. Verhage, J. Heyn, P. van de Putte, J. Brouwer, *Mol. Genet. Genomics* **1997**, *254*, 284-290. Transcription elongation factor S-II is not required for transcription-coupled repair in yeast.
- [193] S. K. Lee, S. L. Yu, L. Prakash, S. Prakash, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 4383-4389. Yeast RAD26, a homolog of the human CSB gene, functions independently of nucleotide excision repair and base excision repair in promoting transcription through damaged bases.
- [194] S. Iwai, M. Shimizu, H. Kamiya, E. Ohtsuka, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7642-7643. Synthesis of a phosphoramidite coupling unit of the pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct and its incorporation into oligodeoxynucleotides.
- [195] T. Mizukoshi, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10634-10642. Studies on the chemical synthesis of oligonucleotides containing the (6-4) photoproduct of thymine-cytosine and its repair by (6-4) Photolyase.
- [196] S. Iwai, T. Mizukoshi, Y. Fujiwara, C. Masutani, F. Hanaoka, Y. Hayakawa, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2299-2303. Benzimidazolium triflate-activated synthesis of (6-4) photoproduct-containing oligonucleotides and its application.

- [197] K. Satou, Y. Komatsu, T. Torizawa, K. Kato, I. Shimada, O. Nikaido, E. Ohtsuka, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2175-2179. Efficient chemical synthesis of a pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct analog and its properties.
- [198] M. Friedel, Diplomarbeit (Universität Marburg), **2001**.
- [199] J. Yamamoto, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4406-4415. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6-4) photoproduct and their use in (6-4) photolyase studies.
- [200] E. J. LeClerc, A. Borden, C. W. Lawrence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **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*.
- [201] C. A. Smith, J.-S. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11143-11151. Preparation and characterization of a set of deoxyoligonucleotide 49-mers containing Site-specific *cis-syn*, *trans-syn-I*, (6-4), and Dewar photoproducts of thymidyl (3'-5')-thymidine.
- [202] L. Boymond, M. Rottländer, G. Cahiez, P. Knochel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1701-1703. Preparation of highly functionalized grignard reagents via an iodine-magnesium exchange reaction. applications to solid phase synthesis.
- [203] A. Lepretre, A. Turck, N. Ple, P. Knochel, G. Queguiner, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 265-273. First study of syntheses and reactivity of grignard compounds in the diazine series. Diazines. Part 27.
- [204] A. Krasovskiy, P. Knochel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3333-3336. A LiCl-mediated Br/Mg exchange reaction for the preparation of functionalized aryl- and heteroarylmagnesium compounds from organic boronides.
- [205] B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373-3386. Highly efficient chemical synthesis of 2'-O-methyloligoribonucleotides and tetrabiotinylated derivatives; novel probes that are resistant to degradation by RNA or DNA specific nucleases.
- [206] P. Capek, R. Pohl, M. Hocek, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2278-2284. Cross-coupling reactions of unprotected halopurine bases, nucleosides, nucleotides and nucleoside triphosphates with 4-boronophenylalanine in water. Synthesis of (purin-8-yl)- and (purin-6-yl)phenylalanines.
- [207] M. Hocek, P. Naus, R. Pohl, I. Votruba, P. A. Furman, P. M. Tharnish, M. J. Otto, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5869-5873. Cytostatic 6-arylpurine nucleosides. 6. SAR in anti-HCV and cytostatic activity of extended series of 6-hetarylpurine ribonucleosides.
- [208] M. Havelkova, D. Dvorak, M. Hocek, *Synthesis* **2001**, 1704-1710. The Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of 2-, 6- or 8-halopurines with boronic acids leading to 2-, 6- or 8-aryl- and -alkenylpurine derivatives.
- [209] M. K. Lakshman, P. Gunda, P. Pradhan, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10329-10335. Mild and room temperature C-C bond forming reactions of nucleoside C-6 aryl-sulfonates.
- [210] M. K. Lakshman, P. F. Thomson, M. A. Nuqui, J. H. Hilmer, N. Sevova, B. Boggess, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1479-1482. Facile Pd-catalyzed cross-coupling of 2'-deoxyguanosine O6-arylsulfonates with arylboronic acids.
- [211] A. Kittaka, T. Kuze, A. Sarai, H. Takayama, H. Tanaka, T. Miyasaka, J.-I. Inoue, S. Ishii, *Heterocycles* **2003**, *59*, 207-215. Synthesis of oligonucleotides with 6-formyl-2'-O-methyluridine and thermal stability of their duplexes.
- [212] H. Tanaka, A. Matsuda, S. Iijima, H. Hayakawa, T. Miyasaka, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2164-2167. Synthesis and biological activities of 5-substituted 6-phenylthio and 6-iodouridines, a new class of antileukemic nucleosides.
- [213] H. Tanaka, H. Hayakawa, T. Miyasaka, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 3565-3572. Synthesis of 6-aryloyluridine from uridine via regioselective lithiation.
- [214] G. Palmisano, M. Santagostino, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2533-2542. Base-modified pyrimidine nucleosides. Efficient entry to 6-derivatized uridines by Sn-Pd transmetalation-coupling process.
- [215] N. Bischofberger, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2821-2824. Synthesis of 4-C substituted pyrimidine nucleosides.

- [216] R. S. Coleman, E. A. Kesicki, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11636-11642. Synthesis and postsynthetic modification of oligodeoxynucleotides containing 4-thio-2'-deoxyuridine (ds4U).
- [217] R. P. Hedge, C. K. Brush, C. M. Harris, T. M. Harris, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1553-1564. Synthesis of 1- and 1,2,2'-deuteriated deoxyribose and incorporation into deoxyribonucleosides.
- [218] H. Berber, M. Soufyane, C. Mirand, S. Schmidt, A. M. Aubertin, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7369-7375. Synthesis of some cyclic and acyclic nucleoside analogues derived from 4-(trifluoromethyl)pyrimidines.
- [219] K. Gao, L. E. Orgel, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 935-940. A convenient synthesis of a novel nucleoside analog: 4-(a-diformylmethyl)-1-(b-D-ribofuranosyl)-2-pyrimidinone.
- [220] Y. Ding, Q. Habib, S. Z. Shaw, D. Y. Li, J. W. Abt, Z. Hong, H. An, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 851-859. Synthesis of new 3'-, 5-, and N4-modified 2'-O-methylcytidine libraries on solid support.
- [221] M. Sekine, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2321-2326. General method for the preparation of N3- and O4-substituted uridine derivatives by phase-transfer reactions.
- [222] N. Bischofberger, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1621-1624. Addition of Grignard reagents to 4-O-TPS pyrimidine nucleosides. Synthesis of 6-substituted 5,6-dihydropyrimidine nucleoside derivatives.
- [223] O. L. Acevedo, R. S. Andrews, M. Dunkel, P. D. Cook, *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 989-995. Synthesis of C-4 substituted pyrimidine nucleoside analogs. Preparation of several 4-(2-oxoalkylidene)-2(1H)-pyrimidinone ribonucleosides.
- [224] C. Switzer, D. Shin, *Chem. Commun.* **2005**, 1342-1344. A pyrimidine-like nickel(II) DNA base pair.
- [225] J. K. Stille, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 508-524. The palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organotin reagents with organic electrophiles.
- [226] M. P. Groziak, D. W. Thomas, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2152-2159. Synthesis of new transglycosidically tethered 5'-nucleotides constrained to a highly biologically relevant profile.
- [227] H. Tanaka, H. Hayakawa, S. Iijima, K. Haraguchi, T. Miyasaka, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 861-866. Lithiation of 3',5'-O-(tetraisopropylsiloxy-1,3-diyl)-2'-deoxyuridine: synthesis of 6-substituted 2'-deoxyuridines.
- [228] T. Hayashi, M. Konishi, Y. Kobori, M. Kumada, T. Higuchi, K. Hirotsu, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 158-163. Dichloro[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene] palladium(II): an effective catalyst for cross-coupling of secondary and primary alkyl grignard and alkylzinc reagents with organic halides.
- [229] T. Yamada, Y. Ohtsuka, T. Ikeno, *Chem. Lett.* **1998**, 1129-1130. Enantioselective borohydride 1,4-reduction of α , β -unsaturated carboxamides using optically active Cobalt(II) complex catalysts.
- [230] P. von Matt, A. Pfaltz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 691-700. Enantioselective conjugate reduction of α , β -unsaturated carboxamides with semicorrin cobalt catalysts.
- [231] B. H. Lipshutz, J. M. Servesko, B. R. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8352-8353. Asymmetric 1,4-hydrosilylations of α , β -Unsaturated Esters.
- [232] M. R. Barvian, M. M. Greenberg, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6151-6154. Diastereoselective synthesis of hydroxylated dihydrothymidines resulting from oxidative stress.
- [233] T. J. Matray, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6931-6932. Site-specific incorporation of the alkaline labile oxidative stress product (5R)-5,6-dihydro-5-hydroxythymidine in an oligonucleotide.
- [234] S. J. Hannon, N. G. Kundu, R. P. Hertzberg, R. S. Bhatt, C. Heidelberger, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1105-1108. A new synthesis of n-blocked dihydrouracil and dihydroorotic acid derivatives using lithium tri-sec-butyl borohydride as reducing agent
- [235] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768-2771. The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement.

- [236] K.-Y. Zee-Cheng, R. K. Robins, C. C. Cheng, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 1877-1884. Pyrimidines. III. 5,6-Dihydropyrimidines.
- [237] B. M. Vuano, O. I. Pieroni, M. C. Cabaleiro, *J. Chem. Res.* **2000**, 318-320. Thermal reaction of cinnamic acid and of -styrylphosphonic acid with urea.
- [238] G. Li, H.-T. Chang, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 451-454. Catalytic asymmetric aminohydroxylation (AA) of olefins.
- [239] B. Tao, G. Schlingloff, K. B. Sharpless, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2507-2510. Reversal of regioselection in the asymmetric aminohydroxylation of cinnamates.
- [240] H. Zhang, P. Xia, W. Zhou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3439-3447. Application of asymmetric aminohydroxylation to heteroaromatic acrylates.
- [241] D. A. Evans, M. M. Faul, M. T. Bilodeau, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6744-6746. Copper-catalyzed aziridination of olefins by (N-(p-toluenesulfonyl)imino)phenyliodine.
- [242] M. Ober, H. Muller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18143-18149. Base pairing and replicative processing of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion.
- [243] S. P. Keen, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4307-4310. Studies on total synthesis of cylindrospermopsin: new constructions of uracils from α,β -unsaturated esters.
- [244] G. R. Heintzelman, W.-K. Fang, S. P. Keen, G. A. Wallace, S. M. Weinreb, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3939-3945. Stereoselective total syntheses and reassignment of stereochemistry of the freshwater cyanobacterial hepatotoxins Cylindrospermopsin and 7-Epicylindrospermopsin.
- [245] H. L. Sham, D. A. Betebenner, T. Herrin, G. Kumar, A. Saldivar, S. Vasavanonda, A. Molla, D. J. Kempf, J. J. Plattner, D. W. Norbeck, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1351-1353. Synthesis and antiviral activities of the major metabolites of the HIV protease inhibitor ABT-378 (Lopinavir).
- [246] T. Douki, M. Court, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol., B* **2000**, *54*, 145-154. Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts.
- [247] Y. Wang, J. S. Taylor, M. L. Gross, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 738-745. Isolation and mass spectrometric characterization of dimeric adenine photoproducts in oligodeoxynucleotides.
- [248] Y. Wang, J.-S. Taylor, M. L. Gross, *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 1077-1082. Nuclease P1 digestion combined with tandem mass spectrometry for the structure determination of DNA photoproducts.
- [249] L. M. Kundu, U. Linne, M. Marahiel, T. Carell, *Chem.--Eur. J.* **2004**, *10*, 5697-5705. RNA is more UV resistant than DNA: The formation of UV-induced DNA lesions is strongly sequence and conformation dependent.
- [250] E. Sage, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 163-174. Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context.
- [251] K. Miyata, A. Kobori, R. Tamamushi, A. Ohkubo, H. Taguchi, K. Seio, M. Sekine, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 3626-3637. Conformational studies of 4-N-carbamoyldeoxycytidine derivatives and synthesis and hybridization properties of oligodeoxyribonucleotides incorporating these modified bases.
- [252] A. Kobori, K. Miyata, M. Ushioda, K. Seio, M. Sekine, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 476-485. A new method for the synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing 4-N-alkoxycarbonyldeoxycytidine derivatives and their hybridization properties.
- [253] L. Zhou, X. Cheng, B. A. Connolly, M. J. Dickman, P. J. Hurd, D. P. Hornby, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 591-599. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases.
- [254] J. S. Driscoll, V. E. Marquez, J. Plowman, P. S. Liu, J. A. Kelley, J. J. Barchi, Jr., *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3280-3284. Antitumor properties of 2(1H)-pyrimidinone riboside (zebularine) and its fluorinated analogues.
- [255] L. Frick, C. Yang, V. E. Marquez, R. Wolfenden, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9423-9430. Binding of pyrimidin-2-one ribonucleoside by cytidine deaminase as the transition-state analogue 3,4-dihydrouridine and the contribution of the 4-hydroxyl group to its binding affinity.
- [256] T. Kunieda, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3478-3487. Photo- and stereochemistry of 5,6-methylenepyrimidine nucleosides, bicyclic isomers of thymidine, and 5-methyluridine.

- [257] M. Adamczyk, S. R. Akireddy, P. G. Mattingly, R. E. Reddy, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5749-5761. Synthesis of hapten–phosphoramidites from 20-deoxyuridine.
- [258] J. Michel, S. Moreau, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **1999**, *18*, 1633-1637. Use of C5-diamino-substituted-uridine in triple helix forming oligonucleotides.
- [259] M. J. Robins, P. J. Barr, J. Giziewicz, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 554-557.
- [260] S. P. Bew, J. B. Sweeney, *Synlett* **1991**, 109-110. Hydrostannation of acetylenic acid derivatives.
- [261] W. G. Finnegan, R. A. Henry, R. Lofquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3908-3911. An improved synthesis of 5-substituted tetrazoles.
- [262] R. Welz, S. Mueller, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 795-798. 5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis.
- [263] F. Brückner, U. Hennecke, T. Carell, P. Cramer, *Science* **2007**, accepted.
- [264] U. Hennecke, D. Kuch, T. Carell, *Synthesis* **2007**, accepted. A general route to 4-C-substituted pyrimidine nucleosides.

9. Anhang

9.1 Kristallstrukturdaten für 8-Demethyl-8-aminoriboflavin (60)

Tabelle 9: Kristalldaten, Mess- und Verfeinerungsparameter für Verbindung 60.

Kristalldaten:

Identification code	ulli1	
Habitus, colour	Regular, Colourless	
Crystal size	0.30 x 0.14 x 0.04 mm ³	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2(1)2(1)2(1) Z = 4	
Unit cell dimensions	a = 4.604(5) Å	$\alpha = 90.000(5)^\circ$.
	b = 17.202(5) Å	$\beta = 90.000(5)^\circ$.
	c = 23.799(5) Å	$\gamma = 90.000(5)^\circ$.
Volume	1885(2) Å ³	
Cell determination	16598 peaks with Theta 1.5 to 26.2°.	
Empirical formula	C17 H23 N5 O7	
Formula weight	409.40	
Density (calculated)	1.443 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.114 mm ⁻¹	
F(000)	864	

Datenaufnahme:

Diffractometer type	IPDS2
Wavelength	0.71069 Å
Temperature	193(2) K
Theta range for data collection	1.46 to 25.00°.
Index ranges	-5<=h<=5, -20<=k<=20, -28<=l<=27
Data collection software	STOE WinXpose (X-Area)
Cell refinement software	STOE WinCell (X-Area)
Data reduction software	STOE WinIntegrate (X-Area)

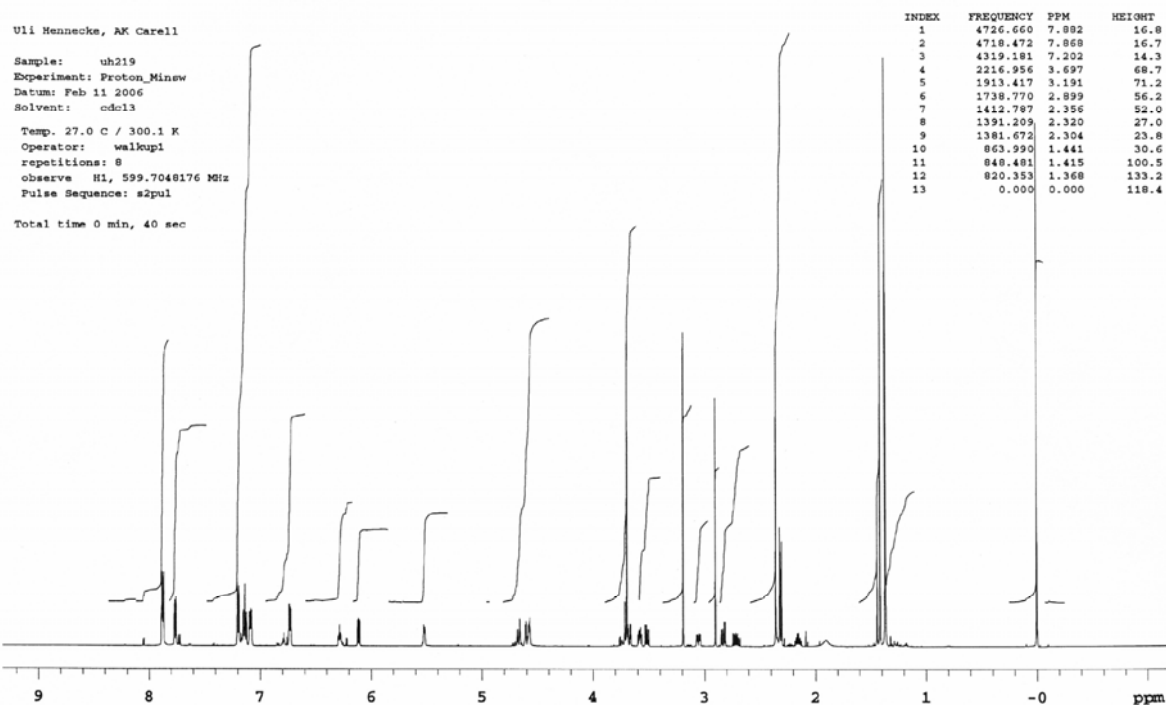
Lösen und Verfeinerung:

Reflections collected	15700
Independent reflections 3335	R(int) = 0.0730]
Completeness to theta = 25.00°	100.0 %
Observed reflections	2801[I >2sigma(I)]
Reflections used for refinement	3335
Extinction coefficient	X = 0.028(3)
Flack parameter (absolute struct.)	1(2)

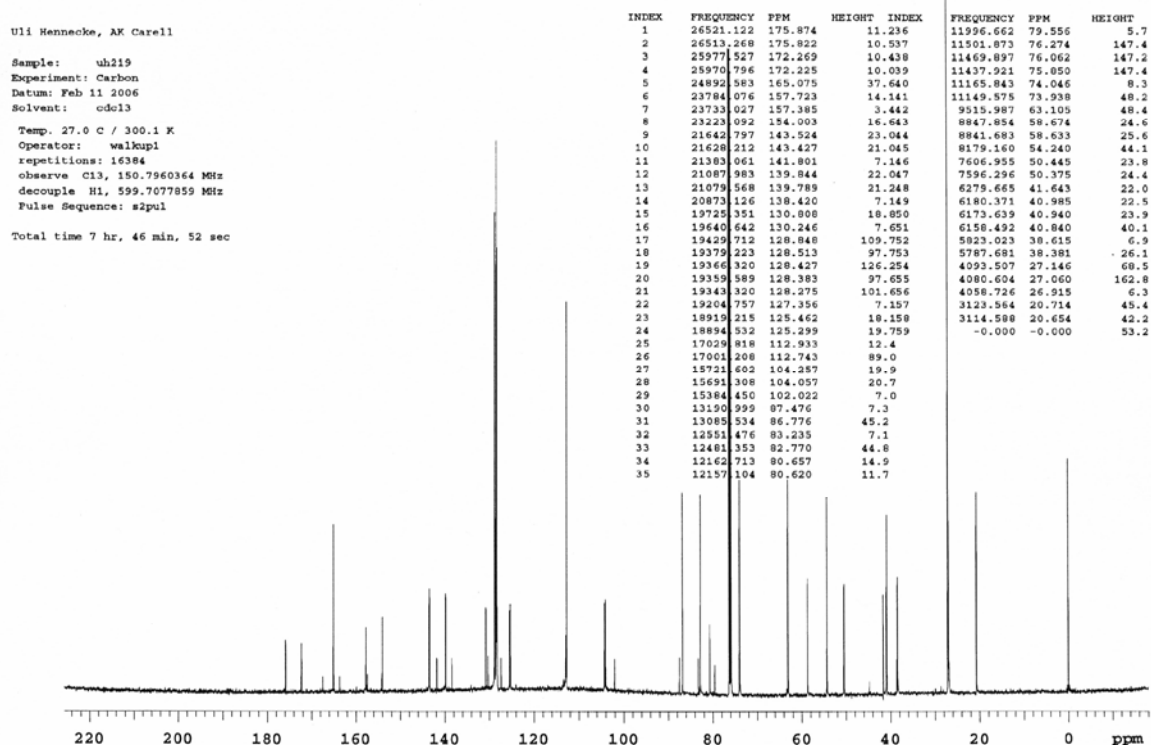
Largest diff. peak and hole	0.320 and -0.222 e.Å ⁻³
Solution	Direct methods / difference fourier
Refinement	Full-matrix least-squares on F ²
Treatment of hydrogen atoms	Located positions, isotropic refinement
Programs used	SHELXS-97 (Sheldrick, 1990) SHELXL-97 (Sheldrick, 1997) SHELXTL, STOE IPDS2 software
Data / restraints / parameters	3335 / 10 / 325
Goodness-of-fit on F ²	1.162
R index (all data)	wR2 = 0.1599
R index conventional [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0615

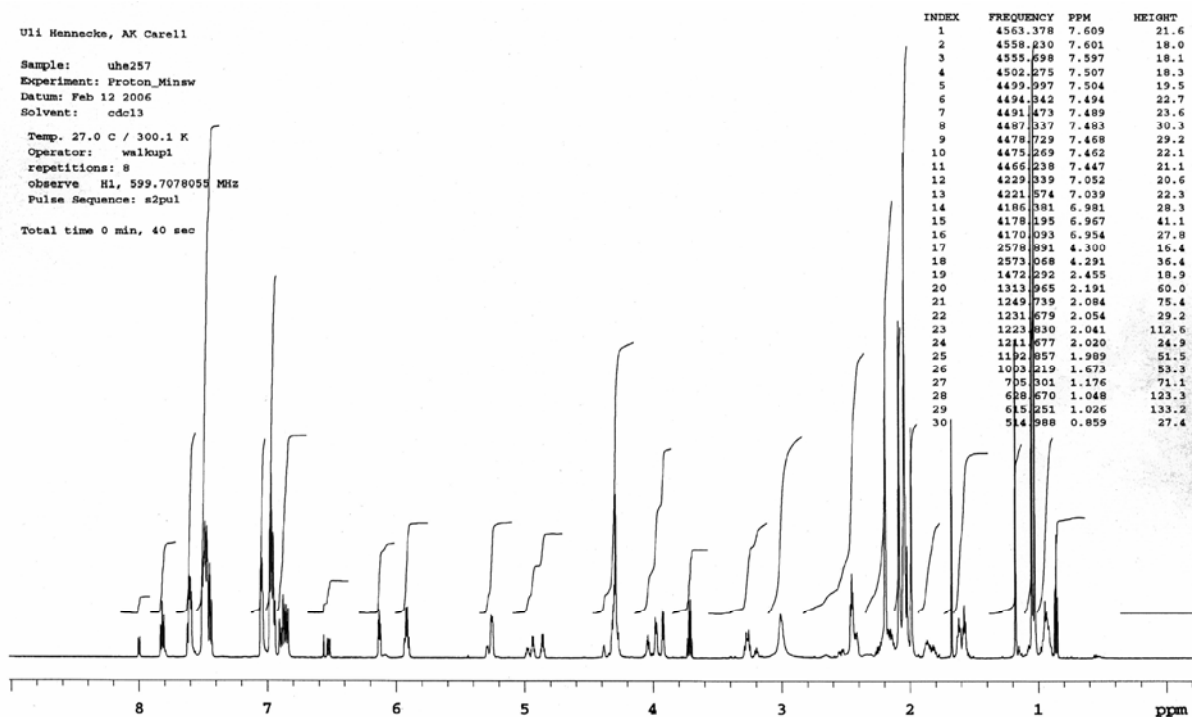
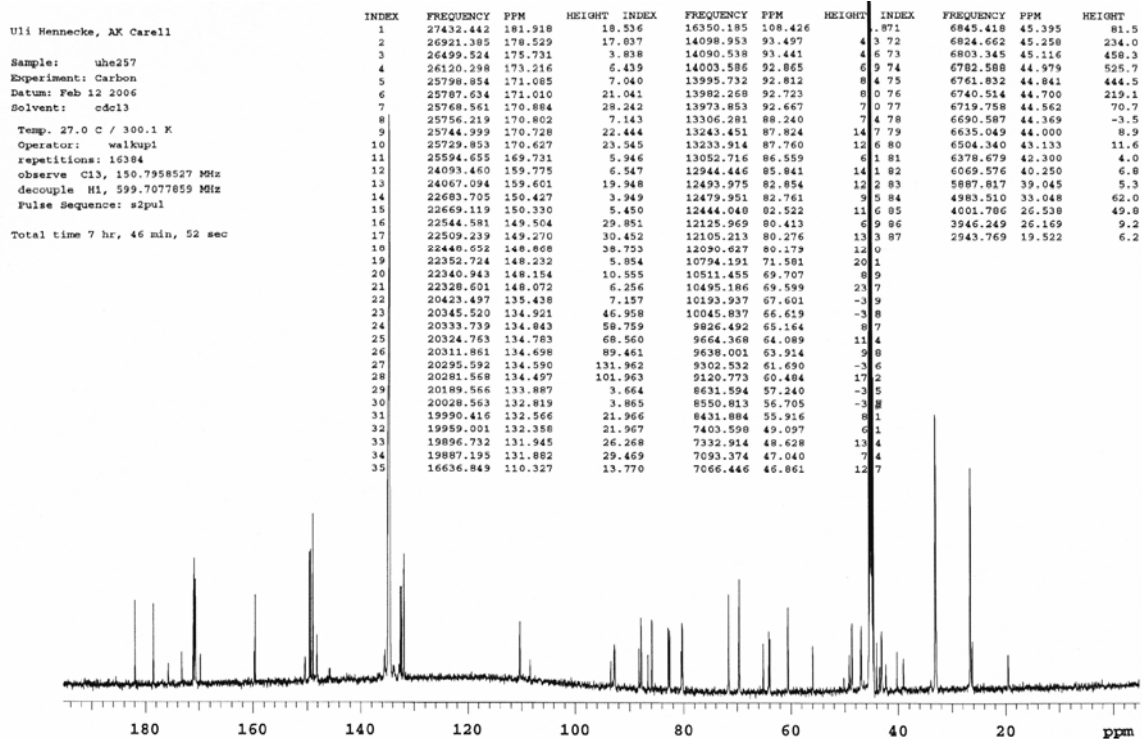
9.2 NMR-Spektren der Verbindungen 134 und 135

¹H-NMR-Spektrum der Verbindungen 134 und 134ds



¹³C-NMR-Spektrum der Verbindungen 134 und 134ds



¹H-NMR-Spektrum der Verbindungen **135** und **135ds**¹³C-NMR-Spektrum der Verbindungen **135** und **135ds**

9.3 *Abkürzungsverzeichnis*

A	Adenin, DNA: 2'-Desoxyadenosin
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i> , chemische Ionisierung bei Normaldruck
ATP	Adenosintriphosphat
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
BER	Basenexzisionsreparatur
ber.	berechnet
BINAP	2,2'-Bis-(diphenylphosphino)-1,1'-binaphtyl
Bn	Benzyl
Bu	n-Butyl
Bz	Benzoyl
C	Cytosin, DNA: 2'-Desoxycytidin
CD	circular dichroism, Zirkulardichroismus
CE	Kapillargelelektrophorese
CEDCI	Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
CPG	<i>controlled pore glass</i>
δ	NMR: chemische Verschiebung
d	Tage
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
DCM	Dichlormethan
dG	2'-Desoxyguanosin
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl
DMTCI	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl-chlorid
DNA	<i>(deoxyribonucleic acid)</i> Desoxyribonukleinsäure
dppf	1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Electron Impact Ionisation
Em	Emission
eq.	Äquivalent(e)
ESI	Elektronensprayionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EtOAc	Essigsäureethylester

Ex.	(excitation) Anregung
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fl	Flavin
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
G	Guanin, DNA: 2'-Desoxyguanosin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GGR	Globale Genomreparatur
h	Stunde(n)
h ν	Photoreaktion
8-HDF	8-Hydroxydesazaflavin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HMBC	Heteronuclear Multi-Bond Connectivity
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HOMO	(<i>Highest occupied molecular orbital</i>) energetisch höchstes, besetztes Molekülorbital
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPLC-MS/MS	MS eines per HPLC und MS isolierten Ions
HR-MS	(<i>High resolution mass spectrometry</i>) hochaufgelöstes Massenspektrum
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
HV	Hochvakuum (10^{-3} – 10^{-2} mbar)
I	Intensität
ISC	<i>inter system crossing</i>
J	Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
LIF	(<i>Laser Induced Fluorescence</i>) laserinduzierte Fluoreszenz
Lsg.	Lösung
LUMO	(<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>) energetisch niedrigstes, unbesetztes Molekülorbital
M	Masse
M	MS: Molekülion
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrum
MS/MS	MS eines mit MS isolierten Ions
MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolat
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidenindinukleotides

NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NEt ₃	Triethylamin
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NT-DNA	(<i>non-templat DNA</i>) Nicht-Templat-DNA
NTP	Nukleosidtriphosphat
Nu	Nukleophil
Ph	Phenyl
Py	Pyridin
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SEM	Trimethylsilylethoxymethyl
SET	(<i>single electron transfer</i>) Einelektronentransfer
SG	Schutzgruppe
Smp.	Schmelzpunkt
T	Temperatur
T	Thymin, DNA: Thymidin
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
T-DNA	Templat-DNA
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCR	(<i>transcription-coupled repair</i>) Transkriptions gekoppeltes DNA Reparatur
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TEAA	Triethylamoniumacetat
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TLS	<i>trans lesion synthesis</i>
TMS	Trimethylsilyl
Tol	Toluol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil, RNA: Uridin
UV	ultraviolett
Vis	<i>visible</i>
z	MS: Ladungszahl

Curriculum vitae

Ulrich Hennecke

Geburtsdatum: 31. März 1977
Geburtsort: Stadtoldendorf
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

August 1983 – Juni 1989 Grundschole und Orientierungsstufe in
Eschershausen/Niedersachsen
August 1989 – Mai 1996 Goetheschule (Gymnasium) in Einbeck/Niedersachsen
Mai 1996 Abitur (1.6).

Zivildienst

August 1996 – August 1997 Zivildienst bei Ha-We-Tec in Holzminden/Niedersachsen.

Studium

Oktober 1997 – Juni 2002 Chemiestudium an der Philipps-Universität Marburg.
Oktober 1999 Vordiplomprüfungen
Oktober 2000 – März 2001 Auslandsaufenthalt an der University of Cambridge
Oktober 2001 Diplomprüfungen
Dezember 2001 – Juni 2002 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Carell,
„Synthese von 3'-Desoxyriboflavin“.
Juni 2002 Diplom

Promotion

September 2002 – Dezember 2003 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Carell an
der Philipps-Universität Marburg
Januar 2004 – Februar 2007 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Carell an
der Ludwig-Maximilians-Universität München

