

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

**Synthese eines carbozyklischen Analogons des
Formamidopyrimidin dA DNA-Schadens zur Untersuchung von
DNA-Replikations- und Reparaturprozessen**

Simone Arnold
aus
Marburg

München, 2007

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 09.01.2007

Simone Arnold

Dissertation eingereicht am: 09.01.2007

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinz Langhals

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2007

*Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden,
wo sie aufhört.*

Justus von Liebig

Meinen Eltern gewidmet.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Thomas Carell* für die interessante und vielseitige Themenstellung, seine großzügige Unterstützung während meiner Promotionszeit sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen. Das von ihm geschaffene Forschungsumfeld, sowie die Möglichkeit immer wieder an spannenden Konferenzen teilnehmen zu können, trug ebenso wie sein Engagement und Optimismus wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Herrn Prof. Dr. Heinz Langhals möchte ich mich besonders herzlich für die freundliche und schnelle Übernahme des Koreferats bedanken. Für Ihre Mitwirkung in meiner Prüfungskommission bedanke ich mich außerdem auch noch bei Herrn Prof. Dr. Franz Bracher, Herrn Prof. Dr. Manfred Heuschmann, Herrn Prof. Dr. Konstantin Karagiosoff und Herrn Prof. Dr. Hendrik Zipse.

Den Mitarbeitern der Service-Abteilungen an der Philipps-Universität Marburg und der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich für die Aufnahme meiner Kernresonanz- und Massenspektren danken.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe *Carell* danke ich für eine fantastische Zeit. Mein besonderer Dank gilt Frau *Sabine Voß* für das enthusiastische Nachsynthetisieren meiner Verbindungen, der großen Unterstützung in so mancherlei organisatorischen Bereichen und ihrer Freundschaft. Bei Herrn *Sascha Breeger* bedanke ich mich für das schnelle und gewissenhafte Korrekturlesen des Manuskripts, für den gemeinsamen Kampf gegen das Unbekannte und Unerwartete sowie seine Freundschaft. Herrn *Johannes Gierlich* danke ich für die Durchführung der Kraftfeldberechnungen und der Korrektur des selbigen Abschnitts sowie für diverse Makros und gute Gespräche. Herrn *Heiko Müller* danke ich für das kritische Korrekturlesen und die fürsorgliche Übernahme

meines Projektes. Bei Herrn *Dr. Dave Hammond* bedanke ich mich für das Korrekturlesen der *Summary*, jeglicher englischer *Abstracts* und für viele neue Vokabeln. Für die Durchführung der Fpg-Bindungsstudien mit meinem cFaPydA-Schaden bedanke ich mich bei *Andreas Glas* und *Ralf Strasser*.

Bei Frau *Slava Gärtner* bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft im bürokratischen Uni-Alltag. Frau *Dr. Maria Angeles Izquierdo Arcusa* danke ich für Salsa und eine schöne Zeit. Für viel Spaß und Ablenkungen innerhalb- und außerhalb der Universitätsmauern bedanke ich mich bei Frau *Claudia Gräf*, Herrn *Ulrich Hennecke*, Herrn *Dr. Matthias Ober*, Herrn *Dr. Martin (Ed) von Meltzer* und – insbesondere für die regelmäßige sportliche Betätigung, Updates und ihren Optimismus – danke ich Frau *Eva Bürckstümmer*. Bei Herrn *Carsten Pieck* bedanke ich mich hauptsächlich für seine offene Biochemie-Sprechstunde.

Für wertvolle Diskussionen und eine tolle Zeit danke ich den Teilnehmern der CLUSTOXDNA-Treffen (2004-2006).

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Frau *Dr. Michaela Cichon* richten, für Ihre Freundschaft und aufmunternde und zugleich motivierende Art.

Bei Herrn *Dominik Petek* bedanke ich mich für den gemeinsamen Weg, seinen Beistand während der Promotion, und dass ich durch Ihn nie den Blick für die „andere Welt“ verloren habe.

Besonders herzlich möchte ich mich auch noch bei Herrn *Dirk Scholz* für seine liebevolle Unterstützung beim Finalisieren dieser Arbeit bedanken.

Bei meiner Schwester *Kirsten Arnold* und meinem Schwager *Thomas Hofmann* bedanke ich mich besonders herzlich für immerwährende Motivation, viel Kraft und wertvolle Tipps und Diskussionen in jeder Lebenslage und für jede Lebenslage.

Der größte Dank aber gebührt meinen Eltern *Marie-Luise* und *Werner Arnold*, die mich in jeder Hinsicht immer grenzenlos und bedingungslos unterstützt haben.

Zusammenfassung	iii
Summary	v
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Oxidative Schäden	5
1.2.1 Oxidierende Reagenzien	5
1.2.2 Oxidative Schädigung von Adenin	7
1.3 Modellverbindungen zum Formamidopyrimidin	10
1.3.1 Problematik und Lösungsansätze des Formamidopyrimidin-Schadens	11
1.4 Biologische Eigenschaften	14
1.4.1 Mutagenität von FaPydA und 8-Oxo-dA	14
1.4.2 Reparatur des FaPydA -Schadens	16
2. Aufgabenstellung	20
3. Synthese	22
3.1 Synthesestrategie zum stabilisierten Formamidopyrimidin	22
3.1.1 Retrosynthese	22
3.1.2 Synthese des 4-Amino-6-chloro-5-nitropyrimidins (27)	23
3.1.3 Synthese des Cyclopentylamins (38)	25
3.1.4 Kupplung des Cyclopentylamins (38) und des Heterozyklus (27) mit anschließender TBDMS Schützung	26
3.1.5 Synthese des Formamids	27
3.1.6 Trityl-Schützung der N6-Aminogruppe des Formamids (40)	28
3.1.7 Desilylierung des Formamids (41)	28
3.1.8 DMT-Schützung der 5'-OH-Gruppe des Formamids (42)	29
3.1.9 Phosphitylierung der 3'-OH Gruppe des Formamids	30
3.2 Struktur und Rotationsbarriere der Formamidbindung von (40)	31
3.3 DNA-Festphasensynthese	38
3.4 Enzymatischer Totalverdau	45
4. Biologische Eigenschaften	47
4.1 Thermodynamische Eigenschaften	47
4.1.1 Theoretischer Hintergrund	47
4.1.2 Ergebnisse der Schmelzpunktstudien	51
4.1.3 Mögliche Fehlpaarungskonstrukte	63
4.1.4 Zusammenfassung	64

4.2 Krafffeldberechnung	65
4.2.1 Zusammenfassung	67
4.3 Replikationskinetiken	68
4.3.1 Theoretischer Hintergrund	69
4.3.2 Durchführung der <i>Primer Extension</i> mit Klenow exo-	75
4.3.3 Ergebnisse der Enzymkinetik	76
4.3.4 Zusammenfassung	82
4.4 Reparatur	83
4.4.1 Bindungsstudien von <i>LIFPG</i> mit cFaPydA	86
5. Ausblick	89
6. Experimenteller Teil	91
6.1 Material und Methoden	91
6.2 Synthese des Carbozyklus	100
6.3 Synthese von 4-Amino-6-chloro-5-nitro-pyrimidin (27)	106
6.4 cFaPydA-Synthese	109
6.5 Festphasensynthese	122
6.5.1 Synthese	122
6.5.1.1 Oligonukleotidsynthese mit Standardphosphoramiditen	122
6.5.1.2 Oligonukleotidsynthese mit Spezialphosphoramiditen	123
6.5.2 Entschützung und Reinigung	125
6.5.2.1 Entschützung und Reinigung von cFaPydA enthaltender DNA	125
6.5.2.2 Entschützung und Reinigung von 8-Oxo-dA enthaltender DNA	129
6.6 Thermodynamische Daten	130
6.6.1 Physikalische Größen des cFaPydA und 8-Oxo-dA	130
6.7 <i>Primer extension</i> Studien	131
7. Abkürzungen	134
8. Literaturverzeichnis	140

Zusammenfassung

Die Anhäufung von DNA-Schäden kann für die Entstehung von Krankheiten wie Krebs oder auch die Alterung verantwortlich gemacht werden. Der 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin-Schaden **1**, der sich aus dem 2'-Desoxyadenosin bildet, ist neben dem 8-Oxo-dA **2** einer der häufigsten vom dA abgeleiteten Schäden, die nach oxidativer Belastung in Zellen gefunden werden. Beide Schäden werden hierbei aus demselben Intermediat gebildet.

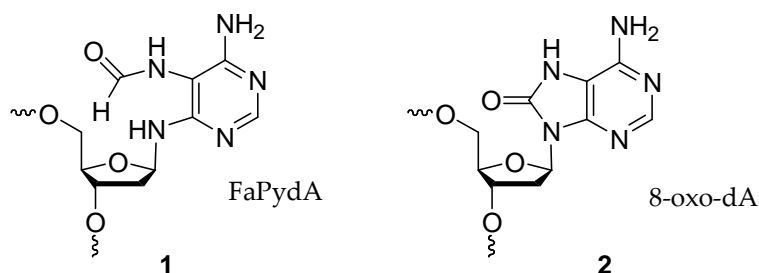


Abbildung 1: FaPydA (1) und 8-Oxo-dA (2) Schaden.

Um die biologische Relevanz dieser Schäden besser studieren zu können, ist es wichtig, die spezifischen Schäden an definierter Stelle in Oligonukleotide in einer eindeutigen Konfiguration einzubauen. In diesem Zusammenhang wurde ein gegenüber Anomerisierung stabilisiertes, carbozyklisches FaPydA-Analogon in β -Konfiguration synthetisiert und über Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut.

Die thermodynamische Stabilität von *c*FaPydA und 8-Oxo-dA enthaltender DNA gegenüber den vier verschiedenen Basen wurde mit Hilfe von *van't Hoff*-Experimenten durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden unterschiedliche DNA-Sequenzen untersucht, um ein sequenzabhängiges Paarungsverhalten der beiden Schäden näher zu untersuchen.

Um einen direkten Vergleich der Energiezustände der *syn-/ anti*-Konformationen des carbozyklischen und des natürlichen FaPydA-Schadens zu erhalten und die speziellen Paarungseigenschaften besser zu verstehen, wurden computer-gestützte Berechnungen in der Gasphase durchgeführt.

Das spezielle Replikationsverhalten von *c*FaPydA und 8-Oxo-dA wurde durch kinetische *Primer extension* Studien mit Klenow *exo⁻* untersucht. Im Fall des *c*FaPydA konnte die Polymerase zwar alle vier Basen gegenüber dem Schaden einbauen, doch war die Inkorporationsgeschwindigkeit im Vergleich zum ungeschädigten Strang deutlich verringert.

Das carbozyklische FaPydA-Analogon ist für die Aufklärung von Reparaturmechanismen besonders gut geeignet, da es von einer intakten Glykosylase, nicht durch Spaltung der glykosidischen Bindung repariert werden kann. In Zusammenarbeit mit *B. Castaing* (*Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans Cedex*) wurden deshalb Kristallisationsstudien mit *c*FaPydA enthaltenden Oligonukleotiden und Fpg gestartet, um die speziellen Reparatur- und Erkennungsmechanismen besser zu verstehen.

Summary

Oxidative stress leads to a variety of base lesions, which are often cytotoxic or mutagenic. The accumulation of lesions in DNA may be responsible for the onset of diseases such as cancer and may also influence aging. The 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine lesion (FaPydA) **1** formed from 2'-deoxyadenosine belongs, along with the 8-oxopurine (8-Oxo-dA) **2** lesion, to the most frequent DNA lesions found in cells after oxidative stress. Both lesions are formed in competition from a common intermediate.

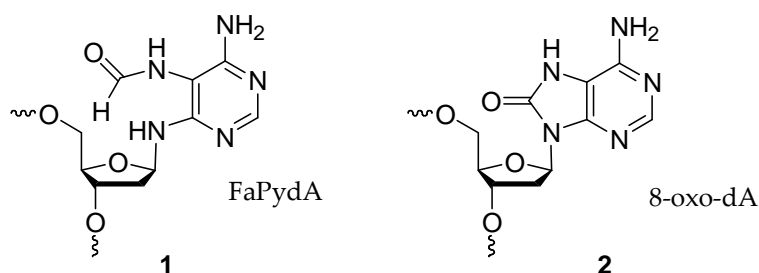


Figure 1: FaPydA (1) und 8-Oxo-dA (2) lesion.

In order to study the biological relevance of this lesion, it is important to incorporate it into oligonucleotides at a defined location and in an unequivocal conformation. In this context the carbocyclic analogue of the FaPydA as the β -nucleoside was successfully synthesized and incorporated into oligonucleotides by using automated solid-phase synthesis.

The thermodynamic stability of DNA comprising *c*FaPydA and 8-Oxo-dA lesions opposite all four DNA bases was investigated by *van't Hoff* experiments. In this context, different DNA sequences were used to examine the sequence-dependent base pairing properties of both lesions.

Computational studies for the comparison of the *syn-/anti*-conformation of the carbocyclic analogue with the natural lesion were also carried out.

The special replication behaviour of *c*FaPydA and 8-Oxo-dA was determined by kinetic primer extension studies with Klenow exo⁻. In case of *c*FaPydA, it was shown that the enzyme was able to incorporate the four bases opposite the lesion, but with lower velocity in comparison to undamaged DNA.

The carbocyclic analogue of the natural lesion is also suitable to study enzymatic repair mechanisms, as it cannot be cleaved by glycosylases. In collaboration with *B. Castaing* (*Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans Cedex*), we have started co-crystallization studies with oligonucleotides comprising carbocyclic FaPydA and Fpg complexes to understand the special repair- and recognition mechanism of this enzyme.

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Die auf unserer Erde existierenden Lebensformen besitzen allesamt doppelsträngige DNA, welche als genetische Informationsquelle fungiert, und somit sämtliche Informationen sichert, die zum Erhalt des Lebens notwendig sind. Die Codierung beruht auf der Abfolge der vier Nukleobasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Die Basen sind innerhalb eines DNA-Einzelstrangs untereinander über ein Zucker-Phosphat-Rückgrat miteinander verbunden. Die Paarung mit der im gegenüberliegenden DNA-Strang befindlichen Base erfolgt sehr spezifisch nach dem Prinzip der Basenkomplementarität^[1] im *Watson-Crick* Modus.^[2] Die DNA codiert durch ihre Basensequenz die Aminosäuresequenz der Proteine. Die Vielfalt der durch die 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebauten Proteine übt eine Vielzahl von Funktionen aus, die von strukturellen und regulatorischen Funktionen bis hin zur Aufrechterhaltung und Weitergabe genetischer Informationen reichen. Das Bindeglied im Informationsfluss von der DNA zum Protein ist die RNA (Transkription), welche aus einer zur DNA komplementären Basensequenz besteht.^[3, 4, 1]

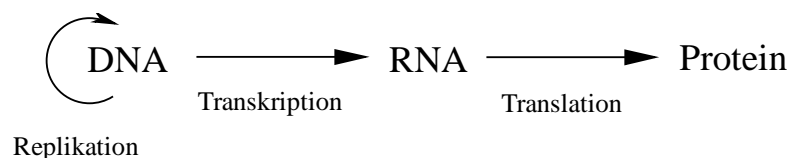


Abbildung 2: Fluss der genetischen Information.

Die Basensequenz der RNA wird dann in die korrespondierende Peptid-Sequenz von Aminosäuren am Ribosom translatiert. Dieses als das „zentrale Dogma der Molekularbiologie“ bezeichnete Schema, wurde 1958 von *F. Crick* aufgestellt.

Obwohl *F. Miescher* schon 1869 DNA isolierte,^[5] wurde bis in die 1940er Jahre angenommen, dass die Proteine - in ihrer Komplexität – die Grundlage für die Speicherung des Erbmaterials sind. Doch die 1944 von *O. Avery, C. MacLeod* und *M. McCarty* gelieferten Ergebnisse zeigten, dass DNA Erbinformationen weitergab, da ein nicht pathogener Stamm durch DNA in einen virulenten Stamm transformiert wurde.^[6]

Beeinflusst von *Averys* Ergebnissen gelang es *E. Chargaff*, die nach ihm benannten Regeln über die Basenkomplementarität aufzustellen.^[1, 3] Basierend auf diesen Ergebnissen gelang es *J. Watson* und *F. Crick* 1953, die helikale Struktur der doppelsträngigen DNA aufzuklären und den Mechanismus der Vererbung (Replikation) zu verstehen.^[2] Bei der Zellteilung dient jeder DNA-Strang als Matrize für die Synthese eines komplementären Tochterstrangs, welcher über die schrittweise durchgeführte Polymerisation der Nukleotide synthetisiert wird. Hierbei paaren die neu eingeführten Nukleotide spezifisch mit den Basen des Elternstrangs.

Nukleotide sind Purin- bzw. Pyrimidin-Heterocyclen, die *N*-glykosidisch an eine Desoxyribofuranose gebunden sind, welche zumindest eine Phosphatgruppe trägt.

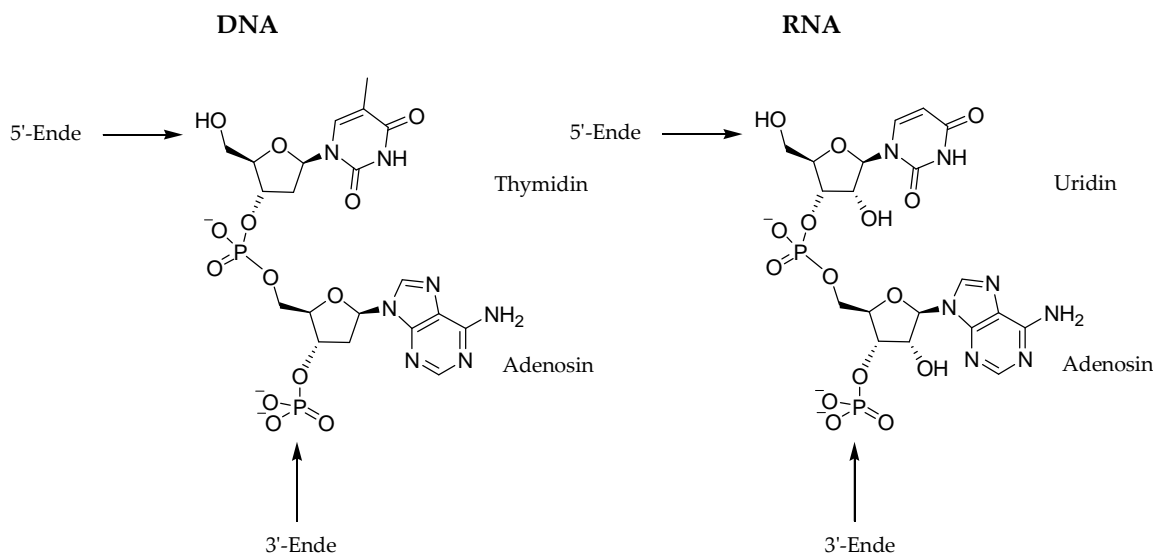


Abbildung 3: Struktur von Nukleinsäuren in DNA und RNA.

Die in DNA und RNA vorkommenden Purinbasen sind Adenin (A) und Guanin (G); die Pyrimidinbasen sind Cytosin (C), Uracil (U) und Thymin (T) (siehe Abb. 4).

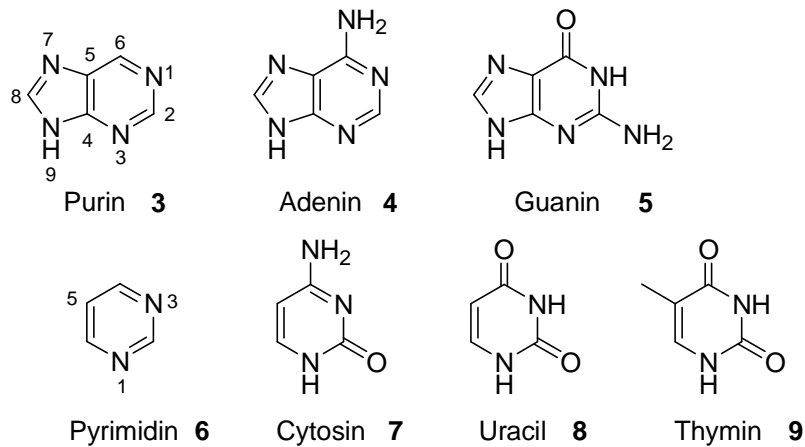


Abbildung 4: Die in DNA und RNA vorkommenden Stickstoffbasen.

Da DNA und RNA fragile Makromoleküle sind, lassen sie sich durch chemische und physikalische (γ - und UV-Strahlung) Einflüsse¹ ebenso leicht verändern wie auch durch Einflüsse endogenen Ursprungs, zum Beispiel fehlerhaft arbeitende Replikations- bzw. Reparaturenzyme. Aber auch innerhalb des Zellmetabolismus können reaktive Agentien (z.B. Hydroxylradikale) entstehen und die DNA schädigen, indem sie das Zucker-Phosphat-Rückgrat oder die Basen angreifen. Schätzungen haben ergeben, dass an einem Tag in einer einzelnen menschlichen Zelle 10^4 - 10^6 DNA-Schädigungsereignisse stattfinden. [7]

¹ Diese Einflüsse sind exogenen Ursprungs.

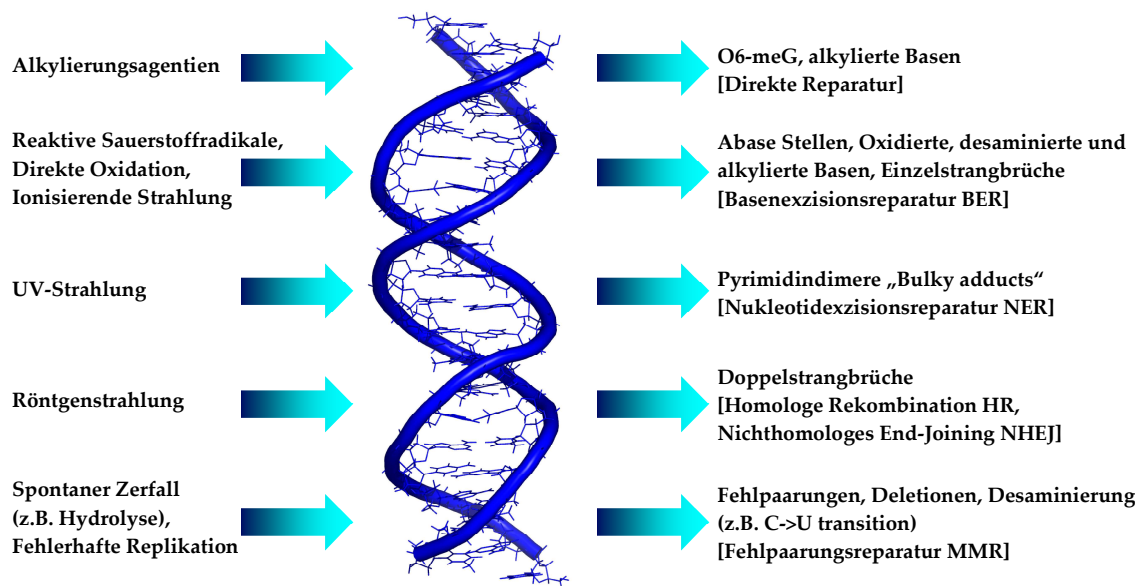


Abbildung 5: Häufigste DNA-schädigende Agentien, Läsionen und Reparaturpfade.

Beim Auftreten von DNA-Schäden gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Zellantwort. Zum einen können bestimmte DNA-Schäden Mutationen auslösen.^[8-10] Diese haben in vielen Fällen Auswirkungen wie Krebs, Erbkrankheiten oder Alterung zur Folge und führen nicht selten auch zum Zelltod (Apoptose).^[11] Zum anderen können DNA-Schäden aber auch durch spezielle Reparaturmechanismen und die zugehörigen Reparaturenzyme effektiv beseitigt werden und somit die genomische Integrität bewahrt werden.^[12, 7, 13-17] [18]

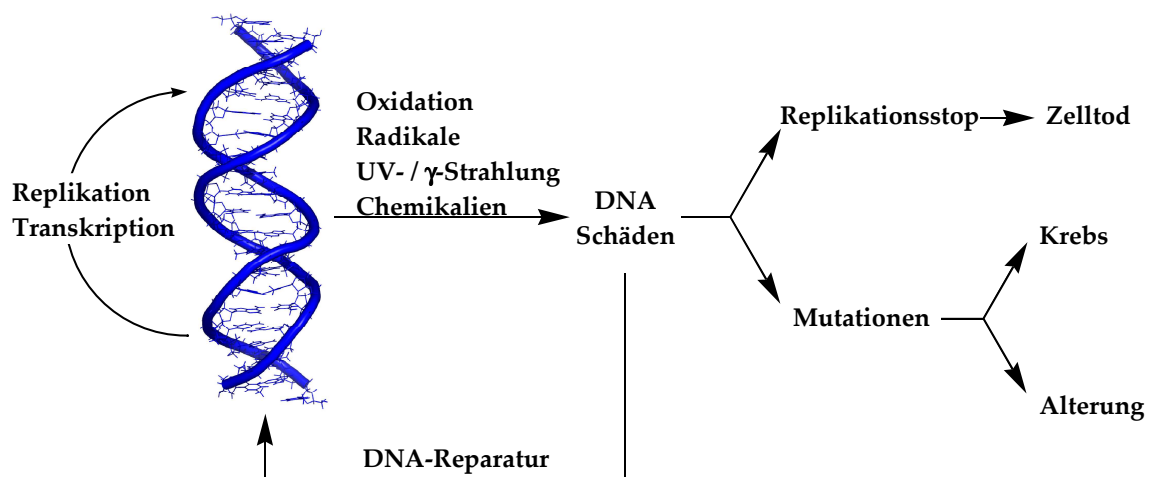


Abbildung 6: Reaktionen auf DNA-Schäden und deren Folgen.

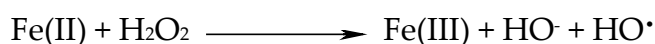
1.2 Oxidative Schäden^[19]

Die Schädigung der DNA durch oxidative Reagenzien ist einer der häufigsten Prozesse. Bis zum heutigen Tag konnten mehr als 50 verschiedene oxidative Schäden identifiziert werden. Die durch Oxidation erzeugten Schäden sind zum Beispiel abasische Stellen, modifizierte Basen, Einzelstrangbrüche und DNA-DNA- sowie DNA-Protein-*crosslinks* (siehe Abb. 5).^[7, 20] Es gibt eine Vielzahl von „Reaktiven Sauerstoff Spezies“ (ROS), welche sowohl aus endogener als auch aus exogener Quelle gebildet werden.

1.2.1 Oxidierende Reagenzien

Die am häufigsten vorkommenden ROS sind Hydroxylradikale (OH[•]), Singulett-Sauerstoff (¹O₂), Ozon (O₃), und Peroxonitrit (ONOO[•]). Die Hydroxylradikale gelten hierbei als die reaktivste und somit gefährlichste Sauerstoffspezies.

Hydroxylradikale können auf mehreren Wegen (endogen wie auch exogen) gebildet werden. Ein Beispiel für den endogenen Ursprung ist die Erzeugung von Hydroxylradikalen während der zellulären Atmung in den Mitochondrien. Innerhalb der Atmungskette können OH-Radikale aus dem bei der Zellatmung als Nebenprodukt entstehenden Wasserstoffperoxid durch die Eisen(II)-katalysierte *Fenton*-Reaktion gebildet werden.



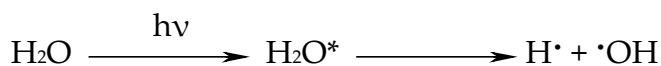
Bei dieser Reaktion wird Wasserstoffperoxid durch Reduktion in ein Hydroxylradikal und ein Hydroxidion umgewandelt, wobei Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert wird. Diese Art der Hydroxylradikal-Erzeugung lässt sich auch in Gegenwart anderer Übergangsmetalle und Wasserstoffperoxid vollziehen.^[21]

Ein weiteres Beispiel endogenen Ursprungs ist die Bildung von OH-Radikalen während eines Herzinfarkts oder Gehirnschlags. Die hier gebildeten OH-Radikale führen zumeist zu Gewebenekrose.^[22]

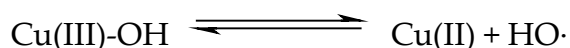
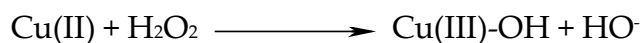
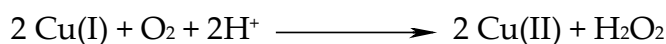
Exogenen Ursprungs sind zum Beispiel die durch ionisierende Röntgenstrahlung (γ -Strahlen) erzeugten Hydroxylradikale. DNA kann zum einen direkt durch Absorption der Strahlung geschädigt werden, oder alternativ durch die durch Photolyse von Wasser gebildeten Hydroxylradikale. Bei der Wasserionisierung gibt es zwei mögliche Mechanismen der Hydroxylradikal-Erzeugung. Im ersten Fall werden zunächst $\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$ -Radikale und solvatisierte Elektronen e^-_{aq} erzeugt. In einer zweiten, schnellen Reaktion bildet sich schließlich durch Protonenübertragung des $\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$ -Radikals auf ein Wassermolekül $\cdot\text{OH}$ und H_3O^+ .



Die zweite Möglichkeit der Wasserionisierung berücksichtigt die direkte Anregung des Wassermoleküls mit sich anschließender Homolyse zum Wasserstoff- und Hydroxylradikal.^[23]

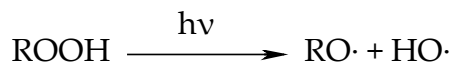


Aber auch durch Kupfer(I)-Katalyse wird die Bildung von HO-Radikalen an der Luft herbeigeführt. Bei dieser Reaktionskaskade reagiert Cu(II) mit dem aus Cu (I) und Luft (O_2) gebildeten Wasserstoffperoxid zu Cu(III)-OH, welches in einem sich anschließenden Schritt zu Cu(II) und einem OH-Radikal zerfällt.



Unbeantwortet ist allerdings die Frage, ob es sich hierbei um das freie OH-Radikal handelt, oder doch eher um eine metallgebundene Spezies, die entweder in einem höhervalenten $M^{n+1}\text{-OH-}$ oder im deprotonierten Zustand $M^{n+2}=\text{O}$ auftritt.^[19]

Durch die Einwirkung von UV-Licht können ebenfalls OH-Radikale durch photolytische Spaltung von Hydroperoxiden gebildet werden.^[19, 24]



1.2.2 Oxidative Schädigung von Adenin

Die Anzahl der oxidativen Schäden des Adenins ist deutlich geringer als im Fall des Guanins. Der Grund hierfür ist, dass zum einen das Oxidieren von dA im Vergleich zum dG weitaus schlechter abläuft und zum Anderen, dass auch ein Weiteroxidieren des 8-Oxo-dA, wie es im Fall des 8-Oxo-dG auftritt, derweilen noch nicht beobachtet wurde. Bekannt sind die aus dA gebildeten häufigen Schäden FaPydA und 8-Oxo-dA, das 2'-Deoxyinosin und die, in weitaus geringeren Mengen vorkommenden, 2-Hydroxy-2'-desoxyadenosin- und 5',8-Cyclo-2'-desoxyadenosin-Schäden.

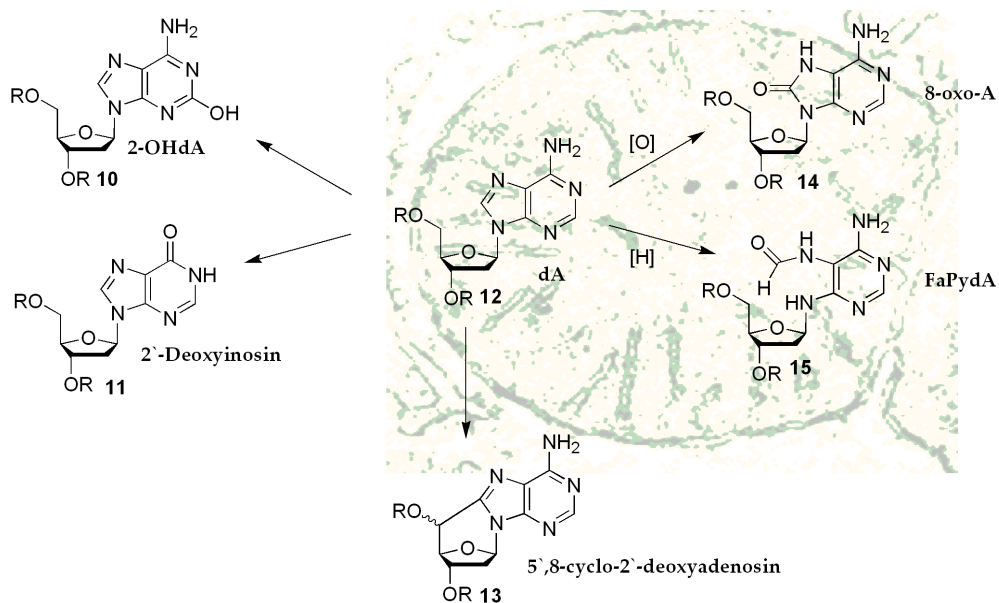
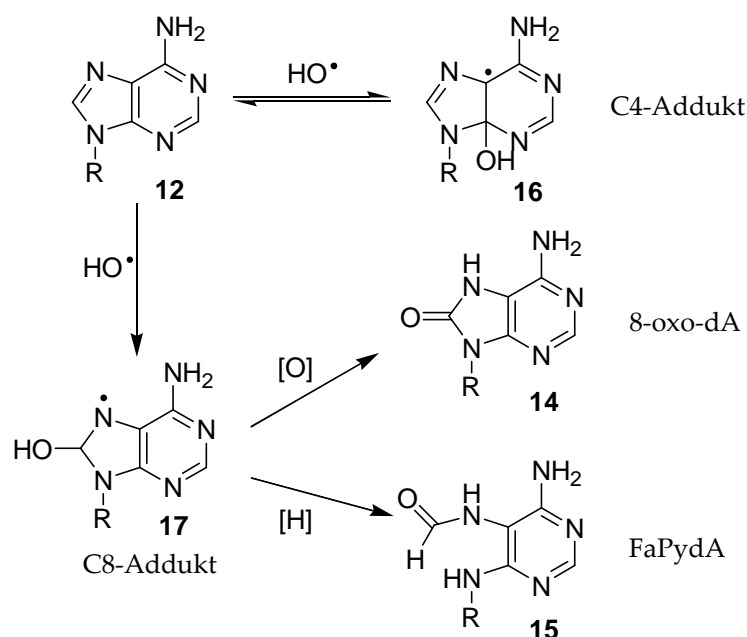


Abbildung 7: Oxidative Schäden des 2'-Desoxyadenosins.

Die oxidative Schädigung von Desoxyadenosin in DNA führt, je nachdem ob reduktive oder oxidative Bedingungen vorliegen, zu den beiden DNA-Schäden FaPydA oder 8-Oxo-dA (Schema 1). Beide Schäden werden ausgehend von demselben Intermediat, dem C8-Addukt, gebildet.



Schema 1: Bildung der beiden Oxidationsprodukte FaPydA und 8-Oxo-dA.

Der Mechanismus der oxidativen Schädigung des Adenins ist noch nicht vollständig geklärt, doch wird angenommen, dass die Schädigung ähnlich wie beim Guanin erfolgt. Der Schlüsselschritt bei der Oxidation durch Hydroxylradikale ist die Bildung der C4- und der C8-Addukte. Das C4-Addukt ist relativ instabil und steht im Gleichgewicht mit dem Edukt, während die Bildung des C8-Addukts irreversibel verläuft. Vom C8-Addukt ausgehend werden das 8-Oxo-dA und das FaPydA gebildet. Hierbei entsteht 8-Oxo-dA durch Einelektronenoxidation und FaPydA durch Reduktion und anschließende Hydrolyse.^[25] In der Reihe der oxidativen Adenin-Schäden sind diese beiden Schäden diejenigen, die hauptsächlich entstehen. Im engeren Sinn ist FaPydA kein oxidativer Schaden sondern ein Hydrolyseprodukt. Dennoch wurde dieser Schaden, aufgrund des ersten oxidativen Schritts, in die Gruppe der oxidativen

Schäden eingruppiert und wird in der Literatur unter diesem Stichwort geführt. Weitere oxidative Adenin-Schäden, welche allerdings in sehr geringen Mengen durch oxidativen Stress erzeugt werden, sind der 2-Hydroxy-2'-desoxyadenosin-Schaden^[26], das 5',8-Cyclo-2'-desoxyadenosin^[27, 28] und auch das 2'-Desoxyinosin² (Abb. 7).

Biochemische *in vitro* Studien deuten an, dass der weniger häufig auftretende 2-Hydroxy-2'-desoxyadenosin-Schaden (2-OH-dA) als mutagen einzustufen ist.^[26] Im Fall des 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosin variieren die biochemischen Eigenschaften je nachdem welches Diastereomer³ betrachtet wird.

Bei den beiden Hauptschäden, dem FaPydA und dem 8-Oxo-dA, wurde *in vivo* gezeigt, dass die Radiolyse von Chromatin unter sauerstoffarmen Bedingungen eine größere Menge an FaPydA im Vergleich zum 8-Oxo-dA liefert, während die beiden jeweiligen oxidativen Schäden von Desoxyguanosin (FaPydG und 8-Oxo-dG) in vergleichbaren Ausbeuten produziert wurden.^[29, 30]

Nach dem Guanin ist das Adenin die zweithäufigste Base, die oxidativ geschädigt wird. Dies ist auf die Redoxpotentiale der beiden Basen zurück zuführen.^[31-33]

Base	E° [V vs. NHE]	pH
dA	1.42	7
dG	1.29	7
dC	1.6	7
dT	1.7	7

In bezug auf die Normalwasserstoffelektrode besitzt das Adenin mit 1.42 V das zweitniedrigste Oxidationspotential der vier Basen.^[34] Guanin besitzt mit 1.29 V das niedrigste Oxidationspotential. Die oxidative Schädigung der zwei Basen Cytosin (1.6 V) und Thymin (1.7 V) ist wesentlich langsamer. Im Gegensatz zum

² Unveröffentlichte Ergebnisse von *Jean Cadet*, CEA/Grenoble, Frankreich.

³ Während der γ -Bestrahlung entsteht ein Diastereomerenmisch des Cyclo-Schadens.

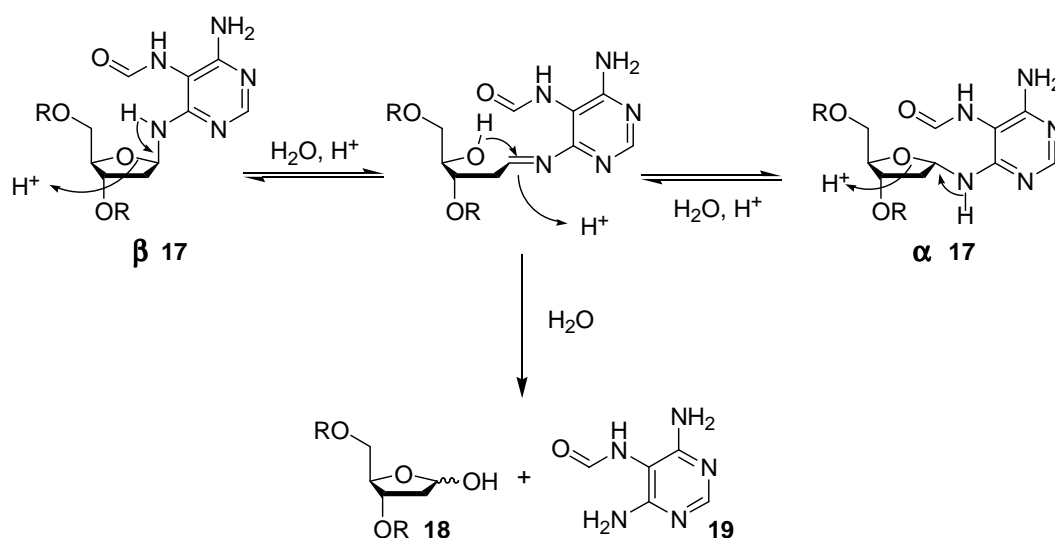
8-Oxo-dG, welches äußerst empfindlich gegenüber einer Weiteroxidation ist, sind im Fall des 8-Oxo-dA weitere Oxidationprodukte nicht bekannt, obwohl 8-Oxo-dA ein niedrigeres Redoxpotential als Adenin aufweist.^[35]

1.3 Modellverbindungen zum Formamidopyrimidin

Zur Untersuchung des speziellen Verhaltens häufig vorkommender DNA-Schäden, ist deren Herstellung zum einen in einer strukturell eindeutigen Konfiguration und zum anderen in größeren Mengen notwendig. Die Erzeugung von Formamidopyrimidin-Schäden wurden schon 1971 von *van Hemmen*^[36] durch direkte γ -Bestrahlung in einer sauerstofffreien, wässrigen Lösung sowohl für das Adenin als auch für die Desoxyverbindung durchgeführt. Das so in mäßigen Ausbeuten herzustellende Formamidopyrimidin isomerisiert sehr leicht, so dass neben dem α -, β -Gemisch auch ein Gemisch aus einem Furanosyl- bzw. Pyranosyl-FaPydA entsteht. Mit diesem FaPydA-Gemisch war *Cadet* 1995 dennoch in der Lage, die ersten NMR-Messungen durchzuführen.^[37] Der Einbau in DNA oder detaillierte biochemische Messungen waren allerdings nicht möglich. Aber auch das direkte Bestrahlen von DNA zur Erzeugung des FaPydA-Schadens erwies sich als problematisch, da in diesem Fall die Schäden zufallsmäßig erzeugt wurden.^[38, 30] Es bestand somit die Gefahr, dass neben dem eigentlich zu untersuchenden Schaden eine Vielzahl von weiteren oxidativen Schäden erzeugt wird. Neben diesen Verfahren wurden auch die *N7*-methylierten Analoga vom FaPydA-Schaden (MeFaPydA), welche durch vorhergehende Methylierung an der *N7*-Position des Adenins und anschließende hydrolytische Ringöffnung erzeugt wurden, für biochemische Untersuchungen herangezogen. Unsicher ist bei dieser Modellverbindung, ob das veränderte Wasserstoffbrücken-Muster das dieses Analoga besitzt, repräsentative Ergebnisse liefert.^[39]

1.3.1 Problematik und Lösungsansätze des Formamidopyrimidin-Schadens

Damit ein einzelner FaPydA-Schaden in einer definierten Sequenz untersucht werden kann, ist der Einbau des synthetisch hergestellten Schadens mittels Festphasensynthese die am besten geeignete Methode. Mit dieser Methode kann der Schaden zum einen in einer genau definierten Sequenz eingebaut werden, und zum anderen ermöglicht diese Methodik die Herstellung größerer Mengen an DNA. Der Einbau des Formamidopyrimidin-Schadens in DNA gelang bisher, infolge von Anomerisierung, immer nur als ein α -, β -Gemisch.^[40, 41] Das Formamidopyrimidin liegt als *N*, *O*-Acetal im Gleichgewicht mit der offenkettigen Iminform vor, und trägt somit am C1' keinerlei Stereoinformation mehr (Schema 2).



Schema 2: Anomerisierung und Deglykosylierung von FaPydA.

Da die DNA-Synthese unter protischen Bedingungen durchgeführt wird, stellt sich immer wieder rasch dieses Gleichgewicht zwischen dem α - und dem β -Anomer ein.^[42] Epimerisierungs- und Deglykosylierungsstudien der Greenberg Gruppe verdeutlichten, dass das Gleichgewicht der Epimerisierung zwar leicht zu Gunsten des β -Formamidopyrimidinderivats verschoben ist, sich dieses Gleichgewicht (1.3 β -Anomer:1 α -Anomer) bei 25°C allerdings auch in weniger als

6 h einstellt. Die Deglykosylierungsstudien zeigten, dass die Halbwertszeit der Deglykosylierung von FaPydA bei 37°C ungefähr 103 h beträgt und um den Faktor 25 schneller vollzogen wird als im Fall des FaPydG.^[41]

Um die glykosidische Bindung zu stabilisieren und den Schaden in einer strukturell-eindeutigen Konfiguration einbauen zu können, wurden bisher unterschiedliche Strategien in der Arbeitsgruppe *Carell* und auch in der Literatur beschrieben und auch umgesetzt:

1) Alkylierung/Acylierung des glykosidischen, sekundären Amins

Durch Alkylierung oder Acylierung der glykosidischen Aminogruppe könnte die Anomerisierungsreaktion verhindert werden. Dieser Ansatz wurde von *L.T. Burgdorf* anhand des FaPydG leider erfolglos verfolgt. Die durch den stark elektronenziehenden Effekt des Heterozyklus nur geringe Nukleophilie des Stickstoffs verhinderte die Alkylierung bzw. Acylierung.^[43]

In der Literatur sind die methylierten Formamidopyrimidin-Analoga allerdings oft beschrieben. Fraglich ist in diesem Punkt, ob die von den Methyl-Analoga gelieferten Ergebnisse repräsentativ für den unmethylierten Schaden sind.^[39]

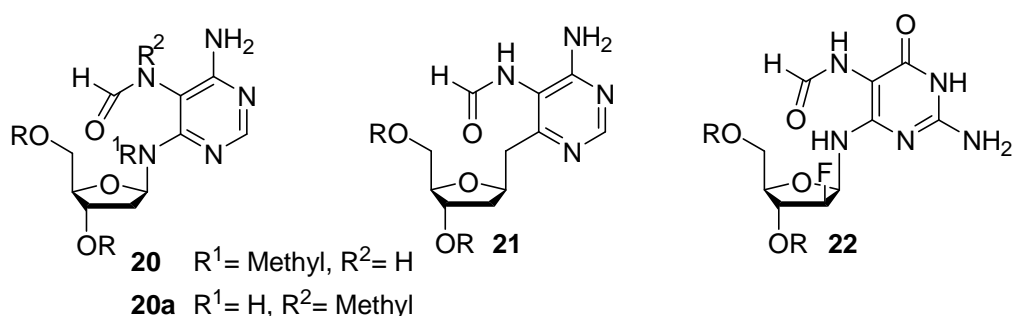


Abbildung 8: Alkyliertes Analogon (20), β -Methylen-FaPydA-Derivat von *Haraguchi* (21), und C2'-fluoriertes FaPydG-Analoga (22).

Von *Haraguchi et al.* wurde ein β -FaPydA-Derivat **21** synthetisiert (Abb. 8), bei dem die Stabilität gesteigert werden konnte, in dem die glykosidische

Aminogruppe durch eine Methylengruppe ersetzt wurde.^[40] Allerdings wird die Substitution der glykosidischen Bindung Auswirkungen auf die elektronischen Eigenschaften des Heterozyklus haben. Durch die Substitution verändert sich auch die Geometrie da man ein sp^2 -hybridisiertes sekundäres Amin durch eine sp^3 -hybridisierte Methylengruppe ersetzt, welche darüber hinaus auch nicht mehr in der Lage ist, Wasserstoffbrückenbindungen auszuüben. Da die Bedeutung dieser Wasserstoffbrücke noch nicht im Einzelnen geklärt ist, führt auch dieses Modell hier zu offenen Fragen bezüglich der erhaltenen Ergebnisse.

2) Stabilisierung durch stark elektronenziehende Substituenten an C2'

Die Einführung eines stark elektronenziehenden Substituenten am C2' (Abb. 8) wurde ebenfalls zur Stabilisierung der glykosidischen Bindung versucht. Die Idee hierbei war, aufgrund der verringerten Elektronendichte am anomeren Zentrum, die Bildung der offenkettigen, Imin-Form zu erschweren.^[44] Bisher wurde versucht, ein C2'-Fluor-substituiertes Analogon des FaPydG-Schadens **22** zu synthetisieren.^[45] Diese Strategie wurde jedoch aufgegeben, da Fluor einen großen Einfluss auf die Konformation der Desoxyribose (Zucker-*pucker*) ausübt. Die C2'-Fluorierung eines Thymidins verursacht, dass die Desoxyriboseeinheit in der *Nord*-Konformation vorliegt.^[46]

3) Ersatz der Desoxyriboseeinheit durch Cyclopentan

Durch die Substitution der Desoxyribose mit dem Cyclopentan **24** (Abb. 9) kann ebenfalls die Anomerisierungsreaktion unterdrückt werden.

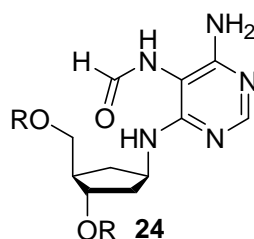


Abbildung 9: Carbozyklisches FaPydA-Derivat.

Carbozyklische Analoga von Nukleotiden erzeugen in DNA kaum strukturelle Veränderungen. DNA, welche die entsprechenden Adenosin- und Thymidin-Analoga enthielt, zeigte eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit natürlicher DNA (B-DNA-Struktur).^[47-50] Bei der Messung von Schmelzpunkten mit den entsprechenden carbozyklischen Adenosin-Analoga konnten kaum Abweichungen festgestellt werden. Dies führt zu der Annahme, dass die durch den Carbozyklus stabilisierten Schäden sowohl für strukturelle Untersuchungen⁴ (Cokristallstrukturen mit Reparaturenzymen) als auch für Paarungsstudien repräsentative Ergebnisse liefern sollten.^[51, 52]

Des Weiteren ist der von *Dominguez* und *Cullis* entwickelte^[53] und von *Ober*^[45] ausgearbeitete, fünfstufige Syntheseweg zum carbozyklischen Analogon des 1- β -Cyclopentylamin **28** leicht im Grammmaßstab durchführbar.

1.4 Biologische Eigenschaften

1.4.1 Mutagenität von FaPydA und 8-Oxo-dA

Die biologischen Auswirkungen von oxidativen Schäden können zum einen mit unterschiedlichen Methoden und zum anderen an unterschiedlichen Systemen untersucht werden. Die Vielfalt der Untersuchungsmethoden spiegelt sich in den zumeist breit gestreuten und unterschiedlichen Ergebnissen wider.

Anhand früherer Studien von zufällig erzeugten oxidativen Schäden in *E. coli* oder auch mit *N7*-methylierten Analoga, wurde eine Fehlpaarung von FaPydA mit dC vorgeschlagen, wobei der Schaden in diesem Fall in einer *syn* Konformation vorliegen sollte. Obwohl das Wasserstoffbrückenmuster, das von dem MeFaPydA-Schaden ausgeht, nicht im Einklang mit dem des natürlichen Schadens steht, wurde in beiden Fällen die Paarung mit dC postuliert.^[38, 39] Spätere

⁴ Das carbozyklische Analogon ist besonders für die strukturellen Untersuchungen mit Reparaturenzymen geeignet, da in diesem Fall das intakte Enzym nicht die glykosidische Bindung spalten kann, und somit den Schaden in der aktiven Tasche zeigt.

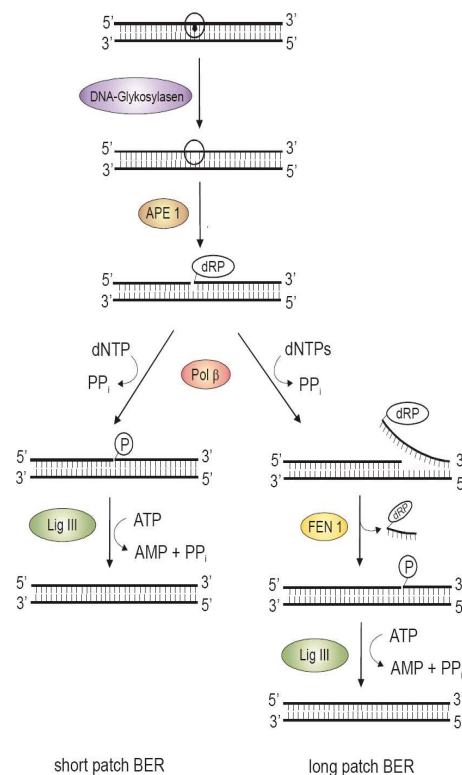
von *Greenberg* durchgeführte Polymerasestudien (Klenow *exo*⁻) mit einem α , β -Gemisch zeigten, dass der Einbau von dT am stärksten begünstigt wurde, der Einbau von dA und dG aber ebenfalls stattfand. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen erzielte *Haraguchi* mit seinem β -C-Analogon (Klenow *exo*⁻) deutlich schlechtere Inkorporationseffizienzen, wobei die Inkorporation von dT allen anderen Nukleotiden gegenüber bevorzugt wurde.^[54]

Die im Jahr 2003 von *Tudek* veröffentlichten Polymerasestudien mit durch *Fenton* Reaktion erzeugten FaPy-Schäden deutete eine Sequenzabhängigkeit der Paarung des FaPydA-Schadens an. Während FaPydA in Poly-dA-Sequenzen keine Inhibierung verursachte (T7 DNA-Polymerase, Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I und Pol β), verstärkte sich diese zunehmend in Gegenwart von Cytosin und Thymin. Die stärkste inhibierende Wirkung zeigte FaPydA in Adenin- und Guanin-reichen Sequenzen.^[55, 39] Im Fall des 8-Oxo-dA-Schadens wurde ebenfalls ein polymerasen- und sequenzabhängiges Verhalten festgestellt. In Abhängigkeit von den gewählten experimentellen Bedingungen konnten zwar *mismatch*-Paarungen mit dG und dC detektiert werden, doch zeigte sich in aktuelleren Arbeiten, dass die Mutagenität von 8-Oxo-dA im Vergleich zum 8-Oxo-dG erheblich niedriger liegt (~Faktor 4 kleiner).^[56] In Abhängigkeit von den verwendeten Polymerasen und Sequenzen ist die Möglichkeit der Fehlpaarung zwar gegeben, spielt allerdings eine eher untergeordnete Rolle in der zellulären Mutagenitätsanhäufung, da sowohl bei den thermodynamischen- als auch bei den Polymerasestudien eine starke Bevorzugung der 8-Oxo-dA:dT Paarung entdeckt wurde.^[57, 56, 58-60] Eine kürzlich veröffentlichte *in vivo* Mutagenitätsstudie bestätigt die geringere Mutagenitätsrate von 8-Oxo-dA, aber auch von FaPydA. In dieser ersten *in vivo* Studie mit Zellen aus Affenieren konnte lediglich unter 1% A \rightarrow C *Transversion* detektiert werden. Die Studie dokumentiert das eindeutig geringere Mutagenitätspotential von FaPydA und 8-Oxo-dA im Vergleich zu den entsprechenden Guanin-Schäden. Weiterhin wird durch die starke Abhängigkeit

der Ergebnisse von den verwendeten Systemen klar veranschaulicht, das es einen gesteigerten Bedarf an Aufklärung gibt.^[61]

1.4.2 Reparatur des FaPydA-Schadens

Zur Erhaltung der genomischen Integrität sind wirkungsvolle Reparaturmechanismen von besonderer Bedeutung.^[15, 7, 62] Der für die oxidativen Schäden ausschlaggebende Reparaturmechanismus ist der Weg der Basenexzisionsreparatur (BER).^[7, 12, 63] Die für diesen Mechanismus spezialisierten Enzyme sind die Glykosylasen, die mittlerweile zu den mit am besten untersuchten Reparaturenzymen gehören. Die Glykosylasen sind sehr schadensspezifische Enzyme, von denen bisher insgesamt 8 prokaryotische, 6 eukaryotische aus Hefe, und 9 humane Vertreter geklont und charakterisiert wurden.^[64]



Schema 3: Schematische Darstellung der Basenexzisionsreparatur.^[65]

Prinzipiell gibt es zwei Arten von DNA-Glykosylasen, die mono- und die bifunktionalen-Glykosylasen. Eine monofunktionale Glykosylase spaltet die *N*-glykosidische Bindung, entfernt die modifizierte Base unter Bildung einer abasischen Stelle, welche von einem zweiten Enzym – der AP-Endonuklease (APE1) – erkannt wird. Die bifunktionale Glykosylase besitzt zusätzlich eine AP-(β -)Lyaseaktivität. Auch in diesem Fall spaltet das Enzym zuerst die *N*-glykosidische Bindung und entfernt die modifizierte Base. In einem sich direkt anschließenden zweiten Schritt, spaltet das Enzym durch β - bzw. β - δ -Eliminierung die 3'-Phosphordiester-Bindung neben der AP-Stelle und erzeugt an dieser Stelle einen Einzelstrangbruch. Nach der Spaltung der 3'-Phosphatenden durch eine AP-Endonuklease, wird die Lücke durch eine Polymerase (Pol β) wieder aufgefüllt und durch DNA-Ligase III in Gegenwart von *X-ray repair cross-complementing 1* (XRCC1) geschlossen.

Im Fall der monofunktionalen DNA-Glykosylase lässt sich weiter zwischen dem *short-patch* und dem *long-patch* Reparaturweg unterscheiden. Beim *short-patch* Reparaturweg inkorporiert die Polymerase (Pol β) ein einziges Nukleotid, während beim *long-patch* Weg gleich 2-10 Nukleotide unter Beteiligung von δ - bzw. ϵ -Polymerase und assoziierten Replikationsfaktoren nachfolgend zur AP-Stelle eingebaut werden. Das überhängende Oligonukleotid wird durch die *Flap*-Endonuklease (FEN 1) entfernt und der Einzelstrangbruch abschließend durch Ligase I oder III geschlossen.^[66, 67]

Für die FaPydA-Reparatur konnten inzwischen mehrere, in nachfolgender Tabelle (1) dargestellte, Reparaturenzyme identifiziert werden.

Die bakteriellen Fpg-, Nei- und Nth-Enzyme entfernen beide Formamido-pyrimidin-Schäden besonders effektiv. Während die Art des *mismatch* beim Fpg nicht von Bedeutung ist, variieren die Reparaturraten bei Nei und Nth in Abhängigkeit von der komplementären Base. In beiden Fällen wird eine schnellere Reparatur festgestellt, wenn der Schaden mit einer Purinbase paart.^[68]

Reparaturenzym	Zellenart	Gene locus	FaPydA	8-Oxo-dA
<i>Eco, Tt, Bst, LIFpg</i> (MutM)	Prokaryont	fpg	✓	-
NTH1	Maus(Leber)	Nth	✓	-
NEIL1	Maus(Leber)	Nei	✓	n.b.
Ntg1	Hefe	NTG1	✓	n.b.
Ntg2	Hefe	NTG2	✓	n.b.
EndonukleaseIII	<i>E. coli</i>	Nth	✓	-
EndonukleaseVIII	<i>E.coli</i>	Nei	✓	n.b.
Ogg1	Hefe	OGG1	-	✓
MutY	<i>E. coli</i>	mutY	-	✓

n.b. (nicht bekannt)

Tabelle 1: Übersicht über die FaPydA-spezifischen Reparaturenzyme.

Die Reparatur durch Endo VIII (Nei) verläuft ~ 200 mal schneller als die durch Endo III (Nth).^[68] Die Reparatur durch Nei und Nth, besonders von FaPydA, wurde kürzlich in Experimenten mit menschlichem Zellextrakt bestätigt und zeigt eine hohe Signifikanz der beiden Reparaturenzyme. In *knock-out* Zellen (Maus) konnte bei Abwesenheit der beiden Reparaturenzyme eine vermehrte FaPydA-Konzentration festgestellt werden.^[69] Die beiden Enzyme Ntg1 und Ntg2 aus Hefe sind die funktionellen und strukturellen Homologe von Endonuklease III (*E. coli*) und auch von Nth1 (Säugetier Zellen); beide reparieren FaPydA.^[70]

Im Fall des 8-Oxo-dA-Schadens ist bezüglich der Reparaturenzyme noch nicht viel bekannt. Die meisten Experimente zur Reparatur oxidativer Schäden wurden mit dem weitaus mutageneren, strukturell verwandten 8-Oxo-dG durchgeführt. Ein Rückschließen von diesen Ergebnissen auf 8-Oxo-dA ist nicht möglich, da vor

allem in dem am besten untersuchten Beispiel – dem Fpg – ein großer Unterschied zwischen diesen beiden Schäden besteht. Während 8-Oxo-dG äußerst schnell von Fpg erkannt und geschnitten wird, wird 8-Oxo-dA von diesem Enzym zwar gebunden, aber nicht entfernt. Bekannt ist, dass in dem *mismatch* Paar 8-Oxo-dA:dC der Schaden von Ogg1 erkannt und entfernt wird.^[71] Aber auch das *Mismatch*-Enzym MutY, welches im Zusammenhang mit Fpg oft als das *GO*-System bezeichnet wird, entfernt im *mismatch* 8-Oxo-dA:dA das Adenin, ignoriert allerdings das FaPydA (unabhängig von dem Basenpaar) gänzlich.^[72, 73, 64]

2. Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war, ein gegenüber Anomerisierungsreaktionen stabiles FaPydA-Analogon zu synthetisieren, in spezifische Oligonukleotide einzubauen und zu charakterisieren um Einblicke in die biologische Relevanz des Schadens zu erhalten.

Zur synthetischen Stabilisierung wurde das carbozyklische FaPydA-Analogon gewählt, welches als Phosphoramiditbaustein in verschiedene Oligonukleotide in guten Ausbeuten inkorporiert werden sollte.

Durch die Aufklärung der Struktur, sollten weitere Einblicke in das mögliche Paarungsverhalten des Schadens erhalten werden, um weitere Kenntnisse über das potentielle mutagene Verhalten des Schadens zu bekommen. Für diese Mutagenitätsstudien wurden thermodynamische Messungen und auch *Primer Extension*-Studien geplant. Durch die Schmelzpunktstudien sollten zum einen Aussagen über die Destabilisierung der DNA durch den cFaPydA-Schaden erhalten werden, zum anderen sollte der direkte Einfluss, der von dem Schaden hervorgeht und für die Entstehung von potentiellen mismatch Paarungen verantwortlich ist, untersucht werden. Das spezielle Replikationsverhalten sollte zusätzliche Aussagen über die Möglichkeit der Fehlpaarungen liefern.

Neben der Mutagenität sollte auch das spezielle Reparaturverhalten des Schadens in Kooperation mit *B. Castaing* (Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS, Orléans, Frankreich) untersucht werden. Das cFaPydA-Analogon bildet für Kristallisationsstudien mit Glykosylasen ein äußerst wirkungsvolles Substrat, da es zum einen in eindeutiger Konfiguration vorliegt und zum anderen durch das intakte Enzym nicht durch Spaltung der glykosidischen Bindung repariert werden kann. Dies sind die besten Voraussetzungen, um Einblicke in die speziellen Erkennungs- und Reparaturmechanismen des für den Schaden wohl am wichtigsten Enzyms – dem Fpg - zu erhalten. Durch diese

Kristallisationsstudien könnte darüber hinaus die Frage geklärt werden, warum Fpg die Formamidopyrimidinschäden und auch den 8-Oxo-dG-Schaden so schnell erkennt und effektiv repariert, das 8-Oxo-dA im Gegensatz hierzu aber gänzlich ignoriert.

3. Synthese

3.1 Synthesestrategie zum stabilisierten Formamidopyrimidin

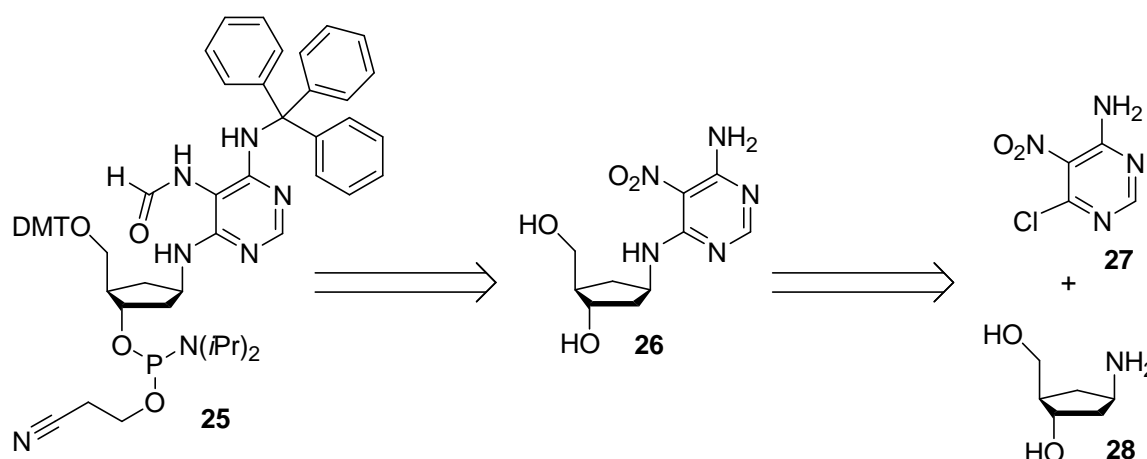
Zur Aufklärung des speziellen Verhaltens von FaPydA-Schäden sind zwei Dinge besonders wichtig. Zum einen sollte der Schaden in einer strukturell-eindeutigen Konfiguration und zum anderen in einer definierten Position in Oligonukleotiden vorliegen. Ungünstigerweise anomerisiert das Formamidopyrimidin in wässriger Umgebung⁵ sehr leicht und führt zu einem α -, β -Gemisch^[41] (siehe Einleitung 1.3.1). Zur Stabilisierung des β -Anomers wird ein Cyclopentanring **28** verwendet, welcher als bioisosterisches- und anomerisierungs-stabiles Analogon für den natürlichen Zucker fungiert.

3.1.1 Retrosynthese

Um das stabilisierte Formamidopyrimidin in kurze DNA-Stränge mittels Festphasensynthese einbauen zu können und den Einbau auch praktikabel zu gestalten, wurde das carbozyklische FaPydA als Phosphoramiditbaustein hergestellt und die 5'-OH-Gruppe des Carbozyklus mit der extrem säureempfindlichen DMT-Schutzgruppe versehen. Diese beiden, für die DNA-Synthese erforderlichen DMT- und Phosphoramiditgruppen, werden wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und der daraus resultierenden schlechten Handhabbarkeit, erst in den letzten Syntheseschritten eingeführt. Ebenso notwendig ist die Tritylschutzgruppe der Aminofunktion am N6 des Pyrimidins, welche Nebenreaktionen an dieser funktionellen Gruppe während der DNA-Synthese unterbindet. Die Einführung einer Schutzgruppe für diese Aminofunktion gestaltet sich äußerst schwierig, da die Nitrogruppe den elektronenarmen

⁵ Unter DNA- Synthesebedingungen.

Pyrimidinring noch zusätzlich deaktiviert. Dies führt dazu, dass die Aminogruppe am N6 vermutlich hauptsächlich in Form eines Imins vorliegt. Bei Schützungsversuchen auf der Stufe des Formamids konkurrieren diese beiden Gruppen miteinander, wobei es zumeist zu Transamidierungen bzw. zur Deformylierung kommt.



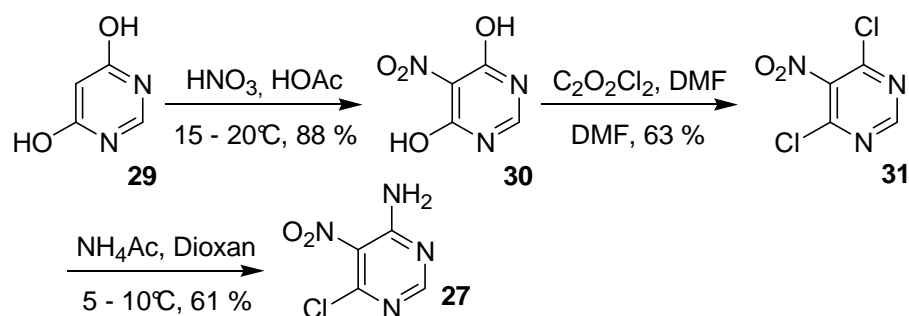
Schema 4: Retrosynthese des carbozyklischen FaPydA-Schadens.

Die Schützung der exozyklischen Aminogruppe als Tritylamin erwies sich jedoch als besonders wirkungsvoll. Die Formamidgruppe des *c*FaPydA-Schadens lässt sich auf eine Nitrogruppe zurückführen. Dieses Nitropyrimidin **26**, welches von mir während meiner Diplomarbeit^[74] in der Arbeitsgruppe von *Prof. Thomas Carell* synthetisiert wurde, lässt sich wiederum auf zwei Schlüsselverbindungen zurückführen, den Pyrimidinring **27** und den Cyclopentanring **28**. Die Kupplung des Cyclopentylamins **28** mit dem 4-Amino-6-chloro-5-nitro-pyrimidin **27** erfolgt durch eine nukleophile aromatische Substitution.

3.1.2 Synthese des 4-Amino-6-chloro-5-nitropyrimidins (27)

Die Synthese des Heterozyklus erfolgte nach bekannten Synthesevorschriften.^[75, 76] Zu Beginn wurde das 4,6-Dihydroxypyrimidin regioselektiv über einen Zweistufenmechanismus durch eine elektrophile aromatische Substitution nitriert. Die Regioselektivität der *ipso*-Substitution ist auf den kooperativen Effekt der

beiden Hydroxygruppen am Pyrimidinring zurückzuführen, da sie die Nitrogruppe über den stabilsten *Wheland*-Komplex in *ortho* Position dirigieren. Die Nitrierung des elektronenarmen Aromaten wurde in rauchender Salpetersäure und Eisessig durchgeführt. Das *in situ* erzeugte Acetylnitrat liefert eine gute Umsetzung von 88 %. Für die Synthese des 4,6-Dichloro-5-nitropyrimidins **31** wurden die Hydroxygruppen durch Chlorid substituiert. Die Substitution verläuft bei kleineren Ansatzgrößen von bis zu 3 g mit Oxalylchlorid in DMF recht gut (63% Ausbeute). Für die in der Literatur von *W. R. Boon et al.* beschriebene Substitution mit Phosphorylchlorid in Gegenwart von *N, N*-Dimethylanilin verläuft die Reaktion bei Ansätzen von bis zu 3 g mit nur schlechten Ausbeuten. Die Synthese des 4-Amino-6-chloro-5-nitropyrimidins verläuft über eine aromatische nukleophile Substitutionsreaktion, die dem Additions-Eliminierungsmechanismus folgt. Die im *Meisenheimer*-Komplex-Analogon auftretende negative Ladung des Carbanions, wird durch die sich in *ortho*-Position befindliche Nitrogruppe und den in *para* und *ortho* positionierten Stickstoff gut stabilisiert. Um die Entstehung des Diamins zu minimieren, wurde die Nucleophilie des Ammoniaks mit Eisessig abgepuffert und die Ammoniumacetat-Lösung *via* einer Spritzenpumpe so langsam zugetropft, dass die Reaktionsmischung eine Temperatur von 10°C nicht überschritt. Die in der Literatur von *W. R. Boon et al.* beschriebene Synthesedurchführung in einem Ammoniak/ Methanol-Gemisch ergaben jedoch auch bei niedriger Temperatur, durch die vermehrte Entstehung des Diamins nur schlechte Ausbeuten.

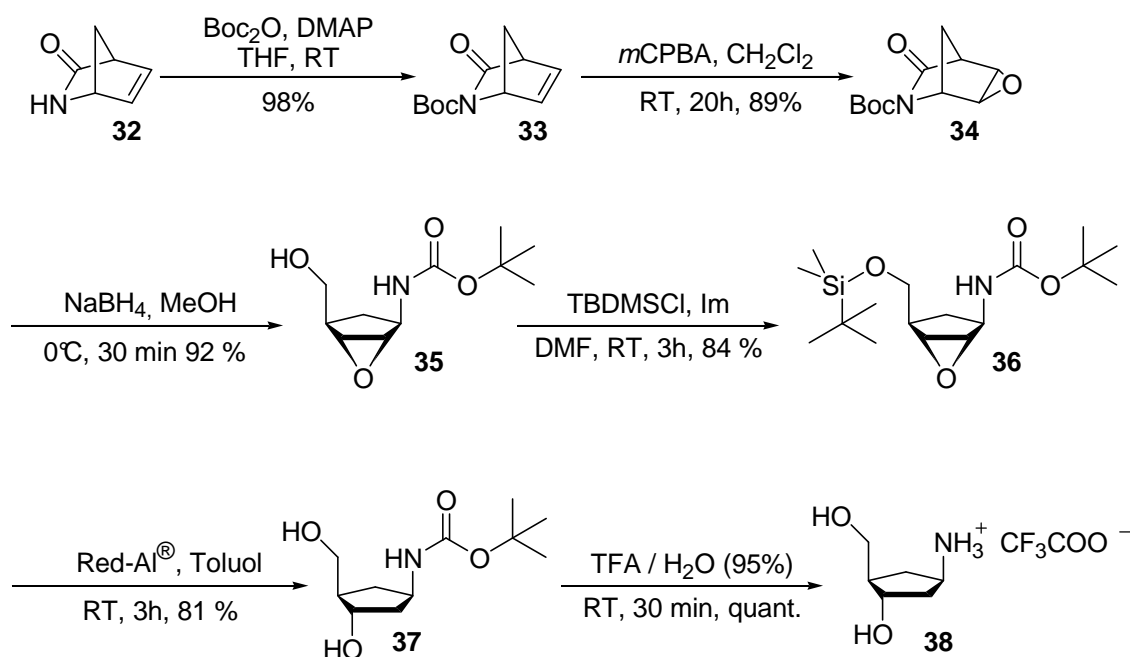


Schema 5: Synthese des Heterozyklus.

3.1.3 Synthese des Cyclopentylamins (38)

Die fünfstufige Synthese des Cyclopentylamins **38** wurde erstmalig von *Dominguez* und *Cullis*^[53] beschrieben und von *M. Ober*^[45] ausgearbeitet.

Die *tert*-Butoxycarbonylschätzung des enantiomerenreinen Lactams **32** verlief mit dem entsprechenden Anhydrid in THF unter katalytischen Zusatz von DMAP innerhalb von 4 h nahezu quantitativ. Die mit hoher Diastereoselektivität zum *exo*-Produkt **34** verlaufende Epoxidierung wurde mit einem Überschuss an *m*CPBA in Dichlormethan bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. Die selektive, reduktive Ringöffnung des Lactams wurde mit Natriumborhydrid in Methanol bei 0°C durchgeführt. Das überschüssige Natriumborhydrid wurde durch Neutralisation mit Essigsäure entfernt.



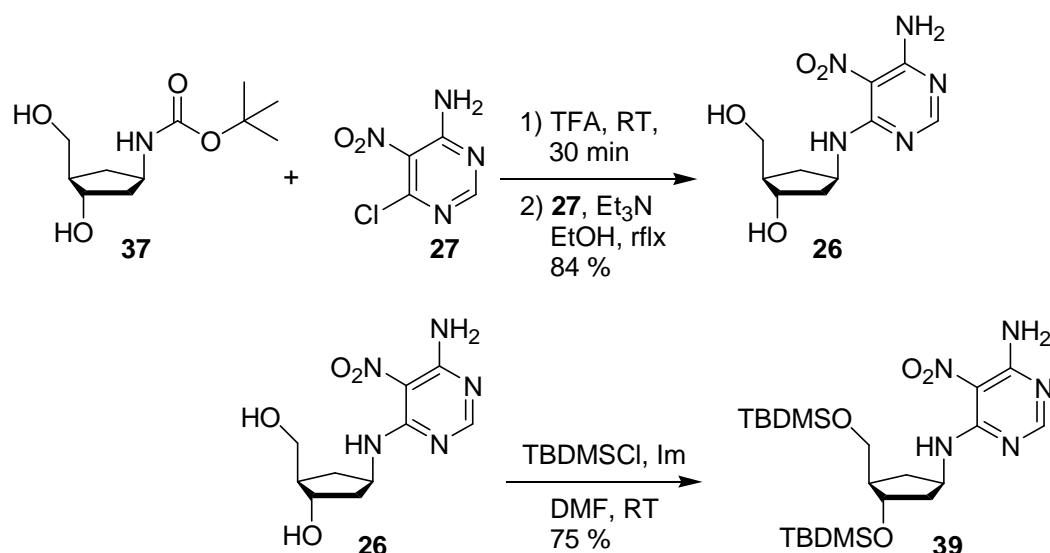
Schema 6: Synthese des Carbozyklus.

Zur Erhöhung der Regioselektivität der folgenden Epoxidöffnung wurde zunächst die freie, primäre 1'-OH-Gruppe mit TBDMSCl und Imidazol in DMF geschützt. Die reduktive Epoxidöffnung verlief mit Red-Al[®] in Toluol regio- und

stereoselektiv, indem das Aluminium an den Carbonylsauerstoff des Carbamats koordinierte und nicht an den sterisch gehinderten Silylether. Dies führte zur regiospezifischen Hydrid-Übertragung auf das C1-Kohlenstoffatom. Die *tert*-Butoxycarbonylentschützung ließ sich durch Refluxieren in entgastem dest. Wasser über Nacht durchführen, oder aber in einer schnellen Variante, mit 95 %iger TFA bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min zum entsprechenden Trifluoressigsäure-Salz.

3.1.4 Kupplung des Cyclopentylamins (38) und des Heterozyklus (27) mit anschließender TBDMS-Schützung

Die Kupplung des Cyclopentylamins **38** mit 4-Amino-6-chloro-5-nitropyrimidin **27** erfolgte unter basischen Bedingungen durch nukleophile aromatische Substitution. Da im Fall der Boc-Entschützung mit TFA nicht das freie Amin, sondern das entsprechende Trifluoressigsäure-Salz entstand, wurden für die Kupplung 7 eq Triethylamin zugesetzt.

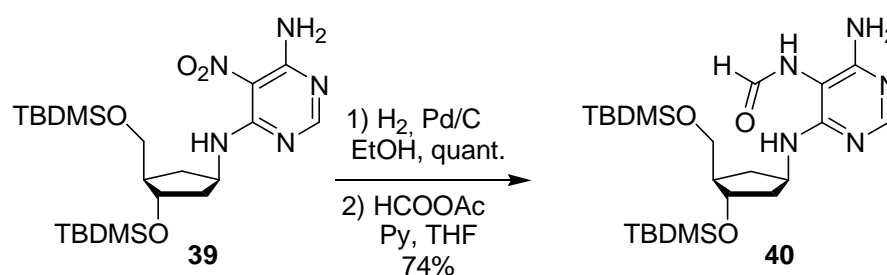


Schema 7: Kupplungsreaktion und anschließende TBDMS-Schützung.

Substituiert wurde in refluxierendem Ethanol, wobei das Kupplungsprodukt beim Abkühlen als weißes Pulver ausfiel. Umkristallisiert wurde aus heißgesättigtem Ethanol. Die beiden Hydroxygruppen wurden mit TBDMSCl und Imidazol nach Standardbedingungen^[77] in DMF „silylgeschützt“, da die freien Hydroxylgruppen bei der späteren Formylierungsreaktion stören würden.

3.1.5 Synthese des Formamids

Die Nitrogruppe **39** des Kupplungsprodukts wurde mit Palladium auf Aktivkohle in einer Wasserstoffatmosphäre quantitativ reduziert. Da das entstandene Diamin stark oxidationsempfindlich war, wurde der Katalysator unter Schutzgas abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Um sämtliche Ethanolreste zu entfernen, wurde der farblose Rückstand zweimal aus trockenem Pyridin eingengt. Zur Formylierung wurde immer ein frisch hergestelltes Ameisensäure-Essigsäureanhydrid-Gemisch eingesetzt, da sich das Gleichgewicht des gemischten Anhydrids im Laufe der Zeit zu Gunsten reiner Ameisensäure- bzw. reinen Essigsäureanhydrids verschiebt.^[78]

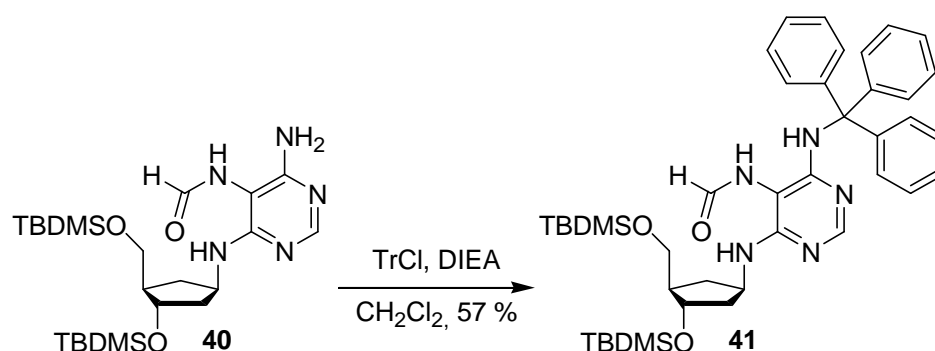


Schema 8: Formylierungsreaktion.

Um jegliche Oxidation zu vermeiden, wurden alle eingesetzten Lösungsmittel und Reagenzien im Vorfeld gründlich entgast. Formyliert wurde schließlich pyridinkatalysiert mit dem gemischten Anhydrid unter Schutzgasatmosphäre für insgesamt 18 h.

3.1.6 Trytyl-Schützung der N6-Aminogruppe des Formamids (40)

Damit es bei der späteren DNA-Synthese zu keiner Nebenreaktion der exozyklischen N6-Aminogruppe kam, musste diese für den gesamten Syntheszyklus geschützt sein. Dies wurde, entgegen den Standardsynthesemethoden welche basenlabile Schutzgruppen vorsehen, mit einer säurelabilen Schutzgruppe erzielt. Die Abspaltungsrate der Trytyl-Gruppe liegt weit niedriger als die der DMT-Gruppe^[77], so dass während des DNA-Syntheszyklus eine selektive Abspaltung der DMT-Schutzgruppe neben der Trytyl-Schutzgruppe möglich ist. Die Trytyl-Schützung wurde basenkatalysiert (Hünig Base) mit TrCl in Dichlormethan durchgeführt.^[79, 77]

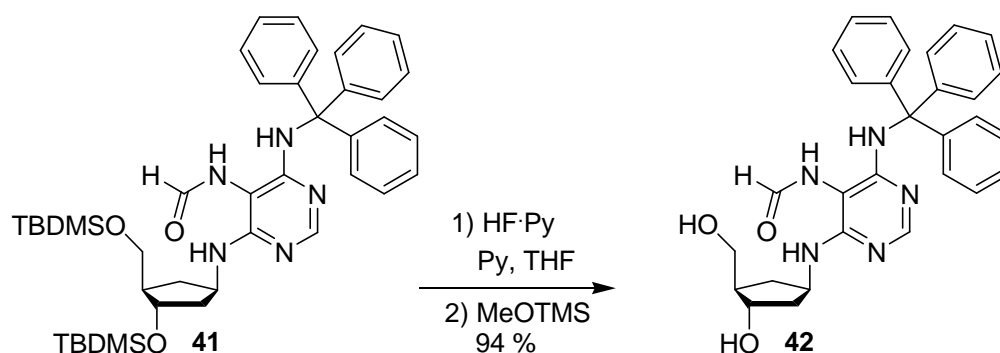


Schema 9: Trytyl-Schützung der N6-Aminogruppe von (40).

3.1.7 Desilylierung des Formamids (41)

Die Abspaltung der beiden Silylschutzgruppen musste in Gegenwart einer säureempfindlichen Trytyl-Schutzgruppe und einer säure- und basenempfindlichen Formamidgruppe geschehen. Die hierfür geeignetste Methode war die Entschützung mit einem HF·Pyridin-Komplex (~70% HF). Dieser HF-Komplex wurde während der Reaktion in trockenem THF noch zusätzlich mit Pyridin

abgepuffert und bewirkte dennoch vollständige Abspaltung der beiden Silylschutzgruppen in Gegenwart der empfindlichen Funktionalitäten. Der Verlauf der Reaktion ließ sich einfach durch *reversed phase* Dünnschichtchromatographie verfolgen. Am Ende der Reaktion wurde das überschüssige HF mit Methoxytrimethylsilan abgefangen. Die dabei entstehenden Produkte waren leicht flüchtig und konnten im Hochvakuum entfernt werden.



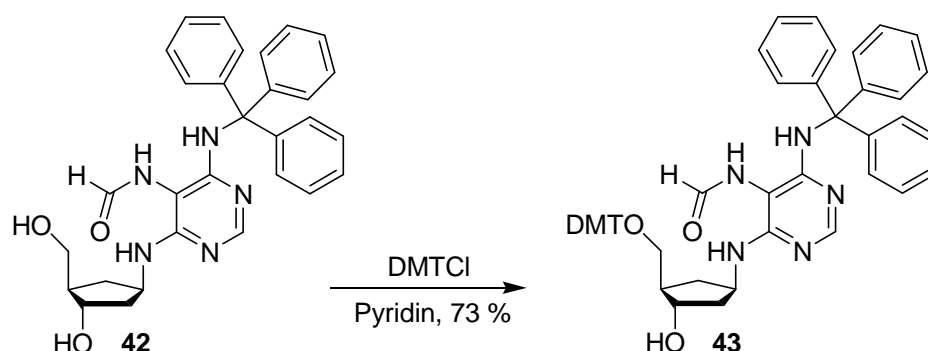
Schema 10: TBDMS-Entschützung von (41).

Nicht umgesetztes Ausgangsprodukt konnte dessen ungeachtet chromatographisch zurückgewonnen werden. Die Entschützung verlief generell mit sehr guten Ausbeuten von 93 %.

3.1.8 DMT-Schützung der 5'-OH-Gruppe des Formamids (42)

Die Veretherung der 5'-OH-Gruppe wurde unter wasserfreien Bedingungen mit DMTCl in trockenem Pyridin über 4 Å Molsieb durchgeführt. Bei dieser Reaktion galt: „Je trockener die Reaktionsbedingungen, umso besser verläuft die Veretherung.“ Prinzipiell ist die Veretherung der 5'-OH-Gruppe neben der 3'-OH-Gruppe kinetisch begünstigt. Bemerkenswert ist dennoch, dass es im Fall des Carbozyklus offensichtlich leichter zur zusätzlichen Schützung der sekundären 3'-OH-Gruppe kommen konnte, als es im Fall der Desoxyribose beobachtet worden

war. Dies hatte zur Folge, dass DMTCI (1,2 eq) portionsweise und unter anfänglicher Eiskühlung zugegeben werden musste. Das entstandene Produkt musste aufgrund der äußerst säureempfindlichen DMT-Gruppe besonders vorsichtig gehandhabt werden. Bei der chromatographischen Reinigung wurde das Laufmittelgemisch mit 0.5 % Pyridin versetzt, um die Zersetzung der Verbindung durch das leicht saure Kieselgel zu unterbinden.



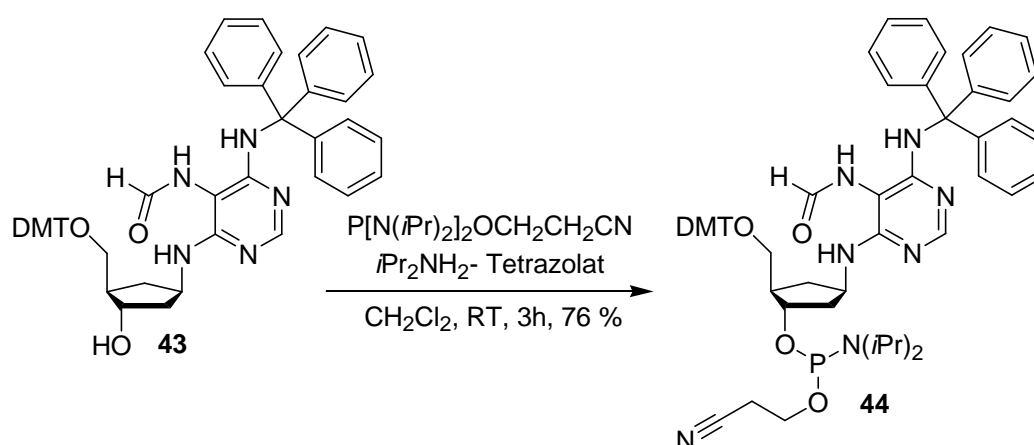
Schema 11: Veretherung der primären 5'-Hydroxylgruppe.

Halogenhaltige Lösungsmittel, wie zum Beispiel CDCl_3 für die NMR-Analyse, wurden vor der Verwendung über basisches Aluminiumoxid filtriert, um Säurereste zu neutralisieren.

3.1.9 Phosphitylierung der 3'-OH-Gruppe des Formamids (43)

Für die abschließende Phosphitylierung des sekundären Alkohols wurde 3-(Bis(diisopropylamino)phosphanoxy)propannitril verwendet, welches durch Diisopropylammoniumtetrazolid aktiviert wurde. Da sowohl das eingesetzte Reagenz, als auch das entstehende Phosphoramidit extrem sauerstoffempfindlich waren, wurden alle eingesetzten Lösungsmittel entgast und die Reaktion unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Um eine oxidative Zersetzung während der chromatographischen Aufreinigung zu vermeiden, wurde zum Einen das

verwendete Kieselgel mit Pyridin deaktiviert und zum anderen das Produkt zügig eluiert. Des Weiteren wurde dem Laufmittel 0.5 % Pyridin zugesetzt, um ein Abspalten der DMT-Gruppe zu vermeiden. Zur vollständigen Entfernung des Pyridins und eventuell noch vorhandenen Reagenz, wurde das Phosphoramidit in wenig Dichlormethan aufgenommen und bei 0 °C in das 100-fache Volumen Pentan getropft, wobei das Produkt als weißes Pulver ausfiel.



Schema 12: Phosphitylierung der 3'-Hydroxylgruppe.

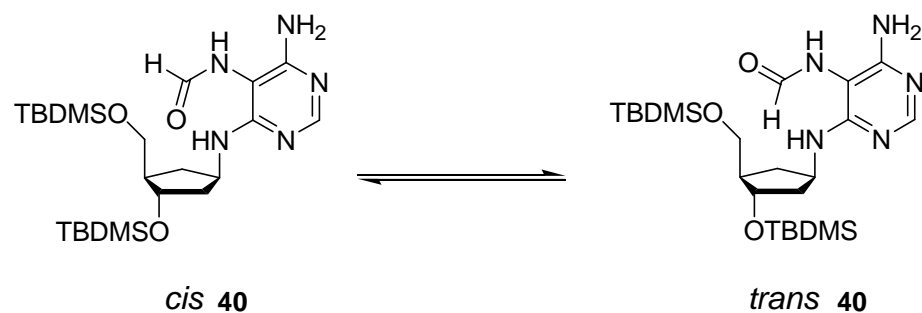
Das im Hochvakuum getrocknete Phosphoramidit wurde bei -20 °C unter Argonatmosphäre aufbewahrt.

Proben für die NMR-Analytik wurden generell unter Schutzgasatmosphäre abgefüllt und in, über basischem Aluminiumoxid filtriertem und entgastem, CDCl_3 aufgenommen.

3.2 Struktur und Rotationsbarriere der Formamidbindung von (40)

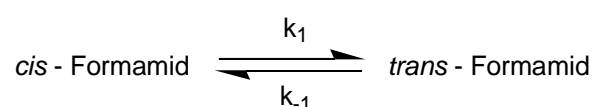
Durch den partiellen Doppelbindungscharakter einer Amidbindung ist deren Rotation um diese Bindung gehemmt. Dies wird auch im cFaPydA-Schaden

sichtbar, da diese Verbindungen immer in einem *cis*-/ *trans*-Gemisch vorliegen, welches in NMR-Messungen deutlich zu erkennen ist.



Schema 13: *cis*-/ *trans*-Isomerisierung des *c*FaPydA.

Zur Untersuchung der Rotationsbarriere der Formamidbindung des *c*FaPydA-Schadens wurde ein Trityl-entschütztes *c*FaPydA gewählt, um die charakteristischen Signale im Aromatenbereich nicht zu verdecken und eine freie Rotation zu gewährleisten. Die Rotationsbarriere des Formamids ließ sich anhand von temperaturabhängigen NMR-Messungen über Linienform-Analyse bestimmen.^[37, 80] Zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Amid liegt ein Gleichgewicht gemäß folgender Gleichung vor:



Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Isomerisierung wurden aus der freien Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger nach der Eyring-Gleichung bestimmt. Nimmt man an, dass der Energieunterschied zwischen *cis*- und *trans*-Formamid nahezu null ist, so lassen sich die beiden Geschwindigkeiten gleichsetzen:

$$k_1 \cong k_{-1} \cong k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (1)$$

$k_B = 1.38066 \cdot 10^{-23}$ [JK⁻¹] Boltzmannkonstante

$h = 6.62618 \cdot 10^{-34}$ [Js] Plancksches Wirkungsquantum

T= Temperatur

R= 8.31441 [JK⁻¹mol⁻¹] universelle Gaskonstante

Am Koaleszenzpunkt gilt folgende Gleichung:

$$k_c = \frac{\pi \cdot \Delta\nu}{\sqrt{2}} \quad (2)$$

k_c = Geschwindigkeitskonstante am Koaleszenzpunkt

$\Delta\nu$ = Differenz der bei Raumtemperatur auftretenden chemischen Verschiebung der betrachteten Signale (in Hz).

Zur Berechnung der freien Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger wird Gleichung (2) in Gleichung (3) eingesetzt und nach ΔG^\ddagger aufgelöst:

$$\Delta G^\ddagger = -RT_c \ln \left(\frac{h \cdot \pi \cdot \Delta\nu}{k_B T_c \sqrt{2}} \right) \quad (3)$$

Hierbei ist T_c die Koaleszenztemperatur in Kelvin. Durch Einsetzen der Konstanten ergibt sich:

$$\Delta G^\ddagger = -8.3145 \frac{J}{molK} \cdot T_c \cdot \ln \left(1.066 \cdot 10^{-10} Ks \cdot \frac{\Delta\nu}{T_c} \right) \quad (4)$$

In folgender Abbildung 10 ist die temperaturabhängige NMR-Messung von Verbindung 40 in DMSO-d₆ bei verschiedenen Temperaturen (300 K-430 K) dargestellt.

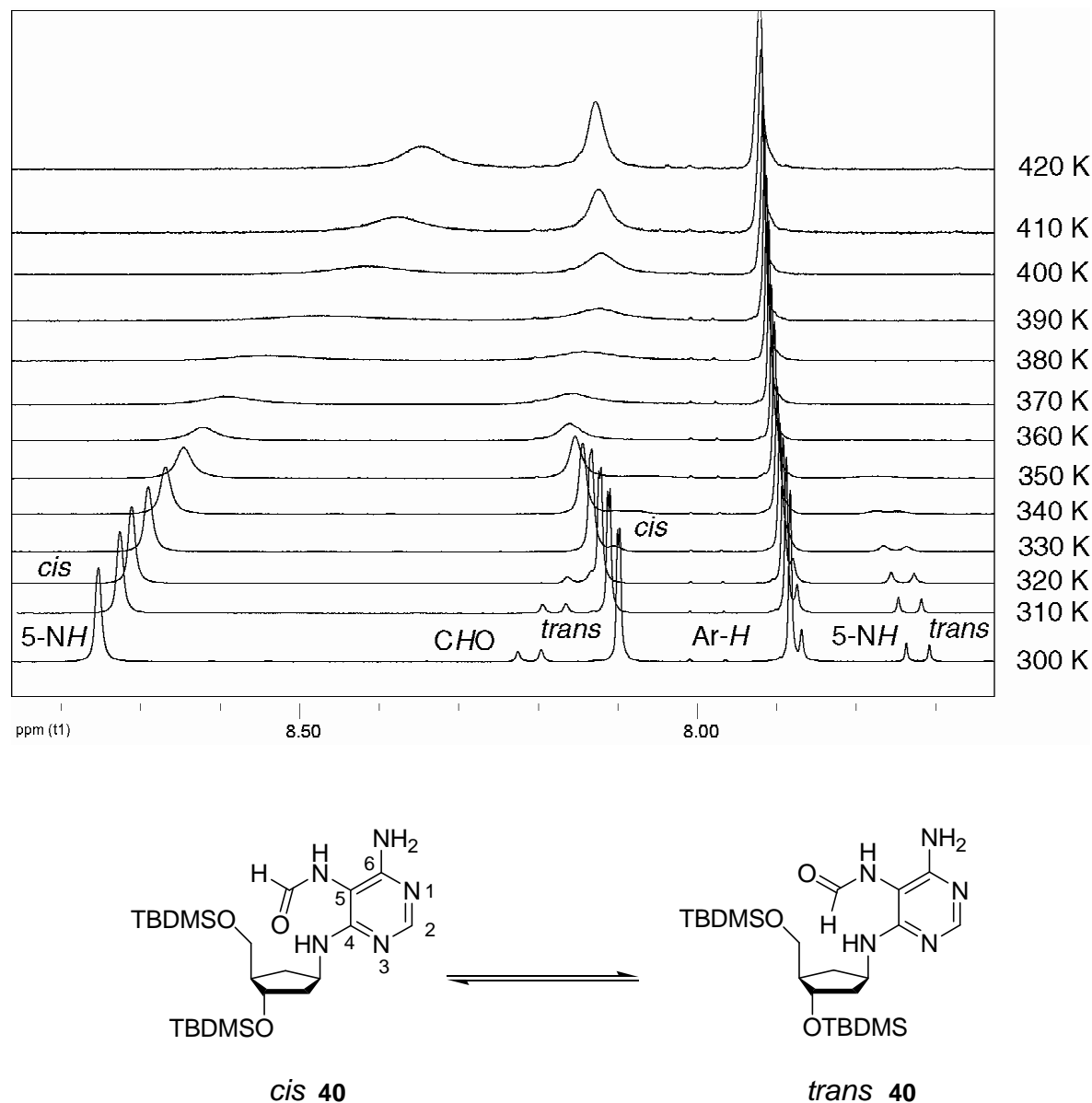


Abbildung 10: Temperaturabhängige ¹H-NMR-Spektren des *c*FaPydA.

Zur Berechnung der Rotationsbarriere können die *cis*-/ *trans*-Signale der Formamidprotonen (5-NH-Proton oder CHO-Proton) oder das Signal des C1'NH (4-NH) verwendet werden. Am Beispiel der CHO-Gruppe ergab sich für die Differenz der *cis*-/ *trans*-Signale ein Wert von $\Delta\nu = 44.9$ Hz. Der Koaleszenzpunkt

der beiden Signale lag bei einer Temperatur von 340 K. Dies führte nach Gleichung (4) zu einer Rotationsbarriere von 70.6 kJ/mol bzw. 16.9 kcal/mol. Die Rotationsbarriere für die 5-NH- bzw. die 4-NH-Protonen berechnet sich mit einer chemischen Verschiebung von $\Delta\nu$ (5-NH)= 412.3 Hz bzw. von $\Delta\nu$ (4-NH)= 94.4 Hz und den jeweiligen Koaleszentemperaturen von T_c (5-NH)= 370 K und T_c (4-NH)= 350 K auf die beiden vergleichbaren Isomerisierungsenthalpien von 16.8 kcal/mol (70.3 kJ/mol) bzw. von 16.9 kcal/mol (70.6 kJ/mol). Die für die Formamidprotonen und die C1`NH-Gruppe ermittelten freien Aktivierungsenthalpien für die *cis*-/*trans*-Isomerisierung sind somit identisch.

Untersuchungen haben gezeigt, dass ab einem ΔG^\ddagger -Wert von 23 kcal/mol die *cis*-/*trans*-Umwandlung bei Raumtemperatur so langsam stattfindet, dass beide Rotamere voneinander getrennt werden können.^[80] Daraus lässt sich schließen, dass bei einer freien Aktivierungsenthalpie von 16.9 kcal/mol, ein Separieren der beiden *c*FaPydA-Rotamere bei Raumtemperatur nicht möglich ist.

Vergleicht man die für das *c*FaPydA ermittelte freie Aktivierungsenthalpie mit denen aus der Literatur bekannten Isomerisierungsenthalpien, so liegt die Rotationsbarriere des *c*FaPydA, im Gegensatz zu dem von *Cadet et al.* für das 4,6-Diamino-5-formamido-pyrimidin gefundene freie Aktivierungsenergie von $\Delta G^\ddagger = 75.5 (\pm 1.1)$ kJ/mol bzw. 18.0 kcal/mol, um 1 kcal/mol niedriger.^[37] Die ebenfalls von *Cadet et al.* für das *N*-(2-deoxy- β -*D*-erythro-pentofuranosyl)formamid berechnete Rotationsbarriere befindet sich mit 18.3 kcal/mol (76.5 kJ/mol) in derselben Größenordnung wie auch schon das 4,6-Diamino-5-formamido-pyrimidin.^[81] Beim Vergleich der Rotationsenthalpien von *c*FaPydA mit *c*FaPydG ($\Delta G^\ddagger = 71.1$ kJ/mol; 17.0 kcal/mol), wird allerdings deutlich, dass diese beiden Isomerisierungsenthalpien ($\Delta\Delta G^\ddagger = \pm 0.1$ kcal/mol) nahezu identisch sind.^[82] Da die Rotationsbarrieren, neben sterischen Faktoren auch durch die Wahl des Lösungsmittels stark beeinflusst werden können, ist ein Vergleichen der in der Literatur publizierten Werte auch immer kritisch zu sehen.

In Abhängigkeit vom verwendeten deuterierten Lösungsmittel veränderten sich die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Formamid-Schadens enorm, wobei das jeweilige *cis-/trans*-Isomerisierungsverhältnis sich allerdings wenig veränderte und sich hauptsächlich zu Gunsten des *cis*-Isomers verschob. Während in apolaren Lösungsmitteln für gewöhnlich die *cis*-Konfiguration etwas stärker vorlag (~80 %), verschob sich dieses Verhältnis in polaren Lösungsmitteln etwas mehr zu Gunsten der *trans*-Konfiguration (~50 %), da intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen nun nicht mehr zur Stabilisierung beitragen konnten.

Die unterschiedlichen Konfigurationen der Formamidgruppe in polarer bzw. apolarer Umgebung verdeutlichen die Rotationsvielfältigkeit dieser Gruppe und die hieraus entstehende potenzielle Flexibilität. Das Ausmaß dieser Flexibilität, welche sich nicht nur im Paarungsverhalten des Schadens sondern auch im Erkennungsmechanismus von Reparaturenzymen widerspiegelt, könnte für die biologische Bedeutung des Schadens relevant sein.

Neben der Rotation des Formamids kann auch die Base um die glykosidische Bindung rotieren und sowohl in *syn*- als auch in *anti*-Konformation vorliegen. Da die Signale im $^1\text{H-NMR}$ in starker Abhängigkeit zum verwendeten deuterierten Lösungsmittel standen, und es somit zu großen Veränderungen des $^1\text{H-NMR}$ kam, wurden NOESY-Messungen sowohl in einem apolaren als auch einem polaren Lösungsmittel durchgeführt, um die erhaltenen Daten zu vergleichen.

Zur Aufklärung des *syn-/anti*-Verhältnisses des *cFaPydA* bezüglich der glykosidischen Bindung wurden NOESY-Messungen in CDCl_3 und in DMSO-d_6 durchgeführt, welche allerdings zu dem gleichen Ergebnis führten.

Exemplarisch ist in Abbildung 12 das NOESY-Spektrum von Verbindung 40 in CDCl_3 dargestellt. Die zu erwartenden NOESY-Kreuzsignale der *syn*- bzw. *anti*-Konformation sind nachfolgend abgebildet.

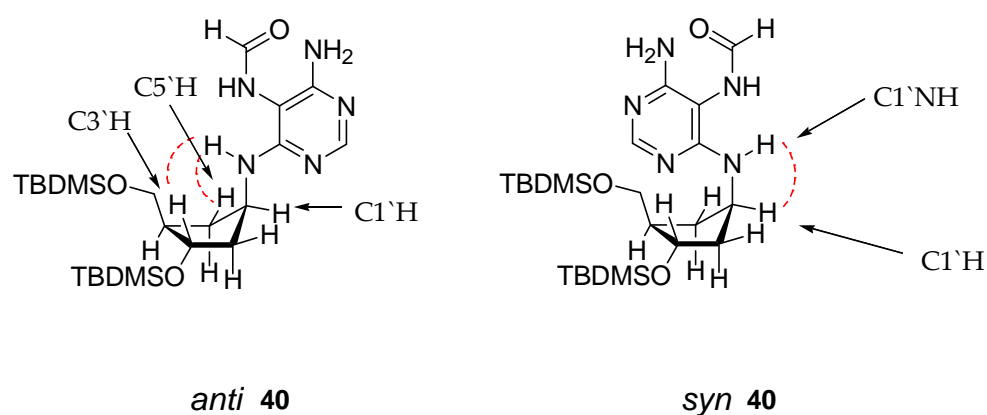


Abbildung 11: Mögliche NOESY-Kreuzsignale des in *syn*- bzw. *anti*-Konformation vorliegenden cFaPydA.

Betrachtet man das $\text{C1}'\text{NH}$ -Signal, so ist eine eindeutige, starke Kopplung mit dem $\text{C1}'\text{H}$ -Proton sichtbar. Diese Kopplung tritt nur in der *syn*-Konformation des cFaPydA auf und bestätigt somit das Vorliegen des Schadens in dieser Konformation. Die für die *anti*-Konformation des cFaPydA-Schadens charakteristischen NOE-Signale traten nicht auf. Das cFaPydA zeigt hier einen deutlichen Unterschied zu dem von M. Ober untersuchten cFaPydG. Im Fall des cFaPydG wurden Kopplungen für beide Konformere sichtbar, wobei die *anti*-Konformation sogar leicht gegenüber der *syn*-Konformation bevorzugt wurde.^[82]

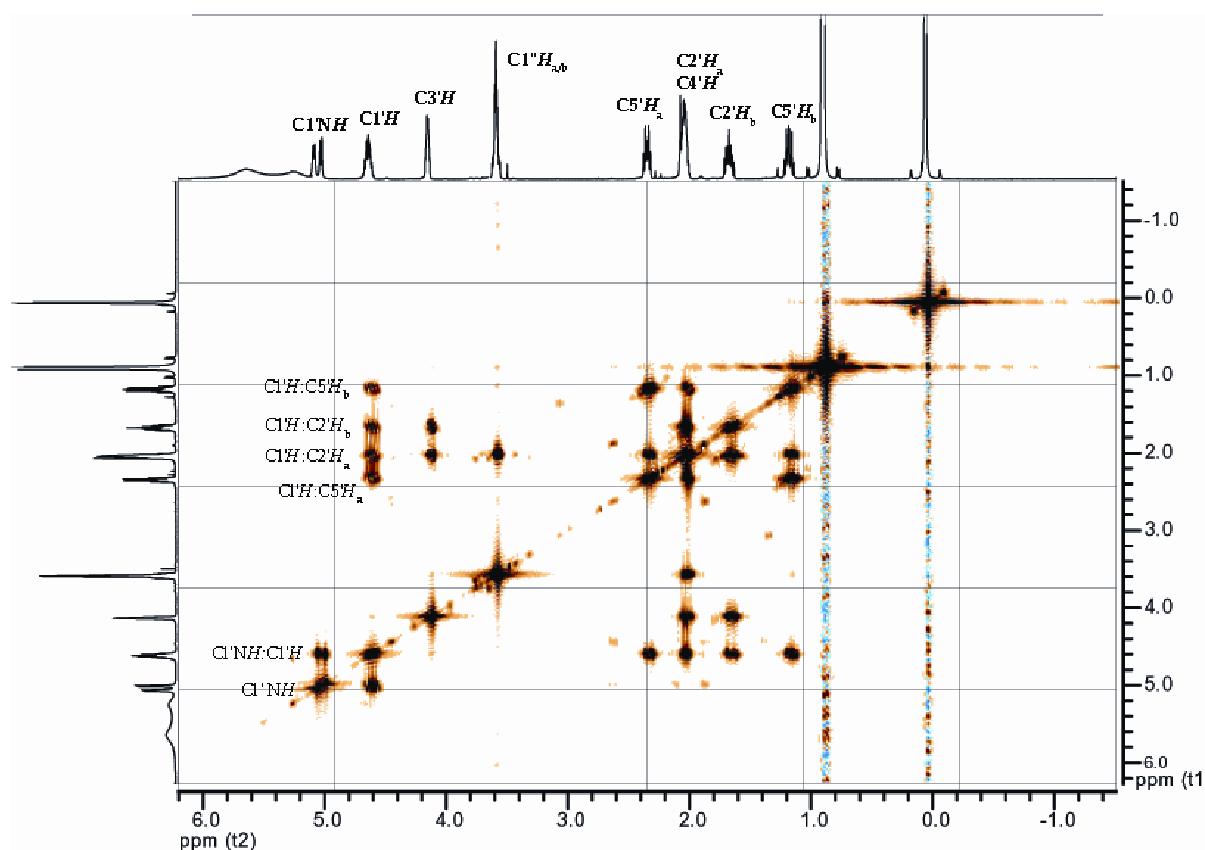


Abbildung 12: NOESY-Spektrum von Verbindung 40 in CDCl_3 .

Weitere NOE-Signale zeigen eine Korrelation des $\text{C1}'\text{H}$ -Protons mit den $\text{C2}'\text{H}$ - bzw. den $\text{C5}'\text{H}$ -Protonen. Dies bestätigt zusätzlich die β -Konfiguration der Verbindung 40.

3.3 DNA-Festphasensynthese

Zur Untersuchung der speziellen Eigenschaften von DNA-Schäden hinsichtlich ihrer Mutagenität, ihres Replikations- und Reparaturverhaltens ist es wichtig, diese Schäden zum einen in einer chemisch-eindeutigen Konfiguration und zum anderen in einer definierten Umgebung in Oligonukleotide einzubauen. Die Inkorporation von natürlichen oder auch modifizierten Basen lässt sich mit unterschiedlichen Methoden, wie zum Beispiel der Phosphoramidit-Chemie^[83, 84] bzw. der *H*-Phosphonat-Chemie^[85, 86] mit Hilfe eines DNA-Synthesizers

durchführen. Welche Methodik letztendlich zum Einsatz kommt, variiert mit den Eigenschaften der einzubauenden modifizierten Base.

Am einfachsten lassen sich Oligonukleotide⁶ jedoch durch die automatisierte Festphasensynthese *via* Phosphoramidit-Chemie herstellen.

Die Festphasensynthese erfolgt für gewöhnlich entgegengesetzt der natürlichen *in vivo* Synthese, in 3' → 5'-Richtung. Hierzu werden basenbeladene CPG-Träger verwendet, in welche die Basen durch einen basenlabilen *Linker* an das Glas gebunden sind.

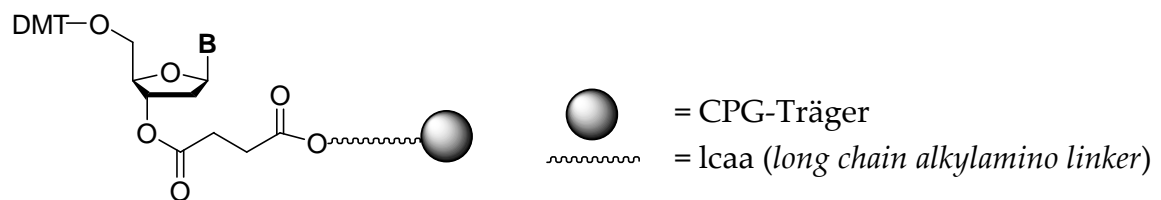


Abbildung 13: An einen CPG-Träger gebundene Base.

Die 3'-OH-Gruppe der Desoxyriboseeinheit ist im Fall der Phosphoramidit-Chemie mit einer *N,N*-Diisopropylcyanoethylphosphoramidit-Gruppe (CED) funktionalisiert. An der 5'-OH-Gruppe befindet sich eine säurelabile Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMT). Da die Formylgruppe des *cFaPydA*-Schadens relativ basenempfindlich ist, wurden für die DNA-Synthese Phosphoramidite verwendet, welche mit *Ultramild*-Schutzgruppen versehen waren. In nachfolgender Abbildung 14 sind die eingesetzten *Ultramild*-Phosphoramidite dargestellt.

⁶ Standard- Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 40 Basen sind hierbei unproblematisch.

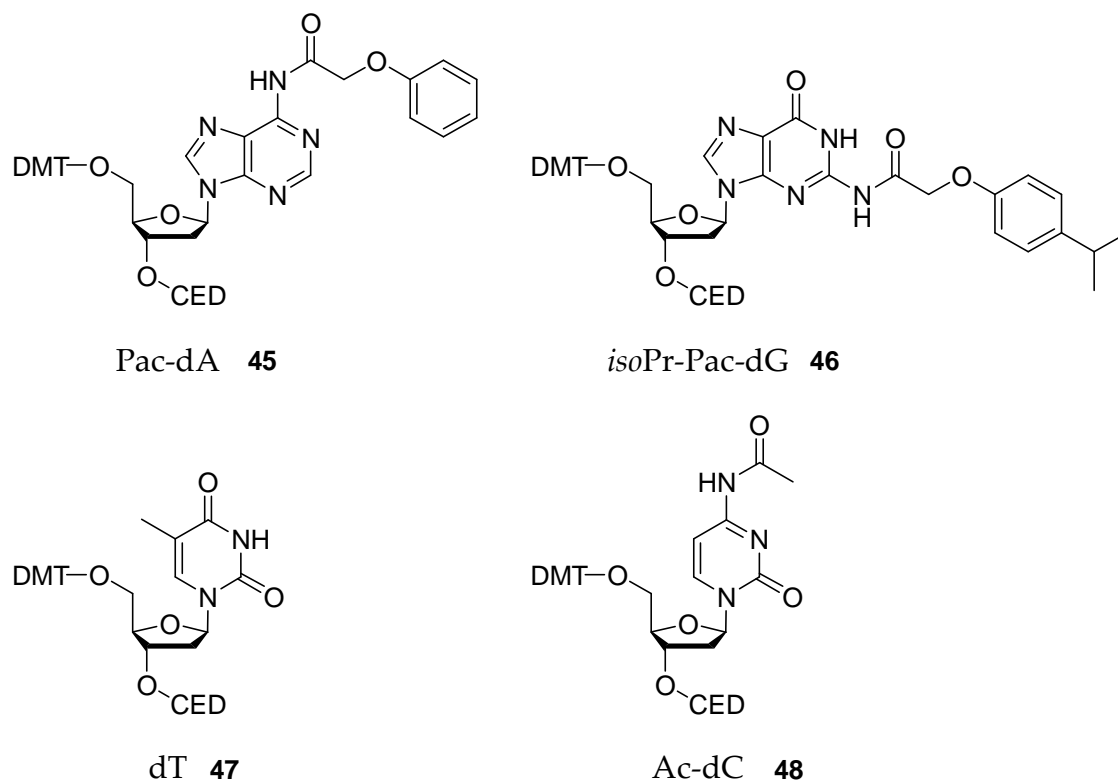
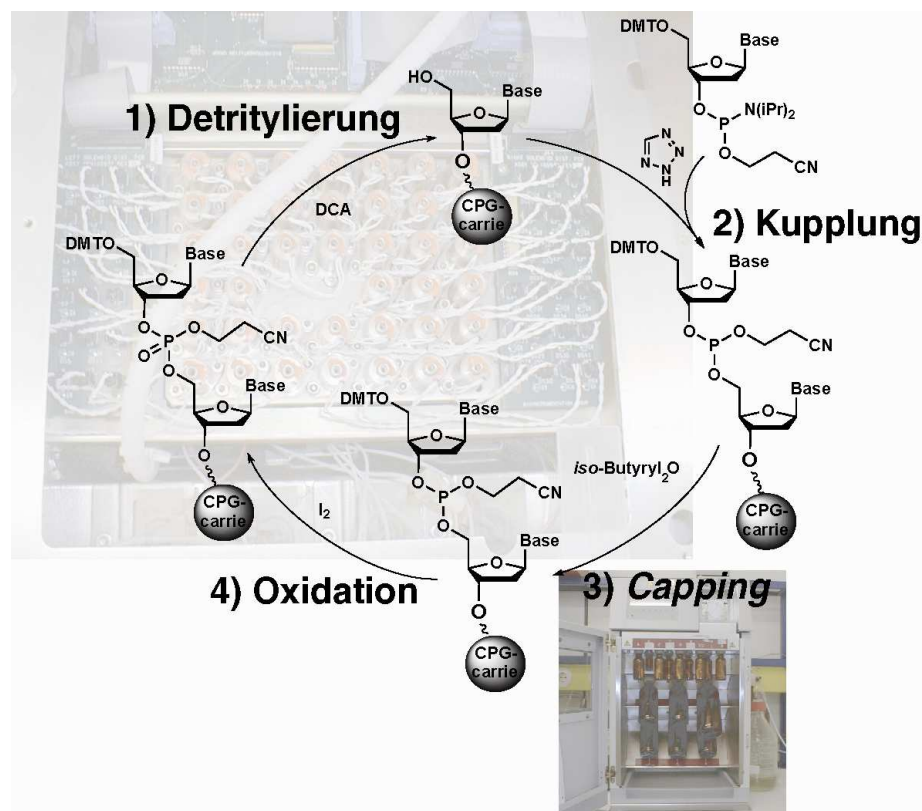


Abbildung 14: Dargestellt sind die für die Festphasensynthese eingesetzten Desoxynucleotide als Phosphoramidite. Die funktionellen Gruppen sind mit *Ultramild*-Schutzgruppen blockiert.

Die DNA-Synthese erfolgt in einem Zyklus, der sich in vier Schritte aufteilen lässt (Schema 14).

1. DMT-Abspaltung
2. Aktivierung und Kupplung des hinzukommenden Phosphoramidits
3. *Capping* der nicht-reagierten 5'-OH-Gruppen
4. Oxidation zum Phosphorsäuretriester

Die Abspaltung der DMT-Schutzgruppe erfolgt im ersten Schritt mit einer 2 %igen Dichloressigsäure in Dichlormethan. Die Qualität der Abspaltung lässt sich anhand der Absorption des orange gefärbten Dimethoxytritylkations verfolgen.



Schema 14: DNA-Synthesesyklus.

Im zweiten Schritt reagiert die freie 5'-OH-Gruppe mit dem neuen, in den Synthesesyklus hinzukommenden, aktivierten Phosphoramidit. Zur Aktivierung des Phosphoramidits wurden unterschiedliche Aktivatoren wie Tetrazol, 4,5-Dicyanoimidazol, ETT und BTT verwendet.^[87] Da die Kupplungsreaktionen nicht quantitativ verlaufen, wird in einem dritten Syntheseschritt (*Capping*), das nicht-reagierte Ausgangsmaterial durch Veresterung für die nachfolgenden Kupplungen blockiert. Die Veresterung wird standardmäßig mit Essigsäure- oder Phenoxyessigsäureanhydrid unter 2,6-Lutidin- und N-Methylimidazol-Aktivierung durchgeführt. Im Fall des cFaPydA führten diese *Capping*-Bedingungen zur Transamidierung des Formamids in das entsprechende Acet- bzw. Phenoxyacetamid.^[88] Deshalb wurde für die Oligonukleotidsynthese ab dem Einbau des cFaPydA-Schadens ein alternatives *Capping*, bestehend aus *iso*-Butyrylanhydrid und 2,6-Lutidin in Acetonitril, eingesetzt (Für Synthesedetails siehe Experimenteller Teil). Im Gegenzug musste die *Cappingzeit* verlängert

werden, um trotzdem noch eine akzeptable Unterdrückung der Deletionsfragmente zu erzielen. Der vierte Syntheseschritt beinhaltet die Oxidation der entstehenden Phosphor(III)-spezies zum Phosphorsäuretriester ($\text{P}(\underline{\text{V}})$) unter Verwendung einer wässrigen Iod-Lösung. Nach Abschluss des vierten Syntheseschritts kann entweder ein neuer beginnen oder aber die Synthesekaskade beendet werden. Hierbei gibt es die Möglichkeit, die DMT-Schutzgruppe des zuletzt eingebauten Phosphoramidits entweder sofort abzuspalten (*DMT-OFF*) oder aber, speziell bei längeren Oligonukleotiden, diese zur leichteren HPLC-Aufreinigung erst später zu entfernen (*DMT-ON*). Im Fall des Trityl-geschützten *cFaPydA* wurde die DMT-Schutzgruppe des zuletzt eingebauten Phosphoramidits immer abgespalten, da auch im Fall von längeren Oligonukleotiden oder schlechten Synthesen eine Reinigung aufgrund der Trityl-geschützten exozyklischen Aminogruppe des Formamids möglich war.

Prinzipiell gab es zwei Möglichkeiten der Trityl-Entschützung. Eine Möglichkeit war zunächst die Tritylschutzgruppe sauer über Nacht direkt am CPG-Träger abzuspalten. Der Vorteil dieser Methode war, dass die saure Abspaltung am Träger in trockenem Lösungsmittel durchgeführt werden konnte, und es somit nicht so leicht zur Spaltung der Formamidgruppe bzw. zur Depurinierung am DNA-Strang kam. An diesen Entschützungsschritt schlossen sich die basische Entfernung der restlichen Schutzgruppen sowie die basische Abspaltung vom Trägermaterial an (siehe Protokoll im Experimentellen Teil 6.5.2.1). Die zweite Variante war etwas aufwendiger, bot sich aber bei längeren Oligonukleotiden oder schlecht verlaufenden Synthesen an. Bei dieser Methode wurden zunächst die basenlabilen Schutzgruppen entfernt, die DNA alkalisch vom CPG-Träger abgespalten und das Oligonukleotid mittels *reversed phase* HPLC vorgereinigt. Hieran schloß sich die saure, wässrige Tritylabspaltung entweder auf einer *Sep-Pak*[®]-Kartusche oder im Eppendorfgefäß an. Die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe des Schadens wurde im HPL-Chromatogramm durch die deutliche

Verschiebung des DNA-Signals um ~20 min sichtbar. Die anschließende Abbildung 15 zeigt die Verschiebung des HPLC-Signals und die zugehörigen mit MALDI-TOF bestimmten Molekulargewichte, in denen die Abspaltung der Tritylgruppe ($\Delta M = 242 \text{ m/z}$) ebenfalls dokumentiert wird.

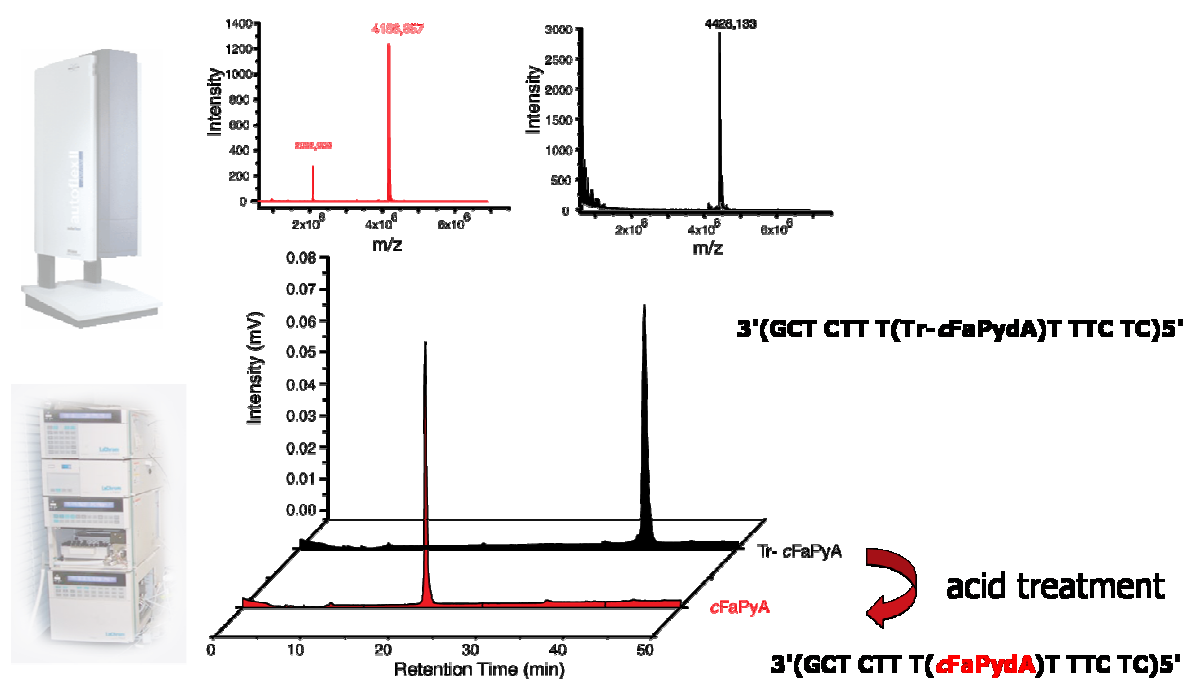


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramme mit korrespondierenden durch MALDI-TOF bestimmte Molekulargewichte für die zweite Variante der Trityl-Entschützung.

Die Herstellung von 8-Oxo-dA^[89] enthaltenden Oligonukleotiden verlief einfacher, da hier auf die Standard-Festphasenprotokolle zurückgegriffen werden konnte. Lediglich die Zeiten für die Kupplung des 8-Oxo-dA und der ersten nachfolgenden Base wurden erhöht. Des Weiteren wurde zusätzlich bei der basischen Abspaltung als Oxidationsschutz noch β -Mercaptoethanol hinzugesetzt, um ein eventuelles Weiteroxidieren⁷ von 8-Oxo-dA zu vermeiden.

Nach obigem Schema wurden folgende, tabellarisch zusammengefasste, Oligonukleotide synthetisiert und aufgereinigt.

⁷ Im Fall des 8-Oxo-dA kommt es nicht so leicht zu einer Weiteroxidation wie es im Fall des 8-oxo-dG beobachtet wird, allerdings ist ein „Überoxidieren“ nicht völlig auszuschließen.

Nr.	Bezeichnung der Sequenz	Sequenz	Verwendet für:
		X= cFaPydA, Y= 8-Oxo-dA	
D1	S1	5' G-C-G-A-T-X-T-A-G-C-G 3'	Thermodynamische Daten
D2	S2	5' T-G-C-A-G-T-X-A-C-A-G-C 3'	Thermodynamische Daten
D3	S3	5' T-G-C-A-G-A-X-A-C-A-G-C 3'	Thermodynamische Daten
D4	S4	5' T-G-C-A-G-G-X-A-C-A-G-C 3'	Thermodynamische Daten
D5	S5	5' T-A-G-X-C-C-T-G-G-T-C-A-T-T	Primer extension
D6	S6	5' C-T-C-T-T-T-X-T-T-T-C-T-C-G	Kokristallisation mit <i>LFpg</i> ^{a)}
D7	S1	5' G-C-G-A-T-Y-T-A-G-C-G 3'	Thermodynamische Daten
D8	S2	5' T-G-C-A-G-T-Y-A-C-A-G-C 3'	Thermodynamische Daten
D9	S5	5' T-A-G-Y-C-C-T-G-G-T-C-A-T-T	<i>Primer extension</i>

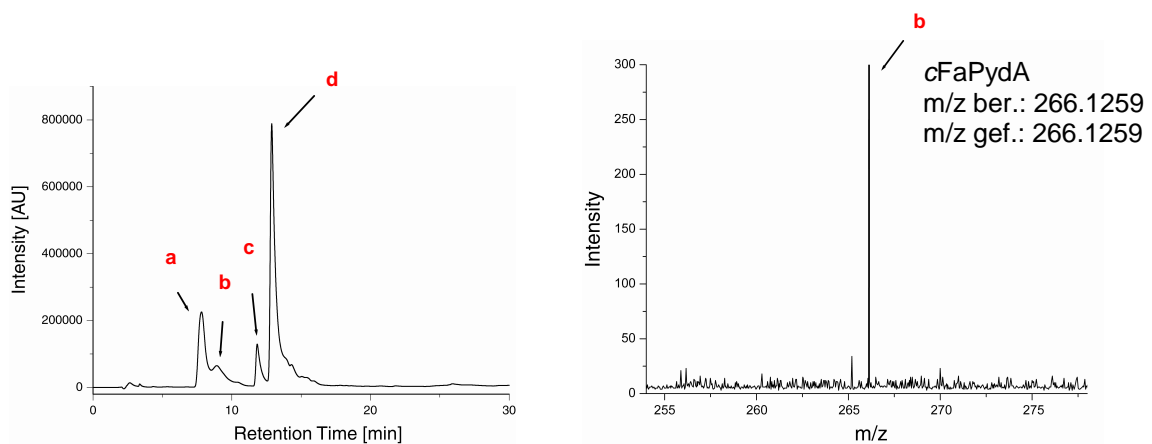
Tabelle 2: Hergestellte Oligonukleotide und deren Verwendung. ^{a)} In Kooperation mit B. Castaing, Arbeitskreis C. Zelwer, Centre de Biophysique Moleculaire, UPR4301, CNRS, Orleans Frankreich.

3.4 Enzymatischer Totalverdau

Zur Charakterisierung des *cFaPydA*-Schadens und auch zur Kontrolle der strukturellen Unversehrtheit des Schadens nach der Festphasensynthese und den Entschützungs- und Abspaltungsbedingungen, wurde ein enzymatischer Totalverdau der entsprechenden Oligonukleotiden durchgeführt.^[90, 91]

Der enzymatische Totalverdau umfasst im Wesentlichen drei Teilschritte, in denen das Oligonukleotid von insgesamt vier verschiedenen Enzymen, schrittweise in seine Nukleoside zerlegt wird. Im ersten Schritt wird das Oligonukleotid mit Nuklease P1 (*Penicillium citrinum*) und *Calf spleen* Phosphodiesterase II sukzessive vom 3'-Ende ausgehend geschnitten. Die Nuklease P1 besitzt neben einer einzelstrangspezifischen Endonukleaseaktivität auch eine 3'-Nukleotidase-Aktivität, welche 3'-Phosphate von 3'-Mononukleotiden und Oligonukleotiden abtrennt. Die *Calf spleen* Phosphodiesterase II entfernt zusätzlich in 5' → 3' – Richtung die 3'-Phosphate der Nukleoside. Im zweiten Teilschritt wurden mit *alkaline calf intestinal* Phosphatase die am 5'-Ende befindlichen Phosphate abgetrennt. Gleichzeitig wurden vom 3'-Ende ausgehend mit einer *Snake venom* Phosphodiesterase I mit Exonukleaseaktivität die 5'-Mononukleotide hydrolysiert. Abschließend wurden in einem dritten Schritt die Enzyme durch die Zugabe von Salzsäure ausgefällt.

Die Reaktionsmischung, bestehend aus den einzelnen Nukleosiden, konnte *via* HPLC-/ MS-/ MS-Experiment getrennt und analysiert werden. Nachfolgend ist das entsprechende Chromatogramm mit den für das *cFaPydA* korrespondierenden FTICR-Massen dargestellt, welches die korrekte Masse des *cFaPydA* auf die vierte Nachkommastelle genau wiedergibt. Die unterschiedlichen Intensitäten der einzelnen Basen im HPL-Chromatogramm spiegeln die Häufigkeit der im Oligonukleotid vorkommenden Basen wider. Das *cFaPydA* ist als breite Schulter am Cytosin identifiziert worden. Die Breite des Signals im HPL-Chromatogramm könnte auf die Rotamere des Formamids zurückgeführt werden.



a: dC, b: cFaPydA, c: dG, d: dT

Abbildung 16: LC/ MS-Analyse des enzymatischen Totalverdaus der cFaPydA enthaltenden Sequenz S6 3'(GCT CTT T (cFaPydA)T TTC TC)5'.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Synthese-, Entschützungs- und auch Aufreinigungsprozeduren, wie sie im vorangegangenen Kapitel (3.2) beschrieben sind, keinerlei Einfluss auf die strukturelle Beschaffenheit des cFaPydA-Schadens nahmen. Carbozyklische FaPydA enthaltende Oligonukleotide können somit bedenkenlos für biologische und auch physikalische Untersuchungen genutzt werden, sofern sie gemäß der vorgestellten Protokolle gehandhabt werden.

4. Biologische Eigenschaften

4.1 Thermodynamische Eigenschaften

Die Bestimmung thermodynamischer Größen (ΔH , ΔS , ΔG) eines bestimmten DNA-Schadens in einer definierten *ds* DNA gewährt wichtige Einblicke in die Stabilität der Basenpaarung und liefert somit wichtige Hinweise für die Aufklärung von schadens-induzierten Mutationen.^[92] Für die Durchführung von thermodynamischen Analysen wurden mehrere UV-Schmelzkurven bei unterschiedlichen Konzentrationen aufgenommen. Die aus diesen Daten erhaltenen Schmelzpunkte lieferten zusammen mit den entsprechenden Konzentrationen, gemäß der *van't Hoff* Methode, die jeweiligen thermodynamischen Größen.^[93] Die Herleitung der benötigten Gleichungen und Gesetzmäßigkeiten wird im folgenden Kapitel näher erläutert.^[94]

4.1.1 Theoretischer Hintergrund

Das thermisch hervorgerufene Denaturieren von DNA-Doppelsträngen lässt sich anhand der sich ändernden UV-Absorption verfolgen und dokumentieren. Dieser Prozess wird im Allgemeinen auch als „Schmelzen“ von *ds* DNA bezeichnet. Die für das thermische Denaturieren (zum Überwinden der apolaren Wechselwirkungen) benötigte Energie, wird durch einen erheblichen Zugewinn an Entropie kompensiert. Die UV-Absorption nimmt, aufgrund der sich mit steigender Temperatur lösenden Basenstapelung, insgesamt zu, wobei sich ein sigmoidaler Verlauf abzeichnet (Abb. 17). Dieses sigmoidale Verhalten ist darauf zurückzuführen, dass die vollständige Auflösung der Basenstapelung schon nach der geringsten thermisch herbeigeführten Störung, erheblich erleichtert wird. Dieses Phänomen wird auch als *kooperatives Schmelzen* bezeichnet und lässt sich mit einem klassischen Phasenübergang vergleichen.

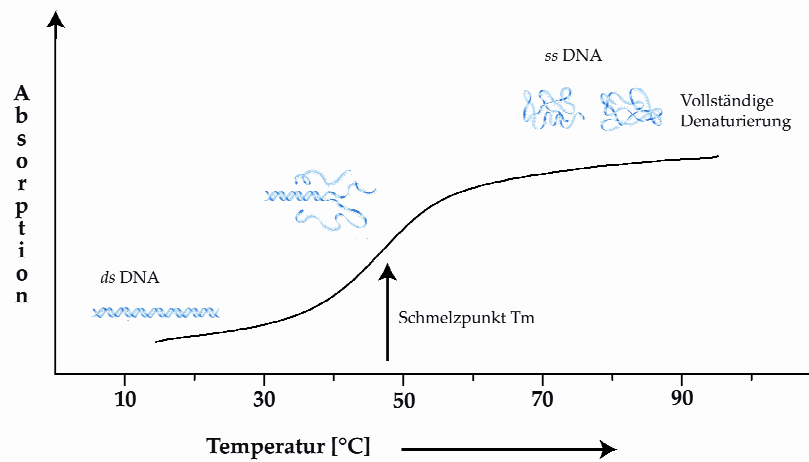
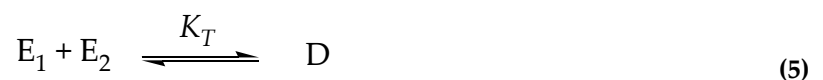


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer sigmoidalen Schmelzkurve. Die DNA-Schmelzkurve wird hierbei als der sich in Abhängigkeit von der Temperatur verändernde Absorptionsverlauf dargestellt.

Am Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Schmelzkurve liegt der sogenannte „Schmelzpunkt“ (T_m) der jeweiligen *ds* DNA.

Der Prozeß des „Schmelzens“ lässt sich vereinfacht durch folgendes Gleichgewicht darstellen:



In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass beim Übergang von *ds* DNA (D) in *ss* DNA ($E_1 + E_2$) nur zwei Zustände auftreten. Zum einen die vollständige Assoziation der zwei DNA-Einzelstränge zu einem Duplex, zum anderen die vollständige Dissoziation der *ds* DNA zu zwei separaten Einzelsträngen. Der Schmelzpunkt (T_m) einer *ds* DNA ist somit der Punkt, an dem 50 % der doppelsträngigen DNA (D) in die beiden Einzelstränge (E_1 und E_2) dissoziiert ist.

Stellt man das MWG auf und berechnet die Gleichgewichtskonstante K_T , indem man für die Konzentrationen die Annahme macht, dass die Konzentration der Einzelstränge gleich groß ist ($c(E_1)=c(E_2)$), dann folgt:

$$K_T = \frac{[D]}{[E_1][E_2]} = \frac{\alpha \left(\frac{C_T}{2} \right)}{\left[(1-\alpha) \frac{C_T}{2} \right]^2} = \frac{\alpha}{(1-\alpha)^2 \left(\frac{C_T}{2} \right)} \quad (6)$$

$C_T = c(E_1) + c(E_2)$, bei vollständiger Denaturierung

$E_1 = E_2 = C_T / 2$

α = Anteil an dimerisierter DNA

Geht man nun davon aus, dass am Schmelzpunkt nur noch 50 % der doppelsträngigen DNA vorliegen, dann ist $\alpha = 1/2$, wobei sich die Gleichung weiter vereinfacht:

$$K_{T_m} = \frac{4}{C_T} \quad (7)$$

Für jedes sich im Gleichgewicht befindliche System gilt,

$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \cdot K_T$ und $\Delta G = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ$ (Gibbs'sche Gleichung)

und führt durch Gleichsetzen dieser zwei Ausdrücke zur folgenden Gleichung:

$$-R \cdot T \cdot \ln \cdot K_T = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ \quad (8)$$

Durch Einsetzen der Gleichgewichtskonstante K_T (7) in (8) bekommt man

$$-R \cdot T_m \cdot \ln(4/C_T) = \Delta H^\circ - T_m \cdot \Delta S^\circ$$

Das Ausmultiplizieren und Umformen liefert

$$R \cdot T_m \cdot \ln C_T - R \cdot T_m \cdot \ln 4 = \Delta H^\circ - T_m \cdot \Delta S^\circ$$

Durch Umstellen nach $1/T_m$ erhält man folgende Geradengleichung:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1) \cdot R}{\Delta H^\circ} \cdot \ln C_T + \frac{[\Delta S^\circ - (n-1)R \cdot \ln 2n]}{\Delta H^\circ} \quad (9)$$

y m x b

$$R = 8.314472 \text{ J/mol}\cdot\text{K}, n = 2 \text{ für } ds \text{ DNA}$$

Die *van't Hoff* Gleichung stellt somit eine Verknüpfung zwischen der thermodynamischen Größe ΔH und der Gleichgewichtskonstante K_T des Schmelzvorgangs her.

Durch die reziproke Auftragung der bei verschiedenen Konzentrationen erhaltenen Schmelztemperaturen ($1/T_m$) gegen den natürlichen Logarithmus der totalen Oligonukleotid-Konzentration ($\ln C_T$) erhält man eine Gerade, aus der sich die thermodynamischen Parameter wie folgt herleiten lassen:

Die Steigung m der Geraden liefert den Enthalpiewert, und mit Hilfe des Achsenabschnitts b lässt sich die Entropie berechnen:

$$\Delta H^\circ = \frac{R}{m} \quad (10)$$

$$\Delta S^\circ = R \cdot \left(\frac{b}{m} + \ln 4 \right) \quad (11)$$

Die *Gibbs'sche* Gleichung liefert letztendlich den Wert für ΔG° (freie Dimerisierungsenthalpie)⁸.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ \quad (12)$$

Die Gültigkeit der oben hergeleiteten Beziehungen beschränkt sich auf nicht-selbstkomplementäre, kurze Oligonukleotide. Im Fall von selbstkomplementären Oligonukleotiden lässt sich die vereinfachte Betrachtung des Schmelzvorgangs nicht mehr heranziehen, da sich der Anteil an dimerisierter DNA (α) im MWG (Gl. 6) verändert. Dies hat keinen Einfluss auf den Enthalpiewert, aber sehr wohl auf den Entropiewert. Des Weiteren beschränken sich die Gesetzmäßigkeiten auf recht kurze DNA-Stränge, da beim „Schmelzen“ von zwei Zuständen - einem vollständigen assoziierten bzw. dissoziierten Zustand - ausgegangen wird (Gl. 5) und jegliche Zwischenformen, wie sie bei längeren Oligonukleotiden auftreten, vernachlässigt werden. Ebenfalls ungeeignet sind monomolekulare (DNA-*Hairpin*) Phasenübergänge, da diese konzentrationsunabhängig sind und damit durch ein anderes mathematisches Modell beschrieben werden.

4.1.2 Ergebnisse der Schmelzpunktstudien

Wie bereits erwähnt, gibt es viele Faktoren, die den Schmelzpunkt (T_m) von doppelsträngiger DNA beeinflussen. Neben der Länge der Oligonukleotide, der Konzentration der DNA und der sich in Lösung befindlichen Salze, ist natürlich auch der Einfluß der Sequenz zu nennen. Je nachdem wie reich ein Oligonukleotid an G:C-Basenpaaren ist, umso mehr erhöht sich die Schmelztemperatur des Oligonukleotids. Des Weiteren können sich unterschiedliche Sequenzen auch auf das spezielle Paarungsverhalten von DNA-Schäden auswirken.^[92, 95] Im Rahmen

⁸ Das Symbol ° steht für einen internen Standard. Dies bedeutet, dass alle so gekennzeichneten thermodynamischen Daten nicht bei standardisiertem Druck, Temperatur oder unendlicher Verdünnung bestimmt wurden.

dieser Schmelzpunktstudien wurden die Paarungseigenschaften des cFaPydA-Schadens ebenso untersucht wie die des 8-Oxo-dA-Schadens. Die thermodynamischen Daten liefern einen wichtigen Hinweis über die möglichen, auftretenden Fehlpaarungen des jeweiligen Schadens, sowie seine Wirkung auf die Stabilität des Duplexes.

Für die Schmelzpunktstudien wurden kurze DNA-Stränge hergestellt, welche im Konzentrationsbereich von 0.3 μM - 9.0 μM bei konstanter Salzkonzentration und mit wechselnden Gegenbasen gegenüber dem DNA-Schaden vermessen wurden. Die für die unterschiedlichen Konzentrationen und Gegenbasen erhaltenen Schmelzpunkte (T_m) wurden zur Bestimmung der thermodynamischen Daten *via van't Hoff Plot* reziprok gegen den natürlichen Logarithmus der totalen Oligonukleotid-Konzentrationen (C_T) aufgetragen. Aus den erhaltenen Geraden ließen sich, wie oben beschrieben, ΔH° , ΔS° und schließlich auch ΔG° bestimmen. Zusätzlich wurde das cFaPydA auf sequenzabhängiges Paarungsverhalten stärker untersucht, wobei die jeweiligen, dem Schaden benachbarten Basen variiert wurden. Folgende Oligonukleotide wurden hierfür synthetisiert:

Bezeichnung der Sequenz	Nr. der dsDNA	Sequenz X= cFaPydA, Z= 8-Oxo-dA, Y= A, C, G, T	Masse (berechnet) [m/z]	Masse (gefunden) [m/z]
S1	D1	5' G-C-G-A-T-X-T-A-G-C-G 3' 3' C-G-C-T-A-Y-A-T-C-G-C 5'	[3397.0]	[3397.6] ⁺
S1	D7	5' G-C-G-A-T-Z-T-A-G-C-G 3' 3' C-G-C-T-A-Y-A-T-C-G-C 5'	[3395.0]	[3394.9] ⁻
S2	D2	5' T-G-C-A-G-T-X-A-C-A-G-C 3' 3' A-C-G-T-C-A-Y-T-G-T-C-G 5'	[3670.2]	[3669.7] ⁺
S2	D8	5' T-G-C-A-G-T-Z-A-C-A-G-C 3' 3' A-C-G-T-C-A-Y-T-G-T-C-G 5'	[3668.2]	[3669.3] ⁺
S3	D3	5' T-G-C-A-G-A-X-A-C-A-G-C 3' 3' A-C-G-T-C-T-Y-T-G-T-C-G 5'	[3679.2]	[3679.3] ⁻
S4	D4	5' T-G-C-A-G-G-X-A-C-A-G-C 3' 3' A-C-G-T-C-C-Y-T-G-T-C-G 5'	[3695.2]	[3695.5] ⁺

Tabelle 3: Auflistung der für die Schmelzpunktstudien verwendeten Sequenzen.

Die in Tabelle 3 dargestellten Oligonukleotide kennzeichnen die eingebauten DNA-Schäden (*c*FaPydA bzw. 8-Oxo-dA) mit **X** bzw. **Z** und die eingesetzten Gegenbasen (dA, dC, dG, dT) mit einem **Y**. Um eine optimale helikale Struktur zu ermöglichen, wurden die Sequenzen so gewählt, dass die jeweiligen DNA-Schäden in der Mitte des Duplexes lokalisiert waren.

Nachfolgend sind exemplarisch die für den *c*FaPydA-Schaden (D1 und D2) in Sequenz 1 (S1, X= *c*FaPydA) und Sequenz 2 (S2, X= *c*FaPydA) bei 3 μ M gemessenen Schmelzkurven und die zugehörigen *van` t Hoff Plots* dargestellt.

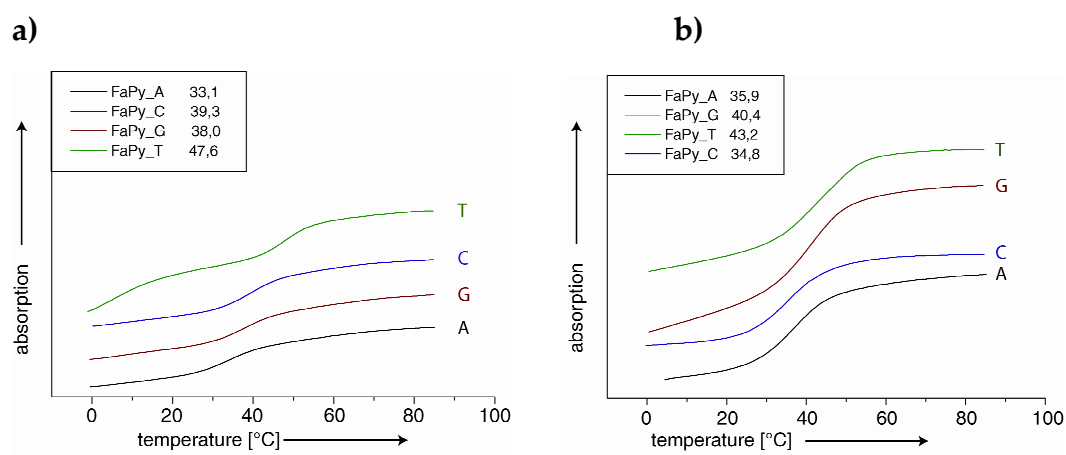


Abbildung 18: *c*FaPydA-Schmelzkurven bei 3 μ M von a) Sequenz 1 (S1, X= *c*FaPydA) und b) Sequenz 2 (S2, X= *c*FaPydA).

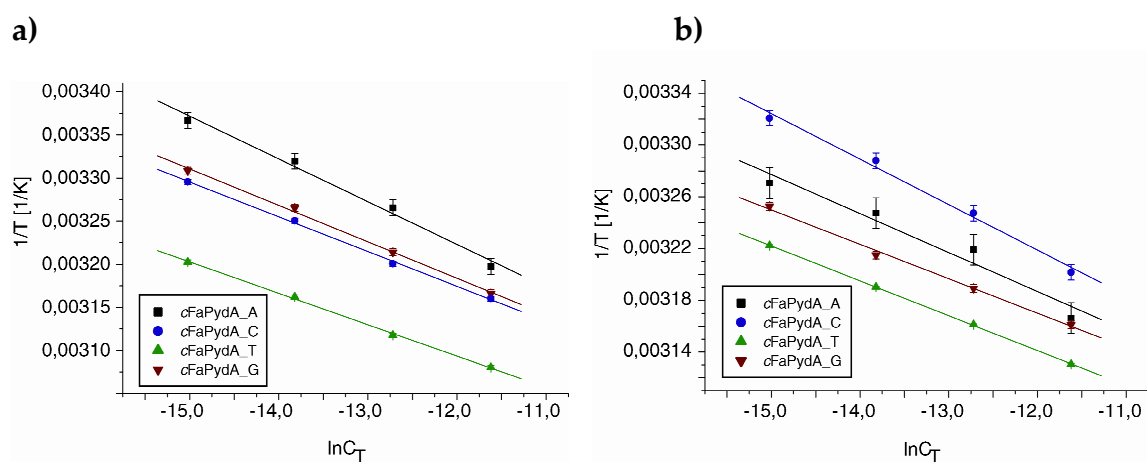


Abbildung 19: *van` t Hoff Plots* von *c*FaPydA der a) Sequenz 1 (S1, X= *c*FaPydA) und b) Sequenz 2 (S2, X= *c*FaPydA).

Die berechneten thermodynamischen Daten sind in Tabellenform zusammengefasst.

X, Y	T_m (°C)	ΔG°_{298K}	ΔH°	ΔS°
	3.0 μM	(kcal mol ⁻¹)	(kcal mol ⁻¹)	(cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
cFaPydA, dT ^{a)}	47.6	-11.8	-54.6	-143.5
cFaPydA, dG ^{a)}	38.0	-9.8	-47.0	-124.6
cFaPydA, dC ^{a)}	39.3	-10.1	-49.3	-131.3
cFaPydA, dA ^{a)}	33.1	-9.1	-40.1	-104.0
cFaPydA, dT ^{b)}	43.2	-12.1	-73.7	-206.7
cFaPydA, dG ^{b)}	40.4	-11.6	-74.7	-211.7
cFaPydA, dC ^{b)}	34.8	-9.8	-56.6	-156.8
cFaPydA, dA ^{b)}	35.9	-10.7	-66.0	-185.4

Tabelle 4: Thermodynamische Daten des cFaPydA in ^{a)} Sequenz 1 (S1, X= cFaPydA) und ^{b)} Sequenz 2 (S2, X= cFaPydA).

Im Fall von Sequenz 1 (S1, X= cFaPydA) sind die dem cFaPydA benachbarten Basen zwei Thymidine (zwei Pyrimidin-Basen). Die Duplexstabilität dieser Sequenz nimmt in der Reihe dT > dC \approx dG > dA ab. Während die Paarung von cFaPydA mit dT eine freie Dissoziationsenthalpie von -11.8 kcal/ mol aufweist, liegen die $\Delta\Delta G^{\circ}$ -Werte der *mismatch*-Paarungen um den betragsmäßigen Wert von 1.7-2.7 kcal/ mol tiefer. Vergleicht man diese Werte mit den von Sequenz 2 (S2, X= cFaPydA) erhaltenen, dann lässt sich recht gut eine deutliche thermische und auch energetische Stabilisierung der Paarung von cFaPydA mit dG feststellen. Dieser Gewinn von betragsmäßig 1.8 kcal/ mol tritt in einer Sequenz auf, in der cFaPydA sowohl von einer Pyrimidin- (Thymidin) als auch von einer Purin- (Adenosin) Base flankiert wird. Die bei der *mismatch*-Paarung von cFaPydA und Desoxyguanosin auftretende freie Dissoziationsenthalpie ist im Rahmen des

Fehlers nahezu identisch mit der freien Dissoziationsenthalpie der Paarung von cFaPydA und Thymidin. Vergleicht man die beiden Schmelzpunkte miteinander, so liegt der Schmelzpunkt der Paarung mit dT um knapp 3 °C höher. Beim Vergleich der Dissoziationsenthalpien ($-\Delta H^\circ$) und der Schmelzentropien ($-\Delta S^\circ$) dieser beiden Paarungen miteinander, wird eine geringfügig niedrigere Dissoziationsenthalpie und auch Schmelzentropie für die Paarung mit dG sichtbar. Es ist also für diese *mismatch*-Paarung ein größerer Energiebetrag notwendig, um den geringeren Entropiewert zu kompensieren und somit den höheren „Ordnungszustand“ auszugleichen. Die Paarungen mit Adenin und Cytidin liegen in dieser Sequenz 2 (S2, X= cFaPydA) mit einem $\Delta\Delta G^\circ$ von -1.4 kcal/mol ($\Delta T_m = 7$ °C) bzw. - 2.3 kcal/mol ($\Delta T_m = 8$ °C) niedriger als die Paarung mit dT. Die Stabilität des Duplexes (D2) nimmt in der Reihenfolge $dT \cong dG > dA \cong dC$ ab. Sequenz 2 wurde ebenfalls von *Greenberg et al.* zur Bestimmung von $T_m^{[40]}$ und $\Delta G^\circ^{[54]}$ verwendet und bietet somit die Möglichkeit zum direkten Vergleich der gemessenen Daten für das cFaPydA-Analogon mit dem in der *Greenberg*-Gruppe untersuchten α -, β -Gemisch. Der für Sequenz 2 gefundene Trend der Duplexstabilität und auch das hervorragende Paarungsvermögen von cFaPydA mit dG, sind in Übereinstimmung mit den von *M. M. Greenberg* für das FaPydA veröffentlichten Ergebnissen. Die gute Übereinstimmung der Daten verdeutlicht abermals, dass der Carbozyklus ein wirklich gutes bioisosteres und enantiomerenstabiles Analogon für den natürlichen Zucker ist.

Die für Sequenz 3 (S3, X= cFaPydA) und Sequenz 4 (S4, X= cFaPydA) erhaltenen Schmelzkurven (Abb. 20) und *van't Hoff Plots* (Abb. 21) sind auf nachfolgender Seite dargestellt. Die für diese beiden Sequenzen erhaltenen Ergebnisse finden sich in Tabelle 5 wieder.

Vergleicht man nun Sequenz 3 (S3, X= cFaPydA) mit Sequenz 2 (S2, X= cFaPydA), so liegt der Unterschied hier in einer einzigen Base (dT \rightarrow dA), welche allerdings starke Auswirkungen auf speziell die Duplexstabilität der Paarung mit dG

hervorrufen. In Sequenz 3 (S3, X= cFaPydA) wird der cFaPydA-Schaden nun von zwei Purinen (zwei Desoxyadenosinen) umgeben.

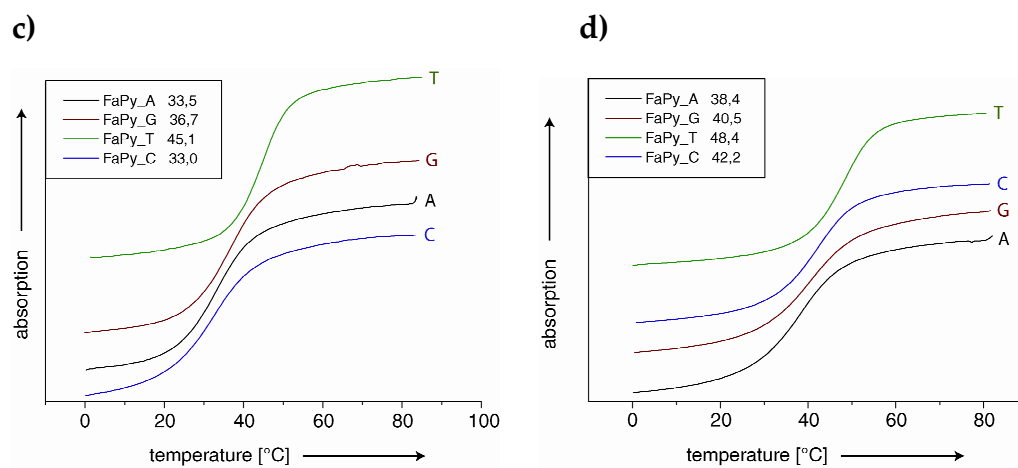


Abbildung 20: cFaPydA-Schmelzkurven bei 3 µM von c) Sequenz 3 (S3, X= cFaPydA) und d) Sequenz 4 (S4, X= cFaPydA).

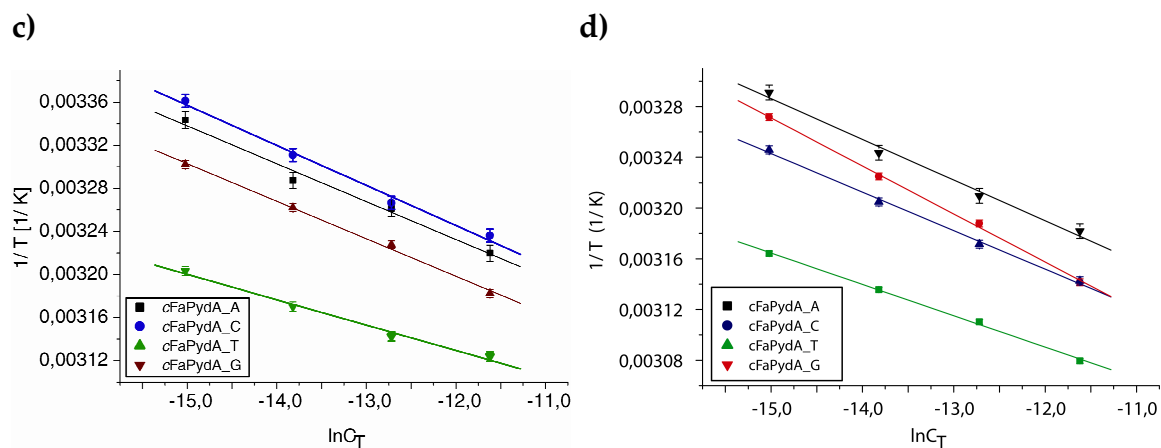


Abbildung 21: van't Hoff Plots von cFaPydA der c) Sequenz 3 (S3, X= cFaPydA) und d) Sequenz 4 (S4, X= cFaPydA).

Die beste Duplexstabilität wird einzig mit der *match*-Paarung von cFaPydA und dT erreicht ($\Delta G^\circ = -13.5$ kcal/ mol). Die Paarung mit Desoxyguanosin verschlechtert sich in dieser Sequenz dramatisch auf eine freie Dissoziationsenthalpie von

-10.2 kcal/ mol; das entspricht einer Differenz von $\Delta\Delta G^\circ = -3.3$ kcal/ mol in Bezug auf die *match*-Paarung.

X, Y	T_m (°C)	ΔG°_{298K}	ΔH°	ΔS°
	3.0 μM	(kcal mol ⁻¹)	(kcal mol ⁻¹)	(cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
cFaPydA, dT ^c	45.1	-13.2	-84.3	-238.3
cFaPydA, dG ^c	36.7	-10.2	-57.0	-157.0
cFaPydA, dC ^c	33.0	-9.3	-53.4	-147.8
cFaPydA, dA ^c	33.5	-9.6	-56.4	-157.0
cFaPydA, dT ^d	48.4	-13.9	-80.4	-223.2
cFaPydA, dG ^d	40.5	-10.6	-52.5	-140.6
cFaPydA, dC ^d	42.2	-11.8	-65.4	-179.7
cFaPydA, dA ^d	38.4	-10.5	-61.9	-172.4

Tabelle 5: Thermodynamische Daten des cFaPydA in c) Sequenz 3 (S3, X= cFaPydA) und d) Sequenz 4 (S4, X= cFaPydA).

Vergleicht man die Werte der freien Dissoziationsenthalpie (ΔG°) und der Schmelztemperaturen (T_m) von dieser Paarung (cFaPydA mit dG) mit den Werten der Paarung von Sequenz 2 (S2, X= cFaPydA), dann verschlechtert sich die Doppelstrang-Stabilität für dieses *mismatch*-Paar sowohl thermisch ($\Delta T_m = 4^\circ\text{C}$) als auch energetisch ($\Delta\Delta G^\circ = -1.4$ kcal/ mol). Stellt man nun die beiden *mismatch*-Paarungen cFaPydA:dG und cFaPydA:dA in Sequenz (3) gegenüber, so verursacht die Paarung mit dG zwar eine geringfügige, thermisch stabilere Paarung ($T_m = 3^\circ\text{C}$), allerdings lässt sich im Vergleich der freien Dissoziationsenthalpien nur ein äußerst geringer energetischer Gewinn gegenüber der Paarung mit dA verzeichnen; die freien Dissoziationsenthalpien liegen dicht beieinander. Die Paarung von cFaPydA mit dC ist in dieser Sequenz die schlechteste Paarung und liegt größenordnungsmäßig im Bereich der Paarung mit dA (S1, X= cFaPydA und S3, X= cFaPydA). Beim Gegenüberstellen der freien Dissoziationsenthalpien der

einzelnen Paarungen in dieser Sequenz 3, verschlechtert sich die Stabilität von $dT \gg dG > dA \cong dC$. Betrachtet man nun Sequenz 4 (S4, X= cFaPydA), dann wird der Schaden von zwei unterschiedlichen Purinbasen (dA und dG) begrenzt. Des Weiteren ist in dieser Sequenz 4 die gesamte Zahl an G:C-Basenpaaren um genau ein Basenpaar erhöht, was sich in dem Absolutwert jedes einzelnen Schmelzpunkts widerspiegelt. Die Schmelztemperatur der Basenpaarung von cFaPydA mit dT liegt bei $T_m = 48.4^\circ\text{C}$ und ist somit wieder am höchsten. Aber auch die beim Schmelzen freiwerdende Dissoziationsenthalpie und die zugehörige freie Dissoziationsenthalpie ist mit $\Delta G^\circ = -13.9 \text{ kcal/mol}$ am größten. Die Paarungen mit den restlichen drei möglichen Basen liegen in einem ähnlichen energetischen Zustand ($\Delta G^\circ = -10.5 - 11.8 \text{ kcal/mol}$). Insbesondere die Paarung mit dC zeigt zwar eine recht hohe freie Dissoziationsenthalpie ($\Delta G^\circ = -11.8 \text{ kcal/mol}$), allerdings liegt die energetische Differenz zur Paarung mit dT mit 2.1 kcal/mol recht hoch. Dennoch gestaltet sich diese Paarungsstabilität von cFaPydA mit Cytosin ($\Delta G^\circ = -11.8 \text{ kcal/mol}$) sehr spannend, da diese im Vergleich aller Sequenzen (S1-4, X= cFaPydA) in diesem Fall deutlich erhöht ist. Zusätzlich sehr interessant ist die Tatsache, dass es zwischen dem cFaPydA-Schaden und dem Cytosin nur dann zu einer Basenpaarbildung kommen kann, wenn der Schaden hierbei eine *syn*-Konformation einnimmt. Es ist anzunehmen, dass sich das Verhältnis von *syn* und *anti* durch die Wahl der Sequenz beeinflussen lässt. Speziell die Paarungen mit dA und dG sind im Vergleich der freien Dissoziationsenthalpien identisch. Interessanterweise unterscheiden sich diese beiden Paarungseigenschaften wieder im Bereich der Schmelzentropie (ΔS°). Während die Schmelzentropie der Paarungen von cFaPydA mit dG für gewöhnlich im Vergleich zu den anderen *mismatch*-Paarungen etwas zu niedrig war, kam es in dieser Sequenz (4) zu einem leicht erhöhten Entropiewert. Dieser „Entropiegewinn“⁹ wird durch eine

⁹ Es handelt sich hier natürlich nicht um einen wirklichen Entropiegewinn, da wir von einer negativen Entropieänderung sprechen, die lediglich im Vergleich innerhalb der Sequenz vom Wert deutlich höher liegt.

betragsmäßig kleinere Dissoziationsenthalpie kompensiert. Die freien Dissoziationsenthalpien nehmen in folgender Reihenfolge betragsmäßig ab: $dT \gg dC > dG \cong dA$.

Neben dem *c*FaPydA-Schaden wurden auch die Paarungseigenschaften des 8-Oxo-dA-Schadens untersucht. Hierzu wurde 8-Oxo-dA *via* Festphasensynthese in die Oligonukleotide (D7 und D8) mit der Sequenz 1 (S1, Z= 8-Oxo-dA) und Sequenz 2 (S2, Z= 8-Oxo-dA) eingebaut. Die zugehörigen Schmelzkurven und *van't Hoff Plots* sind nachfolgend abgebildet, und die thermodynamischen Daten sind anschließend tabellarisch zusammengefasst.

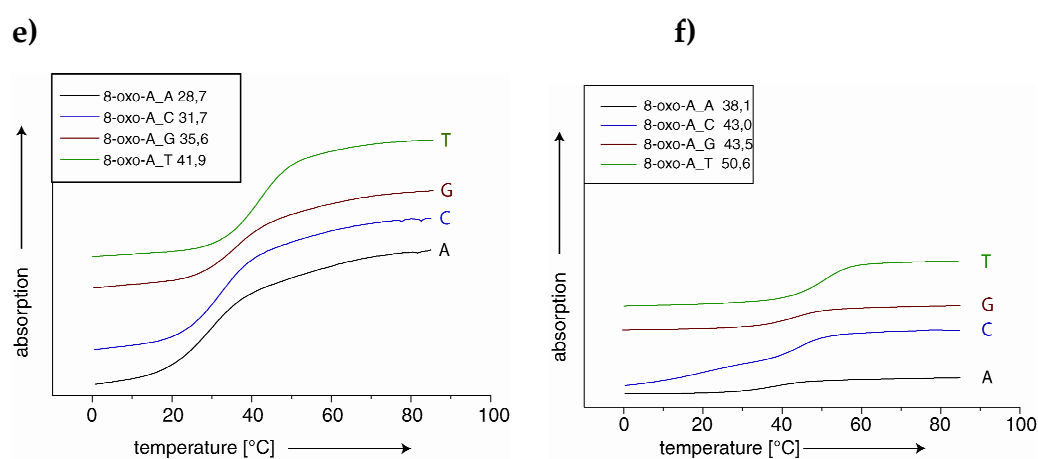


Abbildung 22: Schmelzkurven von 8-Oxo-dA in e) Sequenz 1 (S1, Z= 8-Oxo-dA) und f) Sequenz 2 (S2, Z= 8-Oxo-dA).

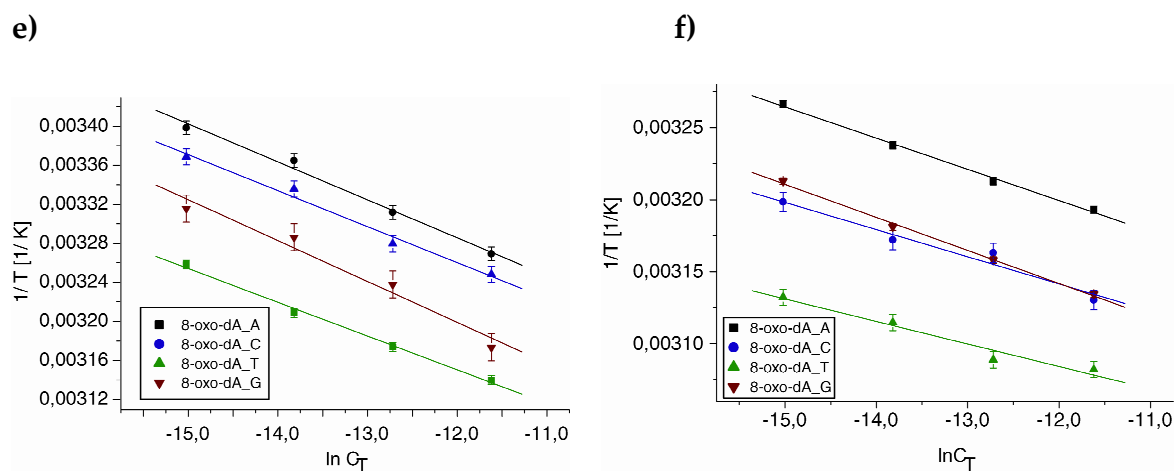


Abbildung 23: *van't Hoff Plots* von 8-Oxo-dA in e) Sequenz 1 (S1, Z= 8-Oxo-dA) und f) Sequenz 2 (S2, Z= 8-Oxo-dA).

X, Y	T _m (°C)	ΔG° _{298K}	ΔH°	ΔS°
	3.0 μM	(kcal mol ⁻¹)	(kcal mol ⁻¹)	(cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
8-Oxo-dA, dT ^{e)}	41.9	-11.0	-57.4	-155.7
8-Oxo-dA, dG ^{e)}	35.6	-9.6	-47.4	-126.7
8-Oxo-dA, dC ^{e)}	31.7	-9.1	-53.9	-150.2
8-Oxo-dA, dA ^{e)}	28.7	-8.5	-51.1	-142.7
8-Oxo-dA, dT ^{f)}	50.6	-17.6	-127.1	-367.0
8-Oxo-dA, dG ^{f)}	43.5	-13.1	-86.6	-246.7
8-Oxo-dA, dC ^{f)}	43.0	-14.1	-105.3	-305.9
8-Oxo-dA, dA ^{f)}	38.1	-11.9	-91.7	-267.8

Tabelle 6: Thermodynamische Daten von 8-Oxo-dA; e) Sequenz 1 (S1, Z= 8-Oxo-dA) und f) Sequenz 2 (S2, Z= 8-Oxo-dA).

Im Fall von 8-Oxo-dA ist die Paarung mit Thymidin in jedem Fall (S1 und S2) thermisch und energetisch die stabilste Paarung. Die freien Dissoziationsenthalpien des cFaPydA-Schadens und des 8-Oxo-dA-Schadens in Sequenz 1 liegen sehr dicht beieinander ($\Delta\Delta G^{\circ}_{cFaPydA-8OA} = 0.8$ kcal/ mol). Die Paarungen mit den restlichen drei Basen verlaufen weitaus schlechter. Anders als im Fall des cFaPydA zeigt sich für das 8-Oxo-dA eine -1.9 kcal/ mol schwächere *mismatch*-Paarung mit dC. Die Basenfehlpaarung von 8-Oxo-dA mit dG befindet sich in einem ähnlichen energetischen und auch entropischen Zustand, wie auch die Fehlpaarung von cFaPydA:dG. Interessant ist auch hier, dass es im Fall der *mismatch*-Paarung mit dG zu einem größeren Entropiewert kommt, welcher durch einen ebenfalls größeren Enthalpiewert ausgeglichen wird. Beim Vergleich der energetischen und auch der thermischen Stabilität der beiden *mismatch*-Paarungen 8-Oxo-dA:dG bzw. 8-Oxo-dA:dC fällt auf, dass die beiden *mismatches* zwar nahezu identische freie Dissoziationsenthalpien (0.5 kcal/ mol) aufweisen, allerdings eine

Diskrepanz in der thermischen Stabilität von 4°C zeigen. Zusammen mit dem erhöhten Entropiewert von dG deutet dies auf eine relativ rigide Basenpaarbildung hin. Die geringste Duplexstabilität wird im Fall von 8-Oxo-dA, ebenso wie im Fall von cFaPydA, mit Adenosin gefunden. Abschließend ergibt sich für diese Sequenz 1 (S1, Z= 8-Oxo-dA) für das 8-Oxo-dA folgende Stabilitäts-Reihenfolge: dT > dG > dC > dA. Deutliche Unterschiede im Paarungsverhalten von 8-Oxo-dA und cFaPydA werden beim Vergleich der thermodynamischen Daten von Sequenz 2 sichtbar. In Sequenz 2 zeigt 8-Oxo-dA eine wirklich deutliche Bevorzugung für die Paarung mit dT¹⁰, cFaPydA allerdings begünstigte die Paarung mit dG nahezu gleichermaßen wie die mit dT. Des Weiteren findet sich beim Vergleich der beiden *mismatches* 8-Oxo-dA:dG bzw. 8-Oxo-dA:dC eine klare Differenz zwischen der thermischen und der energetischen Stabilität. Während der *mismatch* von 8-Oxo-dA mit dG den zweit-höchsten Schmelzpunkt zeigt, ist der für diese Fehlpaarung zugehörige Wert für ΔG° betragsmäßig zu niedrig. Genau umgekehrt verhält es sich im Falle der Paarung mit dC. Hier liegt der Schmelzpunkt zwar nur um 0.5 °C niedriger, allerdings ist der Wert für ΔG° betragsmäßig zu hoch. Beim Vergleich beider freien Dissoziationsenthalpien liegt ΔG° (8OA:dC) um genau 1.0 kcal/ mol höher als im Fall von dG. Dies bedeutet, dass im Fall einer Paarung mit dG diese auf thermischer Ebene etwas stabiler ist, allerdings liegt die „Triebkraft“ für diese Paarung niedriger als im Fall von dC. Spannend sind auch hier wieder die Abweichungen im entropischen- und somit auch im enthalpischen Wert der Paarung zu Desoxyguanosin. Wie auch in Sequenz 1 (S1, Z= 8-Oxo-dA) liegen der Wert für die Schmelzentropie und somit auch der Wert für die Dissoziationsenthalpie etwas höher. Dieser Effekt deutet auf eine starke, vielleicht sogar starre, Basenfehlpaarung hin, da es beim Schmelzen zu einer großen Entropiezunahme kommt. Die enthalpische Duplexstabilität (D8) für Sequenz 2 (S2, Z= 8-Oxo-dA) nimmt in der Reihenfolge dT >> dC > dG > dA ab.

¹⁰ Wie auch schon im Fall von Sequenz (1)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *cFaPydA* im Gegensatz zum 8-Oxo-dA ein sequenzabhängiges Paarungsverhalten zeigt, das am deutlichsten in der Sequenz 2 (S2, X= *cFaPydA*) zu beobachten ist (siehe Abb. 24). Sofern *cFaPydA* sich in einem Purin-Purin-Konstrukt befindet, liegt die Paarungsstabilität mit dT deutlich über der Duplex-Stabilität der anderen Basen. Eine Annäherung an die Stabilität der Paarung mit dT wird nur im Fall des Pyrimidin-Purin-Konstrukts erreicht. Ebenso scheint die Paarungsstabilität des *cFaPydA*:dC-*mismatch* sequenzabhängig zu sein. Da die Paarung mit dC nur in einer *syn*-Konformation stattfinden kann, ist der potentielle Einfluss der Sequenz auf ein *syn*-/ *anti*-Verhältnis äußerst interessant.

Die nachfolgenden Balkendiagramme stellen die freien Dissoziationsenthalpien von *cFaPydA* und 8-Oxo-dA bzw. von *cFaPydA* in allen vier Sequenzen dar.

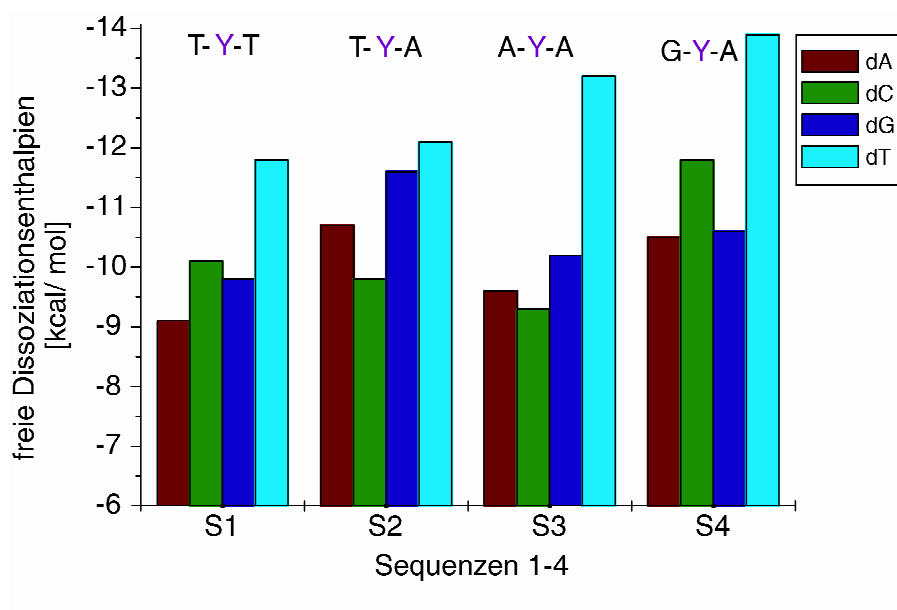


Abbildung 24: Vergleich der Freien Dissoziationsenthalpien von *cFaPydA* gegenüber den vier Basen in den Sequenzen (1-4).

4.1.3 Mögliche Fehlpaarungskonstrukte

Nachfolgend sind die möglichen Wasserstoffbrückenbindungsmuster der auftretenden (Fehl-)Paarungen dargestellt (Abb. 25). Aufgrund der zusätzlichen Rotationsfreiheitsgrade der Formamidgruppe und der möglichen Rotation um die C1`NH-Bindung (*syn*-Konformation!), besteht hier eine größere Vielfalt an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen.

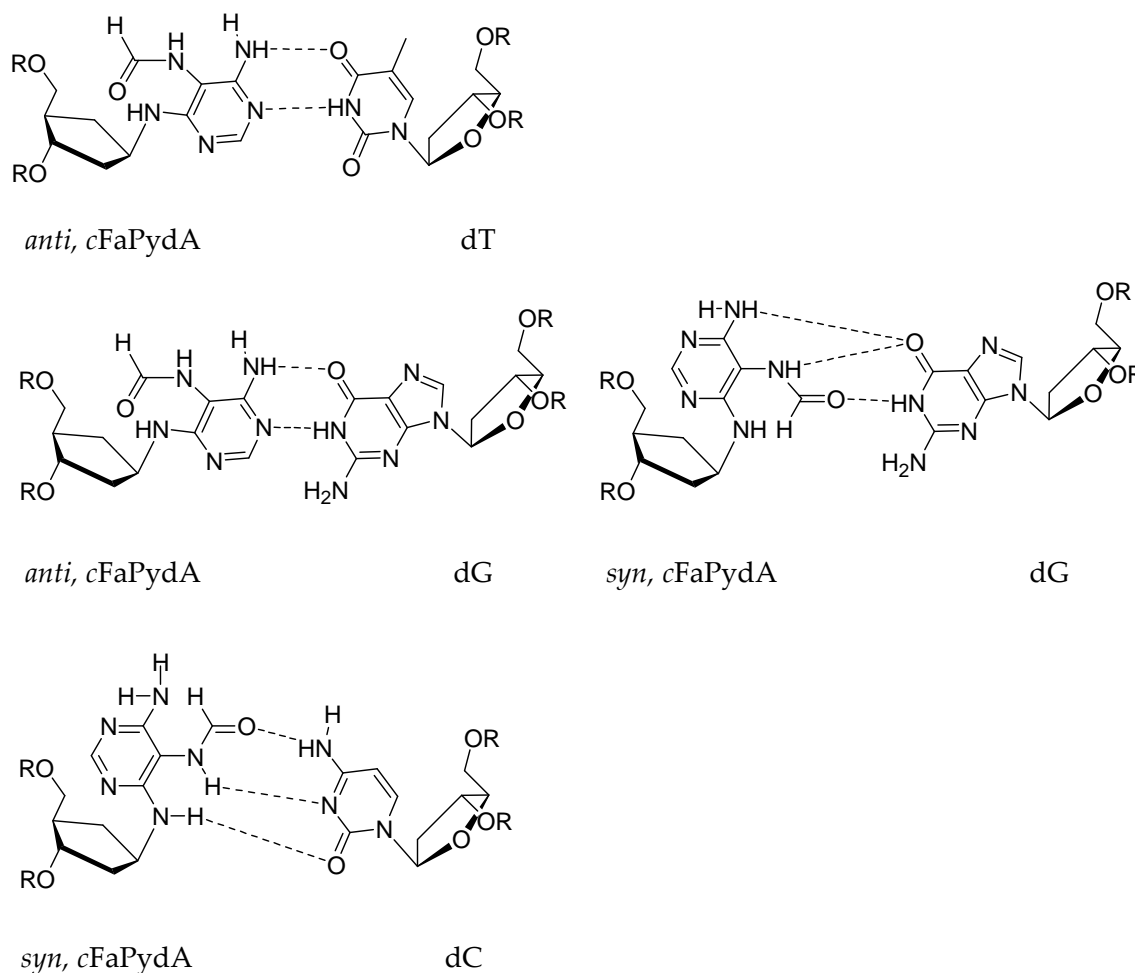


Abbildung 25: Denkbare Wasserstoffbrückenbindungen der auftretenden (Fehl-) Paarungen.

Die Paarung von cFaPydA mit dT zeigt sehr wahrscheinlich dasselbe *Watson-Crick*-Muster wie es auch bei einer „normalen“ dA:dT-Paarung vorkommt. Mit

Desoxyguanosin ist sowohl in *anti*- als auch in *syn*-Konformation die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen denkbar. Speziell die Ausbildung des gabelförmigen Wasserstoffbrückenbindungsmuster von *syn*-*c*FaPydA:dG wurde auch schon von der *Greenberg*-Gruppe postuliert.^[54] Im Fall von Desoxycytidin ist eine Paarung mit dem *c*FaPydA einzig in der *syn*-Konformation möglich ist.

4.1.4 Zusammenfassung

- *c*FaPydA:dT-Paarungen sind in jeder von mir untersuchten Sequenz die thermisch- und auch energetisch- stabilsten Paarungen.
- *c*FaPydA zeigt darüber hinaus ein sequenzabhängiges Paarungsverhalten, welches Fehlpaarungen zulässt.
- In einer Purin-Purin-Umgebung paart *c*FaPydA am besten mit Thymin, während in einer Purin-Pyrimidin-Umgebung die Fehlpaarung mit Guanosin stark begünstigt wird. Befindet sich *c*FaPydA in einer Pyrimidin-Pyrimidin-Umgebung, so wurde die Paarung mit Cytosin energetisch und thermisch stärker stabilisiert.
- Der Vergleich des Carbozyklus-Analogons mit dem von *Greenberg et al.* untersuchten zeigt eine gute Übereinstimmung der erhaltenen ΔG° -Daten.
- 8-Oxo-dA zeigte im Vergleich mit *c*FaPydA keinerlei Tendenz, Fehlpaarungen auszubilden, obwohl diese beiden Schäden ähnliche Wasserstoffbrückenbindungsdonor- und -akzeptorgruppen besitzen. Dies lässt sich vermutlich auf die zusätzlichen Rotationsfreiheitsgrade des Formamid-Schadens zurückführen, welche alternative Bindungsmuster gestatten.

4.2 Kraffeldberechnung

Zur Aufklärung des Verhältnisses von *anti*- zur *syn*-Konformation im FaPydA- und dem carbozyklischen FaPydA-Schaden wurden die Rotationsprofile für die Drehung der C1'-NH-Bindung (berechnet mit SYBYL 6.3 mmff94s) durchgeführt¹¹. Für die Berechnung (Abb. 26) wurde schrittweise (jeweils um 1°) um die C1'-NH-Bindung gedreht und das Molekül in jedem einzelnen Schritt einer vollständigen Geometrieoptimierung unterworfen¹². Die 3'- und die 5'-OH-Gruppen wurden methyliert, um hier zusätzlich auftretende Wasserstoffbrücken zu unterbinden und die unpolare Natur des DNA-Strangs nachzuahmen. Die erhaltenen Ergebnisse konnten darüber hinaus mit den aus den Berechnungen für den cFaPydG-Schaden erhaltenen Ergebnissen verglichen werden^[82].

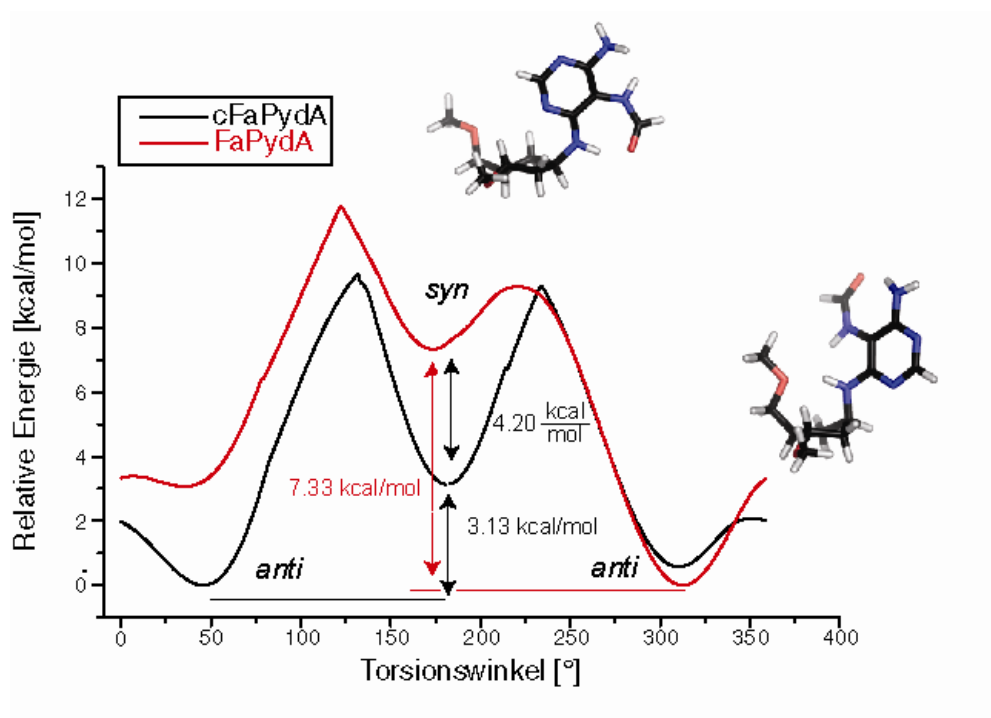


Abbildung 26: Vergleich der relativen Energien bzgl. *syn*- und *anti*-Minima von cFaPydA und FaPydA (Drehung um die glykosidische Bindung in 1°-Abständen).

¹¹ Die Kraffeldberechnungen wurden freundlicherweise von Dipl.-Chem. Johannes Gierlich durchgeführt.

¹² Die Berechnung wurde in der Gasphase durchgeführt.

Im Rotationsprofil sind Unterschiede zwischen dem carbozyklischen FaPydA und dem natürlichen FaPydA-Schaden erkennbar. Die Lage der *syn*- und *anti*-Minima ist zwar identisch, doch sind diese energetisch verschieden. Das Potential des Carbozyklus ist fast symmetrisch, während bei dem Zuckerbaustein der Sauerstoff im Ring das erste *anti*-Minimum ungünstig beeinflusst. Deutlicher werden die Unterschiede jedoch bei der *syn*-Konformation der Bausteine. Bedingt durch die höhere Flexibilität des Carbozyklus ist das Minimum im Vergleich zum Zucker um 4.2 kcal/ mol abgesenkt. Daraus ergibt sich ein *syn*-/ *anti*-Energieunterschied von nur 3.13 kcal/ mol im Gegensatz von 7.3 kcal/ mol beim FaPydA. Diese geringere Energiedifferenz von nur 3.13 kcal/ mol ermöglicht dem cFaPydA-Schaden sowohl eine *syn*- als auch eine *anti*-Konformation einzunehmen. Anhand des NOESY-Spektrums des TBDMS-geschützten cFaPydA (Abb. 12) konnte sogar eine ausschließliche Bevorzugung der *syn*-Konformation gegenüber der *anti*-Konformation beobachtet werden.

Die Berechnungen zeigen zwar Unterschiede im *syn*-/ *anti*-Verhalten zwischen dem natürlichen und dem carbozyklischen FaPydA, doch lassen sich daraus nur bedingt Schlüsse über das Verhalten in wässriger Umgebung und in DNA ziehen. Das Rotationsprofil des cFaPydG^[82] zeigt eine deutliche Bevorzugung für die *anti*-Konformation. Die für diesen Schaden ermittelten Potentialflächen gewähren hier jegliche Drehung der N-C(Base)-Bindung innerhalb eines energiearmen *anti*-Bereichs. Der Vergleich der relativen Energien von cFaPydA mit cFaPydG weisen darauf hin, dass der *syn*-Zustand im cFaPydG weniger bevorzugt zu sein scheint, da die Energiedifferenzen hier zwischen *syn* und *anti* erheblich höher liegen (~6 kcal/mol).

4.2.1 **Zusammenfassung**

- Die Lage der *syn-/* und *anti*-Minima sind für FaPydA, cFaPydA, FaPydG und cFaPydG sehr ähnlich.
- Die für die FaPydA-Berechnung erhaltenen Energieminima zeigen dass der Energieunterschied zwischen der *syn-/* und *anti*-Konformation im Fall des carbozyklischen FaPydA-Schaden deutlich niedriger liegt als im Fall des Zuckerbausteins.
- Die Energieminima des cFaPydA-Schadens liegen im Allgemeinen etwas höher als die des entsprechenden Zuckers.
- Die Paarungsfähigkeit des cFaPydA mit dC lässt sich anhand dieser Berechnungen nicht ausschließen.

4.3 Replikationskinetiken

Die *Primer Extension* Studien liefern wichtige Erkenntnisse über das spezielle Replikationsverhalten bestimmter Polymerasen gegenüber ausgewählten DNA-Schäden. Während bei den thermodynamischen Daten eine Aussage über die Paarungsstabilität eines Schadens gegenüber den vier Basen getroffen wird, liefert die *Primer Extension* eine Aussage, welche Base von welcher Polymerase nun bevorzugt gegenüber eines DNA-Schadens eingebaut wird. Mit diesen Daten lassen sich qualitative und auch quantitative Abschätzungen über das mutagene Potential einzelner DNA-Schäden vornehmen. Untersucht wurden hier wieder der *c*FaPydA- und auch der 8-Oxo-dA-Schaden. Grundsätzlich können vier verschiedene Fälle (a-d) während des Replikationsprozesses auftreten:

- a) Der DNA-Schaden beeinflusst die Basenpaarung nicht negativ und lässt die Inkorporation der „korrekten“ Base durch die Polymerase zu.
- b) Aufgrund eines veränderten Basenpaarungsverhaltens verursacht der DNA-Schaden Mutationen (Transversionen bzw. Transitionen), indem der Einbau einer zu der Ursprungsbasis nicht-komplementären Base bevorzugt wird.
- c) Im Fall des Einbaus einer zur Ursprungsbasis nicht-komplementären¹³ Base kann diese Fehlpaarung durch die entsprechenden Korrekturleseeinheiten (*proofreading*) einer Polymerase erkannt und herausgeschnitten werden, oder aber durch entsprechende Reparaturenzyme repariert werden.
- d) DNA-Schäden können auch zum Replikationsstop führen, der letztendlich in der Zelloptose endet.

¹³ Zum DNA-Schaden komplementäre Base!

4.3.1 Theoretischer Hintergrund

Es gibt zwei Möglichkeiten, unter Fließgleichgewichtsbedingungen (*steady state*) die Replikationsgeschwindigkeit und auch –genauigkeit von DNA-Polymerasen gegenüber DNA-Modifikationen zu ermitteln:^[96-98]

1) Competition Assay

Hier wird der Einbau von zwei Nukleotiden in einen DNA-Strang direkt miteinander verglichen.

2) Kinetic Assay

Bei diesem *Assay* wird jeweils der Einbau eines einzelnen Nukleotids mit unterschiedlichen Konzentrationen gemessen und anschließend – um eine Aussage über die Inkorporationsgenauigkeit treffen zu können – mit den Daten der restlichen Nukleotide verglichen.

Beide Verfahren liefern prinzipiell dieselben Ergebnisse und unterscheiden sich in ihrer Durchführung, welche sich im Fall des *Kinetic Assays* praktikabler gestaltet.

Für die Durchführung des *Kinetic Assay* können unterschiedliche Modelle zum Einsatz kommen, welche sich im jeweiligen Primer-Templat-Konstrukt bzw. in den Eigenschaften der jeweilig eingesetzten Polymerase unterscheiden. Unterschieden wird zwischen dem:

a) *Standard* Modell („*Running*“- und „*Standing*“-Start)

b) *Proofreading* Modell

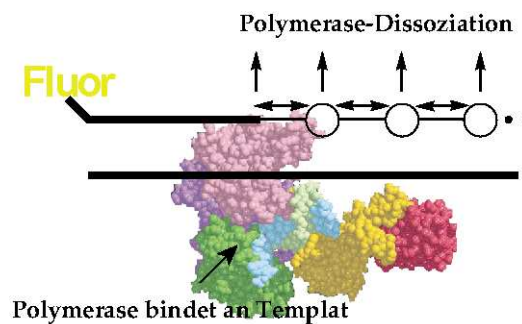
Beide Modelle sind den Bedingungen des *Single Completed Hit Model* (SCH) unterstellt.

Das SCH (Abb. 27) setzt voraus, dass jeder DNA-Strang maximal mit einem Polymerasemolekül in Kontakt steht. In der Praxis bedeutet dies, dass:

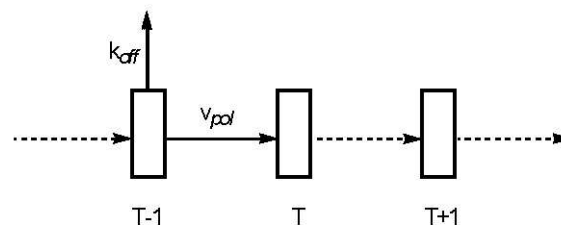
- 1) die Menge an verlängertem Primer ($n+1$) unter 20 % Umsetzung bleibt, und
- 2) dass die für die Reaktion eingesetzte totale Konzentration an Polymerase mindestens 5 % geringer ist als die eingesetzte Primer-Templat-Konzentration.

Die unterschiedlichen Kinetik-Modelle sind in Abbildung (27) schematisch dargestellt.

a) Single Completed Hit



b) Standard Polymerase Modell



c) Exonuclease Modell

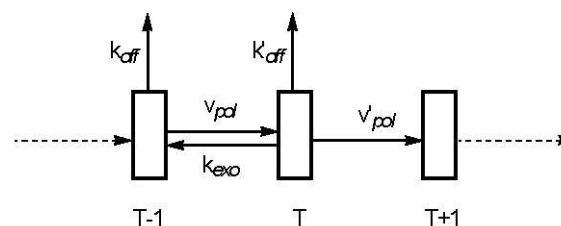


Abbildung 27: Kinetik-Modelle. a) Zeigt stark vereinfacht das SCH Modell; in b) und c) sind schematisch die kinetischen Abläufe des Standard Polymerase Modells und des Exonuclease Modells dargestellt.

Beim *Standard* Modell werden die Wahrscheinlichkeiten, mit der eine Polymerase an der Position T-1 dissoziiert (k_{off}) bzw. weiter polymerisiert (v_{pol}), über die *Michaelis-Menten-Gleichung*^[99] miteinander in Beziehung gesetzt. Besitzt die eingesetzte Polymerase auch die Möglichkeit des Korrekturlesens (*proofreading*), so komplizieren sich die mathematischen Verhältnisse, da nun drei zusätzliche Schritte (k_{exo} , k'_{off} und v'_{pol}) mitberücksichtigt werden müssen. Die Polymerase besitzt jetzt zusätzlich die Möglichkeit, nochmals zurückzugleiten, um die falsch eingebaute Base zu eliminieren.

Im *Standard* Modell lässt sich ferner noch zwischen dem *Running Start* (Warmstart) und dem *Standing Start* (Kaltstart) unterscheiden. Der Unterschied bei diesen zwei Methoden liegt im Primer-Templat-Konstrukt begründet. Während beim *Running Start* der Primer so gewählt ist, dass dieser 2-3 Basen vor der im Gegenstrang befindlichen Modifikation endet, befindet sich das 3'-Ende des Primer-Templat-Konstrukts im Fall des *Standing Start* direkt eine Base vor der Modifikation, so dass die erste einzubauende Base direkt gegenüber dem DNA-Schaden inkorporiert wird.

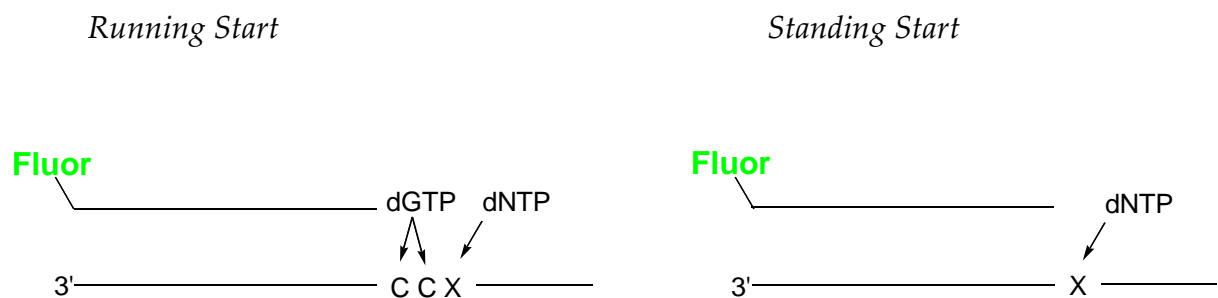


Abbildung 28: Vergleich der unterschiedlichen Primer-Templat-Konstrukte des *Running*- und *Standing Start*. Fluor= Fluorescein.

Die *Running Start*-Methodik wird typischerweise für die Messung der Geschwindigkeit und Genauigkeit des Nukleotid-Einbaus verwendet. Hierbei sind die im Templatstrang zwischen 3'-Primer-Ende und Modifikation befindlichen Basen zueinander identisch, allerdings unterschiedlich im Vergleich

zur komplementären Base der sich im Anschluss befindlichen Modifikation. Für die Verlängerungsreaktion wird das jeweilige Nukleotid-Triphosphat (dNTP) mit einer recht hohen Konzentration eingesetzt, und die für die Modifikation zu untersuchende komplementäre Base wird in variablen Konzentrationen hinzugefügt.

Beim *Standing Start* werden Nukleotidtriphosphate unterschiedlicher Konzentrationen nacheinander auf eine Verlängerung des Primers (n+1) untersucht. Bei dieser Methodik werden die bei der Modifikation mit unterschiedlichen Nukleotidtriphosphaten erhaltenen Kinetiken mit den Inkorporationsgeschwindigkeiten von ungeschädigten Strängen verglichen, da es hier nicht wie im Fall des *Running Start* einen „internen Standard“ gibt.

Standing Start (Kaltstartmethode)

Für die *Primer Extension* Studien von cFaPydA und 8-Oxo-dA wurde die Kaltstartmethode gewählt. An der Position T-1 gibt es für die Polymerase zwei Möglichkeiten fortzufahren. Entweder das Enzym dissoziiert (p_{dis}) oder aber startet mit der Polymerisierungsreaktion (p_{pol}). Zusammen mit der Dissoziationsgeschwindigkeit und der Inkorporationsgeschwindigkeit ergibt sich für die Wahrscheinlichkeiten:

$$p_{dis} = \frac{k_{dis}}{v_{pol} + k_{dis}} \quad \text{und} \quad p_{pol} = \frac{v_{pol}}{v_{pol} + k_{dis}} \quad (13)$$

Das Dissoziieren einer Polymerase mit der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{dis} ist polymerasenspezifisch und unabhängig von der Nukleotidtriphosphatkonzentration. Die Inkorporationsgeschwindigkeit v_{pol} hingegen ist abhängig von der Nukleotidtriphosphatkonzentration. Damit eine Aussage über die Effektivität der Primerverlängerung getroffen werden konnte, wurde das durch die Primerverlängerung neu entstandene Signal (Gelbande, Fluoreszenz-Signal,

Radioaktivität etc.) quantifiziert. Zur Quantifizierung gibt es je nach Wahl der Methode unterschiedliche Möglichkeiten. Im Fall der Kapillargelelektrophorese wurden die Peakflächen von verlängertem und nicht-verlängertem Primer integriert und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Betrachtet man nun die Intensitäten von Primer (I_{T-1}) und Verlängerung (I_T), so lassen sich diese mit den Wahrscheinlichkeiten p_{dis} und p_{pol} gleichsetzen.

$$\frac{I_T}{I_0} = \frac{p_{pol}}{p_{dis}} \quad (14)$$

Hierbei ist I_T die Intensität der Verlängerung und I_0 das Gesamtintegral über alle Peaks. Geht man davon aus, dass die Geschwindigkeiten proportional zum Anteil an aktiver Polymerase (α) sind, so erhält man für die Inkorporationsgeschwindigkeit bzw. für V_{max} folgenden Ausdruck:

$$v'_{pol} = \alpha \cdot v_{pol} = \alpha \cdot k_{dis} \cdot p = \frac{[Pr]_0}{t} \cdot \frac{I_T}{I_0} \quad (15)$$

$$V'_{max} = \alpha \cdot V_{max} = \alpha \cdot k_{dis} \cdot p_{max} = \frac{[Pr]_0}{t} \cdot \frac{I_{T,max}}{I_0} \quad (16)$$

$[Pr]_0$ = Ausgangskonzentration des Primers

t = Reaktionszeit

I_T = Intensität des verlängerten Primers ($n+1$)

I_0 = Gesamtintensität ($I_T + I_{T-1}$)

Auf die Kaltstartmethode lässt sich die *Michaelis-Menten-Gleichung* (17) anwenden, indem Gleichung (15) in (17) eingesetzt wird:

$$v_{pol} = \frac{V_{max} \cdot [dNTP]}{K_M + [dNTP]} \quad \text{Michaelis-Menten-Gleichung} \quad (17)$$

$$\frac{[Pr]_0}{t} \cdot \frac{I_T}{I_0} = \frac{V_{max} \cdot [dNTP]}{K_M + [dNTP]} \quad (18)$$

Da V_{max} eine konzentrationsabhängige Größe ist, wird zusätzlich der k_{cat} -Wert bestimmt, indem V_{max} durch die entsprechende Enzymkonzentration dividiert wird.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} \quad (19)$$

Die Inkorporationsspezifität f_{ins} lässt sich nach *Fersht* wie folgt berechnen.

$$f_{ins} = \frac{(V_{max} / K_m)_f}{(V_{max} / K_m)_r} \quad (20)$$

f = „falsches“ Nukleotid

r = „richtiges“ Nukleotid

Zur Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit v_{pol} als Funktion der Triphosphatkonzentration $[dNTP]$, wurde v_{pol} gemäß Gleichung (18) über das Verhältnis der integrierten Flächen berechnet.

Die *Michaelis-Menten*-Konstante K_M und die Maximalgeschwindigkeit V_{max} ließen sich aus den, bei verschiedenen Substratkonzentrationen, gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten durch reziproke Auftragung (Formel 21) der *Michaelis-Menten*-Gleichung ableiten.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{dNTP} \quad \text{Lineweaver-Burk-Diagramm} \quad (21)$$

$$Y = b + m \cdot X$$

Aus der Geradengleichung lässt sich über den y-Achsenabschnitt (b) und der Steigung (m) V_{\max} und K_M berechnen:

$$b = 1 / V_{\max} \quad (22)$$

$$m = K_M / V_{\max} \quad (23)$$

4.3.2 Durchführung der Primer Extension mit Klenow exo

Die Enzymkinetik wurde unter den von Goodman^[96, 97] beschriebenen *Single Completed Hit*-Bedingungen nach der *Standing Start*-Methode durchgeführt. Das hierfür verwendete Primer-Templat-Konstrukt ist im Folgenden abgebildet.

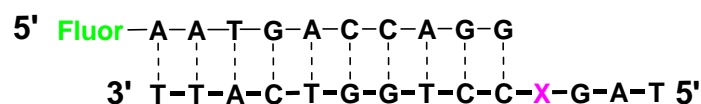


Abbildung 29: Das für die *Primer Extension* verwendete Primer-Templat-Konstrukt (Smp. 47.2°C). **X** steht in diesem Fall für die beiden untersuchten DNA-Schäden cFaPydA und 8-Oxo-dA und für das ungeschädigte Desoxyadenosin. Fluor= Fluorescein.

Es wurden insgesamt drei Primer-Templat-Hybride (**X**= cFaPydA, 8-Oxo-dA und Desoxyadenosin) untersucht, wobei **X** die Position der jeweiligen Modifikation bzw. Base kennzeichnet. Die Fluorescein-Markierung am Primer erspart die aufwendigere radioaktive Markierung, welche ohne spezielle Laborausstattung und komplizierten Genehmigungsverfahren, nicht durchzuführen ist, und ermöglicht gleichzeitig eine einfache Detektion des Primers durch eine

laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion (LIF-Detektor). Die Auftrennung der fluorescein-markierten Primer unterschiedlicher Länge erfolgte an einer Kapillargelelektrophorese. Hierzu wurden Kapillaren verwendet, welche mit einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel gefüllt waren. (Für weitere Details siehe „Material und Methoden“ sowie „Experimenteller Teil“.)

Um für die *Primer Extension* gültige¹⁴ und auch optimalen Reaktionsbedingungen zu finden, wurde bei einer recht hohen Nukleotidkonzentration (500 μM) durch die systematische Veränderung der einzelnen Parameter wie Enzymkonzentration, Reaktionszeit, Temperatur und Puffer die idealen Bedingungen herausgefiltert. Da es sich bei Kinetik-Messungen um sehr fehleranfällige Messungen handelt, wurden für die jeweiligen Konzentrationsmessungen unabhängige Mehrfachmessungen durchgeführt. Aus den erhaltenen Intensitäten von verlängertem und nicht-verlängertem Primer, wurden die jeweiligen Mittelwerte gebildet und zur Berechnung der Geschwindigkeiten verwendet.

4.3.3 Ergebnisse der Enzymkinetik

Die Frage nach der Mutagenität bzw. der Rolle von FaPydA-Schäden stellt sich schon sehr lange und wurde in früheren Arbeiten durch die Verwendung unterschiedlicher Modelle versucht zu beantworten. Frühere Studien zum speziellen Verhalten von FaPydA-Schäden basierten entweder auf „*randommäßig*“ erzeugten FaPydA-Schäden, wobei Desoxyadenosin enthaltende DNA-Stränge durch oxidativen Stress geschädigt wurden, oder auf der Untersuchung von *N7*-methylierten-FaPydA (MeFaPydA), welches durch Methylierung von Desoxyadenosin und anschließender Ringöffnung erzeugt wurden.^[38, 55] Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Fehleinbau von dC gegenüber FaPydA

¹⁴ Nach SCH- Bedingungen gültige Beziehung, wie eine Umsatzrate unter 20 % und mind. 5 % weniger Enzym im Vergleich zum Primer-Templat-Hybrid.

postuliert, wobei der Formamid-Schaden – speziell im nicht-methylierten Zustand – eine *syn*-Konformation einnehmen sollte. Die von Greenberg *et al.* mit einem α -, β -Gemisch erhaltenen Ergebnisse zeigten keine Bevorzugung des Einbaus von dC, sondern eine um 30-50% gesteigerte Inkorporationsspezifität von dA bzw. dG gegenüber diesem Gemisch.^[54] Um etwas mehr Klarheit in diese zunächst widersprüchlichen Paarungseigenschaften von FaPydA zu bringen, wurde das eindeutig in β -Konfiguration vorliegende carbozyklische Analogon hinsichtlich der Inkorporationseffizienz zunächst mit Klenow *exo* untersucht. Die gemessenen kinetischen Parameter (K_M , V_{max}) und Inkorporationsspezifitäten (f_{ins}) sind in nachstehender Tabelle aufgeführt (Tabelle 7).

Einbau dA, X,Y \rightarrow dNTP	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μmol)	k_{cat} / K_M (μmol^{-1} min^{-1})	f_{ins}^a (f_{ins}^b)	f_{ins}^c
dA \rightarrow dTTP	1.79	0.02	79.04	1.0	1.0
dA \rightarrow dATP	59.24	13.70	4.32	$5.47 \cdot 10^{-2}$	$5.47 \cdot 10^{-2}$
dA \rightarrow dCTP	2.41	11.13	0.22	$2.74 \cdot 10^{-3}$	$2.74 \cdot 10^{-3}$
dA \rightarrow dGTP	3.47	19.54	0.18	$2.25 \cdot 10^{-3}$	$2.25 \cdot 10^{-3}$
cFaPydA \rightarrow dTTP	2.76	1.5	1.85	1.0	$2.33 \cdot 10^{-2}$
cFaPydA \rightarrow dATP	1.81	35.3	0.05	$2.77 \cdot 10^{-2}$	$6.47 \cdot 10^{-4}$
cFaPydA \rightarrow dCTP	0.62	449.5	$1.37 \cdot 10^{-3}$	$7.44 \cdot 10^{-4}$	$1.74 \cdot 10^{-5}$
cFaPydA \rightarrow dGTP	12.17	143.7	0.09	0.05	$1.07 \cdot 10^{-3}$
8-Oxo-dA \rightarrow dTTP	1.10	2.71	0.41	1.0 (0.22)	$5.14 \cdot 10^{-3}$
8-Oxo-dA \rightarrow dATP	2.03	22.57	0.09	0.22 (0.049)	$1.14 \cdot 10^{-3}$

$$f_{ins}^a = \frac{(k_{cat} / K_M)dNTP(dA, X, Y)}{(k_{cat} / K_M)dA, X, Y : dT}, f_{ins}^b = \frac{(k_{cat} / K_M)8OA : dT, dA}{(k_{cat} / K_M)cFaPydA : dT, dA}, f_{ins}^c = \frac{(k_{cat} / K_M)dA, X, Y}{(k_{cat} / K_M)dA : dT}.$$

Tabelle 7: Kinetische Parameter der Insertion von Nukleotidtriphosphaten gegenüber dA, cFaPydA (X) und 8-Oxo-dA (Y).

Vergleicht man die Ergebnisse der Enzymkinetik miteinander, so wird deutlich, dass der Einbau von dT gegenüber einem cFaPydA zwar innerhalb der Reihe der vier Basen am effektivsten ist, allerdings ist die Inkorporationseffizienz um den Faktor 43 schlechter, als im Fall des Einbaus von dT gegenüber einem Desoxyadenosin. Dies verdeutlicht die Tatsache, dass der Formamid-Schaden den Einbau der vier Basen mit Klenow *exo*⁻ zulässt, aber doch stark hemmt. Nachfolgend sind die normierten CE-Signale der Nukleotidtriphosphat-Insertion gegenüber dem carbozyklischen FaPydA dargestellt. Gezeigt sind die CE-Signale des unverlängertem (n) und des um eine Base verlängertem Primer-Fluorescein-Signals (n+1). Es wird deutlich, dass unter den gegebenen Bedingungen der Einbau von dC gegenüber cFaPydA nicht stattfindet.

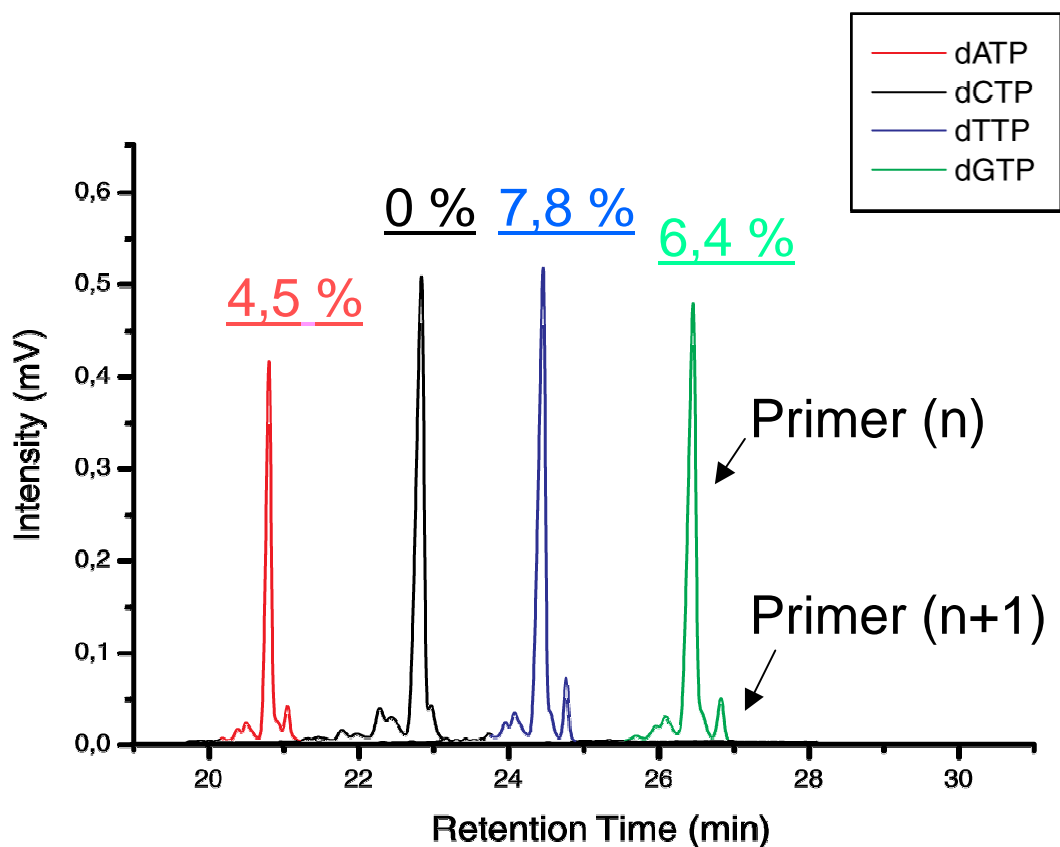


Abbildung 30: Normierte CE-Signale mit pozentuellem Anteil an verlängertem Primer (n+1); 1U Klenow *exo*⁻, NEB 2 Puffer, 200 nM DNA, 500 μ M dNTP; Inkubationszeit 6 min, Reaktionszeit 5 min, 37°C.

Die zweitbeste Inkorporationseffizienz zeigt *c*FaPydA mit dG. Der Einbau ist mit einer Inkorporationseffizienz von 0.0459 nochmals um den Faktor 22 ungünstiger als der Einbau von dT gegenüber *c*FaPydA, doch zeigt sich hier eine deutliche Steigerung im Vergleich zum *mismatch*-Paar dA:dG. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den bei den thermodynamischen Daten (Sequenz 2) gefundenen Paarungsstabilitäten, welche in einer Pyrimidin-Purin-Umgebung eine hohe thermische und auch energetische Stabilität des *mismatche*-Paares *c*FaPydA:dG zeigen. Die Inkorporationseffizienz von Desoxyadenosin gegenüber *c*FaPydA liegt größenordnungsmäßig im Bereich des *mismatch*-Paares dA:dA, während das *mismatch*-Paar *c*FaPydA:dC eine um den Faktor 4 schlechtere Inkorporationseffizienz zeigt als die entsprechende Fehlpaarung mit Desoxyadenosin.

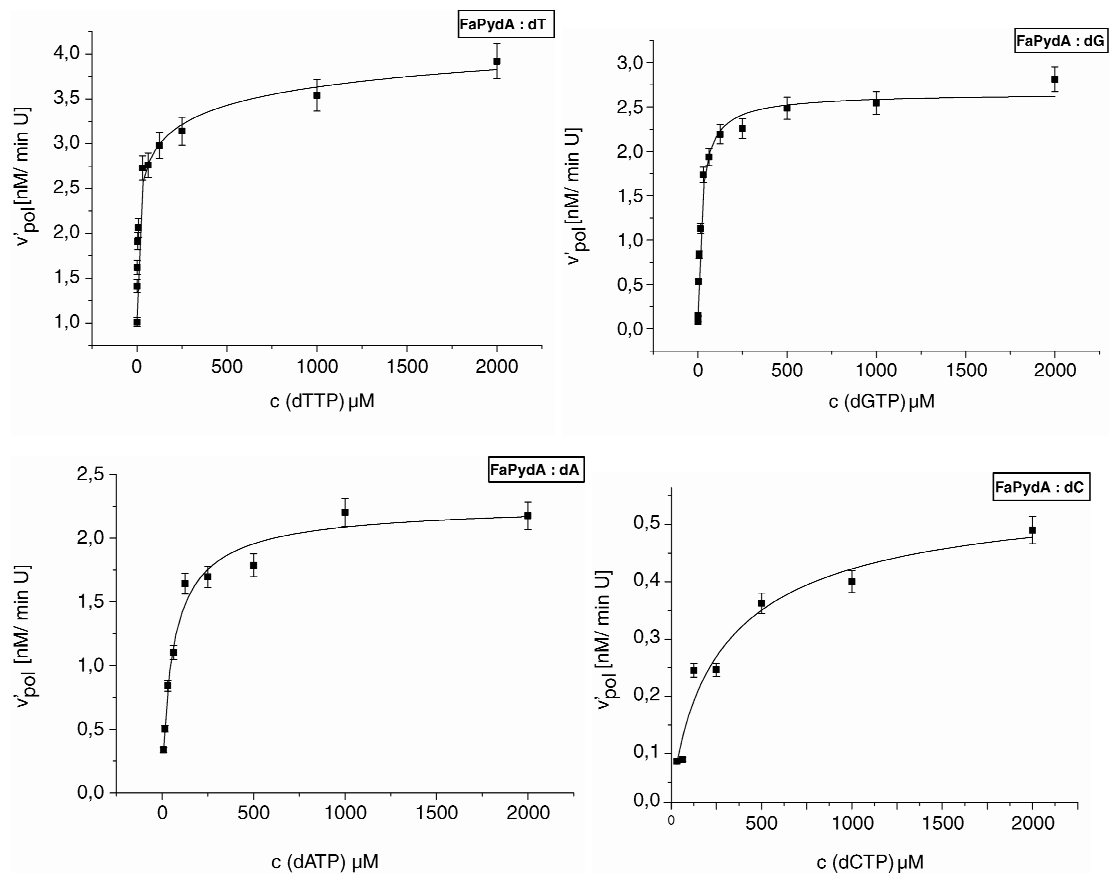


Abbildung 31: Darstellung der Insertionsgeschwindigkeit der vier Basen gegenüber *c*FaPydA.

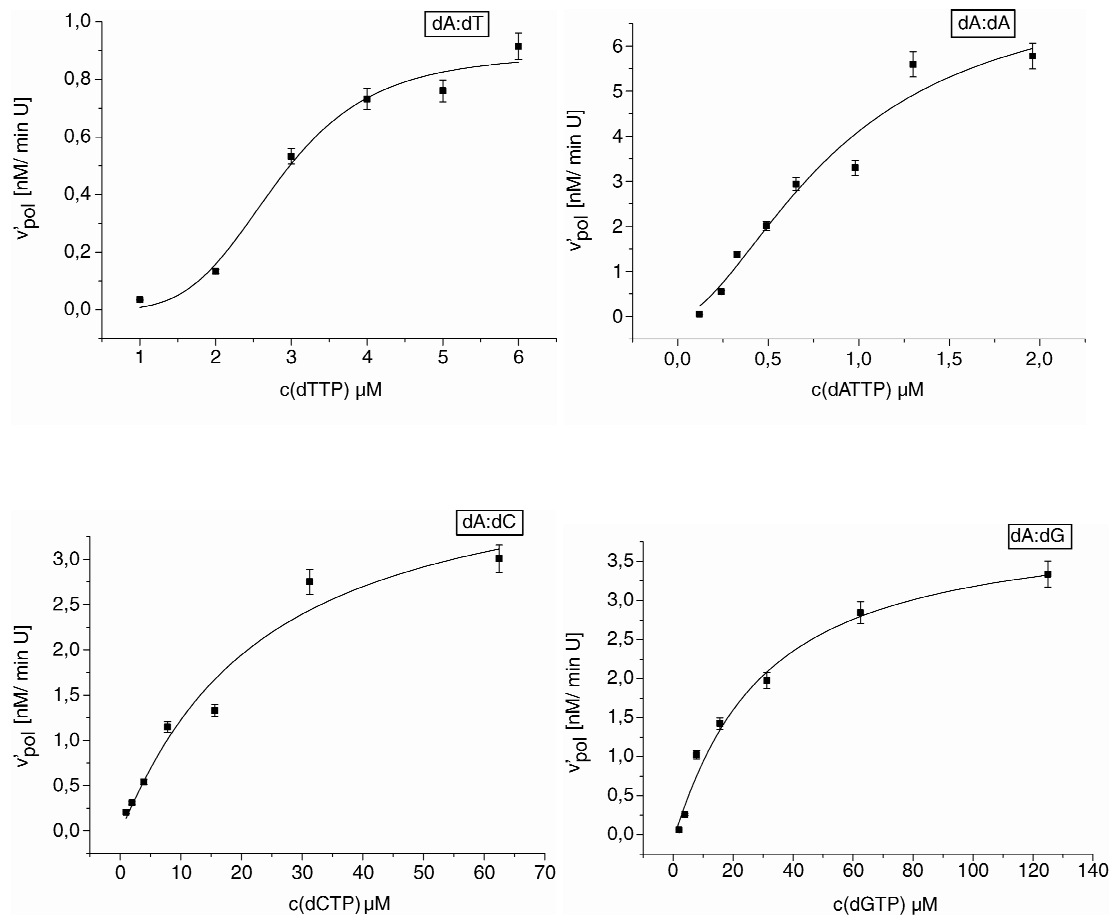


Abbildung 32: Darstellung der Insertionsgeschwindigkeit der vier Basen gegenüber dem ungeschädigten dA.

Allgemein lässt sich feststellen, dass der Einbau der vier Basen mit Klenow exo gegenüber dem *cFaPydA* größenordnungsmäßig im Bereich eines „normalen“ Fehleinbaus gegenüber Desoxyadenosin liegt. Die Tatsache, dass *cFaPydA* die Replikation der prokaryontischen Polymerase stark hemmt wurde auch schon in Arbeiten von *Graziewicz et al.*, in denen *FaPydA* durch *Fenton*-Reaktion erzeugt wurde, beobachtet.^[55] Vergleicht man allerdings die gefundenen Inkorporationseffizienzen von *cFaPydA* mit den von *Greenberg et al.* ermittelten Daten für sein α - β -Gemisch, so zeichnet sich überraschenderweise dennoch derselbe Trend ab, wobei die Effizienz des Einbaus bei dieser Arbeit durchweg höher liegt als im Fall des carbozyklischen Analogons.^[54]

Stellt man die Inkorporationseffizienzen von *c*FaPydA:dT und 8-Oxo-dA:dT gegenüber, so ist der Einbau von Thymidin gegenüber 8-Oxo-dA nochmals um den Faktor 6 schlechter.

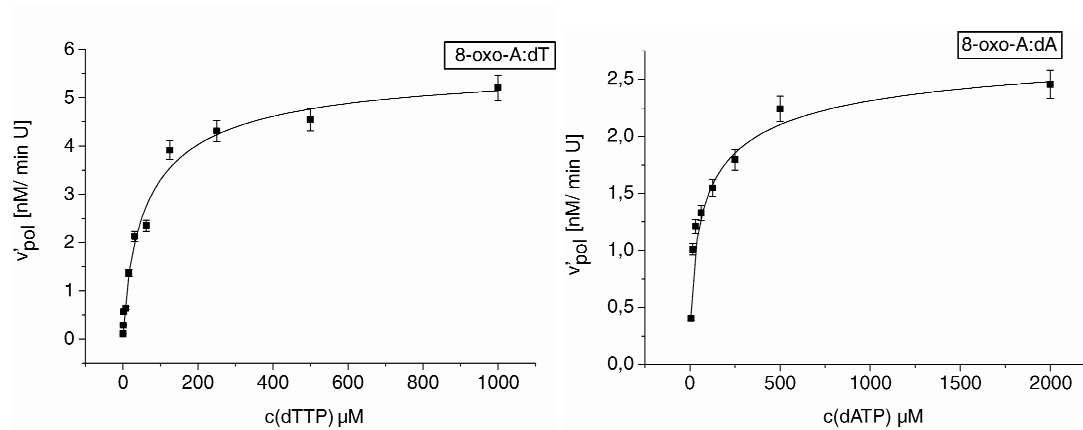


Abbildung 33: Darstellung der Insertionsgeschwindigkeit der vier Basen gegenüber 8-Oxo-dA.

Spannend ist, dass der Einbau von dA gegenüber 8-Oxo-dA sich in der Größenordnung der Fehlpaarung *c*FaPydA:dG befindet, und somit ebenfalls eine leichte Bevorzugung für das *mismatch*-Paar 8-Oxo-dA:dA anzeigt. Im Vergleich zu den Arbeiten von Grollman *et al.*^[59] lässt sich zwar eine stärker gehemmte Inkorporationseffizienz für das 8-Oxo-dA:dT-Paar feststellen, doch ist hier die Effizienz des 2'-Desoxyadenosin-Einbaus deutlich höher. Der Einbau von dC und dG gegenüber 8-Oxo-dA findet im Allgemeinen statt, ist aber so stark gehemmt, dass die Messung einer kinetischen Reihe unter der oben beschriebenen Methodik nicht möglich war.

4.3.4 Zusammenfassung

- Klenow *exo* gestattet die Inkorporation aller vier Basen gegenüber dem carbozyklischen FaPydA-Schaden.
- Die Inkorporationseffizienzen liegen dabei insgesamt niedriger als im Fall des natürlichen 2'-Desoxyadenosins.
- Die Insertion von Thymidin gegenüber cFaPydA verläuft am Besten, ist aber im Vergleich zum natürlichen Basenpaar um 98% vermindert.
- Der Einbau von dG gegenüber cFaPydA ist im Vergleich zu den restlichen Basen (dA und dC) deutlich bevorzugt.
- Der Formamid-Schaden zeigt im Vergleich zum 8-Oxo-dA-Schaden etwas höhere Inkorporationseffizienzen.
- Der 8-Oxo-dA-Schaden zeigt die beste, allerdings im Vergleich zum dA auch deutlich niedrigere, Inkorporationseffizienz von Thymidin.
- Die Insertion von dA wird im Vergleich zu den drei anderen Basen bevorzugt und liegt größenordnungsmäßig im Bereich des cFaPydA:dG *mismatch*-Paars.
- Der Einbau der vier Basen gegenüber den beiden Schäden ist im Vergleich zum 2'-Desoxyadenosin erheblich langsamer.

4.4 Reparatur

Von besonderer Bedeutung ist die Erhaltung der genomischen Integrität in Organismen. Um dies zu verwirklichen, gibt es zahlreiche Reparaturpfade und Reparaturenzyme, welche auf bestimmte Arten von Schäden fokussiert sind. Oxidativ geschädigte Basen werden durch die Basenexzisionsreparatur (BER-Mechanismus) repariert.^[7] Eines der wichtigsten bakteriellen Reparaturenzyme für diesen Reparaturmechanismus ist die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg), welche speziell für die Reparatur der Formamidopyrimidine besonders wichtig ist und erstmals 1987 von *Boiteux et al.* aus *E. coli* isoliert und sequenziert wurde.^[100] Das Fpg-Protein zählt zu den bifunktionalen Glykosylasen, welche neben ihrer Glykosylase-Aktivität auch eine AP-Lyaseaktivität aufweisen. Die Glykosylase-Aktivität erkennt die beschädigte Base und entfernt diese durch Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung zwischen Base und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat. Die entstehende abasische Stelle wird im zweiten Schritt durch die Spaltung der Zucker-Phosphat-Bindung (β -, δ -Eliminierung) am 3'-Ende mittels ihrer AP-Lyaseaktivität gänzlich entfernt.^[101, 102] Neben der hohen Spezifität für die Formamidopyrimidin-Schäden, zeigt das Fpg-Enzym auch eine sehr hohe Affinität für den 8-Oxo-dG-Schaden. Interessanterweise zeigt sich diese hohe Affinität beim 8-Oxo-dA-Schaden nicht. 8-Oxo-dA enthaltende DNA wird zwar gebunden, allerdings wird der Schaden durch das Enzym nicht entfernt.^[103-105] Der Grund für das unterschiedliche Verhalten von *cFaPydA* und 8-Oxo-dA könnte in der größeren Flexibilität, die das *cFaPydA* durch die Rotationsvielfalt der Formamidgruppe erhält, begründet sein. Allerdings fehlt hier noch jeglicher Beweis, und die Frage nach der speziellen Erkennung von *FaPydA* bleibt vorerst unbeantwortet.

Von großem Interesse ist ebenfalls der Erkennungsmechanismus von Fpg in Bezug auf den Formamidopyrimidinschaden des Deoxyadenosins (*FaPydA*) und den 8-Oxo-dA Schaden. Während die Kristallisationsstudien von *cFaPydG* mit

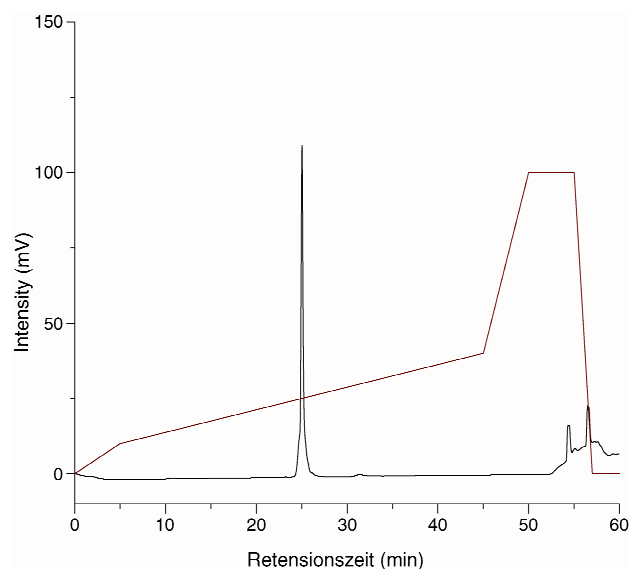
LIFpg^[106] eine Bindung des Schadens in *anti*-Konformation enthüllten, scheint die Erkennung des 8-Oxo-dG-Schadens in *syn*-Konformation^[107] zu erfolgen. Im Gegensatz hierzu erkennt die funktionsanaloge, humane Glykosylase (*hOgg1*) den 8-Oxo-dG-Schaden in *anti*-Konformation.^[108] Dies steht im Einklang mit den theoretischen Berechnungen von *Broyde et al.*^[109], welche (unabhängig von obigen Studien) moleküldynamische Berechnungen der DNA-Schäden FaPydA, FaPydG, 8-Oxo-dG und 8-Oxo-dA durchführten, und für die Formamidopyrimidine ausschließlich einen Erkennungsmechanismus in der *anti*-Konformation postulierten. Für das 8-Oxo-dG wurde hingegen theoretisch berechnet, dass dieser Schaden von Fpg sowohl in *anti*- als auch in *syn*-Konformation erkannt werden kann. Interessant sind diese Erkenntnisse vor dem Hintergrund, ob die Formamidopyrimidin-Glykosylase in der Lage ist verschiedene *syn*-/ *anti*-Erkennungsmechanismen anzuwenden, oder ob es ausschließlich zu einer Katalyse in der *anti*-Konformation kommt und inwiefern das Enzym dann den Unterschied zwischen dem 8-Oxo-dG und dem ungeschädigten dG erfasst.

Um die speziellen Erkennungs- und Reparaturmechanismen besser zu verstehen, wurden Reparaturenzyme zusammen mit definierten Oligonukleotiden kristallisiert. Schwierig gestaltete sich hier die Tatsache, dass die Reparatur von Formamidopyrimidin enthaltenden Oligonukleotiden im Fall eines intakten Fpg-Enzyms extrem schnell vollzogen würde. Dies führte dazu, dass die Kristallisation oft mit einem in der aktiven Tasche veränderten Fpg-Reparaturenzym durchgeführt werden musste^[107]. Die lückenlose Aufklärung des Erkennungs- und Reparaturmechanismus ist in diesem Fall unbefriedigend. Ein für die Kristallisation hingegen besonders gut geeignetes Substrat ist das carbozyklische FaPydA, da das Fpg-Enzym in diesem Fall nicht in der Lage ist, den Schaden durch Spaltung der glykosidischen Bindung zu reparieren. Strukturell aufgeklärt wurden bisher insgesamt vier verschiedene bakterielle Fpg-Proteine.^[110-113] Zu ihnen zählt das aus *E. coli* isolierte *EcoFpg*, das aus *Lactococcus lactis* isolierte *LIFpg*, das in *Bacillus stearothermophilus* gefundene *BstFpg* und das *TfFpg* aus *Thermus*

thermophilus. In Zusammenarbeit mit *F. Coste* und *B. Castaing* aus der Arbeitsgruppe *C. Zelwer* in Orléans wurde bereits ein von *M. Ober* synthetisiertes carbozyklisches FaPydG enthaltendes Oligonukleotid^[82] zusammen mit *L/Fpg* erfolgreich kristallisiert^[106]. Da im Fall des carbozyklischen FaPydA-Schadens der spezielle Erkennungsmechanismus weiterhin ungeklärt ist, sollen auch hier Kristallisationsstudien zusammen mit *F. Coste* und *B. Castaing* durchgeführt werden.

Für die Kristallisationsstudien wurden mehrere *cFaPydA* enthaltende Oligonukleotide (S6) synthetisiert, besonders gründlich gereinigt (Abb. 34) und mehr als 1 mg Material für die Kristallisation zur Verfügung gestellt. Leider konnten bisher keinerlei Kristalle erhalten werden, die für eine röntgenkristallographische Untersuchung geeignet gewesen wären.

a) *Rp* HPL-Chromatogramm



b) MALDI nach Aufreinigung

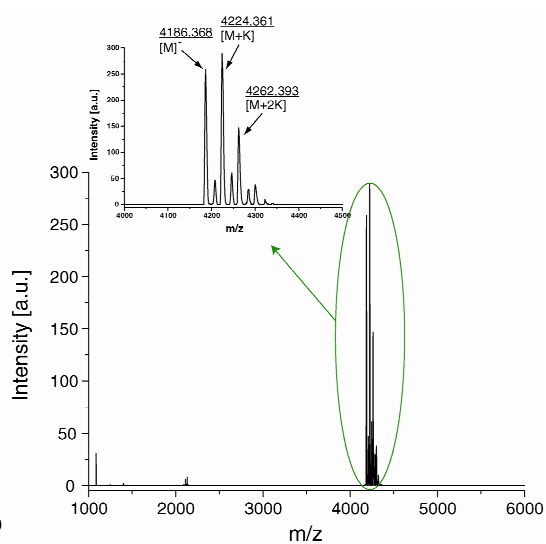


Abbildung 34: a) Puffer A: 0,1 M NEt₃/AcOH in Wasser, Puffer B: 0,1 M NEt₃/AcOH in 80 % MeCN; b) Matrix: 3-Hydroxypicolinsäure (HPA).

4.4.1 Bindungsstudien von *L*Fpg mit *c*FaPydA

Parallel zu den Kristallisationsstudien wurden Bindungsstudien¹⁵ mit *L*Fpg durchgeführt, um das spezielle Bindungsverhalten des Enzyms an DNA näher zu untersuchen.^[114] Die Ergebnisse zeigten, dass Einzelstrang-DNA im Gegensatz zur Doppelstrang-DNA nicht gebunden wurde, ungeschädigte Doppelstrang-DNA allerdings in etwa gleich gut gebunden wurde wie auch die *mismatch*-enthaltende DNA (Abb. 35).^[66] Offensichtlich scheint Fpg *ds*DNA immer in einem gewissen Maß zu binden und auf Schäden zu überprüfen.

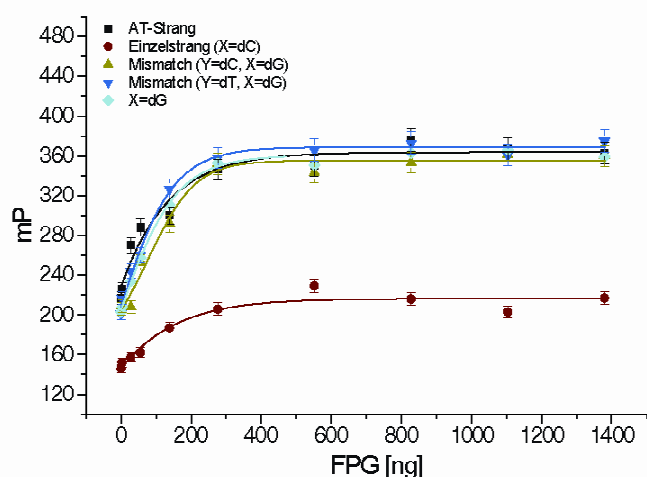


Abbildung 35: Bindungsstudien von Fpg mit *ss*DNA, *mismatch ds*DNA und *ds*DNA.^[114]

Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurden weitere Bindungsstudien mit ausgewählten DNA-Schäden durchgeführt (Abb. 36). Im Vergleich der oxidativen Schäden konnten Unterschiede in der Bindungsaffinität festgestellt werden. Die beste Bindungsaffinität zeigte *L*Fpg mit der in β -Konfiguration vorliegenden *c*FaPydG-DNA. Die durchgeführten Bindungsstudien verdeutlichten hier sehr schön den großen Unterschied zwischen dem β - und dem α -Schaden.

¹⁵ Die Bindungsstudien wurden freundlicherweise von *Andreas Glas* und *Ralf Strasser* (Arbeitsgruppe *T. Carell*, LMU München) durchgeführt.

Der α -cFaPydG-Schaden wurde nahezu nicht gebunden. Dieses Phänomen könnte aufgrund einer starken Verzerrung der DNA-Helix auftreten.

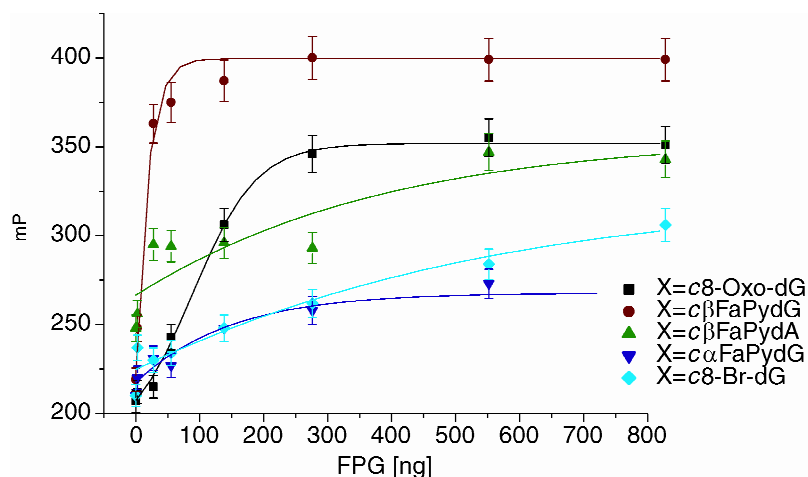


Abbildung 36: Bindungsstudien von Fpg mit Schaden-enthaltender *dsDNA*.^[114]

Ebenso schwach ist die Bindung von Fpg an den in *syn*-Konformation vorliegenden carbozyklischen 8-Br-dG-Schaden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Fpg nicht in der Lage ist auf einen *syn*-/*anti*-Erkennungsmechanismus zurückzugreifen, sondern ausschließlich in *anti*-Konformation erkennt.^[106, 115] Vor diesem Hintergrund ist speziell der Erkennungsmechanismus vom *cFaPydA*, welches als Monomer ebenfalls in der *syn*-Konformation vorlag, sehr interessant. Der *cFaPydA*-Schaden befand sich in einem mittelstarken Bindungsbereich und zeigte ein von den anderen Schäden abweichendes duales Bindungsverhalten (Abb 36). Unabhängige Messungen von *cFaPydA* enthaltender DNA konnten dieses Verhalten weiter bestätigen. Es wurde eine anfängliche schnelle Bindung des Enzyms an die DNA sichtbar, welche zunächst eher schwach ausgebildet war und in einem zweiten, möglicherweise spezifischen Schritt in der aktiven Tasche des Enzyms, wieder stark anstieg. Wenn das carbozyklische *FaPydA* in DNA ebenfalls in einer *syn*-Konformation vorliegt, dann müsste das Fpg-Enzym zunächst den Schaden um seine C1'-H-NH-Bindung in eine *anti*-Konformation drehen, um diesen Schaden zu reparieren. Dies könnte eine Erklärung für das

beobachtete Bindungsverhalten von *cFaPydA* sein, welches zunächst in einem schnellen, unspezifischen Schritt gebunden wird und dann in einem zweiten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der aktiven Tasche den Schaden in die *anti*-Konformation dreht, damit das Enzym durch Spaltung der glykosidischen Bindung (im Fall des „natürlichen Schadens“) diesen Schaden reparieren könnte. Aufklärung über diesen Sachverhalt könnte durch die Kristallisationsstudien von *LI*Fpg mit dem *cFaPydA* erhalten werden.

5. Ausblick

Die über das *cFaPydA* erhaltenen Ergebnisse führen zu einem besseren Verständnis über die biochemischen Eigenschaften des Schadens und werfen dennoch, oder aber gerade deswegen, zusätzliche Fragen auf.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte leider der spezielle Erkennungsmechanismus von *cFaPydA* durch Fpg nicht geklärt werden, da die bisher erhaltenen Kristalle für eine röntgenkristallographische Untersuchung nicht geeignet gewesen waren. Die **Kristallisationsstudien** könnten aufklären, ob *cFaPydA* tatsächlich ein duales Bindungsverhalten zeigt und inwiefern Fpg zwischen dem *FaPydA*- und dem 8-Oxo-dA-Schaden unterscheidet.

NMR-Studien von *cFaPydA* enthaltenden Oligonukleotiden könnten ebenfalls, bezüglich der Schadenslage und –dynamik im DNA-Strang, Aufschluss geben.

Um das von *cFaPydA* offensichtlich vollzogene sequenzabhängige Paarungsverhalten besser zu verstehen, könnten zusätzliche *Primer Extensions* mit unterschiedlichen Sequenzen, durchgeführt werden, um einen eventuellen Einbau von dC zu beobachten. Auch die Wahl einer *low fidelity* Polymerase wie Pol η bietet sich in diesem Zusammenhang an, um eine gesteigerte Inkorporationseffizienz einer eukaryotischen *low fidelity* Polymerase gegenüber dem *cFaPydA*-Schaden zu untersuchen. Von besonderem Interesse sind in diesem Punkt die humanen Polymerasen. Unterschiedliche Polymerasen könnten sich dramatisch auf das mutagene Potential von *cFaPydA* auswirken.

Die von *Greenberg et al.* im Jahre 2004 durchgeführten Messungen bezüglich der Konfiguration der von ihnen in Oligonukleotide eingebauten Formamidopyrimidin-Schäden zeigten, dass im Fall von *cFaPydA* zwar hauptsächlich das β -Anomer gefunden wurde, allerdings konnten auch 10% des α -Anomers detektiert werden. Dies steht im Gegensatz zum *FaPydG*-Schaden, welcher zu 100% als β -Anomer vorlag.^[42] Auch die Anomerisierungsstudien, welche von dieser Gruppe durchgeführt wurden, zeigten eine höhere Sensibilität

des dA-Schadens in bezug auf die Anomerisierung als es im Fall des dG-Schadens beobachtet wurde.^[116] Ein Überprüfen, inwiefern sich das **α -Anomer (α -cFaPydA)** auf die unterschiedlichen Ergebnisse in der *Primer Extension* Studie auswirkt, könnte ebenfalls sehr interessant sein, obwohl die Ergebnisse des carbozyklischen Analogons mit dem α -, β -Gemisch von *Greenberg* überraschenderweise in vielen Bereichen gut übereinstimmen.

6. Experimenteller Teil

6.1 Material & Methoden

Analytik

Die **Infrarot-Spektren** (IR) wurden mit einem *Bruker IFS 88*, *Bruker IFS 25* oder einem *Perkin-Elmer FT-IR* Spektrum 100 mit einer ATR-Einheit aufgenommen. Die Proben wurden als KBr-Pressling, als Film zwischen NaCl-Platten oder mit einer ATR-Einheit vermessen. Die relativen Intensitäten wurden mit den Abkürzungen *ss* (sehr stark), *s* (stark), *m* (mittel), und *w* (schwach) gekennzeichnet.^[117]

Kapillargelelektrophorese von modifizierten Oligonukleotiden wurde mit einem *P/ACE MDQ DNA System* mit *UV Detector Module* sowie *LIF Detector Module* mit *488 nm Laser Module* der Firma *Beckman Coulter* durchgeführt. Die für die Messung von modifizierten Oligonukleotiden verwendeten Glaskapillaren der Firma *Beckman Coulter* sind mit einer Polyacrylamid-Innenbeschichtung versehen, haben einen Innendurchmesser von 100 μm und eine Gesamtlänge von 30 cm. Die effektive Länge zum Detektor betrug 21 cm.

Beladen der Glaskapillare: Gefüllt wurde die Glaskapillare mit einem bei 5000 rpm für 2 min entgasten 6 %igen Polyacrylamidgel, welches in dem denaturierenden Gel- und Elektrodenpuffer (0.1 M Tris/Borat, 1mM EDTA, 7 M Harnstoff) rehydratisiert wurde. Beladen wurde die Kapillare bei einem Druck von 30 psi über einen Zeitraum von 15 min, zur Equilibrierung wurde dann für 10 min eine Spannung von 9 kV angelegt.

Probenvorbereitung: Die zu messenden Proben wurden vor jedem analytischen Lauf mit *Zip Tip*[®] 0.6 μL C_{18} -Pipettenspitzen der Firma *Millipore* gemäß dem Herstellerprotokoll entsalzt und vor der Injektion mit zweifach destilliertem Wasser (20 μL) verdünnt.

Trennmethode: Die Probeninjektion wurde elektrokinetisch bei einer Injektionsspannung von 10 kV für einen Zeitraum von 10 s durchgeführt. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 9 kV, einem beidseitigen Druck von 20 psi, einer Temperatur von 25 °C und über einen Zeitraum von 45 min. Detektiert wurden die fluoresceinmarkierten Oligonukleotide mittels des *LIF Detector Module* bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 526 nm.

Die **¹H-Kernresonanzspektren** (¹H-NMR) wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur auf den Geräten *Bruker AMX 200*, *Varian Mercury 200 VX*, *Bruker ARX 300*, *Bruker DRX 400*, *Varian VXR400s*, *Varian INOVA 400*, *Bruker DRX 500* sowie einem *Varian 600* aufgenommen. In Klammern sind die Messfrequenzen in MHz sowie das entsprechende Lösungsmittel aufgeführt. Die chemische Verschiebung wurde in ppm relativ zu TMS angegeben, wobei das jeweilig benutzte Lösungsmittel als interner Standard diente.^[118] Die Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), sx (Sextett), m (Multipllett) und br (breit) gekennzeichnet. Die Kopplungskonstante *J* wurde in Hz angegeben.^[117] Die Peakzuordnung wurde, wenn nötig, über COSY-, NOESY- und HMQC-Spektren durchgeführt.

Die **¹³C-Kernresonanzspektren** (¹³C-NMR) wurden bei Raumtemperatur auf den Geräten *Bruker AMX 200*, *Bruker ARX 300*, *Bruker DRX 400*, *Bruker AMX 600*, *Varian VXR400s*, *Varian INOVA 400*, *Bruker DRX 500* sowie einem *Varian 600* aufgenommen. Die jeweilige Messfrequenz in MHz und das entsprechende Lösungsmittel sind in Klammern aufgeführt. Die Spektren wurden protonenentkoppelt aufgenommen. Die chemische Verschiebung wurde in ppm relativ zu TMS angegeben, wobei das jeweilig benutzte Lösungsmittel als interner Standard diente.^[118] Die Peakzuordnung wurde, wenn nötig, mit APT-, HMBC- und HMQC-Spektren durchgeführt.

Die **³¹P-Kernresonanzspektren** (³¹P-NMR) wurden bei Raumtemperatur auf dem Gerät *Varian Mercury 200VX* aufgenommen. Die Messfrequenzen in MHz und das Lösungsmittel sind in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung wurde in ppm relativ zu 85% H₃PO₄ angegeben, welche als externer Standard diente.

Massenspektren (MS, HRMS): Die **EI-Massenspektren** wurden auf dem Gerät *MAT CH7A* oder *MAT90* der Firma *Varian* aufgenommen. **FAB-Massenspektren** wurden mit einem *Finnigan MAT95*-Massenspektrometer gemessen. Die **ESI-Messungen** wurden in Niedrig- und Hochauflösung auf den Geräten *Finnigan LTQ FT* (HRMS), *Finnigan MAT 95 S*, *JEOL JMS-700* oder *PE ScieX API Qstar Pulsar i*-Massenspektrometer durchgeführt. In Klammern sind die Methode und die Polarität der gemessenen Ionen vermerkt. Die Masse der gefundenen Ionen ist in Abhängigkeit zur Ionenladung in der Form $\frac{m}{z}$ angegeben. Die relativen Signalintensitäten werden in %, bezogen auf das größte Signal, angezeigt. **MALDI-Tof-Massenspektren** wurden auf einem *Bruker Autoflex II* gemessen. Für kleine Moleküle wurde entweder eine gesättigte Sinapinsäure-Matrix (MeCN/bdH₂O, 1:1) oder, speziell bei säureempfindlichen Molekülen, eine 0.1 M 6-Azathiothymin (ATT-) Matrix (MeCN/bdH₂O, 1:1) verwendet. Für DNA-Oligonukleotiden wurde ein Matrix aus gesättigter 3-Hydroxypicolinsäure (HPA) mit und auch ohne Kronenether (50 mg HPA, 10 mg Diammoniumhydrogencitrat, 10 µL 15-Krone-5, 1mL H₂O) verwendet. Salzhaltige Proben wurden entweder mit der Kronenether enthaltenden HPA-Matrix vermessen, oder vorher mit *MF-Millipore*TM Membranfiltern (Porengröße 0.025 µm) der Firma *Millipore*, oder durch *C18-SepPac*[®] Kartuschen der Firma *Waters* entsalzt. Die wichtigsten Signale werden auch hier in der Form $\frac{m}{z}$ angegeben.

HPLC-/MS-/MS-Experimente von verdauten Oligonukleotiden wurden mit einem *Finnigan LTQ FT* durchgeführt. Zur analytischen Trennung von Nucleosiden wurde eine Umkehrphasen-Säule *Uptisphere 3 HDO* Säule *Interchrom* (150 x 2.1 mm) der Firma *Interchim* verwendet. Die zur Trennung verwendeten Puffersysteme waren: Puffer A (2 mM NEt_3 / AcOH in H_2O) und Puffer B (2 mM NEt_3 /AcOH in 80% Acetonitril). Der verwendete Gradient verlief nach folgendem Protokoll: 0 min 0% B, 12 min 3% B, 30 min 20% B; Flussrate: 0.2 mL/ min. Detektiert wurde bei 260 nm, und gemessen wurde im negativen Modus mit einer *Ion Spray*-Spannung von 4kV, wobei der erste Quadrupol (Q1) auf die zu untersuchenden Ionen eingestellt wurde.

Chromatographie

Die **Dünnschichtchromatogramme** (DC) wurden auf Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck* (*Kieselgel 60 F₂₅₄*, 5 cm x 10 cm bzw. *RP-18F_{254s}*, 5 cm x 7.5 cm) durchgeführt. Detektiert wurde über UV-Licht (254) oder durch Anfärben mit Anisaldehyd- (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL Schwefelsäure) oder Ninhydrin-Lösung (0.3 g Ninhydrin, 3 mL Eisessig in 100 mL *n*-Butanol).^[119]

HPL-Chromatographie wurde entweder auf einer *Merck-Hitachi*-Anlage oder auf einer *Waters*-Anlage durchgeführt. *Merck-Hitachi*-Anlage: L-7400 UV-Detektor (analytisch), L-7420 UV-Vis Detektor (präparativ), L-7480 Fluoreszenzdetektor (analytisch), L-7100 (analytisch) bzw. L-7150 (präparativ) Pumpe, D-7200 Autosampler (analytisch), *Rheodyne* P/N 77 25i Einspritzventil (präparativ), L-7000 Interfacemodul, L-7612 (analytisch) und ERC-3415 (präparativ) Lösungsmittelentgaser. *Waters*-Anlage: 2487 Dual λ Absorbance Detector (präparativ), 1525 Binary HPLC Pump (präparativ), Waters 2695 Separations Module (analytisch) und Waters 2996 bzw. 996 Photodiode Array Detector (analytisch). Für die analytischen Umkehrphasen-Trennungen wurden entweder die *CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18-*, die *CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18*-Säulen oder die *CC 250/4 Nucleodur*

100-3 C18ec-Säule der Firma *Macherey & Nagel* verwendet. Für die präparative Umkehrphasen-Trennung wurden VP 250/21 *Nucleosil 100-7 C18-* oder VP 250/10 *Nucleodur 100-5 C18ec-*Säulen der Firma *Macherey & Nagel* eingesetzt.

Die Detektion wurde generell bei 260 nm durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Gradienten sind in Abschnitt 6.5.2 aufgelistet.

Die **Säulenchromatographie** wurde nach der *Flash-Methode*^[120] mit N₂-Überdruck (0.2 – 0.5 bar) bei Raumtemperatur durchgeführt. Verwendet wurde *Kieselgel 60* (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck*.

DNA

DNA-Synthese wurde auf einem *Expedite™ 8900 Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. *Ultramild®* Phosphoramidite wurden von den Firmen *Pharmacia* und *Glen Research* gekauft, und die mit Nukleotiden beladenen CPG-Träger (1 µM) wurden bei *Applied Biosystems* bezogen. Die Phosphoramidite und der Aktivator wurden in Acetonitril der Firma *Riedel de Haën* mit einem Wassergehalt von < 0.1 ppm gelöst. Das zum Spülen des *Synthesizers* und der *Wash-Lösung* verwendete Acetonitril hatte einen Wassergehalt von < 0.3ppm. Alle weiteren verwendeten Reagenzien wurden mit dem Qualitätsstandard „zur DNA-Synthese“ von der Firma *Fluka* bezogen.

Die zur Synthese von modifizierten Oligonukleotiden verwendeten Protokolle sind im Abschnitt (6.5) beschrieben.

DNA-Schmelzkurven wurden mit einem *Cary 100 Bio-Spektralphotometer* mit *Cary Temperature Controller, Sample Transport Accessory and Multi Cell Block* der Firma *Varian* gemessen. Die Temperatur wurde mittels einer Referenzküvette ermittelt, und der Probenraum wurde während der gesamten Messzeit mit Stickstoff gespült, um ein Beschlagen der Küvetten zu verhindern. Es wurden je

fünf aufeinanderfolgende Messungen im Temperaturbereich von 85°C→0°C und 0°C→85°C mit einem Temperaturgradienten von 0.5°C pro Minute bei 260 nm und 320 nm durchgeführt. Die für die Messung verwendeten Küvetten (Firma *Helma*) besaßen einen Innendurchmesser von 4 mm und eine Schichtdicke von 2 mm (9 µM DNA-Lösung) bzw. 10 mm (0.3 µM, 1.0 µM, 3.0 µM DNA-Lösung). Es wurden Schmelzkurven mit DNA-Konzentrationen von 0.3µM, 1.0 µM, 3.0 µM und 9.0 µM in wässrigen Salzlösungen (150 mM NaCl und 10 mM Tris/HCl, pH 7.4) gemessen. Um beim Erhitzen ein Verdampfen der Proben in den Küvetten zu verhindern, wurden diese mit Dimethylpolysiloxan überschichtet. Die Auswertung der gemessenen fünf Absorptionskurven erfolgte mit dem Programm *Microcal Origin*. Hierzu wurde zunächst der Hintergrund von jeder Kurve abgezogen und anschließend wurden die fünf Absorptionskurven gemittelt. Der jeweilige Schmelzpunkt (T_m) ergab sich aus dem Nulldurchgang der zweiten Ableitung der gemittelten Schmelzkurve.

Zur Bestimmung der jeweiligen Oligonukleotidzusammensetzung wurde ein **enzymatischer Totalverdau** mit nachfolgender HPLC-/MS-/MS-Analyse vorgenommen. Hierzu wurde das zu verdauende Oligonukleotid (100 µL, 20 µM) mit 10 µL Puffer A (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl₂ und 1 mM ZnSO₄, pH 5.7), 22 units Nuklease P1 aus *Penicillium citrinum* (Firma Roche), 0.05 units calf spleen-Phosphodiesterase (Firma Calbiochem) versetzt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 12 µL Puffer B (500 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), 10 units alkaline calf intestinal-Phosphatase (Firma New England BioLabs) und 9 units snake venom-Phosphatase (Firma USB) hinzugegeben und abermals 3 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden 6 µL einer 0.1 M HCl hinzugegeben und die Enzymlösung für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und für die anschließende HPLC-/MS-/MS-Analyse verwendet.

Enzymreaktionen wurden in 0.2 mL oder 1.5 mL Reaktionsgefäßen der Firma *Eppendorf* durchgeführt. Die Enzyme wurden generell bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu der entsprechenden Reaktionslösung hinzupipettiert. Die entsprechenden Reaktionstemperaturen wurden durch einen *Thermomixer comfort* der Firma *Eppendorf* für den Zeitraum der jeweiligen Reaktion konstant gehalten.

Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden wurden bei 260 nm durch die Addition der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen (dA $15.2\text{ L mmol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, dC $7.1\text{ L mmol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, dG $12.0\text{ L mmol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, dT $8.4\text{ L mmol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) berechnet.^[121] Für *cFaPydA* ($4.7\text{ L mmol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) und für *8oxoA* ($11.0\text{ L mmol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) wurden die für die jeweiligen aromatischen Heterozyklen bei 260 nm und pH 7 gefundenen Extinktionswerte verwendet.^[122]

Hybridisierungen für die *Primer extension* wurden in einem *TCR 100 Test Tube Thermostat* der Firma *Roth* durchgeführt, indem die Oligonukleotid-Proben (fluoresceinmarkierter Primer $2\text{ }\mu\text{M}$, *cFaPydA*-DNA $4\mu\text{M}$, Hybridisierungspuffer: 50 mM KCl , $10\text{ mM K}_3\text{PO}_4/\text{HCl}$, pH 7.5) in dem auf 85°C eingestellten Thermostaten für 5 Minuten equilibriert wurden und anschließend über einen Zeitraum von 12 h auf Raumtemperatur abkühlten.

Die **thermodynamischen Parameter** von Oligonukleotidkomplexen wurden bestimmt, indem die bei verschiedenen Konzentrationen gemessenen Schmelzpunkte (in K) invers gegen den natürlichen Logarithmus der jeweiligen Konzentrationen aufgetragen wurden. Nach linearer Regression mit dem Programm *Microcal Origin* erhielt man eine Gerade, aus deren Gleichung sich die Parameter ΔH° , ΔS° , ΔG^{298} berechnen ließen.

UV-Spektroskopie zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde entweder auf einem *Varian Cary 100 Bio*-Spektralphotometer oder auf einem *NanoDrop*[®] ND-

1000 Spectrophotometer der Firma *peqLab* Biotechnologie GmbH durchgeführt. Im Fall des *Varian Cary 100 Bio*-Spektralphotometer wurden Küvetten (4 mm Innendurchmesser, 10 mm Schichtdicke) der Firma *Helma* verwendet. Die Lösungen wurden bei 260 und 320 nm im Konzentrationsbereich von $0.5 \leq OD_{260} \leq 1.0$ bei 80°C gemessen. Der Hintergrund von 320 nm wurde von 260 nm abgezogen und die Konzentration mit Hilfe des aus den einzelnen Basen errechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt. Im Fall des *Nanodrop* wurden 1.5 µL der zu messenden Probe bei 260 nm gemessen und die Konzentration über die errechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt.

Eingesetzte Reagenzien

Die eingesetzten **Lösungsmittel** und **Chemikalien** wurden in den kommerziell erhältlichen Qualitäten *puriss*, *p.a.* oder *purum* verwendet und über die Firmen *Acros*, *Aldrich*, *Fluka*, *Merck* oder *Sigma* bezogen. THF wurde über K, CH₂Cl₂ über CaH₂, Toluol über Na, MeOH über Mg, Ethanol über Na und DMF über Molsieb 4 Å getrocknet. Das für chromatographische Zwecke verwendete Lösungsmittel war von technischer Qualität und wurde vor der Benutzung destilliert. Die gekauften DNA-Stränge wurden bei den Firmen *Metabion* und *IBA* in HPLC-Reinheit bezogen. Alle Reaktionen wurden unter N₂-Atmosphäre durchgeführt. Das Abdestillieren von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde am Membranpumpenvakuum mit einem Rotationsverdampfer *VV2000* der Firma *Heidolph* durchgeführt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum (10⁻² - 10⁻³ mbar) getrocknet. Wässrige oder alkoholische DNA-Lösungen wurden mit einer *Savant Speed Vac*[®] *Plus SC110A*, *Savant Speed Vac*[®] *SPD 111V* der Firma *Thermo Life Sciences* bzw. mit einer *Speed Vac*[®] *RVC 2-25* mit Kühler *CT 02-50* oder einer *Lyophille Alpha 2-4* der Firma *Christ*[®] im Ölpumpenvakuum eingengt.

Kraftfeldberechnungen

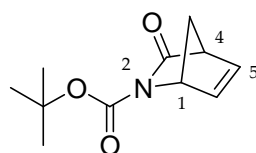
Kraftfeldberechnungen wurden mit dem Kraftfeld *mmff94s* und den zugehörigen Ladungen mit dem Programm *SYBYL*[®] 6.8 der Firma *Tripos Inc.* durchgeführt. Relative Torsionspotentiale wurden errechnet, indem die betrachteten Bindungen in 5°-Schritten fixiert, und der Rest des Moleküls einer vollständigen Geometrieoptimierung unterworfen wurde.

Schmelzpunkte

Die gemessenen **Schmelzpunkte** wurden mit dem Gerät *Büchi Smp 20* in offenen Glaskapillaren gemessen und sind nicht korrigiert.

6.2 Synthese des Carbozyklus

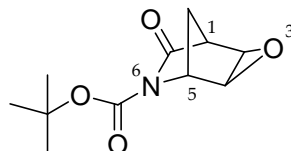
Synthese von *tert*-Butyl(1*R*,4*S*)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxylat (**33**) ^[53]



Azabicyklus **32** (2.0 g, 18.3 mmol, 1 eq) und Boc-Anhydrid (8.0 g, 36.6 mmol, 2 eq) wurden unter N₂-Atmosphäre in abs. THF (60 mL) gelöst und mit DMAP (2.2 g, 18.3 mmol, 1 eq) versetzt. Die orange-rote Reaktionslösung rührte bei RT über Nacht, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Das gelbe Pulver konnte über eine Filtriersäule (Tol/EtOAc 4:1, 20 Tr./L Et₃N) aufgereinigt werden. Man erhielt **33** in Form eines weißen Pulvers (3.8 g, 18.2 mmol, 98 %).

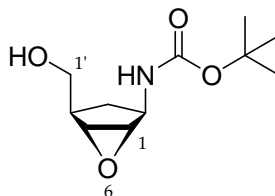
$R_f = 0.41$ (Tol/EtOAc 2:1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.49$ (s, 9H, *t*Bu), 2.13 (d, 1H, ²J(C7H_a, C7H_b) = 8.5 Hz, C7H_a), 2.33 (d, 1H, ²J(C7H_b, C7H_a) = 8.5 Hz, C7H_b), 3.35-3.40 (m, 1H, C4H), 4.92-4.97 (m, 1H, C1H), 6.62-6.68 (m, 1H, C5H), 6.86-6.92 (m, 1H, C6H); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 28.2$ (3 × CH₃), 54.6 (C4), 55.1 (C7), 62.5 (C1), 82.5 (OC(CH₃)₃), 138.3 (C5), 140.1 (C6), 150.3 (R₂NCOO), 176.2 (C3); MS (ESI⁺): m/z (%) = 232 (100) [M + Na]⁺, 176 (87) [M - *tert*-Butyl + Na]⁺, 132 (41) [(M - C₅H₈O₂) + Na]⁺.

**Synthese von *tert*-Butyl(1*S*, 2*R*, 4*S*, 5*R*)-7-oxo-3-oxa-6-azatricyclo-
[3.2.1.0^{2,4}]octan-6-carboxylat (34) [53]**



Metachlorperbenzoesäure (8.3 g, 47.8 mmol, 2.5 eq) wurde bei 0°C zu dem in wasserfreiem CH₂Cl₂ (160 mL) gelösten Boc-geschützten Bicyklus **33** (4.0 g, 19.1 mmol, 1 eq) gegeben. Unter N₂-Atmosphäre wurde für 21 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit ges. wässriger Na₂CO₃-Lösung (1 × 160 mL), ges. wässriger NaHCO₃-Lösung (1 × 160 mL), 1 M wässriger NaHCO₃-Lösung (1 × 160 mL) und dest. Wasser (2 × 160 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit CH₂Cl₂ (2 × 110 mL) rückextrahiert und das Extrakt mit dest. Wasser (2 × 90 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* abdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch *Flash*-Säulenchromatographie (450 g Kieselgel, Tol/EtOAc 2:1, 10 Tr./L Et₃N) aufgereinigt. Man erhielt das Epoxid **34** als weißes Pulver (3.9 g, 17.1 mmol, 89 %).

$R_f = 0.44$ (Tol/EtOAc 2:1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.49 (s, 9H, *t*Bu), 1.60 (d, 1H, ²J(C8H_a, C8H_b) = 10.5 Hz, C8H_a), 1.78 (d, 1H, ²J(C8H_b, C8H_a) = 10.5 Hz, C8H_b), 3.03-3.05 (m, 1H, C1H), 3.58 (dd, 1H, ³J(C2H, C4H) = 2.9 Hz, ³J(C2H, C1H) = 1.2 Hz, C2H), 3.75 (dd, 1H, ³J(C4H, C2H) = 2.9 Hz, ³J(C4H, C5H) = 1.2 Hz, C4H), 4.58-4.61 (m, 1H, C5H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 27.0 (C8), 28.0 (3 × CH₃), 48.3 (C1), 49.9 (C2), 53.0 (C4), 58.9 (C5), 83.2 (OC(CH₃)₃), 149.7 (R₂NCOO), 173.3 (C7); MS (ESI⁺): m/z (%) = 248 (34) [M + Na]⁺, 152 (100) [M - C₄H₈ + Na]⁺.

Synthese von *tert*-Butyl *N*-[(1*S*, 2*R*, 4*R*, 5*S*)-4-(hydroxymethyl)-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-yl]-carbamat (**35)** ^[53]

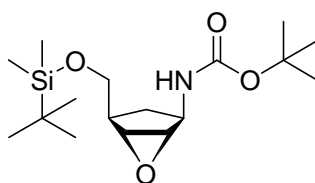
Zu dem in abs. Methanol (35 mL) gelösten Trizyklus **34** (700 mg, 3.1 mmol, 1 eq) wurde bei 0 °C innerhalb von 5 min NaBH₄ (588 mg, 15.5 mmol, 5 eq) hinzugegeben und 30 min bei 0 °C unter N₂-Atmosphäre gerührt, bevor die Reaktionslösung mit Essigsäure¹⁶ neutralisiert wurde. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, und der erhaltene Rückstand mit ges. wässriger NH₄Cl-Lösung (50 mL) versetzt. Die wässrige Lösung wurde mit CHCl₃ (4 × 30 mL) extrahiert, und das Extrakt mit dest. Wasser (2 × 50 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit CHCl₃ (1 × 30 mL) rückextrahiert und das organische Extrakt einmal mit dest. Wasser (1 × 30 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde über *Flash*-Säulenchromatographie (50 g Kieselgel; Tol./EtOAc 1:1) aufgereinigt. Man erhielt den Alkohol **35** als weißes Pulver (650 mg, 2.8 mmol, 92 %).

R_f = 0.31 (Tol/EtOAc 1:1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.42-1.59 (m, 1H, C3H_b), 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 1.75-1.91 (br s, 1H, OH), 2.05-2.17 (m, 1H, C3H_a), 2.41 (ddd, 1H, ³J(C4H, C1`H_a) = 3.6 Hz, ³J(C4H, C1`H_b) = 2.4 Hz, ³J(C4H, C3H) = 9.3 Hz, C4H), 3.42 (s, 2H, C1H, C5H), 3.67 (dd, 1H, ²J(C1`H_a, C1`H_b) = 10.2 Hz, ³J(C1`H_a, C4H) = 3.6 Hz, C1`H_a), 3.92 (dd, 1H, ²J(C1`H_b, C1`H_a) = 10.2 Hz, ³J(C1`H_b, C4H) = 2.4 Hz, C1`H_b), 4.18-4.36 (m, 1H, C2H), 5.83 (br d, 1H, ³J(NH, C2H) = 6.3 Hz, NH); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 28.3 (3 × CH₃), 32.6 (C3), 40.3 (C4), 49.6 (C2), 59.2, 59.8

¹⁶ 10 % Eisessig in Methanol

(C1, C5), 62.7 (C1'), 79.2 (OC(CH₃)₃), 155.7 (NHCOO); MS (ESI⁺): *m/z* (%) = 252 (100) [M + Na]⁺, 196 (16) [M - C₄H₈ + Na]⁺, 152 (19) [M - C₅H₈O₂ + Na]⁺.

Synthese von tert-Butyl N-((1S, 2R, 4R, 5R)-4-[(tert-butyl dimethylsilyloxy)-methyl]-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-yl)carbamat (36) ^[53]

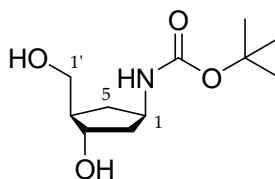


Der Alkohol **35** (3.6 g, 15.9 mmol, 1 eq), Imidazol (2.4 g, 35.0 mmol, 2.2 eq) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (5.3 g, 35.0 mmol, 2.2 eq) wurden unter N₂-Atmosphäre in DMF (73 mL) gelöst und bei RT 3 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat (500 mL) verdünnt, und mit ges. wässriger NaHCO₃-Lösung (2 × 250 mL) sowie ges. wässriger NaCl-Lösung (4 × 250 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (1 × 250 mL) rückextrahiert und das Extrakt mit ges. wässriger NaCl-Lösung (2 × 250 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (470 g Kieselgel, Tol/EtOAc 8:1) aufgereinigt. Man erhielt den Silylether **36** in Form eines gelben Öls (4.6 g, 13.3 mmol, 84 %).

R_f = 0.39 (Tol/EtOAc 8:1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.07 (s, 6H, Si-(CH₃)₂), 0.87 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.31 (d, 1H, ²J(C3H_b, C3H_a) = 14.3 Hz, C3H_b), 1.37 (s, 9H, *t*Bu), 1.98-2.09 (m, 1H, C3H_a), 2.28-2.31 (m, 1H, C4H), 3.28 (d, 1H, ³J(C5H, C1H) = 2.2 Hz, C5H), 3.31 (d, 1H, ³J(C1H, C5H) = 2.2 Hz, C1H), 3.56 (dd, 1H, ²J(C1'H_a, C1'H_b) = 10.3 Hz, ³J(C1'H_a, C4H) = 2.8 Hz, C1'H_a), 3.79 (dd, 1H, ²J(C1'H_b, C1'H_a) = 10.3 Hz, ³J(C1'H_b, C4H) = 2.3 Hz, C1'H_b), 4.15-4.21 (m, 1H, C2H), 5.63 (br d, 1H, ³J(NH, C2H) = 9.6 Hz, NH); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = -5.5 (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃),

18.7 (Si-C(CH₃)₃), 26.1 (Si-C(CH₃)₃), 28.4 (OC(CH₃)₃), 33.3 (C3), 40.8 (C4), 49.6 (C2), 59.4, 59.8 (C1, C5), 64.7 (C1'), 79.1 (OC(CH₃)₃), 155.2 (NHCOO); MS (ESI⁺): *m/z* (%) = 366 (100) [M + Na]⁺, 310 (16) [M - C₄H₈ + Na]⁺.

Synthese von tert-Butyl N-[(1R, 3S, 4R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-cyclopentyl]-carbammat (37) [53]



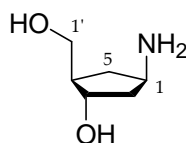
Das in wasserfreiem Toluol (18 mL) gelöste Epoxid **36** (868 mg, 2.5 mmol, 1 eq) wurde bei 0 °C mit Red-Al® (65 % Lsg. in Toluol, 1.5 mL, 5.1 mmol, 2 eq) versetzt. Die Reaktion rührte 3 h bei RT und wurde dann durch Zugabe einer gesättigten, wässrigen Ammoniumchlorid-Lösung (33 mL) beendet. Die Reaktionslösung rührte für weitere 30 Minuten bei RT. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (65 mL) verdünnt und mit ges. wässriger NaCl-Lösung (4 × 65 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (2 × 50 mL) rückextrahiert und das Extrakt mit ges. wässriger NaCl-Lösung (2 × 50 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Boc-geschützte Carbozyklus **37** wurde als weißes, feinkristallines Pulver gewonnen (471 mg, 2.0 mmol, 81 %).

R_f = 0.16 (CHCl₃/MeOH 10:1), 0.11 (Tol/EtOAc 1:2); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.02-1.12 (m, 1H, C5H_b), 1.49 (s, 9H, *t*Bu), 1.58-1.95 (m, 4H, C2H_b, C2H_a, C4H, OH), 2.21-2.31 (m, 1H, C5H_a), 3.16-3.21 (br s, 1H, OH), 3.58 (m, 1H, C1'H_a), 3.77-3.82 (dd, 1H, C1'H_b), 4.13-4.17 (m, 2H, C1H, C3H), 4.60 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR

(50 MHz, D₂O): δ = 28.3 (3 \times CH₃), 34.7 (C5), 41.1 (C2), 48.9 (C4), 49.8 (C1), 64.1 (C1'), 73.7 (C3), 81.7 (OC(CH₃)₃), C=O fehlt; MS (ESI⁺): m/z (%) = 485 (36) [M₂ + Na]⁺, 463 (88) [M₂]⁺, 232 (54) [M]⁺, 176 (75) [M - C₄H₈]⁺, 132 (51) [M - C₅H₈O₂]⁺.

Synthese von (1R, 3S, 4R)-[3-Hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]amin

(28) bzw. (38) [53]



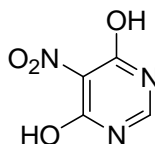
Es gibt zwei Möglichkeiten den Boc-geschützten Carbozyklus zu entschützen:

- 1) Der in 2 mL entgastem Wasser gelöste Carbozyklus **37** (20 mg, 0.087 mmol) wurde unter N₂-Atmosphäre für 7 h unter Reflux erhitzt. Das Wasser wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt über Nacht getrocknet. Man erhielt **28** als farbloses Gel (11 mg, 0.084 mmol, 97 %), welches *in situ* weiter umgesetzt wurde.
- 2) Der Boc-geschützte Carbozyklus **37** (200 mg, 0.866 mmol) wurde in einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Wasser (95:5) (5mL) für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das gelbe Öl **38** *in vacuo* über Nacht getrocknet (quant.).

R_f = 0.03 (CHCl₃/MeOH 10:1); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.93 (m, 1H, C3H_b), 1.43 (m, 1H, C5H_b), 1.57-1.63 (m, 1H, C5H_a), 1.71-1.80 (m, 1H, C2H), 1.97 (m, 1H, C3H_a), 2.31-2.51 (br s, 2H, 2OH), 3.17-3.24 (m, 2H, C4H, C1'H_a), 3.30 (m, 1H, C1'H_b), 3.68 (m, 1H, C1H), 4.61 (br s, 2H, NH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 38.4 (C3), 45.1 (C5), 48.9 (C2), 49.6 (C4), 63.4 (C1'), 73.3 (C1); MS (ESI⁺): m/z (%) = 132 (100) [M+H]⁺, 154 (42) [M+Na]⁺.

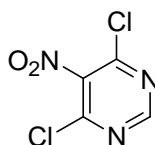
6.3 Synthese von 4-Amino-6-chloro-5-nitro-pyrimidin (27)

Synthese von 4,6-Dihydroxy-5-nitropyrimidin (30)^[75]



4,6-Dihydroxypyrimidin **29** (10 g, 89 mmol, 1 eq) wurde unter Rühren bei einer Temperatur von 15-20 °C zu einem Gemisch aus Salpetersäure (98 %, 11 mL, 267 mmol, 3 eq) und Eisessig (31 mL, 534 mmol, 6 eq) gegeben, wobei sich die Reaktionsmischung rosa verfärbte (Niederschlagsbildung). Nach einer halben Stunde Rühren wurde das Reaktionsgemisch auf Eis (100 mL) gegeben, der Niederschlag abfiltriert und mit wenig dest. Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Man erhielt 4,6-Dihydroxy-5-nitropyrimidin **30** (12.3 g, 78.3 mmol, 88 %) als gelbes Pulver.

Smp.: >200 °C; FTIR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3028.9 ss (OH, NH), 2940.9 m (=CH-Valenz.; Ar), 1728.4 s (C=O-Valenz.), 1665.4 ss (NH-Def. *in plane*; Ar), 1556.4 s (NO₂-Valenz.), 1468.3 m (CH-Def. *in plane*), 1356.9 s (NO₂), 1309.1 s, 1282.1 s (C-N-Valenz., C-O-Valenz.), 1194.7 w, 886.3 m, 789.2 s, 632.7 s, 543.1 s, 457.5 m; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.48-3.55 (br s, 2H, OH × 2), 8.77 (s, 1H, H_{Ar}); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 120.6 (C-NO₂), 153.9 (CH), 155.4 (2 × C-OH); MS (EI⁺): m/z (%) = 157 (100 %).

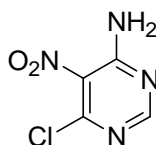
Synthese von 4,6-Dichloro-5-nitropyrimidin (31)^[75]

Zu einer Suspension aus 4,6-Dihydroxy-5-nitropyrimidin **30** (500 mg, 3.2 mmol, 1 eq) und Oxalylchlorid (2.0 mL, 22.4 mmol, 7 eq) wurde vorsichtig DMF (1 mL, 12.8 mmol, 4 eq) getropft. Nach dem Ende der Gasentwicklung wurde die Reaktionsmischung für 4 h unter Rückfluss erhitzt, wobei sich die gelbe Suspension zunehmend rötlich verfärbte. Das überschüssige Oxalylchlorid wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand unter Eiskühlung mit Eis (5 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit Toluol (3 × 20 mL) extrahiert, und das Extrakt mit dest. Wasser (1 × 10 mL) rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach dem Umkristallisieren aus *n*-Heptan konnte die Dichloroverbindung **31** (386.9 mg, 2.0 mmol, 63 %) in Form weißer Kristalle (Plättchen) erhalten werden.

Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse konnten erhalten werden, nachdem das in einem Toluol/*n*-Hexan-Gemisch gelöste Produkt bei -27 °C auskristallisierte.

$R_f = 0.67$ (Tol/EtOAc 10:1); Smp.: 100 °C; FTIR (KBr): ν [cm⁻¹] = 1551.8 *ss* (C=C-Valenz.;Ar), 1533.5 *ss* (NO₂-Valenz.), 1430.8 *s* (CH-Def. *in plane*; Ar), 1377.5 *w* (NO₂), 1316.5 *s*, 1249.5 *w*, 857.7 *s* (C-Cl), 836.8 *s* (C-Cl), 773.9 *w*, 602.7 *m*; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 9.24$ (*s*, 1H, CH_{Ar}); MS (EI⁺): m/z (%) = 193 (100 %).

Synthese von 4-Amino-6-chloro-5-nitropyrimidin (27)^[76]



Ammoniumacetatlösung

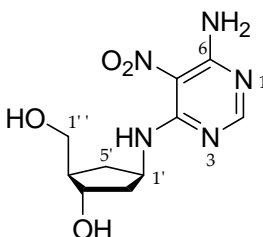
Der Eisessig (1.6 mL) wurde langsam und unter Eiskühlung zur Ammoniumhydroxidlösung (3.2 mL, 28 %) gegeben.

Zu einer bei 8 °C gehaltenen Suspension von 4,6-Dichloro-5-nitropyrimidin **31** (800 mg, 4 mmol, 1 eq) in Dioxan (5 mL) wurde langsam mittels einer Spritzenpumpe frisch hergestellte Ammoniumacetatlösung (4.8 mL) so zugetropft, dass die Reaktionslösung eine Temperatur von 15 °C nicht überschritt. Die Reaktionsmischung wurde 90 Minuten unter Eiskühlung gerührt und 4-Amino-6-chloro-5-nitropyrimidin **27** als gelbliches Pulver durch die langsame Zugabe von eisgekühltem dest. Wasser (18 mL) gefällt. Das gefällte Produkt **27** wurde abfiltriert, aus heiß-gesättigter Benzollösung umkristallisiert und im Ölpumpenvakuum über Nacht getrocknet (425 mg, 2.4 mmol, 61 %).

$R_f = 0.56$ (CHCl₃/MeOH 10:1); Smp.: 155 °C; FTIR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3452.3 s, 3303.3 m (NH-Valenz.; prim. Amin), 3140.4 ss (=CH-Valenz.; Ar), 1647.0 ss (NH-Def. *in plane*; prim. Amin), 1575.9 ss (C=C-Valenz.; Ar), 1519.2 ss (NO₂-Valenz.), 1342.8 m (NO₂), 1260.6 s, 1233.8 m (C-N-Valenz.), 864.0 m (C-Cl); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.37 (s, 1H, H_{Ar}), 8.41-8.47 (br d, 2H, $J = 18.9$ Hz, NH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 151.1 (C_{Ar}), 156.3 (C_{Ar}), 158.2 (C_{Ar}), 158.6 (C_{Ar}); MS (EI⁺): m/z (%) = 174 (100 %).

6.4 cFaPydA-Synthese

Synthese von (1R,3S,4R)-{[4-Amino-5-nitropyrimidin-6-yl]amino}-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentan (26)

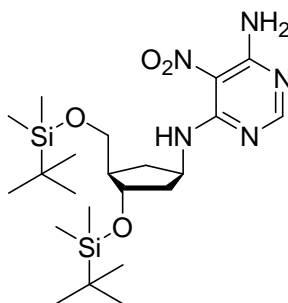


Eine Suspension aus dem entschützten Carbozyklus **38** (53 mg, 0.4 mmol, 1eq), 4-Amino-6-chloro-5-nitropyrimidin **27** (70 mg, 0.403 mmol, 1 eq) und Triethylamin (0.4 mL, 2.8 mmol, 7 eq) in abs. Ethanol (2.1 mL) wurde für 10 Minuten zum Rückfluss erhitzt, bis sich alle Bestandteile gelöst hatten. Die resultierende gelbe Lösung refluxierte eine weitere Stunde. Der hierbei entstehende gelbe Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig EtOH gewaschen und bei 50 °C für 24 h *in vacuo* getrocknet. Das Produkt **26** (91 mg, 84 %) konnte als weißes Pulver isoliert werden.

Smp.: 169 °C (Zersetzung); FTIR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3446.9 ss (OH-, NH₂-Valenz.), 2927.7 s (CH₂-, CH₃-Valenz.), 1650.9 s (NH-Def.), 1605.1 s (C=C-Valenz.), 1517.4 s (NO₂-Valenz.), 1397.6 w; 1368.8 m (NO₂), 1255.4 s (C-N-Valenz.), 1136.9 w, 1042.7 w, 1004.0 m, 794.2 m, 586.1 m, 557.3 w, 425.5 w; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.21-1.35 (m, 1H, C5'H_a), 1.71-1.91 (m, 3H, C4'H, C2'H_{a/b}), 2.08-2.29 (m, 1H, C5'H_b), 3.38-3.44 (m, 2H, C1''H_{a/b}), 3.53-3.59 (m, 1H, OH), 3.93-3.97 (m, 1H, C3'H), 4.62-4.75 (m, 2H, C1'H, OH), 7.97 (s, 1H, CH_{pyrimidin}), 8.56 (d, 2H, *J* = 14.9 Hz, NH₂), 9.15 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, NH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 32.3 (C5'), 34.1 (C2'), 45.5 (C4'), 62.2 (C1''), 71.4 (C3'), 72.0 (C1'), 155.9 (CH_{Ar}), 158.7 (C_{Ar}), 158.8 (C_{Ar}),

159.4 (C_{Ar}); MS (ESI⁺): m/z (%) = 270 (100) [M]⁺, 132 (92) [M-C₄H₂N₄O₂ (Heterozyklus)]⁺; HRMS (ESI⁺, M⁺): ber. für [C₁₀H₁₅N₅O₄]⁺: 270.1202, gef. 270.1213.

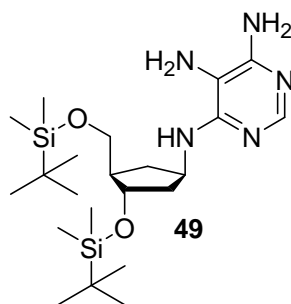
Synthese von (1R,3S,4R)-{[4-Amino-5-nitropyrimidin-6-yl]amino}-3-tert-butyl-dimethylsilyloxy-4-(tert-butyl-dimethylsilyloxy-methyl)cyclopentan (39)



Das Kupplungsprodukt **26** (90 mg, 0.3 mmol, 1 eq) wurde mit Imidazol (90 mg, 1.2 mmol, 4 eq) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (204 mg, 1.2 mmol, 4 eq) in trockenem DMF (2.5 mL) gelöst und 5 h bei RT gerührt. Nach Verdünnung mit Ethylacetat (25 mL) wurde mit ges. wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 × 25 mL) sowie gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (4 × 25 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (1 × 40 mL) rückextrahiert und das Extrakt mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1 × 30 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach chromatographischer Aufreinigung (15g Kieselgel, CHCl₃/MeOH 20:1 → 10:1) des Rohprodukts erhielt man **39** (126 mg, 0.23 mmol, 75 %) als gelbes Öl. Das einfach geschützte Kupplungsprodukt konnte als farbloses Öl isoliert werden.

FTIR (KBr): ν [cm^{-1}] = 2928.9 *m*, 2856.2 *m* (CH_2 -, CH_3 -Valenz.), 1579.8 *ss* (NH-Def.), 1519.7 *s* (NO_2 -Valenz.), 1470.9 *m* (Aromaten, Ringschwingung); 1357.3 *m* (NO_2), 1248.1 *s* (C-N-Valenz.), 1090.2 *s*, 1004.2 *m*, 937.9 *w*, 795.8 *ss*, 772.6 *ss*, 667.8 *m*;
 $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 0.03 (s, 12H, Si-(CH_3)₂ × 2), 0.86 (s, 18H, Si-C(CH_3)₃ × 2), 1.18-1.40 (m, 1H, C5`H_a), 1.67-1.81 (m, 1H, C5`H_b), 1.97-2.14 (m, 2H, C2`H_{a,b}), 2.29-2.44 (m, 1H, C4`H), 3.50-3.62 (m, 2H, C1``H_{a,b}), 4.11-4.19 (m, 1H, C1`H), 4.65-4.81 (m, 1H, C3`H), 6.56-6.58 (br d, 1H, 3J = 4 Hz, NH₂), 8.01 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.54 (br s, 1H, NH₂), 9.10-9.14 (br d, 1H, 2J = 7.26 Hz, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = -5.3 (Si- CH_3), -5.3 (Si- CH_3), -4.6 (Si- CH_3), -4.5 (Si- CH_3), 18.0 (Si-C(CH_3)₃), 18.4 (Si-C(CH_3)₃), 25.9 (Si-C(CH_3)₃), 26.1 (Si-C(CH_3)₃), 34.1 (C5`), 42.4 (C2`), 49.9 (C4`), 50.4 (C1``), 63.4 (C1`), 73.2 (C3`), 159.4 (C_{Ar} × 2), 159.9 (C_{Ar} × 2); MS (ESI⁺): *m/z* (%) = 498 (100) [M]⁺, 360 [M-C₄H₂N₄O₂ (Heterozyklus)]⁺; HRMS (ESI⁻, M⁻): ber. für [C₂₂H₄₂N₅O₄Si₂]⁻: 496.2781, gef. 496.2774.

Synthese von N-{4-Amino-6-[3,4-bis-(*tert*-butyl-dimethyl-silyloxy)-cyclopentylamino]-pyrimidin-5-yl}-formamid (Formylierung) (40)

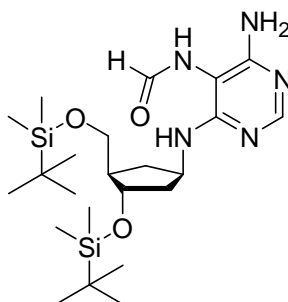


Zu dem in abs. EtOH (5mL) suspendierten Pd/ C (160 mg; 0.4 eq) wurde das in abs. EtOH (5mL) gelöste Nitropyrimidin **39** (200 mg; 0.40 mmol; 1 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde zweimal entgast und einmal mit Wasserstoff gespült, bevor die Reaktionsmischung für 3h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre rührte (optional auch mit weniger Pd/ C über Nacht). Das Pd/ C wurde über einen Spritzenfilter (Nylon für unpolare und polare Lösungsmittel; Poren \varnothing = 0.20 μm ,

Filter 25 mm; Firma Millipore) in einen ausgeheizten Kolben abfiltriert (klare Lösung). Das Ethanol wurde *in vacuo* abkondensiert und der farblose, ölige Rückstand *in vacuo* getrocknet. Da das Diamin **49** extrem oxidationsempfindlich war, wurde direkt mit der Formylierung zum Formamid **40** fortgefahren.

FTIR (ATR): ν [cm^{-1}]= 3325.6 *w* (NH_2 -Valenz.), 2928.9 *m*, 2856.0 *m* (CH_2 -, CH_3 -Valenz.), 1588.9 *ss* (NH -Def.), 1496.5, 1461.5 *m* (Aromaten, Ringschwingung); 1250.0 *s* (C-N -Valenz.), 1076.0 *ss*, 1004.5 *w*, 938.2 *w*, 831.5 *ss*, 772.3 *ss*, 666.4 *m*;
 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 0.04 (*s*, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.05 (*s*, 3H, SiCH_3), 0.06 (*s*, 3H, SiCH_3), 0.88 (*s*, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.90 (*s*, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1.21-1.28 (*m*, 1H, C_5H), 1.72 (*m*, 1H, C_2H_a), 1.98-2.07 (*m*, 2H, C_2H , C_4H), 2.36 (*m*, 3H, C_5H , NH_2 -5), 3.61 (*m*, 2H, $\text{C}_1\text{H}_{a,b}$), 4.15 (*m*, 1H, C_3H), 4.53-4.61 (*m*, 1H, C_1H), 4.97 (*s*, 3H, NH_2 -6), 5.22 (*d*, 3J (C_1NH , C_1H)= 7.44 Hz, 1H, C_1NH), 7.99 (*s*, 1H, CH_{Ar}); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ = -5.1 (Si-CH_3), -4.5 (Si-CH_3), -4.3 (Si-CH_3), -3.4 (Si-CH_3), 18.2 ($\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$), 18.6 ($\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$), 26.1 ($\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$), 26.2 ($\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$), 34.7 (C_5'), 43.1 (C_2'), 49.9 (C_4'), 63.5 (C_1''), 73.3 (C_3'), 102.5 (C_1'), 123.9 ($\text{C}_{Ar}\text{-NH}_2$ -5), 151.8 (C_{Ar}), 155.6 (C_{Ar}), 158.2 (C_{Ar}); HRMS (ESI⁺, M⁺): ber. für $[\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_2\text{Si}_2]^+$: 468,3112, gef. 468.3174.

Formamid-Synthese (40)



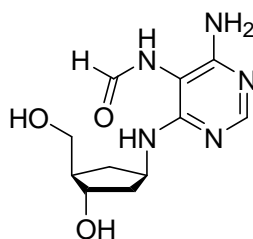
Ameisensäureacetanhydrid: Ameisensäure (2.04 mL) und Essigsäureanhydrid (5.1 mL) wurden für 15 min auf 60°C erhitzt und direkt im Anschluss auf 0°C abgeschreckt. Das gemischte Anhydrid wurde zunächst dreimal entgast und dann auf 0°C gekühlt.

Das Amin **49** wurde dreimal mit je 1 mL Pyridin eingeeengt, um die restlichen Ethanol-Reste zu entfernen. Das gelbe Amin wurde schließlich in entgastem abs. THF (10mL) gelöst und im Anschluss mit Pyridin (815 µL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde abermals entgast, auf 0°C gekühlt und mit dem ebenfalls auf 0°C gekühltem und entgastem Anhydrid (617µL) versetzt. Die zunächst im Eisbad gekühlte Reaktionsmischung rührte über Nacht und konnte sich hierbei allmählich auf RT erwärmen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der gelbe, ölige Rest chromatographisch (CHCl₃:MeOH 20:1→10:1) aufgereinigt. Das Formamid **40** konnte als weißer Schaum isoliert werden (147 mg; 74% über zwei Stufen).

FTIR (ATR): ν [cm⁻¹]= 3338.0 *w* (NH₂-Valenz.), 2929.1 *m*, 2856.2 *m* (CH₂-, CH₃-Valenz.), 1685.2 *s* (C=O, Amid), 1588.5 *ss* (NH-Def.), 1500.9, 1469.9 *m* (konjugierte zyklische Systeme); 1360.2 *w*, 1327.1 *w*, 1250.2 *s* (C-N-Valenz.), 1076.8 *ss*, 1004.5 *w*, 938.2 *w*, 831.5 *ss*, 772.3 *ss*, 667.3 *m*; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.04-0.06 (*m*, 12H, Si(CH₃)₄), 0.88 (*s*, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.90 (*s*, 9H, SiC(CH₃)₃), 1.12-1.20 (*m*, 1H, C5'H_a), 1.59-1.69 (*m*, 1H, C2'H_a), 1.98-2.06 (*m*, 2H, C2'H_b, C4'H), 2.34 (*m*, 1H,

C5`H_b), 3.52-3.63 (*m*, 2H, C1`H_{a/b}), 4.12 (*m*, 1H, C3`H), 4.56-4.64 (*m*, 1H, C1`H), 4.74 (*d*, *J* = 7.14 Hz, 0.46H, NH_{cis}), 4.86 (*d*, *J* = 7.61 Hz, 0.55H, NH_{cis}), 5.21 (*s*, 1.56H, NH_{2-6cis}), 6.56 (*d*, *J* = 11.34 Hz, 0.55H, NH_{trans}), 6.77 (*s*, 0.46H, NH_{2-6trans}), 7.90 (*br s*, 0.16 H, CH_{Ar} Rotamer), 7.94 (*s*, 0.82H, CH_{Ar} Rotamer), 8.02 (*s*, 0.27H, CHO_{trans}), 8.37 (*s*, 0.80H, CHO_{cis}), 8.90 (*br s*, 0.5H, NH-5); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm)= 0.03 (*s*, 12H, Si(CH₃)₄), 0.86 (*s*, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.87 (*s*, 9H, SiC(CH₃)₃), 1.01-1.17 (*m*, 1H, C5`H_a), 1.71-1.78 (*m*, 2H, C2`H_{a/b}), 1.85-1.90 (*m*, 1H, C4`H), 1.99-2.15 (*m*, 1H, C5`H_b), 3.50 (*d*, ²*J*= 6 Hz, 2H, C1`H_{a/b}), 4.03-4.11 (*m*, 1H, C3`H), 4.43-4.55 (*m*, 1H, C1`H), 6.10 (*br s*, 2.73H, NH-4_{cis}, NH₂ Rotamer), 6.33 (*d*, ²*J*= 7.58 Hz, 0.28H, NH-4_{trans}), 7.72 (*d*, *J* = 11.65 Hz, 0.14H, NH-5_{trans}), 7.87 (*d*, *J* = 2.93 Hz, 0.74H, CH_{Ar cis}), 8.09 (*d*, *J* = 1.28 Hz, 0.74H, CHO_{cis}), 8.23 (*d*, *J* = 11.55 Hz, 0.26H, CHO_{trans}), 8.76 (*s*, 0.6H, NH-5_{cis}); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= -5.4 (Si-CH₃), -5.3 (Si-CH₃), -4.8 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), 18.0 (Si-C(CH₃)₃), 18.4 (Si-C(CH₃)₃), 25.8 (Si-C(CH₃)₃), 26.0 (Si-C(CH₃)₃), 34.5 (C5`), 42.6 (C2`), 49.8 (C4`), 63.5 (C1`), 73.0 (C3`), 93.7 (C1`), 94.5 (C1`), 154.4 (C_{Ar}), 156.4 (C_{Ar}), 157.0 (C_{Ar}), 157.9 (C_{Ar}), 159.7 (C_{Ar}), 160.9 (C_{Ar}), 166.7 (CHO); HRMS (ESI⁺, M⁺): ber. für [C₂₃H₄₅N₅O₃Si₂]⁺: 496.3061, gef. 496.2979.

Synthese von N-{4-Amino-6-[3-hydroxy-4-hydroxymethyl-cyclopentyl]-amino]-pyrimidin-5-yl}-formamid (TBDMS-Entschützung) (50)

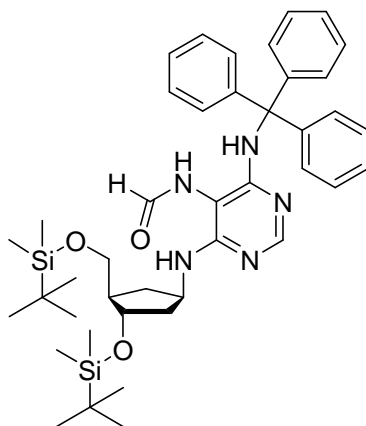


Der in abs. THF (3 mL) gelöste Silylether **39** (78 mg, 0.16 mmol) wurde zunächst mit Pyridin (122 µL) und dann mit dem Pyridin·HF-Komplex (122 µL) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Das Diol fällt dabei teilweise als weißer, feiner Niederschlag aus, welcher nach dem Zentrifugieren von dem Überstand getrennt

werden kann. Der weiße Rückstand wurde zunächst in EtOAc (1 mL) suspendiert, mit MeOTMS (370 μ L) versetzt und für 1-2 h bei RT gerührt. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abdekantiert, und zum Quenchen des Pyridin-HF-Komplexes ebenfalls mit MeOTMS (370 μ L) versetzt und für 2 h bei RT gerührt. Die beiden Fraktionen wurden vereinigt, um das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abzudestillieren. Der entstehende weiße Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet. Das Diol **50** konnte als weißes, feines Pulver (33 mg) in 78 % Ausbeute isoliert werden.

R_f = 0.88 Diol (*RP*; MeOH/H₂O 2:1), R_f = 0.51 *mono*-Silylether (*RP*; MeOH/H₂O 2:1); ¹H-NMR(200 MHz, MeOH-d₄): δ = 1.13-1.30 (m, 1H, C5`H_a), 1.77-1.93 (m, 3H, C4`H, C2`H_{a/b}), 2.16-2.28 (m, 1H, C5`H_b), 3.48-3.51 (m, 2H, C1``H_{a/b}), 3.97-4.01 (m, 1H, C3`H), 4.50-4.58 (m, 1H, C1`H), 7.33-7.40 (m, 1H, NH-4), 7.76 (s, 0.33H, CHO_{trans}), 7.80 (s, 0.33H, CH_{Ar/trans}), 7.95 (s, 0.67H, CH_{Ar/cis}), 8.14 (br s, 0.67H, CHO_{cis}), 8.43 (s, 1H, NH-5_{cis}), OH und NH₂-Signale fehlen bzw. liegen unter Wasserpeak; ¹³C-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 35.4 (C5`), 42.6 (C2`), 50.2 (C4`), 51.5 (C4`), 64.5 (C1``), 74.3 (C3`), 93.9 (C1`), 125.7 (C_{Ar}), 138.8 (C_{Ar}), 149.7 (C_{Ar}), 153.1 (C_{Ar}), 156.7 (C_{Ar}), 159.2 (C_{Ar}), 164.2 (CHO); HRMS (ESI⁺, M⁺): ber. für [C₁₁H₁₈N₅O₃]⁺: 268.1404, gef. 268.1352.

Synthese von N-{4-[3-(tert-Butyl-dimethyl-silyloxy)-4-(tert-butyl-dimethyl-silyloxymethyl)-cyclopentylamino]-6-(trityl-amino)-pyrimidin-5-yl}-formamid (Trityl-Schützung) (41)

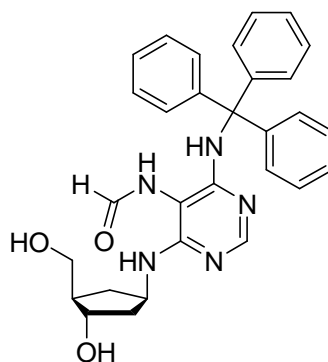


cFapydA **40** (555 mg; 1.12 mmol; 1 eq) wurde im ausgeheizten Kolben über Molsieb (4Å) in abs CH₂Cl₂ (4mL) und DIEA (196 µL) für 30 Minuten gerührt. Hierzu wurde unter Eiskühlung TrCl (376 mg, 1.35mmol, 1.2 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht, wobei das Kältebad allmählich auftaute. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (CHCl₃:MeOH 200:1 → 20:1). Das Produkt konnte als weißer Schaum bzw. Film isoliert werden (462 mg, 0.63 mmol, 57 %).

R_f = 0.48 Produkt (CHCl₃/MeOH 20:1), R_f = 0.07 Gemisch aus Produkt + Edukt (CHCl₃/MeOH 20:1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 0.04-0.03 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.04 (s, 3H, SiCH₃), 0.05 (s, 3H, SiCH₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 1.11-1.18 (m, 1H, C5`H_a), 1.59-1.69 (m, 1H, C2`H_a), 1.93-2.09 (m, 2H, C2`H_b, C4`H), 2.25-2.37 (m, 1H, C5`H_b), 3.53-3.63 (m, 2H, C1`H_{a/b}), 4.05-4.16 (m, 1H, C3`H), 4.51-4.60 (m, 1H, C1`H), 4.66-4.74 (m, 0.5H, NH), 5.88 (s, 0.37H, NH-4_{cis}), 5.95 (s, 0.53H, NH-4_{trans}), 6.27-6.35 (m, 0.16H, NH), 6.49-6.67 (m, 0.81H, NH Rotamere), 6.89-7.09 (m, 0.55H, NH Rotamere), 7.17-7.33 (m, 15H, Tr, CDCl₃), 7.37-7.71 (m, 3H), 7.80 (d, ²J = 17.21 Hz, 0.84H, CH_{Ar trans}), 7.95 (d, ²J = 11.76 Hz,

0.53H, CHO_{trans}), 8.37 (br s, 0.43H, NH-5_{trans}), 9.01 (d, $J = 4.31$ Hz, 0.07H, NH-5_{cis}); ¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = -5.4$ (Si-CH₃ × 2), -4.8 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), 18.0 (Si-C(CH₃)₃), 18.4 (Si-C(CH₃)₃), 25.8 (Si-C(CH₃)₃), 26.0 (Si-C(CH₃)₃), 34.6 (C5'), 34.7 (C5'), 42.6 (C2'), 42.7 (C2'), 49.7 (C4'), 49.8 (C4'), 63.4 (C1''), 63.5 (C1''), 71.1 (C_{quat}-Tr), 71.2 (C3'), 72.9 (C3'), 86.4 (C1'), 94.6 (C1'), 126.6 (*p*CH-Tr), 126.8 (*p*CH-Tr), 127.5 (*p*CH-Tr), 127.8 (*o*CH-Tr), 127.8 (*o*CH-Tr), 127.9 (*o*-CH-Tr), 128.7 (*m*CH-Tr), 128.9 (*m*CH-Tr), 129.2 (*m*CH-Tr), 129.9 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 135.3 (*ipso*CH-Tr), 135.4 (*ipso*CH-Tr), 135.5 (*ipso*CH-Tr), 135.6, 145.2 (C_{Ar}-H₂), 145.5 (C_{Ar}-H₂), 156.5 (C_{Ar}-NH-Tr), 157.2 (C_{Ar}-NH-Tr), 158.9 (C_{Ar}-NH₄), 159.0 (C_{Ar}-NH₄), 160.1 (CHO), 166.6 (CHO); HRMS (ESI⁺, M⁺): ber. für [C₄₂H₅₉N₅O₃Si₂]⁺: 738.4156, gef. 738.4247 [C₄₂H₆₀N₅O₃²⁸Si₂].

Synthese von N-{4-[3-Hydroxy-4-hydroxymethyl-cyclopentylamino]-6-(trityl-amino)-pyrimidin-5-yl}-formamid (TBDMS-Entschützung) (42)

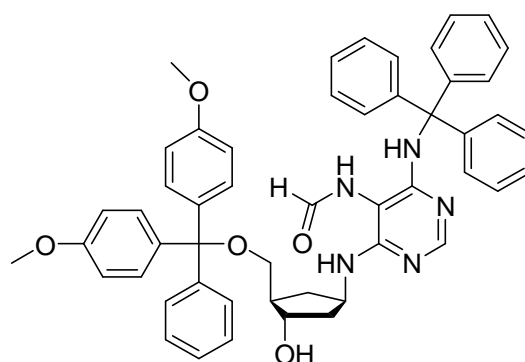


Die Reaktion wurde in verschließbaren 10 mL Polypropylen-Röhrchen (*Falk-Tube*) durchgeführt, wobei größere Ansätze auf mehrere Röhrchen verteilt wurden. Der in abs. THF (2 × 3.5 mL) gelöste Silylether **41** (2 × 125 mg, 0.339 mmol) wurde zunächst mit Pyridin (2 × 131 μ L) und dann mit dem Pyridin·HF-Komplex (2 × 131 μ L) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit MeOTMS (2 × 405 μ L) versetzt und für 1-2h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, und der weiße

Rückstand *in vacuo* getrocknet. Das Diol **42** konnte säulenchromatographisch (CHCl₃:MeOH 20:1→10:1) aufgereinigt werden (162 mg, 94 %).

R_f = 0.05 (CHCl₃/MeOH 10:1); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.12-1.41 (m, 2H, C5`H_a), 1.65-1.92 (m, 3H, C2`H_{a/b}, C4`H), 2.00-2.20 (m, 1H, C5`H_b), 3.27-3.50 (m, 2H, C1`H_{a/b}), 3.85-3.99 (m, 1H, C3`H), 4.09-4.18 (m, 0.4H, OH), 4.21-4.40 (m, 1H, C1`H), 4.46-4.67 (m, 0.6H, OH), 6.82 (s, 0.6H, NH), 6.86 (s, 1H, NH), 6.91 (d, J = 7.59 Hz, 1.96H, NH-6), 7.13-7.35 (m, 14H, Tr), 8.29 (s, 0.62H, CHO), 9.13 (s, 0.98H, NH-5_{cis}); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 34.2 (C5`), 41.0 (C2`), 49.0 (C4`), 50.0 (C4`), 62.7 (C1`), 70.2 (C_{quat}-Tr), 71.6, 79.1 (C3`), 95.7 (C1`), 125.6 (pCH-Tr), 127.7 (oCH-Tr), 128.3 (mCH-Tr), 145.5 (ipsoCH-Tr), 147.7 (C_{Ar}), 150.0 (C_{Ar}), 153.0 (C_{Ar}), 156.0 (C_{Ar}), 161.4 (CHO); HRMS (ESI⁺, M⁺): ber. für [C₃₀H₃₁N₅O₃]⁺: 509.2427, gef. 510.2515 [C₃₀H₃₂N₅O₃].

Synthese von N-[4-{3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxymethyl]-4-hydroxy-cyclopentylamino}-6-(trityl-amino)-pyrimidin-5-yl]-formamid (DMT-Schätzung) (43)

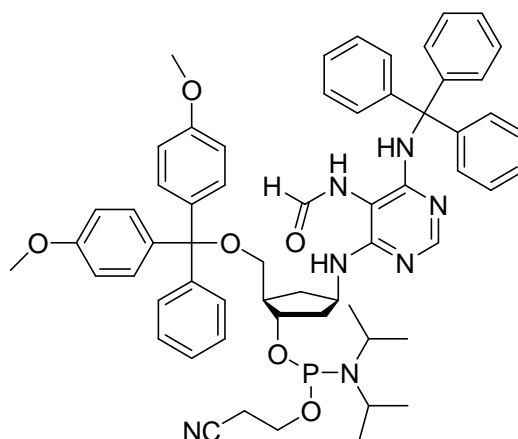


Carbozyklisches FapydA **42** (214 mg, 0.42 mmol; 1eq) wurde zweimal aus trockenem Pyridin (1 mL) eingeengt, bevor es in trockenem Pyridin (8.5 mL) mit Molsieb (4Å) über Nacht zum weiteren Trocknen gerührt wurde. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung im Eisbad gekühlt, und das DMTCl (2 × 86 mg,

0.50 mmol; 1.2 eq) in zwei Portionen je 0.6 eq pro Stunde hinzu gegeben. Im Anschluss an die zweite DMTCl-Zugabe rührte die Reaktionsmischung zunächst ebenfalls für eine Stunde bei 0°C, und abschließend für 18h bei RT. Durch die Zugabe von 5 mL MeOH wurde die Reaktion gestoppt. Das Molsieb wurde abfiltriert, und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das gelbe Rohprodukt konnte säulenchromatographisch mit einem Gradienten in folgendem Laufmittelgemisch (CHCl₃:MeOH [mit jeweils 0.5 % Pyridin versetzt]: 200:1 → 100:1 → 50:1 → 10:1) aufgereinigt werden. **43** konnte als weißer Film/ Schaum isoliert werden (247 mg, 73 %).

R_f = 0.29 (CHCl₃:MeOH 20:1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ= 0.98-1.18 (m, 1H, C5`Ha), 1.73-1.89 (m, 1H, C2`Ha), 2.01-2.18 (m, 2H, C2`Hb, C4`H), 2.23-2.40 (m, 2H, C5`Hb), 2.98-3.08 (m, 1H, OH), 3.29-3.37 (m, 1H, C1``Ha), 3.45-3.57 (m, 1H, C1``Hb), 3.78 (s, 6H, OCH₃), 4.06-4.24 (m, 1H, C3`H), 4.47-4.60 (m, 1H, C1`H), 5.79 (s, 0.53H, NH), 5.90 (s, 0.43H, NH), 6.21 (d, J = 11.74 Hz, 0.42H, NH_{trans}), 6.31 (s, 0.51H, NH), 6.41 (s, 0.29H), 6.83 (d, ³J = 8.77 Hz, 4H, 2 × (*m*CH₂ PhOCH₃)), 7.16-7.33 (m, 28H, Tr, DMT; CDCl₃), 7.40 (d, J = 7.93 Hz, 2H), 7.48 (s, 0.33H), 7.68 (tt, J = 7.61, 7.61, 1.75, 1.75 Hz, 0.84H), 7.77 (d, J = 16.26 Hz, 0.97H, CH_{Ar} /trans), 7.94 (d, J = 11.79 Hz, 0.45H, CHO_{trans}), 8.17 (s, 0.52H, CHO_{cis}), 8.61 (dd, J = 5.68, 1.49 Hz, 1.67H, NH-5); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ= 35.4 (C5`), 35.6 (C5`), 41.6 (C2`), 41.9 (C2`), 49.3 (C4`), 49.6 (C4`), 55.2 (OCH₃), 55.2 (OCH₃), 58.1, 66.0 (C1``), 66.1 (C1``), 71.0 (C_{quat}-Tr), 71.2 (C_{quat}-Tr), 75.5 (C3`), 75.6 (C3`), 86.4 (C_{quat}-DMT), 86.5 (C_{quat}-DMT), 95.2 (C1`), 113.2 (*m*CH-DMT), 116.9 (*m*CH-DMT), 123.7 (C_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 126.8 (C_{Ar}), 127.0 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 129.99 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 130.1 (C_{Ar}), 135.7 (C_{Ar}), 135.8 (C_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 136.0 (C_{Ar}), 144.7 (*ipso*CHPh-DMT), 145.1 (C_{Ar}), 145.5 (*ipso*CH-Tr), 149.8 (C_{Ar}), 155.6 (C_{Ar}), 156.4 (C_{Ar}), 156.9 (C_{Ar}), 157.0 (C_{Ar}), 158.5 (C_{Ar}), 158.6 (C_{Ar}), 158.8 (C_{Ar}), 159.0 (C_{Ar}), 160.1 (CHO), 166.2 (CHO); HRMS (ESI⁺, M⁺): ber. für [C₅₁H₄₉N₅O₅]⁺: 812, 3734, gef. 812.3769 [C₅₁H₅₀N₅O₅].

2-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxymethyl]-4-[5-formylamino-6-(trityl-amino)-pyrimidin-4-ylamino]-cyclopentyl-O-(N,N-diisopropyl)-(2-cyanoethyl)phosphoramidit (Phosphoramidit-Synthese) (44)



Diisopropylammoniumtetrazolid: Diisopropylamin (2 mL, 14.2 mmol, 1.6 eq) wurde unter Rühren zu dem in trockenem MeCN (8 mL) gelösten 1-*H*-Tetrazol (610 mg, 8.7 mmol, 1 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung rührte für 30 Minuten, bevor das Lösungsmittel von der entstandenen Suspension *in vacuo* entfernt wurde. Nach dem Trocknen über Nacht, konnte das quantitativ entstandene Diisopropylammonium-tetrazolid-Salz direkt für die folgende Reaktion eingesetzt werden.

In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde der DMT-Baustein **43** (228 mg, 0.28 mmol, 1eq) und Diisopropylammoniumtetrazolid (24.3 mg, 0.14 mmol, 0.5 eq) unter Argon in trockenem, entgastem Dichlormethan (3 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde nochmals entgast, bevor Bis-(diisopropylamino)-2-cyanoethoxy)-phosphin (100 μ L, 0.32 mmol, 1.1 eq) unter Eiskühlung hinzu gegeben wurde. Die Reaktion rührte bei RT über Nacht. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, und das Rohprodukt konnte säulenchromatographisch mit deaktiviertem Kieselgel¹⁷ (CHCl₃:MeOH 20:1; 0.5 % Pyridin) aufgereinigt werden.

¹⁷ Verhindert die zu schnelle Zersetzung des Phosphoramidites auf der Säule. Deaktiviertes Kieselgel: Merck Kieselgel 60 wurde in einem Pyridin-Dichlormethan Gemisch (2% Pyridin)

Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Phosphoramidit in möglichst wenig trockenem und entgastem Dichlormethan aufgenommen und in (auf 0 °C gekühltes) Pentan (1:100) langsam eingetroppt, wobei das Phosphoramidit als weißer Niederschlag ausfiel. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffgegenstrom abdekantiert und der weiße Rückstand an der HV über Nacht getrocknet. Das Phosphoramidit **44** konnte als weißes Pulver in einer Ausbeute von 76 % (215 mg) erhalten werden.

$R_f = 0.68$ (CHCl₃:MeOH 10:1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃)¹⁸: $\delta = 0.77-0.96$ (m, 1H, C5'H), 1.04 (d, ³J(PN[CH(CH₃)₂]₂, PN[CH(CH₃)₂]₂) = 6.74 Hz, 3H, PN[CH(CH₃)₂]₂/Isomer1), 1.09-1.16 (m, 9H, PN[CH(CH₃)₂]₂/Isomer1 und 2), 2.00-2.08 (m, 1H, C5'H_a), 2.10-2.27 (m, 1H, C2'H_a), 2.36-2.50 (m, 2H, C2'H_b, C4'H), 2.56-2.68 (m, 2H, CH₂CN), 3.13-3.27 (m, 2H, C1''H_{a/b}), 3.48-3.72 (m, 5H, PN[CH(CH₃)₂]₂, OCH₂CH₂CN), 3.73-3.78 (m, 2 × PhOCH₃, 6H), 3.86-3.94 (m, 1H, C3'H), 4.39-4.55 (m, 1H, C1'H), 4.67 (d, $J = 7.18$ Hz, 0.3H, NH), 4.72 (d, $J = 6.63$ Hz, 0.4H, NH), 4.75 (d, $J = 7.40$ Hz, 0.12H, NH), 5.83 (s, 0.57H, NH_{6cis}), 5.89 (s, 0.31H, NH_{6trans}), 6.38 (d, $J = 13.37$ Hz, 1H, NH_{4trans}), 6.77-6.85 (m, 4H, 4 × *m*ArH/ DMT), 7.14-7.34 (m, 24H, ArH und CDCl₃), 7.39-7.46 (m, 2H, 2 × ArH/ DMT), 7.76 (d, $J = 2.47$ Hz, 0.61H, ArH), 7.80 (d, $J = 2.99$ Hz, 0.32H, ArH), 7.94 (dd, $J = 11.14, 3.17$ Hz, 0.33H, CHO_{trans}), 8.05 (d, $J = 5.61$ Hz, 0.58H, CHO_{cis}), 8.61 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH-5);

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 20.6$ (CH₂CN), 24.6 (PN[CH(CH₃)₂]₂), 24.7 (PN[CH(CH₃)₂]₂), 24.8 (PN[CH(CH₃)₂]₂), 24.9 (PN[CH(CH₃)₂]₂), 29.9, 35.1 (C5'), 35.5 (C5'), 41.3 (C2'), 41.8 (C2'), 43.3 (PN[CH(CH₃)₂]₂), 43.4 (PN[CH(CH₃)₂]₂), 46.4 (C4'), 46.5 (C4'), 46.7 (C4'), 49.4 (C1'), 49.6 (C1'), 49.9 (C1'), 55.4 (2 × OCH₃), 58.6 (OCH₂CH₂CN), 58.7 (OCH₂CH₂CN), 63.6, 71.2 (OC_{quat}-Tr), 71.3 (OC_{quat}-Tr), 75.2

suspendiert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das feuchte Kieselgel im Trockenschrank bei 70°C über Nacht getrocknet.

¹⁸ Das deuterierte Lösungsmittel für die ¹H- und ¹³C- NMR wurden ebenfalls vorher 3 × entgast. CDCl₃ wurde in Gegenwart der DMT-Schutzgruppe immer vor dem Gebrauch über basisches Aluminiumoxid filtriert.

(C3`), 75.3 (C3`), 75.8, 75.9, 86.1 (OC_{quat}(*p*CH₃OPh)₂Ph), 86.2 (OC_{quat}(*p*CH₃OPh)₂Ph), 95.0 (C1`), 95.1 (C1`), 95.6, 95.7, 113.2 (*m*CH-DMT), 117.8 (*m*CH-DMT), 118.2 (CN), 118.5 (CN), 126.7 (*p*C_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 130.4 (CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 136.3 (*ipso*C-*p*MeO-Ph), 136.4 (*ipso*C-*p*MeO-Ph), 136.5, 145.2 (*ipso*C-Ph), 145.3 (*ipso*C-Ph), 145.4 (*ipso*C-Ph), 145.8 (*ipso*C-Ph), 155.6 (C_{Ar}-Het), 156.5 (C_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.8 (C_{Ar}), 156.9 (C_{Ar}), 157.0 (C_{Ar}), 158.6 (*p*C-*p*MeO-Ph), 158.7 (*p*C-*p*MeO-Ph), 159.0 (C_{Ar}), 159.1 (C_{Ar}), 159.2 (C_{Ar}), 160.5 (CHO), 160.7 (CHO), 166.4 (CHO); ³¹P-NMR (81 MHz, CDCl₃): δ= 148.3 (OPN(*i*Pr)₂O, Isomer 1), 148.9 (OPN(*i*Pr)₂O, Isomer 2); HRMS (ESI⁺, M⁺): ber. für [C₆₀H₆₆N₇O₆P]⁺: 1012.4915, gef. 1012.4900 [C₆₀H₆₇N₇O₆P].

6.5 Festphasensynthese

In diesem Kapitel wird die Synthese von modifizierten DNA-Strängen (*c*FaPydA und 8-Oxo-dA) und deren Reinigung beschrieben.

6.5.1 Synthese

6.5.1.1 Oligonukleotidsynthese mit Standardphosphoramiditen

Der Einbau von *c*FaPydA und 8-Oxo-dA in Oligonukleotide verlief jeweils nach einem modifizierten Syntheseprotokoll, während die kommerziell erhältlichen Nukleotide nach dem Standardsyntheseprotokoll des Geräteherstellers gekuppelt wurden. Als Trägermaterial (CPG-Granulat) wurden jeweils die vom Hersteller bezogenen 1µm Polypropylenkartuschen verwendet, welche mit der entsprechenden Base beladen waren. Die für die Standardsynthese verwendeten Lösungen und deren Reaktionszeiten sind im Folgenden aufgelistet:

Deblocking: Dichloressigsäure (DCA, 2.0 %) in Dichlormethan. *Deblockzeit*: 49 s

Kupplung: Aktivator (0.25 M) in Acetonitril (<0.001% Wasser) über gewaschenem 4 Å Molsieb. Kupplungszeit: 96 s

Aktivatoren: 4,5-Dicyanoimidazol, ETT oder BTT.

Capping A: Phenoxyessigsäureanhydrid (Pac-Anhydrid, 0.5 M) und 2,6-Lutidin (11.1 Vol.%) in Acetonitril.

Capping B: N-Methylimidazol (NMI, 16 Vol.%) in Acetonitril.

Cappzeit: 15 s

Oxidation: Iod (20 mM) in 2,6-Lutidin/Acetonitril/Wasser 0.6:6.5:3.0.

Die kommerziell erworbenen *Ultramild* CE Phosphoramidite wurden mit folgenden Schutzgruppen eingesetzt,

dA: Phenoxyacetyl(Pac-dA)

dC: N-Acetyl (Ac-dC)

dG: *iso*-Propyl-phenoxyacetyl (*iPr*-Pac-dG)

dT: ohne Schutzgruppe (dT)

und fanden sich auch im beladenen CPG-Träger wieder.

Die für die DNA-Synthese eingesetzten Phosphoramidit-Lösungen (0.10 M in Acetonitril 0.001% Wasser) wurden über Nacht zusätzlich über gewaschenem 4 Å Molsieb getrocknet.

6.5.1.2 Oligonukleotidsynthese mit Spezialphosphoramiditen

Für die Oligonukleotidsynthese von *c*FaPydA und 8-Oxo-dA musste aufgrund der speziellen Eigenschaften dieser Phosphoramidite vom Standardsyntheseprotokoll abgewichen werden.

cFaPydA

Aufgrund der vorhandenen Formamidgruppe ist speziell dieses Phosphoramidit empfindlich gegenüber zu großen Mengen an Säure, Base und den Bedingungen, welche beim *Standardcapping* verwendet werden. Zu große Mengen an wässriger Säure und Base können die Formamidgruppe spalten. Ebenfalls können zu große Mengen an Säure die Trityl-Schutzgruppe am NH-6 des Heterozyklus teilweise abspalten. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Synthese teilweise auch über die NH-6-Gruppe weiter fortgeführt werden kann. Des Weiteren kann die Formamidgruppe unter den Bedingungen des *Cappings* zum Phenoxyacetamid transamidiert werden. Das modifizierte Syntheseprotokoll beinhaltet ab dem Einbau des cFaPydA für den Rest der DNA-Synthese eine kürzere Deblockingzeit und eine mildere Cappingprozedur (*Capping Aux*), welche im Protokoll durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet sind. Des Weiteren wurde die Kupplungszeit der modifizierten Base mit einer Gesamtreaktionszeit von 14 min mittels „*Doppelcoupling*“ durchgeführt. Hierbei wurde das Phosphoramidit in zwei Schritten auf das Trägermaterial gepumpt und für je 7 min mit dem am Träger gebundenen Oligonukleotid in Gegenwart des Aktivators umgesetzt. Aber auch die Kupplungszeit der ersten, nachfolgenden Base wurde auf 144 s (2.4 min) erhöht. Für den Einbau des cFaPydA sowie für alle darauffolgenden Basen wurde ein alternatives *Capping*, bestehend aus Isobuttersäureanhydrid (0.54 M), 2,6-Lutidin (10.5 Vol.%) in Acetonitril, verwendet. Die *Cappingzeit* betrug 25 s.

8-Oxo-dA

Das kommerziell erhaltene 8-Oxo-dA-Phosphoramidit zeichnet sich vor allem durch seine Oxidationsempfindlichkeit aus. Da die Synthese unter Argonatmosphäre stattfindet, musste bei diesem Phosphoramidit während der Synthese lediglich die Oxidationszeit verkürzt und die Kupplungszeit auf 5 min

erhöht werden. Die Oxidationsempfindlichkeit des 8-Oxo-dA's macht sich erst im Entschützungsprozess bemerkbar und benötigt hier eine spezielle Behandlung.

6.5.2 Entschützung und Reinigung

Nach der DNA-Synthese wurden zunächst die CPG-Träger im Ölpumpenvakuum getrocknet, bevor die Kartuschen geöffnet wurden. Für die sich anschließende Entschützungs- und Abspaltungsprozedur wurde eine Kartusche auf jeweils zwei 2.0 mL *Eppendorf-Cups* verteilt.

Die analytischen- und auch die präparativen HPLC's wurden generell mit folgendem Puffersystem durchgeführt:

Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat in *bd* Wasser

Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat in 80% Acetonitril

Fluss (präparativ): 5mL/ min

Fluss (analytisch): 0.7 mL/ min

6.5.2.1 Entschützung und Reinigung von cFaPydA enthaltender DNA

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der Entschützung. Die erste - und beste - Möglichkeit ist, zunächst die Tritylschutzgruppe sauer über Nacht am Träger abzuspalten und die basische Entschützung in einem zweiten sich anschließenden Schritt zu vollziehen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die saure Abspaltung am Träger in trockenem Lösungsmittel durchgeführt werden kann, und es somit nicht so leicht zur Spaltung der Formamidgruppe bzw. zur Depurinierung am Strang kommt. An diesen Entschützungsschritt schließt sich die basische Entschützung der restlichen Schutzgruppen sowie die basische Abspaltung vom Trägermaterial an. Das Protokoll für die zuerst erwähnte Entschützungprozedur ist nachfolgend skizziert:

Tryl-Entschützung:

Eine halbe DNA-Kartusche wurde mit 500 µL TFA-Lösung (0.8% TFA [99.8%] in trockenem Dichlormethan) bei 17 °C in einem Thermoschüttler für 15 h entschützt. Das Fortschreiten der Tryl-Abspaltung ließ sich hierbei durch die zunehmend gelbliche Verfärbung der Lösung verfolgen. Nach 15 h Entschützung wurde das Trägermaterial kurz abzentrifugiert (2 min bei 6000 rpm), die gelbliche Lösung abdekantiert und der Träger insgesamt zweimal mit je 700 µL Puffer A gequenchet. Hierzu wurde die Pufferlösung auf das Trägermaterial gegeben, gut durchmischt (Vortexer!), und nach erneutem Zentrifugieren (2 min bei 6000 rpm) konnte die wässrige Pufferlösung abdekantiert werden.

Basische Schutzgruppen- und Trägerabspaltung:

Die Abspaltung der basenlabilen Schutzgruppen (*Ultra Mild*) und der DNA vom Träger erfolgte mit einer ethanolischen Ammoniak-Lösung (EtOH/ NH₃ 1/ 3) bei 17 °C in einem Thermomixer für 18 h. Für eine halbe DNA-Kartusche wurden insgesamt 1200 µL der ethanolischen Ammoniak-Lösung verwendet. Zur Aufarbeitung wurde auch hier zunächst das Trägermaterial abzentrifugiert (2 min, 6000rpm) und die DNA-Lösung abdekantiert. Das verbleibende Trägermaterial wurde insgesamt zweimal mit je 300 µL zweifach destilliertem Wasser gewaschen (vortexieren, abzentrifugieren und abdekantieren) und an der *Speed Vac* **ohne** Temperatur das Ethanol und der Ammoniak entfernt.

Reinigung:

Die Reinigung der DNA-Stränge erfolgte entweder mit einer *VP 250/21 Nucleosil 100-7 C18-* oder mit einer *VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec-Säule (Macherey & Nagel)*. Die hierfür verwendeten Gradienten variierten mit der jeweiligen Sequenz, Länge und den mehr oder weniger erfolgreich verlaufenden DNA-Synthesen.

Die zweite Möglichkeit wäre gewesen, zunächst die basische Abspaltung der Schutzgruppen und des Trägers vorzunehmen, und anschließend die saure, wässrige Tritylabspaltung entweder auf einer *Sep-Pak*[®]-Kartusche oder im Eppendorfggefäß durchzuführen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass schwieriger aufzureinigende Oligonukleotide zunächst durch die Schutzgruppe recht einfach auf der HPLC zu trennen sind. Der Nachteil ist ganz klar, dass es vereinzelt auch zur Depurinierung bzw. zur Spaltung der Formamidgruppe kommen kann. Das Protokoll für diese Prozedur ist nachfolgend dargestellt:

Basische Schutzgruppen- und Trägerabspaltung:

Die basische Schutzgruppen- und Trägerabspaltung erfolgte - wie oben beschrieben – ebenfalls mit einer ethanolischen Ammoniaklösung (EtOH/NH₃ 1/3) bei 17 °C für 18 h.

„Trityl-on“-HPLC-Reinigung:

Die präparative Umkehrphasen-Trennungen wurden mit einer *VP 250/21 Nucleosil 100-7 C18-* oder mit einer *VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec-*Säule erreicht. Für gewöhnlich wurde folgender Gradient verwendet:

Trityl-Abspaltung (nach HPLC-Reinigung):

Für die Abspaltung der Tritylgruppe nach vorheriger HPLC-Reinigung gibt es ebenfalls wieder zwei Möglichkeiten. Zum einen kann die Schutzgruppe mit Ameisensäure a) und zum anderen mittels einer *Sep-Pak*[®]-Kartusche und TFA b) entfernt werden.

a)

Die aufgereinigte DNA wird lyophilisiert und dann mit 400 µL Ameisensäure (1.5 Vol% HCOOH in *bd* Wasser, pH 2.06 bei 25°C) für 6-12h (MALDI-Kontrolle!) bei 17 °C im Thermomixer (800 rpm) geschüttelt. Zum Aufarbeiten wird die DNA-

Lösung durch eine *Sep-Pak*[®]-Kartusche von der Säure entfernt und gleichzeitig entsalzt.

b)

Die *Sep-Pak*[®]-Kartusche wird zuerst mit Acetonitril (10 mL) aktiviert, mit *bd* Wasser (15 mL) equilibriert und danach mit der DNA-Probe „beladen“, indem diese langsam aufgetropft wird. Die noch eventuell vorhandenen Salzreste werden mit *bd* Wasser (6 mL) entfernt, bevor die TFA-Lösung (0.4 % TFA in *bd* H₂O, 5 mL) über einen Zeitraum von 5 Minuten langsam durchgetropft wird. Die Säurereste werden mit Puffer A (6 mL) und die Salzreste mit *bd* Wasser (6 mL) entfernt. Eluiert wird die DNA mit 80% Acetonitril (4 mL).

Da diese Entschützungsverfahren oft nicht quantitativ verlaufen, muss die jeweilige Prozedur nach HPLC-Aufreinigung eventuell wiederholt werden.

Reinigung:

Die Reinigung der DNA erfolgte auch hier, wie oben schon erwähnt, mit einer *VP 250/21 Nucleosil 100-7 C18-* oder mit einer *VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec*-Säule. Um ein eventuell noch vorhandenes Gemisch aus Trityl-geschützter und ungeschützter DNA zu trennen, wurde folgender Gradient verwendet:

Zeit [min]	Puffer A	Puffer B
5	90	10
45	60	40
50	0	100
55	0	100
57	100	0
60	100	0

6.5.2.2 Entschützung und Reinigung von 8-Oxo-dA enthaltender DNA

Die Entschützung und Abspaltung des 8-Oxo-dA's findet in Gegenwart von β -Mercaptoethanol statt, um ein weiteres Oxidieren dieses Schadens zu verhindern. Im Fall von kommerziell erworbenen *Ultra Mild* CE Phosphoramiditen konnte die DNA mit einer ethanolischen Ammoniaklösung in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol (EtOH/ NH₃ 1/ 3, β -Mercaptoethanol (0.25M), 35 °C, 16h) entschützt werden.

Bei der Verwendung von Phosphoramiditen ohne „*Ultramild*-Schutzgruppen“, reichte die obige Prozedur für die Entschützung der am dG befindlichen Benzoylschutzgruppen nicht aus. Deshalb wurde in diesem Fall eine Entschützungslösung bestehend aus NH₃, MeNH₂ und Mercaptoethanol (0.25M) (1:1, 35 °C, 22h) verwendet.

Reinigung:

Die präparative HPLC wurde in diesem Fall ausschließlich mit einer VP 250/10 *Nucleodur 100-5 C18ec*-Säule und einem Gradienten von:

Zeit [min]	Puffer A	Puffer B
0	100	0
45	70	30
50	0	100
55	0	100
57	100	0
60	100	0

durchgeführt.

6.6 Thermodynamische Daten

6.6.1 Physikalische Größen des cFaPydA und 8-Oxo-dA

Zur Untersuchung der speziellen Paarungseigenschaften der zwei DNA-Schäden cFaPydA und 8-Oxo-dA, wurden deren physikalische Größen bei unterschiedlichen Sequenzen bestimmt. Hierzu wurde die jeweilige DNA mit einem der beiden Schäden mit dem entsprechenden Gegenstrang bei vier verschiedenen Konzentrationen c ($0.3 \mu\text{M}$, $1.0 \mu\text{M}$, $3.0 \mu\text{M}$, $9.0 \mu\text{M}$) hybridisiert. Für jede DNA/ DNA-Doppelstrangpaarung wurden die UV-Schmelzkurven in einer wässrigen Hybridisierungslösung (150mM NaCl , $10\text{mM Tris/HCl pH } 7.4$) gemessen. Eine detaillierte Beschreibung der Messung am UV-Spektralphotometer findet sich im „Material und Methoden Teil“.

Die Auswertung der gemessenen fünf Absorptionskurven erfolgte mit dem Programm *Microcal Origin*®. Hierzu wurde zunächst der Hintergrund von jeder Kurve abgezogen und anschließend die fünf Absorptionskurven gemittelt. Der jeweilige Schmelzpunkt (T_m) ergibt sich aus dem Nulldurchgang der zweiten Ableitung der gemittelten Schmelzkurve. Je nach Messung musste diese gegebenenfalls geglättet oder auch nach einer Polynomfunktion 9. Ordnung gefittet werden. Zur Berechnung der thermodynamischen Daten, wurden die für jede Sequenz erhaltenen vier verschiedenen Schmelzpunkte in einem *van't Hoff Plot* ($1/T$ [K] gegen $\ln C_T$) aufgetragen. Nach den folgenden Gleichungen konnten die drei thermodynamischen Daten ΔH° , ΔS° und ΔG^{298} ermittelt werden:

$$\Delta H^\circ = \frac{R}{m} \left[\frac{J}{\text{mol} \cdot K} \right], m = \text{Steigung}, R = 8.314472 \left[\frac{J}{\text{mol} \cdot K} \right]$$

$$\Delta S^\circ = R \cdot \left(\frac{b}{m} + \ln 4 \right) \left[\frac{J}{\text{mol} \cdot K} \right], b = \text{Achsenabschnitt}$$

$$\Delta G^{298} = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ \left[\frac{J}{\text{mol}} \right], T = 298.15 \text{ K}$$

6.7 Primer extension Studien

Zur Messung der Selektivität und auch der Geschwindigkeit eines Nukleotid-einbaus gegenüber den Schäden *c*FaPydA und 8-Oxo-dA wurden *Primer extension* Studien mit *Klenow exo* bei unterschiedlichen Nukleotidtriphosphatkonzentrationen nach der Kaltstartmethode (*Standing Start*) durchgeführt.

Vor der eigentlichen Enzymreaktion wurden folgende Lösungen für die Umsetzung hergestellt:

Enzymlösung und Reaktionspuffer:

Das Enzym wurde bei der Firma *NEB (New England Biolabs)* bezogen, und in einem Glycerin enthaltenden Lagerungspuffer (25 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.4 bei 25°C) bei -20°C aufbewahrt.

Die Enzymreaktionen wurden mit je 1 U *Klenow exo* in dem von *New England Biolabs* empfohlenen *NEB2*-Puffer (10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 bei 25°C) durchgeführt.

Templat-Lösung:

Das modifizierte Oligonukleotid wurde mit einem fluoresceinmarkierten *Primer* hybridisiert, indem das jeweilige Templat (4 µM) und der entsprechende *Primer* (2 µM) in einer Hybridisierungslösung (50 mM KCl, 10 mM K₃PO₄/HCl, pH 7.5) über Nacht in einem Thermoblock von 80°C auf Raumtemperatur langsam abkühlte. Dieselbe Prozedur wurde ebenfalls mit einem ungeschädigten Strang als Kontrolle durchgeführt, in dem anstelle des DNA-Schadens ein Adenosin vorhanden war.

EDTA-Lösung:

Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurde eine EDTA-Lösung (100mM EDTA in destilliertem Wasser, pH 7.4 bei 25°C) hergestellt.

Nukleotidlösung:

Die Nukleotidlösung für die *Primer extension* mit den modifizierten Oligonukleotiden wurde von den vier Triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) jeweils eine 16-stufige Konzentrationsreihe (in zweifach destilliertem Wasser) im Bereich von $0.61 \mu\text{M}$ - 20 mM (Endkonzentration im Reaktionsgefäß!) hergestellt. Die Nukleotidkonzentration für die *Primer extension* mit dem ungeschädigten Templat wurde für dATP und dTTP um weitere 5 Konzentrationspunkte ($0.33 \mu\text{M}$, $0.16 \mu\text{M}$, $0.051 \mu\text{M}$, $0.02 \mu\text{M}$ und $0.015 \mu\text{M}$) verdünnt.

Enzymreaktion:

Die Reaktionszeit wurde je nach Umsetzungsrate variiert und bei der späteren Auswertung der Daten berücksichtigt.

Generell wurde bei 0°C der Reaktionspuffer ($23.8 \mu\text{L}$), die DNA-Lösung ($3 \mu\text{L}$) und die Enzymlösung ($0.2 \mu\text{L}$) in einem PCR-Eppendorfgefäß zusammenpipettiert und anschließend bei 37°C für 6 min in einem Thermomixer inkubiert, indem die Reaktionslösung zunächst für 4 min bei 800 rpm durchmischt wurde und anschließend für 2 min stillstand. Zum Starten der *Primer extension* wurde schließlich die jeweilige Nukleotidkonzentration ($3 \mu\text{L}$) hinzu gegeben. Nach 3-15 min wurde die Reaktion durch die Zugabe der EDTA-Lösung ($30 \mu\text{L}$) gestoppt, mit Hilfe des Thermoblocks denaturiert (10 min auf 85°C → Abschrecken auf 0°C) und anschließend bei 6000 rpm für 2 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde für jede einzelne Konzentrationsmessung mindestens zweimal durchgeführt und für alle weiteren Messungen einer Konzentrationsreihe wiederholt.

Probenvorbereitung und CE-Analyse:

Die denaturierten Proben wurden zuerst mit ZipTip® $0.6 \mu\text{L}$ C_{18} -Pipettenspitzen der Firma *Millipore* gemäß dem Herstellerprotokoll entsalzt, und anschließend mit zweifach destilliertem Wasser ($20 \mu\text{L}$) verdünnt.

Es wurden jeweils drei Proben im Abstand von 8 min für je 10 s injiziert und bei 9 kV voneinander vorgetrennt. Die letzte der drei Injektionen lief für 30 min bei 9 kV. Die einzelnen Proben wurden schließlich nach 8, 16 und 24 min mittels *LIF* detektiert.

Auswertung:

Die mittels CE-Analyse erhaltenen Peak-Signale wurden integriert, und zur Bestimmung der Inkorporationsgeschwindigkeiten wurde das Signal der Elongation (n+1) durch das Gesamtintegral aus unreaktiertem *Primer* und Elongation dividiert. Dieser Wert ist proportional zur Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, und garantiert eine Linearität, sofern der Anteil an Elongation 20% nicht übersteigt. Durch die reziproke Auftragung der Inkorporationsgeschwindigkeit gegen die reziproke Nukleotidkonzentration konnten die *Michaelis-Menten*-Konstanten K_m , V_{max} bzw. k_{cat} ermittelt werden.

7. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
aliph.	Aliphatisch
amu	<i>atomic mass units</i> , atomare Masseneinheiten
AP	apurinisch oder apyrimidinisch
ar.	aromatisch
Ar	Aromat
ber.	berechnet
<i>bd</i> Wasser	zweifach destilliertes Wasser
BER	Basenexzisionsreparatur
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
br	breit
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
BTT	5-Benzylthio-1 <i>H</i> -tetrazole
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
BzCl	Benzoylchlorid
<i>c</i>	Carbozyklisch
C	Cytosin
CE	Capillary Electrophoresis
COSY	<i>correlated spectroscopy</i> (Korrelierte ¹ H NMR-Spektroskopie)
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>

d	Dublett
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytosin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	Dichloressigsäure
DCI	4, 5-dicyanoimidazole
Def.	Deformationsschwingung (IR)
dest.	destilliert
dG	2'-Desoxyguanosin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleotidtriphosphat
dT	2'-Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
eq	<i>equivalent(s)</i> , (Äquivalent(e))
ESI	Elektronensprayionisierung
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et al ii</i> (und andere)
Et ₃ N	Triethylamin
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
ETT	5-Ethylthio-1H-tetrazole
FaPyA	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin
FaPydA	FaPy-A-Schaden des Desoxyadenosins
FaPy·dG	FaPy-G-Schaden des Desoxyguanosins

FaPyG	2,6-Diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidin
f_{ins}	Inkorporationsspezifität
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FTIR	Fourier-Transform IR (-Spektroskopie)
G	Guanin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i>
HO·	Hydroxyradikal
<i>hOgg1</i>	<i>humane</i> 8-OxoG-DNA-Glykosylase
HRMS	<i>high resolution mass spectroscopy</i> (Hochauflösende MS)
HV	Hochvakuum 10^{-2} - 10^{-3} mbar
Hz	Hertz
Imid.	Imidazol
<i>iPr</i>	Isopropyl
IR	Infrarot
Iz	Imidazolon
J	Kopplungskonstante (NMR)
k_B	Boltzmannkonstante
k_c	Geschwindigkeitskonstante am Koaleszenzpunkt
k_{cat}	Katalytische Konstante (V_{max} / Enzymkonz.)
k_{dis}	Dissoziationsgeschwindigkeit
K_m	Michaeliskonstante (Größe der Enzymaffinität am Substrat)
konz.	konzentriert
L	Liter
LIF	<i>Laser Induced Fluorescence</i> , Laserinduzierte Fluoreszenz
Lsg.	Lösung
m	mittel/medium (IR)

<i>m</i>	Ionenmasse (MS)
m	Multipllett (NMR)
M	Molekülmasse (MS)
M	Molar
<i>m-</i>	<i>meta-</i>
mCPBA	<i>meta chlor perbenzoic acid</i> (Metachlorperbenzoesäure)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeOTMS	Methoxytrimethylsilan
mg	Miligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
MWG	Massenwirkungsgesetz
NHE	<i>normal hydrogen electrode</i> (Normalwasserstoffelektrode)
NMI	<i>N-Methylimidazol</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
<i>o-</i>	<i>ortho-</i>
offenkett.	offenkettig
<i>p-</i>	<i>para-</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAC	Phenoxyacetyl
PAC-Acid	Phenoxyessigsäure
PAC ₂ O	Phenoxyacetanhydrid
Ph	Phenyl
Pol	Polymerase

ppm	<i>parts per million</i>
p_{pol}	Inkorporationswahrscheinlichkeit
Pr_0	Ausgangskonzentration des Primers
prim.	Primär
q	Quartett (NMR)
quant.	quantitativ
quart.	quartär (NMR)
R	Allgemeine Gaskonstante ($R= 8.314472 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$)
Red-Al [®]	Natrium[bis(2-methoxyethoxy)aluminium]hydrid
R_f	Retentionsfaktor
rflx.	Reflux
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RP	<i>Reverse</i> Phase
RT	Raumtemperatur
s	stark (IR)
s	Sekunde
s	Singulett (NMR)
s. Abb.:	siehe Abbildung
sat.	Sättigung
sek.	sekundär
Smp.	Schmelzpunkt
sx	Sextett (NMR)
T	Thymin
TFA	Trifluoressigsäure
dTMP	Thymidinmonophosphat
t	Triplett (NMR)
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid

<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
THF	Tetrahydrofuran
Tr	Tri-phenyl-methan
Tol.	Toluol
Tr.	Tropfen
U	Uracil
<i>U</i>	unit
Vol.	Volumen
<i>w</i>	schwach (von <i>weak</i> ; IR)
<i>z</i>	<i>Ladungszahl (Ms)</i>
<i>Z</i>	<i>Oxazon</i>
<i>Zers.</i>	<i>Zersetzung</i>
δ	chemische Verschiebung (NMR)
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ mol	Mikromol
ν	Wellenzahl (IR)
Valenz.	Valenzschwingung (IR)

8. Literaturverzeichnis

- [1] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, 6, 201-209. *Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation.*
- [2] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738. *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.*
- [3] D. Voet, J. G. Voet, *Lehrbuch der Biochemie*, 2nd ed., Wiley-VCH, New York, Basel, **2002**.
- [4] Stryer, *Biochemie*, 4th ed., Spektrum Akademischer Verlag, New York, **1991**.
- [5] M. McCarty, *The Transforming Principle - Discovering that Genes Are Made of DNA*, W. W. Norton & Company, Inc., New York, **1985**.
- [6] O. T. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158. *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III.*
- [7] O. D. Schärer, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3052-3082. *Mechanismen der DNA Reparatur.*
- [8] E. C. Friedberg, R. Wagner, M. Radman, *Science* **2002**, 296, 1627-1630. *Molecular Biology-Specialized DNA Polymerases, Cellular Survival and the Genesis of Mutations.*
- [9] M. F. Goodman, *Ann. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 17-50. *Error-Prone Repair DNA Polymerase in Prokaryotes and Eukaryotes.*
- [10] R. A. DePinho, *Nature* **2000**, 408, 248-254. *The age of cancer.*
- [11] T. Rich, R. L. Allen, A. H. Wyllie, *Nature* **2000**, 407, 777-783. *Defying Death after DNA Damage.*
- [12] T. Lindahl, *Nature* **1993**, 362, 709-715. *Instability and decay of the primary structure of DNA.*
- [13] E. C. Friedberg, *Nature* **2003**, 421, 436-440. *DNA damage and repair.*
- [14] D. C. Malins, P. M. Johnson, T. M. Wheeler, E. A. Barker, N. L. Polissar, M. A. Vinson, *Cancer Res.* **2001**, 61, 6025-6028. *Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer.*
- [15] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington D. C., **1995**.
- [16] B. B. Zhou, S. J. Elledge, *Nature* **2000**, 408, 433-439. *The DNA Damage Response: Putting Checkpoints in Perspective.*
- [17] J. Rouse, S. P. Jackson, *Science* **2002**, 297, 547-551. *Interfaces Between the Detection, Signalling and Repair of DNA Damage.*
- [18] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411, 366-374. *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.*
- [19] J. Burrows Cynthia, G. Muller James, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151. *Oxidative Nucleobase Modification Leading to Strand Scission.*

- [20] D. Gasparutto, A. G. Bourdat, C. D'Ham, V. Duarte, A. Romieu, J. Cadet, *Biochimie* **2000**, 82, 19-24. *Repair and Replication of Oxidized DNA Bases Using Modified Oligodeoxynucleotides.*
- [21] Y. Luo, E. S. Henle, S. Linn, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 21167-21176. *Oxidative Damage to DNA Constituents by Iron-mediated Fenton Reactions.*
- [22] T. Kuzuya, S. Hoshida, Y. Kim, M. Nishida, H. Fuji, A. Kitabatake, M. Tada, T. Kamada, *Circ. Res.* **1990**, 66, 1160-1165. *Detection of oxygen-derived free radical generation in the canine postischemic heart during late phase of reperfusion.*
- [23] A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Radical Biol. Med.* **1995**, 18, 1033-1077. *Reactions of Oxyl Radicals with DNA.*
- [24] M. Valio, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Makur, *Chemico-Biological Interactions* **2006**, 160, 1-40. *Free Radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.*
- [25] A. J. C. C. Vieira, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6986-6994. *Pattern of Hydroxy Radical Reaction with Adenine and its Nucleosides and Nucleotides. Characterization of two Types of Isomeric Hydroxy Adducts and their Unimolecular Transformation Reactions.*
- [26] S. Frelon, T. Douki, J. Cadet, *Free Radic. Res.* **2002**, 36, 499-508. *Radical oxidation of the adenine moiety of nucleoside and DNA: 2-hydroxy-2'-deoxyadenosine is a minor decomposition product.*
- [27] K. Keck, *Z. Naturforsch. B.* **1968**, 23, 1034-1043. *Formation of cyclonucleotides during irradiation of aqueous solutions of purine nucleotides.*
- [28] J. A. Raleigh, A. F. Fuciarelli, *Radiat. Res.* **1985**, 102, 165-175. *Distribution of damage in irradiated 5'-AMP:8,5'-cyclo-AMP; 8-hydroxy-AMP and adenine release.*
- [29] P. W. Doetsch, T. H. Zastawny, A. M. Martin, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **1995**, 34, 737-742. *Monomeric Base Damage Products from Adenine, Guanine and Thymine Induced by Exposure of DNA to Ultraviolet Radiation.*
- [30] E. Gajewski, G. Rao, Z. Nackerdien, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **1990**, 29, 7876-7882. *Modification of DNA Bases in Mammalian Chromatin by Radiation-Generated Free Radicals.*
- [31] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, A. Tsuchida, M. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6406-6407. *Photoinduced DNA Cleavage via Electron Transfer: Demonstration that Guanine Residues Located 5' to Guanine are the most Electron-donating Sites.*
- [32] K. Ito, S. Inoue, K. Yamamoto, S. Kawanishi, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 13221-13227. *8-Hydroxydeoxyguanosine Formation at the 5' Site of 5'-GG-3' Sequences in Double-Stranded DNA by UV Radiation with Riboflavin.*
- [33] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6406-6407. *Photoinduced DNA Cleavage via Electron Transfer-Demonstration that Guanine Residues Located 5' to Guanine are the most Electron- Donating Sites.*
- [34] 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.*

- [35] H. Yanagawa, Y. Ogawa, M. Ueno, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13320-13326. *Redox Ribonucleosides. Isolation and Characterization of 5-Hydroxyuridine, 8-Hydroxyguanosine and 8-Hydroxyadenosine from Torula Yeast RNA.*
- [36] J. J. van Hemmen, J. F. Bleichrodt, *Radiat. Res.* **1971**, 46, 444-456. *The decomposition of adenine by ionizing radiation.*
- [37] S. Raoul, M. Bardet, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, 8, 924-933. *γ -Irradiation of 2'-Deoxyadenosine in Oxygen-Free Aqueous Solutions: Identification and Conformational Features of Formamidopyrimidine Nucleoside Derivatives.*
- [38] M.-A. Graziewicz, T. H. Zastawny, R. Olinski, B. Tudek, *Mutat. Res.* **1999**, 434, 41-52. *SOS-dependent A \rightarrow G transitions induced by hydroxyl radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase/Fe³⁺/EDTA are accompanied by the increase of Fapy-adenine content in M13 mp18 phage DNA*
- [39] B. Tudek, *J. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, 36, 12-19. *Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance.*
- [40] K. Haraguchi, M. O. Delaney, C. J. Wiederholt, A. Sambandam, Z. Hantosi, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3263-3269. *Synthesis and Characterization of Oligodeoxynucleotides Containing Formamidopyrimidine Lesions and Nonhydrolyzable Analogs.*
- [41] M. M. Greenberg, Z. Hantosi, C. J. Wiederholt, C. D. Rithner, *Biochemistry* **2001**, 40, 15856-15861. *Studies on N4-(2-Deoxy-D-pentofuranosyl)-4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapydA) and N6-(2-Deoxy-D-pento-furanosyl)-6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine (FapydG).*
- [42] J. N. Patro, K. Haraguchi, M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2004**, 43, 13397-13403. *Probing the Configurations of Formamidopyrimidine Lesions FapydA and FapydG in DNA Using Endonuclease IV.*
- [43] L. T. Burgdorf, *Synthese von Ribofuranosid-Formamidopyrimidin und Cyclobutan-Thymidin-Dimer-Verbindungen zur Untersuchung von DNA-Reparaturprozessen*, PhD thesis, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2001**.
- [44] K. W. Pankiewicz, *Carbohydr. Res.* **2000**, 327, 87-105. *Fluorinated Nucleosides.*
- [45] M. Ober, *Synthese von stabilisierten Analoga des Formamidopyrimidin-dG DNA-Schadens*, Diploma thesis, Philipps-Universität Marburg (Marburg), **2002**.
- [46] C. Thibaudeau, J. Plavec, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4967-4984. *A New Generalized Karplus-Type Equation Relating Vicinal Proton-Fluorine Coupling Constants to H-C-C-F Torsion Angles.*
- [47] S. Smirnov, F. Johnson, R. Marumoto, C. de los Santos, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, 17, 981-991. *Structure of an 11-mer DNA duplex containing the carbocyclic nucleotide analog: 2'-deoxyaristeromycin.*
- [48] S. Portmann, K.-H. Altmann, N. Reynes, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2396-2403. *Crystal Structures of Oligodeoxyribonucleotides Containing 6'-a-Methyl and 6'-a-Hydroxy Carbocyclic Thymidines.*
- [49] A. Denisov, E. Zamaratski, T. Maltseva, S. Bekiroglu, K.-H. Altmann, M. Egli, J. Chattopadhyaya, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1998**, 16, 547-568. *The Solution Conformation of a Carbocyclic Analog of the Dickerson-Drew Dodecamer:*

- Comparison with Its Own X-Ray Structure and That of the NMR Structure of the Native Counterpart.*
- [50] C. Thibaudeau, A. Kumar, S. Bekiroglu, A. Matsuda, V. E. Marquez, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5447-5462. *NMR conformation of (-)-beta-D-aristeromycin and its 2'-deoxy and 3'-deoxy counterparts in aqueous solution.*
- [51] M. Ober, H. Mueller, 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.*
- [52] F. Johnson, G. Dorman, R. A. Rieger, R. Marumoto, C. R. Iden, R. Bonala, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 193-202. *Synthesis of enzymatically noncleavable carbocyclic nucleosides for DNA-N-glycosylase studies.*
- [53] B. M. Dominguez, P. M. Cullis, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5783-5786. *2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one epoxide: A versatile intermediate for the synthesis of cyclopentyl carbocyclic 2-deoxy-, 3-deoxy- & ara-ribonucleoside analogues.*
- [54] M. O. Delaney, C. J. Wiederholt, M. M. Greenberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 771-773. *Fapy.dA induces nucleotide misincorporation translesionally by a DNA polymerase.*
- [55] M.-A. Graziewicz, T. H. Zastawny, R. Olinski, E. Speina, J. Siedlecki, *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 75-83. *Fapyadenine is a moderately efficient chain terminator for prokaryotic DNA polymerases.*
- [56] X. Tan, A. P. Grollman, S. Shibutani, *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 2287-2292. *Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells.*
- [57] S. K. Kim, J. Y. Kim, A. K. Baek, B. J. Moon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1977-1980. *Base Pairing Properties of 8-Oxo-7,8-dihydroadenosine in cDNA Synthesis by Reverse Transcriptases.*
- [58] H. Kamiya, H. Miura, N. Murata-Kamiya, H. Ishikawa, T. Sakaguchi, H. Inoue, T. Sasaki, C. Masutani, F. Hanaoka, S. Nishimura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2893-2899. *8-Hydroxyadenine (7,8-dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation in in vitro DNA synthesis and mutations in NIH 3T3 cells.*
- [59] S. Shibutani, V. Bodepudi, F. Johnson, A. P. Grollman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4615-4621. *Translesional Synthesis on DNA Templates Containing 8-Oxo-7,8-dihydrodeoxyadenosine.*
- [60] G. A. Leonard, A. Guy, T. Brown, R. Teoule, W. N. Hunter, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8415-8420. *Conformation of Guanine:8-Oxoadenine Base Pairs in the Crystal Structure of d(CGCGAATT(O8A)GCG).*
- [61] M. A. Kalam, K. Haraguchi, S. Chandani, E. L. Loechler, M. Moriya, M. M. Greenberg, A. K. Basu, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2305-2315. *Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells.*
- [62] S. D. Cline, P. C. Hanawalt, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2003**, *4*, 361-372. *Who's on first in the cellular response to DNA damage?*

- [63] J.-S. Sung, B. Dimple, *FEBS Journal* **2006**, 273, 1620-1629. *Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA.*
- [64] L. Gros, M. Sapparbaev, J. Laval, *Oncogene* **2002**, 21, 8905-8925. *Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage.*
- [65] E. Petermann, *Ein ATP-abhängiger Regulationsmechanismus in einem Proteinkomplex der DNA-Reparatur*, PhD thesis, FU Berlin (Berlin), **2004**.
- [66] P. J. Berti, J. A. B. McCann, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 506-555. *Toward a Detailed Understanding of Base Excision Repair Enzymes: Transition State and Mechanistic Analyses of N-Glycoside Transfer.*
- [67] H. Nilsen, H. E. Krokan, *Carcinogenesis* **2001**, 22, 987-998. *Base excision repair in a network of defence and tolerance.*
- [68] C. J. Wiederholt, J. N. Patro, Y. L. Jiang, K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 3331-3338. *Excision of formamidopyrimidine lesions by endonucleases III and VIII is not a major DNA repair pathway in Escherichia coli.*
- [69] J. Hu, N. C. De Souza-Pinto, K. Haraguchi, B. A. Hogue, P. Jaruga, M. M. Greenberg, M. Dizdaroglu, V. A. Bohr, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 40544-40551. *Repair of Formamidopyrimidines in DNA Involves Different Glycosylases: role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes.*
- [70] I. Schulz, H.-C. Mahler, S. Boiteux, B. Epe, *Mutat. Res.* **2000**, 461, 145-156. *Oxidative DNA base damage induced by singlet oxygen and photosensitization: recognition by repair endonuclease and mutagenicity.*
- [71] P. M. Girard, C. D'Ham, J. Cadet, S. Boiteux, *Carcinogenesis* **1998**, 19, 1299-1305. *Opposite base-dependent excision of 7,8-dihydro-8-oxoadenine by the Ogg1 protein of Saccharomyces cerevisiae.*
- [72] S. Boiteux, L. Gellon, N. Guibourt, *Free Radical Biol. Med.* **2002**, 32, 1244-1253. *Repair of 8-Oxoguanine in Saccharomyces Cerevisiae: Interplay of DNA Repair and Replication Mechanisms.*
- [73] M. E. Lomax, H. Salje, S. Cunniffe, O. N. Peter, *Radiat. Res.* **2005**, 163, 79-84. *8-OxoA Inhibits the Incision of an AP Site by the DNA Glycosylases Fpg, Nth and the AP Endonuclease HAP1.*
- [74] S. Arnold, *Synthese von stabilisierten Analoga des Formamidopyrimidin-dA DNA-Schadens*, Diploma thesis, Philipps- Universität Marburg (Marburg), **2002**.
- [75] W. R. Boon, W. G. M. Jones, G. R. Ramage, *J. Chem. Soc.* **1951**, 1, 96-102. *Pteridines. Part I. An Unambiguous Synthesis of 7:8- Dihydro-6-hydroxypteridines.*
- [76] S. M. Greenberg, L. O. Ross, R. K. Robins, *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 1314-1317. *Potential Purine Antagonists XXI. Preparation of Some 9-Phenyl-6-Substituted Purines.*
- [77] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, 2nd ed. ed., Wiley, New York, **1991**.
- [78] J. H. Penn, W. H. Owens, J. L. Petersen, H. O. Finklea, D. A. Snider, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2128-2133. *Mixed Anhydrides: Physical Properties Influenced by Molecular Structure.*
- [79] *J. Org. Chem.* **1979**, 44

- [80] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1970**, 82, 237-253. *Nachweis gehinderter Rotationen und Inversionen durch NMR-Spektroskopie.*
- [81] J. Cadet, R. Nardin, L. Voituriez, M. Remin, F. E. Hruska, *Can. J. Chem.* **1981**, 59, 3313-3318. *A ^1H and ^{13}C NMR study of the radiation-induced degradation products of 2'-deoxythymidin derivatives: N-(2-deoxy- β -D-erythro-pento-furanosyl)-formamide.*
- [82] M. Ober, *Synthese eines carbozyklischen Analogons des Formamido-pyrimidin-dG DNA-Schadens: Untersuchungen zur Replikation und Reparatur*, PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2005**.
- [83] M. J. Gait, *Oligonucleotide Synthesis: A practical approach.*, IRL Press, Oxford, **1984**.
- [84] S. L. Beaucage, R. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2223-2311. *Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach.*
- [85] B. C. Froehler, P. Ng, M. D. Matteucci, *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 5399-5407. *Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates.*
- [86] B. C. Froehler, *Oligodesoxynucleotide Synthesis, H-Phosphonate Approach*, in *Methods in Molecular Biology. Protocols for Oligonucleotide and Analogs. Synthesis and Properties*, Humana Press, New Jersey, **1993**.
- [87] J. Vargeese, J. Carter, S. Yegge, A. Krivjansky, E. Settle, E. Kropp, W. Peterson, W. Pieken, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1046-1050. *Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis.*
- [88] Q. Zhu, M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1105-1107. *Observation and elimination of N-acetylation of oligonucleotides prepared using post-deprotection phosphoramidites and ultra-mild deprotection.*
- [89] V. Bodepudi, S. Shibusani, F. Johnson, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, 5, 608-617. *Synthesis of 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine and 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoadenosine and their incorporation into oligomeric DNA.*
- [90] 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.*
- [91] 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.*
- [92] J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis, C. S. Lawrence, C. Cheong, I. Tinoco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, 6252-6256. *Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity.*
- [93] L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, 26, 1601-1620. *Calculating Thermodynamic Data for Transitions of any Molecularity from Equilibrium Melting Curves.*
- [94] R. Owczarzy, I. Dunietz, M. A. Behlke, I. M. Klotz, J. A. Walder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 14840-14845. *Thermodynamic treatment of oligonucleotide duplex-simplex equilibria.*

- [95] J. Petruska, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 746-750. *Enthalpy- Entropic Compensation in DNA Melting Thermodynamics.*
- [96] M. F. Goodman, S. Creighton, L. B. Bloom, J. Petruska, *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **1993**, 28, 83-126. *Biochemical Basis of DNA Replication Fidelity.*
- [97] S. Creighton, L. B. Bloom, M. F. Goodman, *Method Enzymol.* **1995**, 262, 232-257. *Gel fidelity assay measuring nucleotide misinsertion, exonucleolytic proofreading and lesion bypass efficiencies.*
- [98] M. S. Boosalis, J. Petruska, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 14689-14696. *DNA Polymerase Insertion Fidelity.*
- [99] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 3 ed., Wiley, New York, **2004**.
- [100] S. Boiteux, T. R. O'Connor, J. Laval, *EMBO Journal* **1987**, 6, 3177-3183. *Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein.*
- [101] D. O. Zharkov, A. A. Ishchenko, K. T. Douglas, G. A. Nevinsky, *Mutat. Res.* **2003**, 531, 141-156. *Recognition of damaged DNA by Escherichia coli Fpg protein: insights from structural and kinetic data.*
- [102] J. T. Stivers, Y. L. Jiang, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2729-2759. *A Mechanistic Perspective on the Chemistry of DNA Repair Glycosylase.*
- [103] J. Tchou, V. Bodepudi, S. Shibutani, I. Antoshechkin, J. Miller, A. P. Grollman, F. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 15318-15324. *Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA.*
- [104] C. J. Wiederholt, M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2002**, 41, 15838-15844. *Interaction of DNA Containing Fapy-dA or Its C-Nucleoside Analogues with Base Excision Repair Enzymes. Implications for Mutagenesis and Enzyme Inhibition.*
- [105] C. J. Wiederholt, M. O. Delaney, M. A. Pope, S. S. David, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2003**, 42, 9755-9760. *Repair of DNA Containing Fapy-dG and Its β -C-Nucleoside Analogue by Formamidopyrimidine DNA Glycosylase and MutY.*
- [106] F. Coste, M. Ober, T. Carell, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 44074-44083. *Structural Basis for the Recognition of the FapydG Lesion (2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by Formamido-pyrimidine-DNA Glycosylase.*
- [107] J. C. Fromme, G. L. verdine, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 51543-51548. *DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM.*
- [108] S. D. Brunner, D. P. Norman, G. L. Verdine, *Nature* **2000**, 403, 859-866. *Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA.*
- [109] R. A. Perlow-Poehnelt, D. O. Zharkov, A. P. Grollman, S. Broyde, *Biochemistry* **2004**, 43, 16092-16105. *Substrate Discrimination by Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase: Distinguishing Interactions within the Active Site.*
- [110] M. Sugahara, T. Mikawa, T. Kumasaka, M. Yamamoto, R. Kato, K. Fukuyama, Y. Inoue, S. Kuramitsu, *EMBO Journal* **2000**, 19, 3857-3869. *Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively damaged DNA MutM (Fpg) from an extreme thermophile Thermus thermophilus HB8.*

- [111] R. Gilboa, D. O. Zharkov, G. Golan, A. S. Fernandes, S. E. Gerchman, E. Matz, J. H. Kycia, A. P. Grollman, G. Shoham, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 19811-19816. *Structure of formamidopyrimidine- DNA glycosylase covalently complexed to DNA.*
- [112] L. Serre, K. P. De Jesus, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *EMBO Journal* **2002**, 21, 2854-2865. *Crystal structure of the Lactococcus lactis formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA.*
- [113] J. C. Fromme, G. L. verdine, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 544-552. *Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM.*
- [114] A. F. Glas, *Synthese von carbacyclischem 8-Brom-2`-desoxyguanosin, sowie Isolierung und Charakterisierung der Formamidopyrimidin DNA-Glykosylase :Bindungsstudien mit geschädigter und ungeschädigter DNA*, Master thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München (München), **2006**.
- [115] B. Castaing, A. Geiger, H. Seliger, P. Nehls, J. Laval, C. Zelwer, S. Boiteux, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 2899-2905. *Cleavage and binding of a DNA fragment containing a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins.*
- [116] M. M. Greenberg, Z. Hantosi, C. J. Wiederholt, C. D. Rithner, *Biochemistry* **2001**, 40, 15856-15861. *Studies on N4-(2-Deoxy-D-pentofuranosyl)-4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (Fapy.bul.dA) and N6-(2-Deoxy-D-pentofuranosyl)-6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine(Fapy.bul.dG).*
- [117] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie. Vol. 4. überarbeitete Aufl.*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, **1991**.
- [118] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7514. *NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities.*
- [119] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, *Organikum*, 20th ed., Johann Ambrosius Barth Verlag Heidelberg, Leipzig, **1996**.
- [120] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925. *Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution.*
- [121] G. D. Fasman, *Optical Properties of Nucleic Acids, Absorption and circular dichroism spectra*, 3 ed., CRC Press, Cleveland (Ohio), **1975**.
- [122] L. F. Cavalieri, A. Bendich, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2587-2594. *The Ultraviolet Absorption Spectra of Pyrimidines and Purines.*

Simone Arnold

geboren am 14.06.1975
in Marburg/ Lahn

CURRICULUM VITAE

Schule und Ausbildung

1992-1995 Berufliches Gymnasium der Adolf-Reichwein-Schule
06/1995 Abschluss: **Allgemeine Hochschulreife**
08/1995-06/1996 Ausbildung zur chemisch-technischen Assistentin an
der Adolf-Reichwein-Schule Marburg
»Laboriumstechnik«
06/1996 Abschluss: **Staatl. gepr. chemisch-technische Assistentin**

Studium

1996-1999 Studium der Lebensmittelchemie/ Chemie an der
Johann Wolfgang Goethe- Universität Frankfurt
03/1999 Abschluss: **Vordiplom**
1999-2002 Studium der Chemie an der Philipps-Universität Marburg
06/2002 – 12/2002 Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Dr. Thomas Carell
»Synthese von stabilisierten Analoga des
Formamidopyrimidin-dA DNA-Schadens«
12/2002 Abschluss: **Diplom-Chemikerin**
04/2003 – 01/2007 Promotion in der Gruppe von Prof. Dr. Thomas Carell
Philipps-Universität Marburg,
01/2004 Umzug an die
Ludwig-Maximilians-Universität München
»Synthese eines carbozyklischen Analogons des
Formamidopyrimidin-dA DNA-Schadens zur
Untersuchung von DNA-Replikations- und
Reparaturprozessen«

München, 09.01.2007

Publikationen und Präsentationen

M. Cichon, S. Arnold, and T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 767-770. *Repair of the oxetane lesion by (6-4) DNA photolyases requires a reduced and deprotonated flavin.*

S. Arnold, T. Carell, *A new approach for the incorporation of the FaPydA lesion into oligonucleotides*, Posterpräsentation, RSC conference, "Responses to DNA damage: Insights from Chemical, Biochemical, Structural Biology and Cellular Studies", Brighton England, 19-21 September 2005.

S. Arnold, T. Carell, *FaPydA – A major oxidative lesion derived from Adenosine*, Vortrag, CLUSTOXDNA 3rd Semi-Annual Meeting, "Selective formation and biochemistry of oxidative clustered DNA damage", Athens Greece, 29.September – 2.Oktober 2005.

S. Arnold, T. Carell, *Carbocyclic FaPydA-Synthesis, incorporation and characterization of this lesion analogue*, Vortrag, CLUSTOXDNA 4th Semi-Annual Meeting, "Selective formation and biochemistry of oxidative clustered DNA damage", Annecy France, 16-18 März 2006.

S.Arnold, T. Carell, *FaPydA-A major oxidative lesion derived from Adenosine*, Posterpräsentation, 7th Winter Research Conferences, "Oxidatively generated damage to DNA", Les Houches France, 19-24 März 2006.

S. Arnold, T. Carell, *Carbocyclic FaPydA-Synthesis, Incorporation and Mutagenity of this Lesion Analogue*, Posterpräsentation, EUCHEM Conference on Organic Free Radicals, Bergen Norway, 09-13 Juli 2006.