Andreas Glas (Autor)

Strukturbiologische und mechanistische Untersuchungen zur Erkennung und Reparatur von DNA-Photoschäden

https://cuvillier.de/de/shop/publications/663

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung 1

II. Summary 4

1. Einleitung 7

1.1 DNA und DNA-Schäden 7
1.2 DNA-Reparatursysteme 9
1.3 DNA-Photoschäden 10
1.3.1 Cyclobutanpyrimidindimer (CPD-Photoschden) 12
1.3.2 (6-4)-Photoschäden 13
1.3.3 Dewar Valenz-Isomere 15
1.3.4 Mutagenität von DNA-Photoschäden 17
1.4 Reparatur von DNA-Photoschäden 19
1.4.1 Einteilung der Photolyasen und Cryptochrome 19
1.4.2 CPD-Photolyase 21
1.4.2.1 Strukturelle Einblicke in die CPD-Photolyase 22
1.4.2.2 Reparaturmechanismus der CPD-Photolyase 24
1.4.2 (6-4)-Photolyase 25

2. Aufgabenstellung 31

3. Ergebnisse und Diskussion 32

3.1 Methoden zur Herstellung des (6-4)-Schadens 32
3.1.1 Direkte Belichtung von Oligonukleotiden mit UV-Licht 33
3.1.2 Herstellung des (6-4)-Schadens auf Dinukleotidebene 39
3.2 Herstellung und Charakterisierung des (TA)*-Photoschadens 42
3.3 Umwandlung der (6-4)-Photoprodukte in ihre entsprechenden Dewar Valenz-Isomere 46

3.3.1 Untersuchungen zur Umwandlung durch Belichtung von Oligonukleotiden ... 46
3.3.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Dewar-Schadensbildung ... 50
3.4 Charakterisierung der (6-4)- und der (Dew)-Photoschäden ... 53
3.4.1 Absorptionseigenschaften ... 53
3.4.2 HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse der enzymatisch abgebauten Oligonukleotide ... 54
3.5 Reparaturstudien der (6-4)- und der (Dew)-Schäden ... 60
3.5.1 Bestimmung des pH-Optimums ... 61
3.5.2 Bestimmung der optimalen Belichtungszeit sowie der Enzymmenge ... 62
3.5.3 Aktivitätsstudien der (6-4)-Photolyase mit (6-4)-Schäden ... 63
3.5.4 Aktivitätsstudien der (6-4)-Photolyase mit Dewar-Schäden als Substrat ... 66
3.6 Charakterisierung der (6-4)-Photolyase ... 73
3.6.1 Homologievergleich der Photolyase/Cryptochrom Superfamilie ... 73
3.6.2 Spektroskopische Eigenschaften der (6-4)-Photolyase ... 77
3.6.3 Identifizierung des zweiten Cofaktors der (6-4)-Photolyase ... 80
3.6.4 Vergleich der Reparaturaktivität der (6-4)-Photolyase mit und ohne dem zweiten Cofaktor F_0 ... 82
3.6.5 Direkte Isolierung von F_0 aus *D. melanogaster* ... 85
3.7 Strukturbiologische und mechanistische Untersuchungen der (6-4)-Photolyase ... 87
3.7.1 Co-Kristallisation des T(6-4)-T-Schadens im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* ... 87
3.7.2 Diffraktionsanalyse der (6-4)-Photolyase ... 88
3.7.3 Strukturanalyse der (6-4)-Photolyase ... 89
3.7.4 Co-Kristallisation mit dem zweiten Cofaktor F_0 ... 94
3.7.5 Mechanistische Untersuchungen zur Reparatur der (6-4)-Photolyase ... 97
3.7.6 Co-Kristallisationsuntersuchungen der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit dem T(6-4)C- bzw. T(6-4)C*-Schaden ... 103
3.7.7 Co-Kristallisationsuntersuchungen der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit den Dewar-Isomeren ... 107
3.8 Synthese des Cofaktors F_0/8-HDF ... 109

3.9 Synthese eines (6-4)-Reparaturintermediat-Analogon 114
3.9.1 Synthese des Nukleosids A 116
3.9.1.1 Silyl-Schützung des 5'- und 3'-Endes von 2'-Desoxyuridin 116
3.9.1.2 Stannylierung der C6-Position des geschützten 2'-Desoxyuridins **52** 116
3.9.2 Synthese des Nukleosids B 117
3.9.2.1 Toluoyl-Schützung des 5'- und 3'-Endes von 2'-Desoxyuridin 117
3.9.2.2 Chlorierung der C4-Position des geschützten 2'-Desoxyuridins **54** 118
3.9.3 Kupplung und Funktionalisierung der beiden Nukleoside A und B zum Analogon **62** 118
3.9.3.1 *Stille*-Kreuzkupplung der beiden *building blocks* 118
3.9.3.2 Entschützung der „Silylklammer“ des Dinukleosids **56** 119
3.9.3.3 Schützung der 5'-OH-Gruppe des Pyrimidinrings von **57** mit DMT-Cl 120
3.9.3.4 Schützung der 3'-OH-Gruppe des Pyrimidinrings von **58** mit TBDMS-Cl 121
3.9.3.5 Entschützung der Toluoylschutzgruppen des Dinukleosids **59** 121
3.9.3.6 Selektive Schützung der 5'-OH-Gruppe des Pyrimidonrings von **60** mit TBDPS-Cl 122
3.9.3.7 Darstellung des Phosphoramidits **62** 122
3.9.4 Einbau und Charakterisierung von **51** in DNA 123
3.9.5 Biochemische und strukturbiologische Untersuchungen mit dem Reparaturanalogon und der (6-4)-Photolyase 125
3.10 Zusammenfassung und Ausblick 126

4. Experimenteller Teil 134

4.1 Material und Methoden 134

4.2 Synthesevorschriften und analytische Daten 143

4.2.1 Synthese des (6-4)-Reparatur-Analogon 143

4.2.2 Synthese des Desazaflavins F_0 157

4.2.3 Synthese des Formacetalverbrückten T(6-4)T-Dinukleotids 161

5. Abkürzungsverzeichnis 162

6. Literaturverzeichnis 166

7. Anhang 179