

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

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

Tim Herbert Gehrke
aus
Ansbach (Mfr.)

2012

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 der LMU München von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 29.03.2012

Tim Gehrke

Dissertation eingereicht am: 29.03.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. K. Karaghiosoff

Mündliche Prüfung am: 24.05.2012

Meiner Mutter gewidmet

“....not because they are easy, but because they are hard, because that goal will serve to organize and measure the best of our energies and skills, because that challenge is one that we are willing to accept, one we are unwilling to postpone, and one we intend to win.”

John Fitzgerald Kennedy (1962)

Teile dieser Arbeit wurden im folgenden Journal oder auf Fachkonferenzen publiziert

Publikationen

“5-Hydroxy-5-methylhydantoin DNA lesion, a molecular trap for DNA glycosylases“; Y.-V. Le Bihan, M. A. Izquierdo, F. Coste, P. Aller, F. Culard, T. H. Gehrke, K. Essalhi, T. Carell, B. Castaing; *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39 (14), 6277-6290.

Konferenzbeiträge

EU – Network Meeting, Base and Sugar Radical Reactivity in Nucleic Acids, München, Deutschland, März **2008**

Posterpräsentation: 8th Winter Research Conference on Oxidative DNA Damage, Les Houches, Frankreich, Januar **2009**

Posterpräsentation: Synthesefest – a celebration of organic chemistry in Munich, München, Deutschland, März **2010**

Posterpräsentation: 3rd European Chemistry Congress, Nürnberg, Deutschland, September **2010**

Vortrag & Posterpräsentation: 13. Frühjahrssymposium des JungChemiker Forums Erlangen, Deutschland, Mai **2011**

Weitere Publikationen

“Axially Chiral β,β' -Bisporphyrins: Synthesis and Configurational Stability Tuned by the Central Metal“; G. Bringmann, D. C. Götz, T. A. Gulder, T. H. Gehrke, T. Bruhn, T. Kupfer, K. Radacki, H. Braunschweig, A. Heckmann, C. Lambert; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17812-17825.

Danksagung

An dieser Stelle soll all den Menschen, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, gedankt werden:

Mein größter Dank gebührt meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell*.

Er gab mir die Möglichkeit, meine Arbeit in einem so reichhaltig ausgestatteten Forschungsumfeld durchzuführen, in dem keine Wünsche offen blieben. Besonders danke ich ihm für sein großes Vertrauen und die wissenschaftliche Freiheit, welche er mir schenkte. Seine kritischen Diskussionen und seine Impulse haben mich immer wieder neu motiviert.

Herrn *Prof. Dr. Konstantin Karaghiosoff* danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats. Besonders freute ich mich über seine Begeisterung für meine Kristalle und über die daraus resultierenden Strukturen, die mich immer wieder angespornt haben – Danke.

Den Mitgliedern der Prüfungskommission: *Prof. Dr. F. Bracher*, *Prof. Dr. M. Heuschmann*, *Prof. Dr. A. Hoffman-Röder* und *Prof. Dr. H. Mayr*.

Weiterhin danke ich *Frau Slava Gärtner* für ihre große Unterstützung bei der Bewältigung der notwendigen großen und kleinen bürokratischen Aufgaben.

Ein besonders großer Dank geht an Frau *Dr. Sabine Schneider*. Ihre einmalige „kristallographische“ Begleitung dieser Arbeit, ihre Motivation sowohl Tag und Nacht am Projekt zu arbeiten, hat viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ulrike Lischke danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung beim Proteinaufreinigen, der Kristallisation oder der Durchführung der Primer Extension und der Pyrosequenzierung.

Danken möchte ich weiterhin *Dr. Markus Müller* für seine Hilfe in allen biochemischen Fragen, bei Computerfragen und besonders für die Etablierung der Polymerase I des *Geobacillus stearothermophilus* bzw. den von ihm erdachten Assay. Das Joggen durch den Forstenrieder Park oder das eine oder andere Bier zum Entspannen am wohlverdienten Feierabend haben den notwendigen Ausgleich geschaffen.

Dr. Martin Münzel, *Korbinian Heil* und *Dr. Emine Kaya* danke ich für die vielen kleinen und großen Hilfen. Sie sind ungezählt, aber nicht vergessen.

Sandra Koch danke ich für die Bereitstellung von Pol η und *Christian Deiml* für die Versorgung mit Pol κ und Pol ι .

Frau *Sabine Voß* danke ich für das Synthetisieren des einen oder anderen Produktes. So war immer genug Material zur DNA-Synthese vorhanden. Danken möchte ich auch *Kerstin Kurz* für die gelegentliche Übernahme der Proteinaufreinigung.

Ebenso danke ich meinen Praktikanten *Michael Paul*, *Mika Scheler* und *Cornelia Ritter*, meinem Bachelorstudent *Klaus Speck*, sowie meiner Masterstudentin *Barbara Steigenberger* für ihre Arbeiten an den unterschiedlichsten Projekten.

Ines Thoma danke ich für die Übernahme des Prebiotik Themas. – Ihr wünsche ich weiter viel Erfolg bei der Suche nach den Spuren des Lebens.

Den Mitarbeitern der zentralen Analytik sei Dank. Insbesondere *Dr. Werner Spahl* und *Sonja Kosak* bei der Messung von Massenproben, sowie *Dr. David Stephenson* und *Claudia Dubler* für die NMR Messungen. Frau *Dr. Karin Lux* (AK *Karaghiosoff*) danke ich für die weitere Bearbeitung meiner Röntgenstrukturen der kleinen Moleküle.

Danke an diejenigen, die Freizeit opferten und über meiner Arbeit saßen um Korrektur zu lesen: *Michael Ehrlich*, *Norbert Fuchs*, *Michael Gattner*, *Verena Gehrke*, *Felix Gnerlich*, *Andrea Kneutinger*, *Sandra Koch*, *Ulrike Lischke*, *Dorothea Matschkal*, *Markus Müller*, *Martin Münzel*, *David Pearson*, *Veronika Reiter*, *Sabine Schneider*, *Ines Thoma* und *Julian Willibald*.

Weiterhin sei hier den zahlreichen ehemaligen und neuen Mitgliedern des Arbeitskreises Carell gedankt, die ich während meiner Promotion kennenlernen durfte.

Meinen Kommilitonen aus Würzburg:

Meinen Schwiegereltern *Norbert* und *Ursula Fuchs* danke ich für ihr Interesse an und während meiner Promotion. Danke.

Meinem Bruder *Oliver*, zusammen mit *Susanne*, *Emma* und *Helene* danke ich für ihre Unterstützung während meines Studiums und die gemeinsamen Stunden der Ablenkung während meiner Promotion. Merci.

Meinem Vater danke ich für seine Unterstützung, die er mir über all die Jahre gab. Sein Vertrauen in mein Tun haben mich stets bestärkt nicht aufzugeben und beharrlich meinen Weg zu gehen. Ich danke dir dafür.

Mein letzter Dank geht an meine Frau *Verena* und meine Tochter *Helena*. Ihre Geduld mit mir und ihr unerschütterlicher Glaube an mich haben mir stets Kraft gegeben. Ich danke euch für alles.

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

Zusammenfassung

Die Erforschung der Auswirkungen von exogenen und endogenen Schädigungen am Informationsträger DNA u.a. während seiner Vervielfältigung durch Polymerasen bildet den Schlüssel für ein tieferes Verständnis von Krankheiten wie Krebs, von Alterungs- oder Entzündungsprozessen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von ringgeöffneten Hydrolyseprodukten der kanonischen DNA-Purinbasen, den sog. Formamidopyrimidinen (Abbildung 1), während ihrer Replikation untersucht. Diese Schäden wurden bereits vor mehr als 40 Jahren bei der Bestrahlung von DNA entdeckt und seit ihrem Nachweis in lebenden Organismen u.a. im Zusammenhang mit oxidativem Stress erforscht.^[1]

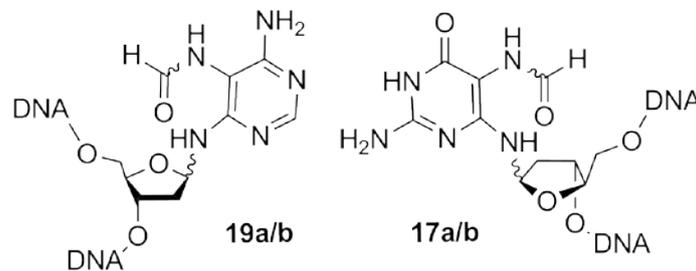


Abbildung 1: Die beiden gegenüber Anomerisierung instabilen natürlichen Formamdiopyrimidine α,β -FaPydA (**19a/b**) und α,β -FaPydG (**17a/b**).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei stabilisierte, carbozyklische Analoga der Formamidopyrimidine, das β -cFaPydA und das β -cFaPydG, synthetisiert,^[2-3] in Oligonukleotide inkorporiert und deren Replikationsverhalten gegenüber zwei *high-fidelity* Polymerasen der A- sowie drei *low-fidelity* Polymerasen der Y-Familie *in vitro* untersucht. Die hierbei induzierten Fehlpaarungen wurden mit Hilfe eines in der Arbeitsgruppe *Carell* entwickelten Assays, der auf der Pyrosequenzierungstechnik basiert, quantitativ analysiert (Tabelle 1).

Es zeigte sich, dass die Formamidopyrimidine ihren jeweiligen 8-oxo-Analoga in ihrem Replikationsverhalten weitaus ähnlicher sind als untereinander. Das β -cFaPydA induzierte seltener die Ausbildung von Fehlbasenpaarungen, wohingegen β -cFaPydG, wie der prominente 8-oxodG Schaden, einen Einbau von dATP zuließ.

Zusammenfassung

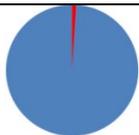
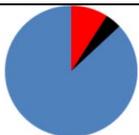
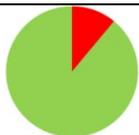
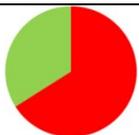
β -cFaPydA	8-oxodA	β -cFaPydG	8-oxodG
			
99 % dTTP, 1 % dATP	87 % dTTP, 9 % dATP, 4 % dGTP	89 % dCTP, 11 % dATP	66 % dATP, 34 % dCTP

Tabelle 1: Pyrosequenzierungsergebnisse der Primerverlängerungsstudien mit *GeoBst* Pol I für β -cFaPydA und β -cFaPydG sowie für die 8-oxo-Purinschäden 8-oxodA und 8-oxodG.

Die Ergebnisse der Primerverlängerungsstudien wurden weiterhin auf struktureller Ebene untersucht. Hierfür wurden kristallographische Studien mit der Polymerase I des thermostabilen Organismus *Geobacillus stearothermophilus* (*GeoBst* Pol I) durchgeführt. Für jeden Schaden konnte eine korrekte Basenpaarung mit dT bzw. dC sowie eine fehlerhafte Basenpaarung mit dG bzw. dA aufgelöst werden (Abbildung 2).

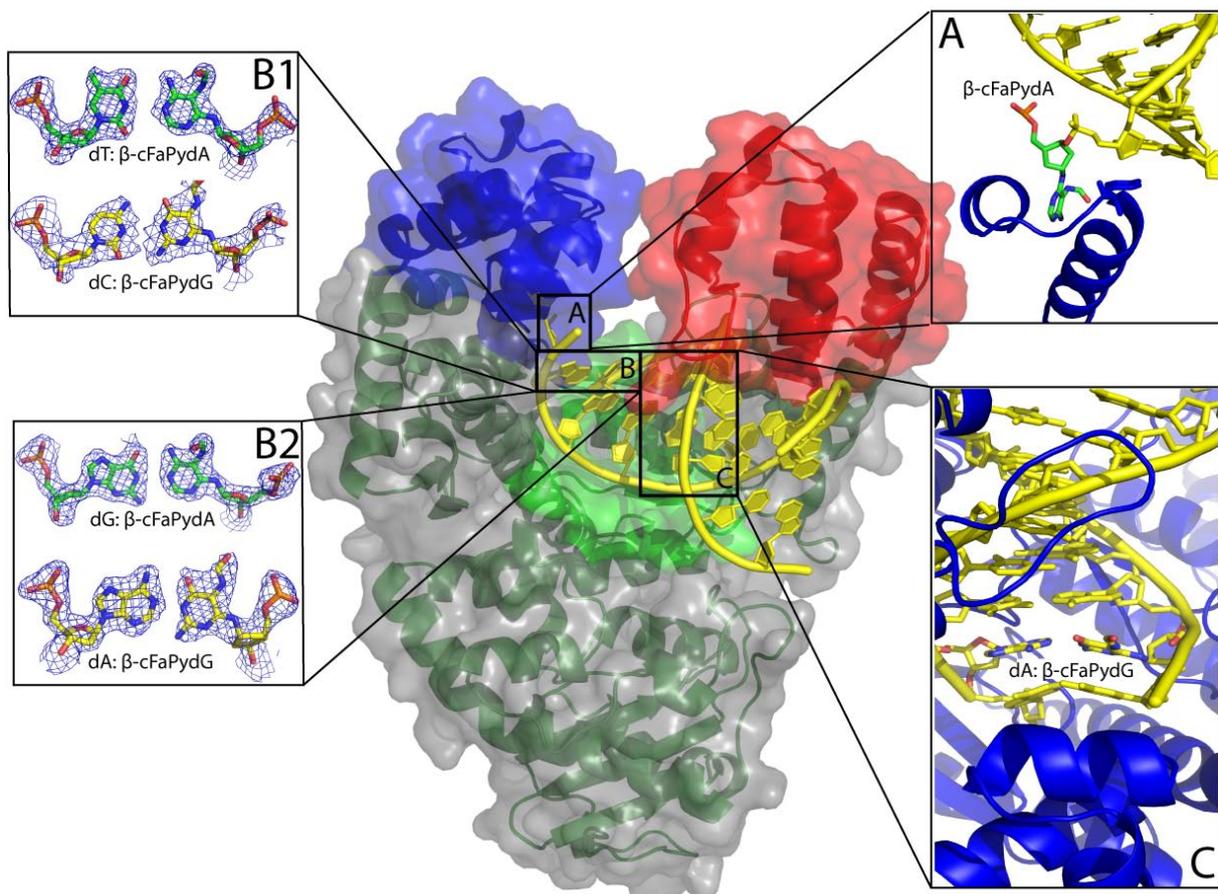


Abbildung 2: Die kristallographisch aufgelösten Schritte der Replikation: **A)** β -cFaPydA vor seinem Eintreten ins aktive Zentrum der Polymerase I. **B1)** Beide carbozyklische Analoga der Formamidopyrimidine im aktiven Zentrum mit dT (β -cFaPydA) bzw. dC (β -cFaPydG) korrekt gepaart. **B2)** Elektronendichten der Fehlbasenpaarungen von dG mit β -cFaPydA und dA mit β -cFaPydG. **C)** Fehlinsertiertes dA: β -cFaPydG Basenpaar nach seiner Translokation im Duplexbereich der DNA.

Es wurden Strukturen einzelner Stadien des Replikationsprozesses sowohl für das β -cFaPydA als auch für β -cFaPydG mit Auflösungen von 1.7 bis 2.7 Å u.a. im aktiven Zentrum der Polymerase erhalten. Weiterhin bestätigten die kristallographischen Daten für beide Schadensanaloga die Ergebnisse der Primerverlängerungsstudien sowohl für eine fehlerfreie Replikation von β -cFaPydA als auch für die fehlerhafte Elongation von β -cFaPydG.

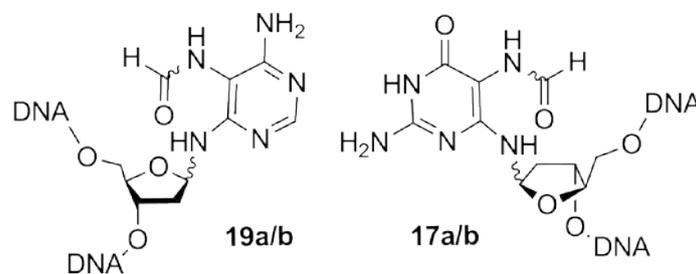
Im Gegensatz zum 8-oxodG-Schaden, der durch eine stabile *syn*-Konformation einen Fehleinbau von dATP erlaubt, behielt das β -cFaPydG beim Fehleinbau von dATP seine *anti*-Konformation bei. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die Formamidopyrimidine eine Verzerrung innerhalb ihres DNA-Templatstranges induzierten, es in den erhaltenen Strukturen jedoch zu keiner Verzerrung des katalytisch aktiven Zentrums und des Primerstranges kam. Hierbei wurde keine Beteiligung des namensgebenden Strukturelements der Formamidgruppe an alternativen Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaarung beobachtet. Dies wurde bisher oftmals in der Literatur vermutet.

Somit konnte erstmals ein bioisosteres Analogon des FaPydA Schadens im aktiven Zentrum einer Polymerase der A-Familie aufgelöst werden. Auch das mutagene Verhalten, welches vor mehr 10 Jahren erstmals für FaPydG erkannt wurde, konnte mit Hilfe des carbozyklischen FaPydG *in vitro* durch eine Replikation im Kristall strukturell dargestellt und durch Primerverlängerungsstudien quantifiziert werden.

Summary

The processing of endogenous and environmental DNA base damage by DNA polymerases is a major factor that leads to mutations, which can result in various pathologies, including cancer, and in physiological processes such as aging and inflammation. An understanding of this process is therefore essential in order to gain fundamental insight into how DNA mutations, under these conditions, originate.^[4]

In the present work the behavior of ring-opened hydrolysis products of the canonical DNA purine bases, the so called formamidopyrimidines (Scheme 1) during their replication process was investigated.



Scheme 1: The two natural formamidopyrimidines α,β -FaPydA (**19a/b**) and α,β -FaPydG (**17a/b**) in their anomeric forms.

The present work describes the synthesis of two anomerically stable, carbocyclic analogues of the formamidopyrimidines β -cFaPydA and β -cFaPydG, their incorporation into DNA,^[2-3] and the evaluation of their coding potential during their replication *in vitro* by two *high-fidelity* polymerases of the A-family and two *low-fidelity* polymerases of the Y-family.

The rates of misincorporation opposite both lesions were quantitatively analyzed using an assay that was developed in the research group of *T. Carell* based on pyrosequencing techniques (Table 1).

With respect to their mutagenic potential, the formamidopyrimidines showed a behavior similar to the 8-oxo-analogues. The β -cFaPydA lesion, for example, induces less mismatched base pairing. On the other hand, incorporation of dATP opposite β -cFaPydG was possible but occurred to a lower extent than opposite the common 8-oxodG lesion.

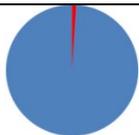
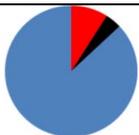
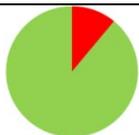
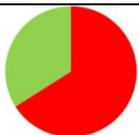
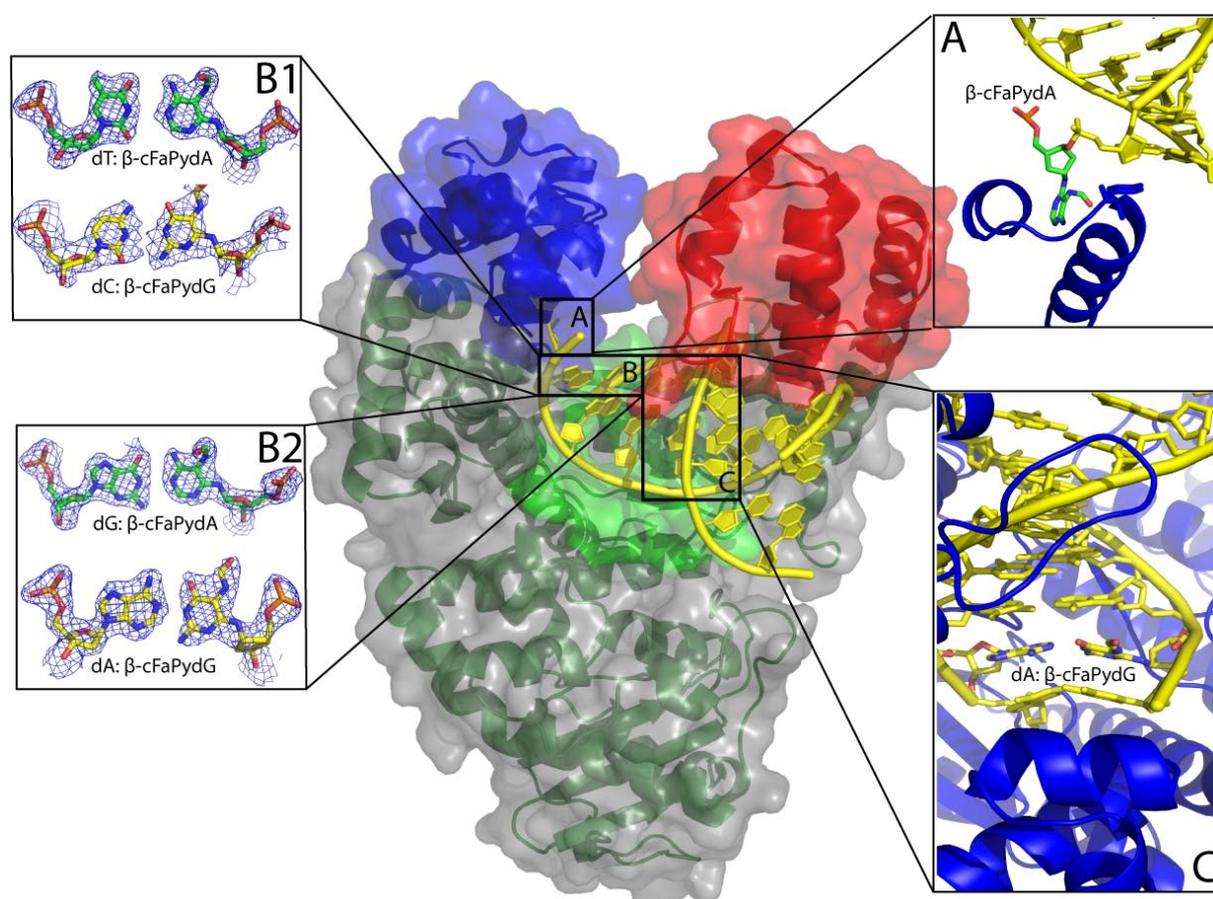
β -cFaPydA	8-oxodA	β -cFaPydG	8-oxodG
			
99 % dTTP, 1 % dATP	87 % dTTP, 9 % dATP, 4 % dGTP	89 % dCTP, 11 % dATP,	66 % dATP, 34 % dCTP

Table 1: Results of dNTP incorporation opposite β -cFaPydA, β -cFaPydG, and the 8-oxo-purine lesions 8-oxodA and 8-oxodG of primer extension reactions with *GeoBst* Pol I.

To obtain deeper insight into the structural basis of the primer extension results, crystallization experiments were carried out with polymerase I from the thermophilic organism *Geobacillus stearothermophilus* (*GeoBst* Pol I). For each of the lesion analogues snapshots of correct base pairs with dT and dC were obtained (Scheme 2).



Scheme 2: Crystallographic snapshots during the replication process of *GeoBst* Pol I: **A**) β -cFaPydA in the preinsertion side before entering the active center of Polymerase I. **B1**) Both carbocyclic analogues inside the active center, basepairing in the correct manner with dT (β -cFaPydA) and dC (β -cFaPydG). **B2**) Electron density maps of mismatched basepairs of dG with β -cFaPydA and dA with β -cFaPydG. **C**) Error prone dA: β -cFaPydG base pair after translocation within the DNA duplex region.

Summary

Several stages of the replication process could be obtained for β -cFaPydA and for β -cFaPydG with resolutions from 1.7 to 2.7 Å. The crystallographic data confirmed the primer extension results for the error free replication of β -cFaPydA and the error prone replication of β -cFaPydG.

In contrast to the 8-oxodG lesion, which induced dATP insertion due to an alternative error-prone *syn*-conformation, the β -cFaPydG lesion maintained its *anti*-conformation. The structural results also show that both analogues induce distortions that only affect the template strand, but neither the primer strand nor the catalytic center of the polymerase. The eponymous formamide group did not participate in any hydrogen bonding, in contrast to what was previously assumed in literature.

For the first time a bioisosteric analogue of the FaPydA lesion could be shown inside the active center of an A-family polymerase. For the carbocyclic FaPydG lesion, error-prone replication behavior *in vitro* could be affirmed ten years after its first discovery and quantified using primer extension based pyrosequencing as well as by the first crystallographic analysis in complex with crystals of protein *GeoBst* Pol I.

1 Einleitung

1.1 Funktion und Aufbau der DNA

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

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

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

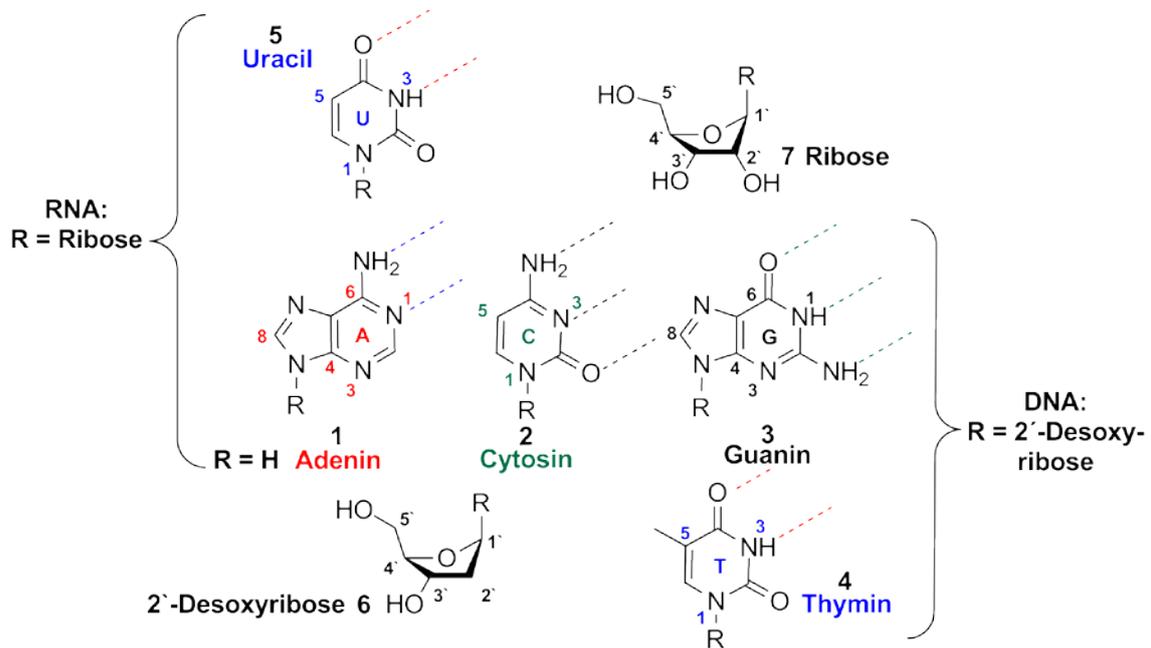


Abbildung 3: Die Bausteine der DNA sind die Nukleoside (1 - 4), die sich jeweils aus einer Purin- oder Pyrimidinbase und einem Monosaccharid (bei DNA: 2'-Desoxyribose (6), bei RNA: Ribose (7)) zusammensetzen. Die Saccharide liegen als Furanoside vor und sind über die *N*- β -glykosidische Bindung ihres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

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

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

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

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

1.2 Rückblick: Die Entdeckung der DNA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

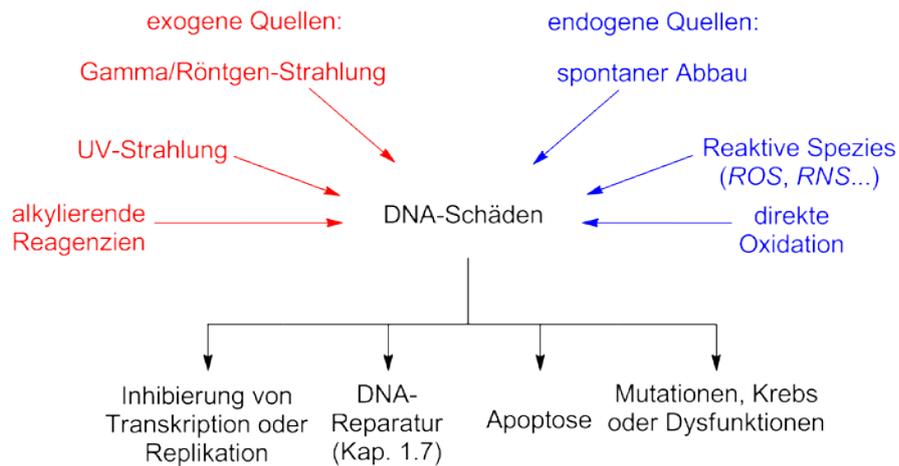
1.3 Ursachen von DNA-Schäden und ihre Folgen

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

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

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

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



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

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

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

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

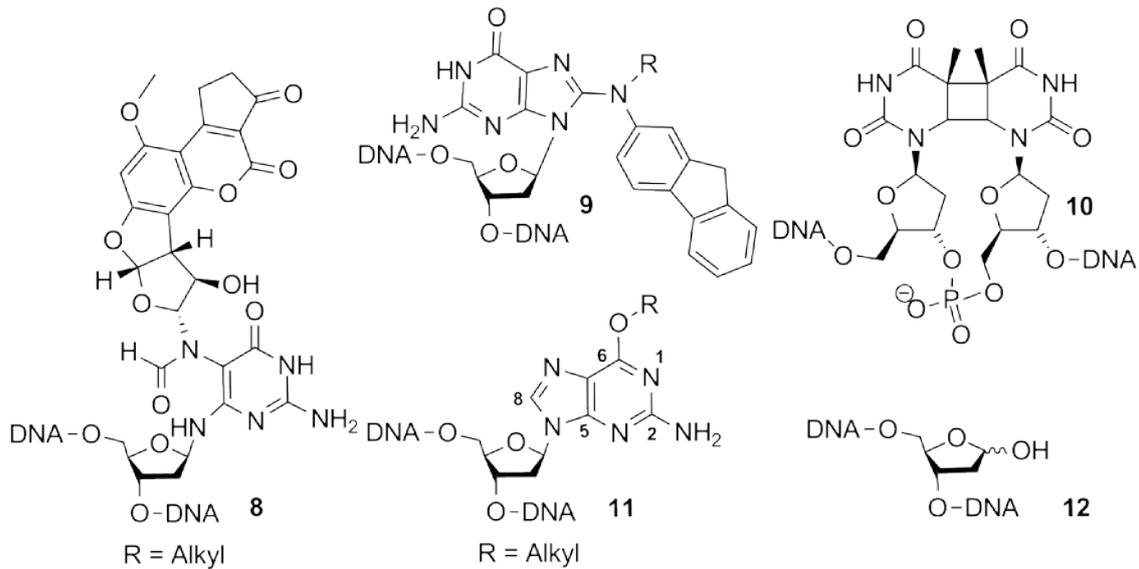


Abbildung 4: Prominente Vertreter nicht-oxidativer DNA-Schäden: AFB₁ – FaPydG (**8**), dG-AF (**9** – R = H), CPD-Schaden (**10**), O6-Alkylguanodin (**11**) oder abasische Stellen (AS - **12**).

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

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

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

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

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

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

1.4 Entstehung oxidativer Schäden an DNA

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

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

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

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

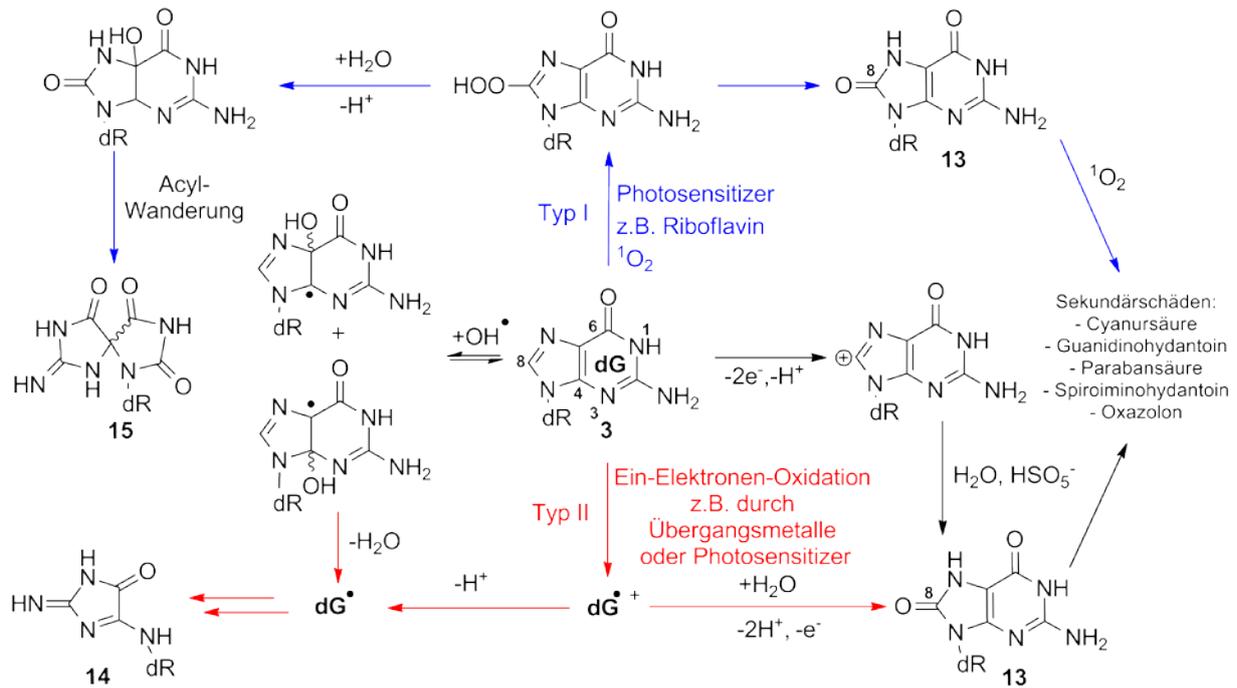


Abbildung 5: Die Oxidationskaskaden des 2'-Desoxyguanosins (3) und deren Endprodukte 8-oxodG (13), Imidazol (14) und Spiroiminohydantoin (15).^[3, 67, 70, 87-88]

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

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

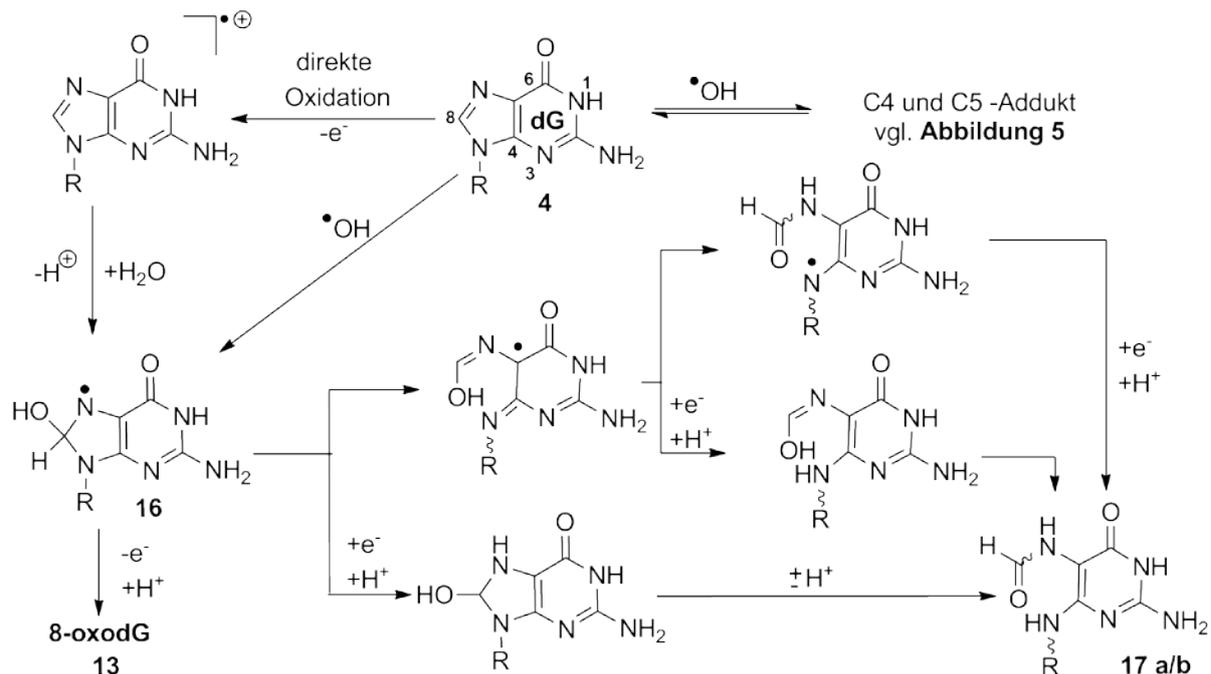
Hydroxylradikale gelten als Hauptverursacher oxidativer Schäden an DNA. Diese entstehen beispielsweise durch das Nebenprodukt der Zellatmung H_2O_2 . Dessen Weiterreaktion über die Fenton-Reaktion unter Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) läßt Hydroxylradikale entstehen. Diese in den Mitochondrien stattfindende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

1.4.1 Oxidative DNA-Schäden des Guanosins

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

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

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



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

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

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

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

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

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

1.4.2 Oxidative DNA-Schäden des Adenosins

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

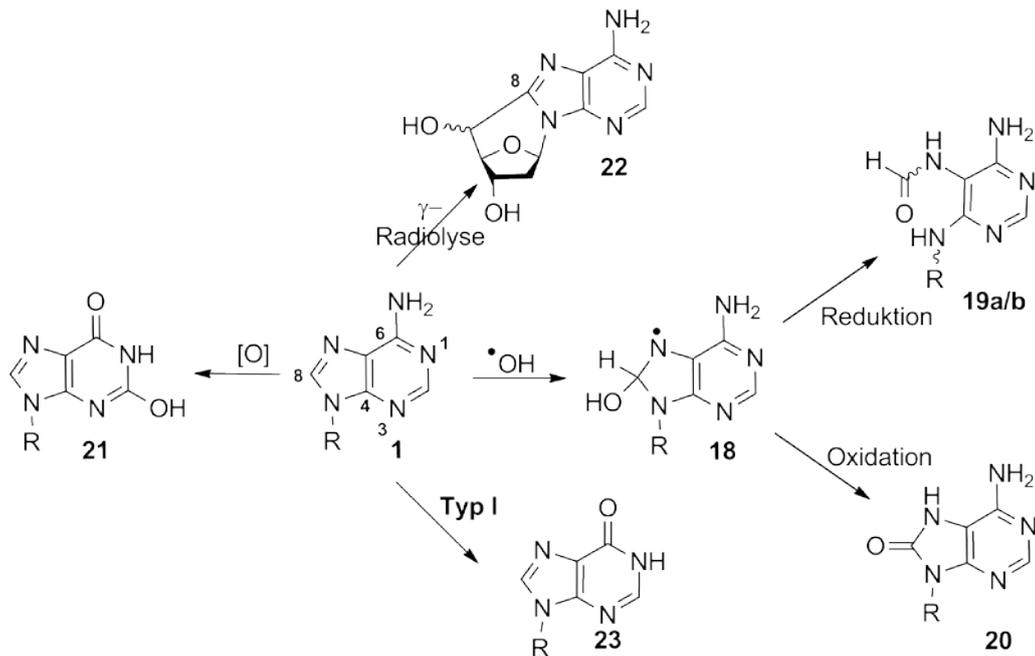
Das 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin-2'-desoxyadenosin (FaPydA - **19 a/b**) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyadenosin (8-oxodA - **20**) bilden die beiden Hauptschäden des Adenosins (**1**) (Schema 3). Bei der Reaktion von Hydroxylradikalen mit dA (**1**) entsteht in wässriger Lösung die radikalische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

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

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

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

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



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

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

1.5 Die Schadklasse Formamidopyrimidine

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

1.5.1 Synthetischer Zugang zu den Formamidopyrimidinen

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

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

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

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

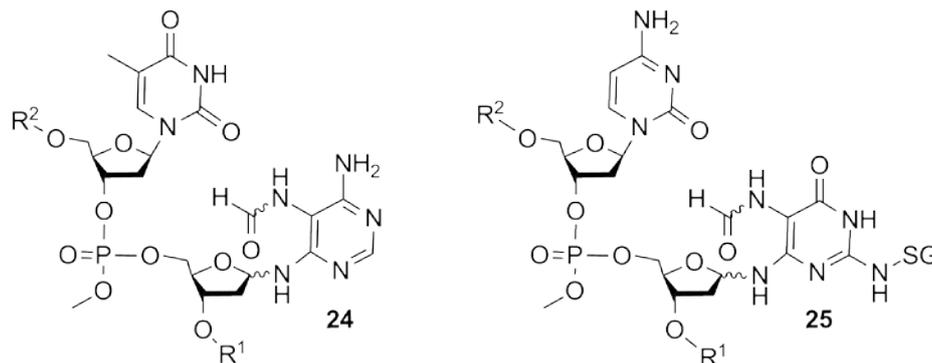


Abbildung 6: Darstellung der anomeren Dinukleotid Bausteine des FaPydA (**24a/b**) und FaPydG (**25a/b**) der *Greenberg* Gruppe, die eine Bildung der Pyranoseform verhindert (SG = Schutzgruppe).^[131-132]

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

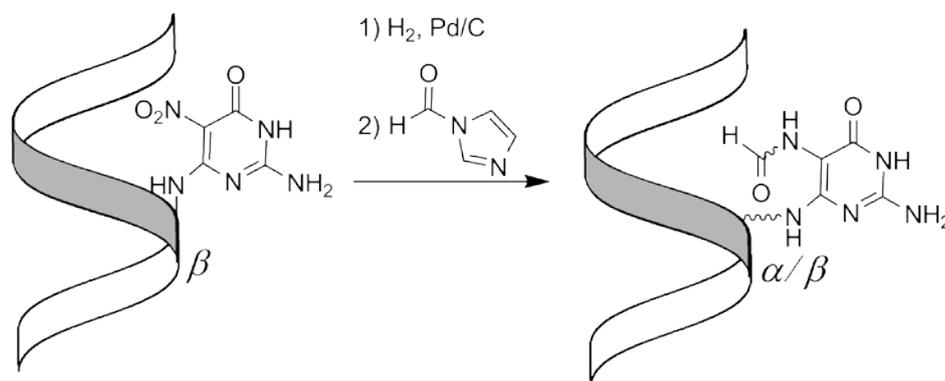


Abbildung 7: Schematische Darstellung der „post-synthetischen“ Generierung von α,β -FaPydG im DNA-Einzelstrang.^[134]

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

1.5.2 Stabilität der natürlichen Formamidopyrimidine

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

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

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

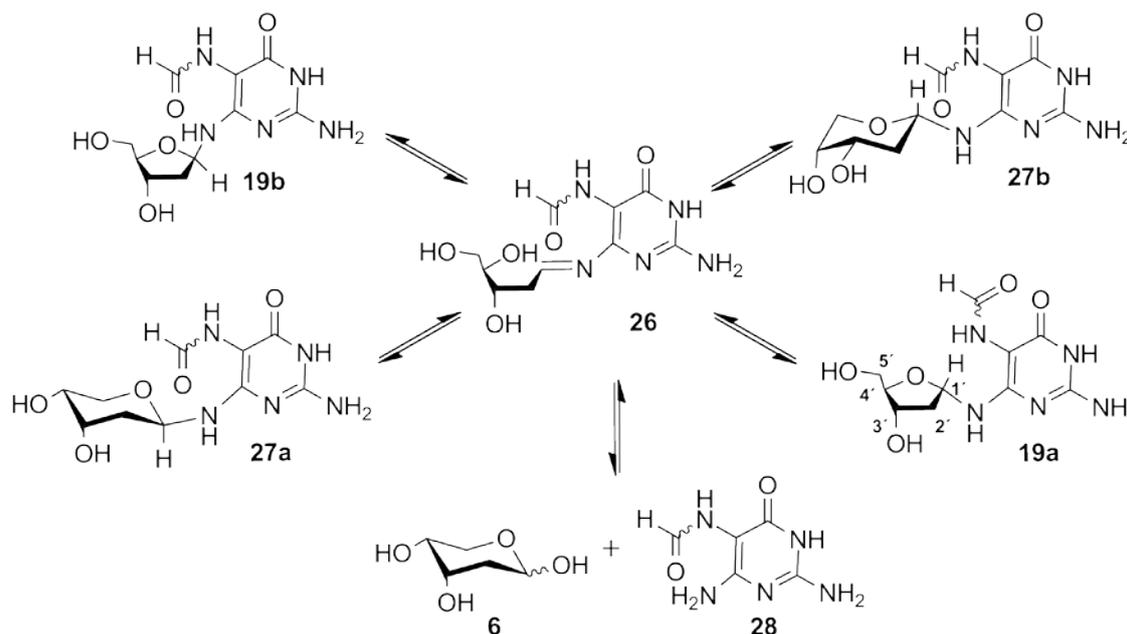


Abbildung 8: Monomeres FaPydG mit unterschiedlichen Zuckerkonfigurationen/Konstitutionen, β -Furanose- (17b), α -Furanose- (17a), sowie α -Pyranose- (27a) und β -Pyranoseform (27b), die sich über die Imin-Struktur (26) bilden. Auch die hydrolytische Spaltung der *N,O*-glykosidischen Bindung erfolgt über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

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

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

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

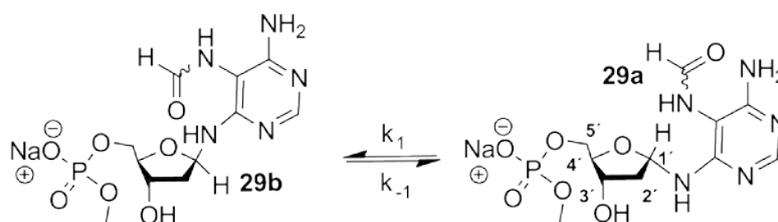


Abbildung 9: Phosphodiester (**29a/b**) des FaPydA der zur Untersuchung der Anomerisierung bzw. Stabilität des Schadens diente.^[132]

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

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

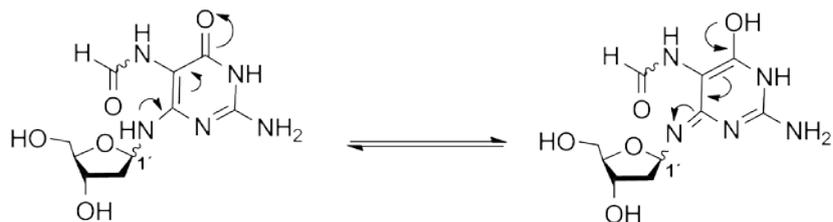


Abbildung 10: Tautomere Grenzstrukturen zur Verdeutlichung der erhöhten Stabilität des FaPydG-Schadens (**17a/b**).^[120]

1.6 Bioisostere Analoga der Formamidopyrimidine

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

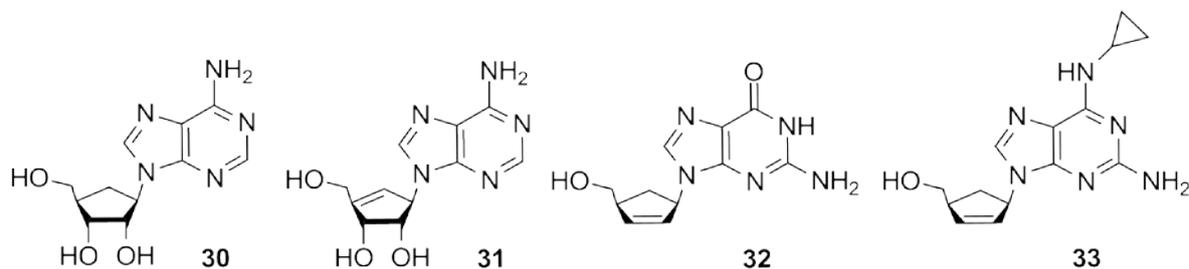


Abbildung 11: Natürlich vorkommende carbozyklische Nucleoside (Aristeromycin (**30**) und Neplanocin A (**31**)), sowie synthetische carbozyklische Vertreter (Carbovir (**32**) und Abacavir (**33**)), die als antivirale Medikamente Anwendung finden.

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

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

Die Bioisosterie der carbozyklischen Nucleoside wurde in mehreren Artikeln diskutiert.^[157-159] Hierbei wurde gezeigt, dass der Cyclopentanring gegenüber der (2'-Desoxy)-Ribose einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Schmelzpunktverhalten von Duplexen, kinetische Prozesse der Replikation oder strukturelle Eigenschaften besitzt.^[149, 152, 157-158, 160-162]

Carbozyklische Analoga von DNA-Schäden besitzen aufgrund ihrer Struktur eine nicht-hydrolysierbare Bindung zwischen Cyclopentanring und Heterozyklus. Somit bieten die carbozyklischen Schadensanaloga die Möglichkeit Kristallisationsstudien mit Reparaturenzymen durchzuführen.^[163-164]

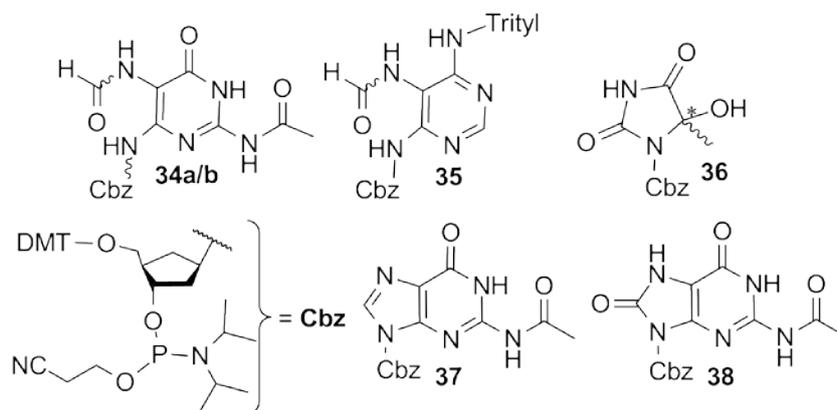


Abbildung 12: Carbozyklische Phosphoramiditbausteine des α,β -cFaPydG (**34a/b**), β -FaPydA (**35**), cHydantoin (**36**), cdG (**37**) und c8-oxodG (**38**). Die Analoga wurden in der Arbeitsgruppe *Carell* erfolgreich in Oligodesoxynucleotide inkorporiert und für Reparatur- und Replikationsstudien verwendet.

Berechnungen von *J. Gierlich* (Arbeitsgruppe *Carell*) ergaben für natürliches als auch für carbozyklisches FaPydG sehr ähnliche Potentialhyperflächen bzgl. der Rotation um die glykosidische Bindung. Beide Verbindungen zeigten zwei lokale Minima, welche den Konformationen der *syn*- bzw. *anti*- Konformation entsprachen.^[3, 158] Im direkten Vergleich der beiden Minima ist die *anti*-Konformation um 6 kcal mol^{-1} stabiler als die *syn*-Konformation.^[158] Bereits erhaltene Kristallstrukturen von β -cFaPydG im aktiven Zentrum der *GeoBst* Pol I bestätigten die Bevorzugung der *anti*-Konformation.^[3] Aufgrund der niedrigen Rotationsbarrieren von $12\text{-}16 \text{ kcal mol}^{-1}$ ist eine freie Drehbarkeit des Heterozyklus um die *N,O*- bzw. *N,C*-glykosidische Bindung bei Raumtemperatur möglich. Im Gegensatz dazu zeigen Berechnungen der Energiefunktionen des 8-oxodG neben einem energetischen Minimum für die *anti*-Konformation einen gleichen Wert für das Minimum für die *syn*-Konformation. Der Grund: In der *anti*-Konformation kommt es für 8-oxodG zu einer sterischen Abstoßung zwischen der C8-Carbonylgruppe und der C5'-CH₂-Gruppe am Zucker. Dies führt zur energetischen äquivalenten *syn* und *anti* Konformationen des Schadens.^[165-166]

Aus der Arbeitsgruppe um *M. Greenberg* stammt erstmals eine Synthese der C-Nucleoside des FaPydA (α/β -C-FaPydA - **34**) und des FaPydG (α/β -C-FaPydG - **40a/b**) (Abbildung 13).^[132, 167] Von beiden Analoga wurde sowohl das α - als auch das β -konfigurierte Phosphoramidit in DNA inkorporiert. Weiterhin konnte ein anomeres Triphosphat des FaPydG sowie ein β -C-Nucleosidtriphosphat (**37**) enzymatisch in DNA eingebaut werden (vgl. Kap. 1.9).^[168]

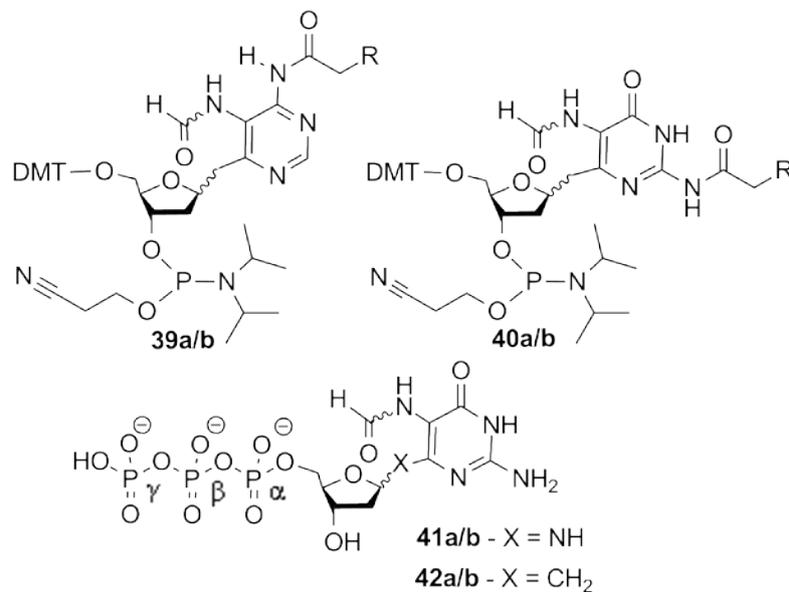


Abbildung 13: C-Nucleoside des α/β -CFaPydA (**39a/b**) und α/β -C-FaPydG (**40a/b**), die mittels PA-Chemie in Oligonucleotide inseriert wurden. Das Triphosphat des FaPydG (**41a/b** - X = NH) sowie sein β -C-Nucleosid (**42a/b** - X = CH₂) wurde enzymatisch in DNA inseriert.^[168-169]

Bezüglich des Schmelzpunktverhaltens der Formamidopyrimidine ergeben sich teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse. Schmelzpunktstudien von FaPydG zeigen ein Basenpaarungsverhalten analog dem 8-oxodG, mit erhöhter Duplexstabilität von FaPydG gegenüber dC und dA.^[170] Schmelzpunktstudien mit β -cFaPydG im Vergleich zum 8-oxodG gegenüber dC und dA zeigten für das β -konfigurierte carbozyklische FaPydG ein sigmoidales Schmelzpunktverhalten, was auf ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten im Vergleich zum 8-oxodG schließen lässt.^[171]

Grundsätzlich kommt es bei beiden Formamidopyrimidinen zu einer Destabilisierung der Duplexstruktur, jedoch misst man die höchste Stabilität mit dT (gegenüber FaPydA) bzw. dC (gegenüber FaPydG).

1.7 Allgemeines zur Reparatur von DNA-Schäden

Die Reparatur von DNA-Schäden ist eine Voraussetzung für den Erhalt der genomischen Integrität.

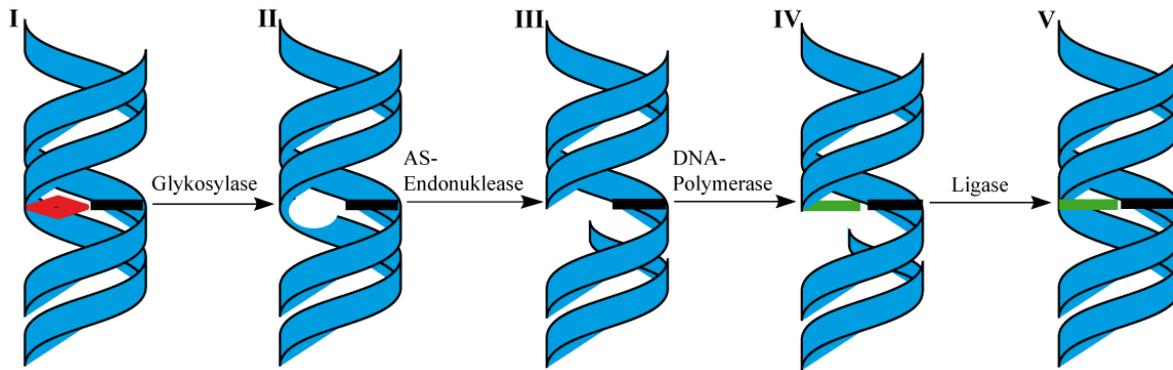
Um Aussagen über die Relevanz eines DNA-Schadens *in vivo* machen zu können, ist die Erforschung der Reparaturprozesse und seines Replikationsverhaltens ein wichtiger Teil.^[94, 172]

Photoschäden wie das CPD (**10**) oder *bulky adducts* wie das dG-AAF (**8** – R = Ac – Abbildung **4**) werden durch direkte Reversion oder durch das Nukleotid-Exzisionsreparatur-System (*nucleotide-excision repair pathway* - **NER**) entfernt.^[173]

Auch alkylierte DNA-Basen wie O6-Alkylguanin-Addukte (**11**) werden auf diese Weise repariert.^[174-179] Neben den sterisch anspruchsvollen *bulky adducts* werden Chemotherapeutika wie *cis*-Platin-Addukte mittels **NER** aus dem Genom entfernt.^[180-181] Der Mechanismus, der durch Polymerasen fehlinsertierte DNA-Basen repariert, wird als Fehlpaarungs-Reparatur-System (*mismatch repair* - **MMR**) bezeichnet.^[173] Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen vollzieht sich auf zwei unterschiedlichen Reparaturwegen: Durch homologe Rekombination (*homologous recombination* - **HR**) und durch die nicht-homologe Endverknüpfung (*nonhomologous end joining* - **NHEJ**).^[37, 182-183]

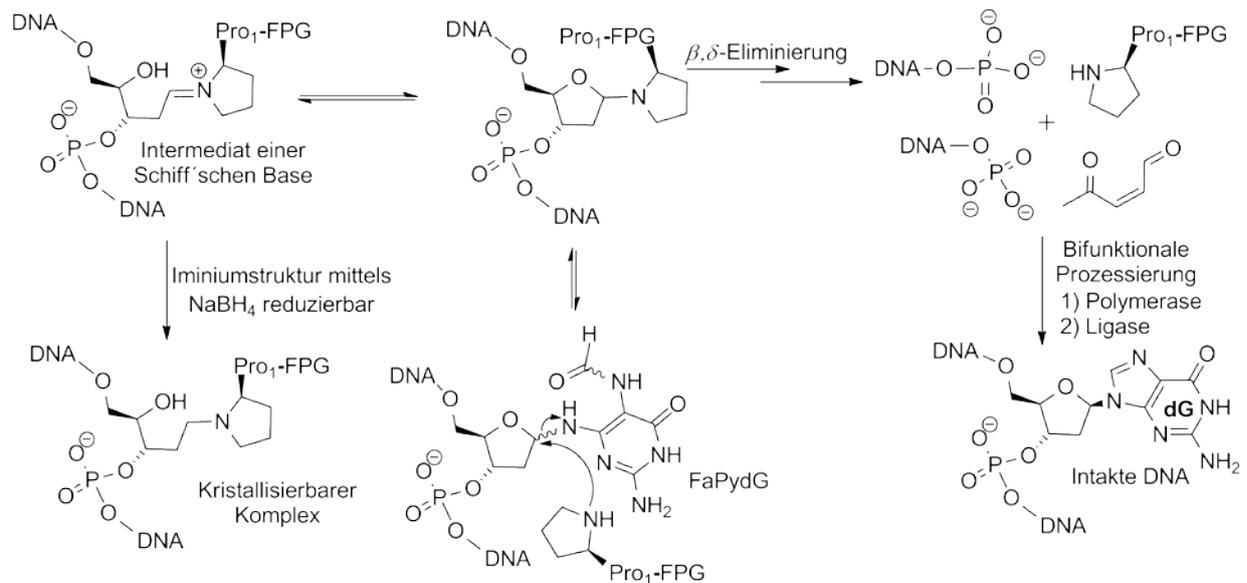
1.7.1 Reparatur der Formamidopyrimidine in Prokaryoten

Die Reparatur der Formamidopyrimidine erfolgt über den Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur (*base excision repair* - **BER**).^[184-185] Dieser kann in zwei unterschiedliche Wege, den *short-patch BER* oder den *long-patch BER*, unterteilt werden (Schema 4).^[186] Die Initiierung des **BER** erfolgt über die Organismus spezifischen Glykosylasen.^[187] Innerhalb des **BER** unterscheidet man zwischen monofunktionalen und bifunktionalen Glykosylasen.^[188] Beide Arten hydrolysieren die *N,O*-glykosidische Bindung des geschädigten Nukleotids und erzeugen somit eine abasische Stelle (**12** - Schema 4) innerhalb des Duplex. Das Ausschneiden der geschädigten Base erfolgt mittels eines Glykosyltransfers. Hierbei nutzen die Glykosylasen ein nukleophiles Amin (wie z.B. Lysin oder im Falle der Formamidopyrimidin-Glykosylase (FPG bzw. MutM) ein *N*-terminales Prolin).^[189] Die nachfolgenden Schritte des **BER** sind in Schema **4** zusammengefasst.



Schema 4: Vereinfachte Darstellung des *short-patch BER* für eine monofunktionale Glykosylase: **I**) Geschädigte Base im DNA-Duplex; **I-II**) Erkennung und Hydrolyse des Schadens: Entstehung einer abasischen Stelle (AS); **II-III**) Hydrolyse der Phosphodiesterbindung durch die intrinsische Lyaseaktivität der Glykosylase, eine separate AP-Endonuklease oder eine Phosphodiesterase; **III-IV**) Einbau einer neuen Base gegenüber dem freien Nucleotid (schwarz) im intakten Einzelstrang mit dem korrekten Triphosphat (grün); **IV-V**) Knüpfung einer neuen Phosphodiesterbindung.^[190]

FPG kommt sowohl in Bakterien als auch in Säugerzellen vor und zählt zu den best untersuchtesten Glykosylasen/AP-Lyasen.^[191-193] Seine Enzymfunktion umfasst neben der Reparatur der Formamidopyrimidine auch die Exzision von Me-FaPydG. Dieses wurde erstmals bei der Untersuchung zellulärer Extrakte verschiedener Stämme von *E. coli* beobachtet.^[85, 194-196] Später wurde auch die Reparatur mittels γ -Strahlung erzeugter Schäden (u.a. FaPydA) nachgewiesen.^[197] Aufgrund seiner Eigenschaften wird das FPG zur Superfamilie der FPG/Nei-Proteine (Endonuklease VIII) gezählt.^[198] Das Enzym besitzt als bifunktionale Glykosylase zusätzlich eine Lyase-Domäne, die sowohl eine β - als auch eine δ -Eliminierung (in Schema 4 bei einer monofunktionellen Glykosylase durch die AS-Endonuklease durchgeführt) an der 2'-Desoxyribose katalysiert (Schema 5).



Schema 5: Schematischer Mechanismus der Basenexzision des FaPydG (**17a/b**) durch das FPG-Protein.^[152, 161-162, 189]

Detaillierte kinetische Untersuchungen und Kristallisationsstudien zu den Formamidopyrimidinen waren jedoch erst nach spezifischen Synthesen der natürlichen Schäden oder ihrer bioisosteren Analoga möglich.^[199-200]

Messungen ergaben, dass FPG für fehlerfreie Basenpaarungen von FaPydG, als auch für FaPydA und 8-oxodG in etwa die gleichen Reparaturkinetiken besitzt.^[201] Im Vergleich wird die dA: FaPydG Fehlpaarung 17-mal weniger effizient durch FPG repariert als das dC: FaPydG Basenpaar. Das 8-oxodA wird nicht bzw. nur sehr schlecht durch FPG repariert.^[198, 202-203] Das FaPydA wird gegenüber allen vier kanonischen DNA-Basen mit gleicher Effizienz durch FPG entfernt. Sobald die Kinetiken an mehreren Schäden innerhalb eines Duplexes gemessen werden, unterscheiden sich die Substratspezifität und Geschwindigkeit des Ausschneidens signifikant.^[204-205]

Ober et al. nutzten das β -cFaPydG, um eine Kokristallstruktur mit dem FPG-Enzym zu erhalten. Dadurch gelang es zum ersten Mal, den Erkennungsmechanismus von FPG für das β -cFaPydG auf atomarer Ebene aufzuklären.^[193, 206-207] Die Struktur zeigt, dass das Enzym in der Lage ist, das Schadensanalogon extrahelikally aus dem Duplex herauszuflippen und in einer *anti*-Konformation zu stabilisieren.^[161, 190] Somit lieferten die von *Ober et al.* entwickelte Synthese und spezifische Inkorporation von β -cFaPydG die ersten detaillierteren Studien zum Reparaturmechanismus des Schadens.^[132-133, 136-137] *Verdine* und Mitarbeiter kristallisierten das 8-oxodG (**13**) in der aktiven Tasche einer mutierten Glykosylase mittels Disulfidbindung. Die erhaltene Struktur zeigt, dass 8-oxodG in einer *syn*-Konformation gebunden wird.^[208] Somit werden FaPydG und 8-oxodG durch das FPG offenbar auf unterschiedliche Weise erkannt.^[209]

MutY (das Enzym entfernt dA in dA:8-oxodG Fehlpaarungen) und MutT (hydrolysiert 8-oxodGTP zu 8-oxodGMP) sind neben dem FPG ebenfalls Teil des bakteriellen *GO* (*guanine oxidation*) Systems zum Schutz gegen gentoxische Effekte. Auch das dA: FaPydG Basenpaar ist ein Substrat für die Adenosin-Glykosylase MutY.^[200]

Im Gegensatz zum FPG ist MutY nicht in der Lage, eine der vier DNA-Basen gegenüber dem FaPydA herauszuschneiden.^[199]

So wird FaPydA durch die Endonuklease VIII (Nei) aus *E. coli* gegenüber dA effizient repariert. Die aus *E. coli* stammende DNA-Glykosylase Endonuklease III (Nth) und Nei sind hauptsächlich für die Reparatur von Pyrimidin-Schäden verantwortlich.^[187] Dennoch wird FaPydA gegenüber dT und noch effizienter gegenüber dA von ihnen repariert.^[210] Die Kinetiken entsprechen dabei den Pyrimidin-basierenden Schäden. Das FaPydG wird durch diese Proteine nicht repariert.^[187, 210-211]

1.7.2 Reparatur in Eukaryoten

Eine Vielzahl eukaryotischer DNA-Glykosylasen zeigen hohe Affinität für FaPydA und FaPydG. Beispielsweise werden beide von humanen und Maus NEIL1-Proteinen (Homologe der bakteriellen Nei Glykosylase aus der FPG/Nei Superfamilie) effizient repariert. Die Sequenzidentität zwischen FPG und Nei liegt bei etwa 25 %, wobei es keine einheitliche Substratspezifität gibt.^[205, 207, 212] Die 8-oxodG Glykosylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (yOgg1) besitzt ebenfalls eine hohe Substratspezifität für oxidative Schäden. Sie ist vergleichbar mit denen der FPG-Familie, obwohl zwischen den beiden Enzymklassen keine signifikante Sequenzhomologie besteht.^[213] Das yOgg1 entfernt sowohl FaPydG als auch 8-oxodG und Me-FaPydG aus Oligonukleotiden. Für FaPydA zeigt sich jedoch keine Substratspezifität.^[214] Ähnliche Substratspezifitäten konnten für das humane Ogg1 (hOgg1), Ogg1 aus *Drosophila melanogaster* oder *Arabidopsis thaliana* (AtOgg1) beobachtet werden.^[215-218]

Der Hauptunterschied zwischen den bakteriellen FPG- und den eukaryotischen Ogg1-Enzymen liegt in der fehlenden Substratspezifität für FaPydA.

Weitere Studien zu hOgg1 zeigen eine höchst effiziente Reparatur des FaPydG, besonders für die nicht mutagene Basenpaarung mit dC. Dagegen erfolgt eine Reparatur des FaPydA nur, wenn eine mutagene Basenpaarung mit dC vorliegt.^[219] Mutationen von nur einzelnen Aminosäuren des hOgg1 zeigten sowohl für FaPydG als auch für 8-oxodG stark verschlechterte Spezifitäten der Glykosylase.^[215-216, 220-221]

Glykosylase Substrat	FPG ^[201] <i>E. coli</i>	Nth ^[222] <i>E. coli</i>	Nei ^[211] <i>E. coli</i>	yOgg1 ^[214] <i>S. cerevisiae</i>	Ntg1 ^[223] <i>S. cerevisiae</i>	Ntg2 ^[223] <i>S. cerevisiae</i>	mNEIL1 Maus ^[224]
FaPydA	17.6 ± 1.2	3.1 ± 0.3	5.0 ± 0.3	-	4.9 ± 0.7	4.7 ± 0.5	7.1 ± 0.1
FaPydG	25.7 ± 2.9	-	-	1.5 ± 0.1	3.6 ± 0.5	2.4 ± 0.6	9.3 ± 0.6
8-oxodG	13.0 ± 1.3	-	-	6.5 ± 0.4	-	-	-

Tabelle 2: Übersicht der Reparaturkinetiken [$k_{cat}/K_M \times 10^5$ ($\text{min}^{-1} \text{nM}^{-1}$)] für die Exzision von FaPydA, FaPydG und 8-oxodG durch für eukaryotische und prokaryotische DNA-Glykosylasen (die Ermittlung der Werte erfolgte mittels GC/MS).^[209] (- = keine Reparatur bzw. Werte unterhalb der Nachweisgrenze)

Weitere Daten der Exzision von DNA-Glykosylasen wurden in der Literatur bereits ausführlich behandelt.^[187]

Obwohl das FaPydGTP bisher noch nicht in Zellen nachgewiesen wurde, zeigt sich eine gewisse Spezifität für seine Hydrolyse durch MutT. Im Vergleich zur Hydrolyse von dGTP ist diese jedoch etwa 100-mal weniger effizient. Im Vergleich zur Hydrolyse von 8-oxodGTP ist die Hydrolyse von FaPydGTP um den Faktor 10.000 langsamer.^[168]

Aktuelle Forschungsschwerpunkte zur Reparatur oxidativer Schäden sind nach wie vor die Mechanismen, mit denen die Glykosylasen aktiv nach den oxidativen Substraten in einem Genom fahnden.^[225] Neuste Studien bestätigen ein Gleiten (*sliding*) der Glykosylasen entlang der DNA, um nach geschädigten Basen(paaren) zu suchen.^[226]

Desweiteren ist nach wie vor unklar, wie es Reparaturenzymen gelingt, mit einem Höchstmaß an Präzision und Geschwindigkeit die oben erwähnten Schäden aus einer Vielzahl ungeschädigter Nukleobasen herauszufiltern.

Kristallstrukturen liefern hierbei wertvolle Ausgangspunkte für moleküldynamische Studien zur Struktur, Dynamik und Energie der Reparaturprozesse.^[227]

In der Arbeitsgruppe *Ochsenfeld* (LMU München) wird derzeit mit Hilfe theoretischer Methoden an Mechanismen zur Basenerkennung, ihrer Extrusion bzw. der Inzision der geschädigten Basen mit Hilfe der in der Arbeitsgruppe *Carell* erhaltenen Röntgenstruktur des FPG mit 8-oxodG und β -cFaPydG geforscht.

1.8 Polymerasen

1.8.1 Funktionsprinzip und Aufbau der Polymerase Familien

Trotz der Vielzahl an DNA-Reparaturmechanismen, werden nicht alle auftretenden Schäden repariert, was zu einer Blockade der replikativen Polymerasen und damit zum Stillstand der Replikation führen kann.

Entgehen DNA-Schäden ihren Reparaturprozessen, können die Schäden von *high-fidelity* Polymerasen nur teilweise repliziert werden.

In diesem Fall kann durch *translesion DNA synthesis (TLS)* die Replikation aufrechterhalten werden. Die Replikation über den DNA-Schaden hinweg erfolgt dann durch spezialisierte Polymerasen jedoch mit einer höheren Fehlerrate.^[228] Die Hauptrolle in den jeweiligen Reparaturmechanismen spielen die verschiedenen *low-fidelity* DNA-Polymerasen.^[229]

Vor 1999 waren nur drei bakterielle Polymerasen bekannt. In Säugetieren hatte man bis zu diesem Zeitpunkt fünf verschiedene Polymerasen entdeckt.^[4] Ab 1999 fand man sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten eine ganz neue Klasse an Polymerasen.^[230-232]

Diese bezeichnet man als *trans lesion synthesis (TLS)* Polymerasen oder auch als *low-fidelity* Polymerasen. *Low-fidelity* Polymerasen besitzen ein sterisch weniger definiertes aktives Zentrum, wodurch es zu einer höheren Fehlerrate, aber auch zu einer höheren Toleranz gegenüber DNA-Schäden kommt. Diese Enzyme sind (anders als *high-fidelity* Polymerasen) in der Lage, über bestimmte Schäden hinweg zu replizieren. Aktuell sind fünf bakterielle Polymerasen sowie 16 eukaryotische Polymerasen bekannt (Tabelle 3).^[233-234]

Familie	Viren	Archaea	Bakterien	Eukaryoten
A	T3-, T5-, T7-DNA Pol ^[235-236]		Pol I ^[237]	Pol γ , Pol θ , Pol ν
B	T4-, RB69-DNA Pol, ^[238] T6-	DNA Pol BI, BII, BIII	Pol II	Pol α , Pol δ , Pol ϵ , Pol ζ /Rev3
C			Pol III	
D			Pol D	
X				Pol β , ^[239] Pol λ , Pol μ , Pol σ , TdT
Y		Dpo4 DNA-Pol, ^[240-242] Dbh DNA-Pol	Pol IV, Pol V	Pol η , ^[243-244] Pol ι , ^[245] Pol κ , ^[246] Rev1
RT		Reverse Transkriptasen der Retroviren und Lentiviren		Telomerase

Tabelle 3: Klassifizierung der Polymerasen in sieben Familien bzw. Gruppen nach Archaea, Bakterien und Eukaryoten.^[29] Die Literaturangaben geben Kristallstrukturen der jeweiligen Polymerase in Komplex mit oxidativen Schäden an.

Der enzymatische Mechanismus der DNA-Synthese ist sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten sehr ähnlich. Dennoch ist die DNA-Replikation in Eukaryoten weitaus komplexer.^[20] Prokaryotische und eukaryotische Polymerasen werden aufgrund ihrer bestehenden Sequenzhomologien in Familien (A, B, C, D, X, Y und RT) unterteilt.^[247]

High-fidelity Polymerasen gehören den Familien A und B an. Die *TLS*-Polymerasen zählen hauptsächlich zur Familie der Y-Polymerasen.^[29]

1.8.2 Prokaryotische Polymerasen

Im Folgenden werden die fünf Gruppen von DNA-Polymerasen und deren Funktionen beispielhaft in *E. coli* dargestellt:

- **Pol I:** Mehrere Funktionen bei der DNA-Reparatur bzw. der damit verbundenen DNA-Synthese; sie besitzen: 5'→3' Polymeraseaktivität, 3'→5' Exonukleaseaktivität (als "proofreading" bezeichnet) und 5'→3' Exonukleaseaktivität.
- **Pol II:** Analog Pol I; DNA-Reparatur-Synthesen, d.h. Schließen von Lücken in DNA-Strängen nach Reparaturprozessen; lediglich 3'→5' Exonukleaseaktivität.
- **Pol III:** Wichtigste Gruppe der Polymerasen; hauptsächlich bei der Replikation von DNA beteiligt (3'→5' Exonukleaseaktivität).
- **Pol IV:** Polymerase der Y-Familie (*low-fidelity* - vgl. hierzu Kap. 1.8.6).
- **Pol V:** Polymerase der Y-Familie; Replikation von DNA-Schäden (vgl. Pol II und Pol IV); an SOS-Reparatur beteiligt.

1.8.3 Wichtige Vertreter eukaryotischer Polymerasen

- **Pol α :** Replikation im Zellkern; nach Insertion von etwa 20 Nukleotiden, danach Übernahme der Elongation durch **Pol ϵ** und **Pol δ** .

- **Pol β**: Beteiligung an der DNA-Reparatur (vgl. *BER* – Kap. 1.7.2).
- **Pol γ**: Reparatur und Replikation von DNA in Mitochondrien bzw. Chloroplasten; fehlerkorrigierende 3'→5' Exonukleaseaktivität.
- **Pol δ**: Hochprozessive DNA-Polymerase; 3'→5' Exonukleaseaktivität; weitere Aufgaben sind Gegenstand der aktuellen Forschung.
- **Pol ε**: Hochprozessive DNA-Polymerase; 3'→5' Exonukleaseaktivität. Zusammenwirken mit **Pol δ**; weitere Funktionen sind Gegenstand aktueller Forschung.
- Weitere weniger gut charakterisierte Polymerasen: **Pol θ, Pol λ, Pol φ, Pol σ, Pol μ**.

Da in der vorliegenden Arbeit nur mit Polymerasen der Familien A und Y gearbeitet wurde, wird im Folgenden auf diese näher eingegangen. Für die Familien B, C, D, X und RT wird an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen.^[20, 29, 234, 247-249]

1.8.4 Polymerasen der A-Familie

Zur A-Familie zählen sowohl replikative Polymerasen als auch Reparaturpolymerasen.^[250]

Charakteristisch für die Polymerasen der A-Familie ist ihre geringe Fehlerrate bei der Replikation.^[251-253] Zu den replikativen Enzymen zählen die T7 DNA Polymerase und die eukaryotisch mitochondriale Pol γ. Die T7 RNA Polymerase zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur Reparaturpolymerase Pol I aus *E. coli*, wobei insbesondere die beiden aktiven Zentren eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Zu den Reparaturpolymerasen gehört die aus *Thermus aquaticus* stammende Pol I und die in der vorliegenden Arbeit kristallisierte Pol I des *Geobacillus stearothermophilus* (*GeoBst* Pol I). Die Sequenzhomologie zwischen *GeoBst* Pol I und dem Klenow Fragment (KF: das große Fragment der Pol I aus *E. coli*) beträgt 49 %.^[254]

Konservierte Strukturen und Aminosäuren über alle Familien hinweg weisen essentielle funktionale Einheiten auf. Diese sind für den Erhalt der Replikation unabdingbar.

Die konservierten Struktur motive werden als Finger (*fingers*), Daumen (*thumb*) und Handfläche (*palm*) bezeichnet (Abbildung 14).^[247, 251-252, 255-256]

In der Handfläche befinden sich saure Aminosäurereste, die die katalytisch aktiven, bivalenten Metallionen koordinieren.^[23] Der Daumen steht in engem Kontakt mit der „kleinen Furche“ des helikalen Teils der DNA. Die Finger formen eine Tasche, die das neu entstehende Basenpaar umschließen.^[23] Bei allen *high-fidelity* Polymerasen befindet sich eine ungepaarte Templatbase im aktiven Zentrum, während sich der Rest des Templatstranges in 5'-Richtung außerhalb des aktiven Zentrums befindet.^[254, 257]

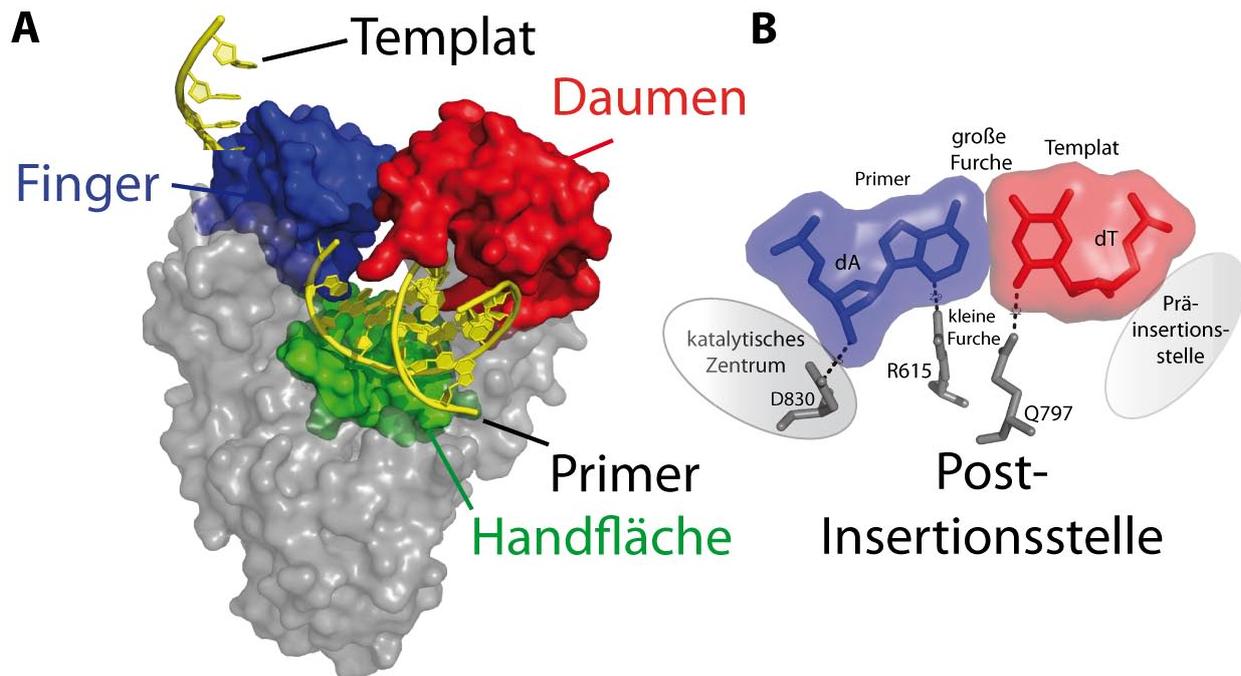


Abbildung 14: A) Oberflächenmodell der *GeoBst* Pol I (A-Familie) in der offenen Konformation. Fingerdomäne (blau - AS 678-744), Daumen (rot - AS 507-585), Handfläche (grün - sechs antiparallele β -Faltblätter).^[258] B) Post-Insertionsstelle (Post-Is) der Polymerase mit einem dA:dT Basenpaar (PDB code 1L3U).^[259]

Die angeführten Eigenschaften führen zu einem hohen Grad geometrischer Selektivität. *High-fidelity* Polymerasen besitzen eine sehr geringe Fehlerrate von etwa $1:10^5$ beim Einbau von Nukleotiden und eine sehr geringe Toleranz gegenüber falsch eingebauten Basenpaaren.^[260]

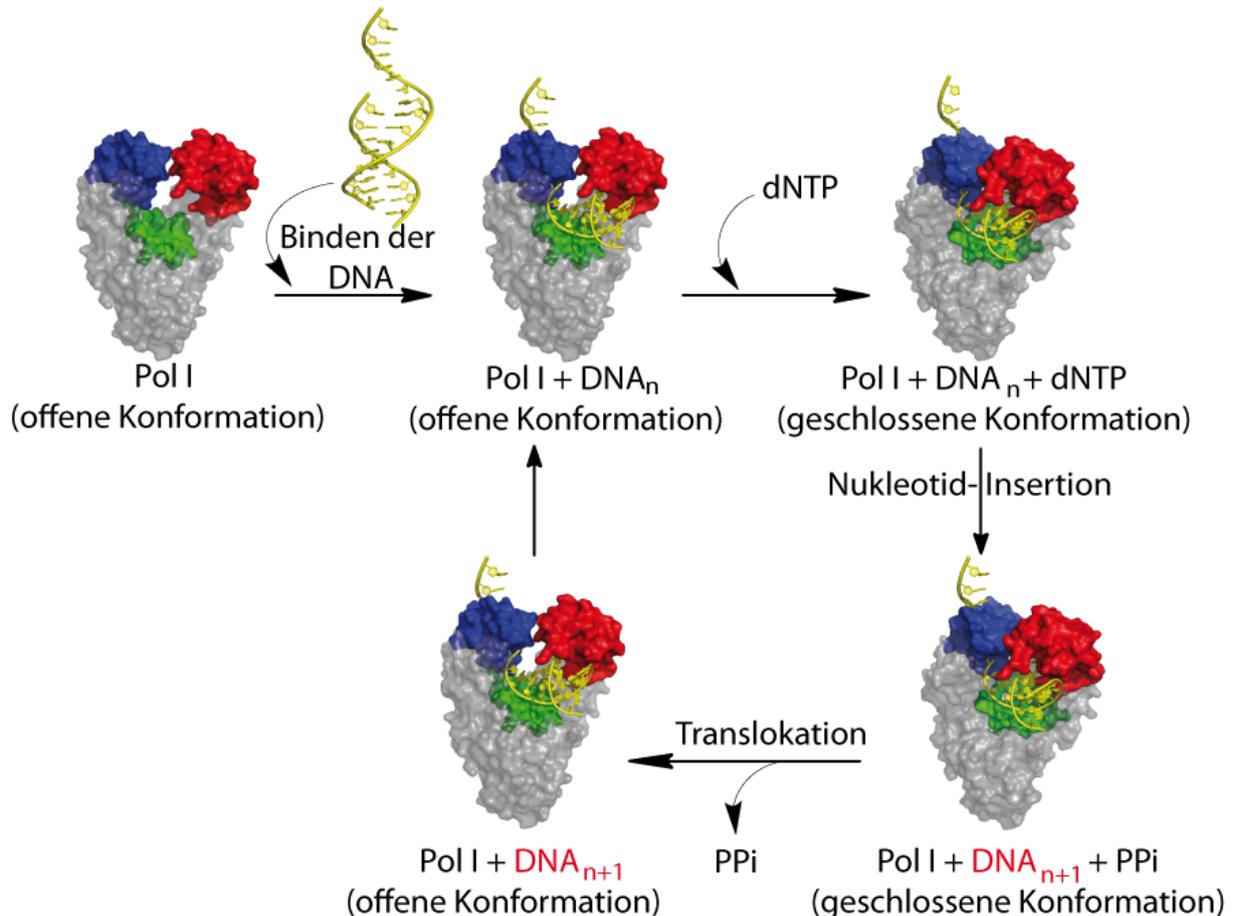
1.8.5 Die Polymerase I des *Geobacillus stearothermophilus*

Die Prozessivität der *GeoBst* Pol I ist mit ca. 112 Nukleotiden s^{-1} im Vergleich zum KF (7.7 Nukleotide s^{-1}) weitaus höher.^[250, 261] Die Fehlerrate der Pol I von *GeoBst* beträgt lediglich 1.5×10^{-5} (mit $3' \rightarrow 5'$ Exonukleaseaktivität).^[262] Dies führt dazu, dass man sowohl enzymatische als auch biochemische Eigenschaften der *GeoBst* Pol I mit denen des KF vergleicht.^[263] In Kooperation der Arbeitsgruppen *Carell* und *Beese* konnte zum ersten Mal die vorhergesagte Struktur eines mutagenen dA: *syn* 8-oxodG Basenpaares im aktiven Zentrum der *GeoBst* Pol I erhalten werden.^[237, 264] Somit wurde der Mechanismus der G \rightarrow T Transversion erzeugt durch den oxidativen Schaden 8-oxodG erstmals strukturell bewiesen.^[237] Weitere Kokristallisationsstudien der *GeoBst* Pol I lieferten Strukturen mit dG-AF **9** (R = H), O6-Methylguanin **11** (R = Me - vgl. hierzu Abbildung 4) sowie einer durch Tautomerie stabilisierten dC:dA Fehlpaarung (Abbildung 36).^[50, 261, 265]

Die Pol I ist ein wertvolles Modellsystem: Bei Zugabe eines geeigneten Nukleosidtriphosphats zum binären DNA-Protein-Komplex können im Kristall noch weitere Schritte der Replikation

katalysiert werden. Das Enzym ist dabei in der Lage, zwischen korrektem und inkorrektem Nukleotid zu unterscheiden.^[50, 254] Wird Magnesium durch Mangan ersetzt, führt dies zu einem signifikant höheren Einbau falscher Nukleosidtriphosphate.^[266-267] Mit dieser Methode gelang es *Johnson et al.*, zwölf mögliche Fehlpaarungen der vier DNA-Basen in der Post-Is der *GeoBst* Pol I zu kristallisieren bzw. aufzulösen.

Bindet das Enzym an einen verlängerbaren DNA-Abschnitt, entsteht ein binärer Komplex, in dem das Enzym eine offene Konformation einnimmt (Schema 6).



Schema 6: Vereinfachter Ablauf der DNA-Replikation. Bindet die Polymerase ein Triphosphat, nimmt das Enzym die geschlossene Konformation ein (ternärer Komplex).^[259] Die Abspaltung des Pyrophosphats (PPI) gilt als treibende Kraft für die Wiederöffnung der Fingerdomäne.^[23]

Vor dem Einbau seines komplementären Nukleotidtriphosphats befindet sich das erste ungepaarte Templatnukleotid in der sogenannten Prä-Insertionsstelle (Prä-Is, Position n). Diese wird durch zwei Helices (O und O1) gebildet (Abbildung 15). Die Aminosäure Tyr714 (Y714) befindet sich mit der Templatbase in der sogenannten Post-Insertionsseite (Post-Is, Position $n-1$) und tritt mit dieser durch π -Stapelung in enge Wechselwirkung. Dieser Sperrmechanismus in der Post-Is verhindert somit das Herausdrehen der Base aus der Prä-Is in das katalytisch aktive Zentrum. Sobald ein Triphosphat im katalytisch aktiven Zentrum der

Polymerase (im unteren Teil der Fingerdomäne) bindet, geht das Enzym in eine geschlossene Konformation über, wobei die Base aus der Prä-Is zur Insertionsstelle (Is) gelangt. Der Übergang in die geschlossene Konformation erfordert einen rigiden Konformationswechsel innerhalb der DNA-bindenden Region der Finger: Dies geschieht durch eine Drehung der O-Helix um etwa 40° .^[259] Zwei katalytisch aktive Metallionen befinden sich im aktiven Zentrum der Pol I, wenn diese ihre geschlossene Konformation einnimmt.^[268] In der offenen Konformation ist im Fall der *GeoBst* Pol I nur ein Mg^{2+} Ion im aktiven Zentrum lokalisiert. Die Is ist nur in der geschlossenen Enzymkonformation durch Bewegung des Daumens in Richtung der Finger vollständig ausgebildet. So stellt sie eine *Watson-Crick*-Basenpaarung beider Nukleotide sicher. Nach der Abspaltung von Pyrophosphat und der Elongation geht das Enzym wieder in die offene Konformation über. Das neu entstandene Nukleotidpaar befindet sich danach in der Post-Is. Die prozessive Bewegung der Polymerase zwischen zwei Phosphoryltransfer-Reaktionen wird als Translokation bezeichnet. Das so betrachtete Nukleotidpaar wird nach einem weiteren vollständigen Verlängerungsschritt in den DNA-Duplexbereich transportiert. Dieser bindet ein vier Basenpaare langes DNA-Segment mit den Registerpositionen $n - 2$ bis $n - 5$.^[258-259] Die DNA geht nach der Position $n - 5$ von einer A Form innerhalb der aktiven Tasche wieder zu einer B-Form über.^[259]

Die molekulare Erkennung des richtigen Basenpaares in der Insertionsseite ist essentiell für die fehlerfreie Replikation.^[269-270] Es wurden verschiedene Orte innerhalb der Polymerase als „Filter“ für einen korrekten Nukleotideinbau erkannt.^[255, 257, 268, 271]

Zum einen beobachtete man die Prä-Is, in der ein passendes Nukleotid vorkoordiniert wird.^[50] Weiterhin erkannte man die Insertionsseite, in der das Triphosphat mit der Templatbase eine Basenpaarung eingeht. Eine vollständig geschlossene Is ist nur möglich, wenn attraktive Wechselwirkungen zwischen Enzym, Triphosphat und Templatbase bestehen.^[272-274] Die Insertionsstelle ist in der geschlossenen Konformation als stark hydrophobes Zentrum sterisch sehr exakt definiert, so dass intakte *Watson-Crick*-Basenpaare eine Geometrie besitzen, welche die optimale van der Waals Kontakte zwischen Protein und DNA zulassen.^[275-277]

Die exakte Geometrie bewirkt somit, dass zusammen mit den direkt beteiligten Aminosäuren D830 bzw. D653 und den essentiellen Magnesiumionen, das Triphosphat zusammen mit der freien 3'-OH Gruppe des Primers zur Reaktion gebracht werden kann (als sog. *induced-fit* bezeichnet).^[256, 272]

Bei einer nicht passenden Geometrie kommt es zur Reversibilität des Insertionsschrittes. Das bei einer Reaktion frei werdende Pyrophosphat bewirkt weiterhin eine Destabilisierung der geschlossenen Konformation. Dieser Übergang in die offene Konformation löst die

Translokation der DNA aus.^[258, 278] Der hochkoordinierte Schritt der Translokation ist weiterhin zur Vermeidung sogenannter *frameshift*-Mutationen (Leserasterverschiebungen) wichtig.^[259] Mit diesen aufeinanderfolgenden Korrekturhürden ist es insbesondere den Polymerasen der A-Familie möglich, dass bei 10^4 bis 10^6 eingebauten Nukleotiden lediglich ein falsch insertiertes gefunden wird.^[274] Fehlpaarungen in den Positionen bis $n - 5$ führen zu Verzerrungen innerhalb der aktiven Tasche des Enzyms, wodurch es zur Hemmung der Prozessivität oder zu einer Abdissoziation kommen kann.^[279-280]

Dem Einbau und der anschließenden Translokation kommt gerade bei geschädigten DNA-Basen eine besondere Bedeutung zu.

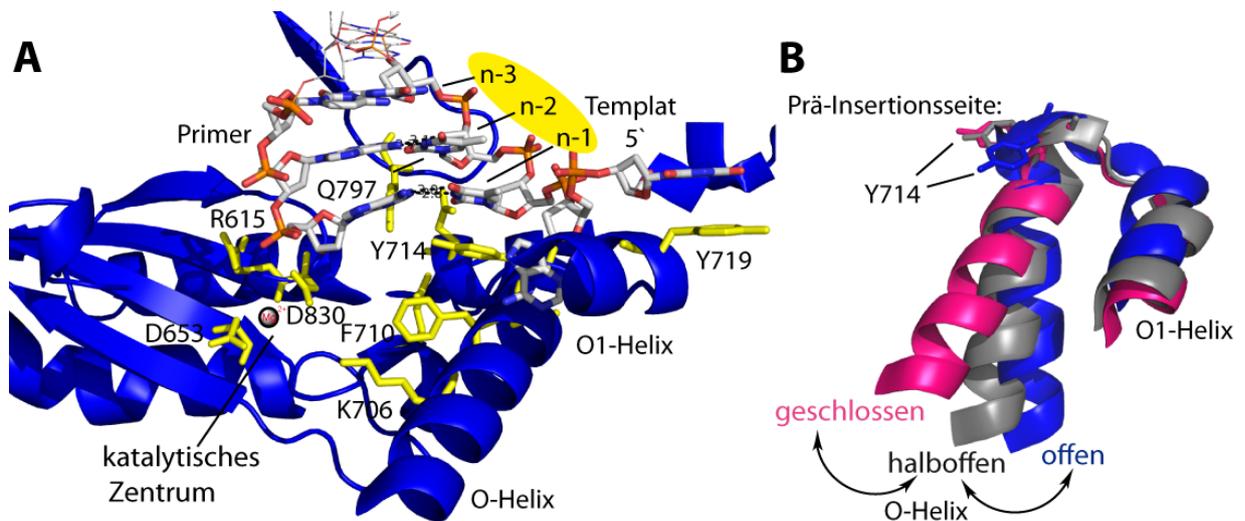


Abbildung 15: A) Aktives Zentrum der *GeoBst* Pol I mit der Templat-Primer-Helix (PDB code: 4BDP).^[254] B) Drei kristallographisch erhaltenen Positionen der O1-Helix in der Prä-Is: offen (PDB code 1L3U)^[259], halboffen (PDB code 3HP6)^[281] und geschlossen (PDB code 3EZ5).^[258, 265]

Oxidative Schäden sind aufgrund ihres veränderten Wasserstoffbrückenbindungsmusters in der Lage, den Einbau falscher Gegenbasen zu induzieren.

1.8.6 Die Familie der Y-Polymerasen

Ein Großteil der Polymerasen der Y-Familie wurden in einem kurzen Zeitraum von 1999 bis 2000 entdeckt und charakterisiert.^[231] Die Y-Familie unterteilt sich in fünf Unterfamilien:

- umuC und umuD bilden zusammen als Dimer Pol V; sie existieren nur in Prokaryoten.^[282-283]
- dinB Zweig Pol IV^[284] aus *E. coli*, Dbp/Dpo4 in Archebakterien sowie Pol κ als eukaryotischer Vertreter.^[285-286]
- Pol η .^[287]
- Rev 1.^[288]
- Pol ι .^[289]

Die Polymerasen der Y-Familie werden als *TLS* (*translesion synthesis*) Polymerasen bezeichnet. Pol η , Dbp und Dpo4 wie auch replikative Polymerasen zeigen die charakteristische Struktur einer rechten Hand.^[256] Zusätzlich besitzen sie eine PADomäne (*polymerase associated domain*), die auch als kleine Finger Domäne bezeichnet wird (Abbildung 16). Eine Exonukleaseaktivität fehlt sämtlichen Mitgliedern der Y-Familie (Pol ι besitzt eine 5'-Desoxyribosephospholyase Aktivität),^[290] wodurch ihre Fehlerrate im Bereich von 1 bis 10^{-3} liegt.^[249]

Abhängig von der Natur des zu replizierenden DNA-Schadens sind Pol η und Dpo4 in der Lage, große Addukt-Schäden oder die durch UV-Strahlung induzierten TT-*cis-syn*-Cyclobutanpyrimidindimere (**10** - Abbildung 4) fehlerfrei zu replizieren.^[291]

Die Krankheit Xeroderma Pigmentosum Variante (XPV) geht auf eine Mutation des Pol η kodierenden Gens zurück. Menschen leiden daher an einer Überempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung,^[292-296] was zu einer Lebenserwartung der Betroffenen von oftmals weniger als zehn Jahren führt.^[243, 297]

Das Dpo4 als Homolog aus den Archaea dient zu vergleichenden Studien für Pol η aufgrund ihres sehr ähnlichen Verhaltens beispielsweise gegenüber dem 8-oxodG.^[298]

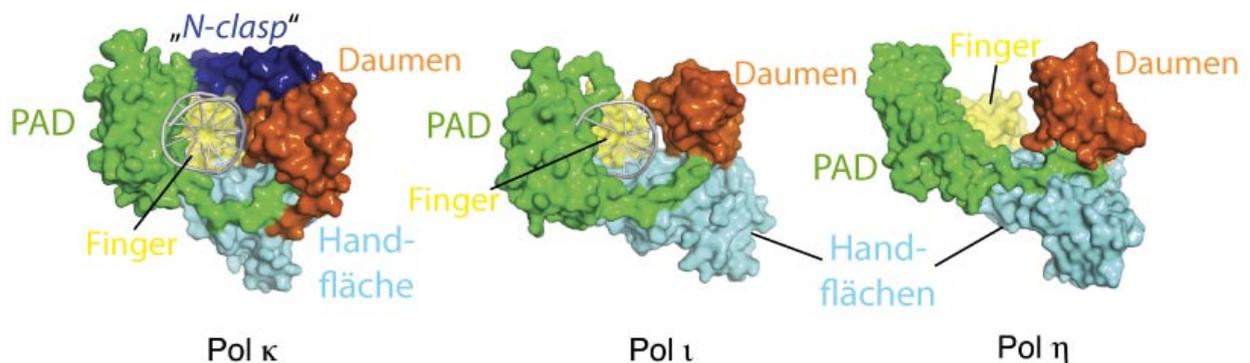


Abbildung 16: Polymerasen der Y-Familie mit ihren unterschiedlichen Domänen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Replikationsverhalten der Formamidopyrimidine mit humaner Pol κ , Pol η (*S. cerevisiae*) sowie humaner Pol ι bezüglich der Schäden untersucht.

Insgesamt existieren sowohl für Pol η , Pol κ und Pol ι Kristallstrukturen mit 8-oxodG im aktiven Zentrum der jeweiligen Polymerase.

Somit bildet der 8-oxodG Purinschaden den Ausgangspunkt für die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse mit den hier untersuchten Formamidopyrimidinen.

Pol η zeigt keine stabilisierenden Kontakte in der mutagenen *syn*-Konformation von 8-oxodG in ihrem aktiven Zentrum (Abbildung 17). Der Schaden nimmt eine *anti*-Konformation in der Insertionsstelle der Polymerase ein und repliziert anhand der von A. Aggarwall publizierte Daten den Schaden fehlerfrei durch Insertion von dCTP.^[240, 243-244] Während der Translokation

zur Post-Is (n-1) wird diese Konformation beibehalten. Die für die Y-Polymerasen charakteristische *PAD* Domäne liefert weitere über Wassermoleküle vermittelte Stabilisierungen durch die Aminosäure Asn400 und dem O8 des Schadens sowie direkt über Asn398.

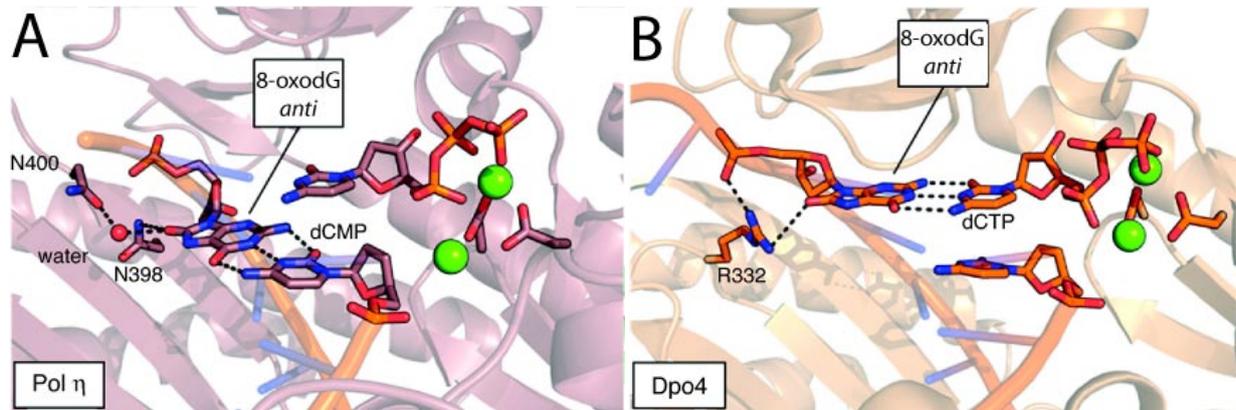


Abbildung 17: A) 8-oxodG in der n-1 Position von Pol η. Wie ungeschädigtes dG weichen die Torsionswinkel des Schadens von den Werten für normale B-DNA ab was eine Abstoßung des O8-Sauerstoffes mit dem Phosphatrückgrat vermeidet. B) Homologes Dpo4 repliziert das 8-oxodG ebenfalls in *anti*-Konformation.^[20]

Pol κ repliziert das 8-oxodG mit enormen Fehlerraten.^[299] Im Gegensatz zu Pol η und Dpo4 repliziert Pol κ das 8-oxodG ohne stabilisierende Kontakte in der Fehler induzierenden *syn*-Konformation. Hierfür wird das große aktive Zentrum der Polymerase verantwortlich gemacht, was die Ausbildung des *Hoogsteen*-Basenpaares mit dATP begünstigt (Abbildung 18).^[241]

Strukturelle Untersuchungen von Pol ι mit 8-oxodG zeigten, dass die Triphosphate der Purinbasen im aktiven Zentrum der Pol ι während des Replikationsvorganges analog dem 8-oxodG in *syn*-Konformation vorliegen. Die Pyrimidinbasen bzw. deren Triphosphate nehmen hingegen eine *anti*-Konformation ein. Somit bestimmt allein das relativ enge und sterisch sehr strikt definierte aktive Zentrum der Pol ι das Replikationsverhalten für 8-oxodG. Lediglich mit der Pyrimidinbase dC ist ein *syn* 8-oxodG in der Lage, ein stabiles *Hoogsteen* Basenpaar im aktiven Zentrum zu bilden, ohne eine zu hohe sterische Abstoßung (wie gegenüber dem ddATP) hervorzurufen (Abbildung 18).^[245]

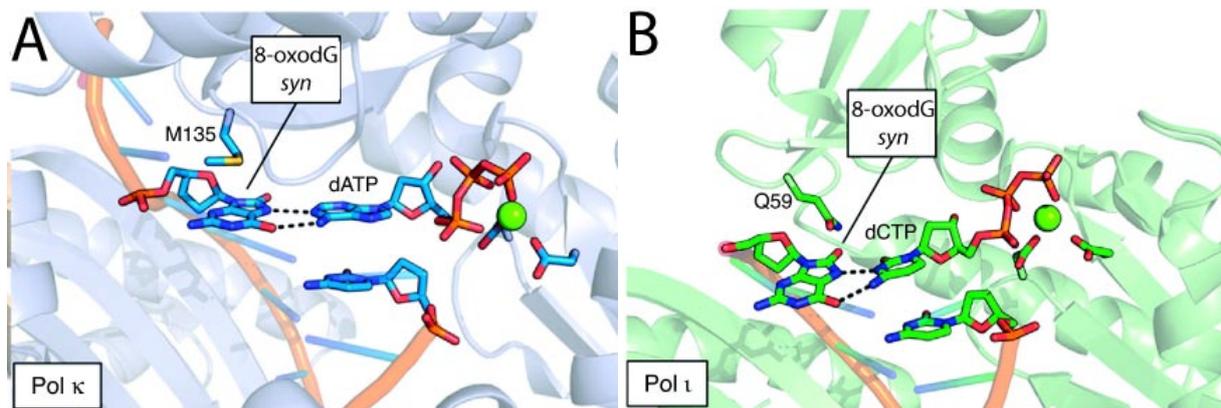


Abbildung 18: A) Struktur der fehlerhaften Replikation von 8-oxodG durch Pol κ . B) Fehlerfreie Replikation von 8-oxodG durch Pol ι . Das Gln59 der Fingerdomäne bildet hierbei spezifisch eine H-Brücke zum O8 der geschädigten Purinbase aus.^[20]

Insbesondere Studien mit mutierten Polymerasen der Y-Familie legen den Schluss nahe, dass die PADomäne der jeweiligen Y-Polymerase essentiell für die fehlerhafte oder fehlerfreie Replikation eines Schadens während der TLS ist.^[299]

Für detailliertere Diskussionen der Kristallstrukturen zu den Polymerasen der Y-Familie mit 8-oxodG sei an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen.^[20, 241, 245-246, 298]

1.9 Mutagenes Potential der Formamidopyrimidine *in vitro* und *in vivo*

Frühere Studien mit zufällig geschädigter DNA oder mittels N7-alkylierten Analoga schlugen Fehlpaarungen des FaPydA und Me-FaPydA mit dC vor. Dies setzt für ein attraktives Wasserstoffbrückenbindungsmuster eine *syn*-Konformation des Schadens voraus.^[89, 300]

Die ersten Arbeiten von *Greenberg* unter Verwendung synthetischer Template mit FaPydA und FaPydG (beide jeweils 3' von dA und 5' von dT flankiert) untersuchten den Einfluß auf das Replikationsverhalten durch das KF:

Die Studien zeigten einen fehlerfreien Einbau von dT und dC gegenüber FaPydA bzw. FaPydG.^[301-302] Im Vergleich zu ungeschädigten Oligonukleotiden verringerte sich die Inkorporationseffizienz (V_{max}/K_m) von dTTP gegenüber FaPydA um etwa 70 % im Vergleich zu ungeschädigter DNA.^[303] Gegenüber FaPydG war die Inkorporation von dCTP etwa 50 mal langsamer als gegenüber ungeschädigtem dG. Die Weiterreplikation über das dC:FaPydG Basenpaar war um das 80-fache langsamer als bei einem ungeschädigten dC:dG Basenpaar.^[302] Im Vergleich zu einer abasischen Stelle (12 - Abbildung 4) ist dieser die Replikation verlangsamende Effekt jedoch gering.^[304]

Bezüglich der Inkorporationsspezifität (F_{ins}) zeigte sich eine fünffache Erhöhung der Misinkorporation von dATP gegenüber FaPydA im Vergleich zum dA.^[303] Dies entspricht

einer Fehlinkorporationsrate von 2 %. Gegenüber dem FaPydG war der Fehleinbau von dATP signifikant höher. Hier fiel auf, dass F_{ins} von dem in 3'-Richtung benachbarten Nukleotid abhängig war: Die Inkorporationsrate von dATP betrug lediglich 1 %, wenn FaPydG von zwei dT Basen flankiert war.^[305] Für eine 5'-dT-FaPydG-dA Umgebung war F_{ins} um 5 % höher. Die Inkorporation von dATP war hier gegenüber der fehlerfreien dCTP Inkorporation nur um den Faktor 2 niedriger.^[302]

Detaillierte Primerverlängerungsstudien zeigten weiterhin, dass das β -C-FaPydG Analogon (Abbildung 13 - **40b**) der *Greenberg* Gruppe im Gegensatz zu natürlichen FaPydG (**17a/b**) keine nachweisbaren G \rightarrow T Transversionen in *E. coli* hervorruft. Die Inkorporationseffizienz von dATP durch KF^- war gegenüber dem β -C-FaPydG etwa 30 mal niedriger als gegenüber natürlichem FaPydG. Gegenüber dG inkorporierte KF^- das dATP etwa 30 mal weniger effizient als gegenüber β -C-FaPydG.^[169] Weiterhin ist die Replikation eines premutagenen dA: β -C-FaPydG Basenpaares gegenüber dem korrekten dC: β -C-FaPydG Basenpaar für KF^- deutlich seltener.

Untersuchungen bezüglich der Inkorporation von α/β -FaPydGTP **41a/b** (X = NH) und β -C-FaPydGTP **42b** (X = CH₂) durch KF^- zeigten, dass beide Triphosphate von KF^- als Substrat inkorporiert werden können.

Die Inkorporation von α/β -FaPydGTP durch KF^- war gegenüber dC etwa 1600 mal langsamer ($V_{\text{max}}/K_{\text{m}} = 1.2 \pm 0.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) im Vergleich zur Inkorporation von dGTP gegenüber dC ($V_{\text{max}}/K_{\text{m}} = 2.0 \pm 0.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).^[168] Gegenüber dA führten Messungen zu einer Inkorporation von α/β -FaPydGTP in einem von 250 Fällen ($V_{\text{max}}/K_{\text{m}} = 4.8 \pm 1.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).^[168]

Die Ergebnisse für die 5'-dT-FaPydG-dT Sequenz wurden durch *in vivo* Experimente mittels einer *Reap* (*restriction endonuclease and postlabeling*) Methode bestätigt.^[305-306] Die Replikationseffizienz für FaPydG war in vier unterschiedlichen Sequenzkontexten beständig um ein Drittel geringer als für das 8-oxodG.^[305] Das mutagene Potential des FaPydG überstieg das des 8-oxodG in keinem der vier unterschiedlichen Sequenzkontexte. Im Vergleich zu 8-oxodG, dessen G \rightarrow T Transversionsraten von 3.1 bis 9.8 % je nach Sequenz reichten, zeigt FaPydG keine höhere Rate als 2 % für eine G \rightarrow T Transversion.

Im Gegensatz dazu betrug das mutagene Potential des FaPydG in der 5'-dT-FaPydG-dT-3' Basensequenz 29.6 % für *simian COS 7* Zellen (Affennierenzellen). Die Sequenz 5'-dT-FaPydG-dA zeigte eine vierfach geringere Mutationsrate. Die erhaltenen Mutationsraten überstiegen für beide Sequenzen die des 8-oxodG um etwa 25 %.

Im Vergleich zeigten weder FaPydA noch 8-oxodA in *E. coli* oder in Säugerzellen ein mutagenes Potential.^[307] Sehr geringe A→C Transversionsraten (< 1 %) wurden nur in einer 5'-dT-Y-dA (Y = FaPydA/ 8-oxodA) Sequenz für beide Schäden festgestellt.^[307]

1.10 Replikation von oxidativen Schäden: *high-fidelity* oder *low-fidelity* Polymerase

In den Kapiteln 1.8.4 und 1.8.6 wurde gezeigt, dass je nach Polymerase unterschiedliche Strategien zur Replikation von DNA-Schäden existieren.^[20] Ein DNA-Schaden bewirkt eine Verlangsamung oder Inhibierung von *high-fidelity* Polymerasen. Dies gilt auch für die untersuchten Formamidopyrimidine. Sowohl FaPydA als auch FaPydG reduzieren die Replikationseffizienz von *high-fidelity* Polymerasen wie KF⁻ und *GeoBst* Pol I.^[3, 155, 158, 303] Neben der Art des Schadens und seinem Einfluß auf die Struktur der DNA, ist auch der jeweilige Sequenzkontext (d.h. welche Basen den Schaden umgeben) dafür verantwortlich, welche Polymerase den Schaden repliziert und ob dies fehlerhaft oder fehlerfrei gelingt.^[248] Aufgrund aktueller Studien werden für den Mechanismus der *TLS* zwei Modelle postuliert. Je nach Art des DNA-Schadens und der Phase des Zellzyklus läuft die *TLS* entweder nach dem *polymerase switching model* oder dem *gap filling model* ab.^[229, 231, 308]

Im *gap filling model* kommt es zu einer Abdissoziation u.a. der replizierenden Polymerase wobei die Fortsetzung der Replikation etwas weiter nach dem Schaden erneut beginnt. Die dadurch entstehenden Lücken (“gaps”), werden anschließend von *TLS* Polymerasen aufgefüllt.^[29]

Man geht heute davon aus, dass die reduzierte Replikationseffizienz einer *high-fidelity* Polymerase bei Bakterien eine sogenannte SOS-Antwort auslöst, die eine Rekrutierung von *TLS* Polymerasen zur Aufrechterhaltung des Zellzyklus zur Folge hat.

In den Eukaryoten wird die replikative Polymerase direkt durch eine spezialisierte *TLS*-Polymerase, meist aus der Familien der Y-Polymerasen, ersetzt (“*polymerase switch model*“).^[309] Sobald die prozessive *high-fidelity* Polymerase durch einen DNA-Schaden an der weiteren Replikation gehindert wird, wird eine *TLS*-Polymerase zu dem DNA-Schaden rekrutiert und die blockierte replikative DNA-Polymerase gegen die *TLS*-Polymerase ausgetauscht. Der Einbau während der *TLS* kann fehlerfrei oder fehlerhaft ablaufen, abhängig von der Art des Schadens, der beteiligten Polymerase und der den Schaden umgebenden DNA-Sequenz. Nach der Inkorporation eines Nukleotidtriphosphats gegenüber dem Schaden wird durch eine weitere *TLS*-Polymerase („*extender*“ - v.a. Pol ζ oder κ) der Primer um einige Nukleotide weiter verlängert.

Sind die durch den jeweiligen Schaden induzierten Verzerrungen der DNA repliziert, übernimmt eine replikative *high-fidelity* Polymerase erneut die DNA-Synthese.^[230-232, 310]

Ob und welche *low-fidelity* Polymerase im Fall der Formamidopyrimidine an die Stelle der replikativen Polymerase tritt, ist nach wie vor nicht geklärt. Aktuelle Forschungsergebnisse für den 8-oxodG Schaden weisen auf einen Ablauf nach einem der beiden oben beschriebenen Modelle *in vivo* hin.

1.11 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung des Replikationsverhaltens unterschiedlichster Polymerasen gegenüber bioisosterer Analoga der Formamidopyrimidine.

Hierzu sollte auf die in der Arbeitsgruppe *Carell* bereits entwickelten Synthesen für beide β -konfigurierte carbozyklischen Formamidopyrimidine zurückgegriffen werden.^[2-3]

Beide Schadensanaloga sollten anschließend an genau definierter Position in verschiedene Oligonukleotide inkorporiert werden, um verschiedenste Polymerasen und ihre Replikationsvermögen gegenüber den DNA-Schäden durch Primerverlängerungsstudien zu untersuchen. Hierfür konnte auf einen Assay zurückgegriffen werden, mit dem es möglich sein sollte, die Ergebnisse der Primerverlängerungsreaktionen auf Basis der Pyrosequenzierungstechnik quantitativ zu analysieren. Die erhaltenen Ergebnisse sollten parallel mittels Kristallisationsstudien verifiziert werden. Als geeignetes Modellenzym zur Aufklärung des Basenpaarungsverhaltens wurde die Polymerase I des *GeoBst* gewählt. Die Pol I ist aufgrund ihrer Fähigkeit, noch im Kristall sequenziell den Einbau einzelner Nukleotidtriphosphate zu katalysieren besonders geeignet, aufeinanderfolgende Stadien des Replikationsprozesses darzustellen. Somit sollte es möglich sein, die einzelnen Stadien des Replikationsprozesses sowohl für das β -cFaPydA als auch für β -cFaPydG auf atomarer Ebene aufzulösen. Insbesondere das namensgebende Strukturelement der Schäden, die Formamidgruppe und ihre Beteiligung an Wasserstoffbrückenbindungen, war hierbei von zentralem Interesse. Aus der Literatur waren bereits zahlreiche Kinetikstudien für Einnukleotid-Insertionen bekannt, die teilweise widersprüchliche Fehlinsertionen insbesondere gegenüber FaPydA gezeigt hatten. Aufgrund des hohen mutagenen Potentials des 8-oxodG Schadens bei der Replikation durch die *GeoBst* Pol I sollte weiterhin die Misinkorporation und anschließende Replikation aller vier Nukleotidtriphosphate gegenüber den beiden Formamiden untersucht werden. Aufgrund vorangegangener Studien, die einen Einbau von dATP gegenüber FaPydG gezeigt hatten, schien das Vorliegen einer *syn*-Konformation insbesondere für β -cFaPydG sehr wahrscheinlich. Die über die Pyrosequenzierungstechnik erhaltenen Daten aus Primerverlängerungsstudien sollten die Fehlkorporationsraten unterschiedlichster Polymerasen der A- und Y-Familie liefern. Gleichzeitig sollten die parallel durchgeführten Kristallisationsexperimente

die Ergebnisse der Primer Extensionen auf atomarer Ebene mit der Polymerase I des thermophilen Organismus *Geobacillus stearothermophilus* erklären.

2 Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

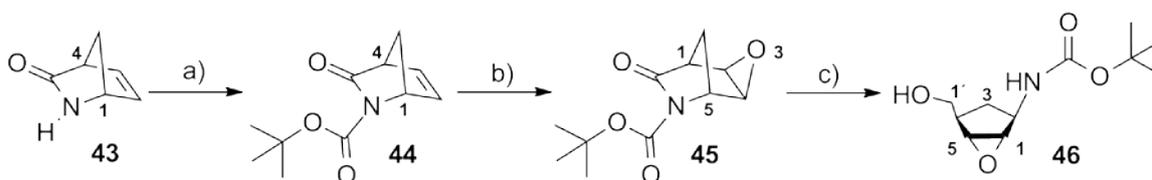
2.1 Synthese der carbozyklischen Analoga der Formamidopyrimidine

Im folgenden Abschnitt wird auf die Synthese des β -cFaPydA und β -cFaPydG eingegangen. Grundelement beider carbozyklischer Phosphoramiditbausteine war die Synthese eines Cyclopentan-Analogen der 2'-Desoxyribose, die erstmals von *Dominguez* und *Cullis* publiziert wurde.^[311] Für die Synthesen der carbozyklischen Nukleoside wurde weiterhin auf die Arbeiten von *Ober* (β -cFaPydG),^[3] *Müller* (β -cdG),^[156] und *Arnold* (β -cFaPydA)^[2] aus der Arbeitsgruppe *Carell* zurückgegriffen.^[2] Das Trityl-geschützte carbozyklische β -cFaPydA wurde in 15 Stufen, das Acetyl-geschützte carbozyklische β -cFaPydG in 14 Stufen erhalten.^[11c,13]

2.1.1 Synthese des carbozyklischen β -D-2'-Desoxycyclopentylamins 49/50

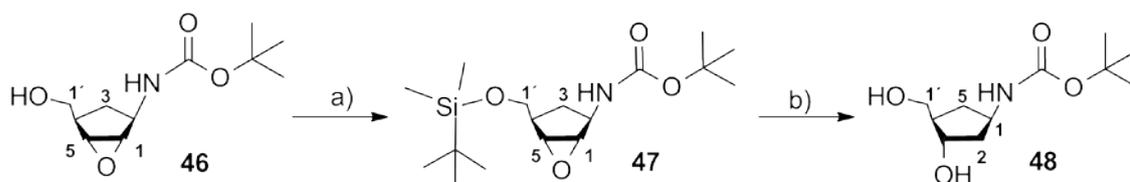
Ausgangssubstanz der Synthese bildete das kommerziell erhältliche enantiomerenreine Vince Lactam **43** (1*R*)-(-)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on, welches im ersten Schritt zum Boc-geschützten *tert*-Butyl-(1*R*,4*S*)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-carboxylat **44** umgesetzt wurde (Schema 7).

Die Boc-Schutzung des Lactams **43** mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O) in wasserfreiem THF garantierte eine quantitative Umsetzung zum Carbamat **44**.^[153, 312]



Schema 7: Synthese des Carbamats **46**. a) Boc_2O , DMAP, THF, RT, 4 h, 98 %. b) *m*CPBA, CH_2Cl_2 , RT, 48 h, 98 %. c) NaBH_4 , MeOH, 0 °C, 30 min, 94 %.

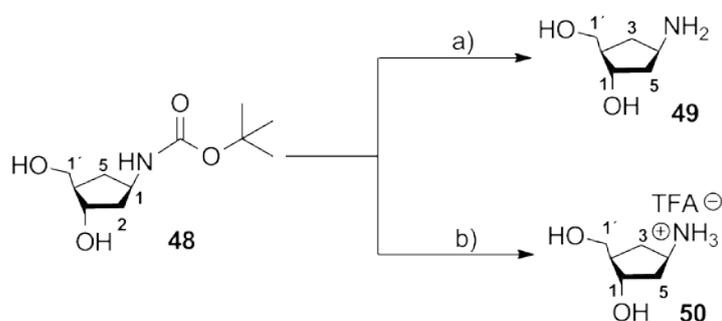
Die Verwendung der sterisch anspruchsvollen Boc-Schutzgruppe führte in der nachfolgenden Epoxidierung mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) nach mindestens 48 h ausschließlich zum gewünschten *exo*-Produkt **45**. Sowohl die dabei entstehende *meta*-Chlorbenzoesäure als auch überschüssige *m*CPBA waren durch Extrahieren und Säulenchromatographie weitestgehend entfernbar. Anschließend erfolgte eine reduktive Öffnung des Lactamringes der Verbindung **45** mit NaBH_4 . Die Hydroxygruppe des Epoxids **46** wurde erneut mit einer sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe versehen. Die TBS-Schutzgruppe führte in der nachfolgenden Reaktion zu einer regioselektiven Öffnung des Epoxids an Position 1 (Schema 8).^[313-314]



Schema 8: a) TBSCl, Imidazol, DMF, 25 °C, 3 h, 90 %. b) RedAl[®], Toluol, 25 °C, 3 h, 94 %.

Die Epoxidöffnung gelang unter reduktiven Bedingungen mit 2.0 Äquivalenten Natrium-*bis*-(2-methoxyethoxy)-aluminiumdihydrid (Red-Al[®]) in wasserfreiem Toluol bei Raumtemperatur. Weiterhin spaltet sich die TBS-Schutzgruppe ab.

Das Boc-entschützte Amin (**49**) diente als Schlüsselbaustein zur Kupplung mit dem Heterozyklus **54**. Die Entschützung der Boc-Gruppe von **48** konnte auf zwei verschiedene Arten erreicht werden. Zum einen thermisch, durch Erhitzen des Carbamats **48** in Wasser über Nacht. Das so erhaltene Amin **49** wurde aufgrund seiner Oxidationsempfindlichkeit sofort *in situ* mit einem Äquivalent Base und dem entsprechenden Heterozyklus weiter umgesetzt.

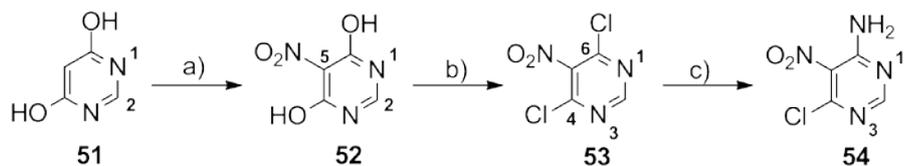


Schema 9: a) H₂O, 100 °C, 12 h, quant. b) TFA/H₂O (95:5), RT, 30 min, quant.

Die zweite, saure Entschützungsvariante, erfolgte mittels Trifluoressigsäure (TFA). Diese Entschützungsvariante lieferte das weitaus weniger oxidationsempfindliche Produkt **50**. Das Hydrotrifluoroacetat **50** des Cyclopentylamins musste mit sieben Äquivalenten Base weiter umgesetzt werden.

2.1.2 Synthese des β -cFapydA

Für die Synthese des β -cFaPydA ergab die saure Entschützung des Carbamats **48** und die weitere Umsetzung des Trifluoroacetat Salzes **50** mit dem Heterozyklus **54** die besten Ausbeuten. Der Pyrimidin-Heterozyklus wurde ausgehend vom 4,6-Dihydroxypyrimidin **51** in drei Stufen synthetisiert (Schema 10).^[2]



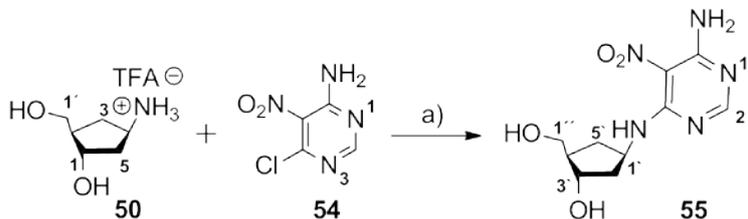
Schema 10: Synthese von des dreifach substituierten Pyrimidins **54**. a) HOAc/HNO₃, 15 - 20 °C, 30 min, 90 %. b) (COCl)₂, DMF, Rückfluss, 4 h, 67 %. c) NH₄OAc, Dioxan, 8 - 15°C, 90 min, 60 %.

Hierzu nitrierte man das kommerziell erhältliche 4,6-Dihydropyrimidin **51** zunächst mittels rauchender Salpetersäure in Eisessig an der C5-Position.^[315]

Die Chlorierung der Verbindung **52** erfolgte mittels Oxalylchlorid in DMF. Die aus der Literatur bekannten Chlorierungen mittels Phosphorylchlorid waren insbesondere für größere Ansätze (> 500 mg) sehr schlecht reproduzierbar.^[315-316]

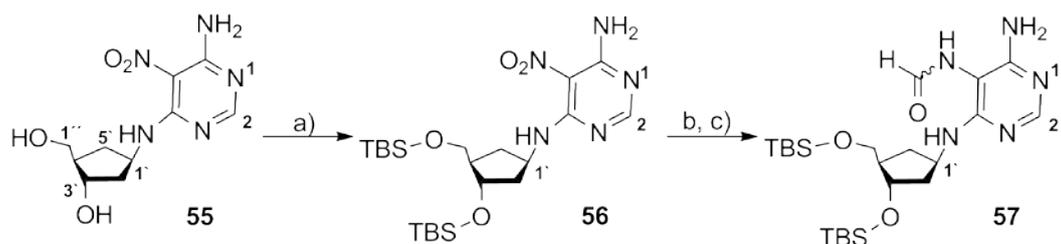
Der zweifach chlorierte Heterozyklus **53** wurde mit Ammoniumhydroxid in Dioxan bei 10 °C einfach aminiert und mittels Umkristallisation vom unlöslichen, zweifach aminierten Nebenprodukt abgetrennt.^[317]

Das Produkt **54** wurde in einer nukleophilen Substitutionsreaktion zusammen mit dem TFA Salz des vorher synthetisierten Cyclopentylamins (**50**) in Ausbeuten von über 80 % gekuppelt. Die Verwendung des freien Amins (**49**) ergab im Schnitt um 5-10 % geringere Ausbeuten, was auf die hohe Oxidationsempfindlichkeit des freien Amins (**49**) zurückzuführen war.



Schema 11: Kupplung des Cyclopentylammonium Salzes **50** mit dem Heterozyklus des Pyrimidinons (**54**). a) NEt₃, EtOH, Rückfluss, 1 h, 82 %.

Die nachfolgende Schützung der primären und sekundären Hydroxyfunktion von **55** mittels TBS-Schutzgruppen reduzierte die Polarität der Substanz **56** und machte somit ihre weitere Umsetzung in weniger polaren Lösemitteln möglich (Schema 12).



Schema 12: a) TBSCl, DMF, Imidazol, 25 °C, 3 h, 75 %. b) Pd/C, H₂, EtOH, 25 °C, 12 h. c) Formylacetanhydrid, Pyridin, THF, 25 °C, 12 h, 75 % über zwei Schritte.

Die Reduktion der Nitrogruppe mittels Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre erfolgte in trockenem Ethanol quantitativ. Das so erhaltene Amin war gegenüber Luftsauerstoff so instabil, dass es mit dem gemischten Formylacetanhydrid *in situ* weiter zum Formamid umgesetzt wurde.^[303] Aufgrund des dirigierenden Effekts der beiden Ringstickstoffe N1 und N3 erfolgte die Formylierung ausschließlich am N5H₂.^[132]

Weiterhin gelang es, **56** aus *n*-Heptan auszukristallisieren und die β -Konfiguration des Heterozyklus zu beweisen (Abbildung 19). Die kristallographische Untersuchung lieferte eine dimere Struktur des Moleküls mit jeweils zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem N1 des Pyrimidinringes und den Wasserstoffatomen der Aminogruppe N6H₂.

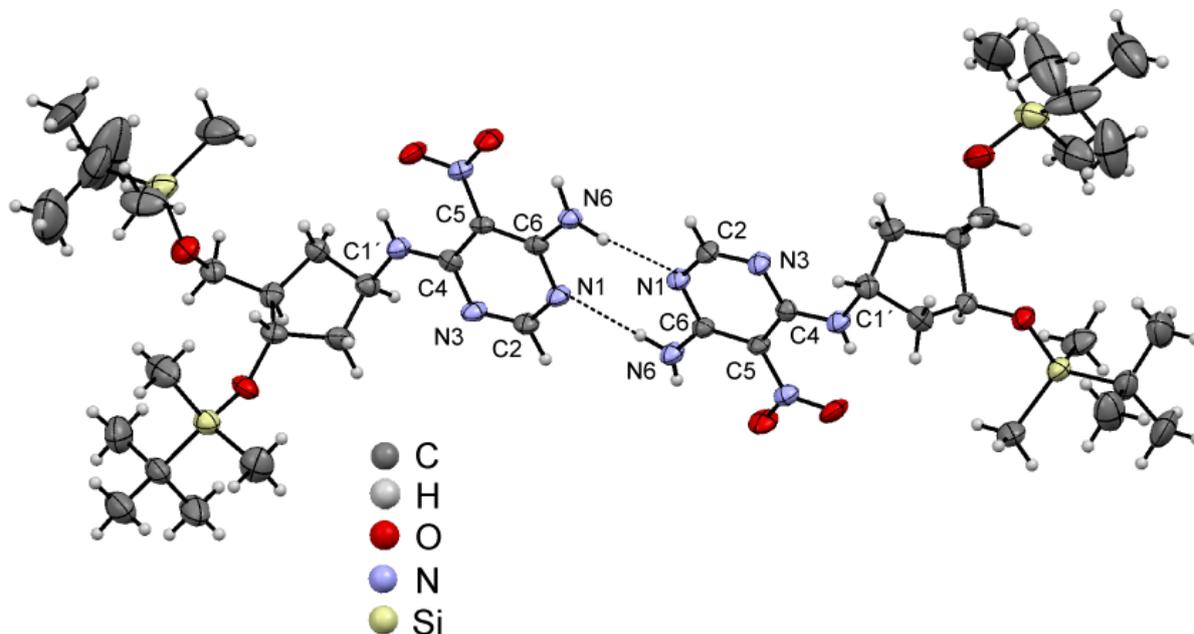
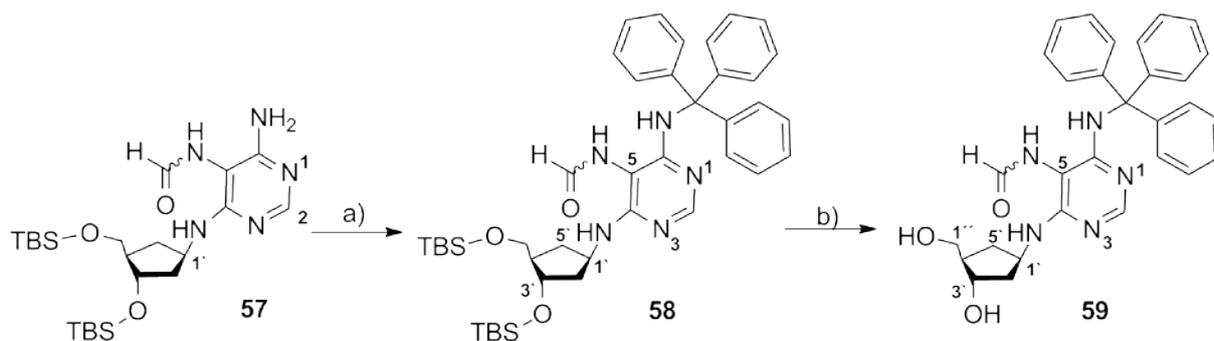


Abbildung 19: Struktur der dimeren Verbindung **56** innerhalb der Elementarzelle. Die beiden Wasserstoffbrücken befinden sich jeweils zwischen N1 und N6H₂. Die Substanz kristallisierte in farblose Plättchen in der Raumgruppe P2₁.

Die kristallographische Untersuchung zeigt zwei unabhängige Moleküle in der asymmetrischen Einheit, die über zwei Wasserstoffbrückenbindungen dimerisieren. Beide Moleküle sind symmetrieunabhängig und weisen eine unterschiedliche Konformation auf. Die

Wasserstoffbrücken werden jeweils zwischen einem Stickstoffatom des Pyrimidinringes (N1) und einem Wasserstoffatom der N6H₂-Aminogruppe ausgebildet.

Die Schützung der N6-Position erfolgte anschließend mit Triphenylmethylchlorid (TrCl) in Pyridin. Die Verwendung der für diese Position ungewöhnlichen Tritylschutzgruppe war aufgrund der Instabilität der Formamidgruppe gegenüber den Anhydriden anderer basenlabiler Schutzgruppen nötig.



Schema 13: Entschützung der 1''/3'-Positionen und Schützung des N6-Stickstoffes für die Oligonukleotidsynthese. **a)** TrCl, DIPEA, CH₂Cl₂, 75 %. **b)** HF-Pyridin, Pyridin, THF, RT, 12 h, 57 %.

Die säurelabile Tritylschutzgruppe überstand die saure DMT-Entschützung der DNA-Syntheszyklen und verhinderte so ein Weiterreagieren der N6-Position zu unerwünschten Nebenprodukten während der DNA-Synthese. Die Entschützung der 3'- und 1''-Hydroxy-Funktionen erfolgte unter milden Bedingungen mittels eines HF-Pyridin-Komplexes.

Kristallographisch verwertbare Kristalle der Verbindung **59** wurden nicht zuletzt aufgrund der großen Tritylschutzgruppe am N6-Stickstoff aus Acetonitril erhalten.^[318] Somit war es möglich, die Konformation der Formamidgruppe eines carbozyklischen Nucleosids mittels einer Röntgenstruktur im Festkörper zu untersuchen. Die erhaltene Struktur zeigte zwei Moleküle innerhalb der Elementarzelle (Abbildung 20) mit jeweils zwei unterschiedlichen *cis* zu *trans* Verhältnissen der beiden Formamidprotonen. Die obere Struktur A nimmt ausschließlich die *cis*-Konformation ein. In der unteren Struktur B liegt ein *cis* zu *trans* Gemisch beider Formamide von 68:32 vor. Die Röntgenstruktur der Verbindung **59** zeigte weiterhin, dass die Formamidgruppe aus sterischen Gründen orthogonal zum Pyrimidinring steht.^[3]

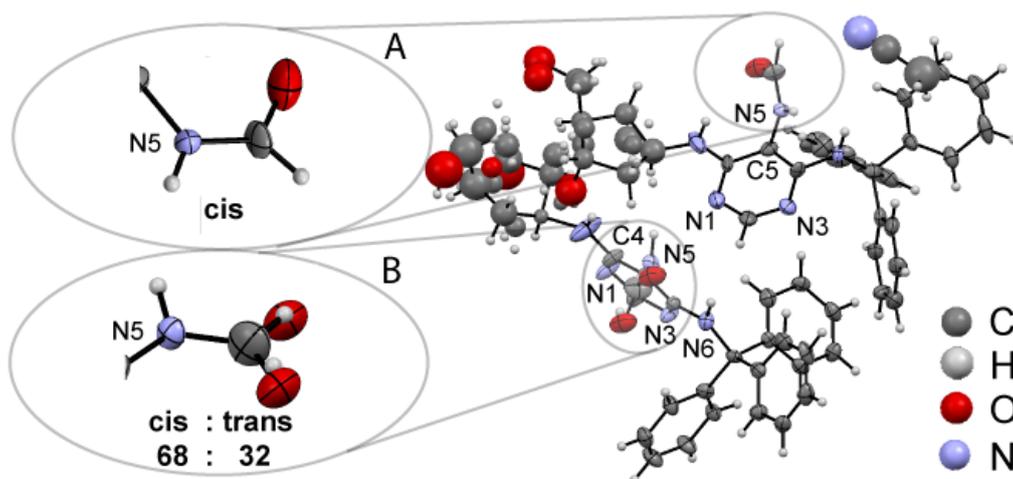
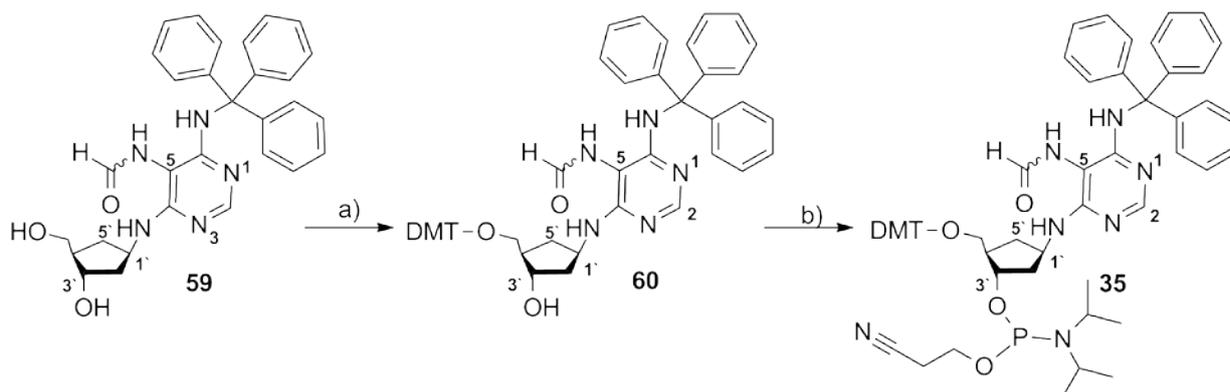


Abbildung 20: Struktur der dimeren Verbindung **59** innerhalb der Elementarzelle. Vergrößert sind die beiden unterschiedlichen Konformationen der Formamidgruppe in A und B. Die farblosen Kristalle von **59** gehören zur Raumgruppe $P2_1/c$.

Die abschließende Funktionalisierung der 1''-Hydroxygruppe mittels 4,4'-Dimethoxytritylchlorid für die DNA-Synthese war unter Standardbedingungen möglich.



Schema 14: a) DMTCl, Pyridin, DMAP, 0 - 25°C, 19 h, 73 %. b) P[N(*i*Pr)₂]₂OCH₂CH₂CN, Bis(diisopropyl-amino)tetrazolid, CH₂Cl₂, 25°C, 2 h, 76 %.

Unter Standardbedingungen gelang ebenso die abschließende Funktionalisierung der 3'-Hydroxy-Funktion zum Phosphoramidit **35** mittels 3-(Bis(Diisopropylamino)phosphanoxy)-propansnitril (für detaillierte Synthesebedingungen vgl. Experimentaltteil).^[319]

2.1.3 *cis/trans* Konformation des β -cFaPydA

Für die beiden unterschiedlichen Konformere der Formamidgruppe wird an dieser Stelle die nach wie vor in der Literatur gebräuchliche *cis/trans* Notation bezüglich der Formamidprotonen verwendet. Dies lässt eine bessere Vergleichbarkeit mit den Daten der Literatur zu. Dennoch soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die E/Z

Deskriptoren insbesondere bei Me-FaPydA/dG oder anderweitig substituierten Verbindungen am C5N zu bevorzugen ist.

Die Formamidgruppe kann in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen (siehe Abbildung 21). Untersuchungen am natürlichen FaPydG sowie am carbozyklischen cFaPydG ergaben eine Rotationsbarriere von $17.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ (72.9 kJ mol^{-1}) für natürliches FaPydG,^[136] sowie $17.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ (71.1 kJ mol^{-1}) für das β -cFaPydG.^[31] Somit sind in beiden Verbindungen die Konformere bei Raumtemperatur nicht voneinander trennbar.^[320] Frühere Arbeiten hatten für β -cFaPydA ebenfalls eine freie Rotation der Formamidgruppe bei Raumtemperatur ergeben.^[2]

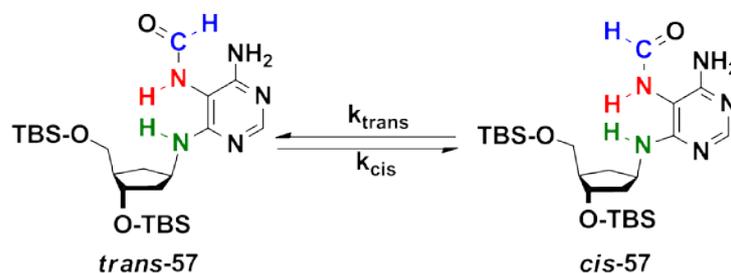
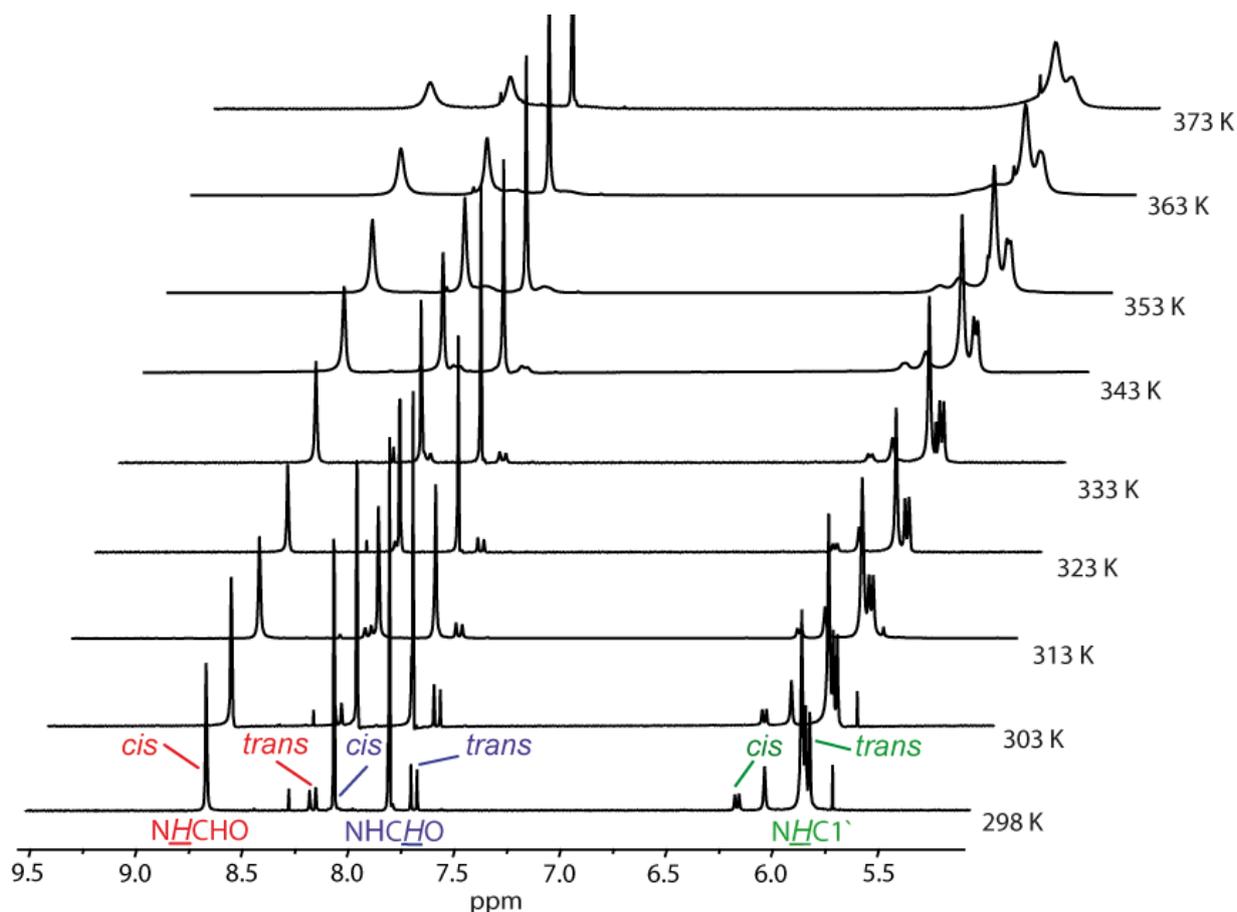


Abbildung 21: Rotamere des β -cFaPydA (**57**).

Die bereits aus der Röntgenstruktur von Verbindung **59** erhaltenen Daten für die Formamidgruppe wurden durch die temperaturabhängige Analyse der Rotationsbarriere ergänzt. Die Berechnungen ergaben für die Rotationsbarriere der Formamidgruppe in DMSO einen Wert von $71.7 \pm 2.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ (vgl. hierzu auch Anhang A6).^[320] Dieser Wert stimmt mit dem von *Cadet et al.* gefundenen Wert von $75.5 (\pm 1.1) \text{ kJ mol}^{-1}$ für das 4,6-Diamino-5-formamido-pyrimidin überein.^[321-322] Somit besitzen sowohl β -cFaPydA als auch β -cFaPydG identische Rotationsbarrieren bezüglich ihrer Formamidgruppen. Weiterhin beobachtet man, dass das *cis*- zu *trans*- Gleichgewicht bei β -cFaPydA analog zu β -cFaPydG von der Polarität des verwendeten Lösemittels abhängig ist. Das Verhältnis von *cis*- zu *trans*-Formamid betrug in DMSO 3:1, in CDCl_3 1:1



Schema 15: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, DMSO-D_6) der Verbindung **57** bei verschiedenen Temperaturen. Die Protonen der Formamidgruppe wurden rot bzw. blau markiert. Die Protonen des NHC1' sind grün markiert.

In CDCl_3 sind die chemischen Verschiebungen der *trans*-Formamidprotonen umgekehrt. Ihre chemischen Verschiebungen liegen für das *trans*- NHCHO Proton bei = 7.94 ppm, das *trans*- NHCHO Proton erscheint bei 7.13 ppm. Enzymatische Verdaustudien zu β -cFaPydA zeigten weiterhin einen verbreiterten Peak, der den beiden nicht voneinander trennbaren Rotameren des Nucleosids **62** zugeordnet werden konnte (vgl. hierzu Abbildung 51).⁶ Dasselbe Verhalten wurde für das α/β -cFaPydG beobachtet.^[3, 154]

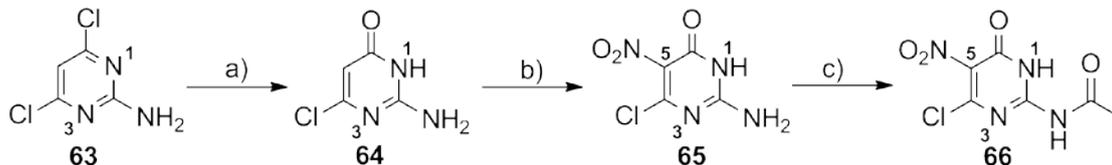
Die freie Rotation der Formamidgruppe in Lösung und die orthogonale Stellung zur Ebene des Pyrimidinringes im Festkörper lassen vermuten, dass diese funktionelle Gruppe keine alternativen Wasserstoffbrückenbindungen in der DNA ausbilden kann insofern auch dieses Verhalten in Wasser auftritt. In jedem Fall setzt die Beteiligung der Formamidgruppe an der Basenpaarung eine *syn*-Konformation des Heterozyklus bezüglich der glykosidischen Bindung voraus. Theoretische Berechnungen zum natürlichen als auch carbozyklischen FaPydG zeigen jedoch, dass die *anti*-Konformation energetisch um 6 kcal mol⁻¹ favorisiert ist.^[3, 158]

⁶ Die beiden Konformere des Me-FaPydA und Me-FaPydG sind im Gegensatz hierzu mittels HPLC-Chromatographie voneinander trennbar.

2.2 Synthese des β -cFapydG

2.2.1 Synthese des Pyrimidinons **66**

Zur Synthese des Pyrimidinons (**66**) wurde kommerziell erhältliches 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin (**63**) eine Stunde in 1 M Natronlauge unter Rückfluss erhitzt, wodurch man das Produkt **64** erhielt (Schema 16).

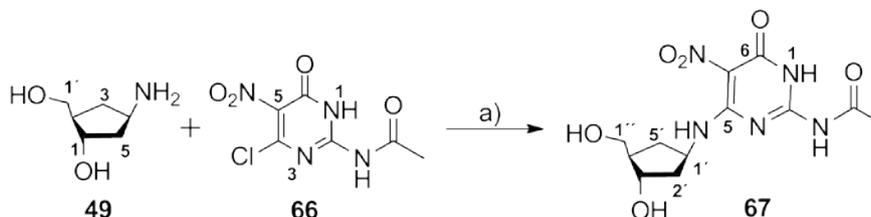


Schema 16: Synthese des Pyrimidinons **66**: a) 1M NaOH (aq.), 120 °C, 1 h, 90 %. b) HNO₃·NO₂, H₂SO₄, 0 °C, 5 min, 86 %. c) Ac₂O, H₂SO₄(kat.), 90 °C, 1 h. 56 %.

Die Nitrierung von 2-Amino-4-chlor-1H-pyrimidin-6-on (**64**) in 5-Position erfolgte bei 0 °C in konzentrierter Schwefelsäure unter Zugabe rauchender Salpetersäure. Die Acetylierung des Nitropyrimidinons (**65**) an der N2-Position erfolgte unter Verwendung katalytischer Mengen konz. Schwefelsäure in Acetanhydrid. Nach einer Reaktionszeit von 1 h bei 90 °C konnte die Substanz **66** durch langsames Auskristallisieren aus Essigsäureanhydrid erhalten werden. Die Acetylierung des Pyrimidinons erhöhte dabei die Löslichkeit.

2.2.2 Synthese β -cFapydG Phosphoramiditbausteins **34b**

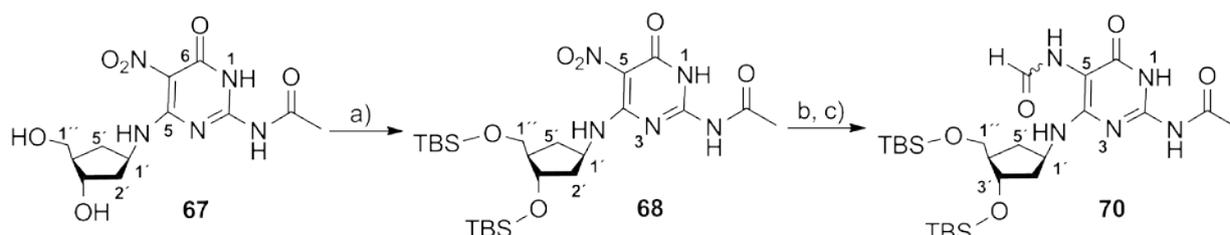
Die Kupplung des Pyrimidinonderivats (**66**) mit dem freien Cyclopentylamin (**49**) ergab die höchsten Ausbeuten im Vergleich zu **50**. Hierzu wurde **49** in trockenem DMF zusammen mit einem Äquivalent Diisopropylethylamin (DIPEA) vorgelegt und an das vinyloge Carbonsäurechlorid des 2-Acetylamin-6-chlor-5-nitro-3H-pyrimidin-4-on (**66**) in einer Additions-Eliminierungsreaktion gekuppelt (Schema 17). Nach der Reaktion wurde die polare Substanz aus einem *iso*-Hexan/Dichlormethan Gemisch ausgefällt.^[3]



Schema 17: Kupplung des Cyclopentylamins **49** mit dem Pyrimidinon **66**. a) DIPEA, EtOH, 90 °C, 1 h, 82 %.

Versuche, die Ausbeute mit Hilfe des stabileren Hydrotrifluoroacetats (**50**) des Cyclopentylamins zu steigern, waren nicht erfolgreich. Die Ausbeuten der Kupplung von **50** mit **66** lagen jeweils unter 80 %.

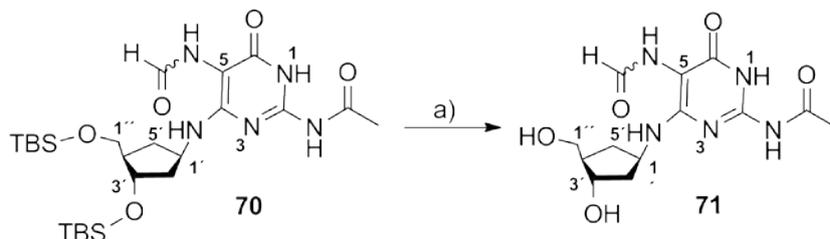
Die Schützung der primären und sekundären Hydroxygruppe der Verbindung **67** mit TBSCl erfolgte unter Standardbedingungen. Nach der Umsetzung ließ sich das Produkt einfach säulenchromatographisch aufreinigen.



Schema 18: Synthese des Formamides **70** aus **67**. **a)** TBSCl, Imidazol, DMF, 25 °C, 3 h, 75 %. **b)** Pd/C, H₂, EtOH, 25 °C, 12 h. **c)** Ameisensäure, EDC, DIPEA, DMF, 25 °C, 48 h, 75 % über zwei Schritte.

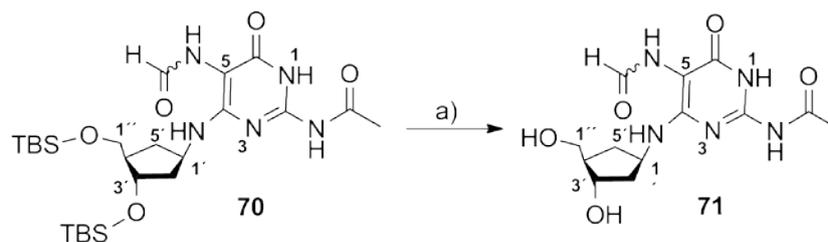
Die Reduktion der Nitrogruppe zum freien Amin erfolgte in einer Wasserstoffatmosphäre analog wie bei β -cFaPydA über Nacht. Die Formylierung des oxidationsempfindlichen freienamins zum Formamid wurde durch Umsetzung mit Ameisensäure und EDC in moderaten Ausbeuten erreicht.

Die TBDMS-Schutzgruppen wurden mittels HF in Pyridin in Ethylacetat abgespalten, wobei Verbindung **71** ausfiel (Schema 19).



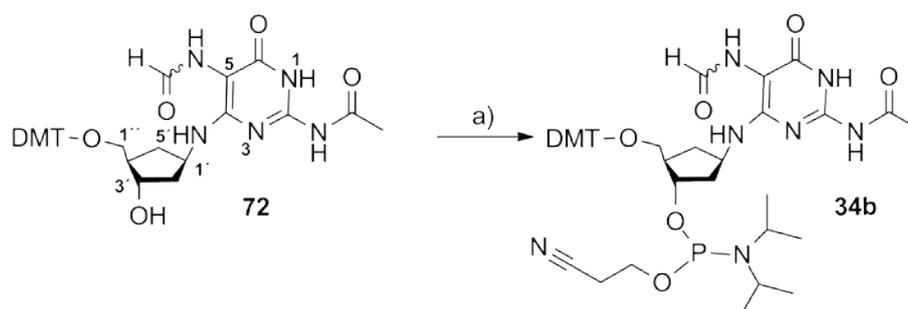
Schema 19: Entschützung von **70**. **a)** HF·Pyridin, Pyridin, THF, RT, 12 h, 90 %.

Der primäre Alkohol wurde für die DNA-Synthese mit DMTCl an der 1''-Position geschützt wodurch man Verbindung **72** erhielt (Schema 20).



Schema 20: DMT-Schätzung der 1''-Position von **71**. a) HF·Pyridin, Pyridin, THF, RT, 12 h, 90 %.

Das Phosphoramidit **34b** wurde schließlich durch Reaktion mit 2-(Bis(diisopropylamino)phosphanoxy)propan-nitril in Gegenwart von Diisopropylammoniumtetrazolid synthetisiert (Schema 21).



Schema 21: Finaler Syntheseschritt zum Phosphoramidit **34b**. a) P[N(iPr)₂]O(CH₂)₂CN, DIPEA, CH₂Cl₂, 0 °C, 18 h, 68 %.

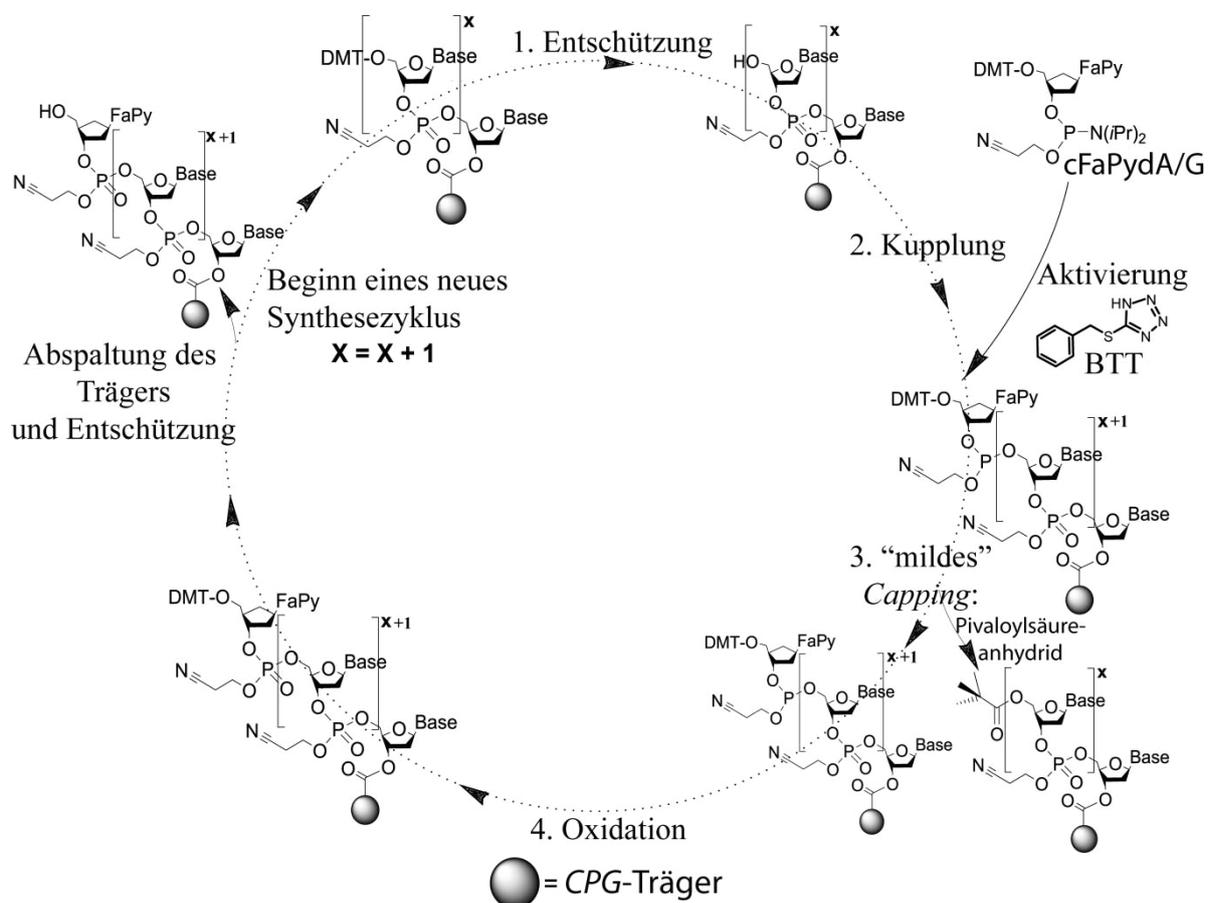
2.3 Oligonukleotidsynthese

Nachdem die Phosphoramidit Bausteine **35** und **34b** der carbozyklischen Formamidopyrimidine synthetisiert worden waren, konnten die Schadensanaloga gezielt in DNA eingebaut werden. Für nachfolgende Replikations-, Reparatur- und insbesondere Kristallisationsstudien war die Herstellung sehr reiner Oligonukleotide in ausreichender Menge notwendig. Der Einbau beider Modifikationen erfolgte mittels automatisierter DNA-Festphasensynthese.^[2-3, 129] Für die Synthese der Oligonukleotide mussten von den Standardsynthesebedingungen abweichende Protokolle sowie Phosphoramidite der Standardbasen mit Ultramild Schutzgruppen verwendet werden (Schema 22).

Ein Synthesezyklus für die Inkorporation eines carbozyklischen Formamids beginnt mit der Aktivierung der 5'-OH Gruppe durch Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppe vom letzten inkorporierten Nukleotid. Das dabei abgespaltene 4,4'-Dimethoxytritylkation dient mit seiner intensiven roten Farbe als Indikator für die Effizienz der vorherigen Kupplung. Anschließend erfolgt die Kupplung des Phosphoramidites des carbozyklischen Formamidopyrimidins. Sowohl für β -cFaPydA als auch für β -cFaPydG mussten die Kupplungszeiten gegenüber den nichtmodifizierten Phosphoramiditen auf 14 min (β -cFaPydA - **35**) und 10 min (β -cFaPydG – **34b**) verlängert werden (Doppelkupplung). Eine weitere Verlängerung der jeweiligen

Kupplungszeit brachte keine Verbesserung der Ausbeute. Als Aktivator für die Synthesen wurde Benzylthiotetrazol (BTT - Schema 22) eingesetzt.^[156, 323]

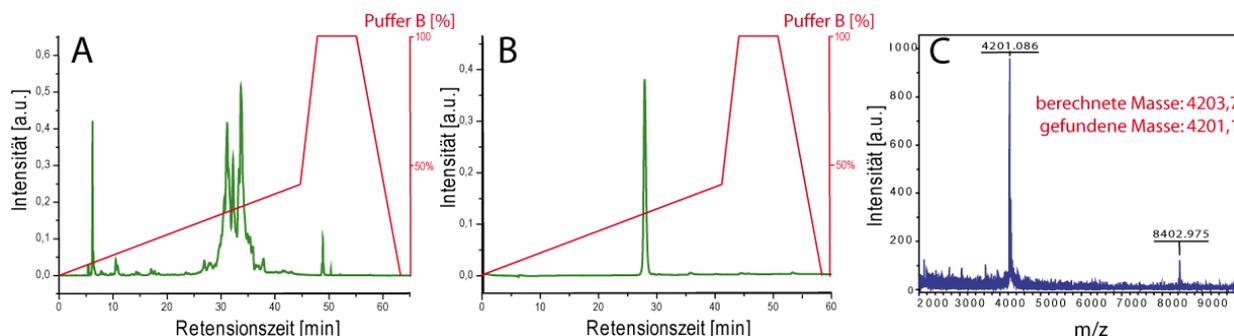
Im nachfolgenden Schritt, dem sog. „capping“, werden alle nicht abreagierten 5'-OH-Gruppen durch eine Veresterung für nachfolgende Kupplungen inaktiviert. Das im Regelfall hierfür verwendete Essigsäure- bzw. Phenoxyessigsäureanhydrid kann für die Formamide hierbei nicht genutzt werden, da es zu einer Transamidierungsreaktion mit der Formamidgruppe kommt.^[120, 131] Stattdessen wurde Pivaloysäureanhydrid als „mildes“ Cappingreagenz eingesetzt. Das Cappingreagenz musste ab der Inkorporation des ersten Formamids durchgehend verwendet werden.



Schema 22: Darstellung des modifizierten DNA-Synthesezyklus für β -cFaPydG (**34b**) und β -cFaPydA (**35**).^[2-3]

Der vierte Schritt der Oligonukleotidsynthese beinhaltet die Oxidation des dreiwertigen Phosphors mit Iod. Im Falle des β -cFaPydA wurde die letzte DMT-Schutzgruppe stets abgespalten, da die Tritylschutzgruppe am N6-Stickstoff der Modifikation **35** eine vereinfachte Aufreinigung mittels HPLC erlaubte. Für β -cFaPydG wurde ab einer Oligonukleotidlänge von ca. 15 Basen die DMT-Schutzgruppe für eine vereinfachte Aufreinigung am Oligonukleotid belassen (DMT-on Reinigung). Die basische Abspaltung von Schutzgruppen und der

Oligonukleotide vom CPG-Träger erfolgte bei maximal 18°C über Nacht mit Ammoniumhydroxid. Anschließend erfolgten eine chromatographische Aufreinigung mittels HPLC sowie eine massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF (Schema 23).



Schema 23: Aufreinigung und Analytik nach der DNA-Synthese (am Beispiel von **ODNFaPydG2**). **A)** Analytisches HPLC-Chromatogramm der Rohprodukte nach der DNA-Synthese. **B)** analytisches HPLC-Chromatogramm nach der präparativen Aufreinigung des Rohproduktes. **C)** MALDI-Spektrum mit Masse des Produktstranges.

Eine Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten bzw. verwendeten Oligonukleotide (ODN) und deren jeweilige Modifikationen, Massen und Retentionszeiten befindet sich im Anhang (vgl. Tabelle 19).

2.4 Verdaustudien zu β -cFaPydA

Der korrekte Einbau modifizierter Nukleotide in die synthetischen Oligonukleotide kann durch LC-MS-Experimente nachgewiesen werden.

Der zu untersuchende DNA-Strang **ODNFaPydA6** wurde durch drei unterschiedliche Enzyme (Nuklease S1, Antarctic Phosphatase, *snake venom* Phosphodiesterase) verdaut und die Nucleoside wurden danach chromatographisch aufgetrennt. Im Anschluss wurden die einzelnen Fraktionen der kanonischen Nucleoside, sowie die inkorporierte Modifikation massenspektrometrisch analysiert. Das β -cFaPydA Nucleosid **62** wurde als Referenzverbindung coeluiert. Unter denselben Bedingungen wurde ein DNA-Strang mit gleicher Basensequenz jedoch mit dA anstelle von β -cFaPydA verdaut und analysiert (Abbildung 51). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass β -cFaPydA durch die DNA-Synthese unmodifiziert inkorporiert wurde.^[2]

Der korrekte Einbau von β -cFaPydG wurde von *Ober* bereits mittels Verdaustudien gezeigt.^[3]

2.5 Einzel-Nukleotid Insertionen und Primer Verlängerungsstudien

2.5.1 Ergebnisse der Primer Extension Studien von β -cFaPydA mit Klenow exo^-

Frühere Untersuchungsergebnisse zur Kinetik der Insertionen einzelner Nukleotidtriphosphate gegenüber dem FaPydA bzw. bioisosterer Analoga durch *Greenberg* und *Carell* unterscheiden sich nur in geringem Maße: KF^- baut hauptsächlich dTTP gegenüber FaPydA ein. Weiterhin konnten erhöhte Inkorporationsraten von dATP gegenüber natürlichem FaPydA (*Greenberg*) und dATP bzw. dGTP gegenüber β -cFaPydA ($dTTP > dGTP \approx dATP > dCTP$ - *S. Arnold*, Arbeitsgruppe *Carell*) gemessen werden.^[2, 303]

Da die Insertionskinetiken der einzelnen Triphosphate gegenüber β -cFaPydA bereits bekannt waren, ergab sich nun die Frage, welche Fehlpaarungen durch KF^- repliziert werden können. Somit sollte in den folgenden Experimenten geklärt werden, ob die zu untersuchende Polymerase in der Lage ist, bei Anwesenheit aller vier Triphosphate eine eventuelle Fehlpaarung des β -cFaPydA zu verlängern^[169] bzw. welche entstandene Fehlpaarung zu einem Stopp der Polymeraseaktivität führen.

In einem ersten Experiment wurde **ODNFaPydA9** mit einem 16 Basen langen 5'-Fluoresceinmarkierten Primer hybridisiert und anschließend mit KF^- sowie mit jeweils einem dNTP für 10 min inkubiert (Abbildung 22). Hierbei diente ein ungeschädigter Strang mit dA zur Kontrolle.

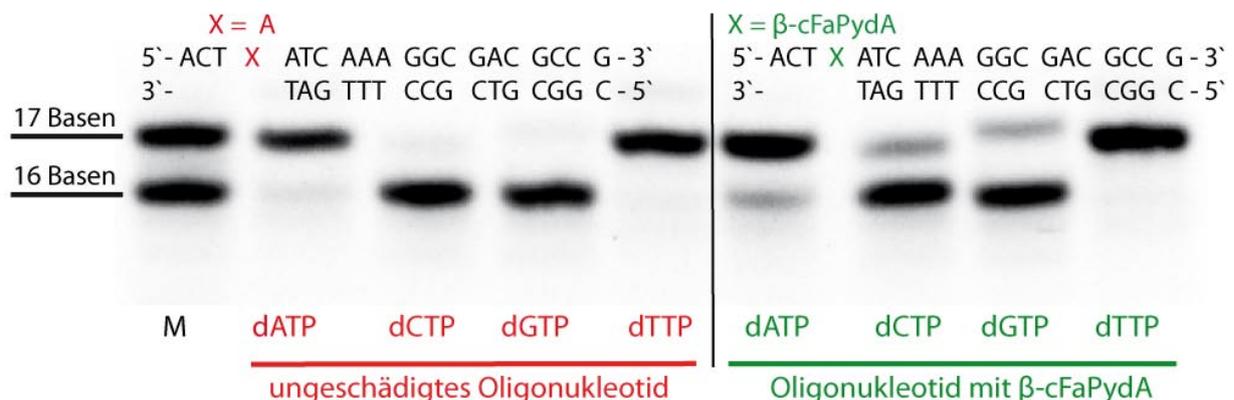


Abbildung 22: Einzelnukleotid Insertionen von ungeschädigtem (rot) und geschädigtem (grün) Oligonukleotiden (**ODNFaPydA9**) mit KF^- . Die Verlängerungsreaktionen wurden mit Fluoresceinmarkierten Primersträngen durchgeführt und durch denaturierender PAGE getrennt. M = Marker

Die Auswertung erfolgte, nachdem die jeweiligen Oligonukleotide durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt worden waren. Die qualitativen Ergebnisse bestätigen die von *Arnold* durchgeführten Kinetikmessungen für den hauptsächlichsten Einbau von dTTP gegenüber β -cFaPydA. Jedoch zeigen sich Unterschiede im Vergleich zu den Einbauraten von dATP und dGTP. Ein Einbau von dATP ist fast genauso gut

Hauptteil mit Ergebnissen

möglich wie von dTTP, der Einbau von dGTP und dCTP ist vergleichbar, wenn auch deutlich geringer ($dTTP \approx dATP > dGTP \approx dCTP$).

Auch beim Teststrang mit ungeschädigtem dA zeigte sich eine vollständige Inkorporation von dTTP und dATP gegenüber dA. Dieses Verhalten erklärt *Greenbergs* Ergebnis der hohen Inkorporationseffizienz von dATP gegenüber FaPydA durch KF.^[324] Da keine weitere dATP-Inkorporation gegenüber dem nachfolgenden dT des Templatstranges stattfand, ist davon auszugehen, dass KF die erhaltenen Fehlpaarungen nicht weiter replizieren kann. Um die Replikation des β -cFaPydA durch KF zu untersuchen, wurde anstatt des dTTP, ddTTP verwendet. Somit kann gezeigt werden, welches Triphosphat bevorzugt eingebaut wird, bzw. ob eine Fehlpaarung weiter verlängert wird.

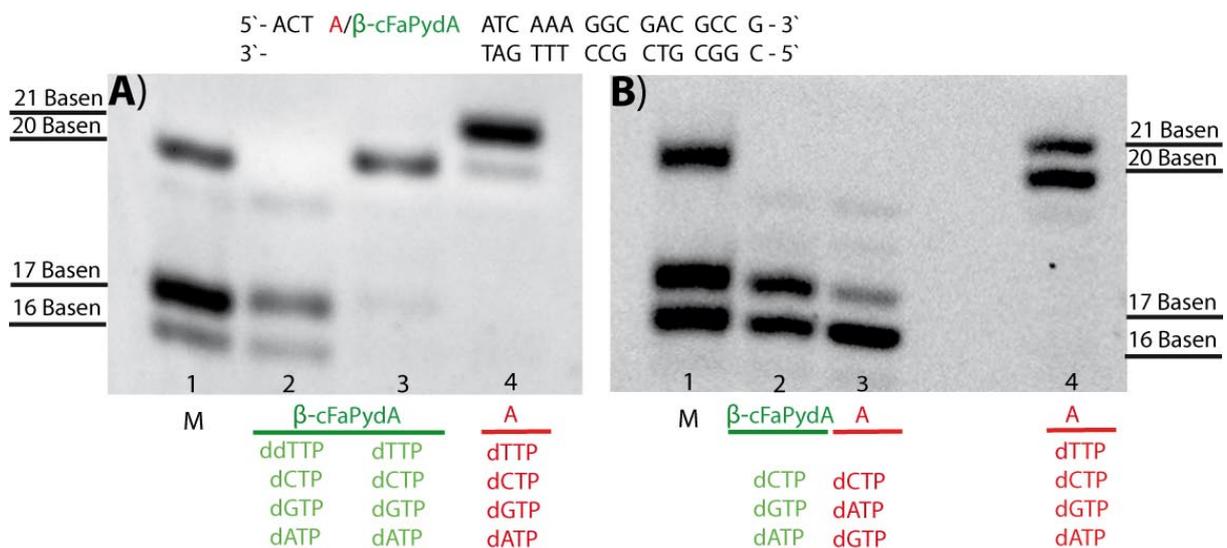


Abbildung 23: Untersuchungen zur Primerverlängerung von KF bei 37 °C gegenüber β -cFaPydA und dA. **A)** Zugabe von drei dNTPs und ddTTP **B)** Zugabe von drei dNTPs ohne ddTTP. **M** = Marker

Zu Abbildung 23 A)

Ersetzt man dTTP durch ddTTP, kann der Primerstrang nach einem Einbau gegenüber dem β -cFaPydA nicht weiter verlängert werden (vgl. Linie 2). Hierfür ergeben sich zwei mögliche Erklärungen: ddTTP wird gegenüber dem β -cFaPydA am effizientesten eingebaut oder aber KF baut statt dem ddTTP ein dCTP, dGTP oder dATP gegenüber dem Schaden ein. Die so entstandene Fehlpaarung kann anschließend jedoch nicht weiter repliziert werden. Liegt dTTP vor, kann der Schaden durch KF repliziert werden (vgl. Linie 3). Linie 4 zeigt den Kontrollstrang mit einem ungeschädigten dA. Im Gegensatz zum Schadensstrang wurde hier über das Primerende (20 Basen) hinaus eine weitere Base inkorporiert. Dies ist ein Indiz, dass sowohl FaPydA als auch β -cFaPydA die Replikationseffizienz von *high-fidelity* Polymerasen signifikant reduzieren.^[2, 303] Für das Klenow-Fragment ist bekannt, dass Störungen, die noch

bis zu vier Basen vom 3'-Ende des Primers entfernt liegen, die Effizienz der Replikation beeinflussen.^[280]

Zu Abbildung 23 B)

In Abwesenheit von dTTP wird zu etwa 50 % eine Fehlpaarung gegenüber dem β -cFaPydA erzeugt, jedoch nicht weiter verlängert (Linie 2). Linie 3 zeigt, dass gegenüber dem ungeschädigten dA ebenfalls ein Einbau durch KF^- stattfindet. Aufgrund der Ergebnisse der Einzelnukleotidinsertionen handelt es sich hier sehr wahrscheinlich um dATP (Abbildung 22). Eine Replikation tritt wie zu erwarten nicht ein. Die Ergebnisse zeigen, dass KF^- in der Lage ist gegenüber dem β -cFaPydA in Anwesenheit von dATP, dCTP und dGTP eine Fehlbasenpaarung erzeugt.

2.5.2 Ergebnisse der Primerverlängerungsstudien von β -cFaPydA mit *GeoBst* Pol I

Die *GeoBst* Pol I besitzt ihr Aktivitätsmaximum (100 %) bei 60 - 65 °C.^[250] Die Untersuchungen zum Replikationsverhalten von β -cFaPydA mit *GeoBst* Pol I fanden daher bei höheren Temperaturen als beim KF^- (37 °C) statt. Aus diesem Grund wurden längere Oligonukleotide verwendet (Schmelzpunkt > 60 °C) und die Experimente wurden bei 55 °C durchgeführt. Dies entspricht einer Aktivität der *GeoBst* Pol I von 80 – 90 %.

GeoBst Pol I war in der Lage dTTP vollständig und zu jeweils 50 % dCTP und dGTP gegenüber dem β -cFaPydA einzubauen.

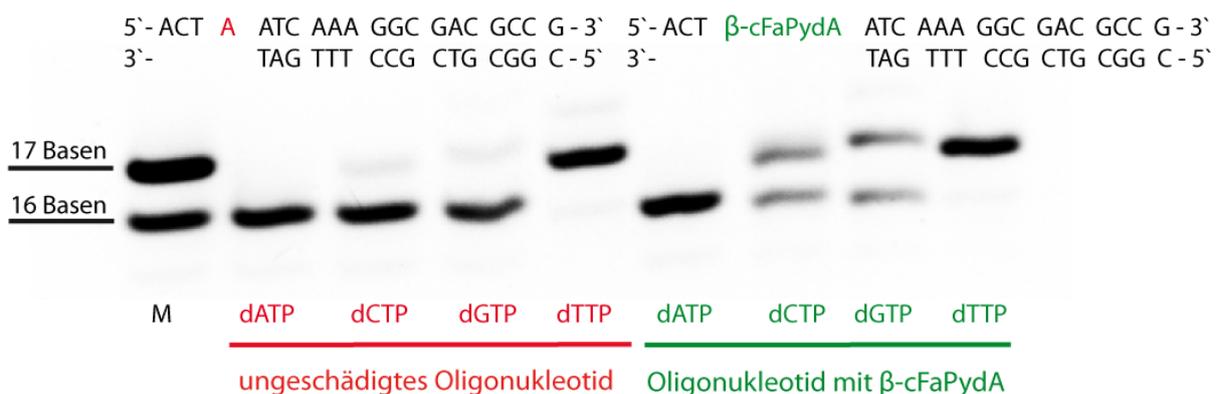


Abbildung 24: Einzelnukleotid Insertionen von ungeschädigtem (rot) und geschädigtem (grün) Oligonukleotiden mit *GeoBst* Pol I bei 55 °C. M = Marker

Das Enzym inkorporierte gegenüber dem ungeschädigten dA, anders als KF^- , nur dTTP (Abbildung 24).

2.5.3 Replikationsverhalten von β -cFaPydA und β -cFaPydG mit *GeoBst* Pol I

Neben den Untersuchungen der beiden Formamidopyrimidine wurden, zu einem besseren Vergleich, parallele Untersuchungen zum 8-oxodA und 8-oxodG durchgeführt (Abbildung 25). Versuche mit ddTTP in Anwesenheit von dCTP, dGTP und dATP zeigten im Fall von β -cFaPydA und 8-oxodA einen Replikationsstopp der Polymerase. Die *GeoBst* Pol I ist in der Lage neben ddTTP auch dGTP sowie dCTP gegenüber β -cFaPydA zu inkorporieren (vgl. hierzu auch Abbildung 24). Für 8-oxodA konnte ein analoges Verhalten zu β -cFaPydA beobachtet werden.^[325]

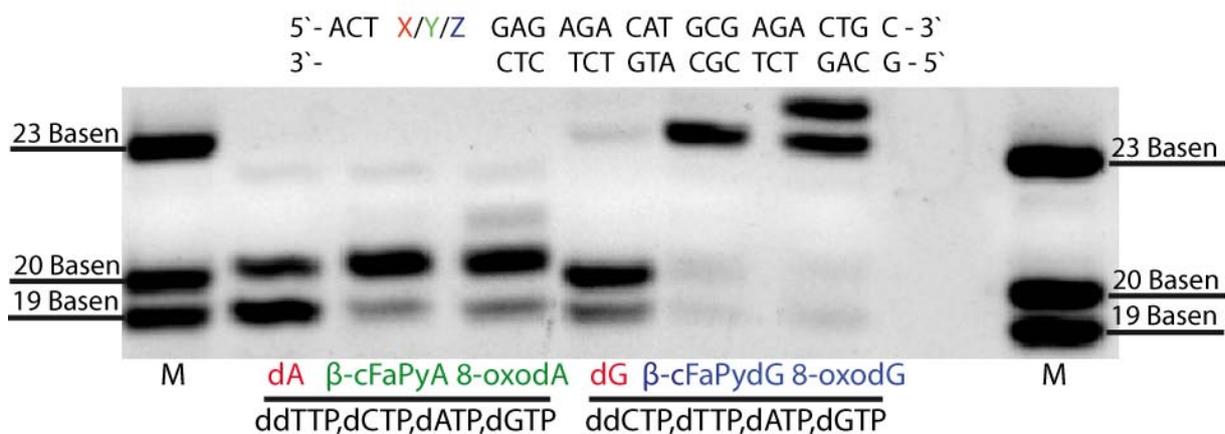


Abbildung 25: Untersuchungen zur Primerverlängerung von *GeoBst* Pol I bei 55 °C gegenüber dA, β -cFaPydA und 8-oxodA (linker Teil) sowie dG, β -cFaPydG und 8-oxodG (rechter Teil). Zugabe von drei dNTPs und ddTTP (links) bzw. ddCTP (rechts). **M** = Marker

Wie für β -cFaPydA ergeben sich für 8-oxodA in Anwesenheit von ddTTP, dATP, dCTP und dGTP ebenfalls Inkorporationen gegenüber dem 8-oxo-Purinschaden. Im Unterschied zum β -cFaPydA zeigen sich jedoch schwache Banden, die auf eine mögliche fehlerhafte Verlängerung durch die *high-fidelity* Polymerase hindeuten.

Für β -cFaPydG und 8-oxodG ergab sich in Anwesenheit von ddCTP ein anderes Ergebnis (Abbildung 25): In beiden Fällen blieb bei Zugabe von ddCTP, dATP, dGTP und dTTP der Replikationsstopp der Polymerase aus. Die *GeoBst* Pol I war für beide Guanosin basierende Schäden in der Lage, den Primer ohne ein Abbruchfragment (bei einer Länge von 20 Basen) zu verlängern. Im Falle des 8-oxodG wurde der fehlerhafte Einbau von dATP gegenüber 8-oxodG gezeigt.^[326] Für die *GeoBst* Pol I konnte damit erstmals die mutagene Konformation des 8-oxodG unter Ausbildung eines *Hoogsteen* Basenpaares gegenüber dem dA innerhalb einer Polymerase der A-Familie bewiesen werden (vgl. Arbeiten der Arbeitsgruppen *Carell* und *Beese*).^[237] Die Primer Extensionen hatten hierbei gezeigt, dass dATP etwa neunmal effektiver gegenüber dem 8-oxodG eingebaut wird als dCTP.^[237]

Aufgrund der schwächeren Substratspezifität von Polymerasen für dd-Triphosphate konnte für einen ddCTP Einbau kein Abbruchfragment nachgewiesen werden.^[327] Da von *Greenberg* bereits ein erhöhter Einbau von dATP gegenüber FaPydG gezeigt worden war, lag für β -cFaPydG eine fehlerhafte dATP Inkorporation nahe.^[302] Weiterhin war die Polymerase im Falle des 8-oxodG in der Lage, den Primer bei gleichen Bedingungen um eine Base über das Templat hinaus zu verlängern. Dies ist ein Indiz für eine höhere Replikationseffizienz der *GeoBst* Pol I für das 8-oxodG im Vergleich zu β -cFaPydG.

Bei der Verwendung eines weiteren Didesoxytriphosphats neben ddCTP konnte allein bei Zugabe von ddATP (Abbildung 26 - Mitte) die Replikation des Enzyms vollständig unterbunden werden. Für die Zugabe von ddTTP (Abbildung 26 – links) bzw. ddGTP (Abbildung 26 – rechts) war durch die Anwesenheit von dATP eine Replikation stets möglich.

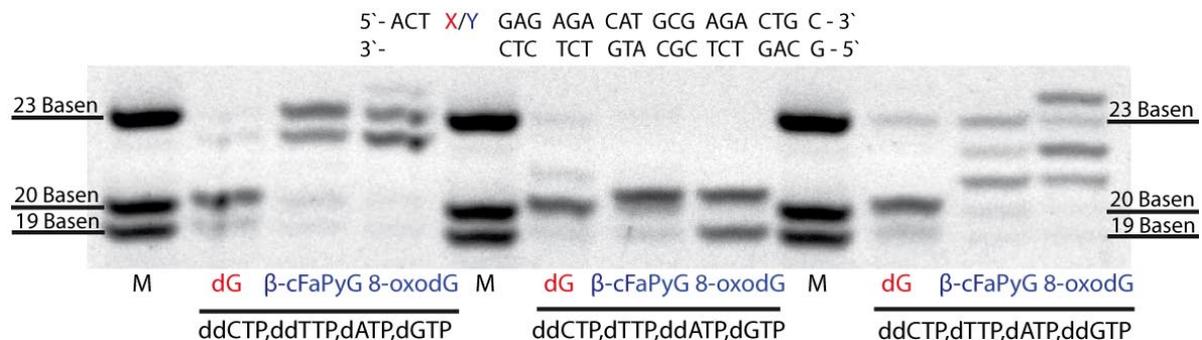


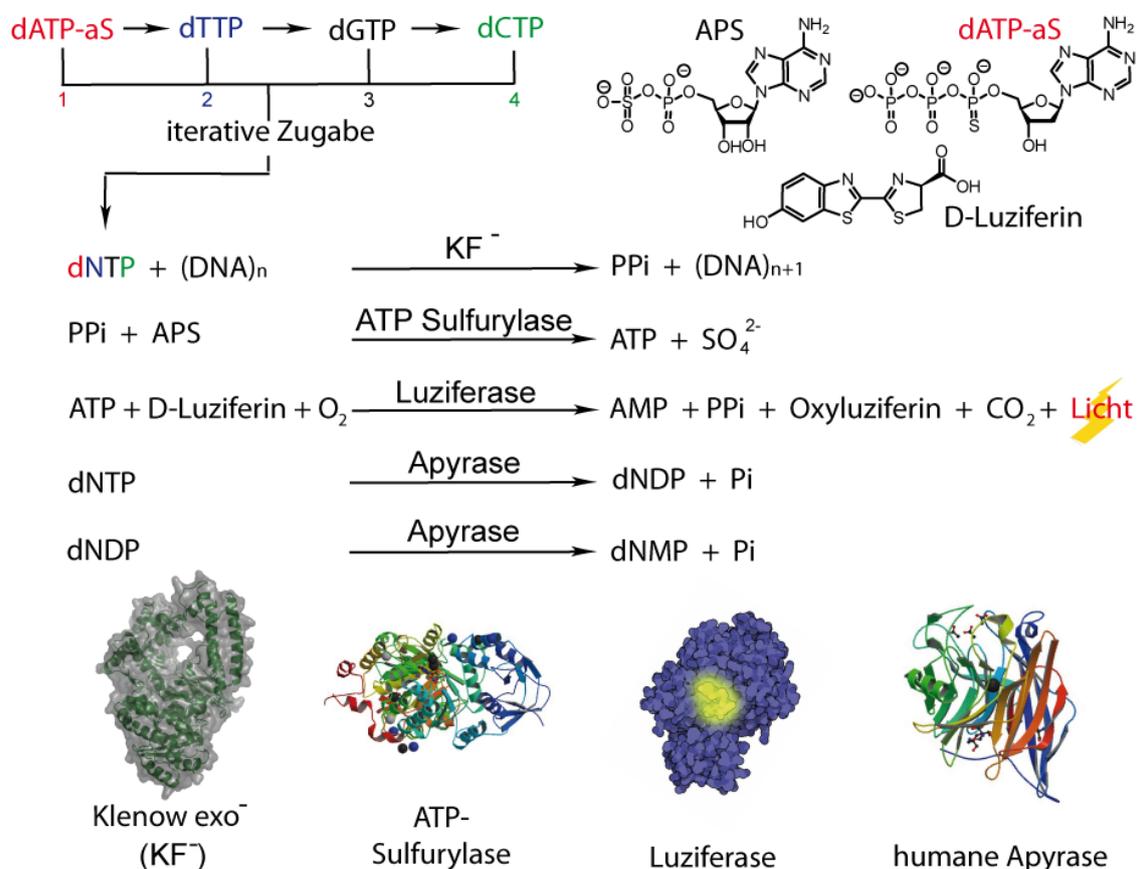
Abbildung 26: Primerverlängerung von *GeoBst* Pol I bei 55 °C gegenüber dG, β -cFaPydG und 8-oxodG. Hierbei wurde jeweils ddCTP, ein weiteres ddNTP sowie zwei dNTPs verwendet. M = Marker

2.6 Pyrosequenzierungs-Analyse zur Quantifizierung des mutagenen Potentials der Formamidopyrimidine

Nach den qualitativen Nukleotidinsertionsreaktionen und Primer Extension Reaktionen wurde auf einen von *M. Müller* (Arbeitskreis *Carell*) entwickelten Assay zurückgegriffen, um den fehlerhaften Einbau von dATP gegenüber β -cFaPydG und 8-oxodG *in vitro* zu untersuchen. Diese auf der Pyrosequenzierungstechnik basierende Methode war geeignet, komplementär zu den Einzelnukleotidinsertion (Kap. 2.5), das Replikationsverhalten von *high-fidelity* Polymerasen der A- sowie von *low-fidelity* Polymerasen der Y-Familie gegenüber den o.g. vier DNA-Schäden in Echtzeit zu überprüfen bzw. eine Quantifizierung von möglichen Fehlinsertionen vorzunehmen.^[328]

2.6.1 Grundlagen der Pyrosequenzierung

Das Prinzip der Pyrosequenzierung basiert auf der Detektion von abgespaltenem Pyrophosphat (PPi), welches bei der Verlängerung eines DNA-Primer-Templat-Duplexes durch eine Polymerase freigesetzt wird. *P. Nyrén* und *M. Ronaghi* entwickelten in den 1990er Jahren diese Sequenzierungstechnik (Schema 24).^[329-330] Die Vorteile der Pyrosequenzierung sind: Hohe Messgenauigkeit, schnelle Analyse einer großen Anzahl unterschiedlicher Proben durch parallele Prozessierung und ein hoher Grad an Automatisierung. Daher wurde die flexible Technik bereits zur vollständigen Sequenzierung eines menschlichen Genoms eingesetzt.^[331-335] Eine Vielzahl weiterer Sequenzierungsstudien konnten mit dieser Technik durchgeführt werden: Aufklärung komplizierter DNA-Sekundärstrukturen,^[336] Detektion von Mutationen,^[337] Analyse von cDNA,^[338] Sequenzierung von Methylierungsmustern der DNA,^[328, 339] Identifizierung neuer Organismen^[340-342] und Viren-Typisierung,^[343] sowie Polymorphismus-Analysen einzelner Nukleotide.^[344] Dabei werden nur sehr kleine Probenmengen (in der eigenen Anwendung 10 – 20 pmol DNA je Probenansatz) benötigt.^[340] Den Beginn der Reaktionskaskade startet eine Polymerase (KF⁻ im hier verwendeten System der Firma *Qiagen*).



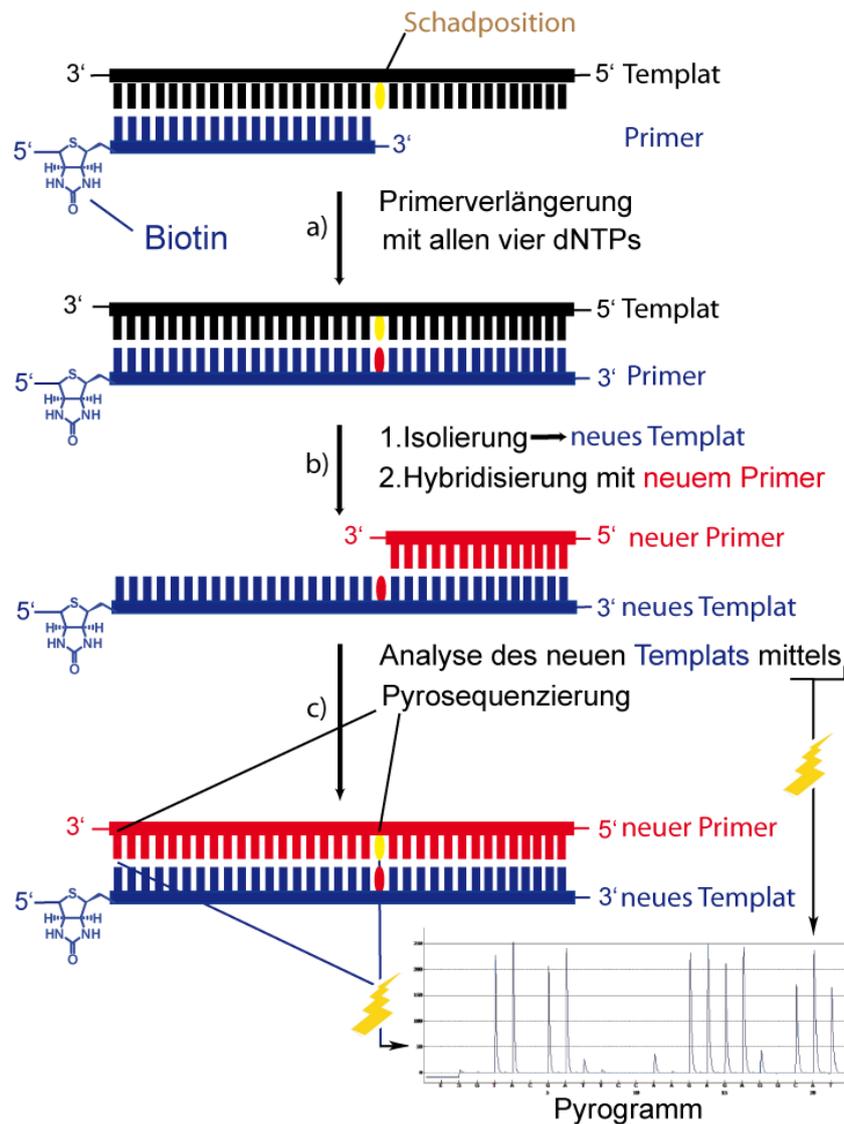
Schema 24: Darstellung der enzymatischen Reaktionskaskaden der Pyrosequenzierung mit den beteiligten, katalysierenden Enzymen (Bildquelle: PDB-Datenbank).

Aufgrund der Polymerisationsreaktion setzt KF^- Pyrophosphat (PPi) aus dem Triphosphateinbau frei. Im Anschluss wird anorganisches PPi von ATP-Sulfurylase zusammen mit APS zu ATP umgesetzt.^[345] Das ATP dient der Luziferase als Energielieferant,^[346] um Luziferin zu Luziferin-Adenylaten und danach zu Oxiluziferin umzusetzen. Hierbei wird Licht mit einer Wellenlänge von 560 nm freigesetzt, welches detektiert werden kann. Weiterhin befindet sich Apyrase in der Reaktionslösung,^[347] um sowohl die zugegebenen dNTPs als auch das entstandene dATP nach einer gewissen Zeit abzubauen. Dies führt dazu, dass nach dem Einbau eines dNTP nur für begrenzte Zeit Photonen generiert werden, bevor dieses Signal wieder auf Null zurückgeht. Die Detektion des Einbaus eines neuen Triphosphats ist somit möglich. Um den sofortigen Umsatz von dATP durch die Luziferase zu verhindern, wird bei der Polymerasereaktion dATP- α S verwendet. Dies ist kein Substrat der Luziferase und wird somit nicht umgesetzt. Durch eine iterative Zugabe der vier kanonischen Triphosphate ist es somit möglich, unbekannte Template zu sequenzieren. Bei der Zugabe eines nicht-komplementären Triphosphats bleibt eine Inkorporation des dNTP für die zu untersuchende Position und damit die Freisetzung von Pyrophosphat aus.

2.6.2 Durchführung des Assays

Zur Bestimmung der Einbauraten der vier verschiedenen DNA-Schäden wurde das Prinzip der Pyrosequenzierung mit je zwei *high-fidelity* Polymerasen (*GeoBst* Pol I und KF^-) sowie den beiden *low-fidelity* Polymerasen (Pol η aus *S. cerevisiae* und humaner Pol κ) herangezogen (Schema 25). Zuvor wurden die Bedingungen für die jeweilige Polymerase zur Vollverlängerung der DNA-Primer bestimmt (Temperaturen: 30°C für Pol κ , 37 °C für Pol η und KF^- , sowie 55 °C für *GeoBst* Pol I).

Die Bedingungen wurden für jede Polymerase so optimiert, dass das Primer-Templat-Konstrukt mit dem jeweiligen Schaden bei Zugabe aller vier dNTPs vollständig verlängert wurde (Schema 25). Anschließend konnte der verlängerte Primer denaturiert, mittels Streptavidin isoliert und mit einem neuen Primer hybridisiert und anschließend mittels Pyrosequenzierung analysiert werden. Die Pyrosequenzierung lieferte sowohl die Art, als auch den prozentualen Wert des durch die jeweilige Polymerase gegenüber des Schadens eingebauten Nukleotids (Schema 25: Schritt **b**) und **c**)).



Schema 25: Prinzip des Assays: **a)** Primer Verlängerung mit KF^- , *GeoBst* Pol I, Pol κ oder Pol η . **b)** Isolierung des verlängerten, einzelsträngigen Primers mittels Streptavidin-Träger **c)** Analyse und Quantifizierung des neuen Templats mittels Pyrosequenzierung.

Weiterhin diene ein ungeschädigter DNA-Strang mit dG (zur Analyse von β -cFaPydG und 8-oxodG) sowie dA (für β -cFaPydA und 8-oxodA) anstelle der geschädigten Base als Referenz. Bei diesem Assay ist zu beachten, dass bei dieser Methode nur vollständig verlängerte Oligonukleotide in die Quantifizierung eingehen.

2.7 Ergebnisse der Primer Extension basierenden Pyrosequenzierung

2.7.1 Ergebnisse mit KF^-

Greenbergs Primer Extensionsstudien mit einem anomeren α/β -FaPydA-Gemisch wurden durch die hier durchgeführten Experimente bestätigt.^[303] Die Polymerase KF^- aus *E. coli* baut fast ausschließlich dTTP gegenüber dem β -cFaPydA ein. Dennoch kommt es in 2 % aller Fälle

durch die *high-fidelity* Polymerase KF^- nach der Inkorporation von dATP gegenüber dem β -cFaPydA zu einer Replikation des dA: β -cFaPydA Basenpaares (Tabelle 4). Die durch *Arnold* (Arbeitsgruppe *Carell*) erhaltenen kinetischen Messergebnisse, die eine gesteigerte Inkorporation von dGTP und dATP gegenüber dem β -cFaPydA zeigten, führten somit im Falle von dATP zu einer messbaren Replikation bei der Fehlpaarungen durch KF^- .^[2]

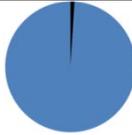
	dA	β -cFaPydA	8-oxodA
Klenow exo^-			
	0 % dATP 0 % dCTP 0 % dGTP 100 % dTTP	2 % dATP 0 % dCTP 0 % dGTP 98 % dTTP	0 % dATP 0 % dCTP 1 % dGTP 99 % dTTP

Tabelle 4: Ergebnisse des Triphosphateinbaus gegenüber dA, β -cFaPydA und 8-oxodA durch KF^-

Die Ergebnisse für das 8-oxodA stimmen mit bisherigen Untersuchungsergebnissen der Literatur überein. Die durch ein *Hoogsteen*-Basenpaar hervorgerufene Inkorporation von dGTP geht auf eine *syn*-Konformation des Schadens zurück. Der Einbau von dGTP gegenüber 8-oxodA mit der resultierenden dA \rightarrow dC Transversion wurde bereits in einer früheren Arbeit mit dem Klenow Fragment, DNA Pol α , sowie Pol β nachgewiesen. Alle drei Polymerasen bauen jedoch bevorzugt dTTP gegenüber 8-oxodA ein.^[325] Das 8-oxodA zeigt bei seiner Replikation durch KF^- eine etwa viermal geringere Mutagenitätsrate als das 8-oxodG.^[348] Diese Mutagenitätsrate zeigt auch der hier durchgeführte Assay: Die Replikation des dG:*syn*-8-oxodA Basenpaares war seltener aber immer noch nachweisbar (für 1 % aller Fälle) im Vergleich zur Replikation des prominenten dA:*syn*-8-oxodG Basenpaares (Tabelle 5).

In 13 % aller Fälle replizierte KF^- in Anwesenheit aller vier dNTPs ein premutagenes dA: 8-oxodG Basenpaar.

Für das β -cFaPydG wurde in 5 % aller Fälle eine fehlerhafte Basenpaarung von dA: β -cFaPydG repliziert. Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe *Greenberg* überein. Diese hatte für FaPydG bzw. FaPydGTP erstmals zeigen können, dass KF^- analog dem 8-oxodG in der Lage ist, dATP gegenüber dem Formamid zu inkorporieren.^[168, 302] Im Vergleich zum 8-oxodG zeigte sich natürliches FaPydG *in vitro* nur schwach mutagen für den Modelorganismus *E. coli*, was durch die hier vorgestellten Inkorporationsergebnisse (Tabelle 5) bestätigt wird.^[169]

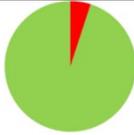
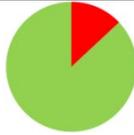
	dG	β -cFaPydG	8-oxodG
Klenow exo^-			
	0 % dATP 100 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP	5 % dATP 95 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP	13 % dATP 87 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP

Tabelle 5: Prozentualer Triphosphateinbau gegenüber dG, β -cFaPydG und 8-oxodG durch KF^-

Die Ergebnisse der Experimente (Tabelle 5) zeigen (verglichen mit den Resultaten der *Greenberg* Gruppe) weiterhin, dass das G \rightarrow T Transversionsverhalten mit β -konfiguriertem, carbozyklischen FaPydG in sehr guter Übereinstimmung mit Ergebnissen für natürliches FaPydG in *E. coli* ist.^[169] In früheren Studien mit Polymerasen der A-Familie (KF^- , T7 DNA-Polymerase und RB69gp) wurde gezeigt, dass 8-oxodG (*in vitro*) zu einem mutagenen dA: 8-oxodG Basenpaar führen kann.^[20] Dennoch wird bei den drei o.g. Polymerasen hauptsächlich das dCTP gegenüber dem 8-oxodG eingebaut. Vergleicht man die Werte mit denen der *GeoBst* Pol I, unterscheiden sich die Mutagenitätsraten für Polymerasen der A-Familie jedoch signifikant (vgl. Kap. 2.7.2).

2.7.2 Ergebnisse mit *GeoBst* Pol I

In Bezug auf die parallel durchgeführten Kristallisationsexperimente mit der *GeoBst* Pol I waren die erhaltenen Ergebnisse des Assays von großem Interesse. Das β -cFaPydA war analog zu den Ergebnissen für KF^- durchaus fehlerinduzierend. In 1 % aller verlängerten Primer konnte eine Replikation des dA: β -cFaPydA Basenpaares beobachtet werden (Tabelle 6). Die beobachteten Inkorporationen von dCTP und dGTP (vgl. Kap. 2.5.2) führten jedoch zu keiner Primer-Verlängerung durch die *high-fidelity* Polymerase nach diesen Fehlpaarungen. Für diese Fehlpaarungen kann *in vivo* weiter das “*polymerase switch model*“ herangezogen werden. Auch die Exonukleaseaktivität der *high-fidelity* Polymerasen muß dabei berücksichtigt werden. Sind alle vier Triphosphate vorhanden, baut die *GeoBst* Pol I somit in 99 % aller Fälle dTTP gegenüber dem β -cFaPydA ein, in 1 % der replizierten Fälle jedoch ein dATP. Das mutagene Potential des 8-oxodA war bei der Replikation durch die *GeoBst* Pol I gegenüber den Ergebnissen mit KF^- sichtbar gesteigert. Insbesondere für die beiden Triphosphate der Purinbasen dGTP und dATP konnte eine häufigere Verlängerung der Fehlpaarungen mit beiden Purinbasen beobachtet werden.

Die Tatsache, dass eine Verlängerung mit dCTP nicht beobachtet werden konnte, deutet auch im Falle der *GeoBst* Pol I auf eine *syn*-Konformation des 8-oxodA gegenüber dGTP oder dATP hin.^[325] Auch zeigt sich anhand des 8-oxodAs, dass sich - trotz hoher Sequenzhomologie von KF⁻ und *GeoBst* Pol I - beide Polymerasen in ihrem Replikationsverhalten für ein und denselben Schaden durchaus unterscheiden können.^[349] Somit ist ein experimenteller Vergleich beider Polymerasen nötig.

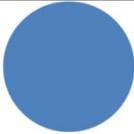
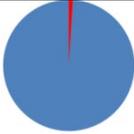
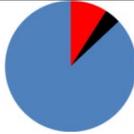
	dA	β -cFaPydA	8-oxodA
<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> Polymerase I			
	0 % dATP 0 % dCTP 0 % dGTP 100 % dTTP	1 % dATP 0 % dCTP 0 % dGTP 99 % dTTP	9 % dATP 0 % dCTP 4 % dGTP 87 % dTTP

Tabelle 6: Prozentuale Inkorporationsraten der vier verschiedenen dNTPs durch *GeoBst* Pol I gegenüber dA, β -cFaPydA und 8-oxodA.

Bei der Replikation durch die *GeoBst* Pol I zeigt 8-oxodG sehr hohe Mutagenitätsraten (Tabelle 7). Dieser Effekt ist jedoch nicht auf die höhere Aktivitätstemperatur der *GeoBst* Pol I zurückzuführen. Auch bei 30 °C zeigte sich eine Misinkorporationsrate von 61 % für dATP gegenüber dem 8-oxodG.

Die *syn*-Konformation des 8-oxodG stabilisiert den Schaden im aktiven Zentrum der Polymerase I. Das dC: *anti*-8-oxodG Basenpaar führt zu einer sterischen Abstoßung des O8-Sauerstoffes mit der 2'-Desoxyribose. Weiterhin kommt es zu van der Waals Kontakten mit der 5'-Phosphatgruppe des Schadens, wodurch es zu einer unvorteilhaften Verzerrung des DNA-Rückgrats kommt. Der Kontakt der Polymerase zur kleinen Furche besteht in diesem Fall nicht mehr.^[237] Ergebnisse der Arbeitsgruppe *Carell*, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Beese* entstanden waren, hatten für die einfache Nukleotidinkorporation gegenüber dem 8-oxodG eine neunmal höhere Inkorporation von dATP im Vergleich zum dCTP gezeigt. Die durch die Pyrosequenzierung erhaltenen Werte der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die *syn*-Konformation des 8-oxodG in 66 % aller Fälle zur Replikation des premutagenen dA:8-oxodG Basenpaares führt.

Hauptteil mit Ergebnissen

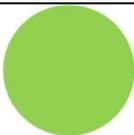
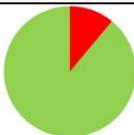
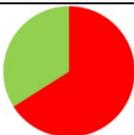
	dG	β -cFaPydG	8-oxodG
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> Polymerase I			
	0 % dATP 100 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP	11 % dATP 89 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP	66 % dATP 34 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP

Tabelle 7: Ergebnisse des Triphosphateinbaus gegenüber dG, β -cFaPydG und 8-oxodG durch *GeoBst* Pol I.

Arbeiten von *F. Büsch* (Arbeitsgruppe *Carell*) hatten für α -cFaPydG einen Replikationsstopp für die *GeoBst* Pol I gezeigt. Erst nach längerer Inkubationszeit und drastisch erhöhter Polymerase- und dNTP-Konzentration war das Enzym in der Lage, das α -konfigurierte cFaPydG zu replizieren.^[154]

In Tabelle 8 sind die Verhältnisse der experimentell erhaltenen Daten für die untersuchten Schäden β -cFaPydA, β -cFaPydG, 8-oxodA und 8-oxodG bei ihrer Replikation durch die aus *E. coli* und aus dem thermophilen Organismus *Geobacillus stearothermophilus* stammenden Polymerasen aufgeführt.

	KF ^r	<i>GeoBst</i> Pol I
β -cFaPydA	dT:dA (98:2)	dT:dA (99:1)
β -cFaPydG	dC:dA (95:5)	dC:dA (89:11)
8-oxodA	dT:dG (98:2)	dT:dA:dG (87:9:4)
8-oxodG	dC:dA (87:13)	dC:dA (34:66)

Tabelle 8: Zusammenfassung der Verhältnisse der (Fehl-)Inkorporationen der beiden *high-fidelity* Polymerasen des *Klenow Fragments* und der *GeoBst* Pol I.

2.7.3 Experimente mit den *low-fidelity* Polymerasen

Die vorangegangenen Experimente zu den beiden *high-fidelity* Polymerasen zeigen, dass die Formamidopyrimidine bereits für diese sehr exakt replizierenden Polymerasen in der Lage sind, Fehlbasenpaarungen zu induzieren. Dennoch zeigen die Einzelnuklotidinsertionen (Kap. 2.5), dass neben der korrekten und der fehlerhaften Insertion von Basen gegenüber dem jeweiligen Formamidopyrimidin auch nach wie vor nichtverlängerte Primer-Templatkonstrukte mit freiem Schaden vorlagen, die durch die *high-fidelity* Polymerasen nicht verlängert wurden. Da der hier vorgestellte Assay keine unverlängerten Primer-Templat Konstrukte berücksichtigen kann, wurden nun auf Basis des “*polymerase switch model*“ (vgl. hierzu Kap. 1.10) für die bekannten Vorgänge *in vivo* weitere Untersuchungen mit *low-fidelity* Polymerasen der Y-Familie *in vitro* durchgeführt. Die hier vorgestellte Methode der Pyrosequenzierung hat den Vorteil einer schnellen Durchführbarkeit bezüglich des mutagenen Potentials von DNA-Schäden. Die u.a. von Greenberg^[306] oder Livneh^[350-351] entwickelten Assays zur quantitativen Bestimmung der TLS sind dagegen sehr nahe am jeweiligen biologischen Organismus, jedoch ungleich zeitintensiver bis zum Erhalt von Resultaten.^[306]

2.7.4 Ergebnisse mit Pol η

Erneut zeigen β -cFaPydA bzw. 8-oxodA bei ihrer Replikation durch die *low-fidelity* Polymerase η kaum replizierte Fehlpaarungen. Die Replikation eines dA geschieht durch die Polymerase der Y-Familie ohne messbare Fehler.

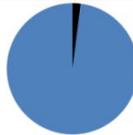
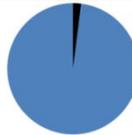
	dA	β -cFaPydA	8-oxodA
Polymerase η			
	0 % dATP 0 % dCTP 0 % dGTP 100 % dTTP	0 % dATP 0 % dCTP 2 % dGTP 98 % dTTP	0 % dATP 0 % dCTP 2 % dGTP 98 % dTTP

Tabelle 9: Prozentualer Triphosphateinbau gegenüber dA, β -cFaPydA und 8-oxodA durch Pol η

Im Gegensatz hierzu zeigt Pol η bei der Replikation von ungeschädigtem dG bereits eine Fehlerrate von 5 %. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Replikation mit Pol η vervollständigen die von Ober erhaltenen Inkorporationsmessungen: Pol η ist in der Lage, ein dC: β -cFaPydG Basenpaar in 92 %, sowie das dA: β -cFaPydG in 8 % aller Fälle bei Anwesenheit aller vier dNTPs zu verlängern. Das α -cFaPydG bildet für die *low-*

fidelity Polymerase η analog wie für die *high-fidelity-GeoBst* Pol I einen Replikationsblock.^[154]

Das mutagene Potential des 8-oxodG unterscheidet sich lediglich um 4 % im Vergleich zum β -cFaPydG.

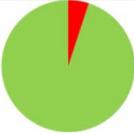
	dG	β -cFaPydG	8-oxodG
Polymerase η			
	5 % dATP 95 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP	8 % dATP 92 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP	12 % dATP 88 % dCTP 0 % dGTP 0 % dTTP

Tabelle 10: Ergebnisse der Triphosphatinsertion gegenüber dG, β -cFaPydG und 8-oxodG durch Pol η

Der hier verwendete Assay für die Replikation des β -cFaPydG durch Pol η zeigt im Vergleich zur *GeoBst* Pol I eine nur um 3 % geringere Fehlinkorporationsrate.

Auch der 8-oxodG Schaden besitzt mit einem 12 %igen dATP Einbau ein bemerkenswert hohes mutagenes Potential im Vergleich zu den in der Literatur publizierten Werten, die eine mehr als 100fach erhöhte Inkorporation von dCTP im Vergleich zu dATP gegenüber dem 8-oxodG Schaden beschreiben.^[241, 352-353] Der vorliegende Assay zeigt explizit, dass die wirkliche Replikation des Schadens von den Insertionseffizienzen deutlich abweichen. Pol η aus *S. cerevisiae* besitzt die höchste Prozessivität für den 8-oxodG Schaden und die niedrigste Fehlerrate mit einer 67-fach häufigeren Inkorporation von dCTP gegenüber dATP.^[354] Weiterhin ergaben frühere Studien mit Pol η eine sehr geringe Fehlerrate für einen Einbau von dATP.^[352-353] Für humane Pol η und dem aus der Maus stammenden Enzym zeigten sich 17-mal höhere Werte für G \rightarrow T Transversionen als für Pol η aus Hefe. Interessanterweise war die Prozessivität von Pol η gegenüber dem 8-oxodG Schaden höher als für ungeschädigtes dG.^[354]

Von *Ober et al.* durchgeführte kinetische Studien zur Inkorporation der einzelnen Nukleotidtriphosphate durch Pol η gegenüber β -cFaPydG, 8-oxodG und cdG zeigten eine hohe Inkorporationseffizienz (f_{ins}) von dCTP.^[3, 158] Die dabei erhaltene Spezifität für β -cFaPydG war jedoch um einen Faktor von drei im Vergleich zu dG für die Inkorporation von dCTP vermindert. Die Fehlinkorporationseffizienz von dTTP war etwas höher im Vergleich zu dATP (Bildung des dA: β -cFaPydG $2.6 (\pm 1.5) \times 10^2$ bzw. dT:cFaPydG Nukleotidbasenpaares $1.3 (\pm 0.7) \times 10^2$ mal weniger effizient als die Bildung des dC: β -cFaPydG Basenpaares).^[3, 158]

2.7.5 Ergebnisse mit Pol κ

Die Replikation der Adenosin basierenden Schäden zeigen einen ähnlichen, wenn auch etwas erhöhten Einbau von dGTP bei der Replikation gegenüber von β -cFaPydA als auch dem 8-oxodA (Tabelle 11). Berücksichtigt man, dass die Polymerase bereits gegenüber dem ungeschädigten dA in 4 % aller replizierten Fälle dGTP inkorporierte, liegen die Fehlerraten für die Adenosin basierenden Schäden im etwa gleichen Bereich wie für Pol η .

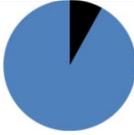
	dA	β -cFaPydA	8-oxodA
Polymerase κ			
	0 % dATP 0 % dCTP 4 % dGTP 96 % dTTP	0 % dATP 0 % dCTP 6 % dGTP 94 % dTTP	0 % dATP 0 % dCTP 8 % dGTP 92 % dTTP

Tabelle 11: Inkorporationsraten gegenüber dA, β -cFaPydA und 8-oxodA durch Pol κ .

Im Gegensatz zu Dpo4 und Pol η (in beiden Polymerasen ist der *N-clasp* nicht konserviert) zeigten frühere Studien, dass Pol κ den 8-oxodG Schaden mit einer überaus hohen Fehlerrate von bis zu 60 % durch Insertion von dATP repliziert.^[355] Die hier durchgeführte Studie quantifizierte den fehlerhaften Einbau von dATP für die vollständig replizierten DNA-Konstrukte gegenüber dem 8-oxodG sogar auf 92 %. Auch für β -cFaPydG zeigte Pol κ mit 82 % die höchste Fehlinkorporationsrate von dATP für alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polymerasen. Weiterhin wurde für alle drei Basen eine Fehlinkorporation von dGTP beobachtet, die für ungeschädigtes dG mit 7 % am höchsten ist.

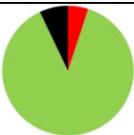
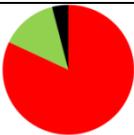
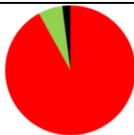
	dG	β -cFaPydG	8-oxodG
Polymerase κ			
	5 % dATP 88 % dCTP 7 % dGTP 0 % dTTP	82 % dATP 14 % dCTP 4 % dGTP 0 % dTTP	92 % dATP 6 % dCTP 2 % dGTP 0 % dTTP

Tabelle 12: Triphosphateinbau in Prozent gegenüber dG, β -cFaPydg und 8-oxodG durch humane Pol κ .

2.7.6 Ergebnisse mit Pol ι

Humane Pol ι inkorporiert vornehmlich dCTP gegenüber dem 8-oxodG.^[245] Aufgrund der fehlerfreien Replikation des 8-oxodG Schadens wird der Polymerase eine wichtige Rolle im *BER* beim Schutz gegen oxidativen Stress innerhalb der Zelle zugeordnet. Die Polymerase der Y-Familie ist beispielsweise bei der *TLS* von oxidativ geschädigtem Chromatin in Zellen beteiligt. Eine Herunterregulierung von Pol ι in Zellen erhöht deren Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress.^[356]

Die strukturellen Arbeiten von *Kirouac et al.* zeigten, dass das für eine Polymerase der Y-Familie außergewöhnlich kleine aktive Zentrum von Pol ι für die fehlerfreie Replikation des 8-oxodG verantwortlich ist.^[245]

Für eine Quantifizierung der inkorporierten dNTPs durch den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Assay zeigte sich die Pol ι jedoch als nicht geeignet. Die Polymerase war unter verschiedensten Bedingungen nicht in der Lage, den Primer mit ungeschädigten oder geschädigten Basen voll zu verlängern (Abbildung 27). Selbst bei hohen Polymerasekonzentrationen (bis zu 1 mM) konnte das Enzym den Primer für eine anschließende Analyse mittels Pyrosequenzierung nicht vollständig verlängern.

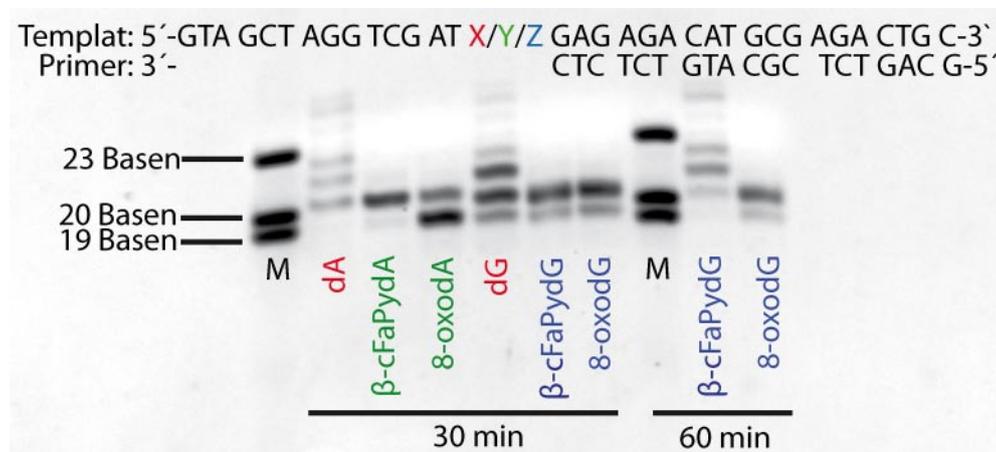


Abbildung 27: Primer Verlängerungsstudien von humaner Pol ι in Anwesenheit aller vier dNTPs mit dA, β -cFaPydA, 8-oxodA, dG, β -cFaPydG, 8-oxodG bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Abschließende Experimente mit den einzelnen Nukleotidtriphosphaten zeigten, dass sowohl β -cFaPydA als auch 8-oxodA in Anwesenheit aller vier dNTPs einen Replikationsstopp für die Polymerase der Y-Familie bilden (Abbildung 28). Bei Zugabe jeweils nur eines dNTPs war die Polymerase in der Lage, dATP weniger dCTP, dGTP und dTTP gegenüber dem carbozyklischen Analogon β -cFaPydA zu inkorporieren. Die Tatsache, dass ausschließlich bei Zugabe von dTTP kein unreaktierter Primer mehr nachgewiesen werden konnte, deutet darauf hin, dass die Polymerase für dTTP offenbar die höchste Inkorporationseffizienz besitzt. Im Fall

des 8-oxodA konnte eine teilweise Replikation bei der Zugabe von dATP beobachtet werden. Neben der Inkorporation von dGTP ist ebenfalls nur bei der Zugabe von dTTP kein unreaktierter Primer mehr vorhanden.

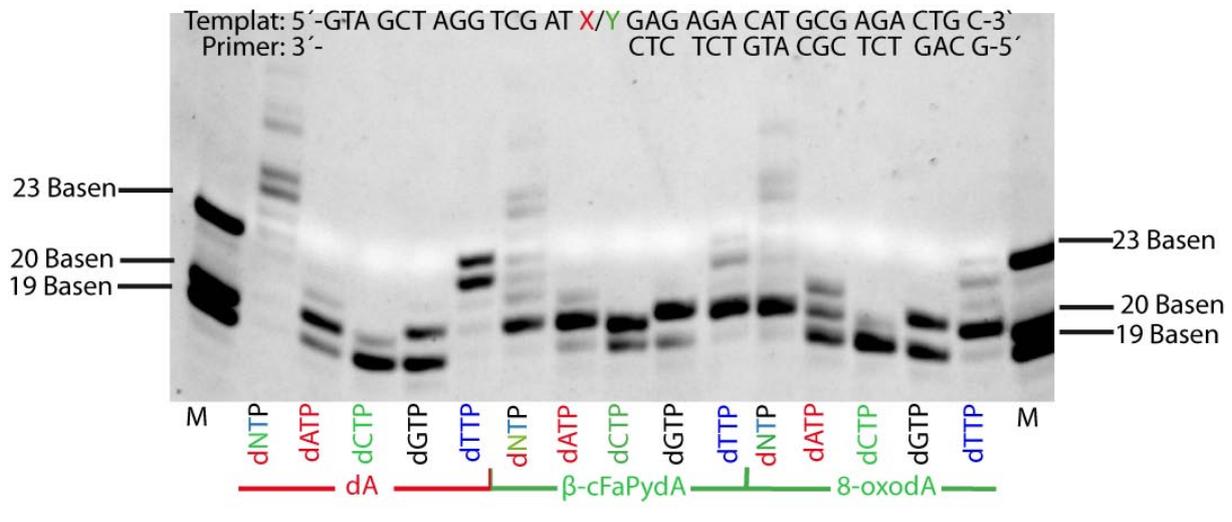


Abbildung 28: Einzelnukleotidinsertionen gegenüber dA, β -cFaPydA und 8-oxodA durch Pol ι

Im Falle der einfachen Nukleotidinsertion sowohl für β -cFaPydG als auch für 8-oxodG war Pol ι in der Lage, bei ausschließlicher Zugabe von dATP, den Primer vollständig (im Fall von β -cFaPydG) oder teilweise (für 8-oxodG) zu replizieren (Primer mit Basenlänge 21 nachweisbar). Desweiteren konnte die Polymerase gegenüber dem carbozyklischen Formamid dCTP, teilweise dGTP und dTTP insertieren.

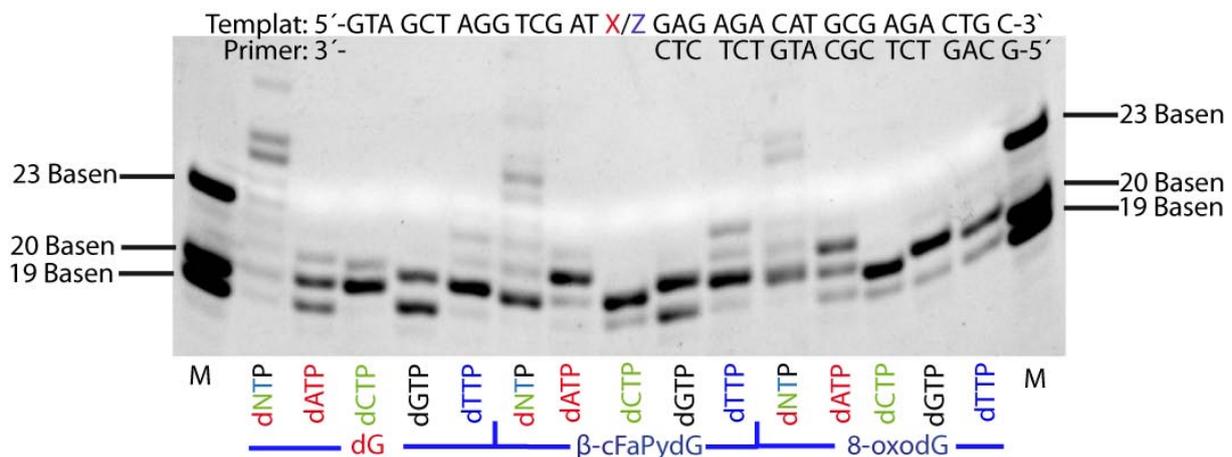


Abbildung 29: Ergebnisse der Einzelnukleotidinsertionen gegenüber dG, β -cFaPydG und 8-oxodG.

Der 8-oxodG Schaden wurde bereits in früheren Arbeiten als Replikationsblock für die eukaryotische Polymerase erkannt.^[357] Bei den vorliegenden Experimenten mit 8-oxodG war Pol ι in der Lage, dCTP, dGTP und dTTP gegenüber 8-oxodG fast vollständig zu insertieren. Das "polymerase switch model" beinhaltet zwei Kategorien von Polymerasen für die TLS.

„Insertions“ Polymerasen (wie Pol ι , Pol η , Pol δ , Pol α , Pol κ) übernehmen dabei die direkte Insertion gegenüber den jeweiligen Schäden. Die Verlängerung geschieht danach durch die als „extender“ DNA Polymerasen bezeichnete Pol ζ oder Pol κ (u.a. auch Pol δ , Pol ε , Pol α , Pol β und Pol η) bis eine replikative Polymerase wieder die Nukleotidinsertion aufnimmt. Somit bestimmt das Zusammenspiel der unterschiedlichen Polymerasen (neben einer Vielzahl weiterer Faktoren) die fehlerfreie oder fehlerhafte TLS für die unterschiedlichsten DNA-Schäden.^[29]

Versuche, nach einer Inkubation von geschädigter DNA mit Pol ι , die Replikation mit dem KF zu Ende zu führen, erbrachten keine auswertbaren Pyrosequenzierungsergebnisse.

3 Strukturelle Analyse der Replikation der Formamidopyrimidine

Um Einblick in die molekularen Mechanismen zur Erklärung der biochemischen Ergebnisse (vgl. Kap. 2.5 und Kap. 2.7) der Formamidopyrimidine β -cFaPydA und β -cFaPydG zu erhalten, wurden Kokristallisationsstudien durchgeführt. Die Kristalle wurden am Synchrotron (*swiss light source (SLS)* des Paul Scherer Instituts, Villingen (Schweiz)) vermessen, um bestmögliche Beugungsdaten zu erhalten. Sowohl für die fehlerfreie als auch die fehlerhafte Replikation lieferten die erhaltenen kristallographischen Daten Auflösungen von 1.7 bis 2.7 Å der beiden Formamidopyrimidine (Abbildung 30).

Die Prozessierungsdaten und Strukturverfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 16, die jeweils verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 19 (s. Anhang) aufgeführt.

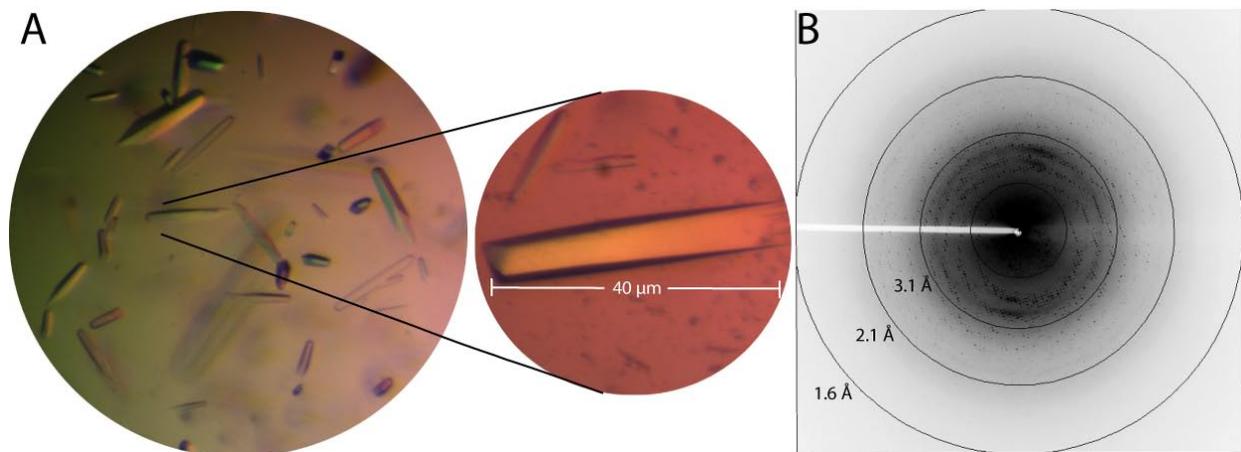


Abbildung 30: A) Kristalle des Komplex von *GeoBst* Pol I mit DNA B) Streubild eines *GeoBst* Pol I Kristalls gemessen an der SLS in Villingen.

Um das Enzym im gewünschten Komplex mit der DNA des jeweiligen Formamidopyrimidins aufzuklären, wurde die entsprechende Gegenbase des Formamidopyrimidins mit dem Schadensstrang (=Templatstrang) hybridisiert und kristallisiert. Alternativ wurde die enzymatische Aktivität der Polymerase im Kristall genutzt. Dies wurde durch iteratives Umsetzen der Kristalle in einem triphosphathaltigen Puffer erreicht. Dabei konnte nach jeweils 48 h ein Einbau des entsprechenden Triphosphates erzielt werden.^[254, 279] (zum Mechanismus der Replikation vgl. Kap. 1.8.5)

3.1 Fehlerfreie Replikation des β -cFaPydA

Zunächst wird der fehlerfreie Replikationsweg des β -cFaPydA dargestellt. Vor der Replikation befand sich das β -cFaPydA in der sogenannten Prä-Insertionsstelle (Prä-Is) der Polymerase. Diese wird als n-Position bezeichnet (Abbildung 31).^[259]

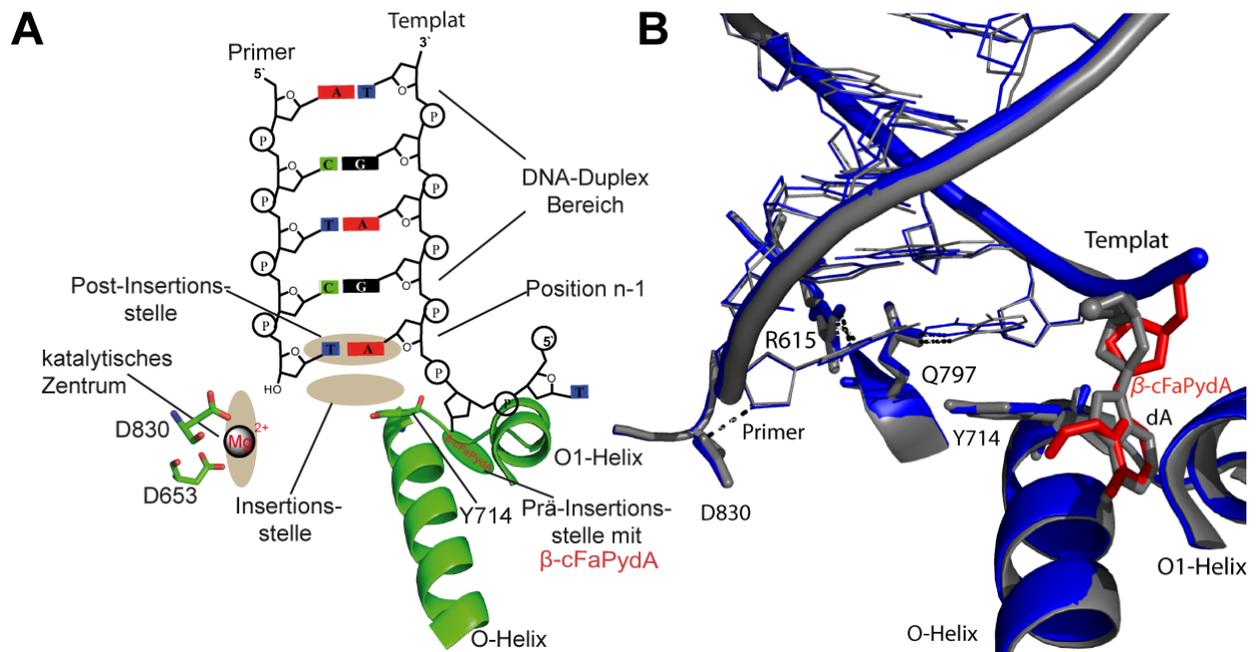


Abbildung 31: A) Schematische Darstellung von β -cFaPydA in der Prä-Is der Polymerase. B) β -cFaPydA in der Prä-Is, koordiniert zwischen den beiden Helices O und O1 in Überlagerung mit dA (PDB code 2HHT).

Das β -cFaPydA nimmt eine strukturell äquivalente Position wie ein ungeschädigtes dA (PDB code 2HHT) bezüglich des Heterozyklus ein.^[261] Beide Nucleotide liegen in *anti*-Konformation bezüglich ihrer *N,O*-glykosidischen Bindung vor,⁷ wobei die Polymerase jeweils eine offene Konformation einnimmt. Die beiden Aminosäuren Arginin 615 (R615) und Glutamin 797 (Q797) sind von wesentlicher Bedeutung für die Stabilisierung eines (neu geformten) Basenpaares in der Post-Is (n-1). Die erhaltene Struktur war die einzige Struktur, die keine Verzerrung („*open distorted conformation*“) hinsichtlich der beiden Helices O und O1 zeigte, was sich an der exakten Überlagerung der beiden Tyrosine 714 (Y714) erkennen lässt (vgl. Abbildung 15 B).^[279]

Durch die Koordinierung des neu einzubauenden Triphosphates im katalytischen Zentrum beginnt ein Replikationszyklus. Die Polymerase geht dabei in die geschlossene Konformation über (Abbildung 32), was durch eine Konformationsänderung der O und O1 Helix erreicht wird. Dies führt zu einem „Hereinklappen“ des in der Prä-Is befindlichen β -cFaPydA in die Insertionsstelle der Polymerase.^[274] Dieser Ablauf der Replikation wird durch theoretische Studien des Übergangszustandes beider Stadien, der offenen und geschlossenen Konformation, gestützt.^[258]

⁷ Pyrimidin Basen liegen normalerweise in *anti*-Konformation in der Prä-Is vor. Für Purin Nucleotide wurden sowohl *syn*- als auch *anti*-Konformationen beobachtet.

Im katalytischen Zentrum koordiniert das Triphosphat zwei Mg^{2+} Ionen. In diesem in Abbildung 32 dargestellten Übergangszustand kommt es zu einem nukleophilen Angriff der 3'-OH-Gruppe der Primerbase auf die α -Phosphatgruppe des Triphosphats unter Ausbildung der kovalenten Bindung des Phosphodiesters.

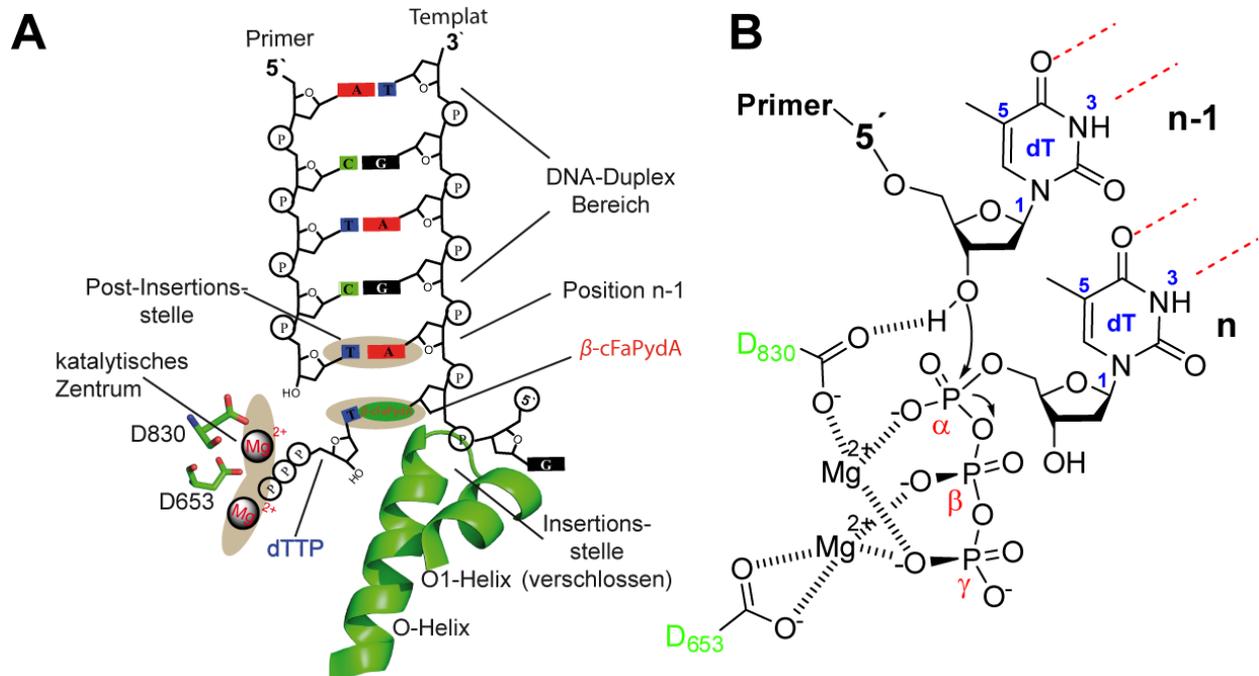


Abbildung 32: A) Schematische Darstellung des Triphosphateinbaus im katalytisch aktiven Zentrum der Polymerase. B) Mechanismus der Mg^{2+} -katalysierten Phosphodiestersynthese zwischen einem Thymin und seinem Triphosphat im wachsenden DNA-Primer.^[94]

Die Prä-Is ist während der geschlossenen Konformation der Polymerase blockiert, so dass sich kein neues Nukleotid des Matrizenstranges zwischen O und O1 befindet. Durch die Abspaltung des Pyrophosphats kommt es zur Öffnung der Polymerase und zur Translokation des DNA-Stranges.^[258] Dabei paart das β -cFaPydA stabil mit dT in der Post-Is (Abbildung 33).

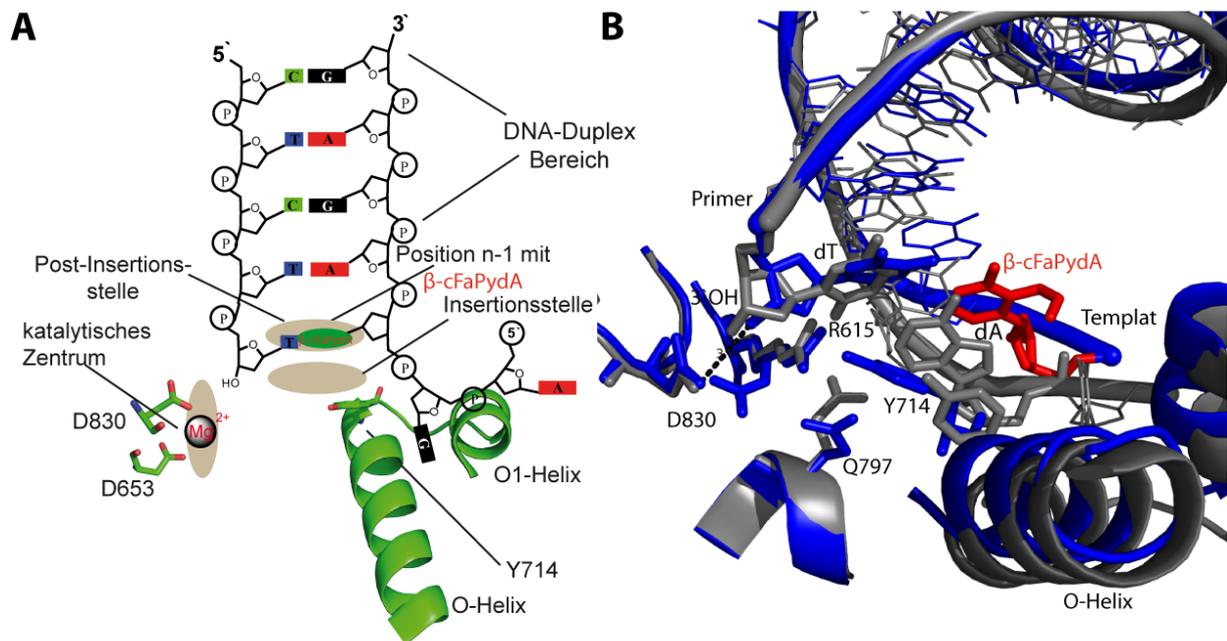


Abbildung 33: A) Schematische Darstellung von β -cFaPydA nach der Insertion von dTTP unter Ausbildung eines Watson-Crick-Basenpaares. B) β -cFaPydA (rot) überlagert mit dA:dT (grau, PDB code 1L3T)^[259], gegenüber dT (grau) in der Post-Is der *high-fidelity* Polymerase.

Für eine durch dTTP-Inkorporation im Kristall erhaltene Struktur, als auch für diejenige, die durch Kristallisation mittels eines vorhybridisierten β -cFaPydA enthaltenden Duplex kristallisiert wurde, konnten keine strukturellen Unterschiede im direkten Vergleich zueinander ermittelt werden. Vergleicht man die erhaltenen Strukturen mit der eines ungeschädigten dA:dT Basenpaares (nach der hier konsistent verwendeten Notation: Primerbase: Templatbase) im aktiven Zentrum der Polymerase, ergibt sich eine Verzerrung des Templatstranges (blau) von β -cFaPydA im Vergleich zum Templatstrang mit dA (Abstand der beiden C1'-C1'-Atome = 4.3 Å). Im Gegensatz hierzu zeigten beide Primerstränge kaum Verzerrung (C1'-C1' < 1.5 Å – Abbildung 34).

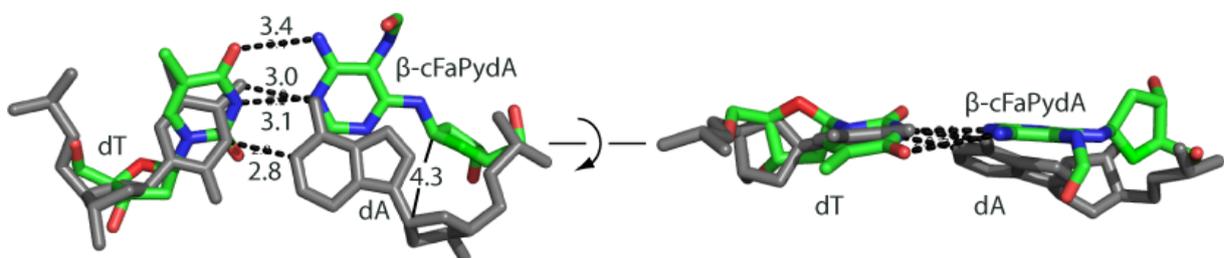


Abbildung 34: Überlagerung von dT: β -cFaPydA mit einem ungeschädigten dT:dA Basenpaar grau, (PDB code 1L3T)^[259].

Die Polymerase nimmt somit in der Schadstruktur eine offene, verzerrte („open distorted“) Konformation ein, wie sie für zahlreiche fehlgepaarte Nukleotide bzw. für ein dC: 8-oxodG

bereits beobachtet wurde.^[237, 279] Die beiden Helices O und O1 der Prä-Is sind in ihrer Position versetzt, nehmen aber nach wie vor eine Position ein, wodurch der Eintritt einer neuen Templatbase in die Prä-Is blockiert wird. Diese Konformation zeigt sich signifikant an Y714, sowie an den Helices O und O1 (siehe Abbildung 33).^[237, 279] Das Y714 stapelt in der Schadstruktur (blau) über beiden Basen (β -cFaPydA und dT), während in der ungeschädigten Struktur (grau) nur die Position der Templatbase dA stabilisiert wird.

Die Aminosäure Asparagin 830 (D830) ist in beiden Fällen in der Lage, das 3'-OH Ende der Primer zu koordinieren bzw. für die nächste Triphosphatinsertion zu aktivieren.

R615 koordiniert beide Primerbasen am O2 des Pyrimidinringes. Die Aminosäure Q797 zeigt keine Interaktionen mit der Templatbase β -cFaPydA.^[3, 237] Die in der Elektronendichte definierte Formamidgruppe des β -cFaPydA ist nicht an einer Basenpaarung beteiligt und steht orthogonal zum Pyrimidinring des Schadenanalogons.

Weiterhin zeigt das β -cFaPydA in der Post-Is eine alternative Konformation gegenüber dT. Zu etwa 5 % (positive F_o-DF_c Elektronendichte Differenz – in Abbildung 35 rot dargestellt) lag das β -cFaPydA durch eine Rotation um die C(4)-N(9) Bindung in einer *Wobble*-Position vor.

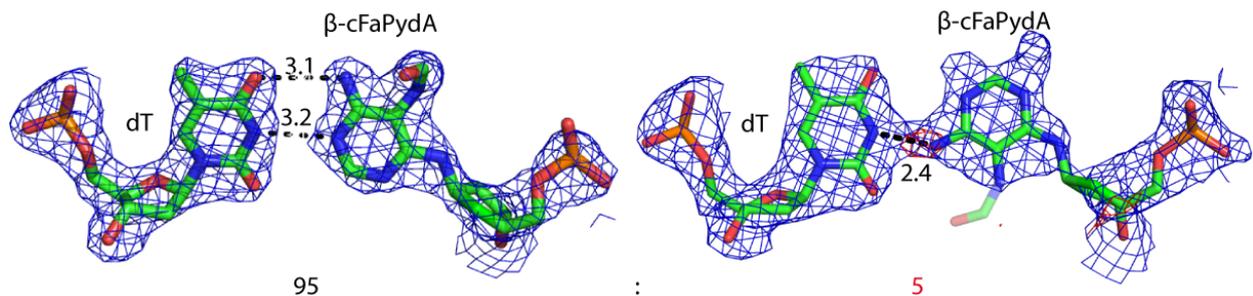


Abbildung 35: Alternative Konformation (*low-occupancy* ~ 5 % - rote Elektronendichte) des β -cFaPydA-Schadens mit dT. Die $2F_o-DF_c$ (blau) und F_o-DF_c (rote) Elektronendichte sind bei 1σ bzw. 2.5σ konturiert. Für die Formamidgruppe der alternativen Konformation ist aufgrund ihrer Flexibilität sowie geringen Okkupanz keine Elektronendichte vorhanden.

In der alternativen Konformation besteht eine attraktive Wechselwirkung zwischen dem $N(6)H_2$ (β -cFaPydA) und dem $N(3)$ des dT. Bei beiden Positionen handelt es sich jedoch um H-Brückendonoren. Für eine stabile Wasserstoffbrückenbindung ist daher eine Tautomerie einer der beiden Basen erforderlich, damit entweder $N(3)$ oder $N(6)H_2$ zum H-Brückenakzeptor wird. Eine tautomere Struktur im aktiven Zentrum der *GeoBst* Pol I wurde bereits im Zusammenhang mit einer dA:dC Fehlpaarung beobachtet (Abbildung 36). Fehlpaarungen, die durch Tautomerie starke Wechselwirkungen bilden, werden im Zusammenhang mit der Entstehung natürlicher Mutationen diskutiert.^[265, 279, 358]

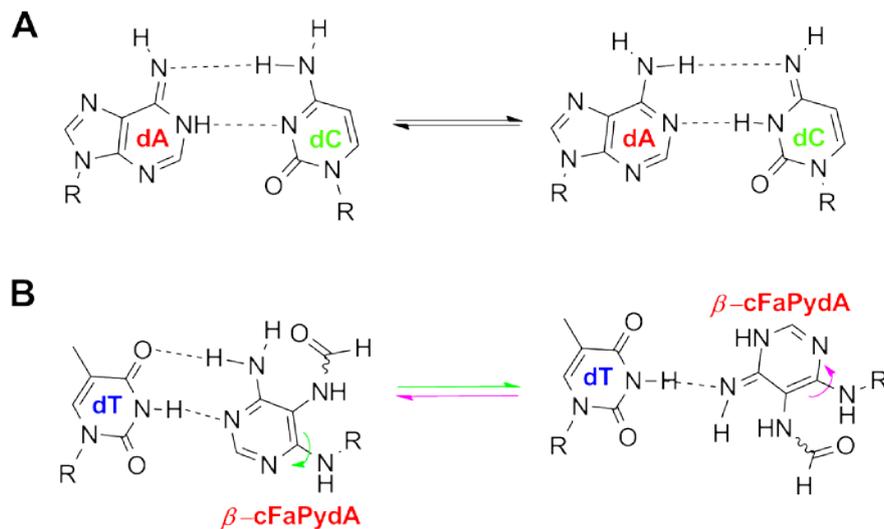


Abbildung 36: A) Ausbildung eines stabilisierten dA:dC Basenpaares aufgrund von Tautomerie. B) Für ein alternative Konformation und Basenpaarung mit dT (5 %) ist entweder eine Tautomerie des β -cFaPydA oder von dT nötig.^[265]

Auch für die einfache Inkorporation von dCTP gegenüber dem β -cFaPydA bieten die beobachteten tautomeren Grenzstrukturen eine Erklärung (vgl. Kap. 2.5.2 –Abbildung 24). Dennoch ist die Inkorporation des Pyrimidintriphosphates von dCTP gegenüber dem β -cFaPydA, wohl auch aufgrund der geringeren Größe von dCTP und der Flexibilität des Formamides, begünstigt.

Trotz des verzerrten Schadensstranges in der Post-Is ist die Pol I in der Lage, bei Zugabe von dTTP, den Primer für dessen nicht mutagenen Paarungsfall zu verlängern, da das Primerende mit der angrenzenden katalytisch aktiven Seite unverändert bleibt.

Eine fehlerfreie Replikation des β -cFaPydA bis zur n-3 Position konnte nach Inkubation von Kokristallen in dTTP haltigem Puffer erreicht werden, wobei dem Schaden im Templatstrang **ODNFaPydA22** zweimal dA nachfolgte. Auch im DNA-Duplexbereich (n-3 Position) zeigte sich eine *Watson-Crick*-Basenpaarung des Schadenanalogons (Abbildung 37).

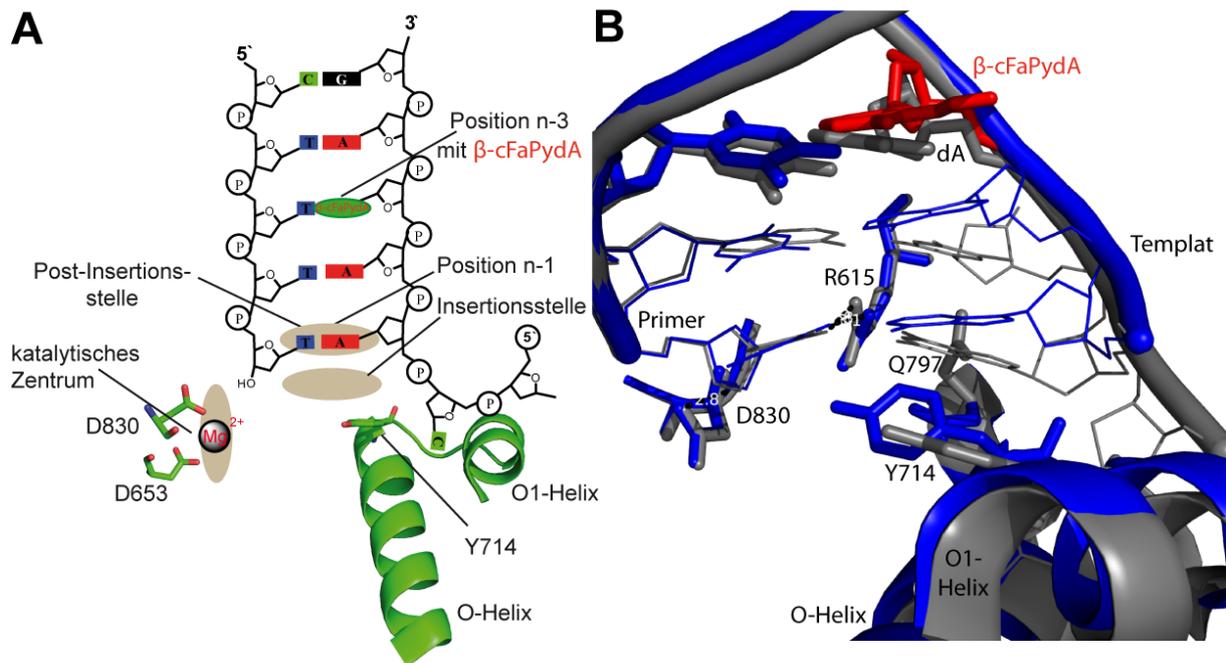


Abbildung 37: **A)** Schematische Darstellung von β -cFaPydA (rot) im DNA-Duplex-Bereich **B)** Überlagerung von dT: dA (grau – PDB code 1L5U)^[259] und β -cFaPydA (rot) gegenüber dT (blau) im DNA-Duplex-Bereich der Polymerase (n - 3 Position).

Der β -cFaPydA-Schaden induzierte in der Position n-3 kaum noch Verzerrungen im Rückgrat der DNA. Die Formamidgruppe ist hier nicht in der Elektronendichte definiert, was die hohe Flexibilität der funktionellen Gruppe bestätigt. Die 3'-OH-Gruppe des Primers wird mittels einer Wasserstoffbrücke von D830 koordiniert. Die Bindungsabstände der beiden Aminosäuren R615 und Q797 sind vergleichbar mit ungeschädigten DNA-Basen in der der Post-Is. Allerdings ist das Y714 der Schadensstruktur (blau) in einer offenen, verzerrten Konformation der Polymerase im Gegensatz zur ungeschädigten Struktur (grau).

Insgesamt betrug die Distanz der Translokation des β -cFaPydA durch Katalyse im Kristall von der Prä-Is (Abbildung 31) bis zum DNA-Duplexbereich der Position n-3 (Abbildung 37) 15.5 Å.

3.2 Strukturelle Grundlagen der fehlerhaften Insertion von dG gegenüber β -cFaPydA

Nach der Darstellung der fehlerfreien Replikation von β -cFaPydA wurde die fehlerhafte Insertion von β -cFaPydA mit dG oder dC (siehe Ergebnisse der Nucleotidinsertionen Kap. 2.5.2) näher untersucht. Mittels eines vorhybridisierten DNA-Duplex gelang es, ein dG: β -cFaPydA-Basenpaar innerhalb der Post-Is der Pol I zu erhalten (Abbildung 38).

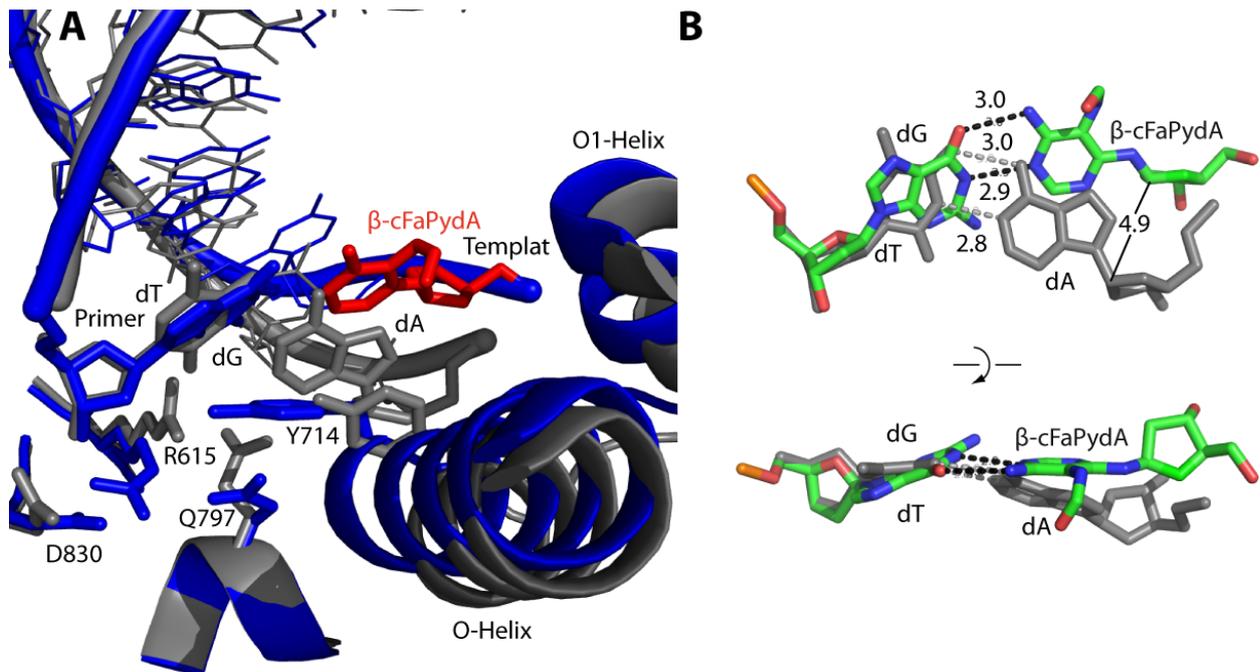


Abbildung 38: **A)** β -cFaPydA (rot) und dA (grau – PDB code 1L3T)^[259] gegenüber dG (blau) und dT (grau). **B)** Vergleich der Bindungsabstände (in Å) und Wasserstoffbrückenbindungen des dT:dA Basenpaares mit dem dG: β -cFaPydA.

Dabei bildet das β -cFaPydA zwei attraktive Wasserstoffbrückenbindungen mit dG aus. Der Abstand der beiden C1'-C1'-Kohlenstoffe von dA und β -cFaPydA beträgt 4.9 Å, was die Verzerrung der Fehlpaarung gegenüber einem ungeschädigten dT:dA Basenpaar zeigt. Die Aufweitung des Phosphodiesterückgrates und die Verschiebung des β -cFaPydA in Richtung der großen Furche der DNA führen in der Polymerase zu einem höheren Grad an Verzerrung im Vergleich zum dT: β -cFaPydA Basenpaar (4.3 Å). Die Aminosäure D830 besitzt mit 3.2 Å zur 3'-OH-Gruppe des Primers einen Abstand, der noch im Bereich einer stabilen Wasserstoffbrücke mit dem Primerende liegt. Ihre Konformation unterscheidet sich jedoch vom D830 (grau) der Vergleichsstruktur. Durch die alternative Konformation der Aminosäure R615 (blau) ist keine Wasserstoffbrückenbindung mit der Primerbase dA (blau) möglich. Ebenso kann das Q797 infolge der Verzerrung des β -cFaPydA zu keiner Stabilisierung der Templatbase beitragen. Die C1'-C1'-Kohlenstoffatome der beiden Primerbasen dG (blau) und dT (grau) zeigen einen Abstand von 0.7 Å (vgl. Abbildung 38 B).

Vergleicht man eine dA:dG Fehlpaarung mit dem dG: β -cFaPydA Basenpaar (Abbildung 39 B), wird deutlich, dass das dG: β -cFaPydA Basenpaar eine Mittelstellung zwischen ungeschädigter DNA und der Purin-Purin-Fehlpaarung einnimmt. Eine umgekehrte Konstellation eines dG:dA Basenpaars war stark verzerrt (PDB code 1NK7) und konnte von Johnson *et al.* an dieser Position nicht gezeigt werden.^[279]

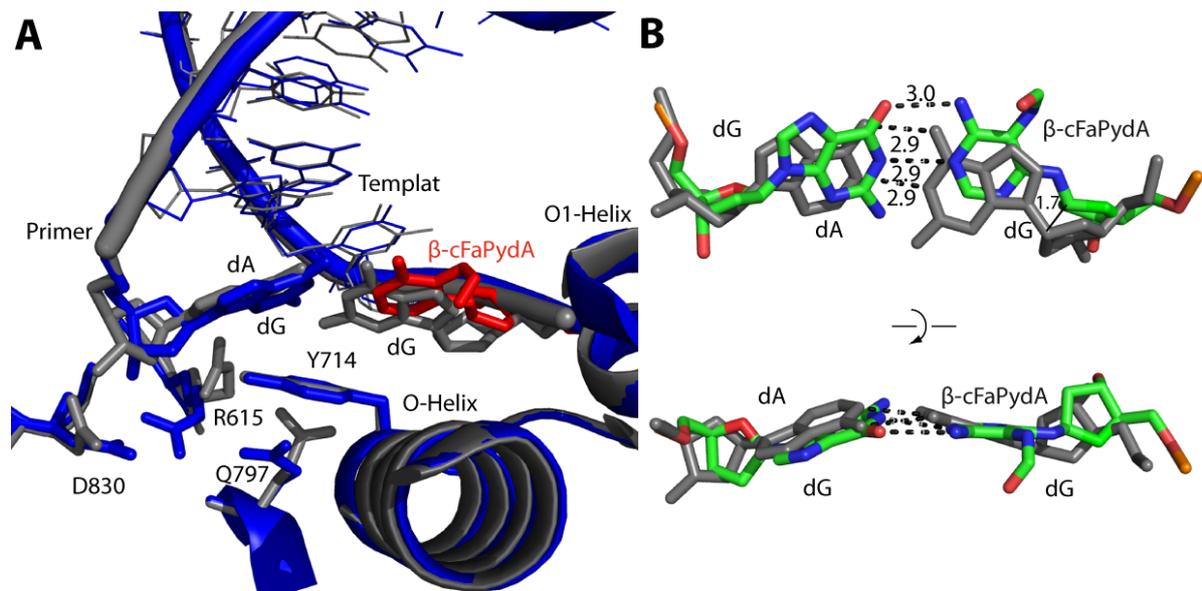


Abbildung 39: A) Überlagerung der dA:dG Fehlpaarung (PDB code 1NK0) im Vergleich mit dem dG:β-cFaPydA Basenpaar in der Post-Is der *GeoBst* Pol I.^[279] B) Beide Basenpaare mit den Bindungsabständen ihrer stabilisierenden Wasserstoffbrücken sowie der Abstand der C1'-Atome.

Die dA:dG Fehlpaarung zeigt eine stärkere Krümmung des Templatstranges zur großen Furche hin.^[279] Die dG:β-cFaPydA Fehlpaarung wird im aktiven Zentrum der *high-fidelity* Polymerase somit besser toleriert als der dA:dG Purin-Purin *mismatch*. Allerdings nimmt die Polymerase in beiden Fällen die verzerrte Konformation ein.

Die Primer Verlängerungen *in vitro* zeigten, dass dTTP gegenüber β-cFaPydA bevorzugt eingebaut wird (vgl. hierzu Kap. 2.7.2). Hier gelang es nicht, die fehlerhafte Replikation mittels dGTP im Kristall zu erreichen. Ebenso schlugen alle Versuche fehl, ein stabiles Basenpaar von dC gegenüber β-cFaPydA in der Post-Is der Post-Is zu erhalten. Weder ein vorhybridisiertes dC:β-cFaPydA Konstrukt, noch Inkubation von Kristallen mit dCTP führten zu einem stabilisierten Basenpaar in der Post-Is der Polymerase.

3.3 Molekulare Basis für die fehlerfreie Replikation des β-cFaPydG

Analog zum β-cFaPydA wurde die *GeoBst* Pol I mit dsDNA und ungepaartem β-cFaPydG kristallisiert. Im Gegensatz zum β-cFaPydA ist hier das β-cFaPydG jedoch nicht in der Prä-Is, koordiniert durch die Helices O und O1 lokalisiert, sondern außerhalb der beiden Helices (Abbildung 40). Aufgrund der hohen Flexibilität des Schadens ist der Heterozyklus nur teilweise in der Elektronendichte definiert. Eine anschließende Untersuchung eines Kristalls mittels MALDI-TOF zeigte jedoch, dass der Templatstrang nach wie vor intakt war, und die fehlende Elektronendichte nicht auf eine Zersetzung der Modifikation zurückzuführen war.

Nach dem Übergang zur Insertionsstelle geht das Templatnukleotid in eine *anti*-Konformation über und ermöglicht somit eine korrekte *Watson-Crick*-Basenpaarung mit dem komplementären dNTP.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltene Struktur gibt lediglich Aufschluss über den hochflexiblen Charakter des Schadens, läßt aber keine Schlüsse bezüglich seiner Konformation zu.^[3]

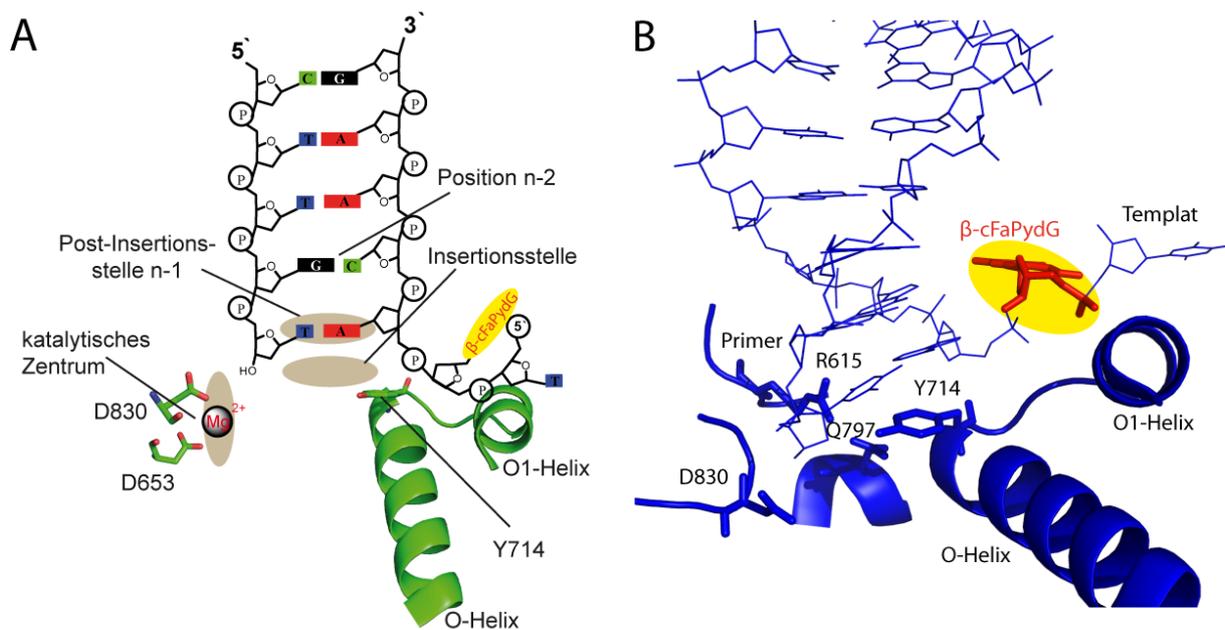


Abbildung 40: A) Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Pol I des *GeoBst*; β -cFaPydG (rot). B) Position des β -cFaPydG außerhalb der beiden Helices O und O1 der Prä-Is.

Dass eine modifizierte Templatbase eine Position außerhalb der Prä-Is einnehmen kann, wurde bereits in früheren Kristallisationsstudien der Pol I mit dG-AAF (**10**, R = Ac) beschrieben.^[50]

Allerdings ist das dG-AAF-Addukt sterisch wesentlich anspruchsvoller und konnte durch die Pol I nicht weiter repliziert werden. Innerhalb derselben Studie konnte jedoch das dG-AF (**10**, R = H) bzw. der Aminofluoren-Teil in der Prä-Is lokalisiert werden. Der Guanosin-Teil des Addukt-Schadens lag außerhalb der beiden Helices O und O1. Somit war der Einbau eines dCTP gegenüber dG-AF aufgrund des *syn*- (Prä-Is) nach *anti*-Überganges (Post-Is) und eines korrekten *Watson-Crick*-Basenpaares möglich. Auch die weitere nicht-mutagene Replikation des Addukt-Schadens konnte von *Hsu et al.* gezeigt werden.^[50]

Im nächsten Schritt wurde der korrekte dCTP Einbau gegenüber β -cFaPydG im aktiven Zentrum der Polymerase (Position n-1) untersucht.

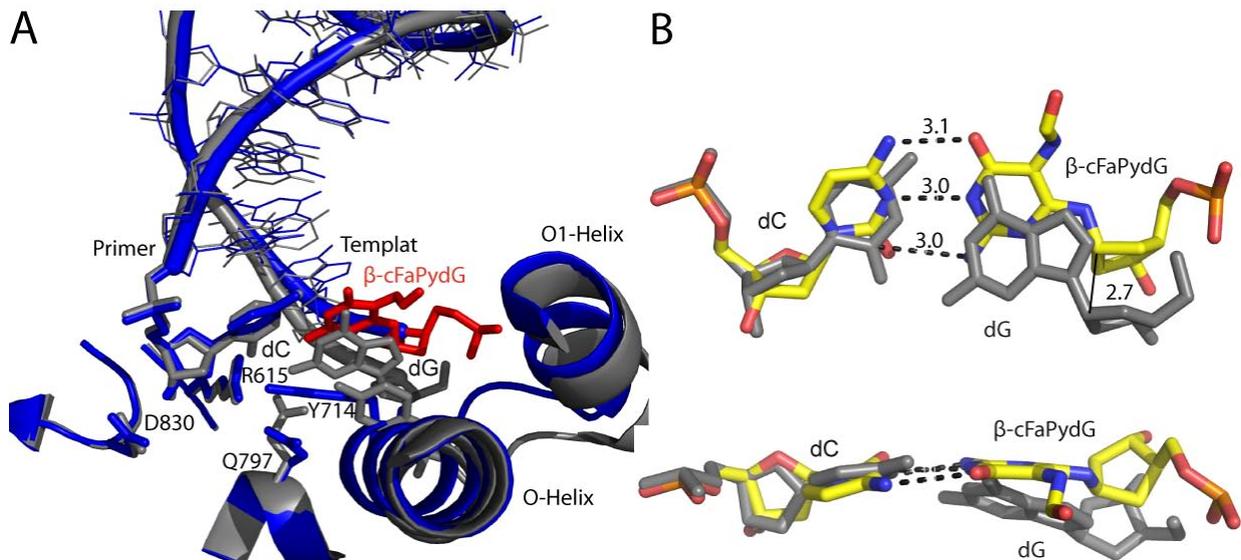


Abbildung 41: A) Basenpaar dC: β -cFaPydG überlagert mit einem intakten dC: dG Basenpaar (PDB code 1L3V)^[259]. B) Überlagerung der isolierten Nucleotide der Post-Is. Der Abstand der beiden C1'-Kohlenstoffatome der Templatbasen dG und β -cFaPydG beträgt 2.7 Å.

Sowohl bei der Verwendung eines vorhybridisierten Primer-Templatstranges als auch bei der Replikation im Kristall, nimmt der β -cFaPydG-Schaden gegenüber dem dC eine *anti*-Konformation ein und zeigt ein *Watson-Crick*-Basenpaarungsmuster mit drei attraktiven Wasserstoffbrückenbindungen. Das β -cFaPydG besitzt somit ein Basenpaarungsverhalten wie ein ungeschädigtes dG, wodurch die hohen Einbauraten von dCTP gegenüber β -cFaPydG erklärt werden können (vgl. Kap. 2.7.2).^[158] Die Aminosäure D830 koordiniert die 3'-OH Funktion des Primerendes. Sowohl G615 als auch Q797 befinden sich außerhalb von Wasserstoffbrücken-Abständen und koordinieren weder die Primerbase dC noch die Templatbase β -cFaPydG. Insbesondere das Q797 zeigt eine Konformation, die nicht wie bei dG in die Richtung des N2 des β -cFaPydG zeigt. Die Polymerase nimmt auch hier die offene, verzerrte Struktur mit einem Y714 ein, welches sowohl mit dem Primerende als auch mit dem β -cFaPydG stapelt.^[259]

3.4 Molekulare Basis zur fehlerhaften Replikation des β -cFaPydG

Die *Primer Extension* basierende Pyrosequenzierungen zeigten (Kapitel 2.7.2), dass in 11 % aller Fälle die *GeoBst* Pol I ein dATP gegenüber dem β -cFaPydG inkorporiert. Auch frühere Arbeiten von *Greenberg* weisen auf den Einbau von dATP gegenüber natürlichem FaPydG hin.^[168, 302] In der Struktur von *GeoBst* Pol I wurde durch Replikation im Kristall ein stabiles dA: β -FaPydG Basenpaar mit zwei Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum der Polymerase ausgebildet (Abbildung 42). Der Abstand der beiden C1'-Kohlenstoffatome beträgt im

Templatstrang zwischen β -cFaPydG und ungeschädigtem dG 4.0 Å und spiegelt den Grad der Verzerrung im Vergleich zu einem intakten dC: dG Basenpaar wider.

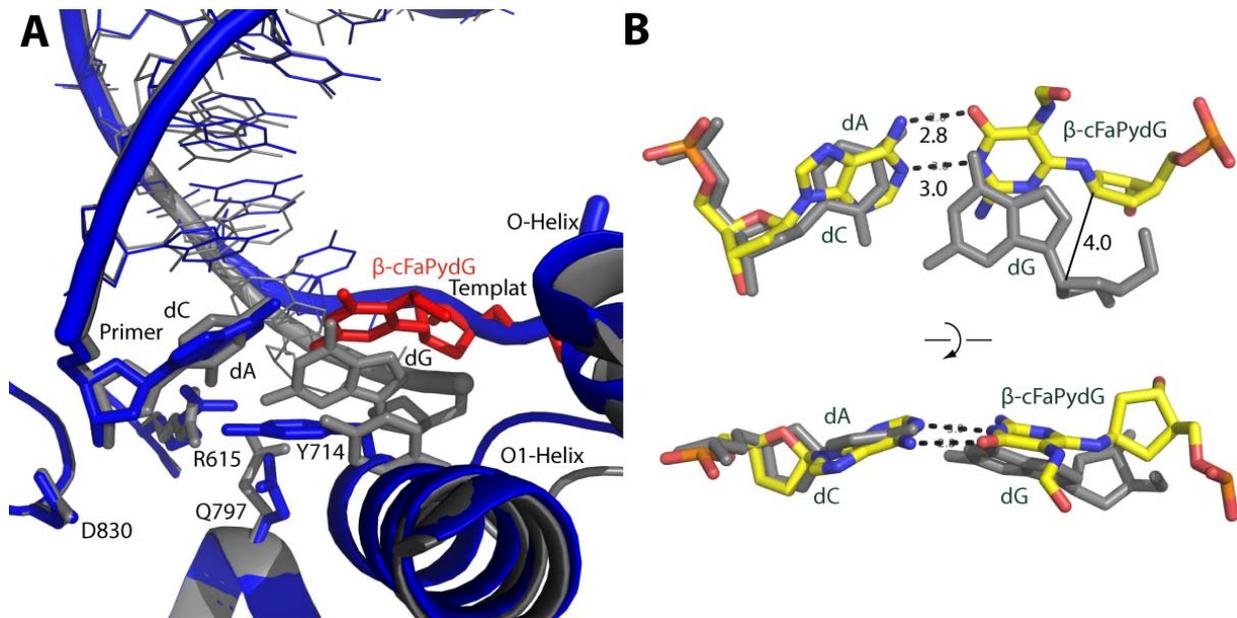


Abbildung 42: **A)** Struktur des fehlerhaft insertierten dA gegenüber β -cFaPydG im Vergleich zu einem intakten dC: dG (PDB code 1L3V) Basenpaar.^[259] **B)** Überlagerung der isolierten Nukleotide der Post-Is mit Bindungsabständen.

Das Enzym nimmt sowohl in der vorliegenden Struktur, als auch in einem von *Beese* kristallisierten dA:dG Mismatch (PDB code 1NK0) wiederum die offene, verzerrte Konformation ein (Abbildung 43). Weiterhin führte das dA:dG Fehlpaarung zu einer Verzerrung des Primerstranges.^[279] Die Struktur des dA:dG Mismatch zeigt im Bereich des Y714 eine Translokation von 0.9 Å im Vergleich zur dA: β -cFaPydG Struktur. Weiterhin sind in beiden Strukturen die gleichen Abstände zwischen Y714 und Matrizen- und Primärbase beobachtbar. Im Falle des dA:dG sind die beiden Helices O und O1 nochmals weiter in Richtung zur Primärbase verschoben als beim dA: β -cFaPydG Basenpaar. Die Wasserstoffbrückenbindungen beider 3'-Hydroxygruppen der Primärbasen mit dem jeweiligen D830 bleiben intakt. Im Falle der Struktur von dA gegenüber dem β -cFaPydG ist der Abstand der 3'-OH Gruppe des Primers geringfügig (~ 0.4 Å) kürzer, was möglicherweise die weitere Replikation des dA: β -cFaPydG Basenpaares durch die stabilere Koordination begünstigt.

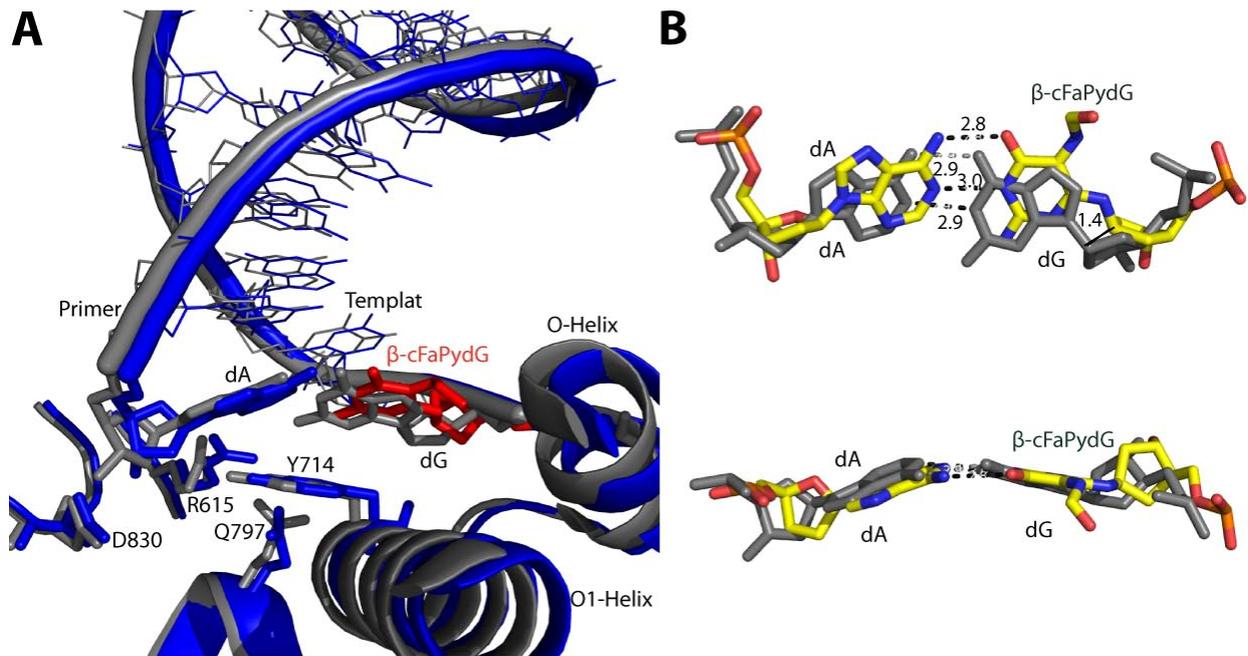


Abbildung 43: A) dA: β -cFaPydG Basenpaar im Vergleich mit einem dA: dG Basenpaar (PDB code 1NK0).^[279] B) Vergleich der beiden Fehlpaarungen mit Wasserstoffbrückenabständen.

Beide Strukturen zeigen keine Wechselwirkung der Templatbasen β -FaPydG oder dG mit Q797. Grund hierfür ist die Verzerrung bzw. Ausdehnung der Templatstränge. Die Wechselwirkung des R615 mit den beiden dA Primerbasen sind intakt und liegen mit jeweils 3.1 Å im selben Bereich.

Das Basenpaar ist durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den N1 - N1H Atomen und den O6 - N6H₂ (Abbildung 43 B) stabilisiert. Der Templatstrang zeigt eine starke Verzerrung im Vergleich zu dC: β -cFaPydG. Dennoch ist die Polymerase in der Lage, das dA: β -cFaPydG Basenpaar im Kristall zu verlängern. Die Struktur der Abbildung 43 zeigt, dass das Enzym die erhöhte Spannung in der Post-Is durch eine Drehung der Templatbase dA von etwa 10° hin zu großen Furche der DNA kompensiert. Dies hat zur Folge, dass weder dA: β -cFaPydG noch das nachfolgende dT: dA Basepaar planar sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit einem vorhybridisierten Primer: Templat-Konstrukt (dT: β -cFaPydG) zeigten für die Position des β -cFaPydG-Schadens eine Elektronendichte im aktiven Zentrum der Polymerase, die sich keiner stabilen Basenpaarung von β -cFaPydG mit dT zuordnen ließ.

Für den Einbau von dTTP ergab sich eine stabile Struktur des β -cFaPydG in *anti* Konformation gegenüber dT.^[3] Die erhaltene Struktur zeigte ein Histin (His829), welches sich zwischen dem katalytisch aktiven Zentrum und dem insertierten dT der Post-Is befand. Trotz verlängerter Inkubationszeiten und erhöhter dTTP Konzentration wurde diese dT: β -cFaPydG Fehlpaarung

durch die *GeoBst* Pol I nicht weiterrepliziert. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierung (Kap. 2.7.2).

Die Frage, ob eine Polymerase eine Fehlpaarung innerhalb ihres aktiven Zentrums weiter replizieren kann, bildet eine weitere wichtige Information in Bezug auf das mutagene Potential eines DNA-Schadens. Sollte die fehlinsertierte Basenpaarung eine zu starke Inhibierung der Polymerase zur Folge haben, ist die Möglichkeit einer Abdissoziation der Polymerase oder die Hydrolyse der Fehlpaarung durch eine nachfolgende Exonukleaseaktivität sehr wahrscheinlich. Somit war es von großem Interesse, das Replikationsverhalten der *GeoBst* Pol I bezüglich des dA: β -cFaPydG bzw. dT: β -cFaPydG Basenpaares (nach der Post-Is) zu untersuchen. Vor dem Hintergrund der vorher durchgeführten Analysen der Primerverlängerungsreaktionen durch Pyrosequenzierung kam es in 11 % aller Fälle für eine dA: β -cFaPydG Basenpaarung zu einer vollständigen Verlängerung. In 89 % aller Fälle wurde dCTP gegenüber β -cFaPydG eingebaut. Für das β -cFaPydG konnte lediglich mit dA eine Verlängerung der Fehlinsertion im Kristall erreicht werden. Insgesamt betrug die Entfernung der Translokation durch die Replikation im Kristall 9.6 Å (Register Position n bis Position n-2).

Das im DNA-Duplexbereich lokalisierte dA: β -cFaPydG Basenpaar (Abbildung 44) zeigte gegenüber dem dA: β -cFaPydG Basenpaar in der Post-Is eine geringere Verzerrung des DNA-Rückgrates. Ein allgemeiner Vergleich erfolgte mit einem dC: dG Basenpaar (PDB code 2HVI).^[261]

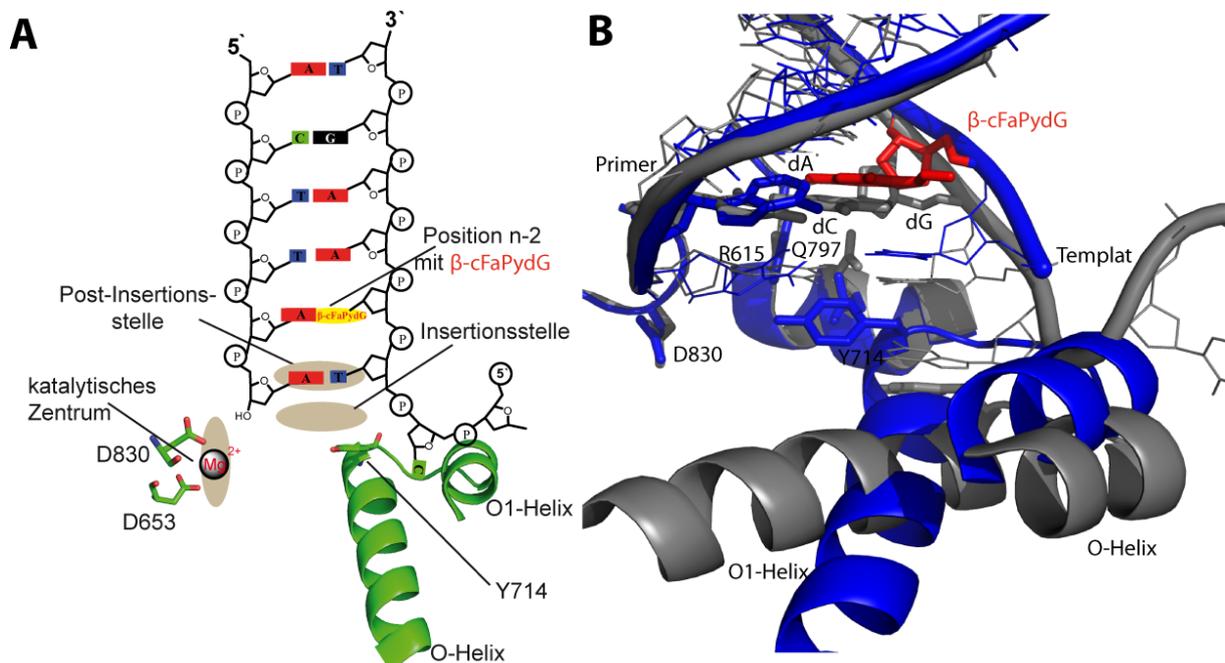


Abbildung 44: A) Schematische Darstellung der n-2 Position des β -cFaPydG. B) Premutagenes dA: β -cFaPydG Basenpaar im Vergleich zu einem ungeschädigten dC: dG Basenpaar an der n-2 Position der Polymerase (PDB code 2HVI)^[261]

Der Abstand der beiden C1'-Kohlenstoffatome von dG und β -cFaPydG betrug in dieser Position 2.3 Å und ist somit gegenüber der n-1 Position um 1.7 Å verringert. Der Abstand des D830 zur Primerbase in der Post-Is liegt bei 2.8 Å, was die weitere Replikation des dA: β -cFaPydG erklärt. Das dA gegenüber dem β -cFaPydG ist nach wie vor leicht aus der horizontalen Ebene gedreht, was sich noch auf die Base in der Post-Is auswirkt. Aufgrund dieser Verdrehung besitzt die Base in der n-1 Position keinen Kontakt mit dem G615. Auch die Templatbase dT in der Post-Is zeigt keine Koordination mit dem Q797.

Die Fähigkeit der *GeoBst* Pol I, das dA: β -cFaPydG Basenpaar zu replizieren, zeigt das mutagene Potential des Formamides. *Johnson et al.* war es nicht gelungen, die kristallisierte dA: dG Fehlpaarung im Kristall weiter zu replizieren.^[279]

3.5 Vergleich der Replikation von β -cFaPydG mit 8-oxodG

Das 8-oxodG zeigt anders als das β -cFaPydG die Fähigkeit, neben der Ausbildung eines normalen dC: *anti* 8-oxodG *Watson-Crick* Basenpaares weiterhin durch Rotation um seine *N,O*-glykosidische Bindung um 180° ein stabiles *Hoogsteen*-Basenpaar in *syn*-Konformation mit dA auszubilden.^[237, 239, 359] Für den Fall der fehlerfreien Replikation von 8-oxodG (*anti*-Konformation) beim Einbau von dCTP innerhalb der *GeoBst* Pol I, ist der Templatstrang im Vergleich zu einem intakten dG: dC Basenpaar verzerrt, um eine Abstoßung des O8-Sauerstoffs des 8-oxodG mit dem Desoxyriboserückgrat zu vermeiden.^[3, 237] Einen strukturellen Vergleich von β -cFaPydG mit 8-oxodG für den fehlerfreien als auch für den fehlerhaften Einbau zeigt Abbildung 45. Somit reduziert sich für das dA: *syn* 8-oxodG Basenpaar die Spannungen innerhalb des aktiven Zentrums der Polymerase im Vergleich zum dC: *anti* 8-oxodG Basenpaar.^[237]

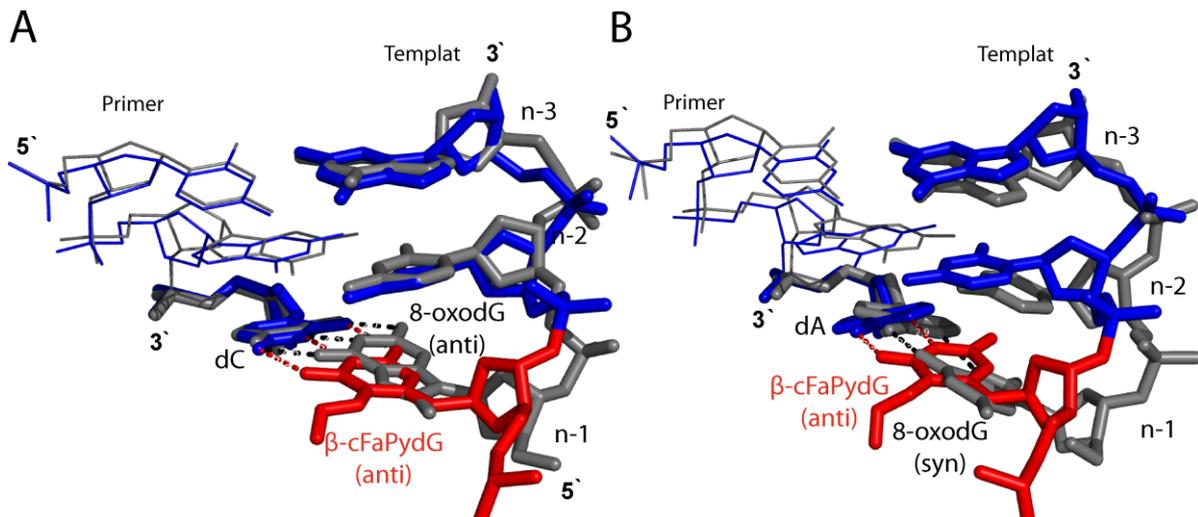


Abbildung 45: Überlagerung der Strukturen von β -cFaPydG und 8-oxodG: **A**) dC: *anti* β -cFaPydG mit dC: *anti* 8-oxodG (PDB code 1U47)^[237] **B**) dA: *anti* β -cFaPydG mit dA: *syn* 8-oxodG (PDB code 1U49)^[237, 291].

Da das β -cFaPydG im Gegensatz zum 8-oxodG lediglich in der *anti*-Konformation nachgewiesen werden konnte, reduzierte sich das mutagene Potential im Vergleich zum 8-oxodG. In lediglich 11 % aller vollverlängerten Primer zeigte sich die Möglichkeit einer G→T Transversion.

Im Vergleich der Strukturen zeigt das dC: β -cFaPydG gegenüber dem dC: 8-oxodG Basenpaar (Abbildung 45) eine ähnliche wenn auch etwas stärkere Delokation (Abstand C1' (β -cFaPydG) - C1' (8-oxodG) = 1.5 Å) im Templatstrang. Diese Verzerrung setzte sich von der Post-Is bis in das aktive Zentrum der Polymerase fort, was eine signifikante Änderung der Konformation der Aminosäuren Q797 und Y714 zur Folge hat. Die Wasserstoffbrücke zwischen Q797 und der kleinen Furche des dC: 8-oxodG-Nucleotidpaars wurde ebenso wie die π -Wechselwirkung zwischen Tyr714 und dem dC: 8-oxodG-Paar aufgehoben.

Der Abstand der beiden dT Basen an der n-1 Position des Primerstranges ist mit 0.6 Å bereits sehr gering, was zeigt, dass sich die Verzerrungen beider Schäden nicht weit in den DNA-Duplexbereich fortsetzen.

Bei der mutagenen Replikation und der Inkorporation von dATP gegenüber von 8-oxodG erfolgte beim Transport von der Prä-Is zur Post-Is keine Konformationsänderung von *syn* nach *anti*, was zur Ausbildung des *Hoogsteen*-Basenpaares gegenüber dem dA führt.^[237]

Der direkte Vergleich beider mutagenen Strukturen (Abbildung 45 **B**) zeigt für dA: β -cFaPydG eine deutlich höhere Delokation des DNA Rückgrates gegenüber dem dA:8-oxodG Basenpaar (Abstand C1' (β -cFaPydG) - C1' (8-oxodG) = 3.7 Å). Dies gibt eine mögliche Erklärung für die sechsfach höhere Einbaurate von dATP gegenüber dem 8-oxodG aus den

Primerverlängerungsstudien. Das 8-oxodG kompensiert die sterische Spannung der beiden Purinbasen im aktiven Zentrum der Polymerase nicht zuletzt durch die Drehung in die *syn*-Konformation. Das β -cFaPydG zeigt dieses Verhalten aufgrund seiner stabileren *anti*-Konformation und der orthogonal stehenden Formamidgruppe nicht.^[158] Auch eine attraktive Wasserstoffbrückenbindung wie sie für Q797 mit dem C8-Carbonylsauerstoff des *syn*-8-oxodG gefunden wurde, trat beim β -cFaPydG-Schaden auf.

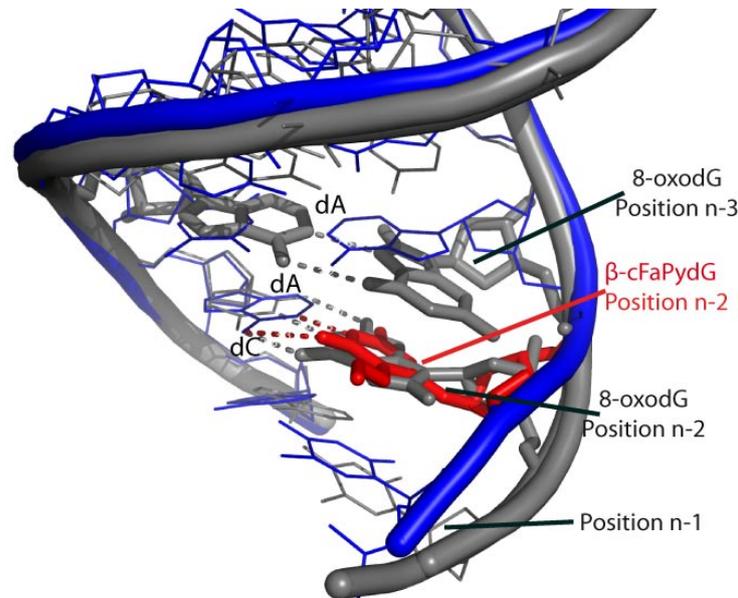


Abbildung 46: Detailansicht dA: β -cFaPydG (n-2) überlagert mit dC: 8-oxodG (Position n-2 - PDB code 1U48) dA: 8-oxodG (Position n-3 - PDB code 1U4B).

Weder das dC: *anti* 8-oxodG- noch das dA: *syn* 8-oxodG-Nucleotidpaar verursachen nach ihrer Replikation im Duplexbereich der DNA noch lokale Störungen im Rückgrat der DNA oder im aktiven Zentrum der Polymerase, wie es für die klassischen Fehlpaarungen beobachtet wurde.^[237] Die dA: *anti* β -cFaPydG Fehlpaarung führte ausschließlich zu einer lokalen Verzerrung des Cyclopentringes des Formamids und weicht von beiden 8-oxodG Strukturen deutlich ab. Die Primerstränge aller drei dargestellten Strukturen zeigen keine Unterschiede und sind untereinander fast deckungsgleich (Abbildung 46).

3.6 Zusammenfassung der Kristallisationsstudien

Die vorliegenden Strukturen zeigen erstmalig einen Replikationsvorgang stabilisierter Analoga der Formamidopyrimidine u.a. im aktiven Zentrum einer Polymerase der A-Familie.

Hierbei war es möglich, die beiden Schadensanaloga im aktiven Zentrum jeweils mit ihren korrekten Gegenbasen dT (β -cFaPydA) bzw. dC (β -cFaPydG) zu kristallisieren und ihre weitere fehlerfreie Replikation im Kristall zu katalysieren. Desweiteren konnte jeweils eine Fehlpaarung von dG mit β -cFaPydA und dA mit β -cFaPydG erhalten werden, wobei nur im

letzteren Fall von dA mit β -FaPydG eine Replikation im Kristall gelang. Im Falle des β -cFaPydA zeigte sich, dass ein dG: β -cFaPydA Fehlbasenpaar in der Post-Is der Polymerase nicht weiterrepliziert werden konnte.

Für das mutagene Potential eines DNA-Schadens ist somit nicht nur sein Basenpaarungsverhalten im Zentrum der Polymerase ausschlaggebend, sondern auch, ob nach einem Einbau gegenüber dem Schaden die Replikation fortgesetzt werden kann bzw. ob es zu einer Blockade der Polymerase kommt.

Beide Schadenanaloge sind somit nach wie vor in der Lage, natürliche *Watson-Crick*-Basenpaare auszubilden. Dies führt größtenteils zu einer fehlerfreien Replikation der Schäden mit dTTP im Falle des β -cFaPydA und dCTP für β -cFaPydG.

In den Fällen, in denen für die hochflexible Formamidgruppe Elektronendichte erhalten werden konnte, zeigte diese nicht in Richtung des DNA-Rückgrats, sondern senkrecht zum Heterozyklus, um einem energetisch unvorteilhaften 7-Ring auszuweichen. Aufgrund der ungehinderten Rotation weicht die Formamidgruppe dem DNA-Rückgrat aus. Dies führt dazu, dass die *anti*-Konformation und somit die Inkorporation von dTTP gegenüber β -cFaPydA und dCTP gegenüber β -cFaPydG deutlich begünstigt wird.

Die Formamidopyrimidine induzieren, als hoch flexible Schadstrukturen, aufgrund von drei zusätzlichen Freiheitsgraden eine geringere sterische definierte Geometrie des aktiven Zentrums der Pol I von *GeoBst*. Sowohl β -cFaPydA als auch β -cFaPydG zeigen Verzerrungen innerhalb ihrer Templatstränge, was die reduzierte Replikationseffizienz u.a. für die *high-fidelity* Polymerase I des *Geobacillus stearothermophilus* erklärt.

Die Aminosäure Q797, die in ungeschädigter DNA die Templatbase der Post-Is mittels Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, zeigen keine stabilisierenden Wechselwirkungen mit den Schadensanaloge. Auch die Aminosäure Y714 ist ihrer Position verglichen mit ungeschädigter DNA verändert. Sie weist im Vergleich zu ungeschädigten Strukturen zum katalytisch aktiven Zentrum hin. Weiterhin stapelt sie sowohl mit der Templatbase als auch der Primerbase in der Post-Is.

Der zu verlängernde Primerstrang sowie das katalytisch aktive Zentrum sind trotz eines veränderten Templatstranges in ihrer Position intakt. Die Aminosäure D830 koordiniert das freie 3'-OH Ende des Primers und aktiviert die Position für eine weitere Replikation. Somit lassen sich die hier erhaltenen Strukturen den klassischen dG: dT, dG: dG, dA: dC und dT: dC Fehlpaarungen zuordnen.^[3, 279]

Eine Paarung von dA mit β -cFaPydG in der *syn*-Konformation analog eines dA: *syn*8-oxodG Basenpaares wurde nicht beobachtet. Die Fehlinsertion von dATP gegenüber β -cFaPydG in

anti-Konformation im aktiven Zentrum der Polymerase ist das Resultat einer geringeren sterischen Definition des Formamidopyrimidins im aktiven Zentrum der Pol I in Kombination mit der Fähigkeit von β -cFaPydG, an drei Positionen stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Ein stabiles Wasserstoffbrückenbindungsmuster ist neben einem intakten katalytischen Zentrum eine Voraussetzung für eine Replikation von DNA-Schäden, was im Fall von FaPydG zu G→T Tranversionen führen kann.

4 Ausblick

Mit der Zunahme an Kristallstrukturen von Polymerasen erweitern sich die Erkenntnisse über die Replikationsprozesse in einer lebenden Zelle. Neben der Kristallisation noch nicht strukturell charakterisierter Polymerasen, bildet die Kokristallisation von DNA-Schäden mit bereits bekannten Polymerasen einen wichtigen Beitrag zu einem tieferen mechanistischen Verständnis der Replikation von geschädigter DNA.

Die Formamidopyrimidine bilden als Hauptprodukte der oxidativen Schädigung von DNA neben den 8-oxo-Purinschäden wichtige Substrate für weitere Kristallisationsstudien. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse für das β -cFaPydG zeigen signifikante Misinkorporationsraten für die Polymerasen der Y-Familie. Insbesondere für Pol κ , aber auch Pol η konnten hohe Fehlinkorporationsraten bei der Replikation des β -cFaPydG gezeigt werden. Das Ausmaß der Inkorporation von dATP gegenüber dem β -cFaPydG als auch dem 8-oxodG konnte hier erstmals quantifiziert werden. Bisher existieren noch keine Strukturen von Pol η , die die fehlerhafte Inkorporation von dATP gegenüber der beiden dG basierenden Schäden 8-oxodG und FaPydG von Pol η erklären würden. Das Verhalten der beiden hochflexiblen Formamidopyrimidine würde insbesondere in den großen aufgeweiteten aktiven Zentren von Pol η und Pol κ neue Einblicke in die Mechanismen ihrer TLS geben.

Die Einzelnukleotidinsertionen mit Pol ι zeigen, dass eine Fehlinkorporation gegenüber dem β -cFaPydG analog dem 8-oxodG möglich ist. Mutationen von Pol ι , um eine höhere Prozessivität zu erhalten, ohne das Replikationsverhalten der Polymerase zu stark zu beeinflussen, könnte die Verwendung des hier angewendeten Assays möglich machen. Somit wäre für Pol ι eine Quantifizierung der Fehlinkorporationsraten gegenüber den hier verwendeten Schäden aber auch anderen DNA-Lesionen möglich.

Insbesondere für die Polymerase I des *Geobacillus stearothermophilus* sind die erhaltenen, hochaufgelösten Kristallstrukturen exzellente Ausgangspunkte für molekulardynamische Rechnungen. Die Strukturen könnten als Basis dienen, um die Vorgänge von Triphosphatinsertion und Translokation beider Formamide unter energetischen Gesichtspunkten weiter zu untersuchen, wie es momentan analog für das FPG-Protein mit 8-oxodG in der Arbeitsgruppe *Ochsenfeld* durchgeführt wird. Es existieren nun eine Vielzahl an Strukturen, anhand derer man den Versuch starten könnte, den gesamten Vorgang der Replikation für die Formamidopyrimidine zu berechnen. Insbesondere über Dynamik und Energetik des mutagenen Beypasses für das dA: *anti*- β -cFaPydG Basenpaar ließen sich hieraus neue Erkenntnisse gewinnen.

Der hier verwendete Assay bietet weiterhin die Möglichkeit, anhand der erhaltenen Fehlinkorporationsraten *in vitro* auf die beteiligten *TLS*-Polymerasen *in vivo* zu schließen. Weiterhin kann die Quantifizierungsmethode auf DNA-Polymerasen und weitere DNA-Schäden ausgedehnt werden. Somit wäre es in naher Zukunft möglich, u.a. den Einfluß der Formamidopyrimidine und einer Vielzahl weiterer DNA-Schäden wie beispielsweise von großen Addukten etc. auf die Replikationsprodukte einer Vielzahl DNA-abhängiger Polymerasen zu untersuchen.

Carbozyklische DNA-Basen sind nach wie vor wertvolle Substrate für die Aufklärung von Replikationsmechanismen und Reparaturprozesse. Das carbozyklische Konzept könnte beispielsweise auf die aktuelle Fragestellung ausgeweitet werden, ob 5-Carboxyl-dC bei der aktiven DNA-Demethylierung durch den *BER* entfernt wird, oder durch einen Decarboxylierungsmechanismus zu dC umgewandelt wird.^[360]

5 Experimententeil

5.1 Biochemische Materialien und Methoden

Verwendete Enzyme, Puffer, Geräte, Lösungen und Medien

Enzym	Quelle (Firma ^o)
AcTEV Protease aus <i>Tobacco etch virus</i>	Invitrogen ^o
Antartic Phosphatase aus <i>antartic bacterium TAB 5</i>	NEB
FPG-Protein <i>Lactococcus lactis</i>	Ralf Strasser und Emine Kaya (AK Carell)
<i>GeoBst</i> Pol I (<i>large fragement</i>)	NEB, eigene Expression vgl. Kap. 5.2
Klenow exo ⁻ aus <i>E. coli</i>	NEB
Nuclease S1 aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Roche, Aldrich
Pol η aus <i>S. cerevisiae</i> ^[361]	Sandra Koch (AK Carell)
humane Pol. κ, humane Pol ι ^[361]	Christian Deiml (AK Carell)
<i>Snake Venom</i> Phosphodiesterase I aus <i>Crotus adamanteus venom</i>	USB

Tabelle 13: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme und ihre Bezugsquellen

Für alle Puffer, Lösungen und Medien wurde soweit nicht anders angegeben bidestilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Die angegebenen pH-Werte wurden durch Zugabe von NaOH-Lsg. (1 M) oder verdünnter HCl-Lsg. (1 M) eingestellt;

1x Thermopol Puffer (NEB): 20 mM TrisHCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1 % Triton X-100, pH 8.8 bei 25°C;

2x TBE-Auftragspuffer für PAGE: 3 mL 10x TBE, 12 % (v/v), 3.6 g Ficoll 400 (3.6 g), 7 M Harnstoff (12.61 g), 6 mg Xylene Cyanol, 3 mg Bromphenolblau, mit ddH₂O auf 30 mL aufgefüllt;

10x TBE-Puffer: 0.89 M TrisHCl (108 g), 0.89 M Borsäure (55 g), 32 mM EDTA (9.3 g) mit ddH₂O auf 1 L aufgefüllt;

Bradford-Assay: Die Bradford-Lösung (Firma *Biorad*) wurde nach den Herstellerangaben hergestellt. Zum Nullabgleich wurden 950 µL Bradford-Lösung mit 50 µL des jeweiligen Puffers versetzt. Die Probenvorbereitung zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie folgt (Gesamtvolumen 1000 µL): 950 µL Bradford-Lsg. + x µL Protein-Lsg. + 50-x µL Puffer;

Heparin Puffer A: 50 mM TrisHCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT;

Heparin Puffer B: 50 mM TrisHCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT;

Kristallisationspuffer der GeoBst Pol I: 50 mM TrisHCl (pH = 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 25 mM NaCl;

LB-Medium: 20 gL⁻¹, 10 gL⁻¹ Hefeextrakt, 20 gL⁻¹ NaCl;

Lysispuffer: 50 mL Strep A + 1 Tablette Roche *complete* ohne EDTA (100 mM TrisHCl (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, mit ddH₂O auf 50 mL aufgefüllt;

NEB2 Puffer: 50 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9 bei 25 °C;

Strep-tag-Puffer A: 100 mM TrisHCl (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0.1 % Tween-20, 0.1 % NP-40 substitute;

Strep-tag-Puffer B: 0.5 mg ml⁻¹ D-Desthiobiotin in Strep-tag-Puffer A;

Stockpuffer (500 mL): 50 mL 1 M TrisHCl, 15 mL 5 M NaCl, 1 mL 0.5 M EDTA, 350 μ L β -Mercaptoethanol mit H₂O auf 500 mL aufgefüllt;

SOC Medium: 0.5 % (m/v) Pepton, 0.5 % (m/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl; pH = 7.2 . Nach der Autoklavierung: 5.0 mM MgCl₂, 5.0 mM MgSO₄;

TE-Puffer: 10 mM TrisHCl (pH = 8.5), 1 mM EDTA;

Puffer zur **Verdünnung von Pol η** (aus dem Glycerinstock): NEB2;

Gerät	Herstellerfirma (aktueller Firmensitz)
Äkta Chromatographie System P-900/UPC/ mit Fraktionierer	GE Healthcare (München)
Autoklav Vakulab S3000	Systec (Gießen)
Bildauswertung LAS 3000	Raytest, (Straubenhardt)
BioPhotometer 6131	Eppendorf, (Hamburg)
Carey UV-Spektrometer Bio100	Varian, (Darmstadt)
Gelkammer Mini Protean 3 Cell	Biorad, (München)
Inkubator 1S	Noctua, (Wiesloch)
Kristallisationsplatten <i>Easy Xtal Tool</i>	Qiagen, (Hilden)
Lyophylle Alpha 2-4 LD plus	Christ, (Osterode)
PCR-Maschine Mastercycler Personal	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Maschine Realplex ep gradient S	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter MP220	Mettler Toledo (Gießen)
Sorvall-Zentrifuge, Evolution RC	Kendro (Dreieich)
Speedvac Cryostat CT 04-50 SR	Christ (Osterode)
Speedvac Plus	Thermo (Dreieich)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Vortexer	VWR (Darmstadt)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 14: Verwendete Geräte der vorliegenden Arbeit mit Angabe der Hersteller

Hybridisierungen wurden in einem *Mastercycler personal* Thermocycler oder in einem *Mastercycler S ep realplex4* Gerät (Firma *Eppendorf*) durchgeführt. Zur Hybridisierung wurden die beiden komplementären DNA Stränge innerhalb kürzester Zeit auf 85°C erhitzt und anschließend mit 1°C min⁻¹ bis auf 4°C abgekühlt.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde mit Hilfe von Gelen einer Länge von 20 cm und einer Dicke von 1.0 mm durchgeführt (jedes Gel bestand aus 36 mL Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat (25 % (m/V) Acrylamid, 1.32 % (m/V) Methylenbisacrylamid, 50 % (m/V) Harnstoff - Firma *Roth*), 5 mL 10x TBE-Puffer, 200 µL APS-Lösung (10 mg/mL) sowie 20 µL TEMED). Diese 22.5 %igen, denaturierenden PA-Gele immer direkt nach einer Polymerisationszeit von 0.5 h verwendet. Die Entwicklung der Gele erfolgte in einer *Protean II xi*-Kammer (Firma *Bio-Rad*) bei einer Einstellung von max. 1000 V, 35 mA bei max. 300W je Gel), wobei mittels Wasserkühlung die Temperatur konstant auf 42 °C gehalten wurde. Die Gelelektrophorese ergab geeignete Auflösungen sobald die Lauffront des Auftragspuffers (2x TBE-Auftragspuffer) das Ende der Gelkammer erreicht hatte. Fluorescein markierte Primer wurden mittels eines LAS-3000 *gel image reader* (Firma *Raytest*) sichtbar gemacht.

Für die Pyrosequenzierung wurde der *Pyromark Q24* und die *Pyro Gold* Reagenzien (Firma *Qiagen*) verwendet, die bis zu ihrem Gebrauch bei 4°C gelagert wurden.

5.2 Transformation, Expression und Aufreinigung der Polymerase I von *Geobacillus stearothermophilus*

Die als *Large Fragment (LF)* bezeichnete Untereinheit der Polymerase I von *Geobacillus stearothermophilus* (Molekulargewicht des Proteins: 66.5 kDa, pI 5.7, DSM Nr. 22) wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pENTR-TEV-D-TOPO (Firma *Invitrogen*) kloniert um somit eine N-terminale TEV-Protease-Erkennungsstelle zu erhalten. Das Fragment wurde danach in das Expressions-plasmid pDEST007^[362] überführt (Abbildung 47), um einen N-terminalen Strep-Tag II einzuführen.^[363]

Transformation von GeoBst Pol I in *E. coli*

Für die Transformation wurden 0.5 µL Plasmid DNA (pDEST007 TEV *GeoBst* Pol I – vgl. Abbildung 47) in 50 µL einer Lösung aus chemisch kompetenten BL21-Zellen des *E. coli* Stamms T7 Express gegeben und auf Eis gestellt. Nach 30 min gab man die Lösung für 30 Sekunden in ein Wasserbad (42 °C) und anschließend wieder auf Eis. Nun gab man 250 µL SOC-Medium hinzu und inkubierte die Mischung für 1 h bei 37 °C in einem Thermoschüttler

(350 rpm). Die so hergestellte Bakterienkultur wurde auf Carbenicillin haltigen LB-Agarplatten (100 µg/mL) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Bakterien wurden mittels Impföse in 50 mL LB Medium (100 µg/mL Carbenicillin) angeimpft und die Kultur bei 37 °C über Nacht bei (200 rpm) geschüttelt.

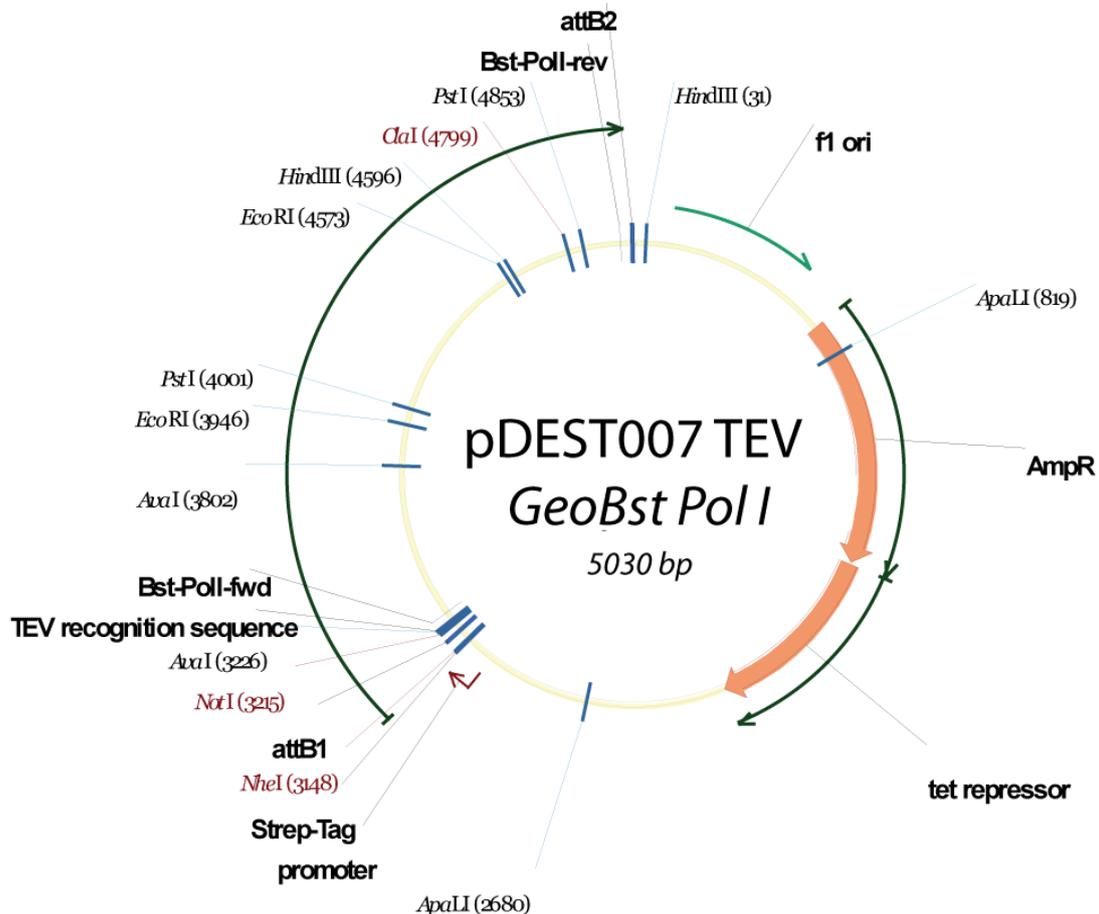


Abbildung 47: Plasmidkarte des pDEST007 TEV der Pol I von *Geobacillus stearothermophilus*.

Expression von *GeoBst Pol I* in *E. coli* und Zellyse

Die 50 mL Kultur wurde auf 4 x 1 L Carbenicillin haltiges LB-Medium verteilt und die so beimpften Lösungen bei 37 °C so lange geschüttelt, bis die Bakterienkulturen eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0.6 – 0.8 erreicht hatten und somit den Beginn ihres exponentiellen Wachstumsverlaufs begonnen hatten. Nun erfolgte die Induktion des Promotors mittels 100 µL Anhydrotetracyclin (2 mg mL⁻¹ in DMF) je Liter Bakterienkultur. Nach etwa 2-3 h Stunden wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert (8 min, 8000 rpm – Rotor SLA 3000) und das erhaltene Zellpellet in 100 mL Lysispuffer resuspendiert (alternativ war das erhaltene Zellpellet bei -20 °C mehrere Monate lagerbar). Man gab Proteaseinhibitor (Complete EDTA-frei, Firma Roche) zu und schloss die Zellen mittels einer *French Pressure Cell Press* (Firma Thermo) mehrere Male hintereinander auf, wobei Zylinder, Basis und Stempel vorher für 30 min auf Eis

Experimentaltteil

vorgekühlt worden waren. Nach Zugabe von Detergenzien (0.1 % NP-40 *substitute* und 0.1 % Tween-20) erhitze man das Lysat auf 55 °C für 10 min. Der Zellaufschluß wurde zentrifugiert (30 min bei 18000 rpm, 4 °C - Rotor SS-34) und mit dem Überstand eine Streptactin-Säule (Firma IBA) beladen.

Aufreinigung der Polymerase mittels Strep-Tactin und Heparin Säule

Das Protein wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mittels FPLC affinitätschromatographisch aufgereinigt. Der erste Schritt der Aufreinigung beinhaltete eine Strep-Tactin Säule: Nach Equilibrierung der Säule mit Streptactin Puffer A gab man das Lysat auf die Säule und wusch mit fünf Säulenvolumina Puffer A. Anschließend verwendete man sechs Säulenvolumina von Streptactin Puffer B um das Protein zu eluieren. Die Polymerase wurde anschließend auf Heparin Puffer A umgepuffert (Amicon Ultra 30 kDa – Firma Millipore) und auf ein Endvolumen von 500 µL aufkonzentriert und danach die Konzentration mittels *Bradford Assay* bestimmt. Die Abspaltung des Streptavidin-Tags erfolgte über Nacht auf Eis mittels AcTEV Protease (1 µL je mg Protein).

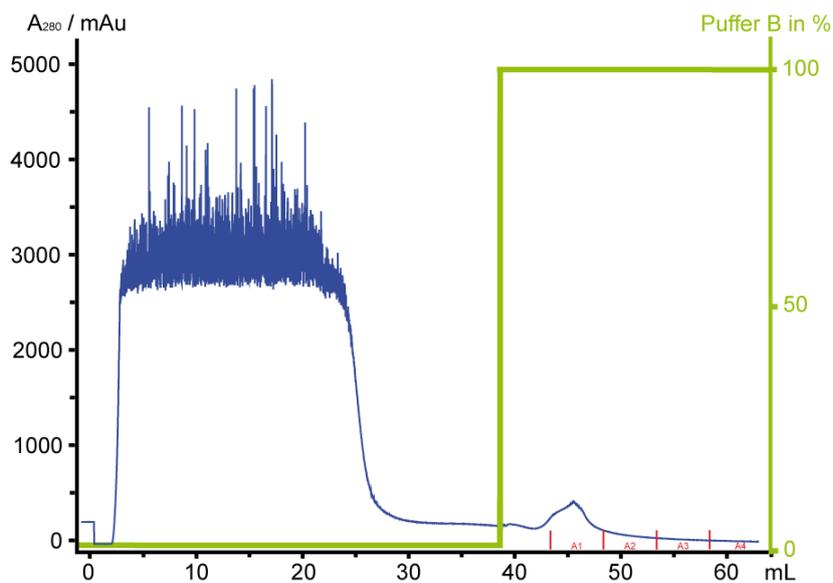


Abbildung 48: Chromatogramm der Streptavidin Aufreinigung; Strep-Tag Puffer B Gradient (grün) und den gesammelten Fraktionen A1 – A4.

Am darauffolgenden Tag wurde die Protein/Protease Mischung noch 1 h bei 30°C inkubiert und danach 10 min bei 10.000 rpm (4°C) zentrifugiert und bis zur Reinigung durch die Heparin Säule auf Eis gelagert. Die Heparin Säule wurde mit 80 mL Heparin Puffer A equilibriert, mit Heparin Puffer B gewaschen und danach wieder auf Puffer A umgepuffert (Dies führt zu einem Austausch von H⁺ gegen Na⁺ an den Sulfonsäuregruppen, was pH Schwankungen während des eigentlichen Aufreinigungsvorgangs verhindert). Die Probe (in 1 mL Puffer A), wurde mit einer Spritze in einen 2 mL Loop injiziert und mit 2 mL Puffer A aus dem Loop gespült. Dann

wurde die Säule mit 2 SV Puffer A gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 0 – 100 % B in 5 SV. Die gesammelten 5 mL die Protein enthielten gab man zur Aufkonzentration in ein Amicon Ultra 30 kDa *cut-off* Membran zentrifugenfilter (Firma *Amicon*) und pufferte auf Hep A bis zu einer Endkonzentration von 10 mg mL⁻¹ um. Die besten Ergebnisse was Größe und Auflösung der Kristalle aus Protein und DNA betrafen, erhielt man, wenn das Protein ohne vorheriges Einfrieren noch am selben Tag zusammen mit der DNA kristallisiert wurde. Für längere Zeit konnte das Protein bei - 80°C aufbewahrt werden.

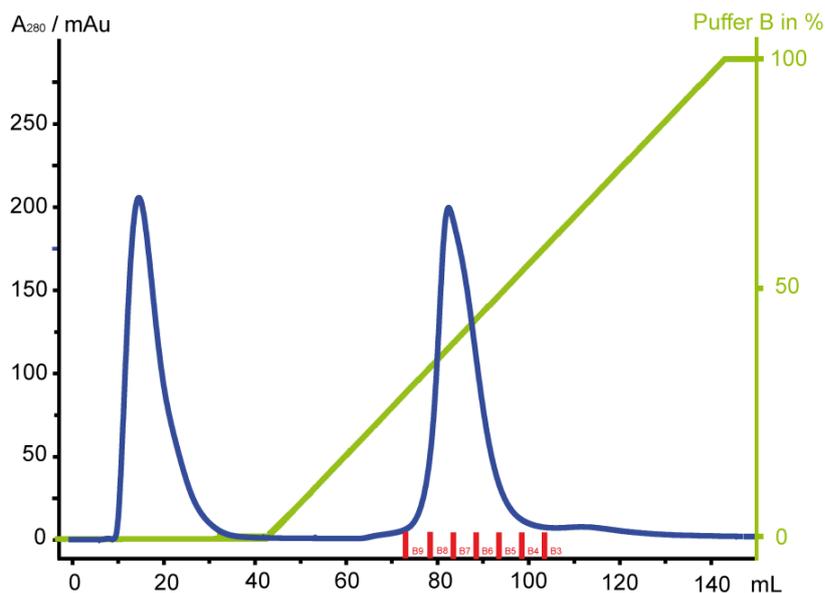


Abbildung 49: Chromatogramm der Heparin Affinitätssäule – Heparin Puffer B Gradient (grün) sowie die gesammelten Fraktionen B9 - B3.

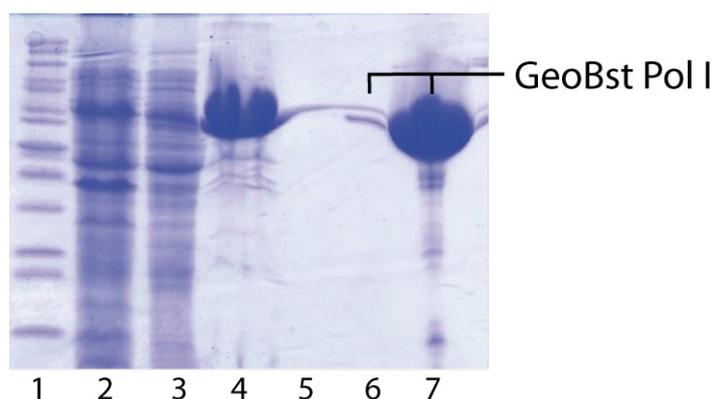


Abbildung 50: SDS-PAGE der einzelnen Schritte von Expression und Aufreinigung der *GeoBst Pol I*: 1) Protein Marker; 2) Vor Zentrifugation; 3) Durchfluss Streptactin-Säule; 4) Eluat Streptactin-Säule; 5) Durchfluss Heparin-Säule; 6) Eluat Heparin-Säule (Fraktion B6); 7) Eluat der Fraktionen B7, B9 und B3 der Heparin-Säule.

Sequenz des Pol I Gens aus *Geobacillus stearothermophilus*

Vektor: pDEST007-BstPOLI

(MW des prozessierten Proteins: 66.5 kDa, pI 5.7)

Expressionsstamm: BL21

MASWSHPQFEKGASTSLYKKAGSAAAVLEENLYFQGSFTAKMAFTLADRVTEEMLADKAALVVEVVEENYHDAPIV
GIAVVNEHGRFFLRPETALADPQFVAWLGDETKKKSMFDSKRAAAVALKWKGIELCGVSFDLLLAAYLLDPAQGVDD
VAAAAKMKQYEAVRPDEAVYGGAKRAVPDEPVLAEHLVRKAAAIWALERPFLDELRRNEQDRLLVELEQPLSSIL
AEMEFAGVKVDTKRLEQMGEELAEQLRTVEQRIYELAGQEFNINSPKQLGVILFEKLQLPVLKKSSTGYSTSADVLEK
LAPYHEIVENILHYRQLGKLGKQSTYIEGLLKVVPRPDTKKVHTIFNQALTQTGRLSSTEPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVPS
SDWLIFAADYSQIELRVLAHIAEDDNLMEAFRRDLDIHTKTAMDIFQVSEDEVTPNMRRQAKAVNFGIVYGISDYGLA
QNLNISRKEAAEFIERYFESFPGVKRYMENIVQEAQKQGYVTLLHRRRYLPDITSRNFNVRSAERMAMNTPIQGSA
ADIKKAMIDLNARLKEERLQARLLLQVHDELILEAPKEEMERLCRLVPEVMEQAVTLRVPLKVDYHYGSTWYDAK

5.3 Kristallisation

Verwendete Puffer

Protein: Das Protein wurde nach Aufreinigung (vgl. Kap. 0) im Kristallisationspuffer mit einer Konzentration von 10 mg mL⁻¹ bei -80°C gelagert.

DNA: Die DNA (Primer und Templatstrang) wurde in Cacodylat Puffer (10 mM Cacodylat, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA 10 mM MgSO₄) bei einer 1 M Konzentration hybridisiert.

Protein (10 mg mL⁻¹) und dsDNA (1 mM) wurden in gleichen Volumina zusammengegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung kurz zentrifugiert und mittels der *hanging drop vapour diffusion* Methode kokristallisiert. Hierfür wurden Reservoirs von Kristallisationsplatten (je 24 Reservoirs) mit jeweils 500 µL 0.1 M MES (pH = 7.1), 3.7 – 4.1 % MPD, 46 – 54 % (NH₄)₂SO₄ (gesättigt) gefüllt. Die 1:1-Mischung von Protein/dsDNA wurde auf einen Objektträger pipettiert (0.8 µL) und mit einem Tropfen aus der jeweiligen Reservoir-Lösung (0.8 µL) versetzt. Der hängende Tropfen wurde über die jeweilige Reservoir-Lösung gelegt und die Platten bei 18 °C gelagert. Durch Diffusion erhielt man nach 2-30 Tagen Kristalle.

Die Kristalle wurden je nach Sequenz entweder in einem dNTP-haltigen Puffer zur Replikation gelagert oder sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -196 °C bis zu Ihrer Vermessung aufbewahrt bzw. transportiert.

Puffer zur Verlängerung im Kristall: 46 – 54 % (NH₄)₂SO₄ (gesättigt), 0.1 M MES, 3.7 – 4.1 % MPD, 33 mM dNTP und 50 mM MgSO₄. Statt Wasser wurde das fehlende Volumen mit Cacodylatpuffer ergänzt.

Die Kristalle wurden je nach ihren angesetzten Bedingungen für 24 h in dem oben angeführten 33 mM dNTP Puffer belassen und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierfür verwendete man ebenfalls einen Cryo-Puffer als Gefrierschutz.

Cryo-Puffer zum Einfrieren und Lagern der Kristalle bei -196 °C: 55 % (NH₄)₂SO₄, 0.1 M MES (pH 7.3); 3.7 – 4.1 % MPD; 24 % Saccharose.

5.4 Einzelnukleotidinsertionen und Primerverlängerungsstudien

Die Studien wurden in einem Gesamtvolumen von jeweils 20 µL durchgeführt wobei dieses aus 10 µL einer lagerfähigen Substratmischung sowie einer immer jeweils frisch hergestellten Reaktionsmischung bestand.

Substratmischung: Verhältnis Templat:Primer = 2:1 (je 10 µL Reaktionseinheit wurden folgende DNA Mengen verwendet)

1 µL Fluorescein markierter Primer aus einer 10 µM Arbeitslösung (n = 10 pmol)

2 µL Templatstrang aus einer 10 µM Arbeitslösung (n = 20 pmol)

1 µL Puffer*

6 µL ddH₂O

Puffer*: = (*GeoBst* Pol I: Thermopolpuffer; Klenow *exo*⁻; Pol η, Pol κ und Pol ι jeweils NEB2.

Die Substratmischung wurde hybridisiert und war lichtgeschützt bei -20 °C über mehrere Monate haltbar.

Reaktionsmischung:

1 µL 10x Thermopolpuffer oder NEB II; 1 µL 100 mM MgSO₄; 3 µL ddH₂O; 1 µL Polymerase

Die Reaktionsmischung wurde zusammen mit der Substratmischung 6 min bei der jeweiligen Reaktionstemperatur vorinkubiert und die eigentliche Reaktion durch Zugabe von 4 µL der/die jeweiligen dNTP(s) gestartet.

Nach Ablauf der jeweiligen Reaktionszeit (zwischen 1 min und 30 min) gab man 20 µL TBE-Auftragspuffer hinzu um die Reaktion zu stoppen.

Die verwendeten Triphosphate (Firma *Promega*) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM) lagen in H₂O vor und wurden mit ddH₂O auf die jeweilige Konzentration verdünnt.

Die Primerverlängerungsreaktionen wurden auf einem 22.5 % TBE-Urea-PAGE aufgetrennt.

5.5 Primerverlängerung mit anschließender Pyrosequenzierung

Die jeweiligen Templatstränge (**ODNFaPydA19**, **ODN8-oxodA1**, **ODN8-oxodG1** und **ODNFaPydG9**) wurden mit einem 5'-Biotin-markierten Primer

(5'-Biotin-GCAGTCTCGCATGTCTCTC-3' - Firma Metabion) im Verhältnis 2:1 hybridisiert.

Die Verlängerungen des Primers wurden mit vier Polymerasen durchgeführt. Die gewählten Reaktionsbedingungen entsprachen denen der einzelnen Nukleotidinsertionen (1 U Klenow *exo*⁻, 1 U *GeoBst* Pol I, 1 µM Pol η und 0.5 µM Pol κ), 5 mM MgSO₄, 50 µM aller 4 dNTPs

Experimentalteil

(dATP, dCTP, dGTP und dTTP) sowie 0.5 μM dsDNA in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 20 μl . Die verwendeten Puffer für die jeweilige Polymerase waren 1x NEB2 Puffer 2 (Klenow exo^- , Pol η , and Pol κ) bzw. 1x ThermoPol-Puffer (Bst Pol I). Die Reaktionszeit für jede Verlängerungsreaktion betrug 30 min bei den für die jeweilige Polymerase optimalen Temperaturen (30°C für Pol η , 37°C für Klenow exo^- und Pol κ sowie 55°C für *GeoBst* Pol I). Nach Beendigung der Primerverlängerung gab man 2 μl Streptavidin-Sepharose Beads (Firma *GE Healthcare*) zu jedem Reaktionsansatz. Weiterhin wurden 40 μl „Binding“ Puffer (Firma *Qiagen*) und 18 μl ddH₂O zugegeben. Nachdem jeder Ansatz für 15 min bei 1400 rpm (25°C) in einem Thermoschüttler inkubiert worden war, wurden die *beads* mit dem gebundenen Primer mittels des „*Vacuum Prep Tool*“ (*Qiagen*) isoliert und nacheinander mit 70 % Ethanol, 0.2 M NaOH (entspricht der „*Pyromark Denaturing Solution*“) und zuletzt mit „*Washing Buffer*“ (TRIS-Acetat pH 7.4) nach dem Standardprotokoll des Herstellers *Qiagen* behandelt. Die nun als Einzelstränge vorliegenden Primer wurden nun als neue Template in jeweils 30 μL „*Annealing Buffer*“ mit je 10 pmol Sequenzierprimer (5'-GTAGCTAGGTCGA-3' oder 5'-GTAGCTAGGTCGAT-3' - *Metabion*) hybridisiert.

Streptavidin Sepharose Beads	„Binding“ Puffer“	ddH ₂ O	Substratmischung
2 μL	40 μL	18 μL	20 μL

Tabelle 15: Pipettierschema zur Pyrosequenzierung nach der jeweiligen Primerverlängerungsreaktion

Die dsDNA wurde nun mittels eines *PyroMark Q24* Pyrosequencer (Firma *Qiagen*) und den Reagenzien *PyroMark Gold Q24 Kits* (*Qiagen*) sequenziert und die Daten mittels der Software *PyroMark Q24* (ebenfalls *Quiagen*) ausgewertet.

Zum allgemeinen Funktionsprinzip der Pyrosequenzierung vgl. Kap. 2.6.1.

5.6 Methoden der DNA Synthese, Entschützung und Aufreinigung

5.6.1 DNA-Standardsynthese

Die DNA-Synthesen wurden an einem *ExpediteTM 8900 Nucleic Acid Synthesis System* (Applied Biosystems) oder einem *Äkta Oligopilot 10* (Firma GE Healthcare) im 1 μ mol oder 200 nmol Maßstab durchgeführt (Es dienen die Standardprotokolle Geräteherstellers als Grundlage). Zur DNA-Synthese der einzelnen Modifikationen (β -cFaPydA, 8-oxodA, β -cFaPydG, 8-oxodG und cdG) wurden veränderte Synthesebedingungen gewählt (vergleiche hierzu Kapitel 0). Die Phosphoramidite der Standardbasen Bz-dA, Bz-dC, *i*Bu-dG und dT sowie die Ultramild[®] Phosphoramidite Pac-dA, Ac-dC und *i*Pr-Pac-dG und die mit der ersten Base beladenen CPG- oder Polystyrolträger wurden von den Firmen *Glen Research* oder *Link Technologies* bezogen. Alle Reagenzien (Amidite, Oxidationslösung, Aktivator, Waschlösung und Capping) wurden in Acetonitril (Firma *Roth* - Wassergehalt < 10 ppm) gelöst. Für alle anderen Lösungen wurde Acetonitril (Firma *Roth* - Wassergehalt < 30 ppm) eingesetzt. Der Aktivator Benzylthiotetrazol (BTT) wurde nach einem Standardprotokoll hergestellt.^[156] Die Konzentration der Phosphoramidite betrug 0.1 M in Acetonitril (< 10 ppm H₂O + Molekularsieb 3 Å). Für die Standardphosphoramidite betragen die Kupplungszeiten 96s.

Aktivator: 0.25 M Benzylthiotetrazol (BTT) in CH₃CN (< 10 ppm H₂O) + Molekularsieb (3 Å)

Capping der Standardbasen:

Cap A: 20 % Essigsäureanhydrid (Ac₂O) in 50 % CH₃CN und 30 % 2,6-Lutidin

Cap B: 16 % *N*-Methylimidazol in CH₃CN

Capping während der Ultramild Synthesen:

Cap A: 0.5 M Pac₂O in CH₃CN/2,6-Lutidin 9:1

Cap B: 16 % *N*-Methylimidazol in CH₃CN (50 ppm)

Detritylierung: 3 % Dichloressigsäure (DCA) in CH₂Cl₂ oder Toluol

Oxidation: 2.5 mM I₂ in 2,6-Lutidin in CH₃CN/H₂O: 6/65/30 v/v)

5.6.2 DNA-Synthese für die verwendeten Modifikationen

Der folgende Abschnitt beschreibt die Festphasensynthese sowie die Entschützung der Oligodeoxynukleotide mit den synthetisierten Phosphoramiditbausteinen **34b** und **35** sowie den kommerziell erhältlichen Phosphoramiditen des 8-oxodA und des 8-oxodG

5.6.3 Oligonukleotide mit der β -cFaPydA Modifikation

Alle synthetisierten Oligonukleotide mit β -cFaPydA wurden in Tabelle 19 aufgelistet. Da die Formamidgruppe weder unter dem Capping der Standardbasen noch unter den Cappingbedingungen der Ultramild Synthesen stabil ist, musste ein modifiziertes Syntheseprotokoll programmiert werden. Es kommt sowohl mit Essigsäureanhydrid als auch mit Phenoxyacetanhydrid zur Transamidierung der Formamidgruppe.^[3, 364]

Ebenfalls können zu große Mengen an Säure die Trityl-Schutzgruppe am N6 des Heterozyklus teilweise abspalten und die Synthese somit auch über die N6-Gruppe fortgeführt werden. In dem angepassten Syntheseprotokoll wurde daher für den Einbau des β -cFaPydA Phosphoramidits seine Reaktionszeit des Phosphoramidits **35** auf insgesamt 14 min verlängert (Das Phosphoramidit wurde während der 14 min in zwei Schritten auf das Trägermaterial gepumpt und für je 7 min mit dem am Träger gebundenen Oligonukleotid in Gegenwart des Aktivators umgesetzt). Die Reaktionszeit der nachfolgenden Base wurde ebenfalls auf 144 s erhöht. Weiterhin wurde ab dem Einbau des β -cFaPydA für den Rest der DNA-Synthese eine kürzere Deblockingzeit (40 s) programmiert. Für den Einbau des β -cFaPydA sowie für alle darauffolgenden Basen musste ein alternatives Capping, bestehend aus *iso*-Buttersäureanhydrid (0.54 M), 2,6-Lutidin (10.5 Vol. %) in MeCN, verwendet werden (Cappingzeit: 25 s). Jedoch zeigte sich auch bei längeren Oligonukleotiden, dass die Formamidgruppe nicht inert gegenüber dem weniger reaktiven *iso*-Buttersäureanhydrid war und nach sieben oder mehr milden Cappingzyklen es zu deutlichen Transamidierungsreaktionen kam. Deshalb wurde bei mehr als sechs nachfolgenden Basen auf ein Capping verzichtet. Nach der DNA-Synthese wurde der CPG-Träger im Hochvakuum getrocknet und anschließend die DNA vom CPG-Träger sowie die basenlabilen Ultra Mild Schutzgruppen mittels Ammoniumhydroxid in Ethanol (3:1) in einem Thermoschüttler (mind. 1000 rpm) bei 18 °C über 18 h abgespalten. Zur Reinigung längerer Stränge konnte auf eine DMT-on Synthese verzichtet werden, da die Tritylgruppe am N6 Stickstoff eine vereinfachte Aufreinigung ermöglichte.

5.6.4 Oligonukleotide mit der β -cFaPydG Modifikation

Synthetisierten Oligonukleotide mit der β -cFaPydG Modifikation sind in Tabelle 19 aufgelistet. Da die Formamidgruppe des β -cFaPydG ebenfalls nicht mit normalen Cappingbedingungen (vgl. vorheriges Kapitel) der Standardbasen als auch Ultramild Synthesen kompatibel war, musste ebenfalls auf die Verwendung von Essigsäureanhydrid bzw. Phenoxyacetanhydrid verzichtet werden.^[3, 364] Sobald der β -cFaPydG Baustein eingebaut worden war, wurde für alle nachfolgenden Basen in 5'-Richtung das mildere Pivaloylsäureanhydrid verwendet.

(Pivaloylsäureanhydrid mit 2,6-Lutidin in THF (abs. - 1:1:8 v/v/v)^[3]. Jedoch zeigte sich auch hier bei den längeren Oligonukleotiden, dass die Formamidgruppe nicht inert gegenüber einer erhöhten Anzahl an milderem Cappingzyklen war und es ab acht Cappingzyklen auch zu deutlichen Transamidierungen kam. Somit wurde bei mehr als sechs nachfolgenden Basen auf ein Capping verzichtet. Die Kupplungszeit des β -cFaPydG Phosphoramidites wurde auf 10 min verlängert und bei einer größeren Länge der Oligonukleotide zur vereinfachten Reinigung DMT-on synthetisiert. (vgl. hierzu auch Protokoll zur Abspaltung von der DMT- und Trityl-Schutzgruppe). Die DNA sowie die basenlabilen Ultra Mild Schutzgruppen wurde vom CPG-Träger mittels Ammoniumhydroxid in Ethanol (3:1) in einem Thermoschüttler bei 15°C für 16 h (mind. 1000 rpm) abgespalten.^[3]

5.6.5 8-oxodA

Aufgrund des niedrigeren Oxidationspotentials des 8-oxodA wurde für die DNA-Synthese lediglich die Kupplungszeit des Phosphoramiditbausteins auf 5 min verlängert. Die Abspaltung erfolgte unter Zugabe von Thioethanol (0.25 M) in Ammoniumhydroxid/ Ethanol 3:1, bei 60 °C für 16 h in einem Thermoschüttler bei mindestens 1000 rpm.

5.6.6 8-oxodG

Auch im Falle des 8-oxodG^[365] wurde die Kupplungszeit der kommerziell erhältlichen Sonderbase (Firma *Glen Research*) auf 5 min verlängert. Ebenfalls wie bei beim 8-oxodA wurde die Entschützung und Abspaltung unter reduktiven Bedingungen durchgeführt (Thioethanol 0.25 M in Ammoniumhydroxid/ Ethanol 3:1, bei 60 °C für 16 h bei mind. 1000 rpm in einem Thermoschüttler).

5.6.7 HPLC-Chromatographie der synthetisierten Oligonukleotide

Die analytische als auch präparative *reversed phase* (*rp*) Chromatographie wurde auf den Anlagen *L-7400* UV- und *L-7420* UV/VIS-Detektor, *L-7100*- und *L-7150* Pumpe, *D-7200* Autosampler, *L-7000*, Interfacemodul und *L-7612* bzw. *ERC-3415* (Firma *Merck-Hitachi*) oder *2487 Dual λ Absorbance* Detector, *1525* Binary HPLC Pump, *2695 Separations* Module und *2996*, bzw. *996* Photodiode Array Detector (Firma *Waters*) durchgeführt. Bei den Entgasern handelte es sich um die jeweiligen Modelle der Hersteller. Die präparativen Trennungen wurden auf folgenden *rp* Säulen durchgeführt: *CC 250/10 Nucleosil 100-7 C18* oder *CC 250/10 Nucleodur 100-7 C18* (Firma *Macherey-Nagel*). Für die analytischen HPLC Trennungen wurden die Säulen *CC 250/4 Nucleosil 4 120-3 C18* und *CC 250/4 Nuceodur 4 120-3 C18*

Experimentalteil

(Firma *Macherey-Nagel*) eingesetzt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden für die Trennung von Oligonukleotiden folgende Puffersysteme verwendet:

Puffersystem A1: 0.1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) in ddH₂O, pH 7.0.

Puffersystem B1: 0.1 M TEAA in 80/20 Acetonitril/Wasser, pH 7.0 .

Zur Trennung einzelner Nukleotide diente als stationäre Phase eine 120-3HDO Säule (150*2.0 mm – Firma *Interchim Interchrom Uptisphere*). Die mobilen Phasen bestand aus dem Puffer A2 und Puffer B2:

Puffersystem A2: 2 mM NH₄HCOO in ddH₂O, pH 5.5.

Puffersystem B2: 2 mM NH₄HCOO in 80/20 Acetonitril/Wasser, pH 5.5.

Folgender Gradient wurde verwendet: 0 → 45 min; 0 % → 40 % B; 45 → 48 min, 40 % → 100 % B; 48 min → 60 min, 100 % → 0 % B (analytische HPLC Flussrate: 0.5 mL/min, Präparative HPLC: Flussrate: 5 mL/min). Je nach beobachteter Retentionszeit wurde der oben angeführte Standardgradient modifiziert.

Die gereinigten Oligonukleotide wurden soweit nicht anders beschrieben mittels Sep-Pak® Kartuschen (Firma *Waters*) anhand des vom Hersteller empfohlenen Protokolls entsalzt.

Zur Abspaltung der **DMT- oder Trityl-Schutzgruppe** in Lösung versetzte man DNA mit 100 µL 80 %iger Essigsäure für 20 min bei RT. Anschließend gab man 100 µL ddH₂O zu sowie 60 µL einer wässrigen 3 M Natriumacetat Lösung. Anschließend versetzte man die Lösung mit 1600 µL Ethanol und fällte die DNA bei -20°C für mindestens 30 min. Das erhaltene Pellet wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die DNA im Hochvakuum getrocknet und mittels HPLC nochmals aufgereinigt.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Extinktionskoeffizienten der synthetischen DNA wurden mit dem Spektrometer NanoDrop ND-1000 (Firma *peqlab*) bei 260 nm bestimmt und daraus die Konzentration mit Hilfe frei zugänglicher Programme berechnet. (Verwendete Extinktionskoeffizienten: dA: 15 L/mmol·cm, dC: 7 L/mmol·cm, dG: 12 L/mmol·cm und dT: 8.4 L/mmol·cm)

Kommerziell erhältliche Oligonukleotide

Soweit nicht selbst hergestellt wurden die verwendeten Oligonukleotide von den Firmen *Metabion GmbH* und *Ella Biotech GmbH* (in HPLC-gereinigter Qualität) bezogen.

5.6.8 Enzymatischer Totalverdau

Der DNA Strang **ODNFaPydA6** (2 nmol in 100 μ L H₂O) wurde mit 10 μ L Puffer EVA (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄, pH = 5.7) und 20 Einheiten Nuclease S1 (*Aspergillus oryzae* – Firma Roche) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 12 μ L Puffer EVB (500 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0), 5 Einheiten *Antarctic Phosphatase* (Firma - NEB) und 0.1 Einheiten *Snake Venom Phosphodiesterase I* (*Crotalus adamanteus venom* – Firma USB corporation) wurde die Lösung für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert bis der Verdau vollständig war. Die Probe wurde anschließend abzentrifugiert (6000 rpm, 10 min) und mittels HPLC Chromatographie und FT-ICR-HPLC/MS analysiert. Für die Analyse der Nukleotide diente als stationäre Phase eine 3 HDO cSäule (150*2.0 mm – Firma Interchim Interchrom Uptisphere). Die mobile Phase bestand aus dem Puffer A2 und Puffer B2 (2 mM NH₄HCOO in H₂O/MeCN 20/80). Es wurde folgender Gradient verwendet: 0 → 12 min; 0 % → 3 % B1; 12 → 60 min; 3 % → 60 % B1; 60 → 62 min; 60 % → 100 % B1; 62 → 90 min; 100 % B1; 90 → 95 min; 100 % B1 → 0 % B1; 95 → 130 min; 0 % B1, mit einer Flußrate von 0.15 mL/min. Die Elution wurde bei einer Wellenlänge von 260nm verfolgt (vgl. hierzu Abbildung 51)

5.7 Röntgenstrukturdaten von DNA und Protein

Kristalle der Polymerase I des *Geobacillus stearothermophilus*

Die Kristalle wurden an der PX I und PX III *Beamline* der *Swiss Light Source* (SLS), in Villigen (Schweiz) vermessen und mit den Programmen XDS^[366] and SCALA^[367-368] prozessiert. Die Lösung der Strukturen wurde von Frau Dr. Sabine Schneider durchgeführt. Die Strukturbestimmungen wurden mittels Molekularem Ersatz (*molecular replacement*) mit PHASER^[369] unter Verwendung der bereits bekannten Struktur aus der Protein Daten Bank (PDB code 1U45) gelöst. Zur Reduzierung des *model bias*, wurden die Temperaturfaktoren für die Hauptkette auf 20 und für die Seitenkette der Peptidkette, sowie DNA-Atome auf 40 zurückgesetzt. Das Model wurde manuell in COOT^[370] gebaut und mit REFMAC5^[371-372] verfeinert. Weiterhin wurde ein „*simulated annealing*“ mittels PHENIX^[373] vorgenommen. Weiterhin wurden mehrere Verfeinerungszyklen unter Verwendung von REFMAC5^[371-372] durchgeführt. Alle Strukturüberlagerungen wurden mit SQRAB^[38] vorgenommen. Für die Abbildungen der Strukturen wurde das Programm Pymol (*Delano Scientific*) verwendet^[374]. Experimentelle Daten sowie Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstrukturen von β -cFaPydA und β -cFaPydG sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die

Atomkoordinaten und Strukturfaktoren jeder Struktur wurden in der *PDB* der *EBI Macromolecular Structure Database* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe>) hinterlegt.

5.8 Material und Methoden zur organischen Synthese

Alle feuchtigkeits- und sauerstoffempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten, evakuierten und mit Stickstoff bzw. Argon gefüllten Schlenkgefäßen durchgeführt. Alle Lösungsmittel und Reagenzien wurden in den kommerziell erhältlichen Reinheiten (*puriss.*, *p.a.* oder *purum*) käuflich erworben und auch so verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden von *Fluka* (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH), *Acros* (KMF Laborchemie Handels GmbH), *Aldrich*, *ABCR*, *Alfa Aesar*, *Sigma*, *TCI* oder *Merck* gekauft oder mittels 3 bzw. 4 Å Molekularsieb selbst getrocknet. Das hierfür verwendete Molsieb wurde vor der eigentlichen Nutzung zuerst mit Wasser gewaschen um Staub zu entfernen und anschließend in einem Heizschrank für mindestens 24 h bei 120 °C vorgetrocknet und abschließend für 12 Stunden in einem Sandbad (bei ca. 340 °C) im Hochvakuum weiter ausgeheizt. Für Säulenchromatographie und Extraktionen wurden Lösemittel von technischer Qualität verwendet die vorher an einem Rotationsverdampfer (Firma *Heidolph*) mittels eines Membranpumpenvakuums (*Vario PC3001*-Membranpumpe - Firma *Vacuubrand*) destilliert wurden. Zur entgasen von Lösemittel wurden diese dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und jeweils mittels Vakuum und Stickstoff ein Gasaustausch vorgenommen. Zum Trocknen von Substanzen im Hochvakuum verwendete man eine RZ-4 Öldrehschieberpumpe (Firma *Vacuubrand*) mit einem Vakuum zwischen 10^{-2} und 10^{-3} mbar. Zum Entfernen von Wasser bzw. wässriger Puffer wurde eine *SpeedVac RVC 2-25* bzw. *RVC 2-33 IR* (Firma *Christ*) oder eine *SpeedVac Plus SC110A* bzw. *SpeedVac SPD 111V* (Firma *Savant*) verwendet. Alle Geräte waren mit den Kühlfallen *CT 62-50-cooling trap* (Firma *Christ*) ausgestattet. Für die Gefriertrocknung wässriger Lösungen wurde eine *Alpha 2-4 plus* Lyophile (Firma *Christ*) verwendet.

Reaktionen kontrollierte man mit Hilfe von **Dünnschichtchromatographie** (DC) auf vorgefertigten Aluminiumplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0.25 mm – Firma *Merck*) durch UV-Licht ($\lambda = 254$ nm oder 366 nm), Ninhydrin-Lsg. (1.5 g Ninhydrin, 100 mL *n*-Butanol, 3 mL Eisessig), Anisaldehyd-Lsg. (0.5 mL Anisaldehyd, 50 mL Eisessig, 1 mL H₂SO₄), Cermolybdat-Lsg. (120 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·24H₂O und 5 g (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ in 800 mL 10 %iger Schwefelsäure), 0.5 %-ige KMnO₄-Lsg. in 1 M NaOH,. Diese Methode wurde ebenfalls zur Bestimmung der R_f-Werte angewendet. Bidestilliertes Wasser (ddH₂O) wurde

von der Anlage *Milli-Q Plus* (Firma *Millipore*) entnommen. Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden am Hochvakuum (bis 10^{-3} mbar) getrocknet.

Die **Säulenchromatographie** zur Aufreinigung von Substanzgemischen wurde unter der Verwendung von Stickstoff Überdruck nach der *Flash*-Methode durchgeführt.^[375] Hierbei wurde soweit nicht anders erwähnt Silicagel (Korngröße 40 - 63 μm - Kieselgel 60 - Firma *Merck*) verwendet.

Von allen synthetisierten Verbindungen wurden **^1H -NMR-Spektren** an folgenden Geräten aufgenommen: *ARX-300* (300 MHz) und *AMX-600* (600 MHz) (Firma *Bruker*) sowie *Mercury 20VX*, *INOVAN XL400* (400 MHz), *Varian Inova 400* (400 MHz - Firma *Varian*). Die Messung wurden sofern nicht anders vermerkt bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messfrequenz und das verwendete deuterierte Solvens sind in Klammern angegeben. Die chemischen Verschiebungen δ für die ^1H und ^{13}C Spektren sind in ppm relativ zu Tetramethylsilan ($\delta = 0$) und für ^{31}P Spektren relativ zu Phosphorsäure (85 % in Wasser, $\delta = 0$) angegeben. Die jeweiligen Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Multiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu CHCl_3 ($\delta = 7.26$) in CDCl_3 , DMSO ($\delta = 2.50$) in $\text{DMSO}-\text{D}_6$, MeOH ($\delta = 3.31$) in CD_3OD , H_2O ($\delta = 4.80$) in D_2O , MeCN ($\delta = 1.94$) in CD_3CN oder Aceton ($\delta = 2.04$) in Aceton- D_6 .

Die zugehörigen **^{13}C -NMR-Spektren** wurden an den Spektrometern *ARX-300* (75 MHz), *AMX 600* (150 MHz) (Firma *Bruker*) oder *VXR400S* (100 MHz) und *Varian Inova 400* (100 MHz - Firma *Varian*) relativ zu den Lösungsmittelsignalen gemessen.

Die **^{31}P -NMR-Spektren** wurden am *Mercury 200VX* (81 MHz) (Firma *Varian*) aufgenommen. Das **^{19}F -Spektrum** wurde an einem *Mercury 200VX* (81 MHz) (Firma *Varian*) aufgenommen. **Massenspektrometrische** Messungen wurden an einem *Varian MAT CH 7A* (Firma *Varian*) für Elektronenstoßionisationen (**EI**) sowie an einem *Thermo Finnigan LTQ-FT-ICR* (Firma *Finnigan*) für Elektrosprayionisationen (**ESI**) durchgeführt. Für **Fast-Atom Bombardment (FAB)** Messungen wurde ein *MAT 95 Q* (Firma *Finnigan*) verwendet. Die **LC/FT-ICR-ESI** Spektren wurden an einer *LTQ Orbitrap XL FTMS* (Firma *Thermo Finnigan*) aufgenommen. Für **MALDI-TOF** Messungen benutzte man das *Autoflex II* (Firma *Bruker*) mit einem *MTP AnchorChip var/348* Träger. Für die MALDI-TOF Spektren von Oligonukleotiden wurde eine Matrix bestehend aus 3-Hydroxypicolinsäure (50 mg), Ammoniumhydrogencitrat (10 mg) und 15-Krone-5 (10 μL) oder 18-Krone-6 (10 μL) gelöst in 1 mL ddH₂O verwendet. Vor jeder Messung wurden die Proben mittels einer Membran (*MF-Millipore*) für mindestens 30

Minuten, wenn nötig auch über Nacht entsalzt. Die Masse der detektierten Ionen wird in Abhängigkeit zur Ionenladung in der Form m/z angegeben. Alle Messungen wurden am Department für Chemie der Ludwig-Maximilian-Universität durchgeführt.

Infrarotspektren zur Charakterisierung flüssiger und fester Substanzen wurden auf einem *Spectrum BX* mit *DuraSampl IR II* ATR Einheit von (Firmen *Smiths* und *Perkin-Elmer*) aufgenommen.

Die **Schmelzpunkte** der jeweiligen Substanzen wurden in offenen Glaskapillaren an einem Smp. 20 (Firma *Büchi*) bestimmt und sind nicht korrigiert.

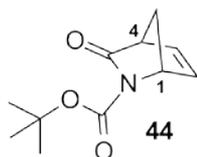
UV/VIS Spektren wurden, sofern nicht anders angegeben, mit einem *Cary 100 Bio* mit *Cary Temperature Controller* und *Sample Transport Accessory* mit *Multi Cell Block* (Firma *Varian*) gemessen.

Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden wurden aus der Summe der einzelnen Extinktionskoeffizienten der Einzelnukelotide des jeweiligen DNA-Stranges berechnet. Diese betragen für dA: $15.2 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, dC $7.1 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, dG $12.0 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und für dT $8.4 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Für modifizierte Monomere nahm man den Extinktionskoeffizienten des β -cFaPydG ($9.5 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) oder β -cFaPydA an.

5.8.1 Synthese des carbozyklischen 2'-Desoxycyclopentylamins

Boc-Schützung des Vince Lactams (1R)-(-)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on^[3]

***tert*-Butyl (1R,4S)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxylat (44)**



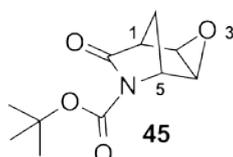
Das kommerziell erhältliche Vince Lactam [(1R)-(-)-2,2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on] (**43**) (16.0 g, 146 mmol), Boc_2O (64.0 mL, 294 mmol, 2 eq) und DMAP (17.9 g, 147 mmol, 1 eq) wurden in 200 mL trockenem THF vorgelegt. Die sich allmählich orange färbende Lösung wurde zwischen 1.5 h und 2.5 h bei RT gerührt und die Umsetzung mit Hilfe von DC kontrolliert. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der orange-rote Feststoff säulenchromatographisch aufgereinigt (Toluol/EtOAc = 4:1). Das Produkt **44** konnte als beiger, kristalliner Feststoff in 98 %iger Ausbeute (29.5 g, 143 mmol) erhalten werden.

Smp.: 86 – 87 °C; **R_f** = 0.55 (Toluol/EtOAc 4:1 v/v); **FTIR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3084, 3071, 3028, 2998, 2975, 1750, 1704, 1364, 1330, 1305, 1194, 1166, 1152, 1136, 1121, 995, 856, 777, 764 (cm^{-1}); **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.48 (s, 9 H, *t*Bu), 2.13 (d, $^2J(\text{C7H}_a, \text{C7H}_b) = 8.0 \text{ Hz}$,

1 H, C7H_a), 2.33 (d, ²J(C7H_b,C7H_a) = 8.0 Hz, 1 H, C7H_b), 3.35 – 3.38 (m, 1 H, C4H), 4.91 – 4.96 (m, 1 H, C1H), 6.62 – 6.67 (m, 1 H, C5H), 6.86 – 6.90 (m, 1 H, C6H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 27.9 (3 x CH₃), 54.4 (C4), 54.9 (C7), 62.4 (C1), 82.6 (OC(CH₃)₃), 138.2 (C5), 140.0 (C6), 150.4 (R₂NCOO), 176.3 (C3); **HRMS** (ESI⁺) (m/z): [2M + NH₄⁺]⁺: ber. für [C₂₂H₃₀N₂O₆+NH₄⁺]⁺: 436.2442; gef.: 436.2426.

Epoxidierung des Boc-geschützten Lactams^[311, 376]

tert-Butyl (1*S*,2*R*,4*S*,5*R*)-7-oxo-3-oxa-6-azatricyclo[3.2.1.0]octan-6-carboxylat (**45**)

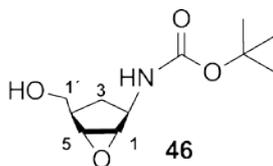


Das Edukt **44** (29.5 g, 141 mmol) wurde in Dichlormethan (510 mL) gelöst und mit *m*CPBA (27.5 % H₂O) (55.1 g, 319 mmol, 2.5 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 48 h bei RT gerührt. Anschließend wurde überschüssige *m*CPBA bzw. entstandene *meta*-Chlorbenzoesäure aus der Produktlösung entfernt, indem jeweils fünfmal mit gesättigter Na₂CO₃ Lösung, anschließend fünfmal mit gesättigter NaHCO₃ Lösung und zuletzt einmal mit Wasser ausgeschüttelt wurde. Die Dichlormethanphase wurde anschließend über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel danach am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der erhaltene, weiße Feststoff (**45**) wurde *in vacuo* getrocknet und konnte in einer Ausbeute von 98 % (31.1 g, 138 mmol) isoliert werden.

R_f = 0.67 (Toluol/EtOAc 2:1 v/v); **Smp.**: 119.5 – 120.8 °C; **FTIR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2987, 1765, 1704, 1368, 1330, 1303, 1257, 1214, 1151, 1118, 1008, 933, 854, 772 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.52 (s, 9 H, *t*Bu), 1.62 (d, ²J(C8H_a,C8H_b) = 12.0 Hz, 1 H, C8H_a), 1.81 (d, ²J(C8H_b,C8H_a) = 12.0 Hz, 1 H, C8H_b), 3.04 – 3.07 (m, 1 H, C1H), 3.61 (dd, ³J(C2H,C4H) = 4.0 Hz, ³J(C2H,C1H) = 1.0 Hz, 1 H, C2H), 3.77 (dd, ³J(C4H,C2H) = 4.0 Hz, ³J(C4H,C5H) = 1.0 Hz, 1 H, C4H), 4.60 – 4.63 (m, 1 H, C5H); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 27.1 (C8), 28.1 (3 x CH₃), 48.4 (C1), 50.0 (C2), 53.1(C4), 59.0 (C5), 83.4 (OC(CH₃)₃), 149.7 (R₂NCOO), 173.5 (C7); **HRMS** (ESI⁺) (m/z): [M + NH₄⁺]⁺: berechnet für [C₁₁H₁₅NO₄ + NH₄⁺]⁺: 243.1339, gef.: 243.1332.

Reduktive Öffnung des Lactams^[311, 377]

tert-Butyl *N*-[(1*S*,2*R*,4*R*,5*S*)-4-(hydroxymethyl)-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-yl]-carbammat (**46**)

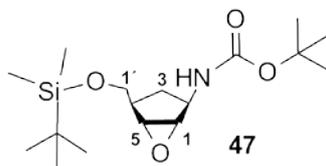


In trockenem Methanol (200 mL) löste man das Epoxid (**45**) 12.2 g (53.9 mmol) und kühlte die Lösung auf 0 °C. Dann gab man langsam NaBH₄ (10.2 g, 269 mmol, 5 eq) zu, wobei darauf geachtet wurde, dass keine zu starke Wasserstoffbildung auftrat. Die Reaktionslösung wurde anschließend eine Stunde bei RT gerührt und der Reaktionsverlauf per DC verfolgt. Die milchige Suspension wurde, nachdem kein Edukt mehr vorhanden war, mit Essigsäure (10 % in MeOH) neutralisiert, das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der farblose Rückstand in gesättigter NH₄Cl Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase extrahierte man viermal mit Chloroform (4 x 150 mL) und anschließend die vereinigten organischen Phasen nochmals mit Wasser und trocknete über Na₂SO₄. Das Chloroform wurde *in vacuo* entfernt, wobei das Produkt (**46**) in Form farbloser Kristalle zurückblieb (94 %, 11.6 g, 50.6 mmol).

R_f = 0.53 (Toluol/EtOAc 1:1 v/v); **Smp.**: 124.4 – 126.1 °C; **FTIR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3413, 3331, 2977, 2951, 2912, 1687, 1524, 1367, 1315, 1282, 1254, 1167, 1012, 840 cm⁻¹; **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 – 1.47 (m, 1 H, C3H_b), 1.44 (s, 9 H, *t*Bu), 2.02 – 2.16 (m, 1 H, C3H_a), 2.40 (ddd, ³*J*(C4H,C1'H_a) = 8.0 Hz, ³*J*(C4H,C1'H_b) = 2.0 Hz, ³*J*(C4H,C3H) = 8.0 Hz, 1 H, C4H), 3.42 (s, 2 H, C1H, C5H), 3.66 (dd, ²*J*(C1'H_a,C1'H_b) = 8.0 Hz, ³*J*(C1'H_a,C4H) = 2.0 Hz, 1 H, C1'H_a), 3.90 (dd, ²*J*(C1'H_b, C1'H_a) = 8.0 Hz, ³*J*(C1'H_b,C4H) = 2.0 Hz, 1 H, C1'H_b), 4.17 – 4.33 (m, 1 H, C2H), 5.85 (br d, ³*J*(NH,C2H) = 8.0 Hz, 1 H, NH), OH konnte nicht detektiert werden; **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ = 28.4 (3 x CH₃), 32.7 (C3), 40.3 (C4), 49.8 (C2), 59.4, 59.8 (C1, C5), 62.8 (C1'), 79.3 (OC(CH₃)₃), 155.5 (NHCOO); **HRMS** (ESI⁺) (m/z): [M + H⁺]⁺ berechnet für [C₁₁H₁₉NO₄ + H⁺]⁺: 230.1387, gef.: 230.1380.

Schützung der primären Hydroxygruppe

tert-Butyl-*N*-{(1*S*,2*R*,4*R*,5*R*)-4-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]-6-oxa-bicyclo-[3.1.0]-hex-2-yl}-carbammat (**47**)

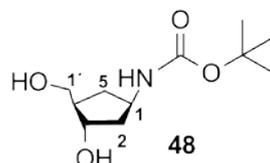


Das Epoxid (**46**) (15.7 g, 68.3 mmol), Imidazol (10.5 g, 150 mmol, 2.2 eq) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBSCl) (22.6 g, 150 mmol, 2.2 eq) wurden in trockenem DMF (100 mL) gelöst und für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktion beendet war (DC) wurde der Reaktionsansatz mit 400 mL Ethylacetat versetzt und mit gesättigter NaHCO₃ Lösung (2 x 500 mL) und NaCl-Lösung (4 x 500 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und das gelbliche Öl säulenchromatographisch (Toluol/EtOAc = 8:1) aufgereinigt. Das Produkt (**47**) konnte als farbloses Öl in 90 %er Ausbeute (21.3 g, 61.5 mmol) erhalten werden.

$R_f = 0.67$ (Toluol/EtOAc 6:1 v/v); **FTIR** (ATR): $\tilde{\nu} = 3392, 2954, 2930, 2858, 1711, 1504, 1472, 1391, 1366, 1325, 1255, 1169, 1094, 1047, 1016, 835, 778$ (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.22$ (s, 6 H, 2 x Si-CH₃), 0.58 (s, 9 H, Si-*t*Bu), 0.98 (d, ² J (C3H_a, C3H_b) = 16.0 Hz, 1 H, C3H_a), 1.06 (s, 9 H, *t*Bu), 1.55 – 1.79 (m, 1 H, C3H_b), 1.90 – 2.02 (m, 1 H, C4H), 3.27 (dd, ² J (C1'H_b, C1'H_a) = 10.0 Hz, ³ J (C1'H_a, C4H) = 2.0 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.33 (d, ³ J (C5H, C1H) = 2.0 Hz, 1 H, C5H), 3.49 (dd, ² J (C1'H_b, C1'H_a) = 10.0 Hz, ³ J (C1'H_b, C4H) = 2.0 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.75 – 3.88 (m, 1 H, C2H), 5.37 (br d, ³ J (NH, C2H) = 10.0 Hz, 1 H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): $\delta = -5.5$ (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃), 18.8 (SiC(CH₃)₃), 25.9 (3 x SiC(CH₃)₃), 28.4 (3 x OC(CH₃)₃), 33.4 (C3), 40.7 (C4), 49.6 (C2), 59.5, 59.8 (C1, C5), 64.8 (C1'), 79.1 (OC(CH₃)₃), 155.3 (NHCOO); **HRMS** (ESI⁺) (m/z): [M + H]⁺ berechnet für [C₁₇H₃₃NO₄Si + H]⁺: 344.2252, gef.: 344.2240.

Reduktive Öffnung des Epoxids:

tert-Butyl-*N*-[(1*R*,3*S*,4*R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]carbammat (**48**)



Der TBS-geschützte Alkohol **47** (1.06 g, 3.08 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Toluol (22 mL) gelöst. Zur Lösung wurde vorsichtig Red-Al[®] (1.20 mL, 6.16 mmol, 2 eq, 65 %ige Lösung in Toluol) zugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert und nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur beendet indem 40 mL gesättigte NH₄Cl-Lösung zum Reaktionsansatz zugegeben wurden. Der Ansatz rührte danach für weitere 30 Minuten. Die weiße Suspension wurde anschließend mit 80 mL Ethylacetat verdünnt und mit NaCl-Lösung (4 x 120 mL) gewaschen. Die organische Phase

wurde über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösemittel abdestilliert. Der erhaltene fahl gelbe Feststoff wurde in eine Nutsche überführt und mit *iso*-Hexan gewaschen. Der saubere, farblose Filtrerrückstand konnte in einer Ausbeute von 94 % (670 mg, 2.90 mmol) erhalten werden.

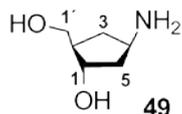
R_f = 0.46 (CHCl₃/MeOH 9:1 v/v); **Smp.**: 126 – 127 °C; **FTIR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3373, 3282, 2989, 2966, 2928, 1684, 1531, 1438, 1364, 1280, 1252, 1230, 1177, 1052, 1014, 621 cm⁻¹; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.04 – 1.15 (m, 1 H, C5H_b), 1.43 (s, 9 H, *t*Bu), 1.76 – 2.00 (m, 4 H, C2H_b, C2H_a, C4H, OH), 2.21 – 2.36 (m, 1 H, C5H_a), 3.56 – 3.61 (m, 1 H, C1'H_a), 3.78 – 3.83 (m, 1 H, C1'H_b), 4.06 – 4.19 (m, 2 H, C1H, C3H), 4.48 – 4.72 (br, 1 H, NH), OH Gruppe nicht detektierbar; **¹³C-NMR** (100 MHz, Aceton-D₆): δ = 28.5 (3 x CH₃), 34.4 (C5), 41.6 (C2), 49.4 (C4), 49.4 (C1), 63.9 (C1'), 73.3 (C3), 77.3 (OC(CH₃)₃), 155.2 (NHCOO); **HRMS** (ESI⁺) (m/z): [M + H⁺]⁺ ber. für [C₁₁H₂₁NO₄ + H⁺]⁺: 232.1543, gef.: 232.1537.

Entschützung der Boc-Schutzgruppe des Carbamats

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe des Edukts **48** wurde auf zwei verschiedene Arten erreicht.

Variante A: Thermische Entschützung

(1*S*,2*R*,4*R*)-4-Amino-2-(hydroxymethyl)cyclopentanol (**49**)



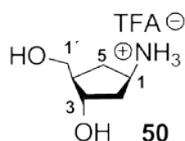
Zur thermischen Entschützung wurden 20 mL sorgfältig entgastes Wasser in einem Schlenkkolben vorgelegt. Das Carbamat **48** (1.03 g, 4.44 mmol) wurde zugegeben, der Kolben mit einem Septum verschlossen und die Reaktionslösung nochmals entgast. Der Reaktionsansatz wurde auf 120 °C über Nacht erhitzt. Die Reaktion wurde anschließend auf Vollständigkeit überprüft (DC). Anschließend wurde die Lösung mit flüssigem Stickstoff eingefroren und das Wasser mit Hilfe einer Lyophilie über Nacht entfernt. Das Produkt **49** konnte als farbloses Harz erhalten werden (0.58 g, 4.42 mmol). Das äußerst oxidationsempfindliche Amin **49** wurde anschließend umgehend für die weiteren Reaktionen eingesetzt.

R_f = 0.46 (MeOH/ CH₂Cl₂ 1:4 v/v); **Smp.**: 84 – 84 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3408, 3258, 2958, 2928, 2860, 1603, 1444, 1365, 1215, 1177, 1092, 1070, 1029, 838, 642, 531, 464 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 0.99 (dt, ²J (C3H_a, C3H_b) = 12.8 Hz, ³J (C3H_a, C2H, C4H) =

8.0 Hz, 1 H, C3H_a), 1.44–1.54 (m, 1 H, C5H_a), 1.61–1.70 (m, 1 H, C5H_b), 1.72–1.83 (m, 1 H, C2H), 1.99 (dt, ²J (C3H_b,C3H_a) = 12.9 Hz, ³J (C3H_b,C2H,C4H) = 7.6 Hz, 1 H, C3H_b), 3.26–3.35 (m, 2 H, C1'H_a, C2H), 3.39 (dd, ²J (C1'H_b,C1'H_a) = 10.4 Hz, ³J (C1'H_b,C2H) = 5.7 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.86 (br s, 1 H, C1H), (2 x OH and NH₂ – Signale nicht detektiert); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-D₆): δ = 38.0 (C1), 44.1 (C3), 49.8 (C5), 50.0 (C2), 63.3 (C1'), 72.6 (C4); HRMS (ESI⁺) (m/z): [M + H⁺]⁺ ber. für [C₆H₁₃NO₂ + H⁺]⁺: 132.1019, gef.: 132.1012.

Variante B: Entschützung unter sauren Bedingungen

(1R,3S,4R)-ammonium-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentan-trifluoracetat (**50**)



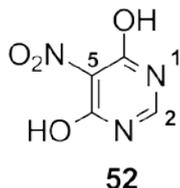
Zur sauren Entschützung wurde das Carbamat (*tert*-Butyl *N*-[(1R,3S,4R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]carbamate) **48** (1.03 g, 4.44 mmol) in 10 mL einer wässrigen Lösung von TFA in Wasser (95:5) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 30 min bei RT gerührt und Säure und Wasser unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene farblose Öl anschließend nochmals sorgfältig im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt das nicht oxidationsempfindliche Salz **50** als farbloses Öl in 99 % Ausbeute (1.01 mg, 4.40 mmol).

Smp. 3 – 4 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3295, 3045, 2938, 1785, 1668, 1532, 1432, 1392, 1369, 1350, 1178, 1130, 1077, 1017, 920, 880, 839, 798, 777, 722 (cm⁻¹); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 1.07 (dt, ²J (C3H_a,C3H_b) = 13.3 Hz, ³J (C3H_a,C1H,C4H) = 9.1 Hz, 1 H, C3H_a), 1.63–1.70 (m, 1 H, C5H_a), 1.72–1.81 (m, 2 H, C5H_b, C2H), 2.03–2.11 (m, 1 H, C3H_b), 3.27 (dd, ²J (C1'H_a,C1'H_b) = 11.1 Hz, ³J (C1'H_a,C2H) = 6.3 Hz, 1 H, C1'H_a), 3.33 (dd, ²J (C1'H_b,C1'H_a) = 11.2 Hz, ³J (C1'H_b,C2H) = 5.8 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.44–3.52 (m, 1 H, C4H), 3.83 (m, 1H, C1H), zwei Signale der OH- sowie der NH₂-Protonen wurden nicht detektiert; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 30.2 (C3), 39.0 (C5), 48.9 (C2), 49.7 (C4), 63.2 (C1'), 73.1 (C1), 116.6 (q, TFA), 164.2 (q, TFA); ¹⁹F-NMR (200 MHz, D₂O) δ = -76.3 (s, 3 F, CF₃CO₂⁻); HRMS (ESI⁺) (m/z): [M + H⁺]⁺: ber. für [C₆H₁₃NO₂+H⁺]⁺: 132.1019, gef.: 132.1020.

5.8.2 Synthese des β -cFaPydA Phosphoramiditbausteins 35

Synthese des heterocyclischen Pyrimidinbausteins

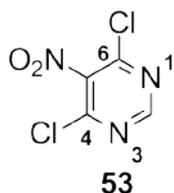
4,6-Dihydroxy-5-nitropyrimidin (**52**)^[378]



Zu einer im Eisbad gekühlten Lösung bestehend aus Eisessig (60 mL) und konzentrierter Salpetersäure (20 mL) wurde langsam über einen Zeitraum von 30 min das 4,6-Dihydroxypyrimidin **51** (20.0 g, 178 mmol) gegeben. Die Lösung rührte nach Beendigung der Zugabe zwischen 10 und 20 °C für weitere 30 min anschließend 10 weitere Minuten bei RT. Abschließend schüttete man die Reaktionsmischung auf Eis und filtrierte den erhaltenen Niederschlag ab und trocknete ihn im Hochvakuum. Das 4,6-Dihydroxy-5-nitropyrimidin **52** (25 g, 160 mmol, 90 %) wurde als gelber Feststoff isoliert.

Smp.: > 320 °C; **FTIR** (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3027, 2937, 1726, 1664, 1555, 1468, 1350, 1310, 1280, 1196, 884, 788, 631 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 8.72 (s, 1 H, C2H), 13.2 (br s, 2 H, 2 x OH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-D₆): δ = 119.9 (C4-NO₂), 150.9 (C2H), 155.5 (2 x C4/6-OH); **HRMS** (EI⁺): m/z : [M]⁺ ber. für = [C₄H₃N₃O₄]⁺ = 157.0118, gef.: 157.0118.

4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin (**53**)^[315]

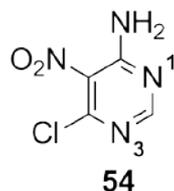


Zu einer Suspension, bestehend aus 4,6-Dihydroxy-5-nitropyrimidin **52** (500 mg, 3.18 mmol) und Oxalylchlorid (2.0 mL, 22.4 mmol, 7 eq) gab man vorsichtig 1 mL trockenes DMF (12.8 mmol, 4 eq). Die Reaktionslösung wurde nun für 4 h unter Rückfluss erhitzt und änderte dabei ihre Farbe von rot nach gelb. Der gesamte Reaktionsansatz wurde anschließend im Hochvakuum getrocknet und der erhaltene Feststoff auf Eis gegeben (5 mL). Die Lösung wurde mit Toluol extrahiert (3 x 20 mL) und die organische Phase nochmals mit Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ entfernte man das Lösungsmittel unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer. Das so erhaltene 4,6-Dichlor-

5-nitropyrimidin **53** wurde mittels *n*-Hexan umkristallisiert, wobei man farblose Plättchen erhielt (413 mg, 2.13 mmol, 67 %).

$R_f = 0.60$ (Toluol:EtOAc, 10:1 v/v); **Smp.**: 101 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu} = 3055, 1682, 1588, 1534, 1428, 1357, 1313, 1127, 1050, 976, 855, 834, 785, 718$ (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 8.75$ (s, 1 H, C2H); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 119.9$ (C4-NO₂), 150.9 (C2-H), 155.5 (2x C4/6-Cl); **HRMS** (EI⁺) (*m/z*): [M]⁺ ber. für = C₄H³⁵Cl₂N₃ = 192.9440, gef.: 192.9433.

6-Amino-6-chloro-5-nitropyrimidin (**54**)^[378-379]

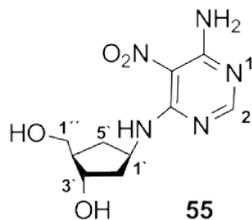


Zu einer Suspension aus 4,6-dichloro-5-nitropyrimidine **53** (800 mg, 4.12 mmol) in Dioxan die auf 8 °C gehalten wurde, gab man langsam mittels einer Spritzenpumpe eine frisch hergestellte Lösung bestehend aus Essigsäure (1.6 mL) in Ammoniumhydroxid (28 %, 3.2 mL). Die Lösung ließ man nicht über 15 °C kommen und rührte nach Zugabe für weitere 90 min unter Eiskühlung. Das Produkt wurde danach durch Zugabe von Eiswasser (18 mL) ausgefällt. Der erhaltene gelbliche Niederschlag wurde abfiltriert und aus Benzol umkristallisiert, um ihn vom zweifach aminierten Produkt abzutrennen. Das Produkt **54**, erhielt man als dünne, farblose Nadeln (425 mg, 2.43 mmol, 60 %).

$R_f = 0.36$ (CHCl₃/MeOH 10:1 v/v); **Smp.**: 155 °C; **FTIR** (ATR): $\tilde{\nu} = 3307, 3144, 1647, 1575, 1519, 1396, 1340, 1233, 1042, 964, 861, 777$ (cm⁻¹); **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-D₆): = 7.95 (s, 1H, C2H), 8.67 – 8.80 (br s, 2H, NH₂); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-D₆): = 115.3 (C4-NO₂), 152.0 (C2-H), 155.4 (C6-Cl), 160.3 (C4-NH₂); **HRMS** (EI⁺): [M]⁺: ber. für C₄H₃³⁵ClN₄O₂, 173.9945; gef., 173.9948.

5.8.3 Kupplung und Synthese zum Phosphoramidit **35**

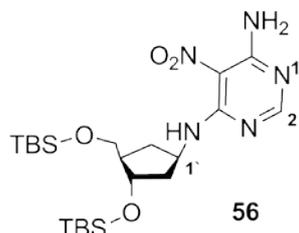
N-4-[(1'R,3'S,4'R)-3'-Hydroxy-4'-hydroxymethyl)-cyclopentyl]amino}-5-nitro-6-amino-pyrimidin (55**).**



Das farblose Öl **50** (420 mg, 1.71 mmol) wurde ohne weitere Reinigung in 2.10 mL trockenem Ethanol gelöst und 4-amino-6-chloro-5-nitropyrimidin **54** (302 mg, 1.73 mmol, 1 eq) zusammen mit Triethylamin (1.68 mL, 12.1 mmol, 7 eq) zugegeben. Die Mischung wurde für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, danach auf RT abgekühlt und der erhaltene gelbe Niederschlag abfiltriert. Der Feststoff wurde mit Ethanol gewaschen und im HV getrocknet. Das erhaltene Produkt **55** (377 mg, 1.40 mmol, 82 %) konnte ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt werden.

Smp.: Zers. > 169 °C; **R_f** = 0.40 (CHCl₃/MeOH 4:1 v/v); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3447, 2928, 1651, 1605, 1515, 1398, 1369, 1257, 1137, 1043, 1004, 794, 586, 557, 425 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 1.24–1.34 (m, 1 H, C5'H_a), 1.76 (ddd, ²J (C2'H_a,C2'H_b) = 13.2 Hz, ³J (C2'H_a,C1'H) = 7.72 Hz, ³J (C2'H_a,C3'H) = 6.53 Hz, 1 H, C2'H_a), 1.85–1.93 (m, 2 H, C2'H_b, C4'H), 2.25 (dt, ²J (C5'H_b,C5'H_a) = 12.9 Hz, ³J (C5'H_b,C1'H,C4'H) = 8.1 Hz, 3.38 (dd, ²J (C1'H_a,C1'H_b) = 10.5 Hz, ³J (C1'H_a,C4'H) = 5.7 Hz, 1 H, C1'H_a), 3.44 (dd, ²J (C1'H_b,C1'H_a) = 10.5 Hz, ³J (C1'H_a,C4'H) = 5.5 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.96 (dt, ³J (C3'H,C2'H_a) = 6.25 Hz, ³J (C3'H,C2'H_b,C4'H) = 4.4 Hz, 1 H, C3'H), 4.60 (br, 2 H, 2 x OH), 4.71 (m, 1 H, C1'H), 7.97 (s, 1 H, C2H), 8.51 (br, 1 H, NH), 8.58 (br, 1 H, NH), 9.15 (d, ³J (C1'NH,C1'H) = 7.52 Hz, 1 H, C1'NH); Signale für 2x OH wurden nicht detektiert. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-D₆): δ = 34.1 (C'5), 41.5 (C'2), 48.9 (C'4), 50.1 (C'1), 62.5 (C''1), 72.1 (C'3), 111.7 (C5), 156.0 (C6), 158.8 (C4), 159.4 (C2); **HRMS** (ESI⁺) (m/z): [M + H⁺]: ber. für [C₁₀H₁₅N₅O₄ + H]⁺: 270.1197; gef.: 270.1199.

***N*-4-[[[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl]-cyclopentyl]amino]-5-nitro-6-amino-pyrimidin (**56**).**

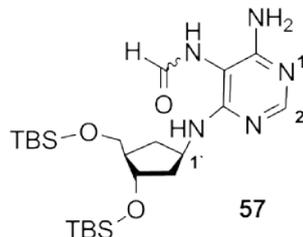


Das Produkt **55** (450 mg, 0.90 mmol) wurde in trockenem DMF (15 mL) gelöst. Zur Lösung gab man Imidazol (184 mg, 2.71 mmol, 3 eq) und TBSCl (408 mg, 2.71 mmol, 3 eq) und rührte die Reaktion für 3 h bei RT. Nachdem kein Edukt mehr vorhanden war, wurde die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (125 mL) verdünnt und mit gesättigter NaHCO₃ Lösung (1x 125 mL) sowie gesättigter Natriumchloridlösung (4 x 125 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden nochmals mit 100 mL Ethylacetat rückextrahiert. Nachdem die gesammelten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet worden waren, entfernte man das organische Lösungsmittel unter reduziertem Druck. Das erhaltene Rohprodukt wurde *via* Säulenchromatographie (CHCl₃ : MeOH 20:1 → 10:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff (336 mg, 0.68 mmol, 75 %) erhalten. Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse erhielt man indem **56** in *n*-Heptan (HPLC-Reinheit) bei 40°C löste und auf Raumtemperatur abkühlte. Die Verbindung kristallisierte über einen Zeitraum von 14 Tagen als farblose Plättchen bei Raumtemperatur (siehe Tabelle 17 Anhang für Strukturdaten).

Smp.: 50 °C; **R_f** = 0.59 (CHCl₃/MeOH, 10:1 v/v); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3397, 3344, 3274, 3122, 2953, 2927, 2855, 1583, 1546, 1522, 1471, 1390, 1358, 1247, 1116, 1094, 1038, 1006, 960, 936, 870, 832, 796, 775 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.03 (s, 3 H, Si-CH₃), 0.04 (s, 3 H, Si-CH₃), 0.04 (s, 3 H, Si-CH₃), 0.04 (s, 3 H, Si-CH₃), 0.87 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 0.88 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 1.31 (dt, ²*J* (C5'H_a,C5'H_b) = 13.1 Hz, ³*J* (C5'H_a,C1'H,C4'H) = 8.8 Hz, 1 H, C5'H_a), 1.75 (ddd, ²*J* (C2'H_a,C2'H_b) = 13.1 Hz, ³*J* (C2'H_a,C1'H) = 7.7 Hz, ³*J* (C2'H_a,C3'H) = 6.7 Hz, 1 H, C2'H_a), 2.04 (m, 1 H, C4'H), 2.09 (ddd, ²*J* (C2'H_b,C2'H_a) = 12.6 Hz, ³*J* (C2'H_b,C1'H) = 7.8 Hz, ³*J* (C2'H_b,C3'H) = 4.4 Hz, 1 H, C2'H_b), 1.31 (dt, ²*J* (C5'H_b,C5'H_a) = 13.1 Hz, ³*J* (C5'H_b,C1'H,C4'H) = 7.88 Hz, 1 H, C5'H_b), 3.56 (dd, ²*J* (C1'H_a,C1'H_b) = 10.1 Hz, ³*J* (C1'H_a,C4'H) = 5.0 Hz, 1 H, C1'H_a), 3.61 (dd, ²*J* (C1'H_b,C1'H_a) = 10.1 Hz, ³*J* (C1'H_b,C4'H) = 5.0 Hz, 1 H, C1'H_b), 4.17 (m, 1 H, C3'H), 4.77 (m, 1 H, C1'H), 7.20 (br, 1 H, NH), 8.01 (s, 1 H, C2H), 8.57 (br, 1 H, NH), 9.02 (d, ³*J* (C1'NH, C1'H) = 7.2 Hz, 1 H, C1'NH); **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = -5.5 (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃), -4.8 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), 18.0 (Si-C(CH₃)₃), 18.3 (Si-C(CH₃)₃), 25.8 (3 x Si-C(CH₃)₃), 25.9 (3 x Si-C(CH₃)₃), 34.0 (C'5), 42.2 (C'2), 49.8 (C'4), 50.3 (C'1), 63.3 (C'1), 73.1 (C'3), 112.7 (C5), 156.6 (C6), 159.3

(C4), 159.5 (C2); **HRMS** (ESI⁺), [M + H⁺]: ber. für [C₂₂H₄₃N₅O₄Si₂+H]⁺: 498.2926; gef.: 498.2926.

N-4-[[[(1'R,3'S,4'R)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl]-cyclopentyl]amino]-5-formylamino-6-amino-pyrimidin (57).

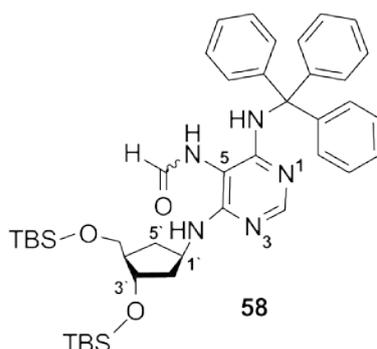


Der Silylether **56** (200 mg, 0.40 mmol) wurde in trockenem Ethanol (5 mL) gelöst und die Reaktionsmischung sorgfältig entgast. Zu dieser Lösung gab man eine vorher ebenfalls sorgfältig entgaste Suspension von Palladium auf Aktivkohle (Pd 10 %, 100 mg) in trockenem Ethanol (5 mL). Die Mischung wurde mittels eines Ballons unter Wasserstoffatmosphäre gesetzt und für 3 h gerührt. Unter strengem Ausschluss von Sauerstoff filtrierte man das Pd/C (0.2 µm Celluloseacetatfilter - MilliporeTM) ab. Das Lösungsmittel entfernte man im HV und koevaporierte das luftempfindliche Amin vorsichtig dreimal mit trockenem Pyridin (3 x 1.0 mL). Das Amin gab man anschließend in 10 mL entgastes THF (abs.) und fügte 815 µL trockenes Pyridin hinzu. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und 617 µL des gemischten Formylacetylanhydrids zugegeben. Dieses wurde vor jeder Reaktion frisch hergestellt. Hierzu erhitzte man eine Lösung bestehend aus Ameisensäure (501 µL) und Essigsäureanhydrid (1.28 mL) für 15 min auf 60 °C und entgaste die Lösung anschließend sorgfältig bei 0°C. Nach Zugabe des gemischten Anhydrids rührte man die Lösung bei 0°C und ließ über Nacht RT erreichen. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (CHCl₃:MeOH 20:1 → 10:1). Das Formamid **57** erhielt man als farblosen Schaum (147 mg, 0.30 mmol, 75 % über zwei Schritte). Das Verhältnis von *cis*- zu *trans*- Formamid in DMSO betrug 3:1, in CDCl₃ 1:1.

Smp.: 141 – 143 °C; **R_f** = 0.19; (CHCl₃/MeOH 10:1 v/v); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3338, 2929, 2856, 1685, 1589, 1501, 1470, 1360, 1327, 1250, 1077, 1005, 938, 832, 772, 667 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 0.03 (s, 12 H, 4 x Si-CH₃), 0.87 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 0.87 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 1.10 (dt, ²J (C5'H_a,C5'H_b) = 12.6 Hz, ³J (C5'H_a,C1'H,C4'H) = 9.3 Hz, 1 H, C5'H_a), 1.68–1.82 (m, 2 H ,C2'H_a,C2'H_b), 1.84–1.92 (m, 1 H, C4'H), 2.11 (dt, ²J (C5'H_b,C5'H_a) = 12.8 Hz, ³J (C5'H_b,C1'H,C4'H) = 9.3 Hz, 1 H, C5'H_b), 3.51 (dd, ²J (C1'H_a,C1'H_b) = 9.5 Hz, ³J (C1'H_a,C4'H) = 5.0 Hz, 1 H, C1'H_a), 3.55 (dd, ²J (C1'H_b,C1'H_a) = 9.5 Hz, ³J (C1'H_b,C4'H) = 5.3 Hz, 1 H, C1'H_b), 4.08 (dt, ³J (C3'H,C2'H_a)

= 7.2 Hz, 3J (C3'H,C2'H_b,C4'H) = 4.30 Hz, 1 H, C3'H), 4.50 (m, 1 H, C1'H), 5.86 (d, 3J (C1'NH,C1'H) = 7.80 Hz, 0.75 H, [*cis*-Formamid]C1'NH), 5.89 (br, 1 H, NH), 6.07 (br, 1 H, NH), 6.20 (d, 3J (C1'NH,C1'H) = 7.80 Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]C1'NH), 7.72 (d, 3J (NHCHO,NHCHO) = 11.6 Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]NHCHO, 7.84 (s, 0.75 H, [*cis*-Formamid]C2H), 7.84 (s, 0.25 H, [*trans*-Formamid]C2H), 8.10 (d, 3J (NHCHO,NHCHO) = 11.8 Hz, 0.25 H, [*cis*-Formamid]NHCHO, 8.20 (d, 3J (NHCHO,NHCHO) = 11.8 Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]NHCHO, 8.70 (d, 3J (NHCHO,NHCHO) = 1.0 Hz, 0.75 H, [*cis*-Formamid]NHCHO); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-D₆): δ = -5.44 (Si-CH₃), -5.42 (Si-CH₃), -4.82 (Si-CH₃), -4.62 (Si-CH₃), 17.71 (Si-C(CH₃), 18.00 (Si-C(CH₃), 25.72 (3 x Si-C(CH₃), 25.80 (3 x Si-C(CH₃), 33.7([*trans*-Formamid]C'5), 33.8 ([*cis*-Formamid]C'5), 40.7 ([*trans*-Formamid]C'2), 41.4 ([*cis*-Formamid]C'2), 48.7 (C'1), 49.5 ([*trans*-Formamid]C'4), 49.5 ([*cis*-Formamid]C'4), 63.7 ([*cis*-Formamid]C''1), 63.9 ([*trans*-Formamid]C''1), 72.8 ([*cis*-Formamid]C'3), 72.9 ([*trans*-Formamid]C'3), 94.0 ([*cis*-Formamid]C5), 94.2 ([*trans*-Formamid]C5), 155.5 ([*cis*-Formamid]C2), 155.9 ([*trans*-Formamid]C2), 157.7 ([*cis*-Formamid]C4), 158.7 ([*cis*-Formamid]C6), 159.1 ([*trans*-Formamid]C4), 160.3 ([*trans*-Formamid]C6), 160.9 ([*cis*-Formamid]CHO), 165.6 ([*trans*-Formamid]CHO); **HRMS** (ESI⁺), [M + H⁺]: ber. für [C₂₃H₄₅N₅O₃Si₂+H]⁺: 496.3134; gef.: 496.3131.

***N*-4-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl]-cyclopentyl]amino}-5-formylamino-6-amino-6-trityl-pyrimidin (**58**)**

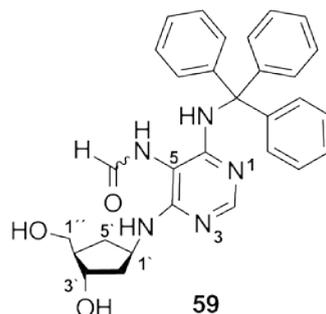


Den Silylether **57** (555 mg, 1.12 mmol) löste man in trockenem Dichlormethan und gab zur Lösung sorgfältig ausgeheiztes Molsieb (4 Å). Die Lösung wurde nun im Eisbad gekühlt und Triphenylmethylchlorid (376 mg, 1.35 mmol, 1.2 eq) portionsweise zugegeben. Die Lösung ließ man über Nacht rühren, und dabei auf RT kommen. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt *via* Säulenchromatographie (CHCl₃:MeOH: 200:1 → 20:1) gereinigt. Die Substanz **58** konnte als farbloser Schaum isoliert werden (462 mg, 0.63 mmol, 57 %). Das erhaltene *cis*- zu *trans*- Verhältnis der

Formamidgruppe in MeCN betrug 1:3, in CDCl₃ lagen beide Konformere im Verhältnis 1:1 vor.

Smp.: 133 – 134 °C; **R_f:** 0.48 (CHCl₃/MeOH 20:1 v/v); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3335, 2914, 2360, 2336, 2060, 2009, 1678, 1588, 1478, 1442, 1326, 1266, 1184, 1155, 1032, 899, 748, 728, 698, 655, 636, 626, 614 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, MeCN-D₃): δ = 0.05 (s, 4 H, [*trans*-Formamid]Si-CH₃), 0.06 (s, 8 H, [*cis*-Formamid]Si-CH₃), 0.88 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 0.90 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 1.09–1.17 (m, 1 H, C5'H_a), 1.65 (ddd, ²J (C2'H_a,C2'H_b) = 13.0 Hz, ³J(C2'H_b,C1'H) = 8.6 Hz, ³J (C2'H_a,C3'H) = 6.6 Hz, 1 H, C2'H_a), 1.84–1.96 (m, 2 H, C2'H_b,C4'H), 2.14–2.22 (m, 1 H, C5'H_b), 3.50 (d, ²J(C1'H_a,C1'H_b) = 5.6 Hz, 0.5 H, [*trans*-Formamid]C1'H_b,C1'H_a), 3.58 (d, ²J(C1'H_b,C1'H_a) = 5.7 Hz, 1.5 H, [*cis*-Formamid]C1'H_b,C1'H_a), 4.12–4.16 (dt, ³J (C3'H,C2'H_b) = 6.6 Hz, ³J (C3'H,C2'H_a,C4'H) = 4.3 Hz, 1 H, C3'H), 4.43–4.54 (m, 1 H, C1'H), 5.14 (d, ³J (C1'NH, C1'H) = 7.6 Hz, 0.75 H, [*cis*-Formamid]C1'NH), 5.40 (d, ³J (C1'NH, C1'H) = 7.7 Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]C1'NH), 6.93 (d, ³J (NHCHO,NHCHO) = 11.7 Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]NHCHO), 7.18–7.28 (m, 10 H, -Trityl), 7.31–7.34 (m, 5 H, -Trityl), 7.42 (s, 0.75 H, [*cis*-Formamid]NHCHO), 7.51 (s, 0.25 H, [*trans*-Formamid]C2H), 7.59 (s, 0.75 H, [*cis*-Formamid]C2H), 7.92 (d, ³J (NHCHO,NHCHO) = 11.7 Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]NHCHO), 8.32 (d, ³J (NHCHO,NHCHO) = 1.2 Hz, 0.75 H, [*cis*-Formamid]NHCHO), 9.02 (br, 0.25 H, [*trans*-Formamid]NH), 9.04 (br, 0.75 H, [*cis*-Formamid]NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, MeCN-d₃): δ = -4.7 (Si-CH₃), -4.7 (Si-CH₃), -4.0 (Si-CH₃), -3.8 (Si-CH₃), 19.1 (Si-C(CH₃)), 19.4 (Si-C(CH₃)), 26.8 (3 x Si-C(CH₃)₃), 26.9 (3 x Si-C(CH₃)₃), 35.5 (C5'), 43.1 (C2'), 50.8 (C1'), 51.3 (C4'), 65.3 (C1'), 71.8 (3 x Cq-trityl), 74.8 (C3'), 97.7 (C5), 127.9 (3 x CH-Trityl), 129.0 (6 x CH-Trityl), 130.2 (6 x CH-Trityl), 147.4 (3 x Cq-Trityl), 155.9 (C2), 158.3 (C4), 159.0 (C6), 162.6 (CHO); **HRMS** (ESI⁺), [M + H⁺]: ber. für [C₄₂H₅₉N₅O₃Si₂+H]⁺: 738.4229; gef.: 738.4238.

***N*-4-[[*(1'R,3'S,4'R)*-3'-hydroxy-4'-(hydroxymethyl)cyclopentyl]amin0]-5-formylamino-6-amino-6-trityl-pyrimidin (**59**)**

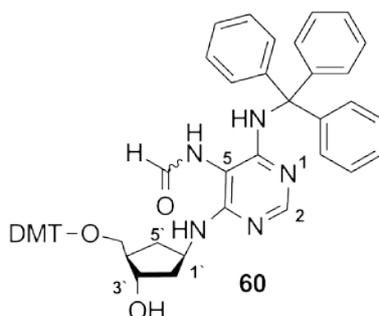


Das Edukt **58** (3 x 125 mg, 3 x 169 μmol) und trockenes THF (3 x 3.5 mL) gab man in drei verschließbare Kunststoffröhrchen. Weiterhin wurde trockenes Pyridin (3 x 131 μL) und HF·Pyridin Komplex (~ 65 % HF, 3 x 131 μL) zugegeben und Reaktionen bei RT über Nacht gerührt, wobei ein rötlicher Feststoff ausfiel. Die Reaktionsgefäße wurden zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Zur Reaktion wurde erneut trockenes THF (3 x 3.5 mL) sowie Methoxytrimethylsilane (3 x 405 μL) zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Danach entfernte man das Lösemittel und reduziertem Druck und trocknete den erhaltenen Feststoff im HV. Das Diol **58** wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (CHCl_3 : Methanol: 20:1 \rightarrow 10:1) und konnte in 94 % Ausbeute erhalten werden (243 mg, 477 μmol). Geeignete Kristalle zur Röntgenstrukturanalyse erhielt man, indem man **59** in Acetonitril (HPLC-Reinheit) löste. Kristalle zeigten sich nach sieben Tagen bei RT (siehe Tabelle 18 für Struktur und Daten).

Smp.: Zers. > 160°C; **R_f** = 0.12 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:1 v/v); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3423, 2956, 2928, 3856, 2360, 1725, 1700, 1580, 1492, 1470, 1443, 1255, 1117, 1073, 1038, 1004, 938, 874, 834, 773, 745 (cm^{-1}); **¹H-NMR** (400 MHz, MeCN-D_3): δ = 1.17 (dt, $^2J(\text{C5}'\text{H}_a, \text{C5}'\text{H}_b) = 13.0$ Hz, $^3J(\text{C5}'\text{H}_a, \text{C1}'\text{H}, \text{C4}'\text{H}) = 8.3$, 1 H, C5' H_a), 1.69 (m, 1 H, C2' H_a), 1.82–1.96 (m, 2 H, C2' $\text{H}_b, \text{C4}'\text{H}$), 2.20 (dt, $^2J(\text{C5}'\text{H}_b, \text{C5}'\text{H}_a) = 12.9$ Hz, $^3J(\text{C5}'\text{H}_b, \text{C1}'\text{H}, \text{C4}'\text{H}) = 8.3$ Hz, 1 H, C5' H_b), 3.47–3.55 (m, 2 H, C1' $\text{H}_a, \text{C1}'\text{H}_b$), 4.00–4.04 (m, 1 H, C3' H), 4.41–4.50 (m, 1 H, C1' H), 5.35 (d, $^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 7.67$ Hz, 0.75 H, [*cis*-Formamid]C1' NH), 5.95 (d, $^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 7.7$ Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]C1' NH), 6.99 (d, $^3J(\text{NHCHO}, \text{NHCHO}) = 11.4$ Hz, 0.25 H [*trans*-Formamid]NHCHO), 7.18–7.22 (m, 3 H, 3 x *para*-H -Trityl), 7.24–7.29 (m, 6 H, 6 x CH-Trityl), 7.31–7.35 (m, 6 H, 6 x CH-Trityl), 7.50 (s, (NHCHO, NHCHO), 0.75 H [*cis*-Formamid]NHCHO), 7.51 (s, 0,75 H, [*cis*-Formamid]C2H), 7.59 (s, 0.25 H, [*trans*-Formamid]C2H), 7.92 (d, $^3J(\text{NHCHO}, \text{NHCHO}) = 11.75$ Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]NHCHO), 8.31 (d, $^3J(\text{NHCHO}, \text{NHCHO}) = 1.16$ Hz, 0.75 H, [*cis*-Formamid]NHCHO), 8.57 (br, 1 H, NH), 2 x OH nicht detektiert; **¹³C-NMR** (100 MHz, MeCN-D_3): δ = 35.8 (C5'), 43.1 (C2'), 50.4 (C4'), 50.9 (C1'), 65.0 (C1'), 71.7 (C-Trityl),

74.8 (C3'), 97.6 (C5), 127.9 (3 x CH-Trityl), 129.0 (6 x CH-Trityl), 130.2 (6 x CH-Trityl), 147.4 (3 x CH-Trityl), 155.1 (C2), 155.9 (C4), 158.3 (C6), 162.7 (CHO); **HRMS** (ESI⁺), [M + H⁺]: ber. für [C₃₀H₃₁N₅O₃+H]⁺: 510.2500; gef.: 510.2503.

***N*-4-[[*(1'R,3'S,4'R)*-4'-(Dimethoxytrityl)oxy]methyl]-3'-hydroxycyclopentyl)amino]-5-(formylamino)-6-amino-6-trityl-pyrimidin (**60**)**

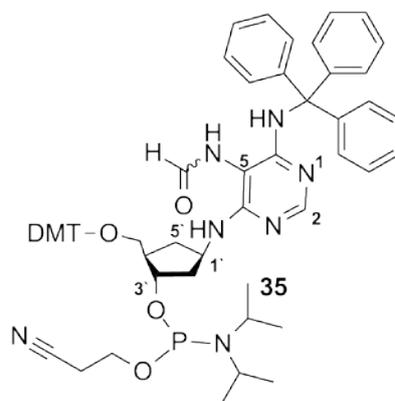


Die Verbindung **59** (214 mg, 0.42 mmol) wurde zweimal in trockenem Pyridin (2 x 1 mL) koevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde wieder in trockenem Pyridin (8.5 mL) gelöst und für 12 h über 4 Å Molsieb gerührt. Vor Zugabe der ersten 0.6 eq des Dimethoxytritylchlorids (DMTCl) (86 mg, 0.25 mmol,) wurde die Lösung im Eisbad gekühlt. Nach einer Stunde gab man die zweiten 0.6 eq. DMTCl hinzu. Die Lösung wurde für eine weitere Stunde auf Eis und danach 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 5 mL MeOH beendet, das Molsieb abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Das erhaltene Rohprodukt reinigte man mittels Säulenchromatographie (CHCl₃:MeOH Gradient: 200:1 → 100:1 → 50:1 → 10:1 mit 0.5 % Pyridin. Die Substanz **60** konnte als farbloser Schaum in einer Ausbeute von 73 % erhalten werden (249 mg, 0.31 mmol).

Smp.: 60–61 °C; **R_f** = 0.29 (CHCl₃/MeOH 20:1 v/v); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3444, 2968, 2915, 2836, 2360, 2338, 1724, 1607, 1508, 1456, 1446, 1285, 1244, 1175, 1152, 1136, 1068, 1030, 982, 903, 861, 822, 791, 726, 704, 651 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, MeCN-D₃): δ = 1.17 (dt, ²J (C5'H_a,C5'H_b) = 12.6 Hz, ³J (C5'H_a,C1'H,C4'H) = 9.6 Hz, 1 H, C5'H_a), 1.69 (dt, ²J (C2'H_a,C2'H_b) = 13.4 Hz, ³J (C2'H_a,C1'H,C5'H_b) = 8.1 Hz, ³J (C2'H_a,C1'H,C5'H_b) = 7.2 Hz, 1 H, C2'H_a), 1.86–1.92 (m, 1 H, C2'H_b), 1.99–2.10 (m, 1 H, C4'H), 2.23–2.33 (m, 1 H, C5'H_b), 3.01–3.05 (m, 1 H, C1''H_a), 3.07–3.10 (m, 1 H, C1''H_b), 3.77 (s, 6 H, 2 x OCH₃), 3.94–4.03 (m, 1 H, C3'H), 4.43–4.53 (m, 1 H, C1'H), 5.20 (d, ³J (C1'NH,C1'H) = 7.6 Hz, 0.75 H, [*cis*-Formamid]C1'NH), 5.43 (d, ³J (C1'NH,C1'H) = 7.7 Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]C1'NH), 6.09 (s, 1 H, OH), 6.85–6.89 (m, 4 H, 4 x *meta*-H *para*-CH₃O*Ph*), 6.99 (d, ³J (NHCHO,NHCHO) = 12.0 Hz, 0.25 H [*trans*-Formamid]NHCHO), 7.18–7.23 (m, 5 H, CH-DMT und Trityl), 7.24–7.35 (m, 20 H, CH-DMT und Trityl), 7.49 (s, 0.75 H, [*cis*-

Formamid]NHCHO), 7.53 (s, 1 H, C2H), 7.92 (d, 3J (NHCHO,NHCHO) = 11.7 Hz, 0.25 H, [*trans*-Formamid]NHCHO), 8.34 (d, 3J (NHCHO,NHCHO) = 1.1 Hz, 0.75 H, [*cis*-Formamid]NHCHO), 8.58 (br, 1 H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeCN-D₃): δ = 36.4 (C5'), 42.5 (C2'), 48.6 (C4'), 50.4 (C1'), 56.0 (2 x OCH₃) 66.3 (C1''), 71.4 (C-Trityl), 74.3 (C3'), 68.7 (C-DMT), 97.3 (C5), 114.1 (4 x *meta*-C *p*-CH₃OPh), 127.6 (CH-Trityl), 128.6 (CH-Trityl), 128.8 (CH-DMT), 129.1 (C-DMT), 129.9 (CH-Trityl), 131.1 (CH-DMT), 131.1 (CH-DMT), 132.3 (CH-DMT), 137.4 (CH-DMT), 137.5 (CH-DMT), 146.5 (CH-DMT), 147.0 (C-Trityl), 155.6 (C2), 157.9 (C4), 158.6 (C6), 159.6 (C-DMT), 162.3 (CHO); **HRMS** (ESI⁺), [M + H⁺]: ber. für [C₅₁H₄₉N₅O₅+H]⁺: 812.3806; gef.: 812.3813.

(1'R,3'S,4'R)-4'-[5-(formylamino)-6-amino-6-trityl-4-pyrimidinyl]amino}-5'-(Di-methoxytrityl)oxy]methyl}-3'-O-(N,N-diisopropyl)-(2-cyanoethyl)-phosphoramidit (35).



Unter Argon löste man Verbindung **60** (228 mg, 0.28 mmol) in trockenem sorgfältig entgastem Dichlormethan (3 mL), zusammen mit Diisopropylammoniumtetrazolid (24.3 mg, 0.14 mmol, 0.5 eq). Die Lösung wurde eine weiteres Mal entgast und anschließend im Eisbad 3-(Bis(diisopropylamino)phosphanoxy)propannitril (100 μL , 0.32 mmol, 1.1 eq) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die erhaltene Mischung wurde unter Hochvakuum getrocknet. Das reine Phosphoramidit wurde mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (CHCl₃: MeOH 20:1; 0.5 % Pyridin) auf desaktiviertem Silicagel (2 % Pyridin) erhalten. Das leicht gelblich bis farblose Produkt wurde zur besseren Aufbewahrung in einer kleinen Menge trockenen, sorgfältig entgastem Dichlormethan gelöst und langsam zu sauerstofffreiem *n*-Pentan (100 Volumenequivalente) zugetropft, worauf das Phosphoramidit ausfiel. Das Lösemittel wurde unter Argon abdekantiert und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Das Phosphoramidit **35** wurde als farbloser Feststoff erhalten (215 mg, 0.21 mmol, 76 %). Das mittels Fällung erhaltene Amidit konnte unter Argon (-20 °C) für mindestens ein Jahr ohne Oxidation aufbewahrt werden.

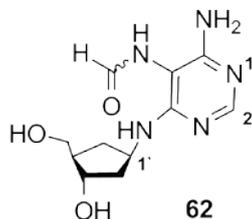
Experimentalteil

Das Diisopropylaminotetrazolat wurde aus frisch destilliertem Diisopropylamin (3 mL, 21.3 mmol, 1.6 eq) und 1-H-Tetrazol (912 mg, 13.0 mmol, 1 eq in trockenem MeCN - 12 mL) hergestellt. Die entstandene Diisopropylammoniumtetrazolid-Suspension wurde nach 30 min Rühren im Vakuum eingengt und über Nacht am HV getrocknet. Das Salz (2.24 g, 13.0 mmol, quant.) wurde ohne weitere Aufreinigung für alle weiteren Phosphoramiditsynthesen bei -20°C aufbewahrt.

Smp: Zers. > 113 °C; **R_f** = 0.68 (CHCl₃/MeOH 10:1 v/v - Mischung beider Diastereomere); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3130, 2943, 2360, 1711, 1630, 1542, 1483, 1455, 1417, 1368, 1353, 1314, 1266, 1221, 1368, 1174, 1153, 1098, 1050, 1018, 979, 913, 893, 862, 862, 817, 794, 758, 716, 676, 643 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.00–1.02 (m, 3 H, [isomer 1]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.08–1.13 (m, 3 H, [isomer 2]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.17–1.22 (m, 6 H, [isomer 1 + 2]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.24–1.28 (m, 1 H, C5'H_b), 1.54–1.67 (m, 1 H, C2'H_b), 2.13–2.17 (m, 1 H, C2'H_a), 2.23–2.30 (m, 1 H, C4'H), 2.38–2.44 (m, 1 H, C5'H_a), 2.53–2.58 (m, 2 H, CH₂CN), 2.97–3.08 (m, 1 H, C1'H_a), 3.16–3.21 (m, 1 H, C1'H_b), 3.47–3.61 (m, 2 H, [(CH₃)₂CHN]₂PR₂), 3.67–3.76 (m, 2 H, CH₂CH₂CN), 3.77–3.79 (m, 6 H, CH₃OPh), 4.08–4.13 (m, 1 H, C3'H), 4.44–4.50 (m, 1 H, C1'H), 6.62 (br s, 1 H, NHCHO), 6.85–6.89 (m, 4 H, 4 x *meta*-H of *para*-CH₃OPh), 7.17–7.21 (m, 5 H, CH- DMT and Trityl), 7.23–7.30 (m, 15 H, CH- DMT and Trityl), 7.37–7.42 (m, 4 H, CH- DMT and Trityl), 7.76 (s, 1 H, C2H), 8.09 (br s, 1 H, NHCHO), 8.68 (br, 1 H, NH); **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): 20.2, 20.4 (CH₂CN), 24.3, 24.4, 24.5, 24.6 (4 x PN[CH(CH₃)₂]₂), 36.1, 36.3 (C5'), 41.1, 41.3 (C2'), 43.0, 43.1 (2 x PN[CH(CH₃)₂]₂), 47.0, 47.01 (C4'), 49.9 (C1'), 55.2, 55.2 (2 x OCH₃), 58.1, 58.3 (OCH₂CH₂CN), 64.1, 64.6 (C1'), 74.8, 74.9 (C- Trityl), 75.5, 75.6 (C3'), 85.7, 85.7 (OC(*p*-CH₃OPh)₂Ph), 85.8, 85.8 (C5), 113.0, 113.0 (4 x *meta*-C *p*-CH₃OPh), 117.7, 117.7 (CN), 123.7 (C- DMT), 127.6 (CH- Trityl), 128.6 (CH- Trityl), 128.8 (CH- DMT), 129.1 (CH- DMT), 129.9 (CH- Trityl), 131.1 (CH- DMT), 131.1 (CH- DMT), 132.3 (CH- DMT), 137.4 (CH- DMT), 137.5 (CH- DMT), 146.5 (CH- DMT), 147.0 (C- Trityl), 155.6 (C2), 156.6 (C4), 158.3, 158.4 (C6), 160.3 (CHO); **³¹P-NMR** (200 MHz, CDCl₃) δ = 148.7, 149.0 (ROP(N(*i*Pr)₂)CH₂CH₂CN); **HRMS** (ESI), [M - H]⁻: ber. für [C₅₁H₄₉N₅O₅-H⁺]⁻: 1010.4739; gef.: 1010.4767.

Referenzsubstanz 62 zum enzymatischen Verdau von β -cFaPydA (vgl. Kap. 2.4)

***N*-(5-(Formylamino)-4-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-hydroxy-4'-(hydroxymethyl)cyclopentyl]-amino)-6-amino-6-hydro-pyrimidine (62)**



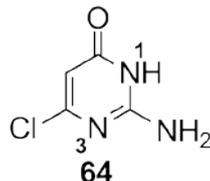
Verbindung **57** (78 mg, 0.16 mmol) wurde in trockenem THF (3 mL) gelöst, mit trockenem Pyridin (122 μ L) und Pyridin·HF Komplex (122 μ L, 70 %) versetzt und in einem verschließbaren Polypropylenröhrchen über Nacht gerührt. Das entschützte Diol fiel dabei als weißer Feststoff aus, den man anschließend abzentrifugierte. Nachdem man den Überstand abgenommen hatte wurde das Produkt in trockenem THF (1 mL) resuspendiert und für eine weitere Stunde zusammen mit 370 μ L MeOTMS bei RT gerührt. Der Feststoff wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Nach Trocknung des Feststoffes im Hochvakuum erhielt man 40 mg von **62** (0.15 mmol, 94 %).

Smp.: decomp. > 147 °C; **R_f** = 0.88 (Umkehrphase: MeOH/H₂O 2:1 v/v); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3157, 2957, 2879, 2680, 2499, 1669, 1646, 1635, 1595, 1503, 1467, 1449, 1441, 1416, 1374, 1331, 1285, 1270, 1249, 1197, 1159, 1151, 1136, 1077, 1035, 1004, 859, 825, 802, 765, 752, 731, 707, 682 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, MeOH-D₄): δ = 1.30–1.37 (m, 1 H, C5'H_a), 1.82–2.02 (m, 3 H, C4'H, C2'H_b, C2'H_a), 2.11 (dt, ²J (C5'H_b, C5'H_a) = 13.3 Hz, ³J (C5'H_b, C1'H, C4'H) = 7.7 Hz, 1 H, C5'H_b), 3.53–3.58 (m, 2 H, C1'H_a, C1'H_b), 4.05–4.09 (m, 1 H, C3'H), 4.56 – 4.63 (m, 1 H, C1'H), 8.02 (br s, 1 H, NHCHO), 8.24 (br s, 1 H, CHO), 8.50 (s, 1 H, C2H), 2 x OH, C1'NH, 2 x NH nicht detektiert; **¹³C-NMR** (100 MHz, MeOD-D₄): δ = 35.5 (C5'), 42.6 (C2'), 50.2 (C4'), 51.7 (C1'), 64.6 (C1''), 74.3 (C3'), 93.9 (C5), 149.6 (C2), 156.0 (C4), 159.3 (C6), 164.6 (CHO); **HRMS** (ESI⁺) (m/z) [M + H⁺]: ber. für [C₁₁H₁₇N₅O₃+H]⁺: 268,1404; gef.: 268,1404.

5.9 Synthese des β -cFaPydG Phosphoramidit 34b

5.9.1 Synthese des heterozyklischen Pyrimidons 66

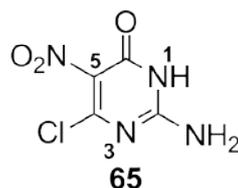
2-Amino-6-chlor-3*H*-pyrimidin-4-on (64)^[3, 158, 380-381]



Das kommerziell erhältliche 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin **63** (10.7 g, 65.2 mmol) wurde mit 1 M wässriger NaOH-Lösung (150 mL) versetzt und unter Rückfluss 1 h erhitzt, wobei sich das Produkt vollständig löste. Anschließend gab man zur abgekühlten Lösung 50 mL Eisessig worauf die Substanz **64** ausfiel. Das Produkt wurde abgesaugt, mit destilliertem Wasser gewaschen und mittels einer Lyophile sorgfältig gefriergetrocknet. Man erhielt den Heterozyklus in 90 %iger Ausbeute als gelblichen Feststoff (8.58 g, 59.0 mmol).

Smp.: Zers. > 250 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3455, 3153, 2923, 2756, 1655, 1564, 1481, 1374, 1227, 1167, 1030, 980, 903, 802, 759, 696, 624, 571, 425 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 5.59 (s, 1 H, CH), 7.02 (br s, 2 H, NH₂), 11.13 (br s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-D₆): δ = 99.7 (C5), 155.8 (C2), 159.8 (C6/C4), 162.5 (C6/C4); **MS** (EI⁺): m/z (%) = 146.0104 (33) [M + H]⁺, 187.0363 (93) [M + ACN + H]⁺, 243.2847 (12), 224.1831 (62) [M + NH₄⁺]⁺; **HRMS** (EI) (m/z): [M – H⁺] ber. für [C₄H₄ClN₃O – H⁺]: 143.9970, gef. 143.9970; 2M – H⁺] ber. für [C₈H₈Cl₂N₆O₂ – H⁺]: 289.0013, gef. 289.0013.

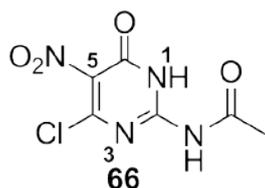
2-Amino-6-chlor-5-nitro-3*H*-pyrimidin-4-on (65)^[382]



Verbindung **64** (8.73 g, 60.0 mmol) wurde bei 0 °C in konzentrierter Schwefelsäure (25 mL) mit Hilfe eines Ultraschallbades vollständig aufgelöst. Anschließend gab man rauchende Salpetersäure (20 mL) bei 0 °C zu und rührte die Lösung ca. 5 min. Danach tropfte man die Reaktionslösung sehr langsam mittels einer Pasteurpipette auf immer frisches Eis und entfernte das entstandene Schmelzwasser kontinuierlich durch Absaugen, um ein erneutes Lösen der Substanz zu verhindern. Der erhaltene Niederschlag wurde über Nacht lyophilisiert und Produkt **65** als gelblicher Feststoff in einer Ausbeute von 86 % isoliert (9.78 g, 51.4 mmol).

Smp.: Zers. >220 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3593, 3509, 3320, 3197, 3068, 2802, 1671, 1583, 1531, 148,0 1377, 1316, 1234, 1135, 1046, 927, 847, 788, 745, 715, 665, 624, 589, 539, 479, 443 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-D₆) δ = 7.14 (br s, 1 H, NH), 8.54 (br s, 1 H, NH), 2.15 (br s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-D₆): δ = 126.6 (C5), 153.1 (C2), 154.1 (C6/C4), 155.0 (C6/C4); **MS** (EI⁺) m/z (%) = ber. für [C₄H₃ClN₄O₃]⁺ = 189.9888, gef.: 189.9888 (100) [M]⁺, 159.9891 (43) [M - NO₂]⁺.

2-Acetylamino-6-chlor-5-nitro-3H-pyrimidin-4-on (**66**)^[383]

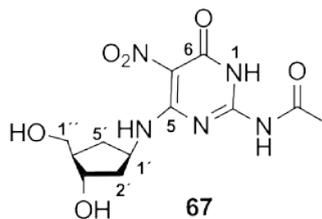


Der nitrierte Heterozyklus **65** (9.08 g, 47.7 mmol) wurde zusammen mit 7 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure in Essigsäureanhydrid (100 mL) vorgelegt und 30 min bei 150 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde über Nacht abgekühlt, und das mittlerweile auskristallisierte Produkt **66** abfiltriert, mit wenig destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht lyophilisiert. Man erhielt die Substanz **66** als gelblich kristallines Produkt (6.19 g, 26.6 mmol, 56 %).

Smp.: >240 – 242 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3424, 3222, 3166, 2931, 2215, 1684, 1601, 1559, 1365, 1325, 1237, 1203, 1104, 1054, 1002, 972, 918, 840, 787, 737, 618, 594, 424 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-D₆): δ = 2.21 (s, 3 H, COCH₃), 12.46 (s, 1 H, NH), 12.77 (br s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-D₆): δ = 23.9 (COCH₃), 131.9, 150.7, 152.2, 153.1, 174.4 (COCH₃); **HRMS** (ESI) [M - H]⁺: ber. für [C₆H₅³⁵ClN₄O₄ - H]⁺: 230.9927, gef. 230.9925.

5.9.2 Kupplung und Funktionalisierung

N-(4-[[[(1'R,3'S,4'R)-3'-Hydroxy-4'-(hydroxymethyl)cyclopentyl]amino]-5-nitro-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyrimidinyl]acetamid (**67**)



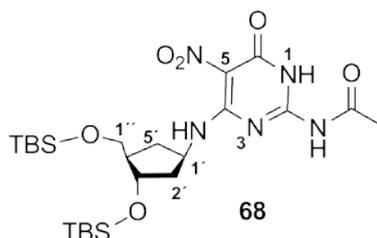
Das Amin **49** (0.93 g, 7.09 mmol) wurde in trockenem DMF (15 mL) gelöst. Anschließend wurden der Lösung 12 mL DIPEA (7.09 mmol, 1 eq) sowie der acetylierte Heterozyklus **67** (1.65 g, 7.09 mmol) bei 0 °C zugesetzt und die Reaktionslösung 90 min bei RT, anschließend

Experimentalteil

90 min bei 75 °C gerührt. Die Farbe der Reaktion änderte sich dabei von hellorange nach braun. Das Gemisch wurde danach auf RT abgekühlt und langsam in eine Lösung bestehend aus Dichlormethan/*i*-Hexan (1/1 - 500 mL) getropft, wobei ein weißes Präzipitat entstand, welches bei 4 °C im Kühlschrank nachgefällt wurde. Nach 12 h wurde der Niederschlag abfiltriert und für weitere 48 h an der Luft getrocknet. Verbindung **67** konnte als beiger Feststoff in 84 %iger Ausbeute (1.95 g, 5.96 mmol) erhalten werden.

$R_f = 0.33$ (6.5 % MeOH in CHCl_3); **Smp.:** Zers. > 195–204 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu} = 3247, 2885, 1681, 1628, 1594, 1539, 1475, 1420, 1331, 1285, 1222, 1152, 1033, 777, 742$ (cm^{-1}); **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, DMSO-D_6): $\delta = 1.23\text{--}1.31$ (m, 1 H, $\text{C5}'\text{H}_a$), $1.74\text{--}1.90$ (m, 3 H, $\text{C2}'\text{H}_a, \text{C2}'\text{H}_b, \text{C4}'\text{H}$), 2.15 (s, 3 H, COCH_3), $2.15\text{--}2.35$ (m, 1 H, $\text{C5}'\text{H}_b$), 3.32 (s, 1 H, OH), $3.32\text{--}3.39$ (m, 2 H, $\text{C1}''\text{H}_a, \text{C1}''\text{H}_b$), $3.93\text{--}3.96$ (m, 1 H, $\text{C3}'\text{H}$), $4.60\text{--}4.77$ (m, 2 H, $\text{C1}'\text{H}, \text{OH}$), 9.56 (d, $^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 4.0$ Hz, 1 H, $\text{C1}'\text{NH}$), $10.9\text{--}12.1$ (br, 2 H, NHAc, NHAr); **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, DMSO-D_6): $\delta = 24.5$ (COCH_3), 34.7 ($\text{C5}'$), 40.2 ($\text{C2}'$), 49.3 ($\text{C4}'$), 51.2 ($\text{C1}'$), 62.7 ($\text{C1}''$), 72.4 ($\text{C3}'$), 112.7 (C-NO_2), 150.9 (Cq), 154.6 (Cq), 158.3 (Cq), 174.9 (COCH_3); **HRMS** (ESI^+) [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$: ber. für $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_6 + \text{H}^+]$ $^+$: 328.1252; gef.: 328.1252.

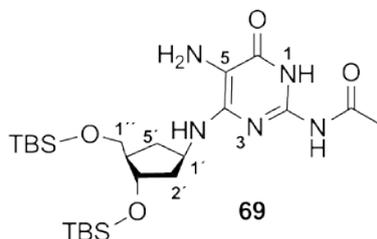
N-{4-[[[(1'R,3'S,4'R)-3'-[(tert-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[[[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]methyl]cyclopentyl)amino]-5-nitro-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyrimidinyl]-acetamid (**68**)



Verbindung **67** (3.01 g, 9.20 mmol) löste man zusammen mit Imidazol (1.88 g, 27.6 mmol, 3 eq) in trockenem DMF (50 mL). Die Reaktionslösung wurde nach Zugabe der Base mit TBSCl (4.16 g, 27.6 mmol, 3 eq) versetzt, wobei die Lösung sich klar färbte. Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich die Lösung dabei gelblich verfärbte. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels DC kontrolliert. Nach Beendigung der Reaktion versetzte man mit 500 mL EtOAc und schüttelte anschließend mit 1 M NaHCO_3 Lösung (2 x 300 mL) und gesättigter NaCl -Lösung (5 x 350 mL) aus. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösemittel abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch (2 % MeOH in CHCl_3) aufgereinigt. Der Silylether **68** wurde als gelbliches, glasartiges Produkt erhalten (4.40 g, 7.91 mmol, 86 %).

$R_f = 0.21$ (5 % MeOH in CHCl_3); **Smp.:** Zers. > 215 – 230 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu} = 3198, 2954, 2929, 2857, 1686, 1625, 1582, 1538, 1472, 1433, 1388, 1242, 1148, 1004, 832, 764$ (cm^{-1}); **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.03$ (s, 6 H, 2 x Si- CH_3), 0.87 (s, 6 H, 2 x Si- CH_3), 0.89 (s, 18 H, 2 x Si- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.32 (dt, $^2J(\text{C5}'\text{H}_a, \text{C5}'\text{H}_b) = 12.0$ Hz, $^3J(\text{C5}'\text{H}_b, \text{C1}'\text{H}, \text{C4}'\text{H}) = 8.0$ Hz, 1 H, $\text{C5}'\text{H}_b$), 1.75 (m, 1 H, $\text{C2}'\text{H}_a$), 1.88 – 2.03 (m, 2 H, $\text{C2}'\text{H}_a, \text{C4}'\text{H}$), 2.05 – 2.30 (m, 1 H, $\text{C5}'\text{H}_b$), 2.11 (s, 3 H, Ac), 3.52 (dd, $^2J(\text{C1}''\text{H}_a, \text{C1}''\text{H}_b) = 6.0$ Hz, $^3J(\text{C1}''\text{H}_a, \text{C4}'\text{H}) = 2.0$ Hz, 1 H, $\text{C1}''\text{H}_a$), 3.60 (dd, $^2J(\text{C1}''\text{H}_b, \text{C1}''\text{H}_a) = 6.0$ Hz, $^3J(\text{C1}''\text{H}_b, \text{C4}'\text{H}) = 2.0$ Hz, 1 H, $\text{C1}''\text{H}_b$), 4.12 (q, $^3J(\text{C3}'\text{H}, \text{C2}'\text{H}_a, \text{C2}'\text{H}_b, \text{C4}'\text{H}) = 4.0$ Hz, 1 H, $\text{C3}'\text{H}$), 4.63 (m, 1 H, $\text{C1}'\text{H}$), 8.97 (br, 1 H, NH), 9.69 (d, $^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 8.0$, 1 H, $\text{C1}'\text{NH}$), 11.33 (br, 1 H, NH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.5$ (Si- CH_3), -5.4 (Si- CH_3), -4.8 (Si- CH_3), -4.7 (Si- CH_3), 18.0 (Si- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 18.3 (Si- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 24.5 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 25.8 (3 x Si- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 25.9 (3 x Si- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 33.9 ($\text{C5}'$), 42.1 ($\text{C2}'$), 49.8 ($\text{C4}'$), 50.7 ($\text{C1}'$), 62.7 ($\text{C1}''$), 72.8 ($\text{C3}'$), 112.9 (C-NO_2), 150.2 (C_q), 155.4 (C_q), 158.3 (C_q), 173.5 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$); **HRMS** (ESI^+) $[\text{M} + \text{H}]^+$: ber. für $[\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_2 + \text{H}]^+$: 556.2981; gef.: 556.2984.

N-{4[[(1'R,3'S,4'R)-3'-[(tert-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-{[(tert-butyl)dimethylsilyl]oxy)methyl]-cyclopentyl)amino]-5-amino-6-oxo-1,6-di-hydro-2-pyrimidinyl}acetamid (69**)**

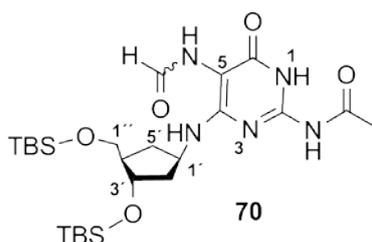


Verbindung **68** (3.60 g, 6.48 mmol) wurde mit Pd/C (0.74 g, 10 % Pd) in 160 mL Ethanol gegeben. Die schwarze Suspension wurde sorgfältig entgast und über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Palladium wurde unter Sauerstoffausschluß abfiltriert, wobei eine gelbe Lösung erhalten wurde. Das Lösemittel wurde anschließend unter HV entfernt. Das oxidationsempfindliche Produkt **69** (3.40 g, 6.48 mmol, 99 %) blieb als gelblicher Feststoff zurück und wurde *in situ* zu Verbindung **70** umgesetzt.

Auf R_f -Wert, **Smp**, **IR** und **Masse** wurde aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit der Substanz verzichtet. **$^1\text{H-NMR}$** : (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.05, 0.05, 0.06, 0.06$ ($4 \times$ s, 12 H, Si- CH_3), 0.89, 0.90 ($2 \times$ s, 18 H, Si- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.15 – 1.33 (m, 2 H, $\text{C5}'\text{-H}_a, \text{C2}'\text{-H}_a$), 1.61 – 1.65 (m, 1 H, $\text{C4}'\text{-H}$), 1.94 – 2.02 (m, 2 H, $\text{C6}'\text{-H}_b, \text{C2}'\text{-H}_b$), 2.23 (s, 3 H, COCH_3), 3.53 – 3.57 (m, 1 H, $\text{C5}'\text{-H}_a$), 3.58 – 3.60 (m, 1 H, $\text{C5}'\text{-H}_b$), 4.11 – 4.14 (m, 1 H, $\text{C3}'\text{-H}$), 4.37 – 4.41 (m, 1 H, $\text{C1}'\text{-H}$), 4.94 (d, $^1J(\text{NH}_a, \text{NH}_b) = 5.4$ Hz, 1 H, NH_a), 5.29 (d, $^2J(\text{NH}_b, \text{NH}_a) = 6.6$ Hz 1 H, NH_b), 126

8.02 (*br s*, 1 H, CONH), 9.62 (d, $^3J(\text{NH}, \text{C1}'\text{-H}) = 6.0$ Hz, 1 H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.4, -5.3, -4.7, -4.5$ ($4 \times \text{Si-CH}_3$), 18.3, 18.6 ($2 \times \text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 24.6 (COCH_3), 26.1, 26.2 ($6 \times \text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 35.0 (C6'), 43.2 (C2'), 50.1 (C4'), 50.2 (C1'), 63.8 (C5'), 73.4 (C3'), 102.8, 144.5, 154.7, 171.0 (COCH_3).

***N*-{4[[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-{[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]methyl}-cyclopentyl)amino]-5-formylamino-6-oxo-1,6-di-hydro-2-pyrimidinyl}acetamid (**70**)**

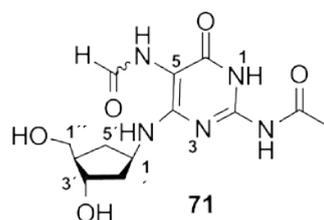


Eine Lösung bestehend aus EDC (*N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid) (2.17 g, 11.3 mmol, 1.75 eq) und DIPEA (1.97 mL, 11.3 mmol, 1.75 eq) in 80 mL DMF wurde vorsichtig entgast und zu sorgfältig getrocknetem Edukt **69** (3.40 g, 6.48 mmol) gegeben. Nach der Zugabe von Ameisensäure (538 μL , 14.3 mmol, 2.2 eq), wurde die Lösung für 48 h gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde per DC kontrolliert. Nach 18 h zeigte der Reaktionsansatz eine klare, rote Farbe, die sich später nach orange verfärbte. Die Reaktionslösung wurde mit 500 mL EtOAc verdünnt und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (1 x 400 mL) und anschließend mit NH_4Cl -Lösung (1 x 400 mL) ausgeschüttelt. Danach wurde die organische Phase mit gesättigter NaCl -Lösung (5 x 300 mL) ausgeschüttelt, über MgSO_4 getrocknet und anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (6.5 % MeOH in CHCl_3). Das Produkt **70** (2.14 g, 3.87 mmol, 34 %) konnte als roter Feststoff erhalten werden (Verhältnis von *cis* zu *trans* in CDCl_3 85:15).

$R_f = 0.38$ (10 % MeOH in CHCl_3); **Smp.**: 100 – 111 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu} = 3282, 2954, 2928, 2856, 1646, 1576, 1525, 1471, 1418, 1371, 1251, 1092, 1004, 938, 843, 772, 665$ (cm^{-1}); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.01$ (s, 6 H, 2 x Si- CH_3), 0.02 (s, 3 H, Si- CH_3), 0.03 (s, 6 H, 2 x Si- CH_3), 0.86 (s, 9 H, Si- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.87 (s, 9 H, Si- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.13 (dt, $^3J(\text{C5}'\text{H}_a, \text{C5}'\text{H}_b) = 12.0$ Hz, $^3J(\text{C5}'\text{H}_a, \text{C1}'\text{H}, \text{C4}'\text{H}) = 10$ Hz, 1 H, C5' H_a), 1.64 (m, 1 H, C2' H_a), 1.89 – 2.03 (m, 2 H, C2' $\text{H}_b, \text{C4}'\text{H}$), 2.20 – 2.30 (m, 1 H, C5' H_b), 2.25 (s, 3 H, COCH_3), 3.51 – 3.55 (m, 2 H, C1'' $\text{H}_a, \text{C1''H}_b$), 4.07 – 4.13 (m, 1 H, C3' H), 4.39 (m, 1 H, C1' H), 5.57 (d, $^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 8.0$ Hz, 0.15 H, [*trans*-Formamid]C1' NH), 6.05 (d, $^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{NH}) = 8.0$ Hz, 0.85 H, [*cis*-Formamid] C1' NH), 7.26 (d, $^3J(\text{NHCHO}, \text{NHCHO}) = 2.0$ Hz, 0.15 H, [*trans*-

Formamid] \underline{NHCHO}), 8.06 (d, $^3J(\underline{NHCHO}, \underline{NHCHO}) = 12.0$ Hz, 0.15 H, [*trans*-Formamid] \underline{NHCHO}), 8.21 (d, $^3J(\underline{NHCHO}, \underline{NHCHO}) = 2.0$ Hz, 0.85 H, [*cis*-Formamid] \underline{NHCHO}), 9.01 (br, 1 H, NH), 11.45 (br, 1 H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.5$ (Si- $\underline{\text{CH}_3}$), -5.43 (Si- $\underline{\text{CH}_3}$), -5.3 (Si- $\underline{\text{CH}_3}$), -4.6 (Si- $\underline{\text{CH}_3}$), 18.3 (2 x Si- $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 24.4 ($\underline{\text{COCH}_3}$), 25.9 (3 x Si- $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 26.0 (3 x Si- $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 34.6 (C5'), 42.4 (C2'), 49.9 (C4'), 50.3 (C1'), 63.8 (C1''), 73.3 (C3'), 96.1 ($\underline{\text{CNHCHO}}$), 146.8 (C_{Hec}), 154.9 (C_{Hec}), 157.6 (C_{Hec}), 160.0 ([*cis*-Formamid] \underline{NHCHO}), 169.6 ([*trans*-Formamid] \underline{NHCHO}), 171.9 ($\underline{\text{COCH}_3}$); **HRMS** (ESI⁺), $[\text{M} + \text{H}^+]^+$: ber. für $[\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_2 + \text{H}^+]^+$: 554.3188; gef.: 554.3167.

***N*-(5-(Formylamino)-4-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-hydroxy-4'-(hydroxymethyl)-cyclopentyl]amino)-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyrimidiny]acetamid (71)**



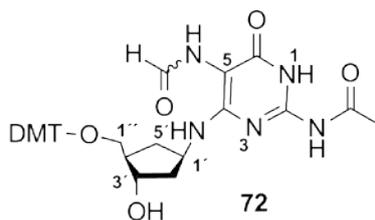
Es wurden jeweils 53.0 mg (95.7 μmol) des Silylethers (**70**) gleichmäßig auf 10 Polypropylen Röhren aufgeteilt. Je Reaktion wurden 5 mL trockenes EtOAc, 47 μL Pyridin und 47 μL Pyridin·HF-Komplex (~70 % HF Anteil, 1.81 mmol, 19 eq) zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich die Lösung eintrübte. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der erhaltene Feststoff mit je 2 ml trockenem EtOAc überschichtet. Der bräunliche Niederschlag wurde im Ultraschallbad vorsichtig resuspendiert und die Ansätze vereinigt. Anschließend wurde Methoxytrimethylsilan (10 x 562 μL , 0.41 mmol, 4 eq) zugegeben und die Suspensionen für weitere 2 h gerührt. Man zentrifugierte die Röhren erneut, verwarf den Überstand und überschichtete die erhaltenen Pellets mit je 0.5 mL EtOAc und vereinigte die Suspensionen. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt, wobei das Produkt **71** als bräunliches, sehr feines Pulver zurückblieb (90 %, 285 mg, 861 μmol), welches unter Argonatmosphäre bei -20 °C gelagert wurde. (Verhältnis von *cis* zu *trans* DMSO- D_6 62:38).

$R_f = 0.33$ (*n*BuOH/ H_2O 9:4 v/v); **Smp.**: 145 – 147 °C; **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu} = 2931, 1648, 1587, 1503, 1444, 1422, 1374, 1243, 1157, 1044, 1012, 879, 770, 707, 562$ (cm^{-1}); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 1.08 - 1.21$ (m, 1 H, C5' H_b), 1.61 – 1.75 (m, 2 H, C2' H_a , C2' H_b), 1.77 – 1.87 (m, 1 H, C4' H), 2.04 – 2.15 (m, 1 H, C5' H_a), 2.12 (s, 3 H, COCH_3), 3.30 – 3.36 (m, 1 H, C1'' H_a), 3.24 – 3.41 (m, 1 H, C1'' H_b), 3.85 – 3.97 (m, 1 H, C3' H), 4.47 – 4.58 (m, 3 H, C1' H , 2 x OH), 6.25 (d, $^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 8.0$ Hz, 0.62 H, [*cis*-Formamid]C1' NH), 6.61 (d,

Experimentalteil

$^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 12.0$, 0.38 H, [*trans*-Formamid]C1'NH), 7.77 (d, $^3J(\text{NHCHO}, \text{NHCHO}) = 12.0$ Hz, 0.38 H, [*trans*-Formamid]NHCHO), 8.00 (d, $^3J(\text{NHCHO}, \text{NHCHO}) = 12.0$ Hz, 0.38 H, [*trans*-Formamid]NHCHO), 8.02 (s, 0.62 H, [*cis*-Formamid]NHCHO), 8.68 (s, 0.62 H, [*cis*-Formamid]NHCHO), 11.34 (br, 2 H, 2 x NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 24.2$ (COCH_3), 35.1 ([*trans*-Formamid]C5'), 35.4 ([*cis*-Formamid]C5'), 39.4 ([*trans*-Formamid]C2'), 40.1 ([*cis*-Formamid]C2'), 49.6 ([*cis*-Formamid]C4'), 49.6 ([*trans*-Formamid]C4'), 50.1 (C1'), 60.2 ([*cis*-Formamid]C1''), 63.5 ([*trans*-Formamid]C1''), 71.9 (C3'), 92.7 ([*cis*-Formamid]CNHCHO), 92.9 ([*trans*-Formamid]CNHCHO), 148.9 ([*cis*-Formamid]C_{Hec}), 149.1 ([*trans*-Formamid]C_{Hec}), 150.1 ([*trans*-Formamid]C_{Hec}), 161.3 ([*cis*-Formamid]C_{Hec}), 162.0 ([Formamid, konf. 1]C_{Hec}), 162.8 ([Formamid, konf. 2]C_{Hec}), 166.9 ([*cis*-Formamid]NHCHO), 170.8 ([*trans*-Formamid]NHCHO), 174.2 (COCH_3); **HRMS** (ESI⁺), $[\text{M} + \text{H}^+]^+$: ber. für $[\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_5 + \text{H}^+]^+$: 326.1459; gef.: 326.1462.

N-{4-[[[(1'*R*,3'*R*,4'*S*)-3'-[(Dimethoxytrityl)oxy]methyl]-4'-hydroxy-cyclopentyl]amino]-5-(formylamino)-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyrimidinyl]-acetamid (**72**)



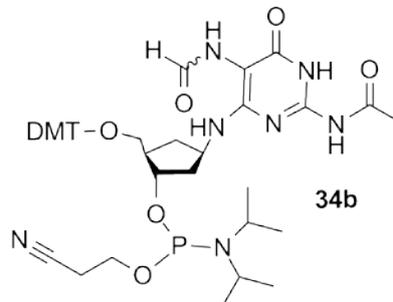
Die Verbindung **71** (137 mg, 532 μmol) wurde in trockenem Pyridin (3 mL) unter Stickstoffatmosphäre gelöst und mit Molekularsieb (4 Å) versetzt. Anschließend gab man DMTCl (90 mg, 265 μmol , 0.5 eq) und eine katalytische Mengen DMAP zu. Die Suspension wurde 1 h bei 0 °C gerührt, und danach erneut DMTCl (45 mg, 133 μmol , 0.25 eq) zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei 0 °C wurde nochmals DMTCl (54 mg, 159 μmol , 0.3 eq) zugegeben. Die Lösung wurde für weitere 1.5 h bei 0 °C gerührt. Während der gesamten Zeit wurde der Reaktionsverlauf mittels DC kontrolliert und sobald zweifach geschütztes Produkt nachweisbar war wurde die Reaktion sofort durch Zugabe von 1-3 mL MeOH beendet. Das Lösungsmittelgemisch wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das als Schaum erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (CHCl_3 :MeOH 90:10, 0.5 % Pyridin) aufgetrennt. Das Produkt **72** eluierte nach dem zweifach DMT geschützten Nebenprodukt. Die Substanz **72** konnte als orange, amorphe Verbindung in einer Ausbeute von 52 % (173 mg, 276 μmol) erhalten werden.

$R_f = 0.26$ (8 % MeOH in CHCl_3 , 1 % Pyridin.); **Smp.**: 140 – 142 °C; **FTIR** (ATR): $\tilde{\nu} = 2955$, 2925, 2871, 1724, 1646 1599, 1580, 1507, 1488, 1462, 1379, 1366, 1275, 1120, 1071, 1038,

964, 740 (cm⁻¹); **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.98 – 1.50 (m, 1 H, C2'H_a), 1.50 – 1.75 (m, 1 H, C5'H_a), 1.75 – 2.29 (m, 4 H, C5'H_b, C3'H, C2'H_b, OH), 2.04 (s, 3 H, COCH₃), 2.94 – 3.07 (m, 1 H, C1''H_a), 3.07 – 3.20 (m, 1 H, C1''H_b), 3.75 (br s, 6 H, 2 x OCH₃), 4.02 – 4.14 (m, 1 H, C4'H), 4.30 – 4.48 (m, 1 H, C1'H), 6.01 (br d, ³J(C1'NH,C1'H) = 6.0 Hz, 1 H, C1'NH), 6.74 – 6.85 (m, 4 H, 4 x *meta*-H des *p*-CH₃O*Ph*), 7.11 – 7.44 (m, 9 H, 9 x H, DMT), 8.17 (s, 1 H, NHCHO), 8.62 (s, 1 H, NHCHO), 9.91 (br s, 1 H, NH), 11.55 (br s, 1 H, NH); **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 24.1 (COCH₃), 35.4 (C2'), 41.6 (C5'), 47.4 (C3'), 50.3 (C1'), 55.2 (2 x OCH₃), 65.8 (C1''), 74.9 (C4'), 86.2 (OCPh(*p*MeO*Ph*)₂), 95.6 (CNHCHO), 113.1 (4 x *meta*-C des *p*-CH₃O*Ph*), 126.8 (*para*-C des Ph), 127.8 (2 x CH des DMT), 128.1 (2 x CH des DMT), 130.0 (4 x CH des DMT), 135.9 (2 x *ipso*-C des OCPh(*p*MeO*Ph*)₂), 144.9 (*ipso*-C des OCPh(*p*MeO*Ph*)₂), 147.3 (C_{Hec}), 155.3 (C_{Hec}), 157.7 (C_{Hec}), 158.4 (2 x *para*-C des OCPh(*p*MeO*Ph*)₂), 160.5 (NHCHO), 172.6 (NHCOCH₃); **HRMS** (ESI⁺), [M - H⁺]: ber. für [C₃₇H₃₆N₅O₇-H⁺]: 626.2619; gef.: 626.2620.

5.9.3 Synthese des Phosphoramidits **34b**

(1'S,2'R,4'R)-4'-[[2-(Acetylamino)-5-(formylamino)-6-oxo-1,6-dihydro-4-pyrimidinyl]amino]-2'--[[[(dimethoxytrityl)oxy]methyl]cyclopentyl-*O*-(*N,N*-diisopropyl)-(2-cyanoethyl)phosphoramidit (**34b**)



Die DMT-geschützten Verbindung **72** (205 mg, 327 μmol) wurde unter Argonatmosphäre in 10 mL entgastem, trockenen Dichlormethan gelöst und Diisopropylammoniumtetrazolid (vgl. hierzu Synthese von **35**) (28.4 mg, 167 μmol , 0.51 eq) zugegeben. Anschließend gab man 3-(Bis(diisopropylamino)phosphanoxy)propannitril (122 μL , 392 μmol , 1.2 eq) zu und rührte die Lösung über Nacht bei RT. Das Lösemittel wurde am nächsten Tag *in vacuo* abdestilliert, und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (5 % MeOH in CHCl_3 , 0.5 % Pyridin) aufgereinigt. Um eine höhere Stabilität des Phosphoramidit **34b** gegenüber seiner Oxidation zu erreichen, wurde in 1 mL entgastem Chloroform gelöst, welches zuvor durch basisches Aluminiumoxid filtriert wurde. Die Lösung wurde bei 0 °C in 100 mL entgastes Hexan getropft, wobei das reine Produkt als weißer Niederschlag ausfiel. Das Hexan wurde abdekantiert und das restliche Lösemittel abdestilliert. Zurück blieb Verbindung **34b** (184 mg, 222 μmol , 68 %) in Form eines gelben Feststoffes. (Aufgrund des dreiwertigen Phosphors entsteht ein weiteres Stereozentrum dessen Diastereomere als Isomer 1 und 2 bezeichnet wurden).

$R_f = 0.65$ (5 % MeOH in CHCl_3 , 0.5 % Pyridin); **FTIR** (ATR) $\tilde{\nu} = 3214, 2962, 1725, 1655, 1584, 1509, 1462, 1410, 1368, 1273, 1246, 1183, 1073, 1029, 978, 831, 738$ (cm^{-1}); **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.03$ (d, $^3J(\text{PN}[\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2]_2, \text{PN}[\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2]_2) = 6.0$ Hz, 3 H, [Isomer 1]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.11 (d, $^3J(\text{PN}[\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2]_2, \text{PN}[\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2]_2) = 6.0$ Hz, 3 H, [Isomer 2]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.16 (d, $^3J(\text{PN}[\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2]_2, \text{PN}[\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2]_2) = 6.0$ Hz, 3 H, [Isomer 1]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.18 (d, $^3J(\text{PN}[\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2]_2, \text{PN}[\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2]_2) = 6.8$ Hz, 3 H, [Isomer 2]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.27 – 1.38 (m, 1 H, C3'H_b), 1.57 – 1.74 (m, 1 H, C5'H_a), 2.09 – 2.47 (m, 3 H, C3'H_b, C5'H_b, C2'H), 2.11 (s, 1.5 H, [Isomer 1]COCH₃), 2.12 (s, 1.5 H, [Isomer 2] COCH₃), 2.52 – 2.73 (m, 2 H, CH₂CN), 2.93 – 3.21 (m, 2 H, C1''H_a, C1''H_b), 3.31 – 3.37 (m, 2 H, [(CH₃)₂CHN]₂PR₂), 3.37 – 3.49 (m, 2 H, CH₂CH₂CN), 3.69 (s, 3 H, [Isomer 1]CH₃O^{Ph}), 3.99

– 4.06 (m, 1 H, C1'H), 4.06 – 4.15 (m, 1 H, C4'H), 6.20 (br d, 0.5 H, $^3J(\text{C4}'\text{NH}, \text{C4}'\text{H}) = 6.0$ Hz, [Isomer 1]C4'NH), 6.67 – 6.78 (m, 4 H, 4 x *meta*-H des *p*-CH₃OPh), 7.07 – 7.15 (m, 1 H, *para*-H des Ph), 7.15 – 7.28 (m, 6 H, 6 x H des DMTs), 7.28 – 7.38 (m, 2 H, 2 x H des DMTs), 7.44 (br s, 0.5 H, [Isomer 1]NHCHO), 7.62 (br s, 0.5 H, [Isomer 2]NHCHO), 8.14 (s, 0.5 H, [Isomer 1]NHCHO), 8.28 (s, 0.5 H, [Isomer 2]NHCHO), 9.58 (br s, 0.5 H, [Isomer 1]NH), 9.50 (br s, 0.5 H, [Isomer 2]NH), 11.23 (br, 1 H, NH), [Isomer 2]CH₃OPh und [Isomer 2]; C4'NH konnten nicht detektiert werden; $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 20.0$ (CH₂CN), 22.6, 22.5 (COCH₃), 24.3, 24.6, 24.6, 24.7 (4 x PN[CH(CH₃)₂]₂), 34.2, 36.2 (C3), 42.9, 42.9 (C5'), 42.9, 43.0, 43.0 (2 x PN[CH(CH₃)₂]₂), 45.0, 45.3 (C2'), 50.5, 50.6 (C4'), 55.1 (2 x OCH₃), 58.3, 58.3 (OCH₂CH₂CN), 65.7, 66.1 (C1''), 77.2, 77.4 (C1'), 85.8 (OC(*p*-CH₃OPh)₂Ph), 112.8 (4 x *meta*-C des *p*-CH₃OPh), 116.9, 117.6 (CN), 126.7 (*para*-C des Ph), 127.1 (2 x CH des DMT), 128.7 (2 x CH des DMT), 130.6 (4 x CH des DMT), 136.1 (2 x *ipso*-C des *p*-CH₃OPh), 144.9 (*ipso*-C des Ph), 147.2 (C_{Hec}), 158.3 (2 x *para*-C des *p*-CH₃OPh), 160.3 (NHCHO), 167.6 (NHCOCH₃); $^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CDCl₃): $\delta = 10.9$, 18.9 (RO₂P(N(*i*Pr)₂)CH₂CH₂CN), 147.3, 149.6 (ROP(N(*i*Pr)₂)CH₂CH₂CN); **HRMS** (ESI⁺), [M - H⁺]⁻: ber. für [C₄₃H₅₃N₇O₈-H⁺]⁻: 826.3699; gef.: 826.3689.

Anhang

A.1 Enzymatischer Totalverdau der β -cFaPydA Modifikation

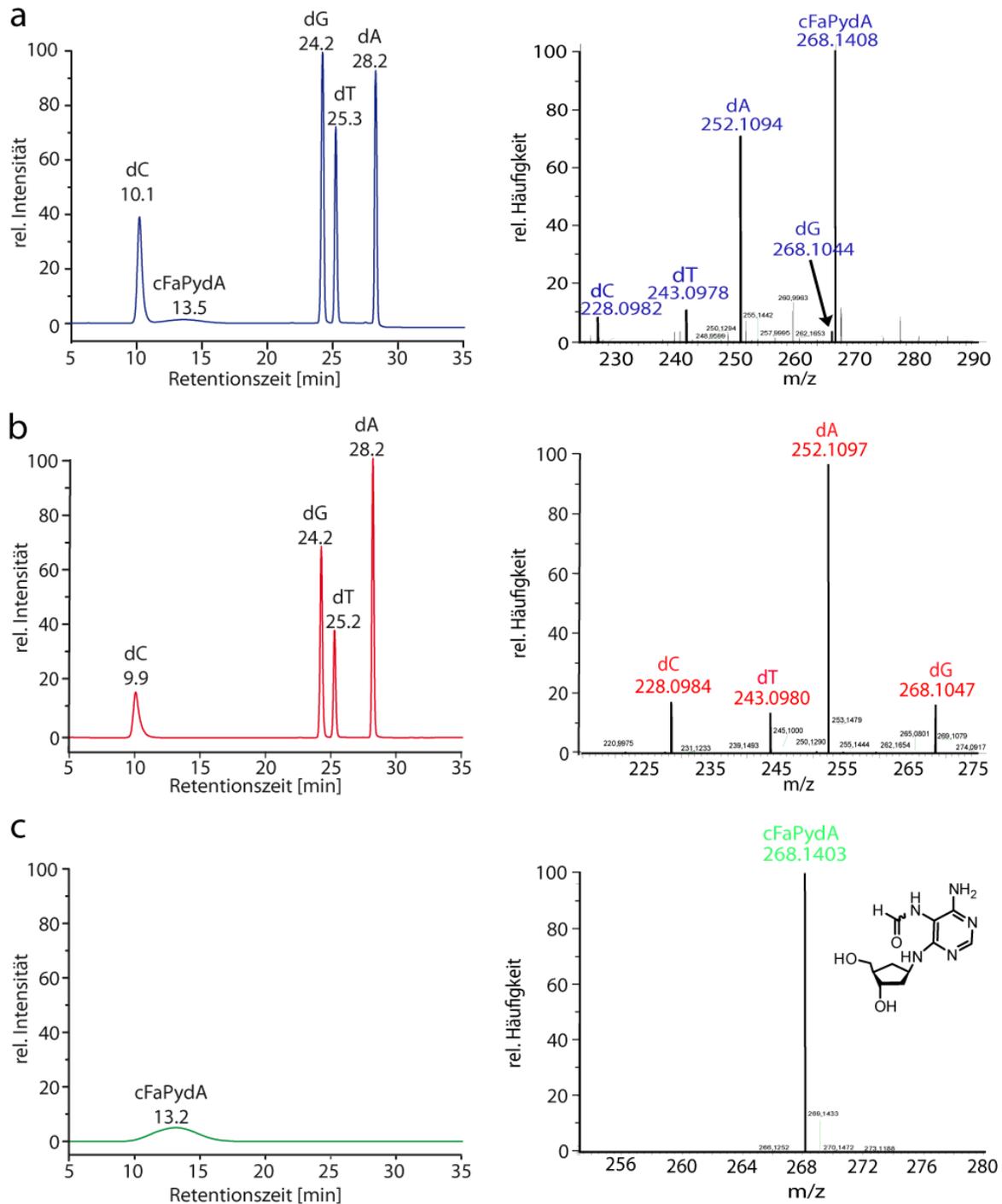


Abbildung 51: UV-Spuren bei 260 nm (links) und HPLC/MS (ESI⁺) Spuren (rechts) des **a**) Totalverdau von **ODNFaPydA6** mit der Modifikation β -cFaPydA (blau); **b**) Totalverdau eines Oligodesoxynukleotides mit gleicher Sequenz aber dA statt β -cFaPydA (rot); **c**) Synthetisierter monomerer Baustein **62** des β -cFaPydA als Referenz (grün) mit einer berechneten Masse für [C₁₁H₁₇N₅O₃+H]⁺ von 268,1404.

A2 Verwendet DNA-Template der Protein-DNA Kristallstrukturen

β -cFaPydA mit *GeoBst* Pol I:

Primerbase: β -cFaPydA	β -cFaPydA	dT: β -cFaPydA ::	dG: β -cFaPydA	dT: β -cFaPydA :
Position	Prä-Insertionsstelle (n)	Post-Insertionsstelle (n-1)	Post-Insertionsstelle (n-1)	DNA-Duplex-Bereich (n-3)
DNA-Sequenz (ODN) vgl hierzu Tabelle 19	FaPyA	1) FaPyA11 Mit Überhangprimer: gut aufgelöst 2) Mit soaken: Schaden etwas schlechter aufgelöst	1) FaPyA6 mit Überhangprimer gut aufgelöst	FaPyA22

β -cFaPydG mit *GeoBst* Pol I:

Primerbase: β -cFaPydG	β -cFaPydG	dC: β -cFaPydG	dT: β -cFaPydG	dA: β -cFaPydG	dA: β -cFaPydG
Position	Außerhalb der Pre- Insertionsstelle (n)	Post- Insertionsstelle (n-1)	Post- Insertionsstelle (n-1)	Post- Insertionsstelle (n-1)	DNA-Duplex- Bereich (n-2)
DNA-Sequenz (ODN) vgl hierzu Tabelle 19	FaPyG7	FaPyG7	FaPyG7	FaPyG11	FaPyG7

	β -cFaPydA	dT: β -cFaPydA	dT: β -cFaPydA(n-3)	dG: β -cFaPydA(n-1)	β -cFaPydG	dC: β -cFaPydG(n-1)	dA: β -cFaPydG(n-1)	β -cFaPydG:dA(n-1)
PDB code		2XOJ		2XOH		2XO9		
Data collection								
Spacegroup	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁							
Cell constants		88.4, 93.7, 105.1		88.7, 94.0, 105.3	88.1, 93.7, 105.6	88.3, 93.8, 105.6	88.7, 93.9, 105.6	87.9, 94.0, 105.3
Resolution (Å)	45.4-2.05 (2.16-2.05)	50.0-2.05 (2.2-2.05)	45.9- 2.2 (2.32-2.2)	50.0-2.05 (2.2-2.05)	46.8-1.75 (1.84-1.75)	45.0-2.65 (2.8-2.65)	46.3-2.1 (2.21-2.1)	47.0-2.0 (2.11-2.0)
No. reflections								
Total	232,264 (33,247)	224,999 (32823)	222,123 (31,606)	241,304 (33,663)	516,974 (76,721)	145,156 (21,136)	230,878 (33,974)	348,144 (52,393)
Unique	55,071 (7,929)	55,210 (7,964)	45,055 (6,409)	55,519 (7,923)	88,292 (12,676)	24,741 (3,627)	51,802 (7,412)	59,511 (8,589)
R _{merge}	0.152 (0.604)	0.061 (0.458)	0.091 (0.586)	0.065 (0.466)	0.043 (0.507)	0.102 (0.474)	0.103 (0.666)	0.060 (0.441)
Mean I/ σ I ^a	6.6 (2.4)	17.5 (3.9)	16.0 (3.2)	16.5 (3.4)	24.3 (3.9)	17.6 (4.0)	11.6 (3.3)	18.9 (4.6)
Multiplicity	4.2 (4.2)	4.1 (4.1)	4.9 (4.9)	4.3 (4.2)	5.9 (6.1)	5.9 (5.8)	4.5 (4.6)	5.9 (6.1)
Completeness (%)	99.8 (100)	99.7 (100.0)	99.8 /99.1	99.3 (98.5)	99.7 (99.4)	95.3 (97.1)	99.3 (99.0)	99.8 (99.8)
Refinement								
R / R _{free}	0.187 / 0.226	0.18 / 0.223	0.183 / 0.2173	0.197 / 0.231	0.181 / 0.206	0.221 / 0.273	19.1 / 22.4	0.187 / 0.215
No. of reflections	54,997	52,362	44,989	52,668	86,204	34,272	49,156	56,504
No. of atoms	5,385	5,384	5,395	5,416	5,484	5,201	5,368	5,362
Protein	4,683	4,680	4,673	4,669	4,677	4,658	4,658	4,675
DNA	432	472	433	474	439	473	495	473
Solvent	270	232	289	272	358	70	217	206
R.m.s. deviations								
Bond	0.009	0.014	0.006	0.018	0.017	0.011	0.014	0.0139
Angle	1.21	1.39	1.0	1.6	1.8	1.56	1.6	1.6
B-factors								
Protein	45.2	32.0	57.1	27.6	26.0	60.7	30.3	30.0
DNA	76.9	55.2	110.4	46.3	39.4	121.0	52.4	55.5
Solvent	35.4	46.0	42.0	39.9	32.0	92.9	34.4	31.4

Tabelle 16: Experimentelle Daten sowie Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Kokristallstrukturen von *Geobacillus steraotherophilus* Polymerase I mit den β -cFaPydA und β -cFaPydG Schäden

Kristallographischer Teil (Daten und Tabellen)

A.4.1 Strukturdatensammlung und -verfeinerung der Verbindungen 56 und 59

Je ein geeigneter Kristall der Substanzen **56**, **59**, **73** und **0388** wurden unter einem Mikroskop selektiert und anschließend auf die Spitze eines Glasfadens positioniert. Der Glasfaden wurde dann auf einen Goniometerkopf montiert und die Probe auf einem Diffraktometer vermessen. Die Datensammlung erfolgte für **56**, **59** und **0388** auf einem Oxford Diffraction Xcalibur3 Diffraktometer (Firma *Agilent*), ausgestattet mit einem Nonius Kappa CCD Detektor unter Verwendung Graphit-monochromatisierter Mo-K α Strahlung ($\lambda = 71.071 \text{ pm}/0.71071 \text{ \AA}$). Die Bestimmung der jeweiligen Elementarzelle, sowie die Datenintegration erfolgte mit der Crysalis CCD Software.^[384] Die Datenreduktion wurde mit dem Programm Crysalis RED^[385] durchgeführt, der sich eine empirische Absorptionskorrektur unter Verwendung von SCALE3 ABSPACK^[386] anschloss. Alle Strukturen wurden mit direkten Methoden gelöst (SHELXS-97)^[387], und mit der Software SHELXL-97^[388] gegen F² verfeinert. Die Strukturvalidierung erfolgte mit PLATON^[389]. Details der Verbindungen sind nachfolgend zusammengefasst. Die kristallographischen Daten der Verbindungen **56** (CCDC 796512) und **59** (CCDC 796513) wurden in der in der *Cambridge Structural Database* www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif hinterlegt.

Verbindung 56

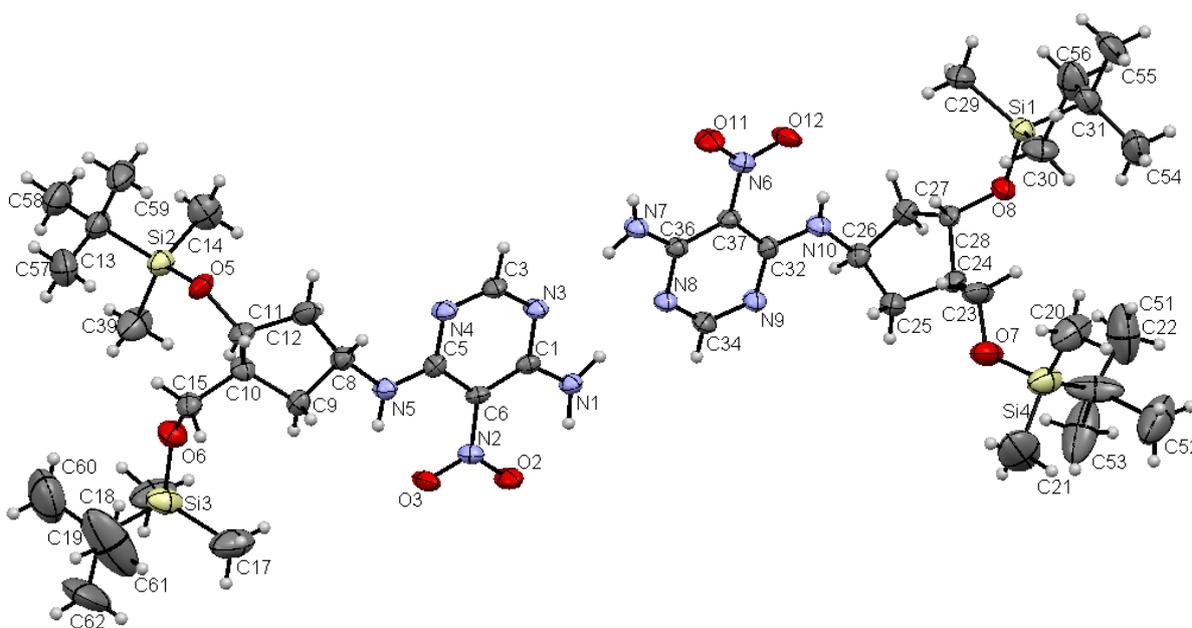


Abbildung 52: Struktur der dimeren Verbindung **56** und Nummerierung der Atome innerhalb der Elementarzelle (Die Nummerierung der Wasserstoffatome wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen).

Bezeichnung	Daten
Summenformel	$C_{22} H_{43} N_5 O_4 Si_2$
Molekularmasse [g/mol]	497.2854
Kristallgröße	0.2
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	$P2_1$
a, b, c (Å)	16.0708(5), 8.5332(3), 21.3678(7)
β	98.155(3)
V (Å ³)	2900.65
Z	2
Flack X Parameter	-0.08(10)
Messtemperatur (K)	200
μ (Absorptionskoeffizient) (mm ⁻¹)	0.156
$F(000)$	1080
θ -Bereich (°)	4.23 – 25.00
gesammelte Reflexe	23024
unabhängige Reflexe	10038
Zahl der <i>restraints</i>	1
$R1 [I > 2\sigma(I)]$	0.0484
$wR2$ [alle Daten]	0.1112
Goof	0.930
$g1$	0.0707
$g2$	0
Differenzelektronendichte	
max. [10^{-6} epm ⁻³]	0.468
min. [10^{-6} epm ⁻³]	-0.283

Tabelle 17: Kristallographische Daten der Verbindung 56.

A.4.3 Verbindung 59

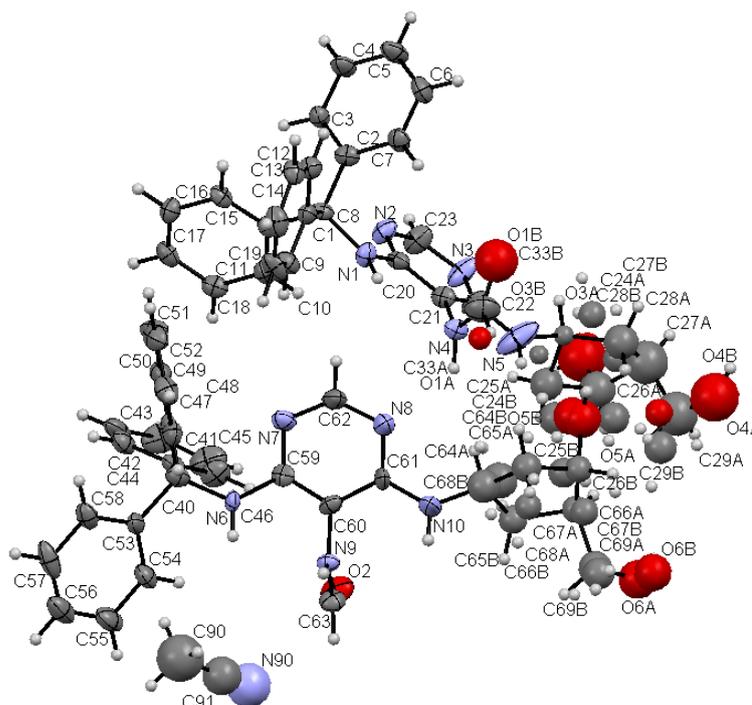


Abbildung 53: Struktur von Verbindung 59 mit Nummerierung der einzelnen Atome innerhalb der Elementarzelle.

Bezeichnung	Daten
Summenformel	C ₃₀ H ₃₁ N ₅ O ₃
Molekularmasse [g/mol]	509.5988
Kristallgröße	0.2
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	<i>P</i> 2 ₁
a, b, c (Å)	22.3291(9), 15.2442(6), 17.6022(7)
βγ	99.195(4)
V (Å ³)	5914.6(4)
Z	8
Messtemperatur (K)	100
μ (Absorptionskoeffizient) (mm ⁻¹)	0.077
<i>F</i> (000)	2211
θ-Bereich (°)	4.23 – 24.00
gesammelte Reflexe	38681
unabhängige Reflexe	9181
Zahl der <i>restraints</i>	20
<i>R</i> 1 [I>2σ(I)]	0.1526
<i>wR</i> 2 [alle Daten]	0.3908
GooF	1.298

Tabelle 18: Kristallographische Daten von Verbindung **59**

A.5 Synthetisierte Oligodesoxynukleotide (ODN)

β -cFaPydA (X)

Bezeichnung:	Sequenz (5'-3'):	Masse (berechnet):	Masse (gefunden):	Retentionszeit (min):
ODNFaPydA1	5'-CTC TTT X TT TCT CG	4187.5	4187.2	27.5 – 27.9
ODNFaPydA3	5'-AGA G XG CAT CAT GC	4313.8	4311.2	25.4 – 25.8
ODNFaPydA4	5'-ATC X AG AGG ATA GGT GGT A	5958.2	5958.94	26.0 – 26.4
ODNFaPydA5	5'-ACT X AG AGG ATA GGT GGT A	5958.2	5959.52	25.7 – 26.1
ODNFaPydA6	5'-CAT X CG AGT CAG GCT-3'	4593.9	4594.1	23.5 – 23.9
ODNFaPydA7	5'-ATG X GA CCA TCC CT-Phosphat	4304.8	4300.8	24.0 – 24.4
ODNFaPydA8	5'-ATC X AT CAA AGG CGA CGC CG	6136.0	6135.8	26.1 – 26.5
ODNFaPydA9	5'-ACT X AT CAA AGG CGA CGC CG	6136.0	6135.14	25.9 – 26.4
ODNFaPydA10	5'-CAT X AG AGT CAG GCT	4618.0	4615.46	23.6 – 24.0
ODNFaPydA11	5'-CAG X AG AGT CAG GCT	4643.0	4640.38	23.2 – 23.6
ODNFaPydA13	5'-CTC TTT X CT TCT CG	4171.7	4171.5	27.6 – 27.7
ODNFaPydA14	5'-CTC TTA X CT TCT CG	4220.7	4222.2	27.5 – 27.0
ODNFaPydA15	5'-CTC TTT X AT TCT CG	4195.7	4196.0	27.4 – 27.8
ODNFaPydA19	5'-GTA GCT AGG TCG AT X GAG AGA CAT GCG AGA CTG C-3'	10596.8	10598.7	29.5 – 30.9
ODNFaPydA20	5'-ACT X GA GAG ACA TGC GAG ACT GC	7122.6	7124.4	27.1 – 28.4
ODNFaPydA21	5'-CAC X CG AGT CAG GCT-3'	4578.1	4574.6	25.0-25.6
ODNFaPydA22	5'-CAA X AG AGT CAG GCT-3'	4626.2	4625.3	25.1-25.5

β -cFaPydG (Y)

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'):	Masse (berechnet):	Masse (gefunden):	Retentionszeit (min):
ODNFaPydG1	5'-CTC TTT Y TT TCT CG-3'	4203.7	4201.1	25.0 – 25.4
ODNFaPydG3	5'-ATC Y AG AGG ATA GGT GGT A	5972.8	5970.1	26.2 – 26.6
ODNFaPydG4	5'-ACT Y AG AGG ATA GGT GGT A	5972.8	5969.1	26.0 – 26.4
ODNFaPydG5	5'-GCG TCC A YT CTACC-3'	4545.9	4541.4	29.2 – 29.6
ODNFaPydG6	5'-CAT Y CG AGT CAG GCT-3'	4609.9	4608.7	24.5 – 24.9
ODNFaPydG7	5'-CAT Y AG AGT CAG GCT-3'	4634.0	4632.0	25.4 – 25.8
ODNFaPydG8	5'-CAG Y AG AGT CAG GCT-3'	4659.0	4657.0	25.4 – 25.8
ODNFaPydG9	5'-GTA GCT AGG TCG AT Y GAG AGA CAT GCG AGA CTG C-3'	10612.9	10612.7	27.3 – 27.9
ODNFaPydG10	5'-ACT Y GA GAG ACA TGC GAG ACT GC-3'	7138.9	7139.7	27.1 – 28.4
ODNFaPydG11	5'-CAA Y CG AGT CAG GCT-3'	4618.0	4618.8	26.0 – 26.4
ODNFaPydG12	5'-CAA Y AG AGT CAG GCT-3'	4642.0	4642.6	24.4 – 24.8
ODNFaPydG13	5'-CAC Y AG AGT CAG GCT-3'	4618.0	4619.6	24.2 – 24.7
ODNFaPydG14	5'-CAT Y CG AGT CAG GCT-3'	4911.0	4910.4	24.1 – 24.9

8-oxodG (Z)

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'):	Masse (berechnet):	Masse (gefunden):	Retentionszeit (min):
ODN8-oxodG1	5'-GTA GCT AGG TCG AT Z GAG AGA CAT GCG AGA CTG-C-3'	10612.8	10612.4	30.4 - -31.2
ODN8-oxodG2	5'-ACT Z G A GAG ACA TGC GAG ACT GC-3'	7138.6	7137.2	30.8 - -32.0

8-oxodA (W)

Bezeichnung	Sequenz (5`-3`):	Masse (berechnet):	Masse (gefunden):	Retentionszeit (min):
ODN8-oxodA1	5`-GTA GCT AGG TCG ATW GAG AGA CAT GCG AGA CTG-C-3`	10597.9	10597.2	30.4 - -31.4
ODN8-oxodA2	5`-ACT WGA GAG ACA TGC GAG ACT GC-3`	7122.6	7122.0	30.8 - -31.9

cdG (V)

Bezeichnung	Sequenz (5`-3`):	Masse (berechnet):	Masse (gefunden):	Retentionszeit (min):
cdG1	5` TCT TTV TTT CTC G-3`	3895.6	3894.3	27.6 – 28.0

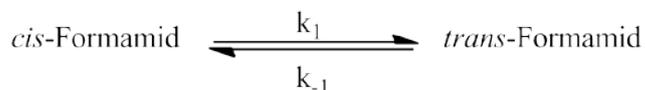
Tabelle 19: Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit den Modifikationen β -cFaPydA, β -cFaPydG, 8-oxodA, 8-oxodG und cdG.

Die Retentionszeiten der Oligonukleotide wurden zur besseren Vergleichbarkeit bei einem Gradienten von : 0 →45 min; 0 % → 40 % B; 45 → 48 min, 40 % → 100 % B ; 48 min → 60 min, 100 % → 0 % B (Flussrate 0.5 mL/min). Als Umkehrphasensäule wurde soweit nicht anders angegeben eine *CC 250/10 Nucleodur 100-7 C18* (DNA) (Firma *Macherey-Nagel*) verwendet.

Die angegebenen Retentionszeiten bilden Mittelwerte (± 0.2 min) aus den durchgeführten Experimenten und sollen als Anhaltspunkte dienen. Abweichungen von den angegeben Elutionszeiten können sich durch geringfügige Unterschiede der Pufferzusammensetzung bei der Herstellung der Puffer oder durch das Alter der verwendeten Säule ergeben.

A.6 Berechnung der Rotationsbarriere des β -cFaPydA^[2-3, 320]

Für die Isomerisierung von *cis*- zu *trans*-Formamid gilt folgende Gleichgewichtsreaktion:



Nach der Eyring-Gleichung berechnen sich die Reaktionsgeschwindigkeiten aus der jeweiligen freien Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger . Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} sind nahezu identisch, wenn der energetische Unterschied (ΔG^0) zwischen dem *cis* und dem *trans* Formamid gegen null geht. Somit gilt: k_1

$$k_1 \cong k_{-1} \cong k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (\text{A6.1})$$

k_B = Boltzmannkonstante, h = Plancksches Wirkungsquantum, T = Temperatur und R = all. Gaskonstante.

Am Koaleszenzpunkt gilt weiterhin:^[3]

$$k_c = \frac{\pi \Delta \nu}{\sqrt{2}} \quad (\text{A6.2})$$

k_c = Geschwindigkeitskonstante am Punkt der Koaleszenz, $\Delta \nu$ = NMR-Linienabstand (in Hz) der betrachteten Signale.

Einsetzen von Gleichung (A6.1) in (A6.2) ergibt für ΔG^\ddagger

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

T_c = Koaleszenztemperatur (Vergleiche hierzu auch das NMR-Spektrum der Verbindung **57** (Schema 15) bei verschiedenen Temperaturen).

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	attenuated total relection
BER	<i>base excision repair</i> , Basenexzisionsreparatur
BTT	Benzylthiotetrazol
ber.	berechnet
Bz	Benzoyl
CDI	Carbonyldiimidazol
CPG	<i>controlled pore glass</i>
δ	NMR: chemische Verschiebung
d	Tage
dA	2'-Desoxyadenosin
dATP	Adenosintriphosphat
dATPαS	2'-Desoxyadenosin 5'-(α-thio)triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytidin
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytosintriphosphat
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanintriphosphat
dT	2'-Desoxythymidin
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidintriphosphat
dd	doppelt destilliert
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl
DMT-Cl	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl-chlorid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dR	2'-Desoxyribose
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	<i>electron impact ionisation</i>
Eq	Äquivalent(e)
ESI	Elektronensprayionisierung
et al.	et alii, und andere
EtOAc	Essigsäureethylester
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FaPydA	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin
FaPydG	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
G	Guanin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin

Abkürzungsverzeichnis

HMBC	<i>heteronuclear multi bond connectivity</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPLC-MS/MS MS	eines per HPLC und MS isolierten Ions
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HV	Hochvakuum (bis 10^{-3} mbar)
I	Intensität
Is	Insertionsstelle
<i>J</i>	Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lsg.	Lösung
M	Molekulargewicht/ Molar (mol/L)
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeCN	Acetonitril
MMS:	Molekülion
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – time of flight</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeOTMS	Methoxytrimethylsilan
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MS	Massenspektrum
NER	<i>nucleotide excision repair</i> , Nukleotidexzisionsreparatur
NEt ₃	Triethylamin
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
ODN	Oligodesoxynukleotid
PA	Phosphoramidit
Pac ₂ O	Phenoxyacetanhydrid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
Post-Is	Post-Insertionsstelle
Prä-Is	Prä-Insertionsstelle
Py	Pyridin
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
<i>rp</i>	<i>reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
Smp.	Schmelzpunkt
T	Temperatur
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TEAA	Triethylamoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
<i>TLS</i>	<i>trans lesion synthesis</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett

Literaturverzeichnis

- [1] G. Hems, *Nature* **1958**, *181*, 1721-1722. *Effect of Ionizing Radiation on Aqueous Solutions of Guanylic Acid and Guanosine.*
- [2] S. Arnold, *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München* **2007**. *Synthese eines carbozyklischen Analogons des Formamidopyrimidin dA DNA-Schadens zur Untersuchung von DNA-Replikations- und Reparaturprozessen.*
- [3] M. Ober, *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München* **2005**. *Synthese eines carbozyklischen Analogons des Formamidopyrimidin-dG DNA-Schadens: Untersuchungen zur Replikation und Reparatur.*
- [4] S. Broyde, L. Wang, O. Rechkoblit, N. E. Geacintov, D. J. Patel, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 209-219. *Lesion processing: high-fidelity versus lesion-bypass DNA polymerases.*
- [5] S. Iwai, *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids* **2006**, *25*, 561-582. *Chemical Synthesis of Oligonucleotides Containing Damaged Bases for Biological Studies.*
- [6] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929-930. *The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain.*
- [7] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, **2010**.
- [8] G. M. Blackburn, M. J. Gait, IRL PRes, Oxford, U.K. , **1990**.
- [9] C. Dennis, P. Campbell, *Nature* **2003**, *421*, 396-396. *The eternal molecule.*
- [10] D. Ralf, *Dev. Biol.* **2005**, *278*, 274-288. *Friedrich Miescher and the discovery of DNA.*
- [11] P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **1919**, *40*, 415-424. *The structure of yeast nucleic acid*
- [12] O. T. Avery, C. M. McLeod, 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 deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III.*
- [13] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, *6*, 201-209. *Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation.*
- [14] E. Chargaff, *Fed. Proc.* **1951**, *10*, 654-659. *Structure and Function of nucleic Acids as Cell constituents. .*
- [15] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1953**, *18*, 123-131. *The structure of DNA.*
- [16] B. Maddox, *Nature* **2003**, *421*, 407-408. *The double helix and the 'wronged heroine'.*
- [17] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738. *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.*
- [18] M. Meselson, F. W. Stahl, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, *44*, 671-682. *The replication of DNA in Escherichia coli.*

- [19] S. S. Lange, K. Takata, R. D. Wood, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 96-110. *DNA polymerases and cancer.*
- [20] K. E. Zahn, S. S. Wallace, S. Doublet, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 358-369. *DNA polymerases provide a canon of strategies for translesion synthesis past oxidatively generated lesions.*
- [21] M. J. Bessman, I. R. Lehman, E. S. Simms, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 171-177. *Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid.*
- [22] I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 163-170. *Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid.*
- [23] J. D. Pata, J. Jaeger, *Structure* **2010**, *18*, 4-6. *Molecular machines and targeted molecular dynamics: DNA in motion.*
- [24] R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350-1354. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.*
- [25] K. B. Mullis, F. A. Faloona, in *Methods Enzymol.*, Vol. Volume 155 (Ed.: W. Ray), Academic Press, **1987**, pp. 335-350.
- [26] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5463-5467. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.*
- [27] S. Balasubramanian, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2011**, *47*, 7281-7286. *Sequencing nucleic acids: from chemistry to medicine.*
- [28] J. Shendure, H. Ji, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1135-1145. *Next-generation DNA sequencing.*
- [29] U. Hübscher, S. Spadari, G. Villani, *DNA Polymerases: Discovery, Characterization and Functions in Cellular DNA Transactions*, World Scientific, **2010**.
- [30] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709-715. *Instability and decay of the primary structure of DNA.*
- [31] T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3610-3618. *Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid.*
- [32] J. A. V. Butler, B. E. Conway, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1950**, 3418-3421. 670. *The action of ionizing radiations and of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid. Part II. The effect of oxygen on the degradation of the nucleic acid by X-rays.*
- [33] B. E. Conway, L. Gilbert, J. A. V. Butler, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1950**, 3421-3425. 671. *The action of ionizing radiations and of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid. Part III. The molecular weights of deoxyribonucleic acid degraded by X-rays and by treatment with a "nitrogen mustard."*
- [34] C. Auerbach, J. M. Robson, *Chem. Prod. of Mut.* **1946**, *157*, 302.
- [35] J. W. G. Scholes, *Biochem. J.* **1953**, *53*, 567-578. *Chemical action of X-rays on nucleic acids and related substances in aqueous systems. 1. Degradation of nucleic acids, purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides by X-rays and by free radicals produced chemically.*
- [36] P. A. Levene, R. S. Tipson, *J. Biol. Chem.* **1932**, *94*, 809-819. *The ring structure of Adenosine*

- [37] N. E. Geacintov, S. Broyde, *The Chemical Biology of DNA Damage*, John Wiley & Sons, **2010**.
- [38] J. Cadet, T. Douki, J. L. Ravanat, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 348-349. *One-electron oxidation of DNA and inflammation processes.*
- [39] J. F. Turrens, *J. Physiol.* **2003**, *552*, 335-344. *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.*
- [40] T. Finkel, N. J. Holbrook, *Nature* **2000**, *408*, 239-247. *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.*
- [41] J. A. V. Butler, K. A. Smith, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1950**, 3411-3418. 669. *The action of ionizing radiations and of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid. Part I. The action of some compounds of the "mustard" type.*
- [42] B. E. Conway, L. Gilbert, J. A. V. Butler, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1950**, 3421-3425. 671. *The action of ionizing radiations and of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid. Part III. The molecular weights of deoxyribonucleic acid degraded by X-rays and by treatment with a "nitrogen mustard."*
- [43] J. Rouse, S. P. Jackson, *Science* **2002**, *297*, 547-551. *Interfaces Between the Detection, Signaling, and Repair of DNA Damage.*
- [44] L. L. Bedard, T. E. Massey, *Cancer Lett.* **2006**, *241*, 174-183. *Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair.*
- [45] S. Gopalakrishnan, M. P. Stone, T. M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7232-7239. *Preparation and characterization of an aflatoxin B1 adduct with the oligodeoxynucleotide d(ATCGAT)₂.*
- [46] H. Mao, Z. Deng, F. Wang, T. M. Harris, M. P. Stone, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4374-4387. *An Intercalated and Thermally Stable FAPY Adduct of Aflatoxin B1 in a DNA Duplex: Structural Refinement from 1H NMR.*
- [47] S. Schorr, S. Schneider, K. Lammens, K.-P. Hopfner, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**. *Mechanism of replication blocking and bypass of Y-family polymerase η by bulky acetylaminofluorene DNA adducts.*
- [48] S. Dutta, Y. Li, D. Johnson, L. Dzantiev, C. C. Richardson, L. J. Romano, T. Ellenberger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 16186-16191. *Crystal structures of 2-acetylaminofluorene and 2-aminofluorene in complex with T7 DNA polymerase reveal mechanisms of mutagenesis.*
- [49] S. Schorr, T. Carell, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2534-2537. *Mechanism of Acetylaminofluorene-dG Induced Frameshifting by Polymerase η .*
- [50] G. W. Hsu, J. R. Kiefer, D. Burnouf, O. J. Becherel, R. P. P. Fuchs, L. S. Beese, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50280-50285. *Observing Translesion Synthesis of an Aromatic Amine DNA Adduct by a High-fidelity DNA Polymerase.*
- [51] R. M. Santella, D. Grunberger, S. Broyde, B. E. Hingerty, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 5459-5467. *Z-DNA conformation of N-2-acetylaminofluorene modified poly(dG-dC).poly(dG-dC) determined by reactivity with anti cytidine antibodies and minimized potential energy calculations. .*

- [52] P. D. Moore, S. D. Rabkin, A. L. Osborn, C. M. King, B. S. Strauss, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, 79, 7166-7170. *Effect of acetylated and deacetylated 2-aminofluorene adducts on in vitro DNA synthesis.*
- [53] J. E. Lindsley, R. P. P. Fuchs, *Biochemistry* **1994**, 33, 764-772. *Use of single-turnover kinetics to study bulky adduct bypass by T7 DNA polymerase.*
- [54] M. L. Michaels, D. L. Johnson, T. M. Reid, C. M. King, L. J. Romano, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 14648-14654. *Evidence for in vitro translesion DNA synthesis past a site-specific aminofluorene adduct.*
- [55] B. S. Strauss, J. Wang, *Carcinogenesis* **1990**, 11, 2103-2109. *Role of DNA polymerase 3'→ 5' exonuclease activity in the bypass of aminofluorene lesions in DNA.*
- [56] S. Fujii, V. Gasser, R. P. Fuchs, *J. Mol. Biol.* **2004**, 341, 405-417. *The Biochemical Requirements of DNA Polymerase V-mediated Translesion Synthesis Revisited.*
- [57] Y. Li, S. Dutta, S. Doublet, H. M. d. Bdour, J.-S. Taylor, T. Ellenberger, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 784-790. *Nucleotide insertion opposite a cis-syn thymine dimer by a replicative DNA polymerase from bacteriophage T7.*
- [58] H. Ling, F. Boudsocq, B. S. Plosky, R. Woodgate, W. Yang, *Nature* **2003**, 424, 1083-1087. *Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution.*
- [59] H. Ling, F. Boudsocq, R. Woodgate, W. Yang, *Mol. Cell.* **2004**, 13, 751-762. *Snapshots of Replication through an Abasic Lesion: Structural Basis for Base Substitutions and Frameshifts.*
- [60] S. S. W. Matthew Hogg, Sylvie Doublé, *EMBO J.* **2005**, 23, 1483-1493. *Crystallographic snapshots of a replicative DNA polymerase encountering an abasic site.*
- [61] O. D. Schärer, H. M. Nash, J. Jiricny, J. Laval, G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 8592-8597. *Specific Binding of a Designed Pyrrolidine Abasic Site Analog to Multiple DNA Glycosylases.*
- [62] K. M. Kroeger, M. F. Goodman, M. M. Greenberg, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 5480-5485. *A comprehensive comparison of DNA replication past 2-deoxyribose and its tetrahydrofuran analog in Escherichia coli.*
- [63] G. R. Hoffmann, R. P. P. Fuchs, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 347-359. *Mechanisms of Frameshift Mutations: Insight from Aromatic Amines.*
- [64] S. Cory, J. M. Adams, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 647-656. *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.*
- [65] E. C. Friedberg, *Nature* **2003**, 421, 436-440. *DNA damage and repair.*
- [66] R. A. DePinho, *Nature* **2000**, 408, 248-254. *The age of cancer.*
- [67] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1152. *Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission.*
- [68] M. B. J. Cadet, T. Douki, J. L. Ravanat, *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.* **1997**, 131, 1-87. *Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance*

- [69] S. Bjelland, E. Seeberg, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, *531*, 37-80. *Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation.*
- [70] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J.-L. Ravanat, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, *531*, 5-23. *Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features.*
- [71] M. M. Greenberg, *Acc. Chem. Res.* **2011**. *The Formamidopyrimidines: Purine Lesions Formed in Competition With 8-Oxopurines From Oxidative Stress.*
- [72] S. Steeken, 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.*
- [73] K. Kawai, Y. Wata, N. Ichinose, T. Majima, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 4327-4329. *Selective Enhancement of the One-Electron Oxidation of Guanine by Base Pairing with Cytosine.*
- [74] Y. Yoshioka, Y. Kitagawa, Y. Takano, K. Yamaguchi, T. Nakamura, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8712-8719. *Experimental and Theoretical Studies on the Selectivity of GGG Triplets toward One-Electron Oxidation in B-Form DNA.*
- [75] S. Steenken, S. V. Jovanovic, M. Bietti, K. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2373-2374. *The Trap Depth (in DNA) of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as Derived from Electron-Transfer Equilibria in Aqueous Solution.*
- [76] 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.*
- [77] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 631-636. *Long-distance charge transport in DNA: the hopping mechanism.*
- [78] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51-70. *Long-Distance electron transfer through DNA.*
- [79] P. W. Doetsch, T. H. Zastawny, A. M. Martin, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **1995**, *34*, 737-742. *Monomeric Base Damage Products from Guanine, Adenine, and Thymine Induced by Exposure of DNA to Ultraviolet Radiation.*
- [80] 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.*
- [81] H. Kasai, H. Tanooka, S. Nishimura, *Gann Jap. J. of Canc. Res.* **1984**, *12*, 1037-1039. *Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation*
- [82] H. Kasai, Z. Yamaizumi, F. Yamamoto, T. Bessho, S. Nishimura, M. Berger, J. Cadet, *Nucleic Acids. Symp. Ser.* **1992**, 181-182. *Photosensitized formation of 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in DNA by riboflavin.*
- [83] D. T. Breslin, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2311-2319. *Anthraquinone Photocleavages: Mechanisms for GG-Selective and Nonselective Cleavage of Double-Stranded DNA.*
- [84] I. Saito, M. Takayama, S. Kawanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5590-5591. *Photoactivatable DNA-Cleaving Amino Acids: Highly Sequence-Selective DNA Photocleavage by Novel L-Lysine Derivatives.*

- [85] S. Boiteux, E. Gajewski, J. Laval, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **1992**, *31*, 106-110. *Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization.*
- [86] J.-L. Ravanat, C. Saint-Pierre, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J. Cadet, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3702-3709. *Damage to Isolated DNA Mediated by Singlet Oxygen.*
- [87] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503-520. *Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts.*
- [88] S. Breeger, *Elektronentransfergetriebene Reparatur und zelluläre Erkennung von DNA-Photoschäden*, Cuvillier Verlag, **2007**.
- [89] M.-A. Grążewicz, T. H. Zastawny, R. Oliński, B. Tudek, *Mut. Res./DNA Repair* **1999**, *434*, 41-52. *SOS-dependent A→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.*
- [90] H. A. Kontos, *Stroke* **2001**, *32*, 2712-2716. *Oxygen Radicals in Cerebral Ischemia.*
- [91] 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.*
- [92] J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*, 1620-1624. *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.*
- [93] J. F. Ward, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1988**, *35*, 95-125. *DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability.*
- [94] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz, T. Ellenberger, *DNA Repair and Mutagenesis, second ed.* ASM Press, , Vol. 5, **2006**.
- [95] T. Gimisis, C. Cismaş, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1351-1378. *Isolation, Characterization, and Independent Synthesis of Guanine Oxidation Products.*
- [96] O. D. Schärer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974. *Chemistry and biology of DNA repair.*
- [97] K. S. Gates, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1747-1760. *An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals.*
- [98] K. B. Beckman, B. N. Ames, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19633-19636. *Oxidative Decay of DNA.*
- [99] M. Foksinski, R. Rozalski, J. Guz, B. Ruzkowska, P. Sztukowska, M. Piwowarski, A. Klungland, R. Olinski, *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, 1449-1454. *Urinary excretion of dna repair products correlates with metabolic rates as well as with maximum life spans of different mammalian species.*
- [100] V. Bodepudi, S. Shibutani, 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.*

- [101] V. Bodepudi, C. R. Iden, F. Johnson, *Nucleosides and Nucleotides* **1991**, *10*, 755-761. *An Improved Method for The Preparation Of The Phosphoramidites Of Modified 2'-Deoxynucleotides: Incorporation Of 8-Oxo-2'-Deoxy-7H-Guanosine Into Synthetic Oligomers.*
- [102] S. Nampalli, S. Kumar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1677-1679. *Efficient synthesis of 8-Oxo-dGTP: A mutagenic nucleotide.*
- [103] A. P. Grollman, M. Moriya, *Trends Genet.* **1993**, *9*, 246-249. *Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within.*
- [104] S. Nishimura, *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **2006**, *82*, 127-141. *8-Hydroxyguanine: From its discovery in 1983 to the present status.*
- [105] L. P. Candeias, S. Steenken, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 475-484. *Reaction of HO. with Guanine Derivatives in Aqueous Solution: Formation of Two Different Redox-Active OH-Adduct Radicals and Their Unimolecular Transformation Reactions. Properties of G(-H).*
- [106] B. H. Munk, C. J. Burrows, H. B. Schlegel, *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 432-444. *Exploration of Mechanisms for the Transformation of 8-Hydroxy Guanine Radical to FAPyG by Density Functional Theory.*
- [107] M. M. Greenberg, *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 46-50. *In vitro and in vivo effects of oxidative damage to deoxyguanosine.*
- [108] M. A. Kalam, K. Haraguchi, S. Chandani, E. L. Loechler, M. Moriya, M. M. Greenberg, A. K. Basu, *Nucleic Acids Res.*, *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.*
- [109] G. Pratviel, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6018-6030. *Guanine Oxidation: One- and Two-Electron Reactions.*
- [110] M. Berger, J. Cadet, *Z. Naturforsch., B: J. Chem. Sci.* **1985**, *40*, 1519-1531. *Isolation and characterization of the radiation-induced degradation products of 2'-deoxyguanosine in oxygen-free aqueous solutions.*
- [111] T. Douki, S. Spinelli, J.-L. Ravanat, J. Cadet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, 1875-1880. *Hydroxyl radical-induced degradation of 2[prime or minute]-deoxyguanosine under reducing conditions.*
- [112] T. Douki, R. Martini, J. L. Ravanat, R. J. Turesky, J. Cadet, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 2385-2391. *Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution.*
- [113] J. P. Pouget, T. Douki, M. J. Richard, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 541-549. *DNA Damage Induced in Cells by γ and UVA Radiation As Measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet Assay.*
- [114] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553. *Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies.*
- [115] J. Cadet, et al., *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2004**, *23*, 33-43. *Radiation-Induced DNA Damage: Formation, Measurement, and Biochemical Features*

- [116] J. J. v. Hemmen, J. F. Bleichrodt, *Radiat. Res.* **1971**, *46*, 444-456. *The Decomposition of Adenine by Ionizing Radiation.*
- [117] S. Raoul, M. Bardet, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 924-933. *.gamma. Irradiation of 2'-Deoxyadenosine in Oxygen-Free Aqueous Solutions: Identification and Conformational Features of Formamidopyrimidine Nucleoside Derivatives.*
- [118] 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.*
- [119] P. Lehtikoinen, J. Mattinen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3819-3823. *Mechanisms for the solvolytic decompositions of nucleoside analogs. 13. Reactions of adenine nucleosides with aqueous alkalies: kinetics and mechanism.*
- [120] 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•dA) and N6-(2-Deoxy-d-pentofuranosyl)- 6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine (Fapy•dG)†.*
- [121] A. F. Fuciarelli, G. G. Miller, J. A. Raleigh, *Radiat. Res.* **1985**, *104*, 272-283. *An Immunochemical Probe for 8,5'-Cycloadenosine-5'-Monophosphate and Its Deoxy Analog in Irradiated Nucleic Acids.*
- [122] N. Murata-Kamiya, H. Kamiya, M. Muraoka, H. Kaji, H. Kasai, *Radiat. Res.* **1997**, *38*, 121-131. *Comparison of Oxidation Products from DNA Components by γ -Irradiation and Fenton-Type Reactions.*
- [123] H. Kamiya, H. Kasai, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19446-19450. *Formation of 2-Hydroxydeoxyadenosine Triphosphate, an Oxidatively Damaged Nucleotide, and Its Incorporation by DNA Polymerases.*
- [124] 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.*
- [125] O. I. Aruoma, B. Halliwell, E. Gajewski, M. Dizdaroglu, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20509-20512. *Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates.*
- [126] M. Dizdaroglu, O. I. Aruoma, B. Halliwell, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8447-8451. *Modification of bases in DNA by copper ion-1,10-phenanthroline complexes.*
- [127] B. Tudek, S. Bioteux, J. Laval, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3079-3084. *Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA.*
- [128] B. Tudek, M. Graziewicz, O. Kazanova, T. H. Zastawny, T. Obtulowicz, J. Laval, *Acta Biochim. Pol.* **1999**, *46*, 785-799. *Mutagenic specificity of imidazole ring-opened 7-methylpurines in M13mp18 phage DNA.*
- [129] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281-285. *Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses.*
- [130] C. B. Reese, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851-3868. *Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis.*

- [131] K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8636-8637. *Synthesis of Oligonucleotides Containing Fapy-dG (N6-(2-Deoxy- α,β -d-erythro-pentofuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine).*
- [132] 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 analogues.*
- [133] Y. L. Jiang, C. J. Wiederholt, J. N. Patro, K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *J. Org. Chem.* **2004**, *70*, 141-149. *Synthesis of Oligonucleotides Containing Fapy-dG (N6-(2-Deoxy- α,β -d-erythropentofuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) Using a 5'-Dimethoxytrityl Dinucleotide Phosphoramidite.*
- [134] M. Lukin, C. A. S. A. Minetti, D. P. Remeta, S. Attaluri, F. Johnson, K. J. Breslauer, C. de los Santos, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5776-5789. *Novel post-synthetic generation, isomeric resolution, and characterization of Fapy-dG within oligodeoxynucleotides: differential anomeric impacts on DNA duplex properties.*
- [135] H. Gordon, M. L. Eidinoff, *Radiat. Res.* **1958**, *9*, 305-311. *Effect of X-Radiation on Aqueous Solutions of Adenosine Diphosphate.*
- [136] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chemistry* **2002**, *8*, 293-301. *Synthesis, stability, and conformation of the formamidopyrimidine G DNA lesion.*
- [137] K. Haraguchi, M. O. Delaney, C. J. Wiederholt, A. Sambandam, Z. Hantosi, M. M. Greenberg, *Nucleic. Acids. Symp. Ser., 1*, 129-130. *Synthesis and characterization of oligonucleotides containing formamidopyrimidine lesions (Fapy-dA, Fapy-dG) at defined sites.*
- [138] L. T. Burgdorf, Philipps-Universität (Marburg), **2001**. *Synthese von Ribofuranosid-Formamidopyrimidin und Cyclobutan-Thymidin-Dimer-Verbindungen zur Untersuchung von DNA-Reparaturprozessen.*
- [139] J. N. Patro, K. Haraguchi, M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13397-13403. *Probing the Configurations of Formamidopyrimidine Lesions Fapy-dA and Fapy-dG in DNA Using Endonuclease IV[†].*
- [140] C. D. Siebert, *Chiuuz* **2004**, *38*, 320-324. *Das Bioisosterie-Konzept: Arzneistoffentwicklung.*
- [141] H. Y. Taiki Kusaka, Motoo Shibata, Masayuki Muroi, Toyokazu Kishi and Komei Mizuno *J. Antibiot.* **1968**, *XXI*, 255-263. *Streptomyces citricolor nov. sp. and a new antibiotic, aristeromycin*
- [142] N. M. Satoshi Yaginuma, Masatoshi Tsujino, Yasuhiro Sudate, Mitsuo Hayashi, Masaru Otani, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 359 – 366. *Studies on Nplanocin a new antitumor antibiotic . i. producing organism, isolation and characterization*
- [143] R. T. Borchardt, B. T. Keller, U. Patel-Thombre, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4353-4358. *Neplanocin A. A potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and of vaccinia virus multiplication in mouse L929 cells.*
- [144] C. R. Wagner, V. V. Iyer, E. J. McIntee, *Med. Research Reviews* **2000**, *20*, 417-451. *Pronucleotides: Toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides.*

- [145] E. Martínez, et al., *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1036-1046. *Substitution of Nevirapine, Efavirenz, or Abacavir for Protease Inhibitors in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection.*
- [146] G. J. Yuen, S. Weller, G. E. Pakes, *Clini. Pharmacokin.* **2008**, *47*, 351-371. *A Review of the Pharmacokinetics of Abacavir.*
- [147] J. Štambaský, M. Hocek, P. Kočovský, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729-6764. *C-Nucleosides: Synthetic Strategies and Biological Applications.*
- [148] O. R. Ludek, C. Meier, *Synthesis* **2003**, *2003*, 2101,2109. *New Convergent Synthesis of Carbocyclic Nucleoside Analogues.*
- [149] F. Johnson, G. Dormán, 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.*
- [150] M. Ferrero, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4319-4348. *Biocatalytic Selective Modifications of Conventional Nucleosides, Carbocyclic Nucleosides, and C-Nucleosides.*
- [151] F. Grolle, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2005**. *Entwicklung von Synthesemethoden und Reagenzien zur selektiven und sequenzspezifischen Generierung und Detektion von DNA-Schäden.*
- [152] Y.-V. Le Bihan, M. Angeles Izquierdo, F. Coste, P. Aller, F. Culard, T. H. Gehrke, K. Essalhi, T. Carell, B. Castaing, *Nucleic Acids Res.* **2011**. *5-Hydroxy-5-methylhydantoin DNA lesion, a molecular trap for DNA glycosylases.*
- [153] M. Ober, *Philipps-Universität Marburg* **2002**. *Synthese von stabilisierten Analoga des Formamidopyrimidin-dG DNA-Schadens. Diplomarbeit.*
- [154] F. Büsch, J. C. Pieck, M. Ober, J. Gierlich, G. W. Hsu, L. S. Beese, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2125-2132. *Dissecting the differences between the alpha and beta anomers of the oxidative DNA lesion FaPydG.*
- [155] S. Arnold. *Synthese von stabilisierten Analoga des Formamidopyrimidin-dA DNASchadens, Diploma thesis, Philipps- Universität Marburg (Marburg), 2002.*
- [156] H. Müller, *Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München* **2008**. *Synthese carbocyclischer Analoga oxidativ erzeugter DNA-Schäden.*
- [157] 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.*
- [158] M. Ober, H. Müller, 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.*
- [159] C. Thibaudeau, A. Kumar, S. Bekiroglu, A. Matsuda, V. E. Marquez, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5447-5462. *NMR Conformation of (-)- β -d-Aristeromycin and Its 2'-Deoxy and 3'-Deoxy Counterparts in Aqueous Solution.*
- [160] V. B. Kurteva, C. A. M. Afonso, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6809-6857. *Synthesis of Cyclopentitols by Ring-Closing Approaches.*

- [161] 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 formamidopyrimidine-DNA glycosylase.*
- [162] F. Coste, M. Ober, Y. V. Le Bihan, M. A. Izquierdo, N. Hervouet, H. Mueller, T. Carell, B. Castaing, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 706-717. *Bacterial base excision repair enzyme Fpg recognizes bulky N7-substituted-FapydG lesion via unproductive binding mode.*
- [163] 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.*
- [164] G. L. Verdine, D. P. G. Norman, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 337-366. *Covalent trapping of protein-DNA complexes*
- [165] S. S. Tavale, H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* **1970**, 48, 109-123. *Crystal and molecular structure of 8-bromoguanosine and 8-bromoadenosine, two purine nucleosides in the syn conformation.*
- [166] S. Uesugi, M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3250-3253. *Carbon-13 magnetic resonance spectra of 8-substituted purine nucleosides. Characteristic shifts for the syn conformation.*
- [167] M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 1460-1465. *Synthesis of Oligonucleotides and Thermal Stability of Duplexes Containing the β -C-Nucleoside Analogue of Fapy-dG.*
- [168] S. Imoto, J. N. Patro, Y. L. Jiang, N. Oka, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14606-14611. *Synthesis, DNA polymerase incorporation, and enzymatic phosphate hydrolysis of formamidopyrimidine nucleoside triphosphates.*
- [169] Y. N. Weledji, C. J. Wiederholt, M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4029-4034. *DNA polymerase bypass in vitro and in E. coli of a C-nucleotide analogue of Fapy-dG.*
- [170] 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 Analogues.*
- [171] M. Ober, U. Linne, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4947-4951. *The two main DNA lesions 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine exhibit strongly different pairing properties.*
- [172] J. Rouse, S. P. Jackson, *Science* **2002**, 297, 547-551. *Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage.*
- [173] J. G. V. Donald Voet, Charlotte W. Pratt in *Lehrbuch der Biochemie* (Ed.: U. H. Annette G. Beck-Sickinger), Wiley-VCH, **2010**.
- [174] T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr Opin Chem Biol* **2001**, 5, 491-498. *The mechanism of action of DNA photolyases.*
- [175] S. C. Treweek, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, 419, 174-178. *Oxidative demethylation by Escherichia coli AlkB directly reverts DNA base damage.*

- [176] P. O. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, *Nature* **2002**, 419, 178-182. *AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in Escherichia coli.*
- [177] T. Duncan, S. C. Trewick, P. Koivisto, P. A. Bates, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 16660-16665. *Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases.*
- [178] P. A. Aas, et al., *Nature* **2003**, 421, 859-863. *Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA.*
- [179] A. Loveless, *Nature* **1969**, 223, 206-207. *Possible Relevance of O-6 Alkylation of Deoxyguanosine to the Mutagenicity and Carcinogenicity of Nitrosamines and Nitrosamides.*
- [180] M. T. Hess, U. Schwitter, M. Petretta, B. Giese, H. Naegeli, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94, 6664-6669. *Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair.*
- [181] K. Sugawara, T. Okamoto, Y. Shimizu, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, *Genes Dev* **2001**, 15, 507-521. *A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair.*
- [182] M. M. Cox, *Annu. Rev. Genet.* **2001**, 35, 53-82. *Recombinational DNA repair of damaged replication forks in Escherichia coli: questions.*
- [183] S. C. Kowalczykowski, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25, 156-165. *Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication.*
- [184] O. D. Scharer, J. Jiricny, *Bioessays* **2001**, 23, 270-281. *Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases.*
- [185] D. Zharkov, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 1544-1565. *Base excision DNA repair.*
- [186] D. P. Clark, *Molecular biology*, Elsevier Academic Press, **2005**.
- [187] D. Miral, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, 591, 45-59. *Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases.*
- [188] H. Nilsen, H. E. Krokan, *Carcinogenesis* **2001**, 22, 987-998. *Base excision repair in a network of defence and tolerance.*
- [189] 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.*
- [190] S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1221-1262. *Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair.*
- [191] P. Duwat, R. de Oliveira, S. D. Ehrlich, S. Boiteux, *Microbiology* **1995**, 141 (Pt 2), 411-417. *Repair of oxidative DNA damage in gram-positive bacteria: the Lactococcus lactis Fpg protein.*
- [192] C. J. Chetsanga, M. Lozon, C. Makaroff, L. Savage, *Biochemistry* **1981**, 20, 5201-5207. *Purification and characterization of Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase that excises damaged 7-methylguanine from deoxyribonucleic acid.*

- [193] S. Boiteux, T. R. O'Connor, J. Laval, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3177-3183. *Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein.*
- [194] G. P. Margison, A. E. Pegg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 861-865. *Enzymatic release of 7-methylguanine from methylated DNA by rodent liver extracts.*
- [195] S. Boiteux, J. Belleney, B. P. Roques, J. Laval, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 5429-5439. *Two rotameric forms of open ring 7-methylguanine are present in alkylated polynucleotides.*
- [196] T. L. C.J. Chetsanga, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 3673-3684. *Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from Escherichia coli.*
- [197] L. H. Breimer, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 6359-6367. *Enzymatic excision from γ -irradiated polydeoxyribonucleotids of adenine residues whose imidazole rings have been ruptured.*
- [198] 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 Hydrolysis and N-Glycoside Transfer.*
- [199] 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†.*
- [200] 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†.*
- [201] A. Karakaya, P. Jaruga, V. A. Bohr, A. P. Grollman, M. Dizdaroglu, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 474-479. *Kinetics of Excision of Purine Lesions from DNA by Escherichia Coli Fpg Protein.*
- [202] 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.*
- [203] M. E. Lomax, H. Salje, S. Cunniffe, P. O'Neill, *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.*
- [204] D. Miral, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, *531*, 109-126. *Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage.*
- [205] E. I. Zaika, R. A. Perlow, E. Matz, S. Broyde, R. Gilboa, A. P. Grollman, D. O. Zharkov *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4849-4861. *Substrate Discrimination by Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase.*
- [206] 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 Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase.*
- [207] D. O. Zharkov, G. Shoham, A. P. Grollman, *DNA Repair* **2003**, *2*, 839-862. *Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases.*

- [208] J. C. Fromme, G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 51543-51548. *DNA Lesion Recognition by the Bacterial Repair Enzyme MutM.*
- [209] M. Dizdaroglu, G. Kirkali, P. Jaruga, *Free Radical Biol. Med.* **2008**, 45, 1610-1621. *Formamidopyrimidines in DNA: Mechanisms of formation, repair, and biological effects.*
- [210] C. J. Wiederholt, J. N. Patro, Y. L. Jiang, K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *Nucleic Acids Res.*, 33, 3331-3338. *Excision of formamidopyrimidine lesions by endonucleases III and VIII is not a major DNA repair pathway in Escherichia coli.*
- [211] M. Dizdaroglu, S. M. Burgess, P. Jaruga, T. K. Hazra, H. Rodriguez, R. S. Lloyd, *Biochemistry* **2001**, 40, 12150-12156. *Substrate Specificity and Excision Kinetics of Escherichia coli Endonuclease VIII (Nei) for Modified Bases in DNA Damaged by Free Radicals†.*
- [212] M. D. Leipold, J. G. Muller, C. J. Burrows, S. S. David, *Biochemistry* **2000**, 39, 14984-14992. *Removal of hydantoin products of 8-oxoguanine oxidation by the Escherichia coli DNA repair enzyme, FPG.*
- [213] P. A. van der Kemp, D. Thomas, R. Barbey, R. de Oliveira, S. Boiteux, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 5197-5202. *Cloning and expression in Escherichia coli of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine.*
- [214] B. Karahalil, P.-M. Girard, S. Boiteux, M. Dizdaroglu, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1228-1232. *Substrate specificity of the Ogg1 protein of Saccharomyces cerevisiae: Excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals.*
- [215] C. Dherin, J. P. Radicella, M. Dizdaroglu, S. Boiteux, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4001-4007. *Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human α -hOgg1 protein and the polymorphic α -hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations.*
- [216] M. Audebert, J. P. Radicella, M. Dizdaroglu, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 2672-2678. *Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein.*
- [217] C. Dherin, M. Dizdaroglu, H. Doerflinger, S. Boiteux, J. P. Radicella, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 4583-4592. *Repair of oxidative DNA damage in Drosophila melanogaster: identification and characterization of dOgg1, a second DNA glycosylase activity for 8-hydroxyguanine and formamidopyrimidines.*
- [218] T. Morales-Ruiz, M. Birincioglu, P. Jaruga, H. Rodriguez, T. Roldan-Arjona, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **2003**, 42, 3089-3095. *Arabidopsis thaliana Ogg1 Protein Excises 8-Hydroxyguanine and 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine from Oxidatively Damaged DNA Containing Multiple Lesions.*
- [219] N. Krishnamurthy, K. Haraguchi, M. M. Greenberg, S. S. David, *Biochemistry* **2007**, 47, 1043-1050. *Efficient Removal of Formamidopyrimidines by 8-Oxoguanine Glycosylases†.*
- [220] M. Audebert, et al., *Cancer Res.* **2000**, 60, 4740-4744. *Alterations of the DNA Repair Gene OGG1 in Human Clear Cell Carcinomas of the Kidney.*
- [221] K. Shinmura, T. Kohno, H. Kasai, K. Koda, H. Sugimura, J. Yokota, *Cancer Sci.* **1998**, 89, 825-828. *Infrequent Mutations of the hOGG1 Gene, That Is Involved in the Excision of 8-Hydroxyguanine in Damaged DNA, in Human Gastric Cancer.*

- [222] M. Dizdaroglu, C. Bauche, H. Rodriguez, J. Laval, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5586-5592. *Novel Substrates of Escherichia coli Nth Protein and Its Kinetics for Excision of Modified Bases from DNA Damaged by Free Radicals†.*
- [223] S. Sentürker, M. Dizdaroglu, P. A. van der Kemp, H. J. You, P. W. Doetsch, S. Boiteux, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5270-5276. *Substrate specificities of the Ntg1 and Ntg2 proteins of Saccharomyces cerevisiae for oxidized DNA bases are not identical.*
- [224] P. Jaruga, M. Birincioglu, T. A. Rosenquist, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **2004**, *43*, 15909-15914. *Mouse NEIL1 Protein Is Specific for Excision of 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidine from Oxidatively Damaged DNA.*
- [225] Y. Qi, M. C. Spong, K. Nam, A. Banerjee, S. Jiralerspong, M. Karplus, G. L. Verdine, *Nature* **2009**, *462*, 762-766. *Encounter and extrusion of an intrahelical lesion by a DNA repair enzyme.*
- [226] P. C. Blainey, A. M. van Oijen, A. Banerjee, G. L. Verdine, X. S. Xie, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 5752-5757. *A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA.*
- [227] C. Bergonzo, A. J. Campbell, C. de los Santos, A. P. Grollman, C. Simmerling, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14504-14506. *Energetic Preference of 8-oxoG Eversion Pathways in a DNA Glycosylase.*
- [228] A. J. Berdis, *Biochemistry* **2008**, *47*, 8253-8260. *DNA polymerases as therapeutic targets.*
- [229] L. S. Waters, B. K. Minesinger, M. E. Wiltrout, S. D'Souza, R. V. Woodruff, G. C. Walker, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2009**, *73*, 134-154. *Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance.*
- [230] E. C. Friedberg, R. Wagner, M. Radman, *Science* **2002**, *296*, 1627-1630. *Specialized DNA Polymerases, Cellular Survival, and the Genesis of Mutations.*
- [231] S. Prakash, R. E. Johnson, L. Prakash, in *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 74, Annual Reviews, Palo Alto, **2005**, pp. 317-353.
- [232] W. Yang, R. Woodgate, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 15591-15598. *What a difference a decade makes: Insights into translesion DNA synthesis.*
- [233] Y. I. Pavlov, P. V. Shcherbakova, I. B. Rogozin, in *Int. Rev. Cyt.*, Vol. Volume 255 (Ed.: W. J. Kwang), Academic Press, **2006**, pp. 41-132.
- [234] K. Bebenek, T. A. Kunkel, in *Adv. Prot. Chem.*, Vol. Volume 69 (Ed.: Y. Wei), Academic Press, **2004**, pp. 137-165.
- [235] L. G. Briebe, B. F. Eichman, R. J. Kokoska, S. Doublet, T. A. Kunkel, T. Ellenberger, *EMBO J.* **2004**, *23*, 3452-3461. *Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase.*
- [236] L. G. Briebe, R. J. Kokoska, K. Bebenek, T. A. Kunkel, T. Ellenberger, *Structure* **2005**, *13*, 1653-1659. *A lysine residue in the fingers subdomain of T7 DNA polymerase modulates the miscoding potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine.*
- [237] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, *431*, 217-221. *Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase.*

- [238] P. Aller, Y. Ye, S. S. Wallace, C. J. Burrows, S. Doublé, *Biochemistry* **2010**, *49*, 2502-2509. *Crystal Structure of a Replicative DNA Polymerase Bound to the Oxidized Guanine Lesion Guanidinohydantoin.*
- [239] V. K. Batra, W. A. Beard, E. W. Hou, L. C. Pedersen, R. Prasad, S. H. Wilson, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 889-890. *Mutagenic conformation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP in the confines of a DNA polymerase active site.*
- [240] H. Zang, A. Irimia, J.-Y. Choi, K. C. Angel, L. V. Loukachevitch, M. Egli, F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2358-2372. *Efficient and High Fidelity Incorporation of dCTP Opposite 7,8-Dihydro-8-oxodeoxyguanosine by Sulfolobus solfataricus DNA Polymerase Dpo4.*
- [241] O. Rechkoblit, L. Malinina, Y. Cheng, V. Kuryavyi, S. Broyde, N. E. Geacintov, D. J. Patel, *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e11. *Stepwise Translocation of Dpo4 Polymerase during Error-Free Bypass of an oxoG Lesion.*
- [242] R. L. Eoff, A. Irimia, K. C. Angel, M. Egli, F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19831-19843. *Hydrogen Bonding of 7,8-Dihydro-8-oxodeoxyguanosine with a Charged Residue in the Little Finger Domain Determines Miscoding Events in Sulfolobus solfataricus DNA Polymerase Dpo4.*
- [243] C. Biertümpfel, et al., *Nature* **2010**, *465*, 1044-1048. *Structure and mechanism of human DNA polymerase η .*
- [244] T. D. Silverstein, R. Jain, R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, A. K. Aggarwal, *Structure* **2010**, *18*, 1463-1470. *Structural Basis for Error-free Replication of Oxidatively Damaged DNA by Yeast DNA Polymerase η .*
- [245] K. N. Kirouac, H. Ling, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 3210-3215. *Unique active site promotes error-free replication opposite an 8-oxo-guanine lesion by human DNA polymerase ι .*
- [246] R. V.-D. Carpio, T. D. Silverstein, S. Lone, M. K. Swan, J. R. Choudhury, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, *PLoS One* **2009**, *4*, e5766. *Structure of Human DNA Polymerase κ Inserting dATP Opposite an 8-OxoG DNA Lesion.*
- [247] P. J. Rothwell, G. Waksman, in *Adv. Prot. Chem., Vol. Volume 71* (Eds.: M. S. John, A. D. P. David), Academic Press, **2005**, pp. 401-440.
- [248] L. A. Loeb, R. J. Monnat, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 594-604. *DNA polymerases and human disease.*
- [249] S. D. McCulloch, T. A. Kunkel, *Cell Res.* **2008**, *18*, 148-161. *The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases.*
- [250] J. R. Kiefer, C. Mao, C. J. Hansen, S. L. Basehore, H. H. Hogrefe, J. C. Braman, L. S. Beese, *Structure* **1997**, *5*, 95-108. *Crystal structure of a thermostable Bacillus DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution.*
- [251] D. L. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong, T. A. Steitz, *Nature* **1985**, *313*, 762-766. *Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP.*
- [252] C. M. Joyce, T. A. Steitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 777-822. *Function and Structure Relationships in DNA Polymerases.*

- [253] C. Joyce, T. Steitz, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 6321-6329. *Polymerase structures and function: variations on a theme?*
- [254] J. R. Kiefer, C. Mao, J. C. Braman, L. S. Beese, *Nature* **1998**, *391*, 304-307. *Visualizing DNA replication in a catalytically active Bacillus DNA polymerase crystal.*
- [255] Y. Li, S. Korolev, G. Waksman, *EMBO J.* **1998**, *17*, 7514-7525. *Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation.*
- [256] T. A. Steitz, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17395-17398. *DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms.*
- [257] S. Doublié, S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, T. Ellenberger, *Nature* **1998**, *391*, 251-258. *Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2[thinsp][angst] resolution.*
- [258] A. A. Golosov, J. J. Warren, L. S. Beese, M. Karplus, *Structure* **2010**, *18*, 83-93. *The Mechanism of the Translocation Step in DNA Replication by DNA Polymerase I: A Computer Simulation Analysis.*
- [259] S. J. Johnson, J. S. Taylor, L. S. Beese, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 3895-3900. *Processive DNA synthesis observed in a polymerase crystal suggests a mechanism for the prevention of frameshift mutations.*
- [260] L. B. Bloom, X. Chen, D. K. Fygenson, J. Turner, M. O'Donnell, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 27919-27930. *Fidelity of Escherichia coli DNA Polymerase III Holoenzyme.*
- [261] J. J. Warren, L. J. Forsberg, L. S. Beese, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 19701-19706. *The structural basis for the mutagenicity of O6-methyl-guanine lesions.*
- [262] G. F. Hong, W.-h. Huang, Z. Deceased., C. Feng (late of Shanghai, Vol. 5834253 (Ed.: C. A. o. S. S. Shanghai Institute of Biochemistry, CN)), China, **1998**.
- [263] A. H. Polesky, T. A. Steitz, N. D. Grindley, C. M. Joyce, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14579-14591. *Identification of residues critical for the polymerase activity of the Klenow fragment of DNA polymerase I from Escherichia coli.*
- [264] K. E. McAuley-Hecht, G. A. Leonard, N. J. Gibson, J. B. Thomson, W. P. Watson, W. N. Hunter, T. Brown, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10266-10270. *Crystal Structure of a DNA Duplex Containing 8-Hydroxydeoxyguanine-Adenine Base Pairs.*
- [265] W. Wang, H. W. Hellinga, L. S. Beese, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 17644-17648. *Structural evidence for the rare tautomer hypothesis of spontaneous mutagenesis.*
- [266] M. Sirover, L. Loeb, *Science* **1976**, *194*, 1434-1436. *Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens.*
- [267] L. A. Weymouth, L. A. Loeb, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, *75*, 1924-1928. *Mutagenesis during in vitro DNA synthesis.*
- [268] C. A. Brautigam, T. A. Steitz, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 54-63. *Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes.*

- [269] T. A. Kunkel, K. Bebenek, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 497-529. *DNA replication fidelity*
- [270] H. Echols, M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, 60, 477-511. *Fidelity Mechanisms in DNA Replication.*
- [271] A. J. Berman, S. Kamtekar, J. L. Goodman, J. M. Lazaro, M. de Vega, L. Blanco, M. Salas, T. A. Steitz, *EMBO J.* **2007**, 26, 3494-3505. *Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases.*
- [272] S. Thomas A, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, 3, 31-38. *DNA- and RNA-dependent DNA polymerases.*
- [273] K. A. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 685-713. *Conformational Coupling in DNA Polymerase Fidelity.*
- [274] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 16895-16898. *DNA Replication Fidelity.*
- [275] M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, 94, 10493-10495. *Hydrogen bonding revisited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity.*
- [276] E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 191-219. *Active site tightness and substrate fit in DNA replication.*
- [277] I. Wong, S. S. Patel, K. A. Johnson, *Biochemistry* **1991**, 30, 526-537. *An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics.*
- [278] Y. W. Yin, T. A. Steitz, *Cell* **2004**, 116, 393-404. *The Structural Mechanism of Translocation and Helicase Activity in T7 RNA Polymerase.*
- [279] S. J. Johnson, L. S. Beese, *Cell* **2004**, 116, 803-816. *Structures of mismatch replication errors observed in a DNA polymerase.*
- [280] H. Miller, A. P. Grollman, *Biochemistry* **1997**, 36, 15336-15342. *Kinetics of DNA Polymerase I (Klenow Fragment Exo-) Activity on Damaged DNA Templates: Effect of Proximal and Distal Template Damage on DNA Synthesis†.*
- [281] E. Y. Wu, L. S. Beese, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 19758-19767. *The Structure of a High Fidelity DNA Polymerase Bound to a Mismatched Nucleotide Reveals an "Ajar" Intermediate Conformation in the Nucleotide Selection Mechanism.*
- [282] N. B. Reuven, G. Arad, A. Maor-Shoshani, Z. Livneh, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 31763-31766. *The Mutagenesis Protein UmuC Is a DNA Polymerase Activated by UmuD', RecA, and SSB and Is Specialized for Translesion Replication.*
- [283] M. Tang, X. Shen, E. G. Frank, M. O'Donnell, R. Woodgate, M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 8919-8924. *UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, Escherichia coli pol V.*
- [284] J. Wagner, P. Gruz, S. R. Kim, M. Yamada, K. Matsui, R. P. Fuchs, T. Nohmi, *Mol. Cell.* **1999**, 4, 281-286. *The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis.*
- [285] T. Ogi, T. Kato, Jr., T. Kato, H. Ohmori, *Genes Cells* **1999**, 4, 607-618. *Mutation enhancement by DINB1, a mammalian homologue of the Escherichia coli mutagenesis protein dinB.*

- [286] V. L. Gerlach, L. Aravind, G. Gotway, R. A. Schultz, E. V. Koonin, E. C. Friedberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 11922-11927. *Human and mouse homologs of Escherichia coli DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily.*
- [287] C. Masutani, et al., *Nature* **1999**, *399*, 700-704. *The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta.*
- [288] W. Lin, H. Xin, Y. Zhang, X. Wu, F. Yuan, Z. Wang, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4468-4475. *The human REV1 gene codes for a DNA template-dependent dCMP transferase.*
- [289] A. Tissier, J. P. McDonald, E. G. Frank, R. Woodgate, *Genes Dev.* **2000**, *14*, 1642-1650. *poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase.*
- [290] K. Bebenek, A. Tissier, E. G. Frank, J. P. McDonald, R. Prasad, S. H. Wilson, R. Woodgate, T. A. Kunkel, *Science* **2001**, *291*, 2156-2159. *5'-Deoxyribose Phosphate Lyase Activity of Human DNA Polymerase ι in Vitro.*
- [291] S. Schneider, S. Schorr, T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 87-95. *Crystal structure analysis of DNA lesion repair and tolerance mechanisms.*
- [292] R. E. Johnson, C. M. Kondratick, S. Prakash, L. Prakash, *Science* **1999**, *285*, 263-265. *hRAD30 Mutations in the Variant Form of Xeroderma Pigmentosum.*
- [293] C. Masutani, et al., *Nature* **1999**, *399*, 700-704. *The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase [eta].*
- [294] R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, *Science* **1999**, *283*, 1001-1004. *Efficient Bypass of a Thymine-Thymine Dimer by Yeast DNA Polymerase, Pol η .*
- [295] M. T. Washington, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 3094-3099. *Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase η .*
- [296] R. E. Johnson, M. T. Washington, S. Prakash, L. Prakash, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7447-7450. *Fidelity of Human DNA Polymerase η .*
- [297] T. E. Anderson, M. Begg, *Br. J. Dermatol.* **1950**, *62*, 402-407. *Xeroderma pigmentosum of mild type*
- [298] T. D. Silverstein, R. Jain, R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, A. K. Aggarwal, *Structure* **2010**, *18*, 1463-1470. *Structural Basis for Error-free Replication of Oxidatively Damaged DNA by Yeast DNA Polymerase [eta].*
- [299] A. Irimia, R. L. Eoff, F. P. Guengerich, M. Egli, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22467-22480. *Structural and Functional Elucidation of the Mechanism Promoting Error-prone Synthesis by Human DNA Polymerase κ Opposite the 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine Adduct.*
- [300] B. Tudek, *J. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *36*, 12-19. *Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance.*
- [301] J. N. Patro, K. Haraguchi, M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13397-13403. *Probing the configurations of formamidopyrimidine lesions Fapy.dA and Fapy.dG in DNA using endonuclease IV.*

- [302] C. J. Wiederholt, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7278-7279. *Fapy-dG Instructs Klenow Exo- to Misincorporate Deoxyadenosine.*
- [303] 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.*
- [304] S. Shibutani, M. Takeshita, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13916-13922. *Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site. A mechanistic study of the "A rule".*
- [305] J. N. Patro, C. J. Wiederholt, Y. L. Jiang, J. C. Delaney, J. M. Essigmann, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10202-10212. *Studies on the Replication of the Ring Opened Formamidopyrimidine, Fapy-dG in Escherichia coli†.*
- [306] J. C. Delaney, J. M. Essigmann, *Methods Enzymol.* **2006**, *408*, 1-15. *Assays for determining lesion bypass efficiency and mutagenicity of site-specific DNA lesions in vivo.*
- [307] 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.*
- [308] P. L. Fischhaber, E. C. Friedberg, *DNA Repair* **2005**, *4*, 279-283. *How are specialized (low-fidelity) eukaryotic polymerases selected and switched with high-fidelity polymerases during translesion DNA synthesis?*
- [309] A. M. Cordonnier, R. P. P. Fuchs, *Mut. Res./DNA Repair* **1999**, *435*, 111-119. *Replication of damaged DNA: molecular defect in Xeroderma pigmentosum variant cells.*
- [310] M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 17-50. *Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes.*
- [311] B. M. Domínguez, 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.*
- [312] S. J. C. Taylor, et al., *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1117-1128. *Development of the biocatalytic resolution of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one as an entry to single-enantiomer carbocyclic nucleosides.*
- [313] P. G. M. W. T. W. Greene, Wiley, New York, 2nd ed., , **1991**.
- [314] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, **2006**.
- [315] W. R. Boon, W. G. M. Jones, G. R. Ramage, *J. Am. Chem. Soc. (Resumed)* **1951**, 96-102. *21. Pteridines. Part I. An unambiguous synthesis of 7 : 8-dihydro-6-hydroxypteridines.*
- [316] R. K. Robins, K. L. Dille, B. E. Christensen, *J. Org. Chem.* **1954**, *19*, 930-933. *Pyrimidines IV. The synthesis of several new chloro substituted pyrimidines.*
- [317] S. M. Greenberg, T. Masurat, E. G. Rice, J. F. Herndon, E. J. Van Loon, *Biochem. Pharmacol.* **1959**, *2*, 308-312. *The effect of chlorpromazine hydrochloride on glutamic acid decarboxylase and pyridoxal kinase in rat brain homogenates.*

- [318] W. Pigman, M. L. Wolfrom, *Advances in carbohydrate chemistry* Elsevier Science, **1948**.
- [319] L. Vertesy, et al., *J. Antibiot. (Tokyo)* **1998**, *51*, 921-928. 3874 H1 and H3, novel antifungal heptaene antibiotics produced by *Streptomyces* sp. HAG 003874.
- [320] H. Kessler, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1970**, *9*, 219-235. *Detection of Hindered Rotation and Inversion by NMR Spectroscopy*.
- [321] S. Raoul, M. Bardet, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 924-933. *Gamma irradiation of 2'-deoxyadenosine in oxygen-free aqueous solutions: identification and conformational features of formamidopyrimidine nucleoside derivatives*.
- [322] H. Kessler, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1970**, *9*, 219-235. *Detection of Hindered Rotation and Inversion by NMR Spectroscopy*.
- [323] C. Vargeese, J. Carter, J. Yegge, S. Krivjansky, A. Settle, E. Kropp, K. Peterson, W. Pieken, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1046-1050. *Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis*.
- [324] A. Sheriff, E. Motea, I. Lee, A. J. Berdis, *Biochemistry* **2008**, *47*, 8527-8537. *Mechanism and Dynamics of Translesion DNA Synthesis Catalyzed by the Escherichia coli Klenow Fragment†*.
- [325] 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*.
- [326] S. Shibutani, M. Takeshita, A. P. Grollman, *Nature* **1991**, *349*, 431-434. *Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG*.
- [327] S. Tabor, C. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 4076-4080. *Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and Escherichia coli DNA polymerase I*.
- [328] M. Münzel, L. Lercher, M. Müller, T. Carell, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e192. *Chemical discrimination between dC and 5MedC via their hydroxylamine adducts*.
- [329] M. Ronaghi, M. Uhlén, P. Nyrén, *Science* **1998**, *281*, 363-365. *A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate*.
- [330] M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlén, P. Nyrén, *Anal. Biochem.* **1996**, *242*, 84-89. *Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release*.
- [331] D. Hofreuter, et al., *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 4694-4707. *Unique Features of a Highly Pathogenic Campylobacter jejuni Strain*.
- [332] J. D. Oh, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 9999-10004. *The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis Helicobacter pylori strain: Evolution during disease progression*.
- [333] F. Cheung, B. Haas, S. Goldberg, G. May, Y. Xiao, C. Town, *BMC Genomics* **2006**, *7*, 272. *Sequencing Medicago truncatula expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology*.
- [334] R. K. Thomas, et al., *Nat. Med.* **2006**, *12*, 852-855. *Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimens by massively parallel picoliter reactor sequencing*.

- [335] C. Wang, Y. Mitsuya, B. Gharizadeh, M. Ronaghi, R. W. Shafer, *Genome Res.* **2007**, *17*, 1195-1201. *Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance.*
- [336] M. Ronaghi, M. Nygren, J. Lundeberg, P. Nyren, *Anal. Biochem.* **1999**, *267*, 65-71. *Analyses of Secondary Structures in DNA by Pyrosequencing.*
- [337] L. J. Ahmadian A, Nyren P, Uhlen M, Ronaghi M, *BioTechniques* **2000**, *28*, 140-147. *Analysis of the p53 tumor suppressor gene by pyrosequencing.*
- [338] T. Nordström, B. Gharizadeh, N. Pourmand, P. Nyren, M. Ronaghi, *Anal. Biochem.* **2001**, *292*, 266-271. *Method Enabling Fast Partial Sequencing of cDNA Clones.*
- [339] K. Uhlmann, A. Brinckmann, M. R. Toliat, H. Ritter, P. Nürnberg, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4072-4079. *Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis.*
- [340] B. Gharizadeh, M. Akhras, N. Nourizad, M. Ghaderi, K. Yasuda, P. Nyren, N. Pourmand, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 504-511. *Methodological improvements of pyrosequencing technology.*
- [341] J. Jonasson, M. Olofsson, H.-J. Monstein, *APMIS* **2002**, *110*, 263-272. *Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments.*
- [342] B. Gharizadeh, E. Norberg, J. Löffler, S. Jalal, J. Tollemar, H. Einsele, L. Klingspor, P. Nyren, *Mycoses* **2004**, *47*, 29-33. *Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing™ technology.*
- [343] B. Gharizadeh, M. Kalantari, C. A. Garcia, B. Johansson, P. Nyren, *Lab. Invest.* **0000**, *81*, 673-679. *Typing of Human Papillomavirus by Pyrosequencing.*
- [344] G. B. Ahmadian A, Gustafsson AC et al., *Nature* **2005**, *437*, 376-380. *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.*
- [345] I. H. Segel, F. Renosto, P. A. Seubert, *Methods Enzymol.* **1987**, *143*, 334-349. *Sulfate-activating enzymes.*
- [346] M. Deluca, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1976**, *44*, 37-68. *Firefly luciferase.*
- [347] M. Komoszynski, A. Wojtczak, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1310*, 233-241. *Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases.*
- [348] 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.*
- [349] M. L. Hamm, et al., *Biochemistry* **2011**, *50*, 10713-10723. *Importance of the C2, N7, and C8 Positions to the Mutagenic Potential of 8-Oxo-2'-deoxyguanosine with Two A Family Polymerases.*
- [350] S. Avkin, S. Adar, G. Blander, Z. Livneh, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 3764-3769. *Quantitative measurement of translesion replication in human cells: Evidence for bypass of abasic sites by a replicative DNA polymerase.*

- [351] S. Avkin, M. Goldsmith, S. Velasco-Miguel, N. Geacintov, E. C. Friedberg, Z. Livneh, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 53298-53305. *Quantitative Analysis of Translesion DNA Synthesis across a Benzo[a]pyrene-Guanine Adduct in Mammalian Cells.*
- [352] K. D. Carlson, M. T. Washington, *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 25, 2169-2176. *Mechanism of Efficient and Accurate Nucleotide Incorporation Opposite 7,8-Dihydro-8-Oxoguanine by Saccharomyces cerevisiae DNA Polymerase η .*
- [353] L. Haracska, S. L. Yu, R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, *Nat. Genet.* **2000**, 25, 458-461. *Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase ϵ .*
- [354] S. D. McCulloch, R. J. Kokoska, P. Garg, P. M. Burgers, T. A. Kunkel, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 2830-2840. *The efficiency and fidelity of 8-oxo-guanine bypass by DNA polymerases δ and η .*
- [355] Y. Zhang, F. Yuan, X. Wu, M. Wang, O. Rechkoblit, J.-S. Taylor, N. E. Geacintov, Z. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 4138-4146. *Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase κ in vitro.*
- [356] T. B. Petta, S. Nakajima, A. Zlatanou, E. Despras, S. Couve-Privat, A. Ishchenko, A. Sarasin, A. Yasui, P. Kannouche, *EMBO J.* **2008**, 27, 2883-2895. *Human DNA polymerase ι protects cells against oxidative stress.*
- [357] Y. Zhang, F. Yuan, X. Wu, J.-S. Taylor, Z. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 928-935. *Response of human DNA polymerase ι to DNA lesions.*
- [358] M. D. Topal, J. R. Fresco, *Nature* **1976**, 263, 285-289. *Complementary base pairing and the origin of substitution mutations.*
- [359] L. A. Lipscomb, M. E. Peek, M. L. Morningstar, S. M. Verghis, E. M. Miller, A. Rich, J. M. Essigmann, L. D. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 719-723. *X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine.*
- [360] S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeyer, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6516-6520. *Mechanism and Stem-Cell Activity of 5-Carboxycytosine Decarboxylation Determined by Isotope Tracing.*
- [361] S. Schorr, Dissertation thesis, LMU München: (Hochschulschrift (Dissertation, LMU München)), **2010**. *Replication of Bulky DNA Adducts: Replikation von sterisch anspruchsvollen DNA Addukten.*
- [362] J. C. Pieck, *Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München* **2007**.
- [363] *Die Klonierung wurde von Dr. Markus Müller durchgeführt.*
- [364] 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 fast-deprotecting phosphoramidites and ultra-mild deprotection.*
- [365] Y. Kuchino, F. Mori, H. Kasai, H. Inoue, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, S. Nishimura, *Nature* **1987**, 327, 77-79. *Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues.*

- [366] W. Kabsch, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, 26, 795-800. *Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants.*
- [367] Collaborative, *Acta Crystallogr. Sec. D* **1994**, 50, 760-763. *The CCP4 suite: programs for protein crystallography.*
- [368] P. Evans, *Newsletter on Protein Crystallography* **1997**, 33, 22-24. *Joint CCP4 and ESF-EACMB.*
- [369] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, L. C. Storoni, R. J. Read, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2005**, 61, 458-464. *Likelihood-enhanced fast translation functions.*
- [370] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, 66, 486-501. *Features and development of Coot.*
- [371] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1997**, 53, 240-255. *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.*
- [372] J. Painter, E. A. Merritt, *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, 39, 109-111. *TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models.*
- [373] P. D. Adams, et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2002**, 58, 1948-1954. *PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination.*
- [374] D. S. W. L. DeLano, San Carlos, CA., 2002.
- [375] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, 43, 2923-2925. *Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution.*
- [376] M. von Meltzer, M. Marsch, T. Carell, K. Harms, *Acta Crystallogr. Sect. E: (Wiley-Blackwell)* **2004**, 60, o2515-o2516. *(1 S,2 R,4 S,5 R)- tert-Butyl 7-oxo-3-oxa-6-azatricyclo[3.2.1.0^{>2,4}]octane-6-carboxylate.*
- [377] M. von Meltzer, M. Marsch, T. Carell, K. Harms, *Acta Crystallogr. Sect. E: (Wiley-Blackwell)* **2005**, 61, o23-o24. *(1 S,2 R,4 R,5 R)- tert-Butyl N-(4-hydroxymethyl-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-yl)carbamate.*
- [378] 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 I.*
- [379] W. R. Boon, W. G. M. Jones, G. R. Ramage, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1951**, 96-102. 21. *Pteridines. Part I. An unambiguous synthesis of 7 : 8-dihydro-6-hydroxypteridines.*
- [380] H. S. Forrest, R. Hull, H. J. Rodda, A. R. Todd, *J. Am. Chem. Soc. (Resumed)* **1951**, 3-7. 1. *Synthesis of 8-substituted pteridine derivatives.*
- [381] M. Ober, U. Linne, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 115, 5097-5101. *The Two Main DNA Lesions 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 2,6-Diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine Exhibit Strongly Different Pairing Properties.*
- [382] W. Pfeleiderer, H. Walter, *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **1964**, 677, 113-126. *Untersuchungen in der Pyrimidinreihe, XIV. Umsetzungen mit 4-Chlor- und 4-Chlor-5-nitro-pyrimidinen.*

- [383] C. Temple, B. H. Smith, J. A. Montgomery, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3141-3142. *Preparation of 2,5-diamino-4,6-dichloropyrimidine.*
- [384] O. D. L. CrysAlis CCD, Version 1.171.27p5 beta (release 01-04-2005 CrysAlis171.NET), (compiled Apr 1 2005, 17:53:34).
- [385] O. D. L. CrysAlis RED, Version 1.171.27p5 beta (release 01-04-2005 CrysAlis171.NET) (compiled Apr 1 2005, 17:53:34).
- [386] g. C. O. D. L. SCALE3 ABSPACK - An Oxford Diffraction program (1.0.4, **2005**. *An Oxford Diffraction program (1.0.4, gui:1.0.3) (C) Oxford Diffraction Ltd.*
- [387] G. M. S.-. Sheldrick, Program for Crystal Structure Solution, Universität Göttingen, **1997**. *Sheldrick, G.M. SHELXS-97, Program for Crystal Structure Solution, Universität Göttingen.*
- [388] G. M. S.-P. f. t. R. o. C. S. U. o. G. Sheldrick, Germany, **1997**. *Sheldrick, G.M. SHELXL-97. Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany.*
- [389] P. A. L. Spek, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 1999., **1999**. *A. L. Spek, PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 1999.*