

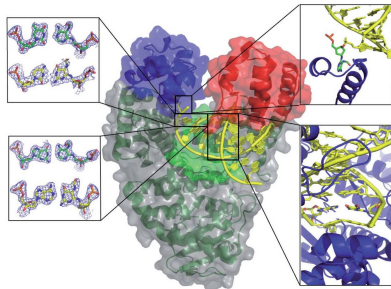


Tim Gehrke (Autor)

# 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](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Zusammenfassung .....   | IV  |
| Summary .....   | VII |
| 1 Einleitung .....  | 1   |
| 1.1 Funktion und Aufbau der DNA.....  | 1   |
| 1.2 Rückblick: Die Entdeckung der DNA.....  | 2   |
| 1.3 Ursachen von DNA-Schäden und ihre Folgen.....   | 3   |
| 1.4 Entstehung oxidativer Schäden an DNA.....   | 6   |
| 1.4.1 Oxidative DNA-Schäden des Guanosins .....   | 7   |
| 1.4.2 Oxidative DNA-Schäden des Adenosins .....   | 9   |
| 1.5 Die Schadklasse Formamidopyrimidine .....   | 10  |
| 1.5.1 Synthetischer Zugang zu den Formamidopyrimidinen .....  | 10  |
| 1.5.2 Stabilität der natürlichen Formamidopyrimidine .....  | 12  |
| 1.6 Bioisostere Analoga der Formamidopyrimidine .....   | 14  |
| 1.7 Allgemeines zur Reparatur von DNA-Schäden .....   | 16  |
| 1.7.1 Reparatur der Formamidopyrimidine in Prokaryoten .....  | 17  |
| 1.7.2 Reparatur in Eukaryoten.....  | 20  |
| 1.8 Polymerasen .....   | 21  |
| 1.8.1 Funktionsprinzip und Aufbau der Polymerase Familien.....  | 21  |
| 1.8.2 Prokaryotische Polymerasen .....  | 23  |
| 1.8.3 Wichtige Vertreter eukaryotischer Polymerasen.....  | 23  |
| 1.8.4 Polymerasen der A-Familie.....  | 24  |
| 1.8.5 Die Polymerase I des <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....                                | 25  |
| 1.8.6 Die Familie der Y-Polymerasen .....   | 28  |
| 1.9 Mutagenes Potential der Formamidopyrimidine <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....              | 31  |
| 1.10 Replikation von oxidativen Schäden: <i>high-fidelity</i> oder <i>low-fidelity</i> Polymerase ... | 33  |
| 1.11 Aufgabenstellung .....   | 35  |
| 2 Eigene Untersuchungen und Ergebnisse .....  | 37  |
| 2.1 Synthese der carbozyklischen Analoga der Formamidopyrimidine .....                                | 37  |
| 2.1.1 Synthese des carbozyklischen $\beta$ -D-2`-Desoxycyclopentylamins 49/50 .....                   | 37  |



|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1.2 | Synthese des $\beta$ -cFapydA .....   | 38 |
| 2.1.3 | <i>cis/trans</i> Konformation des $\beta$ -cFaPydA .....  | 42 |
| 2.2   | Synthese des $\beta$ -cFapydG .....   | 45 |
| 2.2.1 | Synthese des Pyrimidinons 66.....   | 45 |
| 2.2.2 | Synthese $\beta$ -cFapydG Phosphoramiditbausteins 34b .....   | 45 |
| 2.3   | Oligonukleotidsynthese .....  | 47 |
| 2.4   | Verdaustudien zu $\beta$ -cFaPydA.....  | 49 |
| 2.5   | Einzel-Nukleotid Insertionen und Primer Verlängerungsstudien .....                                    | 50 |
| 2.5.1 | Ergebnisse der Primer Extension Studien von $\beta$ -cFaPydA mit Klenow $exo^-$ .....                 | 50 |
| 2.5.2 | Ergebnisse der Primerverlängerungsstudien von $\beta$ -cFaPydA mit <i>GeoBst</i> Pol I..              | 52 |
| 2.5.3 | Replikationsverhalten von $\beta$ -cFaPydA und $\beta$ -cFaPydG mit <i>GeoBst</i> Pol I.....          | 53 |
| 2.6   | Pyrosequenzierungs-Analyse zur Quantifizierung des mutagenen Potentials der Formamidopyrimidine ..... | 54 |
| 2.6.1 | Grundlagen der Pyrosequenzierung .....  | 55 |
| 2.6.2 | Durchführung des Assays.....  | 56 |
| 2.7   | Ergebnisse der Primer Extension basierenden Pyrosequenzierung.....                                    | 57 |
| 2.7.1 | Ergebnisse mit KF <sup>-</sup> .....  | 57 |
| 2.7.2 | Ergebnisse mit <i>GeoBst</i> Pol I.....   | 59 |
| 2.7.3 | Experimente mit den <i>low-fidelity</i> Polymerasen .....   | 62 |
| 2.7.4 | Ergebnisse mit Pol $\eta$ .....   | 62 |
| 2.7.5 | Ergebnisse mit Pol $\kappa$ .....   | 64 |
| 2.7.6 | Ergebnisse mit Pol $\iota$ .....  | 65 |
| 3     | Strukturelle Analyse der Replikation der Formamidopyrimidine .....                                    | 68 |
| 3.1   | Fehlerfreie Replikation des $\beta$ -cFaPydA .....  | 68 |
| 3.2   | Strukturelle Grundlagen zur fehlerhafte Insertion von dG gegenüber $\beta$ -cFaPydA..                 | 74 |
| 3.3   | Molekulare Basis für die fehlerfreie Replikation des $\beta$ -cFaPydG .....                           | 76 |
| 3.4   | Molekulare Basis zur fehlerhaften Replikation des $\beta$ -cFaPydG .....                              | 78 |
| 3.5   | Vergleich der Replikation von $\beta$ -cFaPydG mit 8-oxodG.....                                       | 82 |
| 3.6   | Zusammenfassung der Kristallisationsstudien .....   | 84 |
| 4     | Ausblick.....   | 87 |
| 5     | Experimentalteil.....   | 89 |
| 5.1   | Biochemische Materialien und Methoden.....  | 89 |

## II



|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.2   | Transformation, Expression und Aufreinigung der Polymerase I von <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ..... | 91  |
| 5.3   | Kristallisation .....  | 95  |
| 5.4   | Einzelnukleotidinsertionen und Primerverlängerungsstudien.....   | 96  |
| 5.5   | Primerverlängerung mit anschließender Pyrosequenzierung .....  | 96  |
| 5.6   | Methoden der DNA Synthese, Entschützung und Aufreinigung .....   | 98  |
| 5.6.1 | DNA-Standardsynthese .....   | 98  |
| 5.6.2 | DNA-Synthese für die verwendeten Modifikationen.....   | 98  |
| 5.6.3 | Oligonukleotide mit der $\beta$ -cFaPydA Modifikation .....  | 99  |
| 5.6.4 | Oligonukleotide mit der $\beta$ -cFaPydG Modifikation .....  | 99  |
| 5.6.5 | 8-oxodA.....   | 100 |
| 5.6.6 | 8-oxodG.....   | 100 |
| 5.6.7 | HPLC-Chromatographie der synthetisierten Oligonukleotide.....  | 100 |
| 5.6.8 | Enzymatischer Totalverdau .....  | 102 |
| 5.7   | Röntgenstrukturdaten von DNA und Protein .....   | 102 |
| 5.8   | Material und Methoden zur organischen Synthese .....   | 103 |
| 5.8.1 | Synthese des carbozyklischen 2'-Desoxycyclopentylamins.....  | 105 |
| 5.8.2 | Synthese des $\beta$ -cFaPydA Phosphoramiditbausteins 35.....  | 111 |
| 5.8.3 | Kupplung und Synthese zum Phosphoramidit 35 .....  | 113 |
| 5.9   | Synthese des $\beta$ -cFaPydG Phosphoramidit 34b.....  | 123 |
| 5.9.1 | Synthese des heterozyklischen Pyrimidons 66.....   | 123 |
| 5.9.2 | Kupplung und Funktionalisierung.....   | 124 |
| 5.9.3 | Synthese des Phosphoramidits 34b .....   | 131 |
|       | Anhang .....   | 133 |
|       | Abkürzungsverzeichnis .....  | 142 |
|       | Literaturverzeichnis.....  | 144 |
|       | <i>Curriculum vitae</i> .....  | 169 |