

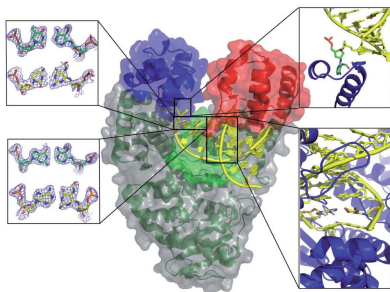


Tim Gehrke (Autor)

Untersuchungen zum Replikationsverhalten carbozyklischer Analoga der Formamidopyrimidine des 2'-Desoxyadenosin und 2'-Desoxyguanosin

Tim Gehrke

Untersuchungen zum Replikationsverhalten
carbozyklischer Analoga der Formamido-
pyrimidine des 2'-Desoxyadenosin
und 2'-Desoxyguanosin



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6084>

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>

1 Einleitung

1.1 Funktion und Aufbau der DNA

Die Speicherung und Weitergabe der Erbinformation wird durch eine einzigartige Substanz ermöglicht: Der Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl. *DNA*).¹ Die DNA ist das zentrale Molekül in den drei Reichen des Lebens (Bakterien, Archaea und Eukaryoten).²

Sie ist der Informationsträger der Gene und liefert den Bauplan für einen Organismus. Dieser Bauplan ist als chemische Information gespeichert. Diese Information wird als genetischer *Code* bezeichnet und ist durch eine Basenabfolge innerhalb der Desoxyribonukleinsäure festgelegt. Damit die genetische Information bei der Teilung einer Zelle weitergegeben werden kann, muss die DNA dupliziert werden. Diesen Vorgang nennt man Replikation. Er wird durch DNA-Polymerasen katalysiert (vgl. Kap. 1.8).

Die genetische Information wird in der Sequenz von vier DNA-Nukleobasen gespeichert: dem Adenosin (1), Cytidin (2), Guanosin (3) und Thymin (4) (R = 2'-Desoxyribose –Abbildung 3).

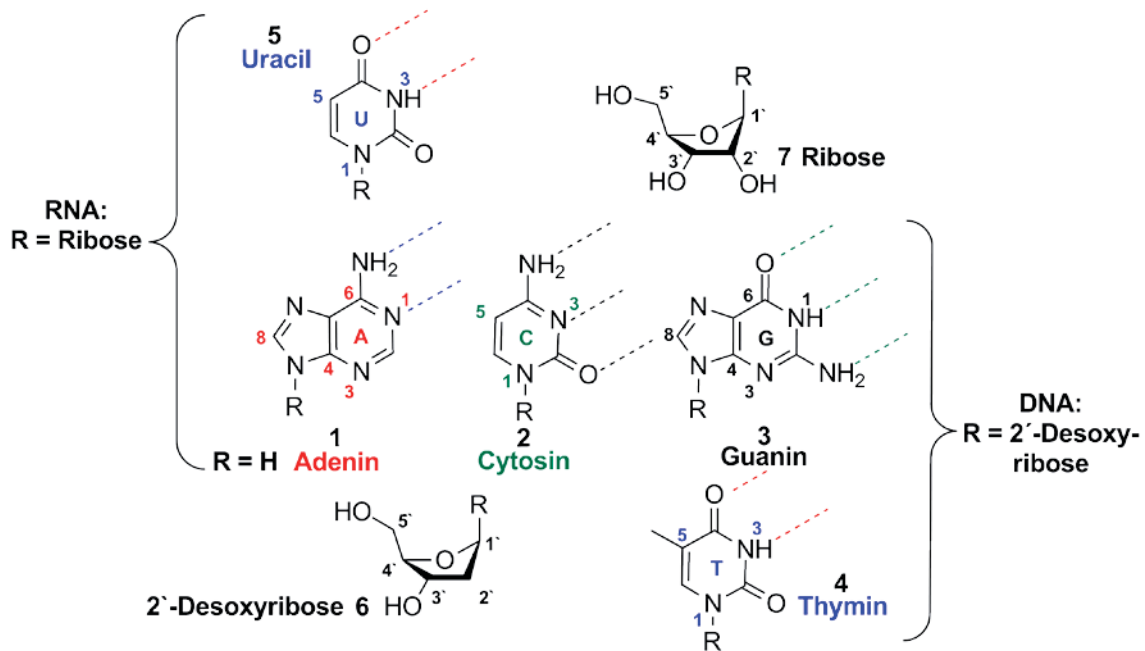


Abbildung 3: Die Bausteine der DNA sind die Nukleoside (1 - 4), die sich jeweils aus einer Purin- oder Pyrimidinbase und einem Monosaccharid (bei DNA: 2'-Desoxyribose (6), bei RNA: Ribose (7)) zusammensetzen. Die Saccharide liegen als Furanoside vor und sind über die *N*- β -glykosidische Bindung ihres C-1' Kohlenstoffes mit dem jeweiligen Stickstoff der Heterozyklen (R = H) verbunden.

¹ Im Folgenden wird der in der Fachliteratur gängige englische Begriff DNA verwendet.

² Eine Ausnahme bilden RNA-Viren. Diese nutzen anstelle von DNA RNA (dt.: Ribonukleinsäure - RNS) als Erbinformationsträger.



Sie wird in einem lebenden Organismus aufgrund der Basenpaarung zwischen den Heterozyklen des Adenin (**1**) und Thymin (**5**) bzw. Guanin (**4**) und Cytosin (**3**) (R = H) weitergegeben, abgelesen oder verändert.^[5-7]

Die Nukleobasen sind am 5'- und am 3'-Ende über eine Phosphodiesterbindung untereinander verknüpft.^[8] Auch die RNA ist während des Transkriptionprozesses ein Informationsspeicher (wenn auch nur temporär). Die relevanten Informationen der DNA werden zunächst in RNA umgeschrieben (Transkription) und anschließend dient die RNA als Vorlage zur Proteinbiosynthese (Translation).

1.2 Rückblick: Die Entdeckung der DNA

Unser heutiger Kenntnisstand über die Funktion und den Aufbau der DNA ist das Ergebnis fast 150-jähriger Forschungstätigkeit von Wissenschaftlern unterschiedlichster Bereiche. So beschäftigen sich Biochemiker, Biologen, Chemiker, Mediziner und Physiker seit etwa Mitte des 19. Jahrhunderts mit der DNA.^[9]

Den Grundstein für die Erforschung der DNA legte *F. Miescher* im Jahre 1868, als er erstmals Nuklein (Nukleinsäure) aus Leukozyten isolieren konnte. Aus chemischer Sicht ist dies heute ein Meilenstein, da man erst viele Jahre später herausfand, dass die Nukleinsäure tatsächlich der Träger der Erbinformation ist.^[10]

Aufbauend auf den Arbeiten von *A. Kossel* gelang es *P. Levene* 1919, die drei Komponenten der DNA und RNA sowie deren Verknüpfung (Phosphat-Zucker-Base) aufzuklären. Die Phosphodiesterbindung der Zucker untereinander hatte er jedoch noch nicht erkannt.^[11]

Die Bakteriologen *O. T. Avery*, *C. McLeod* und der Physiker *M. McCarty* fanden 1944 am *Rockefeller* Institut heraus, dass DNA und nicht Proteine, wie vorher vermutet, der (Über-)Träger der Erbinformation ist.^[12]

Inspiriert durch die Arbeit von *O. T. Avery* formulierte der österreichische Chemiker *E. Chargaff* Anfang 1950 seine Grundsätze zur Komplementarität der DNA-Basen.^[13-14]

Die bahnbrechende Entdeckung der Doppelhelixstruktur erfolgte im Jahr 1953 durch *J. D. Watson* und *F. A. Crick*.^[15] So konnte durch die Lösung der Röntgenstrukturbilder von B-DNA^[16] ein Weg zur Aufklärung des noch unbekanntes Mechanismus der DNA-Vervielfältigung gefunden werden. *Watson* und *Crick* erkannten bereits früh,³ dass mit ihrer postulierten helikalen Basenpaarung auch ein plausibler Mechanismus der DNA-Vervielfältigung einhergeht.^[17]

³ "It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material."



Der semikonservative Mechanismus der DNA-Replikation (aufgeklärt durch *M. Meselson* und *F. Stahl*, 1958)^[18] beschreibt die Synthese eines Tochterstranges durch einen der komplementären Elternstränge. Um die exakte Basenabfolge einzuhalten und die genetische Information genau zu kopieren,^[19] dienen die Wasserstoffbrückenbindungsmuster der DNA Basen des Elternstranges als Vorlage (Abbildung 3).^[20] Jede der zwei so entstandenen Helices besteht somit aus dem neu synthetisierten Tochter-DNA-Strang, sowie seinem Templat- dem ursprünglichen Elternstrang. Dadurch wurden die theoretischen und intuitiven Vorhersagen von *Watson* und *Crick* aus dem Jahr 1953 bestätigt.^[17]

Mit der Entdeckung eines Enzyms aus *Escherichia coli* (*E. coli*) durch *A. Kornberg et al.* 1956 - als Polymerase (später als Pol. I) bezeichnet - gelang es erstmals, genetisches Material *in vitro* zu vervielfältigen.^[21-22] *Kornberg* beobachtete, dass eine Polymerase durch Zugabe von aktivierten DNA-Basen (ihren Triphosphaten oder dNTPs), einem Templat mit Primer und Mg^{2+} genetisches Material *in vitro* vervielfältigt. Bis heute ist noch keine DNA-Polymerase bekannt, durch die ein DNA-Strang ohne Primer "de novo" synthetisiert werden kann.

Nach fast 60 Jahren Forschung gehören Polymerasen zu den mit am besten untersuchten Enzymen der Biologie.^[23]

Zahlreiche essentielle Techniken und molekularbiologische Anwendungen (*Polymerase Chain Reaction (PCR)*,^[24-25] Sequenzierung nach Sanger,^[26] cDNA Klonierung, DNA-basierende Diagnostik bis hin zur Sequenzierung ganzer Genome^[27-28]) beruhen u.a. auf den Beobachtungen von *Kornberg* von vor über 50 Jahren.^[29]

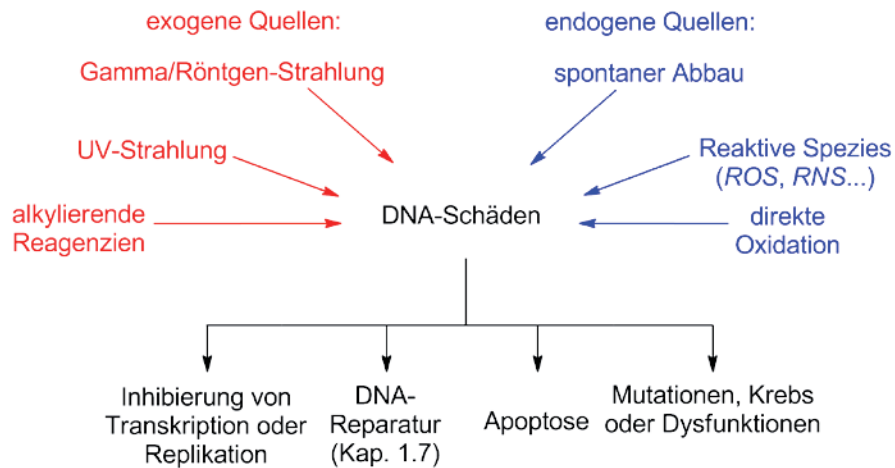
1.3 Ursachen von DNA-Schäden und ihre Folgen

Wie alle biologischen Makromoleküle ist auch die DNA chemischen Zersetzungsreaktionen ausgesetzt. Schätzungen zufolge kann es zu 10^4 bis 10^6 Schäden pro Tag am Erbgut in einer einzigen Säugerzelle kommen.^[30-31]

DNA-Schädigungen können durch unterschiedlichste Quellen verursacht werden.^[32-36] Diese können exogenen als auch endogenen Ursprungs sein.^[30]

Zu den exogenen DNA-schädigenden Einwirkungen zählen UV-Strahlung, Röntgen- oder γ -Strahlung und alkylierende Reagenzien (Schema 1).^[37]

Endogene Einflüsse sind Prozesse, die aufgrund des natürlichen Metabolismus einer Zelle sogenannte *reactive oxygen- (ROS)* oder *reactive nitrogen species (RNS)* bilden.^[38-40]



Schema 1: Ursachen von DNA-Schäden und deren zelluläre Folgen.

Weitere schadhafte Veränderungen der DNA werden hervorgerufen durch spontane Abbauprozesse (Depurinierungen und die selteneren Depyrimidierungen), nicht-enzymatische Methylierungen oder Alkylierungen.^[34, 41-42]

Schäden können im Anschluss teilweise zu Mutationen führen. So kann auch die Entstehung von Krebs^[43] u.a. auf oxidative Schäden zurückgeführt werden.

Verschiedene krebserregende Substanzen wie Aflatoxin B₁ (AFB₁ – FaPydG - **8**) oder polycyclische Aromaten (z.B. Aminofluoren AF) sind in der Lage, mit Nukleobasen zu reagieren und große sog. Addukt-Schäden zu bilden (Abbildung 4 - **9**).^[44-46] Diese als *bulky-adducts* bezeichneten Schäden können mit ihren ausgedehnten π -Systemen in DNA interkalieren.^[47] Die geschädigte Nukleobase wird so aus ihrer helikalen Position herausgedreht, wodurch es lokal zu einer Verzerrung des DNA-Doppelstranges kommt.^[47-51] Während das dG-AF **9** (R = H) von *high-fidelity* Polymerasen, wenn auch verlangsamt, noch repliziert werden kann,^[52-55] ist das dG-AAF (9 - R = Ac) für replikative Polymerasen nicht passierbar. Seine Replikation erfordert eine *low-fidelity* Polymerase (meist aus der Familie der Y-Polymerasen vgl. Kap. 1.8.6).^[50, 56]

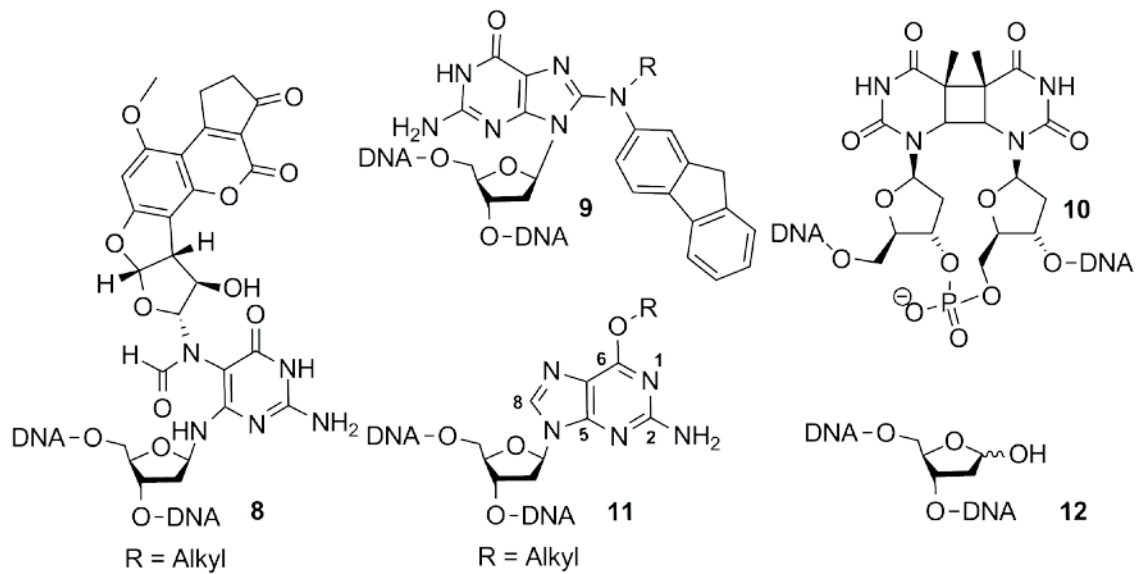


Abbildung 4: Prominente Vertreter nicht-oxidativer DNA-Schäden: AFB₁ – FaPydG (**8**), dG-AF (**9** – R = H), CPD-Schaden (**10**), O₆-Alkylguanosin (**11**) oder abasische Stellen (AS - **12**).

Auch die Klasse der Photoschäden, darunter der prominente TT-*cis-syn*-Cyclobutanpyrimidindimer Schaden (CPD - **10**), bildet durch seine kovalent verknüpften Thymidine einen Replikationsstopp für *high-fidelity* Polymerasen innerhalb desselben Stranges (*intrastrand crosslink*).^[57-58]

Die spontane Hydrolyse der *N,O*-glykosidischen Bindung führt zu einer Abspaltung der Base (insbesondere bei Purinbasen) und damit zur Bildung hochmutagener abasischer Stellen (sog. *abasic sites* - **12**).^[59-62]

Neben der Art ist auch der Ort des Schadens für einen Organismus ausschlaggebend. Tritt die Mutation in einem Bereich des Genoms auf, der keine Proteine kodiert, so bleibt dies ohne Folgen. Ebenso verhält es sich bei Mutationen, bei denen ein Basentriplett in ein Codon überführt wird, welches dieselbe Aminosäure kodiert. Geht aufgrund einer Mutation eine Base verloren (Deletion) oder wird eine zusätzliche Base hinzugefügt (Insertion), ändert sich automatisch das Leseraster der Basentriplets bzw. Codons. Treten diese Mutationen in kodierenden Bereichen der DNA auf, so werden bei der späteren Transkription in RNA und der nachfolgenden Proteinbiosynthese (Translation) essentielle Informationen eines Gens für das entsprechende Protein verloren gehen. Betrifft die Schädigung lediglich eine Base, so spricht man von einer Punktmutation.

Leserastermutationen (*frameshift mutations*) werden u.a. durch große Basen-Addukte verursacht (Abbildung 4). Sie führen dazu, dass Polymerasen ein oder mehrere Nukleotide überlesen, so dass nachfolgende Gensequenzen um die entsprechende Anzahl der überlesenen



Nukleotide verschoben werden.^[63] Abasische Stellen können in Folge einer protonenkatalysierten β -Eliminierung zu Einzelstrangbrüchen führen.

Folge dieser DNA-Schäden sind Zelltod durch Apoptose (Schema 1).^[64-65] Tritt kein programmierter Zelltod ein, kann es zu unkontrolliertem Wachstum von Zellen kommen. Gesundes Gewebe wird somit verdrängt oder zerstört. Es entsteht ein erhöhtes Risiko für Tumore bzw. Krebs.^[66]

1.4 Entstehung oxidativer Schäden an DNA

Im Folgenden wird explizit auf die *in vitro* Erzeugung oxidativer DNA-Schäden eingegangen. Die Schäden des Guanosins und Adenosins bilden die häufigsten der über 70 heute bekannten, oxidativ erzeugten DNA-Schäden.^[67-70] Von ihnen konnten bisher 15 in zellulärer DNA nachgewiesen werden.^[71]

Die vier Nukleobasen besitzen unterschiedliche Redoxpotentiale. Guanosin hat als Monomer mit 1.29 V (gegenüber der Normwasserstoffelektrode NHE) das geringste Redoxpotential.^[72-75] Aufgrund der π -Stapelung erniedrigt sich innerhalb einer DNA-Helix das Redoxpotential für dG umso weiter, je mehr Purinbasen im DNA-Strang aufeinanderfolgen (1.10-1.24 V geg. der NHE).^[76-77] Darüber hinaus ist das Redoxpotential vom pH-Wert abhängig. Eine Erhöhung des pH-Werts führt generell zu einer Absenkung des Standardpotentials.^[67]

Die Tatsache, dass oftmals nicht kodierende, dGdC-reiche Sequenzen zwischen den Genabschnitten eines Organismus existieren, läßt vermuten, dass sie in genomischer DNA als Schutz vor Oxidation kodierender Gensequenzen dienen.^[78] Oxidative Schädigungen können im Labor durch eine Vielzahl an Methoden erzeugt werden:^[79-81]

Als Typ I klassifiziert man mittels Photooxidation hervorgerufene Reaktionen an DNA mit lichtangeregten Photosensibilisatoren (Anthrachinon, Benzophenon oder Riboflavin).^[76, 82-85] Singulett Sauerstoff, der beispielsweise durch Porphyrine, Fullerene oder Methylenblau erzeugt werden kann, ist ebenfalls in der Lage, mit DNA-Basen zu reagieren und Formamidopyrimidine zu erzeugen. Diese chemischen Photooxidationen werden als Typ II klassifiziert.^[85-86]

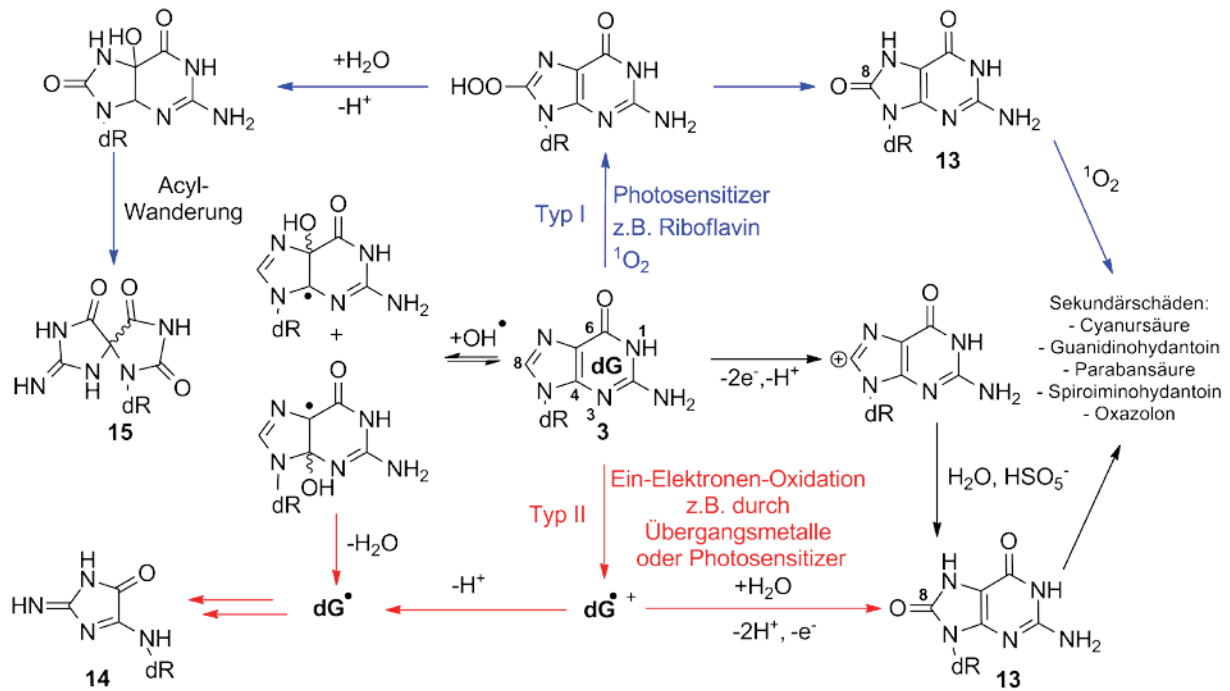


Abbildung 5: Die Oxidationskaskaden des 2'-Desoxyguanosins (**3**) und deren Endprodukte 8-oxodG (**13**), Imidazolone (**14**) und Spiroiminohydantoin (**15**).^[3, 67, 70, 87-88]

Auch Übergangsmetallionen, wie beispielsweise Fe(III), in einer Hypoxanthin/Xanthin-Oxidase katalysierten Reaktion generieren oxidative Schäden *in vitro*.^[89] Weiterhin besteht die Möglichkeit Hydroxylradikale mittels γ -Strahlung zu erzeugen.^[81]

In einem lebenden Organismus sind Schädigungen der Nukleobasen durch ROS wie Superoxid (O_2^-) oder Hydroxylradikale ($\cdot OH$) möglich. Diese hochreaktiven Spezies entstehen bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen einer Zelle und sind in hohem Maß nach Schlaganfällen^[90] oder Herzinfarkten^[91] nachweisbar. Sind Abbauenzyme wie Katalasen oder Superoxiddismutasen nicht in der Lage, die reaktiven Sauerstoffspezies schnell genug abzubauen, treten vermehrt Schädigungen am Erbgut auf.^[92]

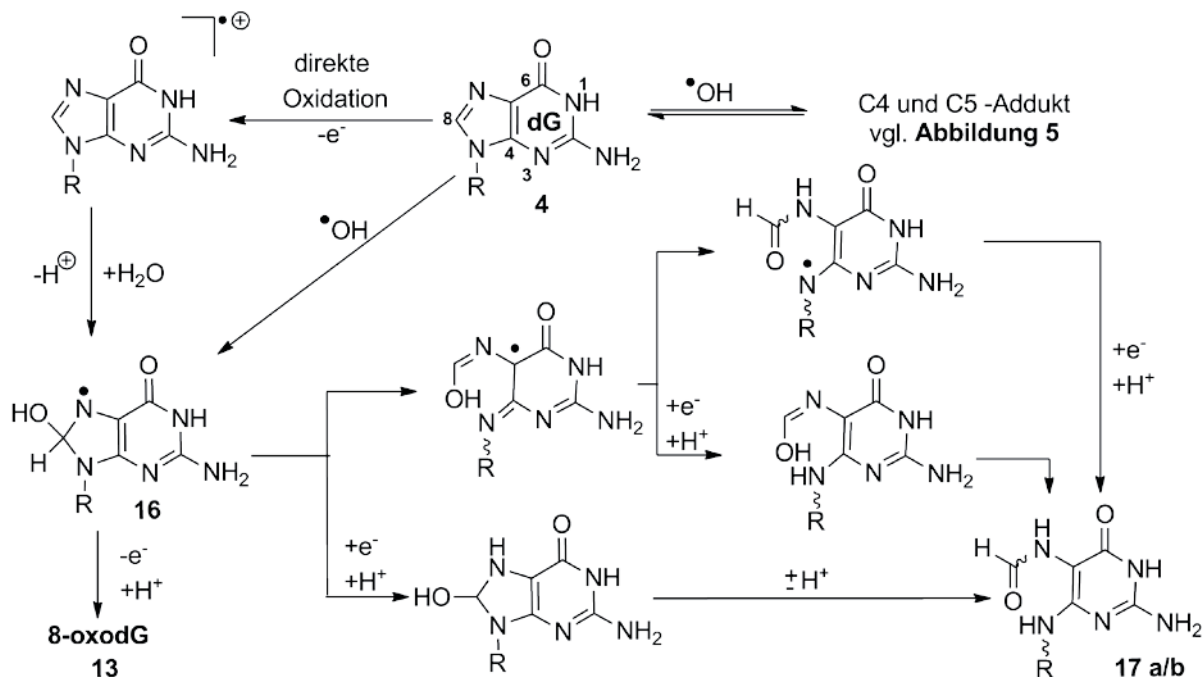
Hydroxylradikale gelten als Hauptverursacher oxidativer Schäden an DNA. Diese entstehen beispielsweise durch das Nebenprodukt der Zellatmung H_2O_2 . Dessen Weiterreaktion über die Fenton-Reaktion unter Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) läßt Hydroxylradikale entstehen. Diese in den Mitochondrien stattfindende Reaktion führt dazu, dass dort etwa zehnmal mehr DNA-Schäden gefunden werden können als in nicht mitochondrialer DNA.^[93-94] Die komplexen Bildungswege weiterer oxidativer DNA-Schäden (insbesondere der Pyrimidin-basierenden DNA-Schäden des dC und dT) wurden in der Literatur bereits ausführlich dargestellt.^[63, 69, 95-97]

1.4.1 Oxidative DNA-Schäden des Guanosins

Das 8-oxodG (**13**) ist ein häufig vorkommender oxidativer Schaden, der Schätzungen zufolge im Genom einer menschlichen Zelle ca. 2000-mal pro Tag entsteht.^[98-99] Der Schaden besitzt

ein hohes mutagenes Potential^[100-104] und wird daher als biologischer Marker bei der Untersuchung oxidativer Schäden verwendet.^[95]

Sowohl das 8-oxodG als auch das ringgeöffnete Hydrolyseprodukt *N*-(2'-Desoxy-D-pentofuranosyl)-*N*-(2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin) kurz FaPydG entstehen aus derselben radikalischen Vorstufe **16**. Beiden Schäden geht die formale Addition eines Hydroxylradikals an die C8-Position des 2-Desoxyguanosins voraus.^[87, 105] Studien mit Pulsradiolyse weisen darauf hin, dass **16** mit einer Ratenkonstante von $2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ zum ringgeöffneten Iminoradikal reagiert.^[110] Neueste theoretische Untersuchungen weisen auf einen möglicherweise komplizierteren Reaktionsweg von **16** zu FaPydG **17a/b** hin.^[106]



Schema 2: Bildungsmechanismen des natürlichen FaPydG **17a/b** (R = 2'-Desoxyribose).^[107-108]

Nach der Reaktion unterschiedlicher reaktiver Spezies mit DNA können primäre oder sekundäre oxidative Schäden entstehen.^[95, 109] Produkte, die aus dem 8-oxodG entstehen⁴, werden als sekundäre Oxidationsprodukte bezeichnet.^[72-75, 95]

Das 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin 2'-Desoxyribonukleosid (FaPydG - **17a/b**) ist ein primäres Oxidationsprodukt⁵, das sich unter reduktiven Bedingungen bei gleichzeitiger Generierung von Hydroxylradikalen nachweisen lässt.^[110-111] Während das 8-oxodG unter aeroben oxidativen Bedingungen *in vivo* vorherrscht,^[105] konnte das FaPydG bei γ -Bestrahlung von Chromatin unter Ausschluss von Sauerstoff als Hauptoxidationsprodukt nachgewiesen

⁴ Das Oxidationspotential des 8-oxodG ist im Vergleich zum dG nochmals um 0.71 V geringer.

⁵ Da der Kohlenstoff in den Formamidopyrimidinen dieselbe Oxidationszahl wie im dG besitzt, sind die FaPydG eigentlich Hydrolyseprodukte des dG. Ihre Entstehung beginnt jedoch durch eine Oxidation



werden.^[80, 112] Bei der Bestrahlung humaner Blutkrebszelllinien mit γ -Strahlen entsteht FaPydG in dreifach höherer Menge als 8-oxodG.^[113]

1.4.2 Oxidative DNA-Schäden des Adenosins

Betrachtet man die Verteilung der oxidativen Schäden der vier DNA-Basen, so finden sich die meisten Schäden beim Guanin, gefolgt von Adenin (Verhältnis ca. 3:1).^[80] Mit etwas Abstand folgen die Pyrimidinbasen dC und dT (Oxidationspotentiale: dA: 1.42 V geg. NHE, zum Vergleich: dG: 1.29 V, dC: 1.6 V und dT: 1.7 V).^[114] Einfache Bestrahlung von DNA in wässriger Lösung mit γ -Strahlung liefert etwa zehnmal weniger FaPydA als FaPydG-Schäden (neben den 8-oxo-Schäden).^[115]

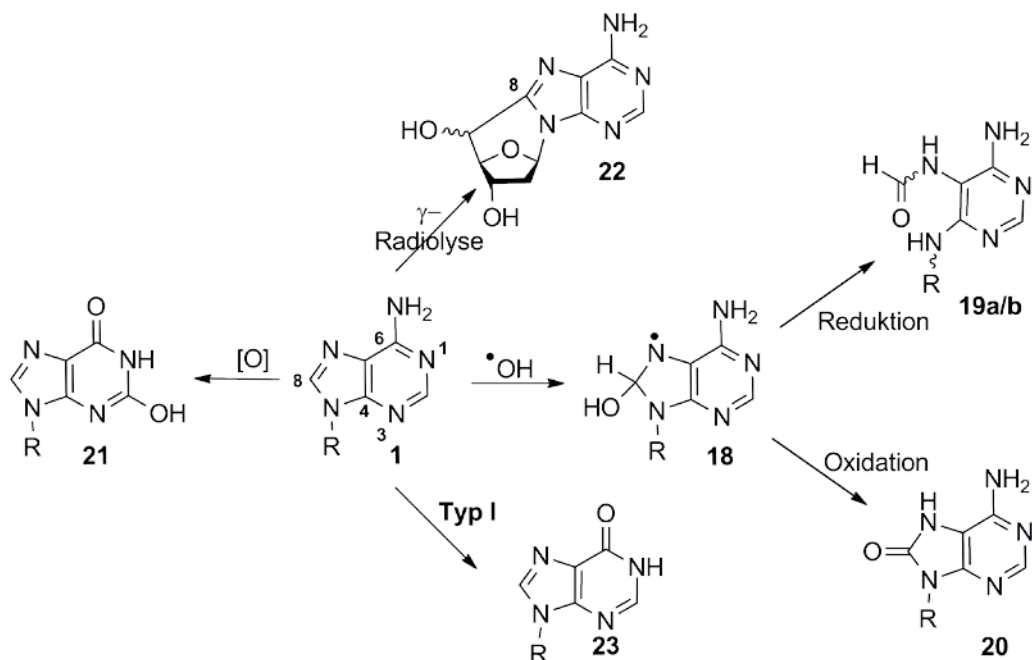
Das 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin-2'-desoxyadenosin (FaPydA - **19 a/b**) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyadenosin (8-oxodA - **20**) bilden die beiden Hauptschäden des Adenosins (**1**) (Schema 3). Bei der Reaktion von Hydroxylradikalen mit dA (**1**) entsteht in wässriger Lösung die radikalische Zwischenstufe, das 8-Hydroxy-2'-desoxyadenosinradikals (**18**). Anschließend erfolgt unter reduktiven Bedingungen entweder eine Reaktion zum FaPydA oder unter oxidativen Bedingungen die Reaktion zum 8-oxodA.^[116-118] Weiterhin kann bei der Behandlung von monomerem dA bzw. in einzelsträngiger DNA mit alkalischer Lösung FaPydA nachgewiesen werden.^[119-120]

Solange die Radiolyse von Chromatin unter O₂-Ausschluss stattfindet, zeigt sich eine höhere Bildung des FaPydA- gegenüber dem 8-oxodA.^[79-80]

Eine γ -Bestrahlung von **1** bzw. 5'-AMP (**29a/b**) lieferte die Produkte 5',8-Cyclo-2'-desoxyadenosin (**22**) bzw. dessen Monophosphat.^[121]

2-Hydroxy-2'-desoxyadenosin (**21**) wird bei der Oxidation von dA (**1**) mit γ -Strahlen in nur kleinen Mengen gebildet. Unter Fenton-Bedingungen ist **21** nach **20** ein Hauptprodukt.^[122-123]

Ein weiterer Schaden, der durch eine Typ I Photooxidation von **1** entsteht, ist das 2'-Desoxyinosin (**23**).^[118]



Schema 3: Entstehung von FaPydA (**19 a/b**) unter reduzierenden und 8-oxodA (**20**) unter oxidativen Bedingungen über das gemeinsame Intermediat **18**.^[118] 2'-Hydroxy-2'-desoxyadenosin (**21**), 2'-5'-8'-Cyclo-2'-desoxyadenosin (**22**) und Desoxyinosin (**23**) (R = 2'-Desoxyribose).^[2]

Obwohl 8-oxodA (**20**) ein geringeres Oxidationspotential (0.92 V geg. NHE) als dA aufweist, konnte seine Weiteroxidation analog dem 8-oxodG (**13**) bisher noch nicht beobachtet werden.^[124]

1.5 Die Schadklasse Formamidopyrimidine

Ältere Arbeiten zur biochemischen Untersuchung oxidativer Schäden bzw. Formamidopyrimidine verwendeten genomische DNA aus Bakterien, Bakteriophagen oder synthetische DNA. Diese wurden UV- oder γ -Strahlung, Alkylierungsmitteln oder anderen kanzerogenen Bedingungen ausgesetzt.^[5, 110] Die Schädigung bzw. Oxidation der DNA erfolgte hier willkürlich bzw. ungerichtet.^[85, 89, 125-128]

1.5.1 Synthetischer Zugang zu den Formamidopyrimidinen

Die Fortschritte in der Phosphoramiditchemie machten es möglich, DNA-Schäden an genau definierten Positionen in einem Oligonukleotid zu platzieren.^[129-130] Voraussetzung für diese gerichtete DNA-Synthese ist die Entwicklung effizienter Synthesen für den jeweiligen DNA-Schaden bzw. für seinen Phosphoramiditbaustein.

Eine erste Synthese von FaPydG als auch von FaPydA gelang *M. Greenberg* und Mitarbeitern, indem sie ein Dinukleotid dieser beiden Schäden an genau definierter Stelle in einem DNA-Strang einbauten (Abbildung 6). Unter den protischen Bedingungen der DNA-Synthese



verhindert die Verwendung des Dinukleotids beider Formamidopyrimidine die Isomerisierung der Ribose zur Pyranoseform. Zunächst gelang der Arbeitsgruppe die Synthese eines FaPydG enthaltenden anomeren Dinukleotids, welches über eine reverse Phosphoramiditsynthese in DNA inkorporiert wurde.^[131]

In weiteren Studien zur Synthese und zum Einbau von natürlichem FaPydA in Oligonukleotide (von 3' nach 5') erzielte man höhere Kopplungseffizienzen als beim reversen Einbau von FaPydG.^[120]

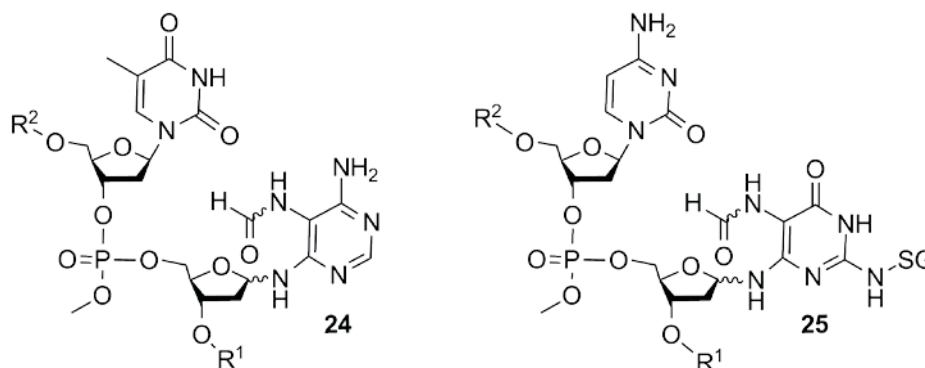


Abbildung 6: Darstellung der anomeren Dinukleotid Bausteine des FaPydA (**24a/b**) und FaPydG (**25a/b**) der *Greenberg* Gruppe, die eine Bildung der Pyranoseform verhindert (SG = Schutzgruppe).^[131-132]

Im Jahr 2004 publizierte die Gruppe um *Greenberg* einen α/β -FaPydG-Phosphoramiditbaustein, dessen Einbau in einer gerichteten DNA-Synthese von 3' nach 5' möglich ist und höhere Ausbeuten liefert.^[133] Die Ausbeuten der DNA-Synthese sind jedoch nach wie vor gering. Eine kürzlich publizierte Synthesevariante geht von einem elektronenarmen Nitropyrimidin Intermediat aus (Abbildung 7).

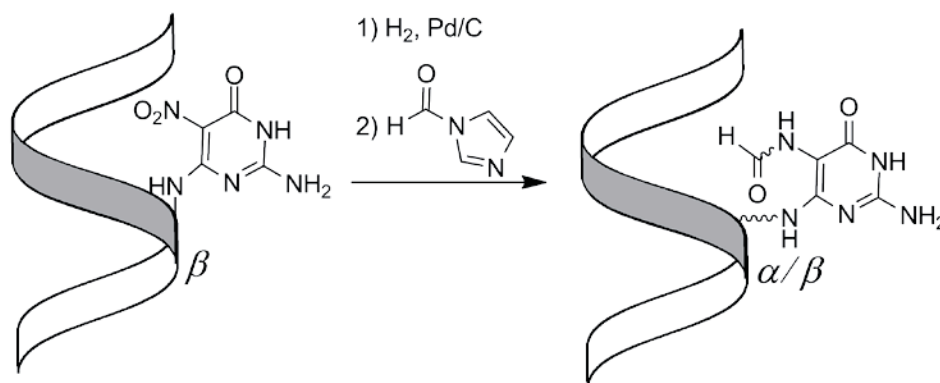


Abbildung 7: Schematische Darstellung der „post-synthetischen“ Generierung von α,β -FaPydG im DNA-Einzelstrang.^[134]

Dieses verhindert die Anomerisierung der 2'-Desoxyribose zu ihrer Pyranoseform. Die Nitroverbindung wurde *post*-DNA-synthetisch nach ihrem Einbau in DNA in Wasser reduziert und mit Formylimidazol zum FaPydG Schaden umgesetzt. Eine analoge Synthese für FaPydA wird in der Arbeit nicht diskutiert.^[134]

1.5.2 Stabilität der natürlichen Formamidopyrimidine

Die gerichtete DNA-Synthese der natürlichen Formamidopyrimidine an fester Phase machte es erstmals möglich, die Stabilität der FaPy-Schäden bezüglich ihrer Anomerisierung und Depurinierung zu untersuchen. Man hatte schon 1958 erkannt, dass die Formamidopyrimidine aufgrund ihrer chemischen Struktur leichter hydrolysierbar sind als ungeschädigte DNA-Basen und anomerisieren können (Abbildung 8).^[95, 110, 117]

Die Spaltung des Imidazolteils am Purinring führt zu einer raschen Hydrolyse der *N,O*-glykosidischen Bindung (im Sauren).^[110, 132, 135-137]

Carell und Mitarbeiter entwickelten aufgrund des oben dargestellten chemischen Verhaltens der Formamidopyrimidine eine 12-stufige Synthese eines 3',5'-silylgeschützten, stabilen α oder β -konfigurierten FaPydG Derivates.^[136]

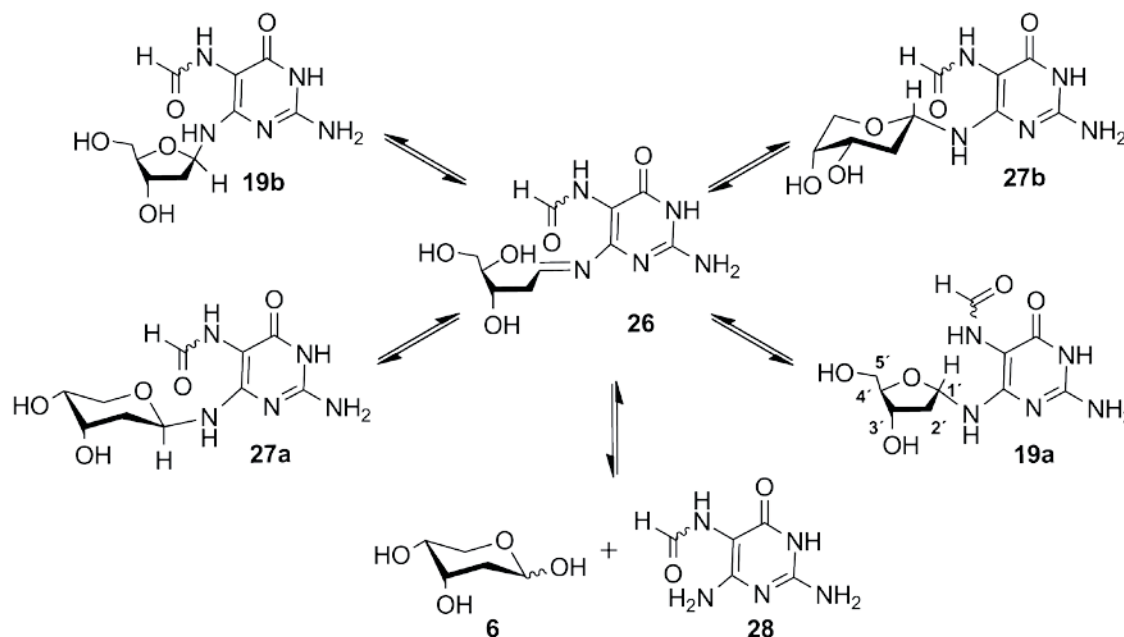


Abbildung 8: Monomeres FaPydG mit unterschiedlichen Zuckerkonfigurationen/Konstitutionen, β -Furanose- (17b), α -Furanose- (17a), sowie α -Pyranose- (27a) und β -Pyranoseform (27b), die sich über die Imin-Struktur (26) bilden. Auch die hydrolytische Spaltung der *N,O*-glykosidischen Bindung erfolgt über 26 zu 28 bzw. 6.^[138]

Dabei zeigte sich, dass die β -Furanoseform des FaPydG (nach etwa 6,5 h) über 26 in saurem Milieu zum α -Furanose Anomer reagiert (Verhältnis β : α 29:71 MeCN:H₂O = 1:1). Sowohl ältere als auch neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass die β -Konfiguration in 12



doppelsträngiger DNA vorherrscht.^[134, 139] Weiterhin ergab sich eine starke Abhängigkeit der Konformation der Formamidgruppe vom jeweiligen Lösemittel. In apolarer Umgebung liegt ausschließlich die *cis*-Konformation vor. In polaren Lösemitteln waren sowohl die *cis* als auch die *trans* Konformation beobachtbar. Die Rotationsbarriere für das Formamid wurde bei Raumtemperatur auf $17.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ (72.9 kJ mol^{-1}) experimentell bestimmt.^[136]

Für das FaPydA wurde eine Synthese des monomeren 5'-Phosphatmethylester (Abbildung 9) entwickelt. Dieser zeigte bei 25°C (pH 7.5) eine sofort einsetzende Anomerisierung. Das Gleichgewicht der Reaktion stellte sich nach etwa 7 h zugunsten des β -Anomers ($\beta : \alpha = 1.33:1.00$) ein.^[120]

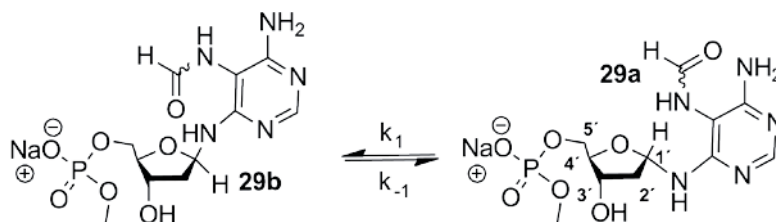


Abbildung 9: Phosphodiester (**29a/b**) des FaPydA der zur Untersuchung der Anomerisierung bzw. Stabilität des Schadens diente.^[132]

Die Deglykosylierung des monomeren FaPydA Methylphosphats (**29a/b**) folgt einer Kinetik erster Ordnung im Bereich von $37 - 90^\circ\text{C}$. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der Deglykosylierung von FaPydA ergaben für die Monomere isoliert und im Oligonukleotid bei 55°C eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 20.5 h. Bei 37°C konnte eine $t_{1/2}$ von 103 h beobachtet werden. Für die Deglykosylierungsreaktion lag die Halbwertszeit des FaPydG bei $t_{1/2} > 500 \text{ h}$ (55°C). Bei 90°C betrug die Ratenkonstante $2.1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Somit ist die Deglykosylierung des FaPydG etwa sechzehn mal langsamer als beim FaPydA.^[120]

Die höhere Stabilität des FaPydG lässt sich durch eine tautomere Grenzstruktur für den N6/C1'-Stickstoff erklären. Da das freie Elektronenpaar am Stickstoffatom des anomeren Zentrums weniger zur Verfügung steht (dargestellt durch Grenzstruktur **17a/b** - Abbildung 10), ist die mesomere Struktur des Imins **26** (Abbildung 8) weniger favorisiert. Das Imin **26** ist ein wichtiges Intermediat auf dem Reaktionsweg zur Öffnung der *N,O*-glykosidischen Bindung.^[120]

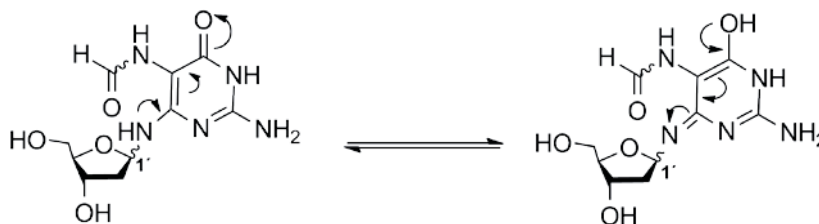


Abbildung 10: Tautomere Grenzstrukturen zur Verdeutlichung der erhöhten Stabilität des FaPydG-Schadens (**17a/b**).^[120]

1.6 Bioisostere Analoga der Formamidopyrimidine

Die Verwendung carbozyklischer Analoga von Nucleosiden ist keine Erfindung der Chemiker, sondern - wie so oft - der Natur entliehen. Carbozyklische Analoga können aufgrund ihrer gleichen räumlichen Ausdehnung und vergleichbaren Wirkung in einem biologischen System eingesetzt werden.^[140] Natürlich vorkommende Vertreter carbozyklischer Nucleoside sind Aristeromycin (**30** - aus *Streptomyces citricolor*) und Neplanocin A (**31** - aus *Ampullariella regularis* - Abbildung 11).^[141-142] Beide Verbindungen zeichnen sich durch ihre hohe cytostatische und viruzide Wirkung aus. Dem Neplanocin A konnte *in vivo* eine anti-leukämische Wirkung bei Mäusen und eine Hemmung der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase in Säugetieren nachgewiesen werden.^[143]

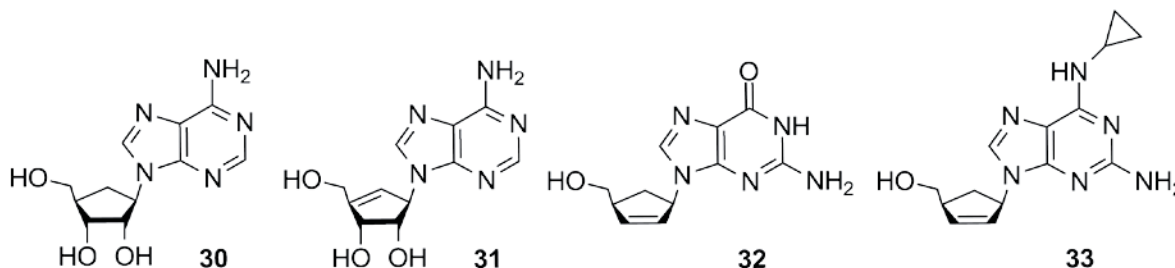


Abbildung 11: Natürlich vorkommende carbozyklische Nucleoside (Aristeromycin (**30**) und Neplanocin A (**31**)), sowie synthetische carbozyklische Vertreter (Carbovir (**32**) und Abacavir (**33**)), die als antivirale Medikamente Anwendung finden.

Eine Reihe von Medikamenten mit dem Strukturelement des Cyclopentan sind wirksame Virustatika.^[144] Von den beiden natürlich vorkommenden Verbindungen **30** und **31** wurden die beiden Virustatika Carbovir (**32**) und Abacavir (**33**) abgeleitet und synthetisiert. Beide sind potente Inhibitoren der Reversen Transkriptase des HI-Virus.^[145-146]

Es existiert eine Vielzahl an Übersichtsartikeln zur Synthese von C-Nucleosiden^[147-148] oder carbozyklischen Nucleosiden.^[149-150] So wurden in der Arbeitsgruppe von Carell carbozyklische Derivate des cHydantoins (**36**),^[151-152] α,β -cFaPydGs (**34b a/b**),^[3, 153-154] β -cFaPydAs (**35**),^[155] c8-oxodGs (**38**), cdGs (**37**) oder cImidazolons entwickelt (vgl. Abbildung 12).^[156]