

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

**Chemische Synthese und Evaluierung der biologischen Eigenschaften von
UV-induzierten DNA-Dinukleotidschäden**

Korbinian Heil
aus
Cham, Bayern

2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. T. Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Korbinian Heil, München den 18. Juni 2012

Dissertation eingereicht am: 28.06.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Zipse

Mündliche Prüfung am: 25.07.2012

Teile dieser Arbeit sind publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt worden

Publikationen

K. Haisert†, B. P. Fingerhut†, K. Heil†, A. Glas, T. T. Herzog, B. M. Pilles, W. J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 408-411.

“ Mechanism of UV-Induced Formation of Dewar Lesions in DNA”

† Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

K. Heil, A. C. Kneuttinger, S. Schneider, U. Lischke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9651-9657.

"Crystal Structures and Repair Studies Reveal the Identity and the Base Pairing Properties of the UV-induced Spore Photoproduct DNA Lesion"

K. Heil, D. Pearson, T. Carell, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4271-4278.

"Chemical investigation of light induced DNA bipyrimidine damage and repair"

D. Fazio, C. Trindler, K. Heil, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 206-212.

"Investigation of Excess-Electron Transfer in DNA Double-Duplex Systems Allows Estimation of Absolute Excess-Electron Transfer and CPD Cleavage Rates"

A. F. Glas, E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3254-3255.

"DNA (6-4) Photolyases Reduce Dewar Isomers for Isomerization into (6-4) Lesions"

A. Benjdia, K. Heil, T. R. M. Barends, T. Carell, I. Schlichting, *Nuc. Acids Res.* accepted.

“Structural insights into recognition and repair of UV-DNA damage by Spore Photoproduct Lyase, a radical SAM enzyme”

B. Fingerhut, K. Heil, E. Kaya, S. Oesterling, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 1794-1797.

“Mechanism of UV-induced Dewar lesions repair catalyzed by DNA (6-4) Photolyase“

B. Fingerhut, S. Oesterling, K. Haiser, K. Heil, A. Glas, W. Schreier, W. Zinth, T. Carell, R. de Vivie-Riedle, *J. Chem. Phys.* **2012** accepted DOI: 10.1063/1.4720090.

„ONIOM approach for non-adiabatic on-the-fly molecular dynamics demonstrated for the backbone controlled Dewar valence isomerization“

B. Fingerhut, T. T. Herzog, G. Ryseck, K. Haiser, F. F. Graupner, K. Heil, P. Gilch, W. J. Schreier, T. Carell, R. de Vivie-Riedle, W. Zinth, *New J. Phys.* accepted.

„Dynamics of UV-induced DNA lesions: Dewar formation guided by pre-tension induced by the backbone“

Konferenzbeiträge

Posterpräsentation: „*Mechanism of UV-Induced DNA Dewar-Lesions Formation Deciphered by Time Resolved Vibrational Spectroscopy.*“

Gordon Research Conference „Nucleosides, Nucleotides & Oligonucleotides“ 2011, Newport, RI, USA

Posterpräsentation: „*New Insights in UV-Lesion Repair.*“

3rd EuCheMS Chemistry Congress 2010, Nürnberg

Posterpräsentation: „*New Insights in UV-Lesion Repair.*“

International Conference of the SFB 749 2010, Kloster Irsee

Arbeitstagung „Mikromethoden in der Proteinchemie“ 2009, Martinsried

Symposium of the SFB 749 2009, Wildbad Kreuth

Internationale Konferenz „Synthesefest“ 2009, München

COST Meeting 2008, München

Danksagungen

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Thomas Carell danken. Dieser Dank begründet sich mit der sehr interessanten Themenstellung, den von ihm zur Verfügung gestellten, ausgezeichneten Arbeitsbedingungen sowie der hervorragenden wissenschaftlichen aber auch sozialen Unterstützung.

Prof. Hendrik Zipse danke ich für die Übernahme des Koreferats und für die stetige Diskussionsbereitschaft zur Radikalchemie der Sporenphotoproduktlyase.

Dr. Andreas Glas möchte ich an dieser Stelle besonders danken. Nur durch seine entscheidenden Vorarbeiten sind weite Teile dieser Arbeit überhaupt möglich gewesen. Auch Dr. Eva Bürckstümmer sei an dieser Stelle herzlich für dass von ihr geerbte, sehr fruchtbare Thema gedankt, auf welchem ich wegen ihrer Vorarbeiten schnell Erfolge erzielen konnte.

Auch bei Andrea Kneuttinger möchte ich mich bedanken. Ohne ihr Engagement und ihre Leistung würde sich meine DNA wahrscheinlich immer noch mit der B. st rumtreiben.

Dr. Sabine Schneider danke ich für die unermüdliche Geduld mit der sie mir die Proteinkristallographie beigebracht hat. Auch für Unterstützung während meiner Freizeit sie ihr hier gedankt.

Dr. Emine Kaya und Dorothea Matschkal möchte ich für die vielen Photolyasen und schönen Abende danken.

Unserem technischen Personal Kerstin Kurz, Claudia Gräf und Sabine Voß möchte ich für die Arbeit danken die mir durch sie erspart wurde und mein Doktorat hierdurch deutlich beschleunigt hat. Auch Slava Gärtner sei hier für die reibungslose Abwicklung sämtlicher organisatorischer Belange gedankt.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Danila Fazio, Dr. Benjamin Fingerhut, Prof Regina de Vivie-Riedle, Karin Haiser, Prof. Wolfgang Zinth, Dr. Alhosna Benjdia und Prof. Ilme Schlichting möchte ich für die hervorragende und ergiebige Zusammenarbeit danken.

Meinen Benchnachbarn Dr. Thomas Reissner und Veronika Reiter sowie allen anderen Mitgliedern von Labor F4.012 möchte ich für die schöne Arbeitsatmosphäre danken.

Dr. Markus Müller gebührt vielfältiger Dank. Einerseits wegen Hilfe bei biologischen Fragestellungen, Korrekturlesen, Computerfragen, Feierabendbier und andererseits für seine bedeutende Rolle in meiner Freizeit.

Dann möchte ich noch einer Reihe von Leuten u.a. Stefan Prill, Felix Gnerlich, Christian Deiml, Dr. Tim Gehrke, Benjamin Hackner, Johannes Hader, Thoma Ines, Mirko Wagner, Dr. Milan Vrabel, Dr. Malte Winnacker, Julian Willibald, Dr. Viviana Fluxa, Dr. Martin Münzel, Dr. Christian Trindler und Anika Kern danken. Diese Liste ist vermutlich unvollständig und die Gründe meines Dankes sind zu vielfältig um einzeln aufgeführt zu werden.

Meinen Praktikanten Manuel Güntner, Ufuk Borucu, Maxi Reindl, Carolin Weigl, Olesea Kosmatchev, Stefanie Bernhartzeder und Stefanie Leidner möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	1
II.	Summary	6
1.	Einleitung	11
1.1	DNA und DNA-Schäden	11
1.2	DNA-Photoschäden	13
1.2.1	Cyclobutanpyrimidindimer (CPD-Photoschäden)	14
1.2.2	Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukt ((6-4) Photoschäden)	17
1.2.3	Dewar-Valenzisomere (Dewar-Schäden)	19
1.2.4	Sporenphotoprodukt (SP)	21
1.3	Reparatur von DNA-Photoschäden	26
1.3.1	Basen-Entfernungs-Reparatur (<i>Base Excision Repair</i> , BER)	26
1.3.2	Nukleotid-Entfernungs-Reparatur (<i>Nukleotide Excision Repair</i> , NER)	27
1.3.3	Schadenstolerante Replikation (<i>TLS, Trans Lesion DNA Synthesis</i>)	28
1.3.4	Direkte Reparatur	30
1.3.4.1	Photolyasen (Lichtabhängige, direkte Reparatur)	31
1.3.4.2	Sporenphotoproduktlyase (Lichtunabhängige, direkte Reparatur)	33
2.	Aufgabenstellung	37
3.	Ergebnisse und Diskussion	38
3.1	Kokristallisation von CPD-Schäden und DNA-Polymerase η	38
3.2	Reparaturstudien mit (6-4)-Schäden und Dewar Valenzisomeren	45
3.3	Herstellung von Sporenphotoprodukt enthaltender DNA	57

3.3.1	Belichtung von Oligonukleotiden	57
3.3.2	Chemische Synthese von Sporenphotoprodukt-Analoga	59
3.4	Kokristallisation von Sporenphotoprodukt enthaltender DNA mit <i>Geobacillus stearothermophilus</i> DNA Polymerase I	64
3.5	Kokristallisation des Sporenphotoprodukts mit Sporenphotoproduktlyase	71
4.	Experimenteller Teil	83
4.1	Allgemeine Methoden	83
4.2	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	84
4.3	Oligonukleotidsynthese und Entschützung	84
4.4	<i>B. st.</i> Pol I Aufreinigung, Kristallisation und Strukturlösung	85
4.5	SPL aus <i>G. st.</i> Aufreinigung und Reparatorexperimente	85
4.6	SPL aus <i>G. thermodenitrificans.</i> Aufreinigung, Reparatorexperimente, Kristallisation und Strukturlösung	86
4.7	Herstellung von (6-4), Dewar und Sporenphotoprodukt enthaltender DNA durch Belichtung	87
4.8	(6-4)-Photolyase aus <i>D. melanogaster.</i> Aufreinigung und Reparatorexperimente	87
4.9	Synthese der Sporenphotoprodukt-Analoga	88
5.	Literaturverzeichnis	108
6.	Anhang	
6.1	Abkürzungsverzeichnis	126
6.2	Datensammlungs-, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistiken der Proteinkristallstrukturen	130

I. Zusammenfassung

UV-Strahlung gehört zu den bedeutendsten Schadquellen des Erbguts. Aus diesem Grund ist die Entstehung und Reparatur von DNA-Photoschäden seit langem Gegenstand intensiver Forschung, wobei bereits beachtliche Erfolge bei der Aufklärung der Reparaturprozesse erzielt werden konnten.

Das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) ist der häufigste DNA-UV-Schaden und am besten untersucht.^[1] So wurde einerseits seine Bildung mit hochentwickelter, Femtosekunden-UV-Spektroskopie aufgeklärt^[2] und andererseits die Reparatur durch lichtgetriebene Reparaturenzyme bzw. Photolyasen mittels Kristallstrukturanalyse^[3] untersucht. Allerdings verfügen viele Lebewesen, u.a. der Mensch, nicht über diese Photolyasen, so dass auf universelle Reparatursysteme wie die Nukleotid-Entfernungs-Reparatur (NER) zurückgegriffen werden muss.^[4] NER ist allerdings bei Schäden wie dem CPD, welche die Duplexstruktur der DNA nur geringfügig stören, nicht sehr effizient. Damit es dennoch nicht zu einem Abbruch der Replikation und damit zu einem Arrest im Zellzyklus kommt, übernimmt DNA Polymerase η die Replikation.^[5-6] Diese ist in der Lage, fehlerfrei zwei dA gegenüber dem T(CPD)T einzubauen.

Um die Gründe für dieses einzigartige Verhalten von Pol η auf molekularer Basis aufzuklären, wurde dieses Enzym zusammen mit CPD enthaltenden Oligonukleotiden kokristallisiert. Hierfür wurde ein CPD-Phosphoramidit auf der Basis der von *Butenandt et al.* veröffentlichten Synthese hergestellt^[7] und mittels automatisierter Festphasensynthese in DNA-Stränge eingebaut. DNA-Polymerase η wurde rekombinant in *E. coli* überproduziert und anschließend gereinigt. Unter geeigneten Bedingungen wurden vom zweiten Verlängerungsschritt Kristalle erhalten, welche Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von 2.9 Å beugten (Abbildung 1).

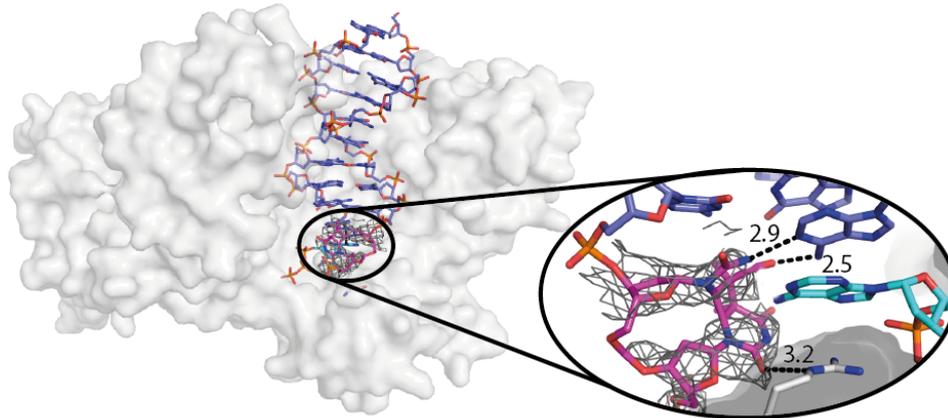


Abbildung 1: Kristallstruktur von DNA Polymerase η (grau) aus *S. cerevisiae* in Komplex mit einem CPD enthaltenden Duplex (blau). Das aktive Zentrum mit T(CPD)T (magenta), dATP (türkis), 5'-Terminus des Primers und Arg73 zusammen mit der Elektronendichte des Schadens bei 2σ ist vergrößert hervorgehoben. Distanzen sind in Å angegeben.

Auch bezüglich des Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukts und des daraus entstehenden Dewar-Valenzisomers wurden in den letzten Jahren bedeutungsvolle Erkenntnisse gewonnen. Ähnlich wie beim CPD-Schaden wurde die Entstehung, von (6-4) aus Dewar-Schäden durch zeitaufgelöste IR-Spektroskopie aufgeklärt, wozu in dieser Arbeit mit der Synthese von Modellverbindungen beigetragen wurde.^[8] Des Weiteren wurde durch die Kristallstruktur der substratgebundenen (6-4)-Photolyase^[9-10] von *Maul et al.* der bisherige Reparaturmechanismus widerlegt. Demnach sollte zunächst im aktiven Zentrum ein Oxetan gebildet und anschließend durch Elektroneninjektion gespalten werden.^[1, 11] Stattdessen geht man nun davon aus, dass ein Elektron direkt auf den Schaden transferiert wird. Ob das Heteroatom, ein Sauerstoff im Fall des T(6-4)T, konzertiert über einen oxetanartigen Übergangszustand,^[12] oder schrittweise über ein freies Wasser^[9, 13] übertragen wird, war jedoch noch nicht geklärt. Die Reparatur der Dewar-Valenzisomere war ebenfalls nur oberflächlich untersucht. So war beispielsweise bekannt, dass die (6-4)-Photolyase nur T(Dew)C und nicht T(Dew)T repariert, die mechanistischen Gründe dafür hingegen waren ungeklärt. Um diese Kenntnislücken zu schließen, wurden Studien mit Modellsubstraten sowie mit mutierten (6-4)-Photolyasen (Y423E, Y423R, Y423F, Y306F und Q299A, siehe Abbildung 2) angefertigt.

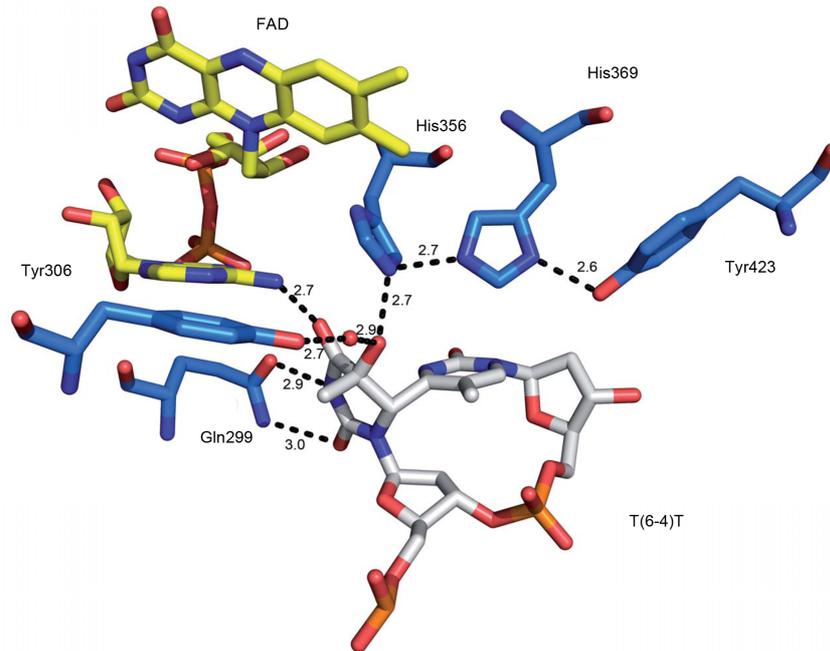


Abbildung 2: Aktives Zentrum der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* in Komplex mit T(6-4)T (3CVU). Aminosäuren sind in Blau, T(6-4)T in Grau und FAD in Gelb gezeigt. Relevante Abstände sind in Å angegeben.

Aus den Reparaturexperimenten mit den (6-4)-Photolyase-Mutanten und (6-4)-Schäden ließen sich keine eindeutigen Schlüsse zum Übertragungsmechanismus des Heteroatoms ziehen. Die Verwendung von T(6-4)^{4Nm}C lieferte jedoch durch seine stark verlangsamte Reparatur Indizien für einen zweistufigen Mechanismus, da nach Protonierung eine schlechtere Abgangsgruppe erzeugt wird als im Fall des T(6-4)C (vgl.: $pK_{NH_4^+}$: 9.2, $pK_{NH_3Me^+}$: 10.3). Bei einem über ein Oxetan- bzw. Azeridinintermediat verlaufenden Mechanismus sollte die Reaktionsgeschwindigkeit durch die erhöhte Nukleophilie des Stickstoffs hingegen beschleunigt werden.

Diese langsame Umsetzung erwies sich außerdem als hilfreich bei der Untersuchung des Mechanismus der Dewar-Reparatur. Während der Reparatur von T(Dew)^{4Nm}C akkumuliert T(6-4)^{4Nm}C, was erstmals zeigt, dass Dewar-Schäden vor der eigentlichen Reparatur zu (6-4)-Schäden umgewandelt werden. Durch Verwendung einer H365N-Mutante sowie oxidiertem FAD konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Umwandlung durch Elektroneninjektion induziert wird.

Die Ursache für die Substratspezifität der (6-4)-Photolyase bei Dewar-Schäden wurde durch die Verwendung von T(Dew)T-T(Dew)C-Hybridmolekülen aufgeklärt. Als Hauptfaktor wurde der Substituent der Dewar-Substruktur ermittelt. Eine Methylgruppe mit +I-Effekt verlangsamt die Reaktion. Der Substituent der 5'-Base zeigt einen schwächeren, umgekehrten Effekt. Hier bewirkt ein stärkerer +I-

Effekt eine leicht schnellere Reaktion. Kristallstrukturen zeigen, dass diese Effekte nicht auf sterische Hinderungen im aktiven Zentrum zurückzuführen sind und deshalb durch die elektronischen Eigenschaften der Dewar-Spezies verursacht werden. Diese Ergebnisse wurden darüber hinaus durch *ab-initio*-Rechnungen untersucht und bestätigt.

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag in der Untersuchung des Sporenphotoprodukts (SP) und dessen Reparatur durch die Sporenphotoproduktlyase.^[14] Während CPD-, (6-4)- und Dewar-Photoprodukte die Hauptmenge der DNA-UV-Schäden in Lösung stellen, wird in bakteriellen Sporen, wo die DNA dehydratisiert vorliegt, annähernd exklusiv SP gebildet.^[15-17] Bedingt durch die Bildung eines neuen Stereozentrums, welches sowohl auf der 3'- als auch der 5'-Seite denkbar ist, und den sterischen Einschränkungen in einer Duplexumgebung, können zwei verschiedene Diastereomere gebildet werden. Es ist seit langem bekannt, dass in Sporen hiervon nur eines gebildet wird.^[18] Ob es sich dabei um das *R*- oder *S*-konfigurierte Sporenphotoprodukt handelt, wird jedoch kontrovers diskutiert.^[19-22] Um dies endgültig zu klären sowie die Basenpaarungseigenschaften und die Duplexverzerrung zu untersuchen, wurde ein Sporenphotoprodukt enthaltender DNA-Duplex zusammen mit der DNA-Polymerase I aus *Geobacillus stearothermophilus* (\equiv *Bacillus stearothermophilus*, *B. st.* Pol I) kristallisiert. Zu diesem Zweck wurde die Herstellung des Sporenphotoprodukt-Phosphoramidits^[23] sowie die anschließende DNA-Festphasensynthese deutlich verbessert. Beispielsweise wurde, bezogen auf eingesetztes Phosphoramidit, die Oligonukleotidausbeute um das 6-fache gesteigert. Zusammen mit Reparaturexperimenten der Sporenphotoproduktlyase konnte so die natürliche Konfiguration eindeutig mit *5R* an der 5'-Base bestimmt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Sporenphotoprodukt, das am wenigsten verzerrende Pyrimidindimer ist und das es eine annähernd perfekte Watson-Crick-Basenpaarung zu den zwei gegenüberliegenden Adenosinen eingeht.

Um den Reparaturmechanismus der Sporenphotoproduktlyase weiter aufzuklären, wurde diese zusammen mit dem Sporenphotoprodukt als Dinukleosid kristallisiert (Abbildung 3). Hierdurch war es möglich, früheren Ergebnissen, z.B. zur Rolle von Cys140 als Wasserstoffdonor oder zur Stereospezifität, eine molekulare Grundlage zu liefern. Weiterhin konnte Tyr98 als eine für die Reparatur kritische

Aminosäure identifiziert werden. Die Position dieser Aminosäure sowie Reparaturexperimente mit Mutanten lassen eine Rolle im Radikaltransport vermuten. Zusammenfassend wurde die erste Kristallstruktur eines DNA-Reparaturenzyms aus der Radikal-SAM-Familie erhalten, welche wegweisende Erkenntnisse zum Mechanismus der Sporenphotoproduktlyase liefern konnte und somit Grundlage für weiterführende Untersuchungen sein wird.

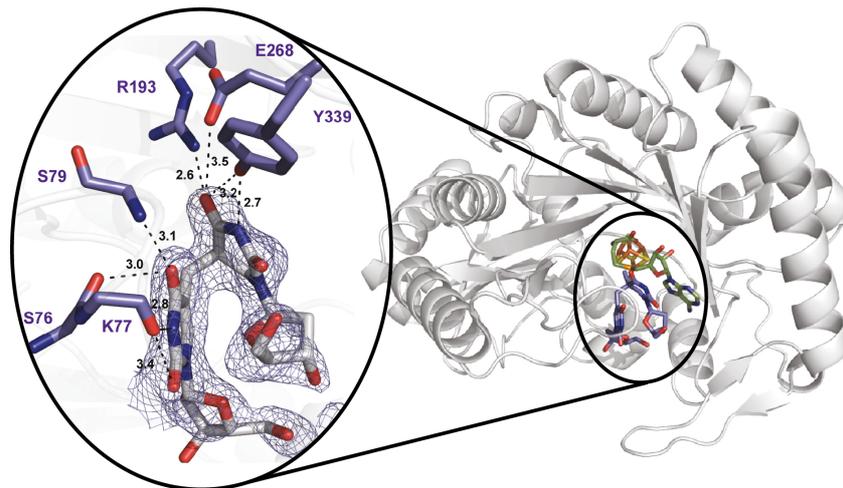


Abbildung 3: Kristallstruktur der Sporenphotoproduktlyase mit gebundenem Substrat. Das 5R SP Dinucleosid mit Elektronendichte (2.5σ) und die Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum (Aminosäuren in Blau) sind als Vergrößerung hervorgehoben. Distanzen sind in Å angegeben.

II. Summary

UV-light is one of the most important exogenous influences that harm genetic material. Formation and repair of DNA photolesions is a key objective in scientific research and important scientific insights could be gained recently.

Cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) are the most frequent and well investigated DNA UV-lesions.^[1] The formation of these lesions has, for example, been studied using sophisticated femtosecond UV-spectroscopy.^[2] Repair of the lesions by light driven repair enzymes (photolyases) has been examined using X-ray crystal structure analysis.^[3] However not all organisms, (including higher eukaryotes such as humans) are able to perform this type of repair and consequently have to use more universal repair pathways such as nucleotide excision repair (NER).^[4] However, NER is inefficient for lesions which only slightly distort the duplex structure. Therefore, if CPD lesions are still present during replication, pol η takes over to avoid stalling of the replication fork.^[5-6] This DNA polymerase is able to insert two adenosines opposite T(CPD)T.

To gain further mechanistic insight into this unique behavior, the enzyme together with CPD-containing DNA was investigated using X-ray crystallography. For this purpose, a CPD phosphoramidite was produced based on the synthesis of *Butenandt et al.*^[7] and incorporated into oligonucleotides via automated solid phase synthesis. DNA polymerase η was overproduced in *E. coli* and purified. Suitable conditions gave crystals of the second elongation step, which diffracted to 2.9 Å resolution at a synchrotron light source (Figure 1).

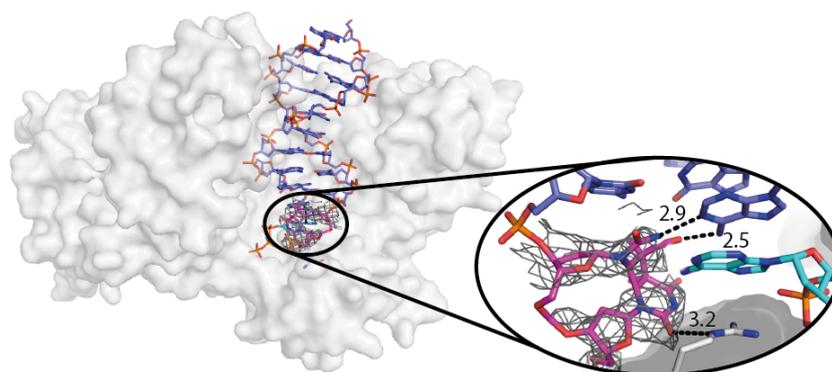


Figure 1: Crystal structure of DNA polymerase η (gray) in complex with CPD containing DNA (blue). The active side is shown magnified. The electron density of T(CPD)T (magenta) is shown at 2σ level. Distances are given in Å.

Important results were also obtained for pyrimidine–pyrimidone-(6-4)-photoproducts and their secondary products, the Dewar valence isomers. The mechanism of Dewar formation was deciphered by time resolved vibrational spectroscopy using model compounds synthesized during this thesis.^[8] Furthermore, a new repair mechanism was established based on the crystal structures of *Maul et al.*,^[9-10] involving electron injection directly to the lesion and not to a preformed oxetane as initially postulated.^[1, 11] However, it was still unclear whether the reaction proceeds concerted via an oxetane-like transition state^[12] or stepwise with formation of an intermediate water molecule.^[9, 13] The repair of Dewar lesions has also been underexplored in the past. For example the mechanistic rationale for the preference of the (6-4)-photolyase for T(Dew)C over T(Dew)T was previously unknown. To overcome this gaps in knowledge, mutant photolyases (Y423E, Y423R, Y423F, Y306F und Q299A, see Figure 2) and model compounds were studied in repair assays.

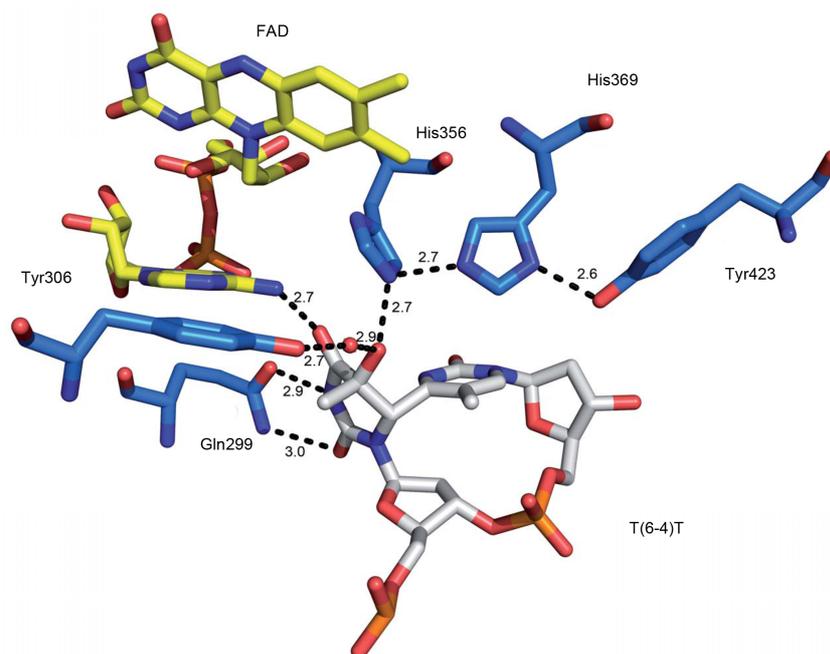


Figure 2: Active side of *D. melanogaster* (6-4)-photolyase in complex with T(6-4)T (3CVU). Amino acids are shown in blue, T(6-4)T in gray and FAD in yellow. Distances are given in Å.

The experiments performed with these mutant enzymes did not conclusively reveal the mechanism of the heteroatom transfer. However, a slowed repair rate of T(6-4)^{4Nm}C was observed, which provided strong evidence for a two-stage mechanism. Protonation of this compound results in a weaker leaving group ($pK_{\text{NH}_4^+}$: 9.2 vs. $pK_{\text{NH}_3\text{Me}^+}$: 10.3) and the enhanced nucleophilicity of the nitrogen should accelerate a reaction involving an oxetane intermediate.

Furthermore, the decreased conversion rate allowed us to clarify the repair mechanism of Dewar lesions. T(6-4)^{4Nm}C accumulates during the repair of T(Dew)^{4Nm}C, showing that this (6-4)-lesion occurs as an intermediate of the repair of Dewar lesions. Repair assays with H365N mutant photolyase together with oxidized FAD revealed that this conversion is driven by electron injection.

The specificity of the (6-4)-photolyase for T(6-4)C was clarified using T(Dew)T-T(Dew)C-hybrids in repair assays. The substituent of the Dewar substructure was identified as the main reason for this specificity, as a methyl group with stronger +I effect slows down the reaction. The substituent of the 5'-base shows a weaker but inverse effect, since in this position a stronger +I effect does accelerate repair. Crystal structures reveal that this behavior is not caused by steric hindrance in the active site. For this reason, the effects are attributed to the electronic properties of

the Dewar compounds. The obtained results were additionally investigated and confirmed by *ab initio* calculations.

The main focus of this thesis was the investigation of the spore photoproduct (SP) together with its repair by the spore photoproduct lyase.^[14] CPD, (6-4) and Dewar lesions are the main photoproducts formed in solution. In bacterial spores, with the DNA nearly in solid state, the SP is however almost exclusively formed.^[15-17] During formation of the spore photoproduct a new stereo center is created. Since the asymmetric carbon can be located either at the 3' or 5'-base of the dimer, and is constricted by the DNA duplex environment, two diastereomers can be formed. *Douki et al.* demonstrated that in nature only one of the epimers occurs.^[18] However, the exact stereochemistry of this species (*R* vs. *S*) is controversial.^[19-22] In order to unequivocally assign the stereochemistry of the spore photoproduct lesion and to investigate the pairing properties in the duplex, SP containing DNA in complex with the DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* was crystallized. For this purpose the synthesis of SP phosphoramidite together with the solid-phase DNA synthesis was significantly improved. The yield of the oligonucleotides was increased by 600 % corresponding to the phosphoramidite. These structures together with the results of repair assays reveal the configuration *R*, for the 5'-base, to be the natural configuration SP lesion. In comparison to structures of the other main UV-induced lesions (CPD, (6-4), and Dewar) the SP induces only minor structural perturbations. In the lesion, both thymines form almost perfect Watson-Crick H-bonds to the opposite adenine base pairing partners.

To get insight into the mechanism of the spore photoproduct lyase, the crystal structures of the substrate-bound enzyme from *Geobacillus thermodenitrificans* was determined at high resolution (2.2 Å, Figure 3) and biochemical characterization studies with wild type SP lyase as well as mutants were performed. With this data, earlier results such as the role of Cys140 as hydrogen donor and the stereospecificity of the hydrogen abstraction at C6 could be explained at a molecular level. In summary, the first crystal structure of an iron-sulfur cluster and *S*-adenosyl-methionine (SAM) dependent DNA repair enzyme was obtained, allowing the proposal of a detailed mechanism, paving the way for further investigations.

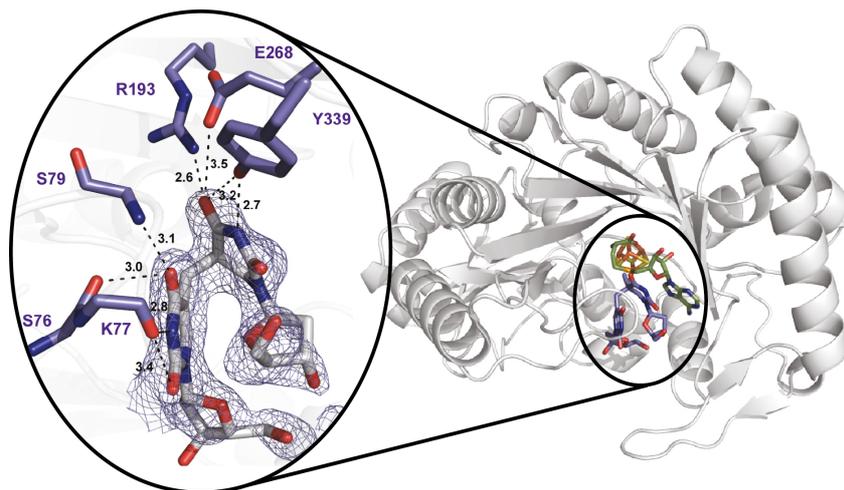


Figure 3: Crystal structure of substrate bound *G. thermodenitrificans* spore photoproduct lyase (gray, amino acids in blue). The active site is shown magnified. The electron density of the spore photoproduct dinucleoside (magenta) is shown at 2.5 σ level. Distances are given in Å.

1. Einleitung

1.1 DNA und DNA-Schäden

In allen bekannten Lebensformen wird Desoxyribonukleinsäure (DNA) zur Speicherung der genetischen Information verwendet. Die Abfolge der vier kanonischen Nucleoside 2'-Desoxyadenosin (**dA**), 2'-Desoxycytidin (**dC**), 2'-Desoxyguanosin (**dG**) und Thymin (**dT**) (Abbildung 4) kodiert hierbei die Erbinformation. Somit ist es für jedes Lebewesen essentiell, dass Struktur und Abfolge der Basen (Purine bzw. Pyrimidine), welche an einen Zucker (2'-Desoxyribose) geknüpft und über Phosphodiester verbunden sind, erhalten bleiben.

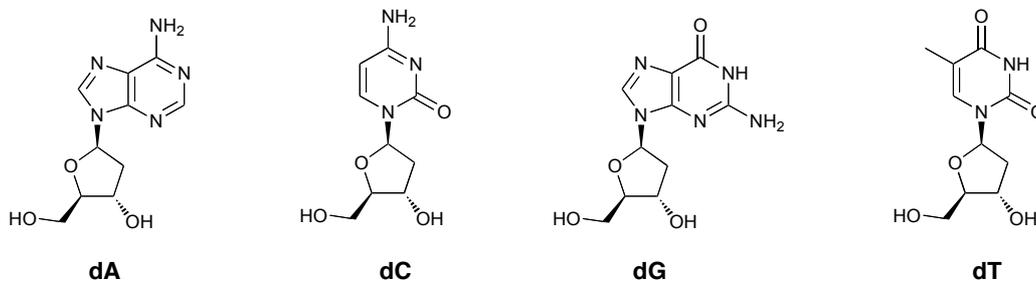


Abbildung 4: 2'-Desoxyadenosin (**dA**), 2'-Desoxycytidin (**dC**), 2'-Desoxyguanosin (**dG**) und Thymin (**dT**).

Das Erbgut ist jedoch einer Vielzahl von endogenen und exogenen Gefahren ausgesetzt. Hierbei gehen Schätzungen von bis zu 10^6 Schäden pro Tag und Zelle aus.^[24] Abhängig von der Entstehungsursache können viele verschiedene Arten von DNA-Schäden entstehen. Desaminierung von DNA-Basen, wodurch sich beispielsweise Cytosin in Uracil umwandelt, sowie fehlerhafte Methylierung durch S-Adenosylmethionin sind typische endogene Ursachen für DNA-Veränderung.

Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS = *reactive oxygen species*) können sowohl innerhalb des Körpers entstehen, z.B. in den Mitochondrien als Nebenprodukte der Zellatmung, als auch von außen, beispielsweise über Zigarettenrauch, aufgenommen werden. Diese ROS können zu oxidativen Schäden führen. Wegen seines niedrigen Oxidationspotentials reagiert dabei am häufigsten 2'-Desoxyguanosin unter Entstehung von 8-Oxo-2'-desoxyguanosin **1** (Abbildung 5) oder Formamidopyrimidin-dG.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und aromatische Amine gehören zu den rein exogenen Ursachen für DNA-Schäden, wobei sich in diesem

Fall sogenannte „bulky adducts“ also sperrige, voluminöse Schäden bilden. Nach metabolischer Aktivierung reagieren diese Amine als elektrophile Arylnitreniumionen mit nukleophilen Positionen in der DNA. Meist handelt es sich hierbei um die Aminogruppen der Purine und in besonderem Maße um die C8-Position von 2'-Desoxyguanosin, wodurch sich beispielsweise 2-Acetylaminofluoren-dG **2** (Abbildung 5) bildet.^[25-26]

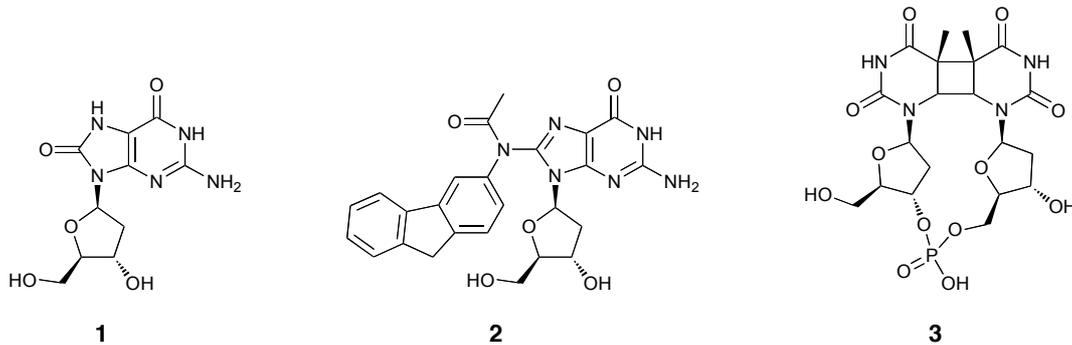


Abbildung 5: Einige häufige DNA-Schäden: 8-Oxo-2'-desoxyguanosin **1**, ein oxidativer Schaden, 2-Acetylaminofluoren-dG **2**, ein „bulky-adduct“ und das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer **3**, ein UV-Schaden.

Ionisierende Strahlung, wie sie durch den Zerfall radioaktiver Elemente entsteht, oder kosmische Hintergrundstrahlung, der man in erhöhtem Maße bei Langstreckenflügen ausgesetzt ist, kann zu Strangbrüchen sowie zu Schädigungen führen, die UV-induzierten Schäden ähneln.

UV-Strahlung, eingeteilt je nach Wellenlänge und Energiegehalt in UV-A (380-315 nm), UV-B (315-280 nm) und UV-C (280-200 nm) ist ebenfalls eine exogene Quelle für DNA-Schäden, der jeder Mensch täglich durch Sonneneinstrahlung ausgesetzt ist. Je kurzwelliger diese elektromagnetische Strahlung ist, umso schädlicher ist sie. UV-C liegt z.B. genau im Absorptionsbereich der Nucleobasen (≈ 260 nm, siehe Abbildung 6) und kann diese deshalb direkt zu Reaktionen anregen, während UV-A nur über Umwege, wie einen Photosensibilisierer, wirken kann.^[27] Glücklicherweise sind die Anteile der verschiedenen UV-Wellenlängen im Sonnenlicht umgekehrt proportional zu ihrer Schädlichkeit. Während UV-A noch in signifikanten Mengen zur Erdoberfläche durchdringt, wird der UV-B-Anteil durch Absorption in der Atmosphäre bereits beträchtlich reduziert und UV-C Strahlung erreicht die Erdoberfläche nur in minimalen Dosen (Abbildung 6). Nichtsdestotrotz gehören DNA-Photoschäden zu den häufigsten und wichtigsten Schäden, was Hautkrebs oder Krankheiten wie *Xeroderma pigmentosum* beweisen.^[4]

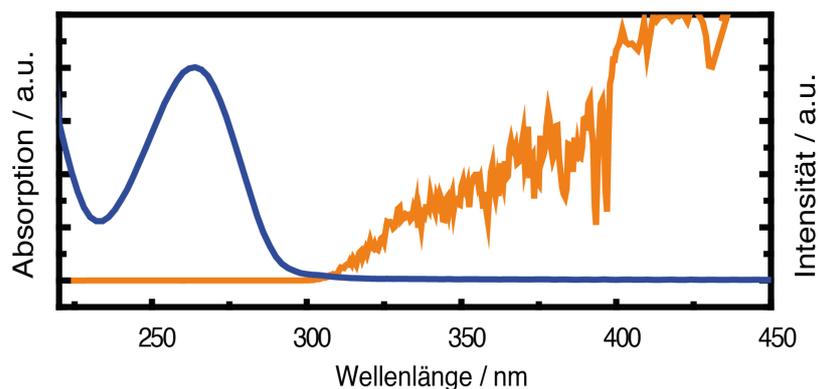


Abbildung 6: Überlagerung des Emissionsspektrums der Sonne auf Meereshöhe (orange) mit dem Absorptionsspektrum der photoreaktivsten DNA-Base Thymidin (blau).

Die Dimerisierung von Nucleobasen, wie die Reaktion zu einem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer **3** (CPD, Abbildung 5) ist sicherlich die wichtigste Reaktion von DNA, die durch UV-Licht verursacht wird, jedoch spielen auch Photohydratation und Photooxidation eine bedeutsame Rolle.^[28]

Dass die genetische Information trotz dieser vielen Schadquellen intakt bleibt, ist vor allem zwei Aspekten zu verdanken. Erstens ist Information in der DNA sehr stabil gespeichert. Die DNA ist für ein Biomolekül sehr robust,^[29] durch die doppelhelikale Struktur ist permanent eine Sicherungskopie verfügbar^[30] und die Primärstruktur ist, anders als bei z.B. Proteinen, ausreichend, um die Funktion als Datenspeicher auszuführen. Zweitens wird die DNA, wie unter 1.3 gezeigt, ununterbrochen durch Reparaturenzyme auf Fehler untersucht und gegebenenfalls instand gesetzt.

1.2 DNA-Photoschäden

Wie bereits beschrieben ist die Wechselwirkung von UV-Licht mit den Nucleobasen eine der wichtigsten Quellen für DNA-Schäden.^[28] Dabei können eine Vielzahl von Reaktionen auftreten, wobei die Dimerisierung von Pyrimidinbasen dabei die wichtigste Klasse stellt. Nachfolgend sollen die vier wichtigsten Photodimere beschrieben werden.

1.2.1 Cyclobutanpyrimidindimer (CPD-Photoschäden)

Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) sind mit 70-80 % Gesamtmenge die häufigsten von UV-Licht-induzierten DNA-Schäden. Sie entstehen durch eine $[2\pi + 2\pi]$ Cycloaddition zwischen den beiden C5=C6-Doppelbindungen von benachbarten Pyrimidinen. Prinzipiell können drei verschiedene Konfigurationsisomere (ein *cis-syn* und zwei *trans-syn*) gebildet werden. *In vivo* wird in DNA jedoch fast ausschließlich das *cis-syn*-Isomer gebildet. Dieser Umstand ist der fixierten Konformation der Basen (*anti* relativ zur glycosidischen Bindung) in einer DNA-Doppelhelix geschuldet. CPDs bilden sich zwischen allen Pyrimidinen, jedoch nicht mit derselben Wahrscheinlichkeit. Die Bildungstendenzen sind dabei $5'\text{-T(CPD)T-3'} \gg 5'\text{-T(CPD)C-3'} \geq 5'\text{-C(CPD)T-3'} > 5'\text{-C(CPD)C-3'}$.^[31-32]

Wie in NMR-Strukturen sichtbar, wird die Basenpaarung nicht stark gestört (Abbildung 7).^[33-34] Die Aufhebung der Basenparallelität führt aber dennoch zu einer Destabilisierung des Duplex um ca. $1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, da die perfekte Geometrie für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken nicht möglich ist.^[35] Ein T(CPD)T-Schaden ist nicht sehr mutagen, wobei eine T→A-Transversion an der 3'-Position die höchste Häufigkeit hat. Replikation über Cytosin-haltige CPDs ist weit fehleranfälliger. Dies ist weniger den veränderten Basenpaarungseigenschaften als vor allem dem Umstand geschuldet, dass die exozyklische Aminogruppe nicht stabil ist und innerhalb von Stunden zu Uracil-haltigen CPDs desaminiert. Dies führt bei Replikation zu einer T→A-Transversion.^[36-37] Diese erhöhte Hydrolyseempfindlichkeit im CPD ist auf den Verlust der aromatischen Stabilisierung zurückzuführen, welche durch die Sättigung der Doppelbindung verursacht wird.

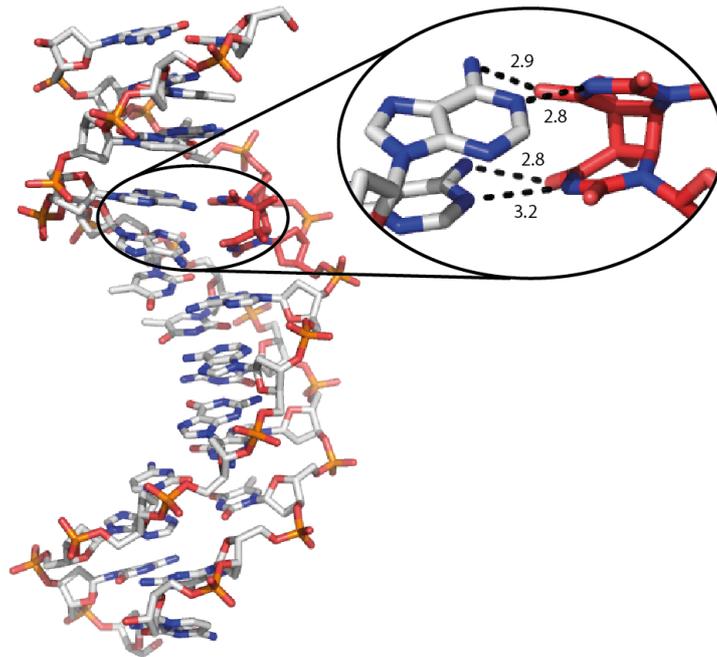


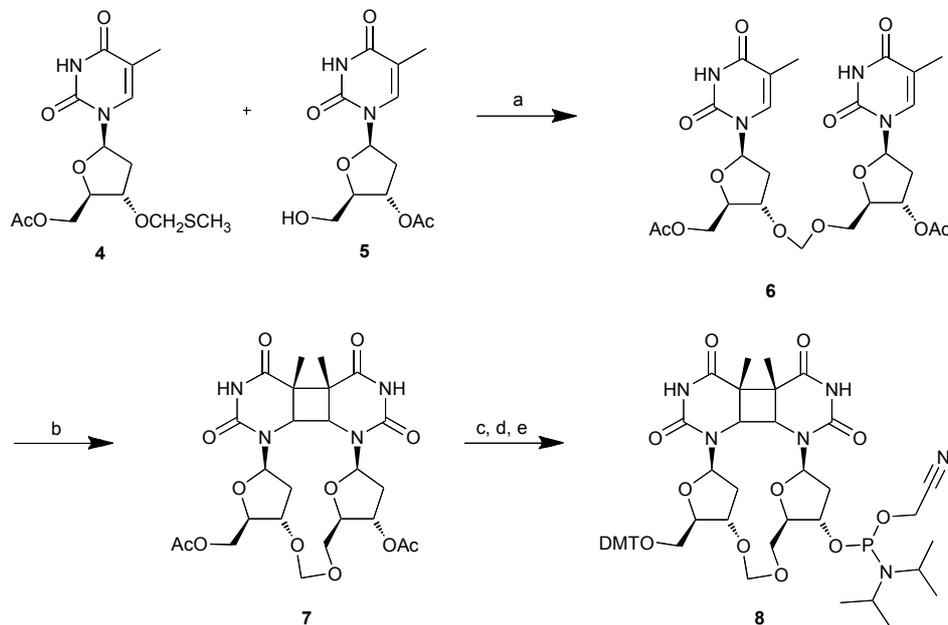
Abbildung 7: NMR-Struktur eines T(CPD)T (rot) enthaltenden Dodecamers im Stabmodell.^[33] Das T(CPD)T-ApA-Basenpaar, zusammen mit relevanten Abständen (in Å), ist vergrößert hervorgehoben.

Die erste Synthese eines T(CPD)T wurde zusammen mit dem Einbau in ein Oligonukleotid im Jahre 1987 von *Taylor et al.* veröffentlicht und basiert, genau wie spätere elegantere Wege, auf der Belichtung eines geschützten TpT-Bausteins in Anwesenheit eines Photosensitizers (Aceton oder Benzophenon).^[38-39] Auch ein *trans-syn*-Isomer wurde mittels eines vergleichbaren Ansatzes in DNA eingebaut.^[40]

Die Herstellung eines natürlichen T(CPD)T, unter Verwendung eines Phosphordiesterrückgrats, bringt allerdings einige Nachteile bei der Synthese mit sich. Die freie OH-Gruppe des Phosphats muss geschützt werden, was zu zusätzlichen Schritten für Schützung und Entschützung führt und von der Ausbildung eines weiteren Stereozentrums am Phosphor begleitet wird. Diese Epimerisierung macht wiederum eine HPLC Reinigung nach der Belichtung notwendig, da theoretisch sechs verschiedene Diastereomere entstehen können.

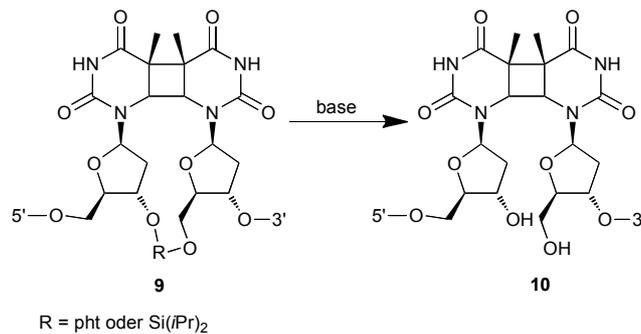
Um diese Probleme zu umgehen, wurde von *Carell* und Mitarbeitern ein CPD mit bioisosterem Formacetalrückgrat entwickelt (Schema 1).^[7] Bei dieser Synthese ist die chromatographische Reinigung überflüssig, da das Produkt **7** durch simples Waschen mit Aceton im Maßstab von mehreren Gram erhalten werden kann. Das formacetalverknüpfte U(CPD)U wurde ebenfalls unter Verwendung dieser Route synthetisiert. Dieses Analogon konnte erfolgreich in vielen biologischen

Untersuchungen eingesetzt werden, was es zu einer guten Modellverbindung macht.^[3, 41-42]



Schema 1: Synthese von T(CPD)T mit Formacetalrückgrat **8**. (a) NIS, TfOH, THF; (b) hv (150 W Hg-Lampe), Acetophenon, H₂O, Acetonitril; (c) NH₄OH, 12 h; (d) DMTCl, Pyridin, DIEA; (e) (NCCH₂CH₂O)PN(*i*-Pr)₂(Cl), DIEA, THF.

Seit *cis-syn* T(CPD)T mit Phosphatrückgrat als Phosphoramidit kommerziell erhältlich ist, haben biologische Studien an CPD-Schäden trotz der hohen Kosten beträchtlich zugenommen, was diesen UV-Schaden zum meistuntersuchten und bestverstandenen macht. Für einige Spezialfälle sind jedoch maßgeschneiderte CPD-Derivate notwendig, so dass chemische Synthese weiterhin nötig ist. Ein Beispiel für solche Derivate ist ein T(CPD)T ohne Phosphordiester zwischen den beiden Riboseeinheiten des Dinukleotides (Schema 2). Dabei wird das interne Phosphat, vor der Belichtung zum Vierring, durch eine basenlabile Gruppe, wie ein Phthalsäureester oder Diisopropylsilylgruppen, ersetzt.^[43-44] Während des simultanen Entschützens der Nucleobasen und der Abspaltung des Oligonukleotids vom Träger, wird die Rückgratgruppe hydrolysiert und das CPD wird ohne Riboseverknüpfung erhalten (Schema 2). Diese Derivate sind äußerst hilfreich, wenn es darum geht, die Reparatur von CPDs durch Photolyasen zu analysieren bzw. Elektronentransfer in DNA zu untersuchen, da die Reparatur mit einem leicht detektierbaren Strangbruch einhergeht.^[45]



Schema 2: Bildung eines T(CPD)T mit offenem Rückgrat während der basischen Abspaltung des Oligonucleotids von der festen Phase.

1.2.2 Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukt ((6-4) Photoschäden)

Die Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoschäden werden wie die CPDs durch eine $[2\pi + 2\pi]$ Cycloaddition gebildet. Anders als beim Cyclobutanpyrimidindimer reagieren nicht die beiden C=C-Doppelbindungen, sondern die C5=C6-Doppelbindung der 5'-Base bildet in einer *Paternó-Büchi*-Reaktion mit der C4-Carbonylgruppe des 3'-Thymidins einen viergliedrigen Oxetanring.^[46] Dieses Oxetan ist bei Temperaturen über -80 °C nicht stabil und zerfällt zu 5-Hydroxy-6-4'-(5'-methylpyrimid-2'-on)-dihydrothymine oder T(6-4)T.^[47] Genau wie bei den CPD-Schäden sind (6-4)-Schäden prinzipiell zwischen allen Pyrimidinen möglich, wobei die Bildungstendenzen deutlich verschoben sind. Das T(6-4)C wird am häufigsten gebildet, gefolgt vom T(6-4)T.^[48] (6-4)-Schäden mit Cytidin auf der 5'-Seite kommen zwar vor, jedoch mit drastisch verringerter Ausbeute.^[49-52] Bei den Schäden mit 3'-Cytidin erfolgt die Bildung formal aus einem Imintautomer, so dass ein Azetidin-Intermediat und kein Oxetan auftritt.

(6-4)-Schäden sind die zweithäufigsten UV-Schäden, wenn DNA mit UV-B/C bestrahlt wird.^[48] Von größerer biologischer Relevanz ist jedoch, dass, wie im nächsten Kapitel genauer beschrieben, das Dewar-Valenzisomer den (6-4)-Schaden auf den dritten Platz verdrängt, wenn mit simuliertem Sonnenlicht bestrahlt wird.^[48] Anders als bei den CPD-Schäden ist das Basenpaarungsmuster in (6-4)-Schäden stark verändert bzw. wird fast nur noch über die 5'-Komponente gewährleistet.^[53] Dieser Umstand hat nicht nur eine mit ca. 6 kcal mol^{-1} sehr hohe Destabilisierung von Duplexen zur Folge,^[35] sondern wirkt sich auch auf das Verhalten während der Replikation negativ aus. Mit 85 % T→C-Transition an der 3'-Position ist T(6-4)T nicht nur äußerst mutagen, sondern die Mutagenität ist auch bemerkenswert spezifisch.

Wie in Abbildung 8 gezeigt ist dies auf eine effizientere Paarung des 3'-Pyrimidons mit dG zurückzuführen.^[54] Das T(6-4)C ist zwar weniger mutagen, jedoch auch hier ist eine Transition beim Pyrimidon (C→T) zu beobachten.^[55]

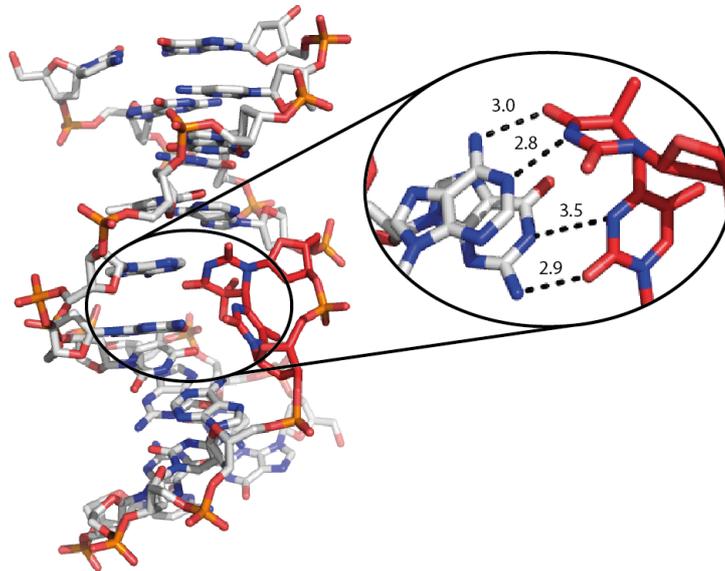


Abbildung 8: NMR-Struktur eines T(6-4)T (rot) enthaltenden Duplex im Stabmodell.^[56] Die T(6-4)T-ApG-Fehlpaarung, zusammen mit relevanten Abständen (in Å), ist vergrößert hervorgehoben.

Das erste synthetisch hergestellte T(6-4)T, das in ein Oligonukleotid eingebaut wurde, wurde von *Iwai et al.* dargestellt.^[57] Die Synthese folgt dabei in weiten Teilen der T(CPD)T Synthese.^[39] Neben diesem Baustein wurden auch das T(6-4)C^[58] und unnatürliche Derivate wie T(6-4)^{5S}T hergestellt.^[59] Modellreaktionen mit solch einem schwefelhaltigen Photoschaden deuteten auf einen Reaktionsmechanismus in der (6-4)-Photolyase hin, bei dem im Enzym ein Oxetan gebildet wird.^[59]

Auch wenn alle notwendigen Voraussetzungen gegeben sind, um die Bildung und Reparatur von (6-4)-Schäden mit synthetisch hergestellten Derivaten zu untersuchen, ist dies zeitraubend, schwierig und mit geringen Ausbeuten verbunden. Die meisten Oligonukleotide, die einen (6-4)-Schaden enthalten, werden deshalb über direkte Belichtung von DNA hergestellt. (6-4)-Schäden absorbieren, anders als andere Nucleobasen oder DNA-Schäden, im UV-A (ca. 320 nm). Durch diese Markerbande ist es möglich, (6-4)-Schäden aus komplexen Mischungen, wie sie durch die direkte Belichtung von Oligonukleotiden entstehen, mittels HPLC zu präparieren. In frühen Studien konnten nur sehr kurze Oligonukleotide, mit definierter Sequenz und Position des Schadens, auf diese Weise hergestellt werden. Durch sorgfältige Wahl der Basensequenz und optimierte, anaerobe Belichtungsbedingungen wurde diese Grenze jedoch nach oben verschoben, so dass

derzeit bis zu 18mere direkt aus dem unmodifizierten Oligonukleotid hergestellt werden können.^[10] Diese Längenbeschränkung kann jedoch durch Ligation mit anderen Oligomeren aufgehoben werden, so dass auch (6-4) enthaltende DNA von der Größe eines Plasmids produziert werden kann.^[60] Mit dieser Methode ist es selbstverständlich auch möglich, modifizierte, unnatürliche Substrate, wie sie für Modelluntersuchungen nötig sind, herzustellen.^[61]

1.2.3 Dewar-Valenzisomere (Dewar-Schäden)

Das Dewar-Valenzisomer des (6-4)-Schadens oder kürzer der Dewar-Schaden entsteht, wie der Name besagt, durch Bindungsisomerie des (6-4)-Schadens. Genau wie beim Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukt ist das C6 der 5'-Base mit dem C4 der 3'-Base verknüpft und das C5 der 5'-Base trägt ein von der 3'-Base übertragenes Heteroatom, genauer eine Hydroxylgruppe oder ein Amin. Im Dewar-Photoprodukt ist jedoch die 3'-Base kein Pyrimidon, sondern eine heterocyclische Variante des 1867 von Dewar vorgeschlagenen bicyklischen Benzols.^[62-64]

Wie bereits erwähnt absorbieren (6-4)-Schäden im UV-A (ca. 320 nm). Genau diese Anregung kann, durch eine 4π -elektrozyklische Reaktion, zur Bildung des Dewar-Valenzisomers führen. Die Quantenausbeute dieser ungewöhnlichen Bildung eines hochgespannten, anellierten Doppelvierringsystems ist dabei höher als die der CPD und (6-4)-Bildung, was sie zur effizientesten UV-induzierten Schadensbildungsreaktion macht.^[65] Die Verteilung zwischen (6-4) und Dewar spiegelt diesen Sachverhalt wieder. Während bei Bestrahlung mit UV-B keine Dewar-Schäden nachweisbar sind, ist bei UV-A enthaltendem, simuliertem Sonnenlicht das Dewar-Valenzisomer wesentlich häufiger als der (6-4)-Schaden, wobei CPDs immer die häufigsten Schäden sind.^[48, 66] Da Dewar-Schäden aus (6-4)-Photoprodukten entstehen, sind sie ebenfalls zwischen allen vier Kombinationen von Pyrimidinen möglich, wobei die Verteilung ähnlich der der (6-4)-Schäden ist.^[48]

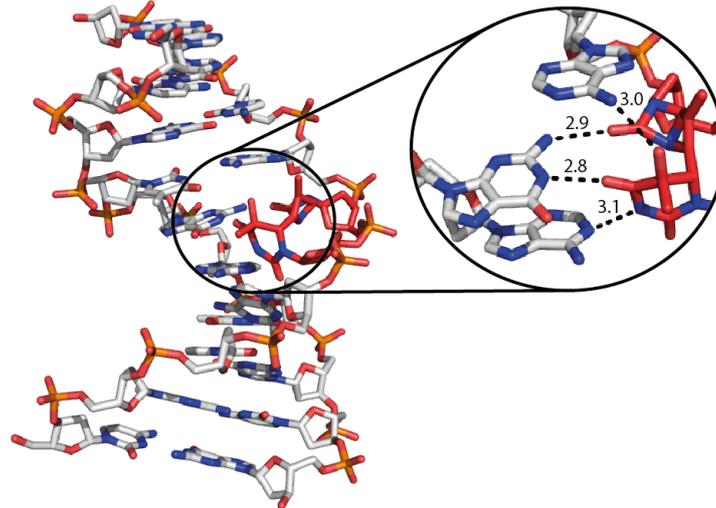


Abbildung 9: NMR-Struktur eines T(Dew)T (rot) enthaltenden Duplex im Stabmodell.^[67] Die T(Dew)T-ApG-Fehlpaarung, zusammen mit relevanten Abständen (in Å), ist vergrößert hervorgehoben.

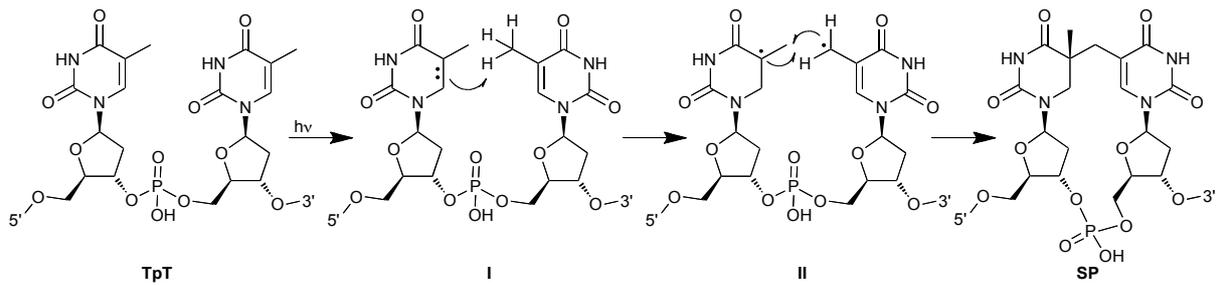
Die Basenpaarungseigenschaften ändern sich beim T(Dew)T gegenüber dem strukturell ähnlichen T(6-4)T deutlich. Ist beim (6-4)-Schaden nur eine Base an den Wasserstoffbrücken zum ApA beteiligt, binden beim Dewar die N3-Atome beider Basen die exozyklische Aminogruppe des 3'-Adenins im komplementären Strang. Bei einer mutagenen Paarung zu einem ApG ist die Situation noch komplexer (Abbildung 9).^[68] Die 5'-Base bindet beide gegenüberliegenden Basen und die 3'-Base bindet neben der gegenüberstehenden Base auch ein angrenzendes Nukleotid. Diese Änderung schlägt sich auch in der Replikation über den Schaden nieder. Dewar-Schäden haben zwar allgemein eine geringere Mutagenität als ihre Vorläufer, diese ist jedoch nicht auf die 3'-Base beschränkt und besitzt allgemein eine wesentlich geringere Spezifität, so dass alle möglichen Kombinationen aus Transition und Transversion beobachtet werden können.^[54-55, 67, 69]

Auch der Dewar-Schaden ist über Phosphoramidit-Chemie zugänglich,^[70] wobei allerdings fast alle Oligonukleotide mit Dewar-Schaden durch die effizientere Belichtung von (6-4) enthaltender DNA hergestellt werden.^[10]

1.2.4 Sporenphotoprodukt (SP)

Die Photochemie wässriger Lösungen wird, wie bereits beschrieben, von wenigen Reaktionen und den daraus folgenden Photoschäden dominiert.^[28] In bakteriellen Sporen verschiebt sich das Schadspektrum jedoch drastisch. Bei einer Strahlendosis, die für ca. 90% der Sporen letal ist, liegt der Anteil von Strangbrüchen, CPDs und (6-4)-Schäden unter 1% aller UV-induzierten DNA-Schäden.^[16-17] Als dominanter, nahezu exklusiv gebildeter Schaden tritt 5-(α -ThyminyI)-5,6-dihydrothymidin auf, das deswegen auch Sporenphotoprodukt (SP) genannt wird.^[14-15] Anders als die bisher besprochenen Bipyrimidinschäden tritt er nicht mit Cytidinen, sondern nur zwischen zwei benachbarten Thymidinen auf.

Der Mechanismus der Sporenphotoproduktbildung ist noch nicht vollständig geklärt. Der erste vorgeschlagene Mechanismus beinhaltet das Entstehen und Kombinieren von zwei Radikalen an benachbarten Thymidinen.^[71] Da die unabhängige Bildung zweier benachbarter Radikale jedoch sehr unwahrscheinlich ist, wurde von *Cadet* ein konzertierter Mechanismus unter Beteiligung der 5'-Doppelbindung und der 3'-Methylgruppe vorgeschlagen.^[72] Der neueste Vorschlag für den Mechanismus der Sporenphotoproduktbildung (Schema 3), geht wieder von zwei rekombinierenden Radikalen aus (Schema 3, II).^[73] Diesmal wird ein plausiblerer Weg zu diesen beiden Radikalen postuliert. Thymin wird durch UV-Licht, direkt oder über einen Photosensitizer, in einen elektronisch angeregten Zustand überführt, der diradikalischen Charakter besitzt (Schema 3, I). Die angeregte Doppelbindung abstrahiert von der Methylgruppe des benachbarten Thymins ein Wasserstoffatom, so dass ein stabilisiertes, benzylisches Radikal entsteht. Durch Radikalrekombination entsteht das Sporenphotoprodukt (Schema 3, **SP**). *Li* und Mitarbeiter konnten dabei durch Deuteriummarkierung zeigen, dass die Wasserstoffe der 3'-Methylgruppe selektiv auf die proS Seite des C6 wandern.^[73] Eine Norish Typ II Reaktion kann also, anders als 1999 von *Begley* vorgeschlagen,^[74] nicht in die Bildung involviert sein, da diese nicht stereoselektiv wäre.



Schema 3: Bildungsmechanismus des Sporenphotoprodukts.^[73]

Bei der Reaktion der Methylgruppe mit dem C5-Atom wird ein neues Stereozentrum gebildet. Da zwei Thymidine beteiligt sind, sind prinzipiell auch zwei verschiedene C5-Stereozentren möglich, je nachdem ob die 3'- oder 5'-Methylgruppe angreift. Auf diese Weise sind insgesamt 4 verschiedene Diastereomere möglich. Da jedoch, auch bei der ungewöhnlichen Packung von DNA in Sporen mit *small acid soluble proteins* (SASPs) und Ca-DPA (siehe nächster Absatz), davon ausgegangen werden kann, dass die DNA als Duplex und damit gepaart vorliegt, sind nur noch zwei verschiedene Diastereomere möglich. Während eine Reaktion in 5'→3'-Richtung das *R*-Sporenphotoprodukt bildet, ergibt eine Reaktion in 3'→5'-Richtung den *S* konfigurierten Schaden (Abbildung 10). *In vivo* konnte jedoch nur ein Diastereomer nachgewiesen werden.^[18] Die erste Bestimmung dieser Stereochemie wurde von *Friedel et al.* durchgeführt.^[19-20] Dafür wurde das 5*R*- und 5*S*-Sporenphotoprodukt als Dinukleosid ohne Phosphordiester synthetisiert und mit dem Reparaturenzym Sporenphotoproduktlyase behandelt, von dem bekannt ist, dass es die Sporenphotoproduktbildung umkehren kann, dies jedoch stereospezifisch nur beim natürlichen Diastereomer macht. Durch NMR-Experimente, bei denen das Phosphatrückgrat durch ein, über Metatase erzeugtes, Alkin ersetzt wurde, wurde die Konfiguration des reparierten Schadens zunächst mit 5*S* bestimmt. Neuere NMR-Studien von *Bardet* und *Broderick* mit natürlichem, phosphatverbrücktem Sporenphotoprodukt geben die Stereochemie jedoch mit 5*R* an.^[21-22] Diese Diskrepanz in der Literatur zu beseitigen war ein Teilaspekt dieser Arbeit.

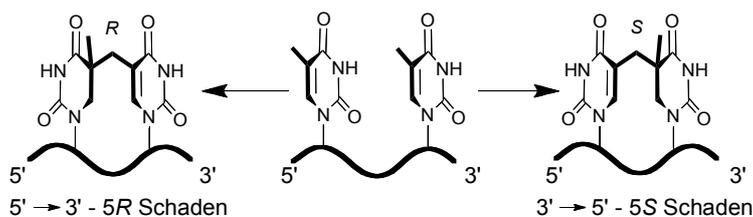


Abbildung 10: Entstehung der zwei prinzipiell möglichen SP-Diastereomere mit 5*S*- und 5*R*-Konfiguration.

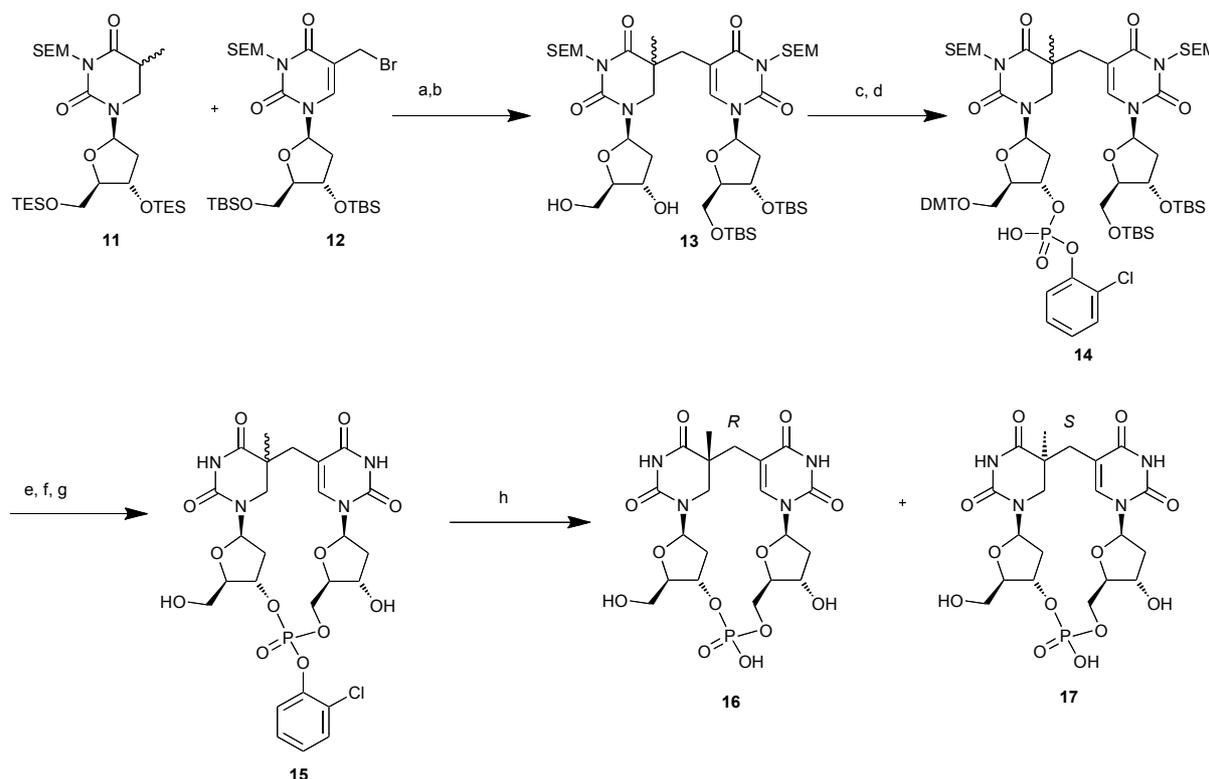
Im Gegensatz zum Mechanismus und der Stereochemie sind die Faktoren, welche die Sporenphotoprodukt-Bildung beeinflussen, äußerst gut untersucht.^[14] Ohne hier auf mindere Einflüsse wie Temperatur oder Luftdruck einzugehen, wird die veränderte Photochemie in Sporen vor allem durch drei Einflüsse gesteuert, die „kleine-säurelösliche-Sporen-Proteine“ (SASPs, *small acid-soluble spore proteins*), Dipicolinsäure und Wasser.

Unter SASP versteht man nicht ein einzelnes Protein, sondern eine Gruppe von kleinen Sporenproteinen mit um die 70 Aminosäuren. SASPs repräsentieren mit 10 % einen beträchtlichen Teil der Gesamtproteine von Sporen und mit 20 % einen noch größeren Anteil der Kernproteine. So sind genug SASP vorhanden, um die gesamte Sporen-DNA zu binden. Sie werden in α/β - und γ -SASP unterteilt, wobei letztere keinen signifikanten Einfluss auf die Photochemie haben und als Aminosäuredepot für die Keimung dienen. α/β -SASP binden unter Ausbildung von Dimeren^[75] an DNA und haben dabei zwei photochemische Auswirkungen. Sie verringern die Gesamtmenge an UV-Schäden und erhöhen gleichzeitig die Menge an SP.^[76] So steigt die SP-Bildung um 50 %, während CPD-Schäden um den Faktor 40 verringert werden.

Dipicolinsäure (DPA, *dipicolinic acid*) ist ebenfalls ein Hauptbestandteil von Sporen und macht als Calciumsalz ungefähr 15 % der Sporenmasse aus.^[77] DPA wird von der Mutterzelle während der Sporulation synthetisiert und in den Zellkern transportiert.^[78-79] In Mutanten die keine DPA produzieren können, nimmt die Menge von Sporenphotoprodukt um den Faktor 4-7 ab. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass es als Photosensitizer wirkt.^[16, 80] Diese Vermutung wird von *in-vivo*-Experimenten gestützt, in denen DPA und andere Photosensitizer wie Pyridopsoralen oder Benzophenon für die SP-Herstellung genutzt wurden.^[81-83] Ein zweiter Wirkmechanismus von Ca-DPA ist, dass durch die Einlagerung im Zellkern dessen Hydratisierungsniveau verringert wird.^[84]

Die Hydratisierung der DNA ist der letzte Hauptfaktor, der die veränderte Photochemie in Sporen bewirkt. In Sporen ist diese so weit reduziert, dass die DNA nicht mehr in Lösung, sondern als Feststoff vorliegt. Die dramatischen Auswirkungen des Hydratisierungslevels zeigen sich am eindrucksvollsten durch *in-vitro*-Experimente. Während bei der Belichtung von in Wasser gelöster Kalbthymus-DNA eine Mischung aus CPD und (6-4)-Schäden entsteht und kein SP nachgewiesen wurde, ist bei der Belichtung von DNA-Trockenfilmen das Sporenphotoprodukt in signifikanten Mengen nachweisbar.^[16, 18, 82, 85] Als Nebeneffekt nimmt außerdem die Gesamtmenge an DNA-Schäden ab. In der Summe bewirkt die veränderte Photochemie den Schutz des Erbmaterials durch eine allgemeine Verringerung der UV-Schäden und eine Bündelung dieser in einem einzigen, relativ ungefährlichen, gut reparierbaren Schaden, dem Sporenphotoprodukt.

Begley und Mitarbeiter entwickelten die erste Synthese von 5-(α -Thyminy)-5,6-dihydrothymidin (Schema 4).^[86] Der Schlüsselschritt dieser Synthese ist die Enolkupplung des Allylbromids **12** mit dem Dihydrothymidin **11**. Die Synthese ist leider nicht stereospezifisch, was eine Diastereomerentrennung durch HPLC notwendig macht.



Schema 4: Synthese des Sporenphotoprodukts als Dinucleotid. (a) LDA, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C} - 0\text{ }^\circ\text{C}$; (b) 4% HF in MeCN; (c) DMTCl, TEA, Pyridin; (d) 2-Chlorphenyl-dichlorophosphat, 1,2,4-Triazole, THF; (e) Bu_4NF , THF; (f) MSNT, Pyridin; (g) SnCl_4 , CCl_4 ; (h) NH_4OH , R.T.

Eine andere Variante, die ebenfalls von *Begley* an Thymin entwickelt und später von *Desnous et al.* auf Thymidin erweitert wurde, basiert ebenfalls auf der Enol-Chemie.^[87-88] Hier wird allerdings kein Bromid, sondern ein Aldehyd angegriffen. Da die folgende Reduktion des Alkohols an der Methylenebrücke, in Gegenwart der beiden Desoxyribosen nur schlecht gelingt, ist die erste Variante allerdings die Bessere.

Für die Kristallisation und mechanistische Studien mit Reparaturenzymen sind Oligonucleotide mit definierter Sequenz erforderlich. Deshalb wurde von *Carell* und Mitarbeitern, basierend auf den Arbeiten von *Begley*, eine Synthese für Phosphoramidite des Sporenphotoprodukts vorgestellt.^[23] Diese Substrate wurden wegen der erleichterten Synthese und Reparaturdetektion ohne Phosphordiester-rückgrat synthetisiert. Analog zu rückgratfreien CPD Substraten ist die Thymidinbildung aus SP sehr leicht durch einen Strangbruch nachweisbar.^[43] Da man zum damaligen Zeitpunkt davon ausging, dass das $3' \rightarrow 5'$ 5S-Diastereomer die natürliche Form des Sporenphotoprodukts darstellt, wurde das $3' \rightarrow 5'$ Epimerenpaar synthetisiert und in Oligonucleotide eingebaut.^[19] Mit beiden $3' \rightarrow 5'$ Epimeren wurde

in der Arbeitsgruppe *Carell* jedoch keine Reparatur beobachtet. Zu erwähnen ist auch noch, dass das Konzept des bioisosteren Ersatzes des Phosphats durch ein Formacetal erfolgreich von *Li* und Mitarbeitern auf das Sporenphotoprodukt angewandt wurde.^[89]

Neben der chemischen Totalsynthese ist die Belichtung eine Variante zur Erzeugung von Photoschäden wie dem Sporenphotoprodukt. Am natürlichen Dinukleotid wurde dies erstmals von *Fontecave* und Mitarbeitern gezeigt.^[21, 90] Auch kurze Oligonukleotide, z.B. 6mere, mit definierter Sequenz wurden auf diese Weise hergestellt.^[91] All diese Belichtungen haben jedoch äußerst schlechte Ausbeuten, so dass sie für die Herstellung größerer Mengen, wie sie z.B. für Kristallstrukturanalyse notwendig sind, nur suboptimal sind.

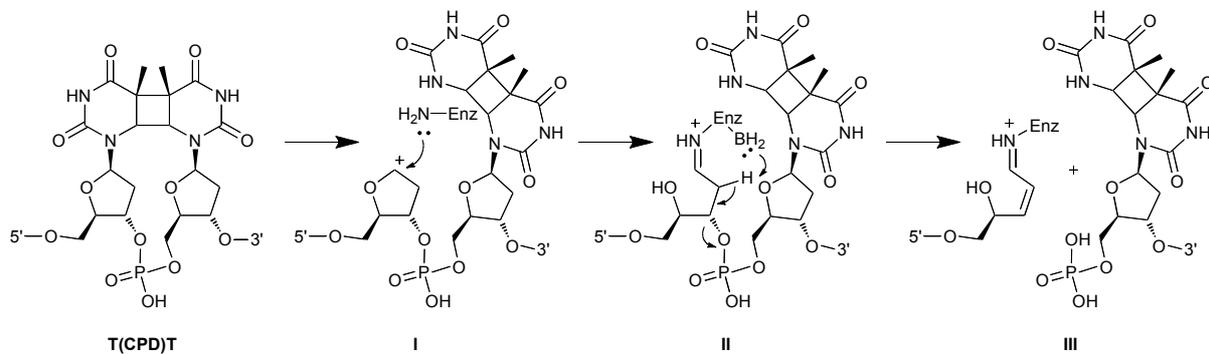
1.3 Reparatur von DNA-Photoschäden

1.3.1 Basen-Entfernungs-Reparatur (*Base Excision Repair*, BER)

BER ist ein Reparaturpfad, der sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten verwendet wird.^[92-93] Dabei wird der Schaden durch ein Enzym erkannt und dann die *N*-glykosidische Bindung zwischen Base und Ribose gespalten. Im weiteren Verlauf wird dann die abasische Stelle entfernt.^[94] Je nach dem, ob dieser Prozess von der Glykosylase selbst bewerkstelligt wird oder ein weiteres Enzym benötigt wird, spricht man von bi- oder monofunktionellen Glykosylasen. Anschließend füllt eine Polymerase die Fehlstelle auf und eine Ligase schließt die Lücke.

BER wird typischerweise mit oxidativen Schäden in Verbindung gebracht,^[95-96] jedoch sind auch Fälle von BER vermittelter Photoschadenreparatur bekannt. Die Reparatur von CPDs durch die Glykosylase Endo V aus dem T4-Phagen ist ein gut untersuchtes Beispiel hierfür.^[97] Bei der Schadenserkenung des CPD ist bemerkenswert, dass der Schaden nicht direkt mit dem Enzym interagiert. Stattdessen wird das Adenin, das gegenüber der 5'-Base des CPDs sitzt, aus der Helix herausgedreht und in einer Kavität des Proteins gebunden. Eine Aminogruppe des Enzyms greift nun die *N*-glykosidische Bindung zwischen 5'-Base und Ribose unter Ausbildung einer Schiffischen Base an (Schema 5, I). Die Existenz dieser Zwischenstufe wurde von *Golan et al.* durch chemische Fixierung mit NaBH₄ und

Kristallisation des Protein-DNA-Komplexes nachgewiesen (II).^[98] Durch eine β -Eliminierung, unter Abstraktion des 2'-proS-Protons, wird dann das Zucker-Phosphat-Rückgrat



Schema 5: Reaktionsmechanismus der T4-Endonuklease V.

1.3.2 Nukleotid-Entfernungs-Reparatur (*Nukleotide Excision Repair, NER*)

Bei der NER wird von der Natur dasselbe Grundkonzept angewandt wie bei der BER. Der DNA-Schaden wird erkannt, ausgeschnitten und die leere Stelle durch neu synthetisierte DNA ersetzt. Anders als bei der BER wird jedoch nicht eine einzelne, geschädigte Base herausgeschnitten, sondern eine größere Anzahl von Nukleotiden, ca. 10 bei Prokaryoten und 24-32 bei Eukaryoten, um den Schaden herum entfernt.^[4, 99-100] Die Anzahl der beteiligten Enzyme ist weit größer als bei der BER. So sind an der humanen NER mindestens 30 verschiedene Proteine beteiligt, von denen einige Schäden erkennen, andere die DNA entwinden oder schneiden bzw. regulatorische Funktionen haben.

Bei der NER wird zwischen zwei Untergruppen unterschieden, der Transkriptions gekoppelten Reparatur (TCR, *transcription coupled repair*) und der genomweiten Reparatur (GGR, *global genome repair*). Bei der TCR wird durch das „Hängenbleiben“ der RNA-Polymerase an dem geschädigten Templat während der Transkription die Rekrutierung weiterer NER-Enzyme initiiert, während bei der GGR eigene Proteine für die Schadenserkennung notwendig sind.^[41]

NER-Proteine sind zum Teil sehr groß, interagieren miteinander und sind ohne solche Interaktionen oft unlöslich. All dies führt dazu, dass viele Details dieses komplizierten Systems unbekannt sind, was die NER aktuell zu einem zentralen Gegenstand in der Forschung macht.^[4]

Die NER ist ein sehr universelles Werkzeug. Sie kann oxidative Schäden, sperrige Addukte und auch Photoschäden reparieren. Im Menschen, der nicht über Photolyasen verfügt, werden UV-Dimere von diesem Reparaturpfad beseitigt. (6-4)- und Dewar-Schäden werden dabei deutlich schneller prozessiert als CPDs, die aber durch TLS (*Trans Lesion DNA Synthesis*) gut toleriert werden (siehe nächstes Kapitel).^[101]

1.3.3 Schadenstolerante Replikation (TLS, *Trans Lesion DNA Synthesis*)

Wie bereits erwähnt werden UV-Dimere beim Menschen vom NER-System entfernt. Im vorangehenden Kapitel wurde auch schon angesprochen, dass dieser Prozess bei CPD-Schäden nur mit mäßiger Geschwindigkeit vonstattengeht. Geht eine Zelle mit nicht reparierten DNA-Schäden in die Teilungsphase, würde die Replikationsgabel zum Stillstand kommen oder abfallen, was zu genomischer Instabilität und somit zu Apoptose oder Krebs führen würde. Um dem entgegenzuwirken sind von den 15 Polymerasen, die in Säugetiergenomen bekannt sind, viele nicht wie eigentlich zu erwarten für die DNA-Replikation, sondern für die prozessive DNA-Reparatur und Schadenstoleranzprozesse zuständig (siehe Tabelle 1).^[102] Diese Enzyme werden deswegen auch TLS-Polymerasen (TLS = *trans lesion DNA synthesis*) oder auch Polymerasen mit geringer Genauigkeit (*low fidelity polymerases*) genannt. Zu dieser Gruppe gehören vier Polymerasen der Y-Familie (Pol η, Pol ι, Pol κ und REV1), eine aus der B-Familie (Pol ζ mit der katalytischen Untereinheit REV3L) und zwei Polymerasen der A-Familie (Pol θ und Pol ν). All diese TLS-Polymerasen besitzen keine korrekturlesende Exonukleaseaktivität und weisen spezifische Schadensumgehungseigenschaften auf, wobei die physiologische Rolle noch nicht von allen im Detail bekannt ist.^[103-104]

Tabelle 1: DNA-Polymerasen von Säugetieren.

DNA Polymerase	Größe in kDa	Funktion	Familie
Pol α	166	<i>Priming</i> für die DNA-Replikation	B
Pol δ	124	DNA-Replikation, NER, MMR	B
Pol ϵ	262	DNA-Replikation, NER, MMR	B
Pol γ	140	Mitochondriale DNA-Replikation und Reparatur	A
Pol β	38	BER und majotische Recombination	X
Pol λ	63	V(D)J-Rekombination ^[105] ; evtl. Verbindung der Enden bei nichthomologer Rekombination und BER	X
Pol μ	55	V(D)J-Rekombination ^[105] ; evtl. Verbindung der Enden bei nichthomologer Rekombination	X
TDT	58	Erzeugung von genetischer Diversität von Immunglobulinen an Knotenpunkten codierender Regionen	X
Pol ζ	353	TLS und Mutagenese	B
REV1	138	TLS und Mutagenese, Anker für andere DNA-Polymerasen	Y
Pol η	78	TLS, besonders bei CPD-Schäden	Y
Pol ι	80	TLS, Reserveenzym für UV-Schäden	Y
Pol κ	99	TLS, besonders sperrige Addukte, Reserveenzym für NER	Y
Pol θ	290	Verteidigung gegen Schäden bei ionisierender Strahlung	A
Pol ν	100	ICL-Reparatur und evtl. Hoden spezifische Funktionen	A

Auch wenn andere DNA-Polymerasen ebenfalls fähig sind DNA-Photoschäden zu überlesen, ist in diesem Kontext die Polymerase η die Interessanteste und sie ist auch die einzige Polymerase im Menschen, von der bekannt ist, dass ein Ausfall die Veranlagung für erhöhtes Krebsrisiko mit sich bringt.^[5] So wird eine Variante der Erbkrankheit *Xeroderma Pigmentosum* durch eine fehlerhafte bzw. nicht vorhandene Pol η verursacht. Diese Krankheit, die ebenfalls durch ein defektes NER-System hervorgerufen wird, bewirkt eine stark erhöhte Risiko, an Hautkrebs zu erkranken, wenn die Patienten Sonnenlicht ausgesetzt sind.^[6]

Pol η kann fehlerfrei über den häufigsten DNA-Schaden replizieren, der durch UV-Licht gebildet wird, das Cyclobutanpyrimidindimer. Diese Eigenschaft wird vor allem durch die sehr offene aktive Tasche der Polymerase erreicht, die es ihr auch ermöglicht, über andere verzerrende oder sperrige Schäden zu replizieren.^[106-107] Normale replikative Polymerasen haben eine sehr enge aktive Tasche, die eine verzerrende Quervernetzung, wie ein CPD, nicht passieren kann. Zusätzlich zu dieser eher allgemeinen Eigenschaft gibt es in Pol η noch spezifische

Wechselwirkungen (z.B. H-Brücken) zwischen dem T(CPD)T-Schaden und dATP, die den korrekten Einbau zweier Desoxyadenosine gewährleisten.^[108-109]

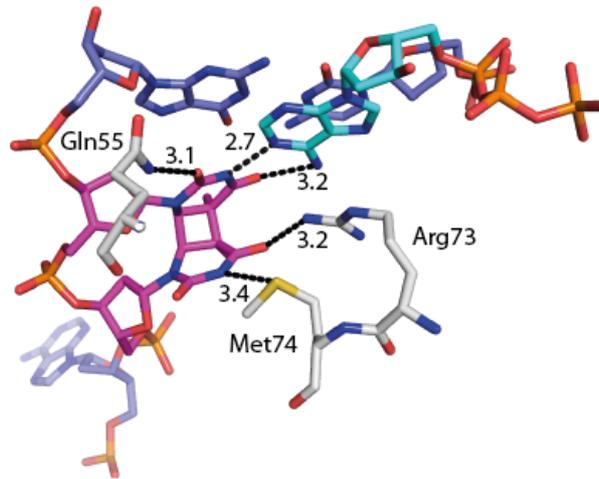


Abbildung 11: Darstellung der stabilisierenden Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von *S. cerevisiae* Pol η während der Replikation über T(CPD)T (magenta). dATP ist in türkis, Gln55, Arg73 und Met74 in grau abgebildet. Zusätzliche DNA-Reste sind in blau gezeigt. Distanzen sind in Å angegeben.^[108]

Der zweithäufigste UV-Schaden, das (6-4)-Photoprodukt, kann nicht von Pol η überlesen werden.^[110] So werden statt zweier dA ein dG eingebaut, bevor die Replikation zum Erliegen kommt.^[111] Pol ι scheint besser geeignet, die korrekten Basen gegenüber (6-4) und auch den Dewar-Schäden einzubauen,^[112] wobei angenommen wird, dass bei der Replikation zwei Polymerasen für die verschiedenen Schritte verwendet werden.^[60] Für die Verlängerung nach dem Einbau von Basen gegenüber dem Schaden kommt dabei Polymerase ζ zum Einsatz, die, da sie auch bei vielen anderen Schäden diese Funktion erfüllt, auch als „Allgemeiner Verlängerer“ (*general extender*) bezeichnet wird und als ein Hauptkontrollprotein der TLS gilt.^[111, 113-114] Die Untersuchung dieses über 3000 Aminosäuren großen Proteins, das aus mehreren Untereinheiten besteht und mit vielen anderen Proteinen interagiert, ist, obwohl sehr schwierig in der Handhabung, momentan Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen.^[102, 115]

1.3.4 Direkte Reparatur

Unter direkter Reparatur von DNA-Schäden versteht man die Umkehrreaktion der Schadensbildung, also z.B. die Spaltung von T(CPD)T zurück in zwei Thymidine. Bei

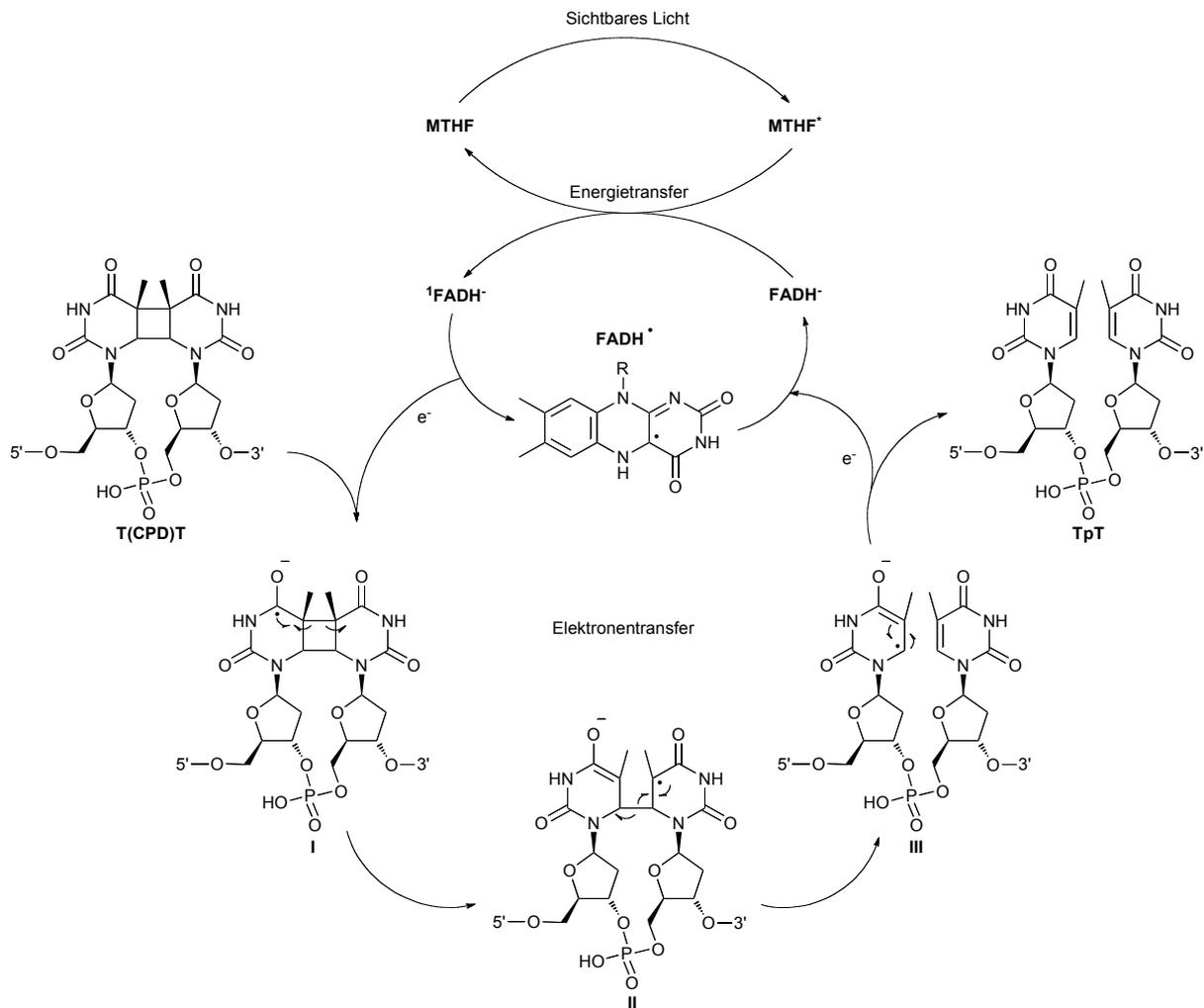
der Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden wird dabei zwischen lichtabhängigen^[1] und lichtunabhängigen^[14] Prozessen unterschieden.

1.3.4.1 Photolyasen (Lichtabhängige, direkte Reparatur)

Photolyasen sind Enzyme, die durch die Absorption von sichtbarem Licht die Umwandlung von CPD-, (6-4)- und Dewar-Schäden in die ursprünglichen Basen katalysieren. Je nach Substrat wird dabei zwischen zwei Gruppen unterschieden, den CPD- und den (6-4)/Dewar-Photolyasen. Beide Gruppen sind miteinander verwandt und auch die Lichtrezeptoren aus der Gruppe der Cryptochrome gehören zu dieser Klasse von Proteinen.^[42, 116-117]

Photolyasen sind in vielen Organismen, nicht jedoch in Säugetieren verbreitet.^[116] Beide Typen von Photolyasen haben zwischen 450 und 550 Aminosäuren und zwei nicht kovalent gebundene Kofaktoren, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und einen im sichtbaren Spektrum absorbierenden Antennenchromophor (meist Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deaza-riboflavin (8-HDF)). Das FAD ist dabei für Reparatur und DNA-Bindung essentiell, während der zweite Kofaktor die Reparatureffizienz um den Faktor 10 bis 100, je nach verwendeter Wellenlänge, steigert. Wie alle DNA-bindenden Enzyme haben sie eine positiv geladene Furche an ihrer Oberfläche, welche negativ geladene Phosphatgruppen und somit DNA bindet. Der Schaden wird in eine hydrophobe aktive Tasche gedreht, wo er durch Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Wechselwirkungen stabilisiert wird.^[3, 9]

CPD-Photolyasen sind seit langem bekannte^[118] und sehr gut untersuchte DNA-Reparaturenzyme, so dass deren Reparaturmechanismus als gesichert gilt (Schema 6).

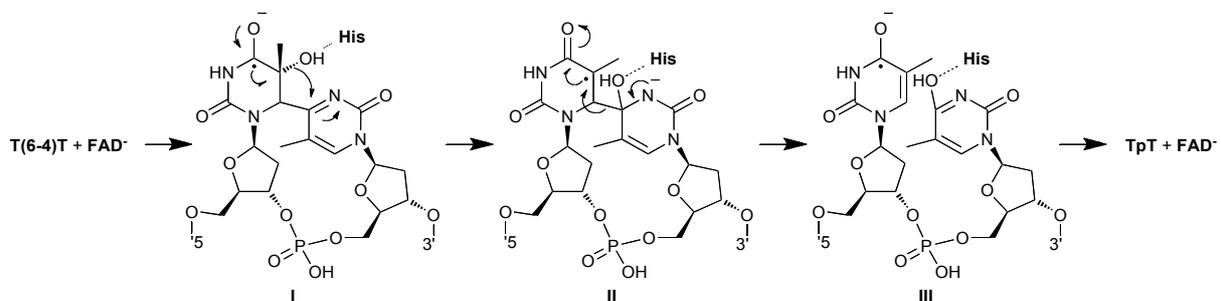


Schema 6: Reparaturmechanismus der CPD-Photolyase.

Als Erstes wird der Antennenchromophor mit sichtbarem Licht angeregt. Anschließend erfolgt ein Energietransfer durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf das reduzierte FAD⁻, welches dann ein Elektron in den CPD-Schaden injiziert (I). Das auf diese Weise entstehende CPD-Radikalanion (II) fragmentiert zu einem dT und einem Thymidin-Radikalanion (III), welches wiederum ein Elektron an das FADH-Radikal abgibt und so FADH⁻ produziert. Die ungeschädigten Basen sind wiederhergestellt und der Kofaktor ist bereit für einen neuen Katalysezyklus.

Für die (6-4)-Photolyase wurde lange Zeit von einem analogen Mechanismus ausgegangen.^[11, 119] Ein Elektron wird in einen Vierring injiziert und das Radikalanion fragmentiert in die unbeschädigten Basen. Dieser viergliedrige Ring sollte dabei das auch bei der Schadensbildung beteiligte Oxetan bzw. Aziridin sein. Da diese Heterozyklen nur bei tiefen Temperaturen stabil sind, sollten sie vor der Reparatur im Enzym von der Proteinumgebung stabilisiert werden. Nach Elektroneninjektion wäre

dann eine Fragmentierungsreaktion wie in der CPD-Photolyase möglich. Neuere Studien widersprechen jedoch diesem Mechanismus. So wird in der Kristallstruktur der (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster* kein Oxetan beobachtet^[9-10] und auch zeitaufgelöste Spektroskopie^[12] deutet auf einen Mechanismus hin, bei dem das Elektron direkt in den (6-4)-Schaden injiziert wird (Schema 7, I).^[13, 120] Nach der Injektion des Elektrons muss die Hydroxylgruppe an das C4 der 3'-Base wandern (II), entweder nach Stabilisierung und Protonierung durch ein Histidin in Form eines freien Wassermoleküls^[9] oder konzertiert unter gleichzeitiger Ausbildung der neuen und Brechen der alten Bindung^[12] mit einem oxetanartigen Übergangszustand. Durch Fragmentierung der Bindung zwischen C4 der 3'-Base und C6 der 5'-Base (III), gefolgt vom Elektronentransfer zum FAD wird die Reparatur vervollständigt.



Schema 7: Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyase.^[120]

Wie bereits erwähnt, reparieren (6-4)-Photolyasen nicht nur (6-4)-, sondern auch Dewar-Schäden,^[11] was sinnvoll ist, da die meisten (6-4)-Schäden im Sonnenlicht zum Valenzisomer umlagern.^[48] Dabei wird T(Dew)T wesentlich schlechter bzw. nicht repariert.^[10-11] Der Mechanismus dieser Reparatur sowie der Grund für die Substratspezifität waren bislang schlecht untersucht und sind deshalb Gegenstand dieser Arbeit.

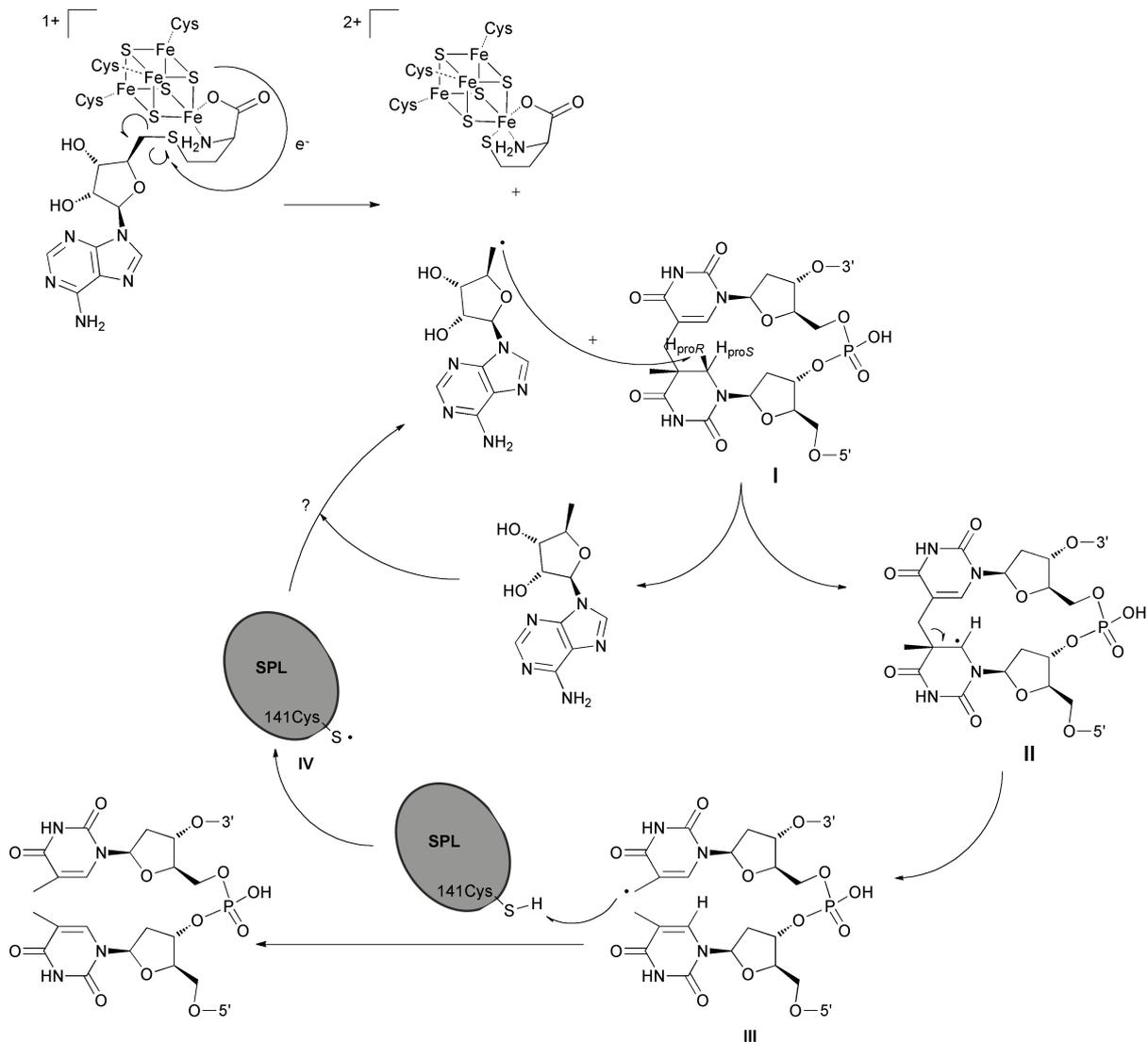
1.3.4.2 Sporenphotoproduktlyase (Lichtunabhängige, direkte Reparatur)

Neben den beschriebenen lichtabhängigen Photoproduktlyasen existiert noch ein weiteres Enzym für die direkte Reparatur von Photodimeren, die Sporenphotoproduktlyase (SPL).^[14] SPL wird während der Sporulation in Bakterien gebildet.^[121] Während der Keimung der Spore erfolgt die Reparatur der evtl.

gebildeten Sporenphotoprodukte unter Wiederherstellung der ursprünglichen TpT-Sequenz.^[122-123] Anders als die (6-4)- und CPD-Photolyasen benötigt die SPL hierfür kein Licht, sondern verwendet einen Eisen-Schwefel-Cluster sowie S-Adenosylmethionin (SAM) für die Reparatur^[124] und gehört damit zur Radikal-SAM-Enzym-Superfamilie.^[125-128] Sporenphotoproduktlyasen, die momentan von *Bacillus subtilis*,^[129] *Geobacillus stearothermophilus*^[91] und *Clostridium acetobutylicum*^[130] charakterisiert wurden, sind unwesentlich kleiner als die lichtabhängigen Photolyasen (43 kDa für *B. subtilis*)^[131] und setzen wegen des sauerstofflabilen [Fe₄S₄]-Clusters strikt anaerobe Bedingungen voraus. Zu Beginn dieser Arbeit war noch nicht klar, ob die Sporenphotoproduktlyase in ihrer nativen Form als Homodimer^[91, 132] oder als Monomer^[131] vorliegt, was jedoch im Verlauf dieser Arbeit zumindest für *Geobacillus stearothermophilus* eindeutig geklärt wurde (siehe Kapitel 3.5).

Für die Reparatur wird das Sporenphotoprodukt vom Protein erkannt, die DNA ca. 9 bp um den Schaden herum gebunden und vermutlich wie bei den lichtabhängigen Photolyasen das Dimer in eine aktive Tasche gedreht.^[122] Nach der Reduktion des Eisen-Schwefel-Clusters durch Flavodoxin, Flavodoxinreduktase und NADPH wird die Reaktion eingeleitet.^[133] Der reduzierte Cluster ([Fe₄S₄]⁺) gibt nun ein Elektron an SAM, unter Bildung von Methionin und einem hochreaktiven 5'-Desoxyadenosylradikal (5'-dA•), ab. Das gebildete 5'-dA• abstrahiert ein C6-H-Atom auf der Dihydrothymidin Seite des Schadens (Schema 8, I). Durch diastereoselektive Substitution der 6-H_{proR}- bzw. 6-H_{proS}-Atome mit Deuterium konnte gezeigt werden, dass ausschließlich das proR-Wasserstoffatom auf 5'-dA• übertragen wird.^[134] Das so entstandene C6-Radikal (II) fragmentiert nun durch Spaltung der Methylenbrücke zu einem Thymidin und einem delokalisierten Methylradikal auf der 3'-Base (III). Frühere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass das Thymidylradikal vom 5'-dA ein Wasserstoff abstrahiert, so die TpT-Sequenz wiederherstellt und durch die Regeneration von 5'-dA• den katalytischen Zyklus vollendet.^[135] Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass der Rück-Elektronen-Transfer komplizierter ist als ursprünglich vermutet. So konnte *Li* den von *Broderick* gezeigten H-Transfer von SAM auf das SP nicht reproduzieren^[134] und *Atta* und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das Cystein 141 der SPL aus *B. subtilis* für die Kontrolle des Radikals kritisch ist.^[136] Eine Substitution dieser Aminosäure durch Alanin bewirkt, dass freies Reduktionsmittel (Dithionit) mit dem Methylradikal des 3'-Thymins (III) reagiert. *Li* und

Mitarbeiter schlugen, basierend auf diesen Daten, vor, dass dieses Cystein der H-Donor für das Thymidylradikal ist (IV), wobei anschließend, evtl. unter Beteiligung weiterer Aminosäurereste, 5'-dA• wiederhergestellt wird (Schema 8).^[134]



Schema 8: Vorgeschlagener Reparaturmechanismus der Sporenphotoproduktlyase.^[134]

SAM wirkt in dem oben gezeigten Mechanismus katalytisch, ist also ein Kofaktor. Dies ist jedoch nicht unumstritten. Das Allylradikal auf der 3'-Base und auch das Thylradikal an Cys141 liegen energetisch weit unterhalb des 5'-dA•,^[137] was die Regeneration dieses Radikals thermodynamisch sehr ungünstig macht. Die Energiedifferenz muss also durch das Protein und eine angekoppelte, thermodynamisch günstige Bildung von SAM aus Methionin und 5'-dA aufgebracht werden.^[138-140] Bei Untersuchungen mit SPL aus *B. subtilis* konnten mehrere SP-Schäden mit einem Äquivalent SAM repariert werden,^[131, 134] was für eine Rolle als

Kofaktor spricht. Mit SPL aus *G. stearothermophilus* und *C. acetobutylicum* wurde dies jedoch noch nicht beobachtet. Stattdessen wurde mehr SAM zu 5⁷-dA umgesetzt als SP zu TpT.^[19, 141] Dies deutet wiederum entweder auf eine Rolle als Kosubstrat, wie in Biotin-Synthase^[142] oder auf eine substratunabhängige SAM-Spaltung hin,^[143] die von vielen Radikal-SAM-Enzymen in Gegenwart unphysiologischer Reduktionsmittel bekannt ist.

2. Aufgabenstellung

Alle Lebewesen sind im Sonnenlicht dauerhaft der Gefahr UV-induzierter DNA-Schäden ausgesetzt, welche zu Apoptose, Mutationen und Krebs führen können. CPD-, (6-4)- und Dewar-Schäden bzw. in bakteriellen Sporen das SP stellen hiervon den überwiegenden Anteil. Aus diesem Grund sollten diese Photoprodukte sowie deren Reparatur bzw. Toleranzprozesse untersucht werden.

Die Reparatur von CPD-Schäden durch Photolyasen ist weitestgehend aufgeklärt.^[1, 3, 116] Da Menschen jedoch nicht über Photolyasen verfügen, ist die fehlerfreie Replikation von DNA-Polymerase η über diesen Schaden^[144] von großem Interesse. Um tiefere Einblicke in die molekularen Grundlagen dieses einzigartigen Verhaltens zu erhalten, sollte Pol η zusammen mit CPD enthaltender DNA kristallographisch charakterisiert werden.

Im Gegensatz zu den CPD- sind die (6-4)-Photolyasen schlechter untersucht.^[1, 11] Besonders über den Mechanismus der Dewar-Reparatur war wenig bekannt. Basierend auf den seit kurzem verfügbaren Kristallstrukturen der substratgebundenen (6-4)-Photolyase^[9-10] sollten biochemische Untersuchungen mit mutiertem Enzym angefertigt werden. Des Weiteren sollten geeignete Modellverbindungen für mechanistische Untersuchungen der (6-4)- sowie Dewar-Reparatur hergestellt und in Reparatorexperimenten eingesetzt werden.

Der Hauptaspekt dieser Arbeit lag in der Untersuchung des Sporenphotoprodukts^[14-15] und dessen Reparatur durch die Sporenphotoproduktlyase.^[129] Zunächst sollten bestehende Synthesen^[20, 23, 87] verbessert werden, um große Mengen SP enthaltender DNA zur Verfügung zu haben. Die hergestellten Oligonukleotide sollten dann durch Röntgenbeugung mit *B. st.* Pol I als Kristallisationsrahmen untersucht werden. Zusammen mit Reparatorexperimenten sollte so die Stereochemie des natürlich vorkommenden SP-Diastereomers eindeutig bestimmt^[19, 21-22] und dessen Basenpaarungseigenschaften in Duplexumgebung aufgeklärt werden. Schlussendlich sollte die Kristallstruktur der Sporenphotoproduktlyase mit intakten Eisen-Schwefel-Cluster, SAM und Substrat gewonnen werden, um deren Mechanismus auf atomarer Ebene zu untersuchen. Mit dieser wären dann von sämtlichen bekannten Photoproduktlyasen Kristallstrukturen vorhanden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Kokristallisation von CPD-Schäden und DNA-Polymerase η

Wie bereits beschrieben ist die Polymerase η bei Säugetieren ein Schlüsselprotein, um mit dem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer umzugehen. Anhaltspunkte hierfür sind, dass Säugetiere nicht über die sehr effizienten Photolyasen verfügen, und dass das universelle Reparatursystem NER für diesen Schaden nicht sehr effizient ist.^[4] Die genomweite Reparatur ist nur für stark duplexverzerrende Schäden effizient, also z.B. Dewar-Schäden oder Acetylamino-fluoren-Addukte und nicht für das dem TpT relativ ähnliche T(CPD)T. Die Transkriptions gekoppelte Reparatur ist wiederum nicht auf alle Positionen der DNA anwendbar, da Transkription nur bei aktiven Genen auftritt.^[41] Durch diese Aspekte ist es für Säugetiere, um nicht im Zellzyklus zu arretieren, oft nötig, CPD-Schäden bei der Replikation zu tolerieren, wozu die replikativen Polymerasen nicht in der Lage sind.^[5-6] Pol η ist jedoch fähig fehlerfrei zwei dA gegenüber dem T(CPD)T einzubauen.

Um die Ursache für diesen bemerkenswerten Umstand aufzuklären, sollte die DNA-Polymerase η aus *Saccharomyces cerevisiae* zusammen mit CPD enthaltender DNA kristallisiert werden. Für die Kristallisationsbedingungen konnte auf die Arbeiten von *Dr. Aaron Alt* zurückgegriffen werden. Diesem gelang neben der Kristallisation von GpG-Cisplatin-schäden^[107] auch die Kristallisation eines Oligonukleotides mit einem T(CPD)T-Schaden und Pol η (Abbildung 12). Die DNA-Region um den Schaden lag jedoch nicht homogen vor und konnte deshalb mit dieser Methode nicht aufgelöst werden. Deshalb war diese Struktur für eine Aufklärung des Replikationsverhaltens bei CPD-Schäden nicht verwertbar. Sie lieferte jedoch eine gute Grundlage für weitere Verfeinerungen. Die allgemeine Struktur von Pol η mit den Motiven *Polymerase assoziierte Domäne* (PAD) sowie Finger, Handfläche und Daumen einer rechten Hand wurde bereits an anderer Stelle diskutiert,^[26, 107, 145] weshalb hier nur auf die Besonderheiten der CPD gebunden Strukturen eingegangen werden soll.

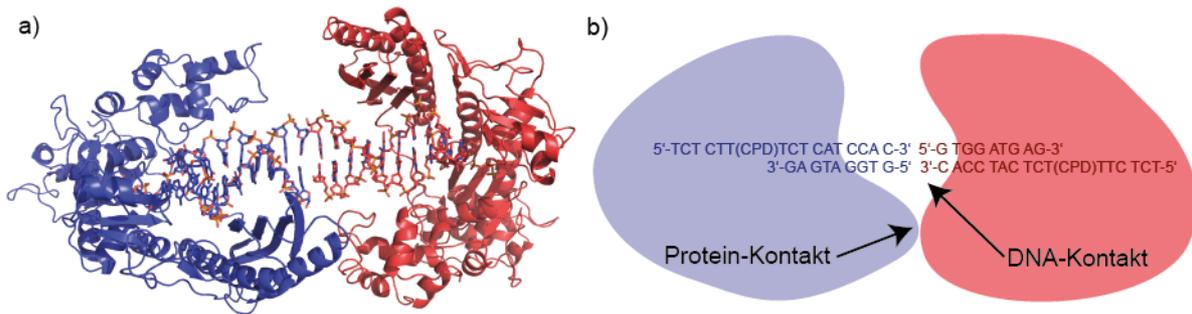


Abbildung 12: a) Abbildung der Kristallstruktur von Aaron Alt. DNA-Polymerase η aus *S. cerevisiae* in Komplex mit dem CPD enthaltenden Duplex (blau, 9mer Primer) sowie eines symmetrieverwandten Komplexes aus der nächsten Einheitszelle (rot). b) Schematische Darstellung der DNA- und Proteinkontakte.

Beim Betrachten der Kristallstruktur fallen vor allem zwei relevante Kontakte zu einem symmetrieverwandten Komplex auf (Abbildung 12a): die Stapelung der endständigen DNA-Basen sowie ein Protein-Protein-Kontakt. Insgesamt wirkt die Struktur auf eine Weise gespannt, welche die Doppelstränge ins Protein drückt. Diese Spannung könnte jedoch den Schaden aus dem aktiven Zentrum herausdrücken, was wiederum die diffuse Elektronendichte erklärt. Um diesen Druck zu vermindern, wurden verschiedene DNA-Stränge synthetisiert, welche nicht neun, sondern nur 8 bzw. 7 Basen aus dem aktiven Zentrum herausragten. Diese Anzahl an Basen entspricht auch der Länge der *primer* (Abbildung 12b).

Zur Herstellung der Oligonukleotide wurden das in der Arbeitsgruppe Carell entwickelte CPD-Phosphoramidit mit Formacetalrückgrat synthetisiert und verwendet, da bei großen synthesespezifischen Vorteilen kaum strukturelle Nachteile auftreten (siehe Kapitel 1.2.1).^[7] Die komplementären *primer* wurden unter Verwendung von 2',3'-Dideoxyphosphoramiditen mittels 5'→3' DNA-Festphasensynthese hergestellt.^[146-147] Durch die Verwendung von 2',3'-Dideoxynukleotiden hat das Enzym keine Möglichkeit, ein Desoxytriphosphat umzusetzen, wodurch der Verlängerungsschritt „eingefroren“ wird. Die Oligonukleotide wurden vor Verwendung in Kristallisationsexperimenten in Proteinlagerpuffern (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM KCl, 10 mM β -Mercaptoethanol und 10% Glycerin) hybridisiert. Überproduktion und Aufreinigung des von 632 auf 513 Aminosäuren verkürzten Proteins wurde von Dr. Claudia Chiocchini optimiert.^[107] Die fehlende C-terminale Domäne besitzt regulatorische Funktionen, welche für die Untersuchung der katalytischen Eigenschaften überflüssig sind.^[148-149] Nach der

Kristallisation mittels *hanging-drop vapor diffusion* Methode wurden Kristalle erhalten, die bis zu einer Auflösung von 2.9 Å beugten. Das Protein und die DNA lagen dabei in Proteinlagerpuffern im Verhältnis eins zu vier vor. Als Reservoirösungen wurden Mischungen aus 7 % - 16 % PEG 3350, 120 - 220 mM CaCl₂ und 100 mM dATP verwendet.^[26, 107, 145]

Die erhaltenen Kristalle zeigen durch die Verkürzung der 3'-Seite eine veränderte Symmetrie von orthogonal auf triklin, was auf einer umorganisierten Packung der Protein-DNA-Komplexe beruht (Abbildung 12). Die Stapelung der endständigen DNA-Basen zweier symmetrieverwandter Doppelstränge wurde wie erwartet aufgehoben. Es zeigte sich jedoch, dass durch das Wegfallen dieser Wechselwirkung die DNA weit inhomogener in der Polymerase gebunden wird. Dies äußerte sich wiederum in einer schlechten Auflösung des gesamten Oligonukleotids und damit auch des T(CPD)T-Schadens. Für eine Analyse des Verhaltens von DNA-Polymerase η während der Replikation über ein Cyclobutanpyrimidindimer sind Strukturen, welche auf der 3'-Seite des aktiven Zentrums kürzer als neun Basen sind, folglich nicht geeignet.

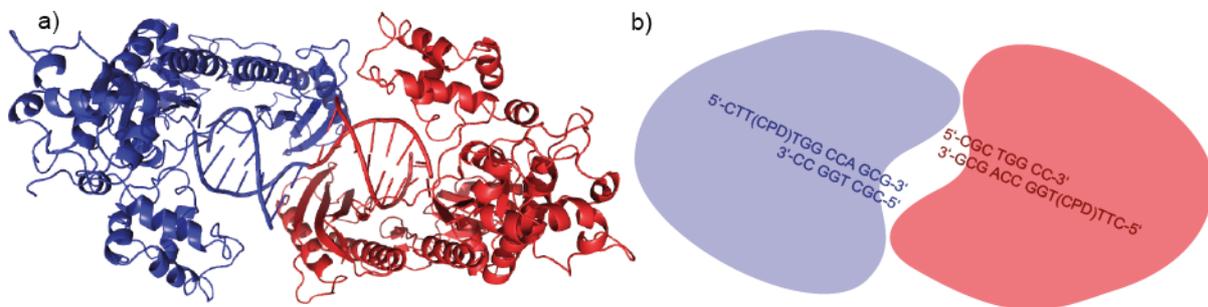


Abbildung 13: a) Darstellung der Kristallstruktur mit verkürzten *primern*. DNA-Polymerase η aus *S. cerevisiae* in Komplex mit dem CPD enthaltenden Duplex (blau, 8mer *primer*) sowie eines symmetrieverwandten Komplexes aus der nächsten Einheitszelle (rot). b) Schematische Darstellung der DNA- und Proteinkontakte.

Daraufhin wurde die Kristallisation mit verschiedenen Sequenzen, welche auf der 3'-Seite neun bis zehn Basen aus dem aktiven Zentrum herausragten, fortgesetzt. Unter Verwendung des Oligonukleotids 5'-TCTCTT(CPD)TCTCATCCAC-3' sowie des komplementären *primers* 5'-GTGGATGAGA-5' wurden Kristalle erhalten, die Röntgenstrahlung bis 2.9 Å beugten. Obwohl auch bei diesem Duplex die in Abbildung 12 gezeigte Stapelung der endständigen Nukleotide auftritt und der

Doppelstrang weiterhin gespannt aussieht, ist der CPD-Schaden dennoch erstmals weitgehend homogen und somit aufgelöst (Abbildung 14).

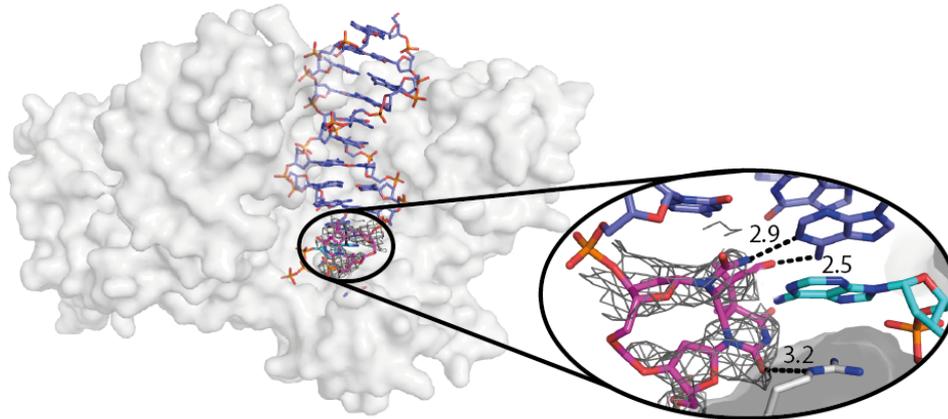


Abbildung 14: Darstellung der Kristallstruktur von DNA-Polymerase η (grau) aus *S. cerevisiae* in Komplex mit einem CPD enthaltenden Duplex (blau, 10mer *primer*). Das aktive Zentrum mit T(CPD)T (magenta), dATP (türkis), 5'-Terminus des Primers und Arg73 zusammen mit der Elektronendichte des Schadens bei 2σ ist vergrößert hervorgehoben. Distanzen sind in Å angegeben.

Die Wasserstoffbrücken auf der 5'-Base des Schadens mit dem gegenüberliegenden ddA des *primers* stimmen mit dem eines normalen dT:dA-Basenpaares sehr gut überein. Dies ist, obwohl nicht die eigentliche Basenpaarung zwischen 5'-Base des Schadens zum dATP während des Einbaus gezeigt wird, ein deutlicher Hinweis für den Mechanismus der Replikationsfähigkeit von Pol η über CPD-Schäden. Einerseits ist das aktive Zentrum offen genug, um das relativ sperrige CPD passieren zu lassen, andererseits ist die Watson-Crick-Basenpaarung voll ausgebildet, um mutagene Replikation zu vermeiden. Die PAD-Domäne gleicht durch zusätzliche DNA-Proteinwechselwirkungen die lose Bindung des Schadens im aktiven Zentrum aus (Abbildung 15a). Die H-Brücken der 3'-Base zum dATP sind hingegen so gut wie nicht ausgebildet. Stattdessen besteht eine stabilisierende Wasserstoffbrücke zu Arg73. Dieses Arginin stabilisiert zusätzlich auch das dATP durch $\pi\pi$ -Wechselwirkungen. Das geringe Maß an Wechselwirkung zwischen 3'-Base und dATP legt die Vermutung nahe, dass diese Struktur die Replikation nur teilweise beschreibt. Um den gesamten Vorgang der Replikation besser zu verstehen, sind weitere Strukturen notwendig.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zeitgleich von den Gruppen um *Satya Prakash* und *Aneel K. Aggarwal* ^[108] bzw. *Fumio Hanaoka* und *Wei Yang* ^[109] Kristallstrukturen von Oligonukleotiden mit CPD und Pol η aus *S. cerevisiae* bzw. *H. sapiens* in der Zeitschrift *Nature* veröffentlicht. Aus diesem Grund wurden die Arbeiten an Pol η eingestellt.

Bei dem von *Aggarwal* und Mitarbeitern verwendeten Enzym wurde an Position 140 ein Lysin in Alanin und an 144 das Serin in Tryptophan mutiert.^[108] Auf diese Weise wurden Protein-Protein-Kontakte aufgelöst, die im Vergleich zur Kristallstruktur der Wildtyp Pol η zu einer Bewegung der PAD-Domäne um 11 Å zur DNA hinführten (Abbildung 15). In dieser Position interagiert die PAD-Domäne deutlich stärker mit dem Duplex. Die DNA ist stärker fixiert, wodurch zusätzlich zu einer ebenfalls sichtbaren Wechselwirkung mit Arg73 eine Interaktion mit Gln55 und Met74 zutage tritt. Da der *primer* vor dem Schaden endet, liegt das dATP gegenüber der 5'-Base des T(CPD)T, zu der es eine Watson-Crick-Basenpaarung ausbildet. Das einzubauende dATP wird, wie im Wildtyp Enzym, durch π -Stapelung mit Arg73 stabilisiert.

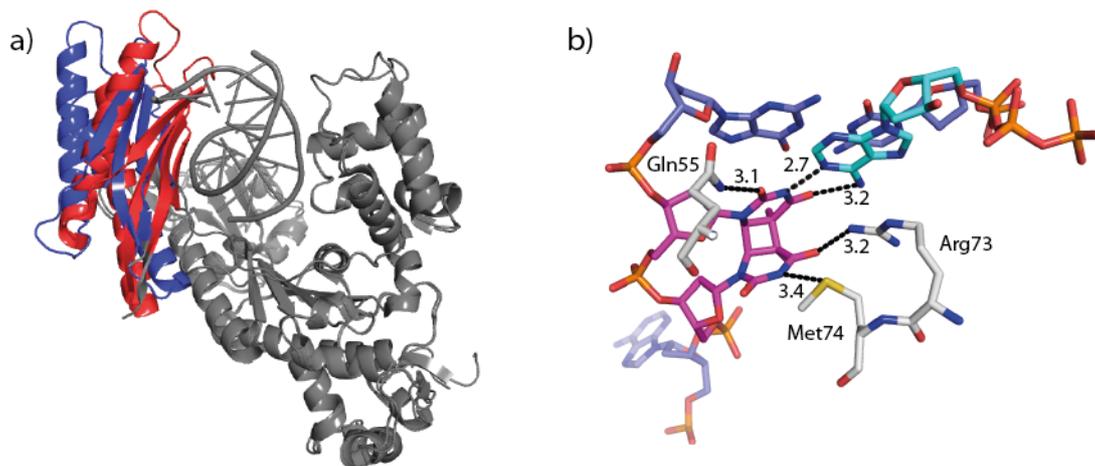


Abbildung 15: a) Überlagerung der Kristallstrukturen des Wildtyps (grau, PAD in Blau) und der K140A-S144W Pol η (grau, PAD in Rot) aus *S. cerevisiae* in Komplex mit einem CPD enthaltenden Duplex. b) Aktives Zentrum der K140A-S144W Mutante mit T(CPD)T (magenta), dATP (türkis), Gln55, Arg73 und Met74. Zusätzliche DNA-Reste sind in Blau gezeigt. Distanzen sind in Å angegeben.

In der Publikation von *Yang* und Mitarbeitern wird ein ganzes Set von Kristallstrukturen der humanen Pol η gezeigt (Abbildung 16).^[109] Neben der Struktur mit ungeschädigter DNA wird sowohl der Einbau von dATP gegenüber der 3'-, als auch der 5'-Base des CPD-Schadens gezeigt. Auch von einigen

Verlängerungsschritten jenseits des Schadens werden strukturelle Informationen geliefert. Wie in der Hefe-Polymerase bilden ein Glutamin (Gln38) und ein Arginin (Arg61) Wasserstoffbrücken zum CPD-Schaden aus. Die PAD-Domäne bindet wieder die DNA, um so die fehlende Stabilität des relativ weiten aktiven Zentrums auszugleichen (Abbildung 16a). Anders als bei *S. cerevisiae* ist jedoch kein Methionin an der Bindung des CPD-Schadens beteiligt. Die Wirkungsweise von Arg61, welches äquivalent zu Arg73 in Hefe ist, ist besonders hervorzuheben. Während des Einbaus von dATP gegenüber der 3'-CPD-Base, geht Arg61 eine Wasserstoffbrücke mit der C2 Carbonylgruppe der 5'-Base ein (Abbildung 16b). Hierdurch wird die Aminosäure unter das Triphosphat bewegt, was dieses durch $\pi\pi$ -Wechselwirkungen weiter stabilisiert. Bei den anderen Verlängerungsschritten ist diese Stabilisierung nicht vorhanden, was die besondere Substratspezifität von Pol η für T(CPD)T zeigt. Beim ersten kritischen Einbau greift Arg61 stabilisierend ein, da ansonsten die 5'-Seite ungebunden wäre.

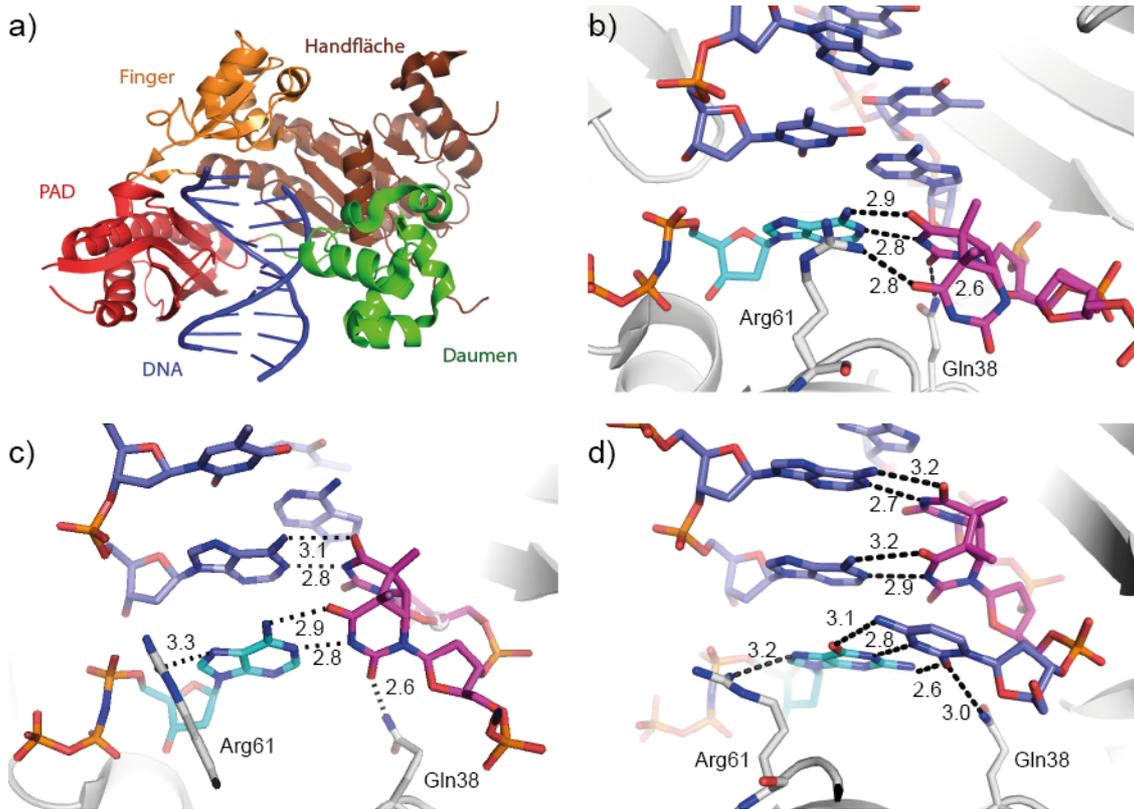


Abbildung 16: Kristallstrukturen der humanen DNA-Polymerase η und T(CPD)T enthaltenden Oligonukleotiden. a) Darstellung der verschiedenen Domänen von Pol η . b-d) Aktives Zentrum der humanen Pol η (grau) mit T(CPD)T (magenta), dATP (türkis), Gln38 und Arg61. Zusätzliche DNA-Reste sind in Blau gezeigt. Distanzen sind in Å angegeben. b) dATP-Einbau gegenüber der 3'-CPD-Base. c) dATP-Einbau gegenüber der 5'-CPD-Base. d) dGTP-Einbau hinter dem CPD-Schaden.

Die Haupteigenschaft ist bei der in dieser Arbeit vorgestellten sowie bei den von *Yang* bzw. *Aggerwal* publizierten Strukturen dieselbe. Ein weites aktives Zentrum ermöglicht es dem relativ großen CPD, das Enzym entlang des Substratkanals zu passieren. Die PAD-Domäne gleicht durch zusätzliche DNA-Proteinwechselwirkungen die lose Bindung im aktiven Zentrum aus. Einzelne Aminosäuren, vor allem Arg73 (*S. cerevisiae*) bzw. Arg61 (human), unterstützen durch Wasserstoffbrücken die CPD- und durch π -Wechselwirkungen die dATP-Bindung. Vor allem die Strukturen von *Yang* und Mitarbeitern sind hervorzuheben,^[109] weil sie von dem interessanteren, humanen Enzym alle relevanten Schritte zeigen und deshalb ein detailliertes Bild der TLS des Menschen ermöglichen.

3.2 Reparaturstudien mit (6-4)-Schäden und Dewar Valenzisomeren

Das Verständnis der Reparatur von Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukten durch die (6-4)-Photolyasen hat in den letzten Jahren deutliche Fortschritte gemacht.^[9-10, 12-13] Es konnte gezeigt werden, dass der von *Sancar* und Mitarbeitern vorgeschlagene Mechanismus nicht korrekt ist.^[11] Dabei sollte ein Oxetan in der aktiven Tasche des Enzyms stabilisiert werden und dieser Vierring anschließend durch Elektroneninjektion, analog zum Mechanismus der CPD-Photolyase, gespalten werden. Die Kristallstrukturen von *Maul et al.*^[9-10] weisen stattdessen auf einen Mechanismus hin, bei dem das Elektron direkt in den Schaden injiziert wird (siehe Kapitel 1.3.4.2, Schema 7). Der Transfer des Heteroatoms (-NH₂ bzw. -OH) war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht hinreichend aufgeklärt. Möglich war ein Transfer des Sauerstoffatoms beim T(6-4)T zweistufig, über Bindungspaltung und ein freies Wassermolekül.^[9, 13] Alternativ wurde ein konzertierter Mechanismus mit einem oxetanartigen Übergangszustand für möglich gehalten.^[12] Auch der Reparaturmechanismus der Dewar Valenzisomere durch die (6-4)-Photolyase war nur schlecht untersucht. Dass T(Dew)T wesentlich schlechter als T(6-4)C repariert wird, war beispielsweise bekannt, ohne die Ursachen hierfür zu kennen.^[10-11] Dies ist bemerkenswert, da Dewar-Schäden unter Bestrahlung mit Sonnenlicht häufiger sind als (6-4)-Schäden und ein extrem breites Mutagenitätsspektrum besitzen.^[54-55, 67, 69] Um diese Wissenslücken in der Literatur zu schließen, sollten mechanistische Studien mit Modellsubstraten sowie im aktiven Zentrum mutierten (6-4)-Photolyasen angefertigt werden.

Die Herstellung der Mutanten zur Untersuchung des Heteroatomtransfers sowie deren Überproduktion in *E. coli* und die anschließende Reinigung wurden von *Dr. Emine Kaya* und *Dorothea Matschkal* durchgeführt. Das aktive Zentrum mit den relevanten Aminosäuren ist in Abbildung 17 dargestellt. Besonders interessant erscheinen in diesem Zusammenhang Mutationen von Tyr423. Dieses interagiert über Wasserstoffbrücken mit His369 und His365, welches wiederum direkten Kontakt zur wandernden Gruppe (-OH bzw. -NH₂) hat (Abbildung 17). Da Tyr423 einen niedrigen pKa-Wert von 10.07 aufweist, liegt His365 möglicherweise protoniert vor. Des Weiteren deuten ENDOR-Studien von *Weber* und Mitarbeitern darauf hin, dass das Histidin nahe der Ribitylkette des FADs, in unserem Fall His365, wahrscheinlich

protoniert vorliegt.^[150] Neue QM/MM Rechnungen von *Condic-Juric et al.* zeigen jedoch das jegliche mögliche Kombination der Protonierungszustände von His365 und His 369 die experimentellen EPR Hyperfeinkopplungen des FADH-Radikals ähnlich gut erklärt.^[151] Weiterhin wurden die pK_a Werte mittels PROPKA, H++ und APBS Ansätzen berechnet, wobei als Gesamtergebnis zwei neutrale Histidine als der relevanteste Zustand des Enzyms ermittelt wurden.

Für eine Reaktion, welche ein Oxetan als Intermediat beinhaltet, wäre eine Deprotonierung der C5-OH-Gruppe günstig, da so die Nucleophilie erhöht wird. Für eine zweistufige, nicht konzertierte Reaktion ist hingegen eine Protonierung vorteilhaft. Auf diese Weise würde eine bessere Abgangsgruppe generiert (-OH vs. -OH₂⁺). Es ist zu beachten das bei einem protonierten Histidin die initiale Elektronenübertragung wahrscheinlich nicht auf den Schaden, sondern auf das Histidin erfolgen würde.^[152] In diesem Fall würde ein Wasserstoffatom anstatt eines Protons übertragen werden. In beiden Fällen entsteht aber das protonierte Radikal des UV-Schadens. Ein protoniertes His365 spricht also für eine mehrstufige, oxetanfreie Reparatur.

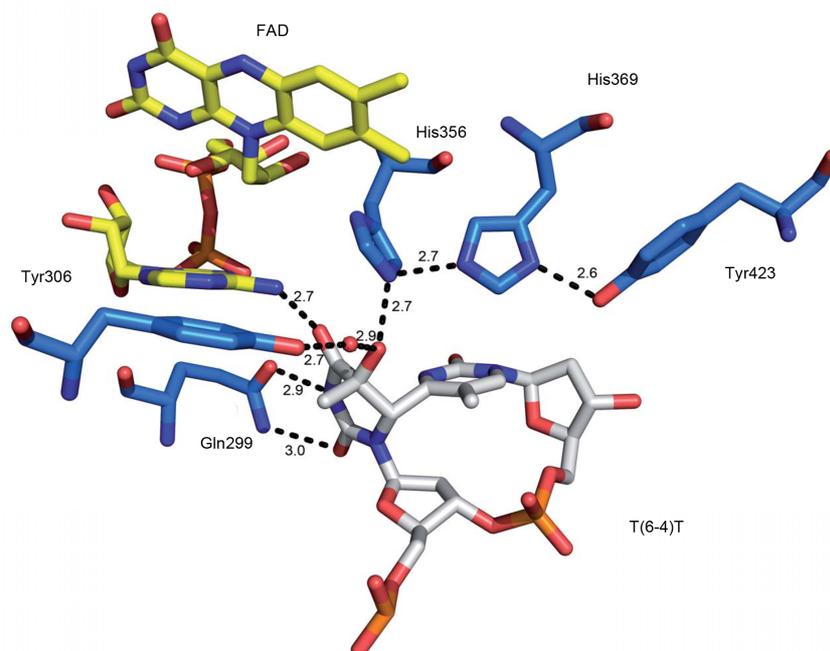


Abbildung 17: Aktives Zentrum der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* in Komplex mit T(6-4)T (3CVU). Aminosäuren sind in Blau, T(6-4)T in Grau und der Kofaktor FAD in Gelb gezeigt. Relevante Abstände sind in Å angegeben.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde Tyr423 in eine saure Glutaminsäure, ein basisches Arginin und in ein neutrales, aprotisches Phenylalanin mutiert. Eine

saure Aminosäure sollte einen konzertierten, über ein Oxetan verlaufenden Mechanismus mehr stören als einen, bei dem Wasser als Intermediat auftritt. Eine basische Gruppe sollte genau die umgekehrten Folgen haben. Beide Mutationen führten jedoch zu vollständig inaktiven Proteinen (siehe Tabelle 2). Lediglich der aprotische Phenylalaninrest zeigte noch Restaktivität. Es scheint, dass der Protonierungszustand der katalytischen Triade sehr fein justiert ist und stärkere Abweichungen die Reaktion unmöglich machen. Die Möglichkeit, dass die Reparatureffizienz an einem nicht korrekt gefalteten Enzym liegt, wurde durch die Stärke des HPLC-Signals von FAD überprüft. Da dessen Intensität bei allen Mutanten sowie beim Wildtyp weitgehend gleich blieb, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein korrekt gefaltet mit dem einbetteten Kofaktor vorliegt.

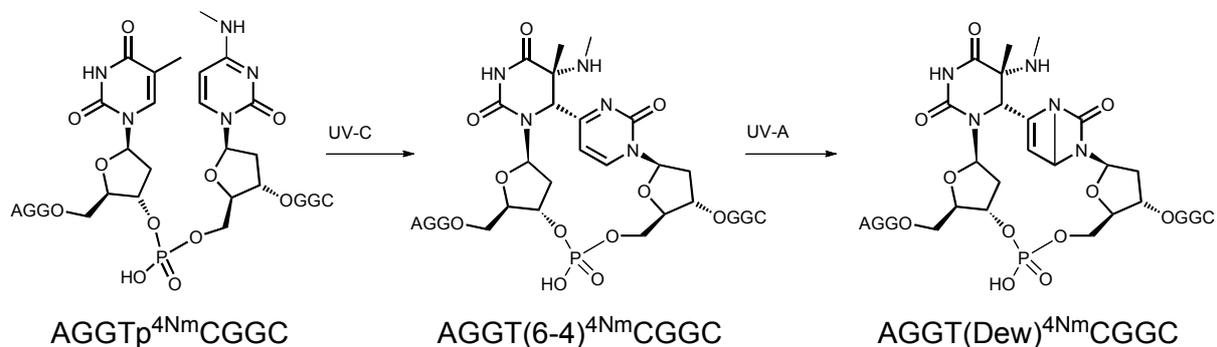
Tabelle 2: Relative Reparatureffizienz der (6-4)-Photolyasemutanten.

(6-4)-Photolyase	Reparatureffizienz
Y423E	0.0 %
Y423R	0.0 %
Y423F	4.1 %
Y306F	100 %
Q299A	5.6 %

Tyr306 ist ebenfalls über eine Kette von Wasserstoffbrücken mit der wandernden Hydroxylgruppe verbunden (Abbildung 17). Als Bindeglied dient hierbei ein Wassermolekül. Tyrosin könnte über diese Wechselwirkungen und seinem pKa-Wert von 10,07 ebenfalls durch Protonierung eine bessere Abgangsgruppe erzeugen. Eine Mutation von Tyr306 in ein Phenylalanin zeigte jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Reparatureffizienz (siehe Tabelle 2).

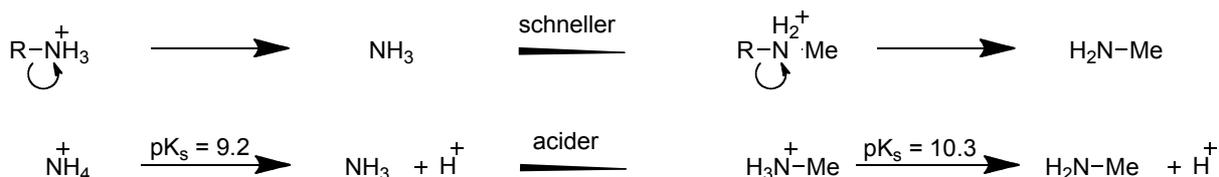
Eine Mutation von Gln299 in ein Alanin bewirkte hingegen eine reduzierte Reparatureffizienz. Dies könnte daran liegen, dass durch das Wegfallen dieses elektronenziehenden Restes die Spindichte während der Reparatur weniger auf der 5'-Seite des Schadens lokalisiert ist. Wahrscheinlicher ist hingegen, dass durch die fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen der (6-4)-Schaden schlechter gebunden wird. In weiterführenden Experimenten könnte dies durch einen großen Überschuss an (6-4)-DNA in der Reaktionsmischung überprüft werden. Das

Massenwirkungsgesetz würde voraussagen, dass dann die schlechtere Substratbindung kompensiert werden kann.



Schema 9: Schematische Darstellung der Herstellung von T(6-4)^{4Nm}C und T(Dew)^{4Nm}C im Einzelstrang.

Ein Indiz für einen zweistufigen Mechanismus konnte durch die Verwendung von T(6-4)^{4Nm}C (Schema 9) als Substrat für die (6-4)-Photolyase erhalten werden. Diese Verbindung, wie auch das entsprechende Dewar Valenzisomer, wurde in Zusammenarbeit mit *Dr. Andreas Glas* hergestellt und untersucht. Hierfür wurde der (6-4)-Schaden durch Belichtung (254 nm, anaerob) des DNA-Strangs 5'-AGGT^{4Nm}CGGC-3' hergestellt.^[10] Die Oligonukleotide wurden anschließend, wie in Kapitel 4.7 beschrieben, mittels *rp*-HPLC gereinigt, anschließend mit (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* versetzt und mit Weißlicht bestrahlt, um die Reparaturreaktion einzuleiten. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass T(6-4)^{4Nm}C nur äußerst langsam umgesetzt wird. Trotz einer Verlängerung der Belichtungszeit von einer auf sieben Stunden sowie eines Überschusses von zehn Äquivalenten an (6-4)-Photolyase wurde nur geringer Umsatz beobachtet (Abbildung 18). Ein möglicher Grund für diese verlangsamte Reaktivität ist die erhöhte Elektronendichte am Stickstoff, welche durch den elektronenschiebenden Effekt der Methylgruppe verursacht wird. Dies erzeugt nach einer Protonierung durch His365 bei T(6-4)^{4Nm}C eine schlechtere Abgangsgruppe als bei T(6-4)C (vgl.: $\text{pK}_{\text{NH}_4^+}$: 9.2, $\text{pK}_{\text{NH}_3\text{Me}^+}$: 10.3, siehe Schema 10).



Schema 10: Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Acidität und der Güte einer Abgangsgruppe.

Diese Beobachtung passt eher zu einem zweistufigen Mechanismus mit sequenzieller Bindungsspaltung und anschließender Neubildung. Bei einem Mechanismus der über ein Oxetan- bzw. Azeridinintermediat verläuft sollte die höhere Elektronendichte durch eine erhöhte Nukleophilie des Stickstoffs hingegen beschleunigt werden. Im Einklang hiermit ist ebenfalls die höhere Ausbeute der (6-4)-Bildung bei Tp^{4Nm}C (21 %) im Vergleich zu TpC (14 %), die bekanntlich über solch einen viergliedrigen Ring verläuft.^[1, 48, 153] Es ist zu beachten das dies jedoch nur hinweise sind. Weitere Untersuchungen

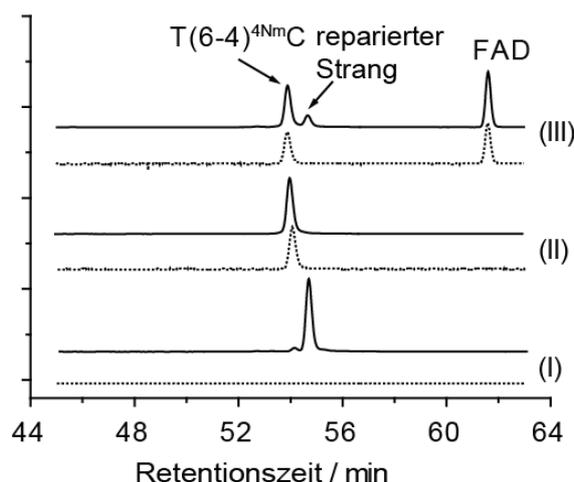


Abbildung 18: HPLC-Analyse der Reparaturreaktion des T(6-4)^{4Nm}C-Schadens. Die durchgezogene Linie entspricht der Absorption bei 260 nm und die Gepunktete der bei 325 nm. (I) HPLC-Chromatogramme ungeschädigter DNA. (II) HPLC-Chromatogramme der jeweiligen UV-geschädigten DNA. (III) HPLC-Chromatogramme der Reparaturreaktion durch (6-4)-Photolyase.

Die Verwendung von 4*N*-Methylcytidin erwies sich außerdem als besonders geeignet um den Mechanismus der Dewar-Reparatur durch die (6-4)-Photolyase zu untersuchen. Für die Umwandlung von 5'-AGGT(6-4)^{4Nm}CGGC-3' zur entsprechenden Dewar-Verbindung durch Bestrahlung mit UV-A (365 nm) war eine Verlängerung der Belichtungszeit von einer Stunde auf 10 Stunden erforderlich. Eine HPLC-Reinigung war nicht nötig, da die Umsetzung vollständig und ohne Nebenprodukte verlief.

Bei der Umsetzung von T(Dew)^{4Nm}C wurde, neben dem reparierten Strang, ein zusätzliches Signal sichtbar (Abbildung 19), welches nicht nur bei 260 nm, sondern auch bei 325 nm Absorption zeigte. Die naheliegende Vermutung, dass es sich hierbei um das Oligonukleotid 5'-AGGT(6-4)^{4Nm}CGGC-3' handelt, wurde unter anderem durch Koinjektion bestätigt (nicht gezeigt).^[61] Dieses Ergebnis zeigt, dass (6-4)-Schäden während der Reparatur von Dewar Valenzisomeren als Zwischenstufen auftreten. Durch die sehr langsame Umsetzung von T(6-4)^{4Nm}C akkumuliert dieses Intermediat, während es bei T(6-4)C sofort weiterreagiert.

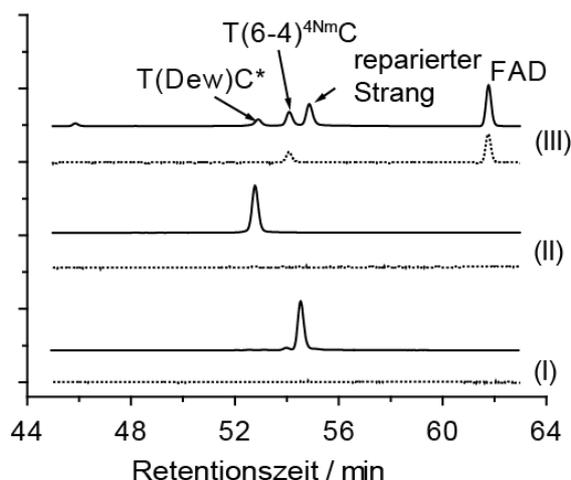


Abbildung 19: HPLC-Analyse der Reparaturreaktion des T(Dew)^{4Nm}C-Schadens. Die durchgezogene Linie entspricht der Absorption bei 260 nm und die Gepunktete der bei 325 nm. (I) HPLC-Chromatogramme ungeschädigter DNA. (II) HPLC-Chromatogramme der jeweiligen UV -geschädigten DNA. (III) HPLC-Chromatogramme der Reparaturreaktion durch (6-4)-Photolyase.

Die 4 π -elektrozyklische Ringöffnung wird bei der CPD-Photolyase durch einen Elektronentransfer auf den Schaden katalysiert.^[11] Da die (6-4)-Photolyasen mit dem Kofaktor FAD sehr ähnlich aufgebaut sind,^[116] liegt ein ähnlicher Mechanismus zur Öffnung der Dewar-Struktur nahe. Um dies zu überprüfen, wurde T(Dew)^{4Nm}C sowie der natürliche T(Dew)C-Schaden mit der H365N-Mutante der (6-4)-Photolyase umgesetzt. Durch die Substitution von His365 durch ein Asparagin ist diese Mutante nicht mehr in der Lage, (6-4)-Schäden zu reparieren.^[9] Dies ist vermutlich auf eine fehlende Stabilisierung des Übergangszustands bei der Übertragung des Heteroatoms (Sauerstoff bzw. Stickstoff) zurückzuführen. Ein Elektronentransfer ist jedoch weiterhin möglich. Die HPLC-Analyse von T(Dew)^{4Nm}C (Abbildung 20a) weist nur das Signal von T(6-4)^{4Nm}C auf. Bei der Reparaturreaktion von T(Dew)C taucht neben dem Eduktsignal zusätzlich das Signal des entsprechenden (6-4)-Schadens auf (Abbildung 20b). Beim T(Dew)T-Schaden hingegen war, wie erwartet, keine

Umsetzung nachweisbar (nicht gezeigt), was zeigt, dass dieses Substrat für (6-4)-Photolyasen ungeeignet ist.

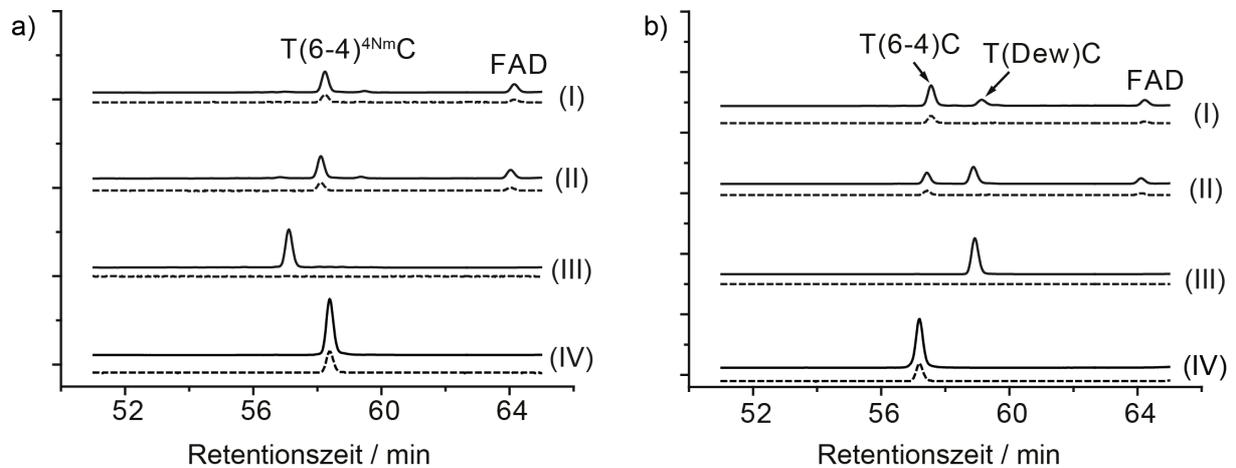


Abbildung 20: HPLC-Analyse der Reparaturreaktion der H365N-Mutante mit a) dem T(Dew)^{4NmC}-Schaden und b) dem T(Dew)C-Schaden. Die durchgezogene Linie entspricht der Absorption bei 260 nm und die Gepunktete der bei 325 nm. (I) HPLC-Chromatogramme der Reparaturreaktion nach zehn Stunden. (II) HPLC-Chromatogramme der Reparaturreaktion nach drei Stunden. (III) HPLC-Chromatogramme der jeweiligen Dewar-Schäden. (IV) HPLC-Chromatogramme der korrespondierenden (6-4)-Schäden.

Um die Theorie weiter zu erhärten, dass die Reparatur von Dewar-Schäden über (6-4)-Schäden verläuft und durch Elektroneninjektion katalysiert wird, wurden Dewar-Valenzisomere mit (6-4)-Photolyase umgesetzt, bei der das FAD oxidiert vorlag. Ein oxidiertes FAD ist nicht in der Lage, nach Belichtung Elektronen zu übertragen. Wie erwartet ist in der Analyse der Reparaturreaktionen sowohl bei T(Dew)^{4NmC} (Abbildung 21a) als auch beim natürlichen Substrat (Abbildung 21b) nur Edukt nachweisbar. Eine Elektroneninjektion ist für die Konvertierung von Dewar zu (6-4)-Schäden unabdingbar. Nach dieser Umwandlung kann dann direkt die Reparatur der so entstandenen intermediären (6-4)-Schäden stattfinden.

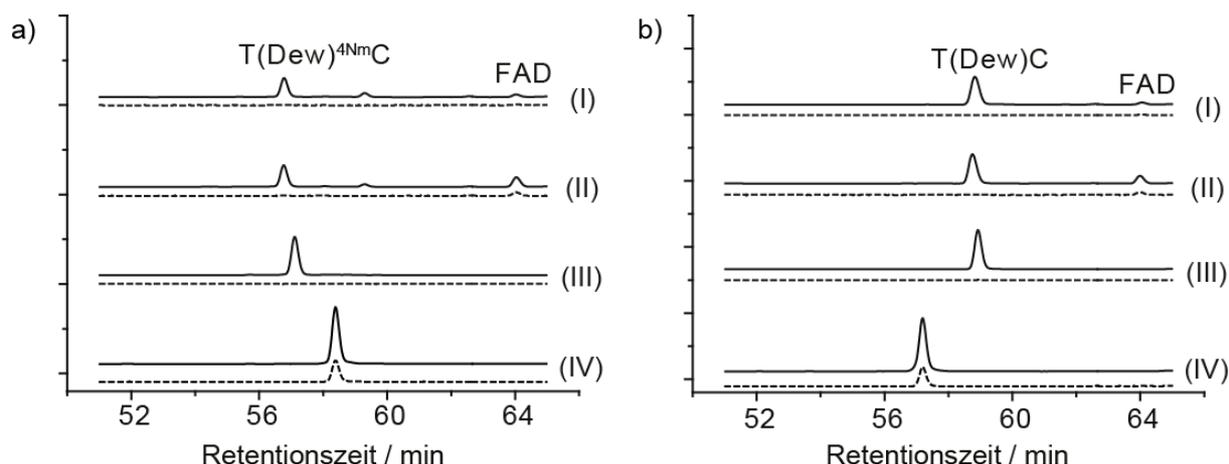


Abbildung 21: HPLC-Analyse der Reparaturreaktion der (6-4)-Photolyase und oxidiertem FAD mit a) dem T(Dew)^{4NmC}-Schaden und b) dem T(Dew)C-Schaden. Die durchgezogene Linie entspricht der Absorption bei 260 nm und die Gepunktete der bei 325 nm. (I) HPLC-Chromatogramme der Reparaturreaktion nach zehn Stunden. (II) HPLC-Chromatogramme der Reparaturreaktion nach drei Stunden. (III) HPLC-Chromatogramme der jeweiligen Dewar-Schäden. (III) HPLC Chromatogramme der korrespondierenden (6-4)-Schäden.

Abschließend wurde der Grund für die Substratspezifität der (6-4)-Photolyase bei Dewar-Schäden untersucht. Das unterschiedliche Verhalten von T(Dew)T und T(Dew)C muss durch das veränderte Substitutionsmuster hervorgerufen werden (Abbildung 22). Die beiden Schäden unterscheiden sich jeweils im Substitutionsmuster am C5 der 5'-Base und am C5 der 3'-Base. Im T(Dew)T-Schaden ist an der C5-Position des Pyrimidins, neben der Methylgruppe eine Hydroxylgruppe, während im T(Dew)C an dieser Position eine Aminogruppe ist. An der C5 der Dewar-Base befindet sich im T(Dew)T eine Methylgruppe, welche im T(Dew)C durch ein Wasserstoff ersetzt ist. Um herauszufinden, welcher der Substituenten das veränderte Reaktionsverhalten verursacht, wurde das Substitutionsmuster dieser Positionen permutiert. Durch die Verwendung von TpU-Sequenzen wurde ein Dewar-Schaden erhalten, der an der 5'-Base eine Hydroxylgruppe und an der 3'-Base ein Wasserstoff aufweist. Dabei erwies sich die Umwandlung zum (6-4)-Schaden als sehr ineffizient, so dass dieser Schritt sowie die HPLC-Reinigung mehrmals wiederholt werden mussten, um ausreichendes Material für die Untersuchungen herzustellen. Tp^{Me}C als Edukt lieferte ein Dewar-Valenzisomer mit Aminogruppe am Pyrimidinring und Methylgruppe am Dewar-Bizyklus (Abbildung 22). Diese Substrate wurden in Reparaturexperimenten mit (6-4)-Photolyase sowie *in silico* untersucht.

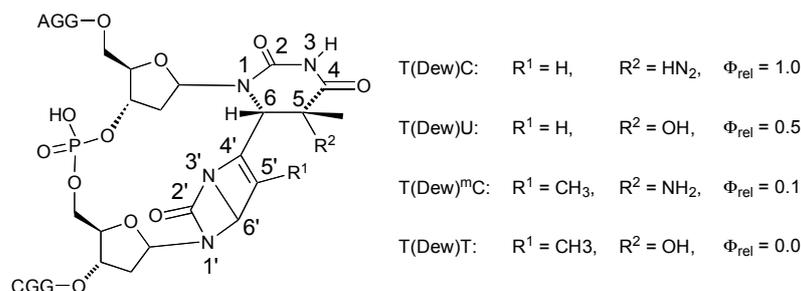


Abbildung 22: Darstellung der Substrate zur Untersuchung der Spezifität der (6-4)-Photolyase zusammen mit den normierten, relativen Quantenausbeuten während der Dewar-Reparatur.

Die Reparaturzeit wurde so angepasst, dass der T(Dew)C zu 10 % repariert wird, so dass auch bei einer höheren Reparatureffizienz der Derivate kein vollständiger Umsatz erreicht wurde. Bei einer quantitativen Reaktion wäre ein Vergleich der Quantenausbeuten nicht möglich, da bei den anderen Substraten die Reaktion fortschreiten könnte. Wie bereits beschrieben trat für T(Dew)T keine Reaktion auf. Der T(Dew)^mC-Schaden wurde zu 5 % und der T(Dew)U zu 1 % umgesetzt. Die normierten, relativen Quantenausbeuten wurden dementsprechend mit $\Phi_{T(Dew)C}$: 1.0, $\Phi_{T(Dew)U}$: 0.5, $\Phi_{T(Dew)^mC}$: 0.1 und $\Phi_{T(Dew)T}$: 0.0 bestimmt. Substrate, welche an der 3'-Base keine Methylgruppe aufweisen, werden also gut repariert, wohingegen solche mit Methylgruppe mit signifikant reduzierter Effizienz umgesetzt werden. Der zweite Substituent hat wesentlich weniger Einfluss. Substrate, die eine Aminogruppe aufweisen, werden geringfügig besser umgesetzt als solche mit Hydroxylgruppe.

Die Möglichkeit, dass der starke Einfluss der Methylgruppe durch eine sterische Hinderung und daraus resultierender schlechter Bindung in der Photolyase verursacht wird, kann durch die Kristallstruktur der (6-4)-Photolyase mit einem Dewar-Schaden ausgeschlossen werden (Abbildung 23, pdb: 2WG6). Dabei ist zu sehen, dass das aktive Zentrum reichlich Platz für eine Methylgruppe bietet. Interessant ist ebenfalls der Vergleich zu (6-4)-Schäden. Die Position der Methylgruppe an C5 der 3'-Base ändert sich durch die Bildung des anellierten Doppelrings nur marginal. T(6-4)T, welches ebenfalls eine Methylgruppe an dieser Position trägt, wird jedoch sehr gut umgesetzt. Die Spezifität der Reparaturreaktion muss also auf die elektronischen Eigenschaften der Dewar-Verbindungen zurückzuführen sein.

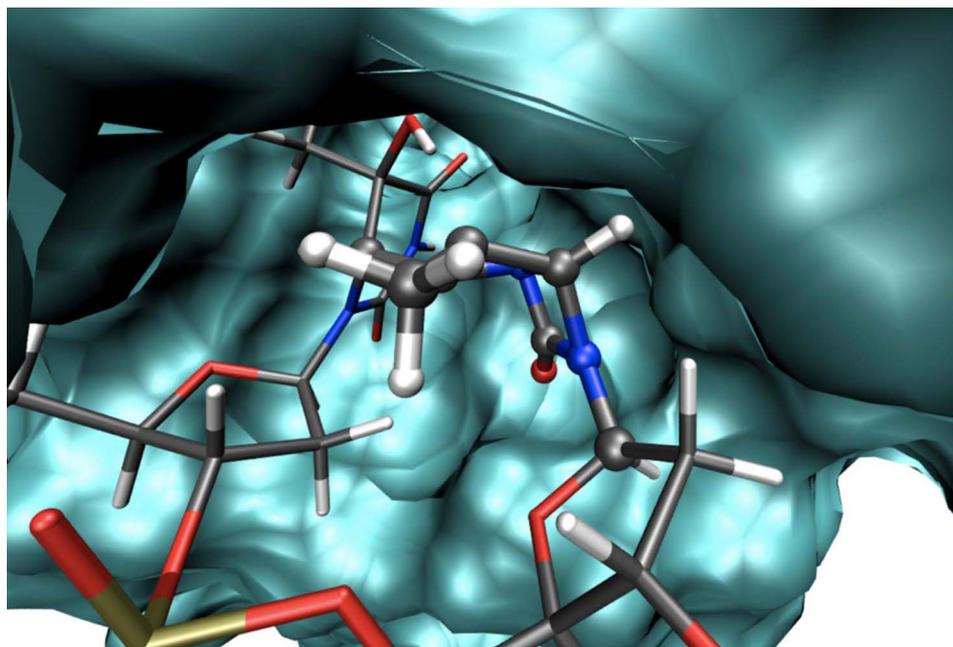


Abbildung 23: Kristallstruktur der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit T(6-4)^{4Nm}C (pdb: 2WG6). Die Methylgruppe an C5 der 3'-Dewarbase wurde nachträglich modelliert.

Eine Methylgruppe erhöht durch Hyperkonjugation die Elektronendichte in der 5'-Base. Da die Reparatur über ein Radikalanion verläuft, ist es naheliegend, dass ein System mit elektronenreicher Dewar-Substruktur langsamer reagiert. Der Substituent an der 5'-Base hat entgegengesetzte Auswirkung. Hier reagiert das System mit mehr Elektronen (-NH₂) schneller als das elektronenärmere (-OH). Durch den induktiven Effekt der Aminogruppe könnte die Spindichte des Radikalanions auf die 3'-Base verlagert werden, was die Reaktion beschleunigt. Dass T(Dew)^{4Nm}C schneller als T(Dew)C von der H365N-Mutante umgesetzt wird (Abbildung 20), stimmt ebenfalls mit dieser Theorie überein, da es den Elektronendruck an der 5'-Base weiter erhöht.

Um ein quantitatives Bild der Dewar-(6-4)-Umwandung zu erhalten, wurde diese von *Dr. Benjamin Fingerhut* durch *ab initio* Berechnungen untersucht (Abbildung 24). Details der quantenchemischen Rechnungen können seiner Doktorarbeit entnommen werden.^[154] Vereinfacht wurde dabei wie nachfolgend beschrieben vorgegangen. Die 4π-elektrozyklische Ringöffnung der Dewar-Substrate wurde zuerst in wässriger Lösung simuliert durch ein polarisierbares Kontinuum (PCM,^[155] Hybrid Meta-GGA Austausch-Korrelations-Funktional M05-2X,^[156-157] Basissatz 6-31G*) und anschließend im aktiven Zentrum der (6-4)-Photolyase (pdb: 2WG6) durch einen QM/MM-Ansatz^[158-159] beschrieben. Im Gegensatz zu älteren

Rechnungen^[160-161] wurde dabei das komplette Dinukleotid miteinbezogen, da bekanntermaßen der komplette Makrozyklus für eine korrekte Beschreiben von Dewar-Reaktionen notwendig ist.^[8] Die entsprechende Aktivierungsenergie der Radikalanionen, also die Differenzenergie der Übergangszustände und der relaxierten Radikalanionen, wurden mit T(Dew)C: 0.106 eV, T(Dew)U: 0.145 eV, T(Dew)^mC: 0.219 eV und T(Dew)T: 0.323 eV berechnet. Bei den neutralen Dewar-Schäden liegt dieser Wert wesentlich höher ($\Delta E_A \sim 1.60$ eV), was zeigt, dass die 4π -elektrozyklische Reaktion durch Elektroneninjektion katalysiert wird. Der Trend der Aktivierungsenergien wird durch die Berechnung im aktiven Zentrum der (6-4)-Photolyase bestätigt (T(Dew)C = 0.158 eV, T(Dew)T = 0.256 eV). Die Übergangszustände unterscheiden sich in Lösung und im Enzym nur unwesentlich (R.M.S.D. = 0.06 Å). Dies weist darauf hin, dass die (6-4)-Photolyase bei dieser Reaktion hauptsächlich über die Optimierung des Elektronenpfades wirkt (Abbildung 17).

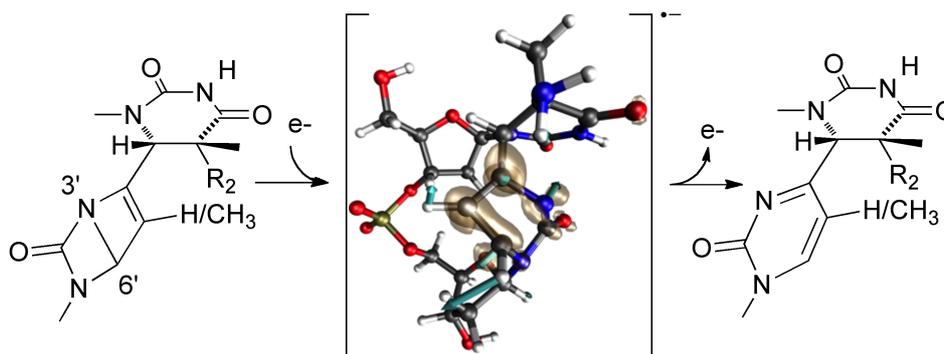


Abbildung 24: Vorgeschlagener Mechanismus der Reparatur von Dewarschäden durch (6-4)-Photolyasen. Die Dewarstruktur wird nach Elektroneninjektion in den korrespondierenden (6-4)-Schaden umgewandelt, der anschließend weiter zur ungeschädigten DNA-Sequenz fragmentiert.

Unter Zuhilfenahme eines kinetischen Modells (Abbildung 25, Einlage) konnten die relativen Quantenausbeuten der Dewar-(6-4)-Umwandlung simuliert werden. Grundlage bildeten dabei die von *Zhong* und Mitarbeitern bestimmten Zeitkonstanten der (6-4)-Reparatur^[12] sowie die *in silico* bestimmten Aktivierungsenergien. $\Phi_{T(Dew)C}$ wurde wie gehabt gleich 1.0 gesetzt. Daraus ergab sich $\Phi_{T(Dew)U}$: 0.6, $\Phi_{T(Dew)mC}$: 0.1 und $\Phi_{T(Dew)T}$: 0.0 als berechnete Werte für die übrigen Substrate (Abbildung 25), in sehr guter Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Quantenausbeuten.

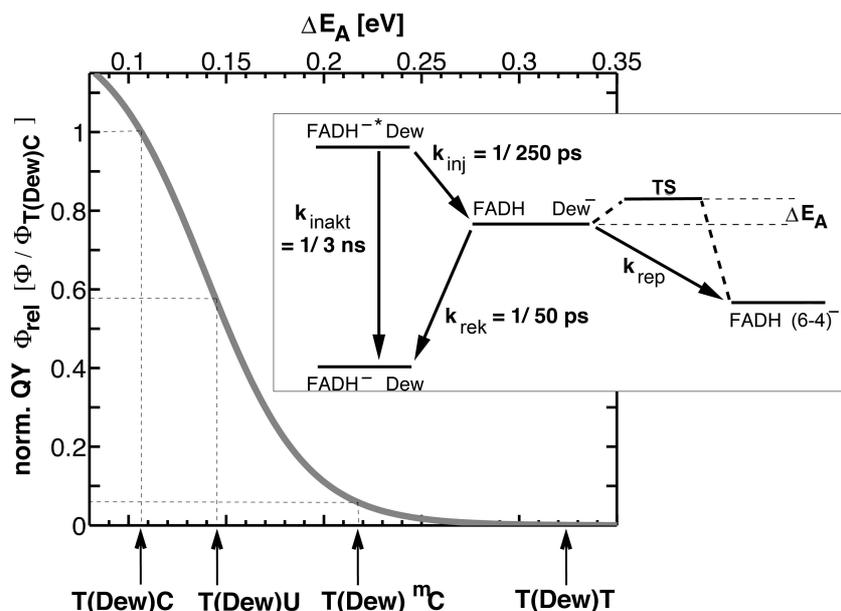


Abbildung 25: Relative Quantenausbeute Φ_{rel} als Funktion der Aktivierungsenergie ΔE_A . Das kinetische Modell der Dewar-Reparatur durch die (6-4)-Photolyase ist als Einlage abgebildet.

Die Reparatureffizienz der (6-4)-Photolyase bei Dewar-Schäden ist stark vom Substitutionsmuster abhängig. Dieses beeinflusst die Verteilung der negativen Ladung des Radikalanions und somit die Aktivierungsenergie. T(Dew)U wird noch sehr gut umgesetzt, wohingegen eine Methylgruppe in der Dewar-Substruktur die Energie des Übergangszustandes so stark anhebt, dass die Reparaturreaktion nicht mehr mit der Ladungsrekombination konkurrieren kann. Obwohl (6-4)-Schäden und folglich auch die daraus entstehenden Dewar-Valenzisomere hauptsächlich an TpC-Sequenzen gebildet werden, kann ein Teil nicht durch (6-4)-Photolyase repariert werden. Dewar-Schäden mit hoher negativer Partiaalladung auf der 5'-Base müssen deshalb durch alternative Systeme wie NER oder TLS repariert bzw. umgangen werden.

3.3 Herstellung von Sporenphotoprodukt enthaltender DNA

3.3.1 Belichtung von Oligonukleotiden

Die direkte Belichtung kurzer DNA-Fragmente für die Herstellung von (6-4)- und Dewar-Schäden ist aufgrund ihrer Effizienz die beste Herstellungsmethode. Dieser Ansatz sollte auch zur Herstellung von Sporenphotoprodukt enthaltenden Oligonukleotiden angewandt werden. Diese sollten anschließend für Kristallisationsexperimente mit Polymerasen und Photoproduktlyasen eingesetzt werden. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass nur das natürliche Diastereomer gebildet wird.^[21, 90] Eine verlangsamende und Ausbeuten verringernde Epimerentrennung, wie sie bei aktuellen chemischen Synthesen nötig ist, entfällt somit.^[22, 86]

Im Arbeitskreis *Carell* wurden bereits erste Versuche mit dem 6mer 5'-GGTTGG-3' von *Dr. Carsten Pieck* und *Dr. Ulrich Henneke* durchgeführt.^[91] Bei den Untersuchungen wurde eine Belichtungszeit von 6 h unter anaeroben Bedingungen als Optimum ermittelt. Als beste Methode zur Erstellung des DNA-Trockenfilms stellte sich das Lyophilisieren einer Lösung aus 0.125 µM Oligonukleotid, 50 mM DPA und 5 mM CaCl₂ bei pH 7.0 heraus. Nun sollte einerseits die Belichtung optimiert und andererseits die maximale Oligonukleotidlänge einer solchen Bestrahlung bestimmt werden.

Ein möglicher Ansatz für einen höheren Umsatz besteht darin, das Anlösen, Trocknen und Belichten zu wiederholen, was von *Fontecave* und Mitarbeitern erfolgreich auf die Herstellung von SP-Dinukleotid angewandt wurde.^[90] Im trockenen Zustand ist nur ein Teil der TpT-Sequenzen in der richtigen Konformation, um eine Reaktion zwischen Methylgruppe der einen Base und C5 der anderen Base zu ermöglichen. Durch wiederholtes Lösen, Trocknen und Belichten kann somit ein anderer Teil die Reaktion eingehen. Um zu überprüfen, ob dies auch für Oligonukleotide anwendbar ist, wurde das 6mer bis zu sechs solcher Zyklen ausgesetzt. Nach jedem Belichtungszyklus wurde ein Aliquot entnommen und mittels HPLC analysiert (Abbildung 26). Durch eine zusätzliche Belichtung steigt die Sporenphotoproduktmenge um ca. ein Drittel. Weitere Belichtungszyklen führen jedoch zu einer geringeren Ausbeute. Dies ist wahrscheinlich auf andere DNA-

Schäden wie Strangbrüche zurückzuführen. Somit ist Mehrfachbelichtung, in diesem Fall nur die Doppelbelichtung, eine geeignete Methode, um die Sporenphotoproduktbildung zu steigern. Diese ist jedoch bei Oligonukleotiden nicht so effizient wie beim Dinukleotid, welches deutlich robuster ist als längere DNA-Fragmente. Weitere Versuche, die Ausbeuten zu optimieren, wurden nicht unternommen, da zu diesem Zeitpunkt festgestellt wurde, dass die erforderliche Stranglänge für Kristallisationsexperimente von idealerweise 15 Basen durch Belichtung nicht zu erreichen ist. Deswegen wurde die chemische Synthese bevorzugt.

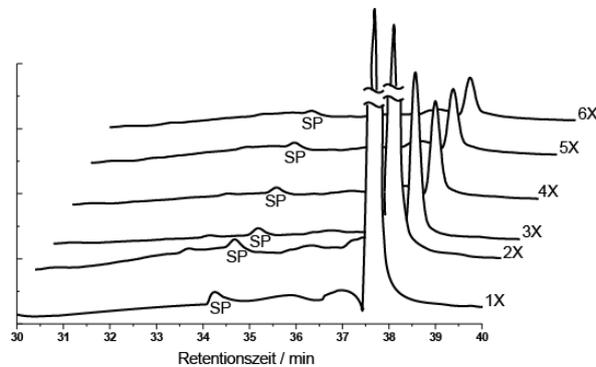


Abbildung 26: Wasserfalldiagramm der wiederholten Belichtung von 5'-GGTTGG-3'. Der Hauptpeak bei ca. 38 Minuten ist das Edukt. Die Zahl am Ende der Graphen gibt die Anzahl der Belichtungszyklen an. SP markiert das gebildete 5'-GGT(SP)TGG-3'.

Zur Bestimmung der maximalen DNA-Länge für Belichtungsexperimente wurden Oligonukleotide mit 6 bis 15 Basen, die von *Andreas Glas* erfolgreich zur Herstellung von (6-4)- und Dewar-Schäden verwendet wurden, anaerob UV-C ausgesetzt und mittels HPLC analysiert (Kapitel 4.7). Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, kann ein kurzer DNA-Strang, der ein Sporenphotoprodukt enthält, weitgehend problemlos von einem ungeschädigten Oligonukleotid abgetrennt werden. Bei längeren DNA-Fragmenten steigt der Anteil der nicht reagierten, unveränderten Basen. Dies führt zu einem geringeren Unterschied in der Polarität, was sich wiederum in einem geringeren Unterschied der Retentionszeiten äußert. Wie in Abbildung 27 gezeigt ist ein 8mer noch gut trennbar, längere Oligonukleotide sind jedoch kaum noch durch wiederholte Chromatographieläufe, die wiederum negative Auswirkungen auf die Ausbeute haben, zu reinigen. Dieser Effekt ist so stark, dass

beim 15mer das Sporenphotoprodukt nur noch als kleine Schulter wahrnehmbar ist. Da der Schmelzpunkt von Sporenphotoprodukt enthaltender DNA um mindestens 10 °C verringert wird,^[23] ist die erforderliche Länge für einen stabilen Duplex auf diese Weise nur schwer zu erreichen und die vermutlich ideale Oligonukleotidlänge für Kristallisationsversuche mit der Sporenphotoproduktlyase (14 bis 15 Basen)^[162-163] nicht möglich. Eine Verlängerung belichteter Stränge durch Ligation ist zwar möglich, da jedoch bereits die Ausbeuten der Belichtung sehr schlecht sind (1-2 %), wurde, wie bereits erwähnt, auf weitere Belichtungen zugunsten einer chemischen Synthese verzichtet.

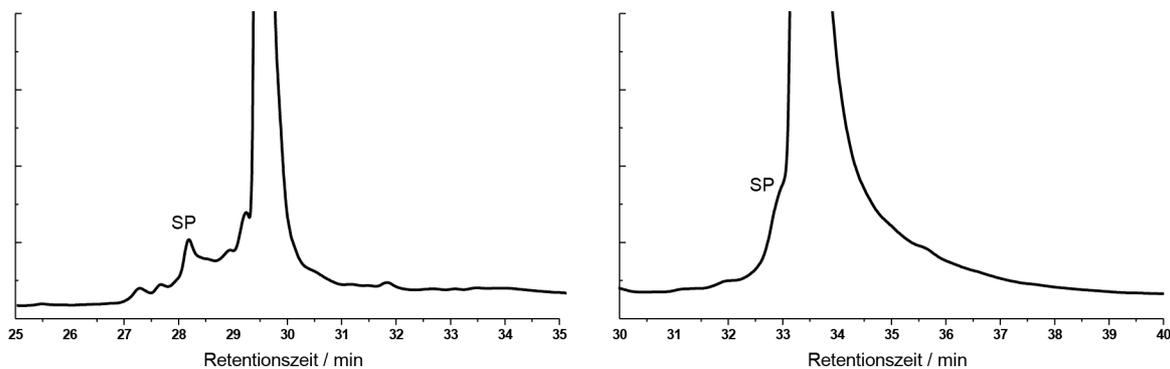


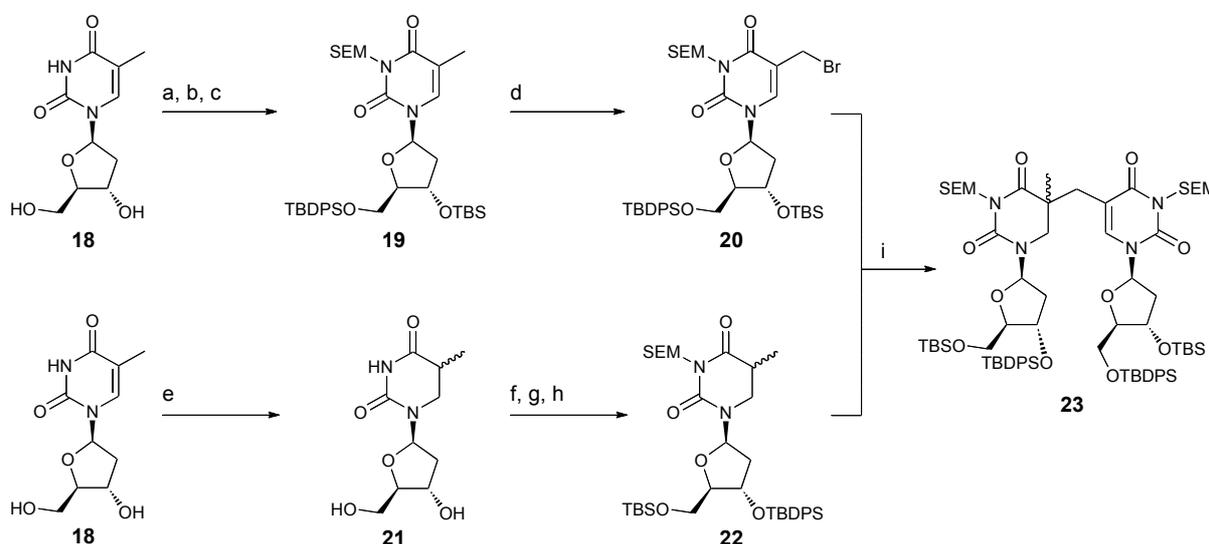
Abbildung 27: HPLC-Chromatogramme nach der Belichtung des 8mers 5'-AGGTTGCC-3' (links) und des 15mers 5'-ACAGCGGTTGCAGGT-3' (rechts). SP kennzeichnet das Signal des gebildeten Sporenphotoprodukts.

3.3.2 Chemische Synthese von Sporenphotoprodukt-Analoga

Die Belichtung von Oligonukleotiden eignete sich, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, nicht dazu, Sporenphotoprodukt enthaltende DNA für Kristallisationsexperimente mit Proteinen herzustellen. Deshalb wurden Sporenphotoprodukt-Phosphoramidite für die DNA-Festphasensynthese synthetisiert. Hierzu wurde eine Variante der von *Bürckstümmer* vorgestellten Synthese von SP-Analoga ohne Phosphatrückgrat verwendet.^[23] Die Synthese wurde durch das Austauschen der Schutzgruppen an den Ribose-Hydroxylgruppen so abgeändert, dass nicht wie bei *Bürckstümmer et al.* das 3'→5' Diastereomerenpaar erhalten wurde, sondern die 5'→3' Sporenphotoprodukte, welche die Dihydrothymineinheit am 5'-Nukleotid aufweisen (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 10).

Die Synthese basiert im Wesentlichen auf der von *Begley* und Mitarbeitern etablierten Bromid-Enol-Kupplung (Schema 11).^[86] Zur Herstellung des Allylbromids

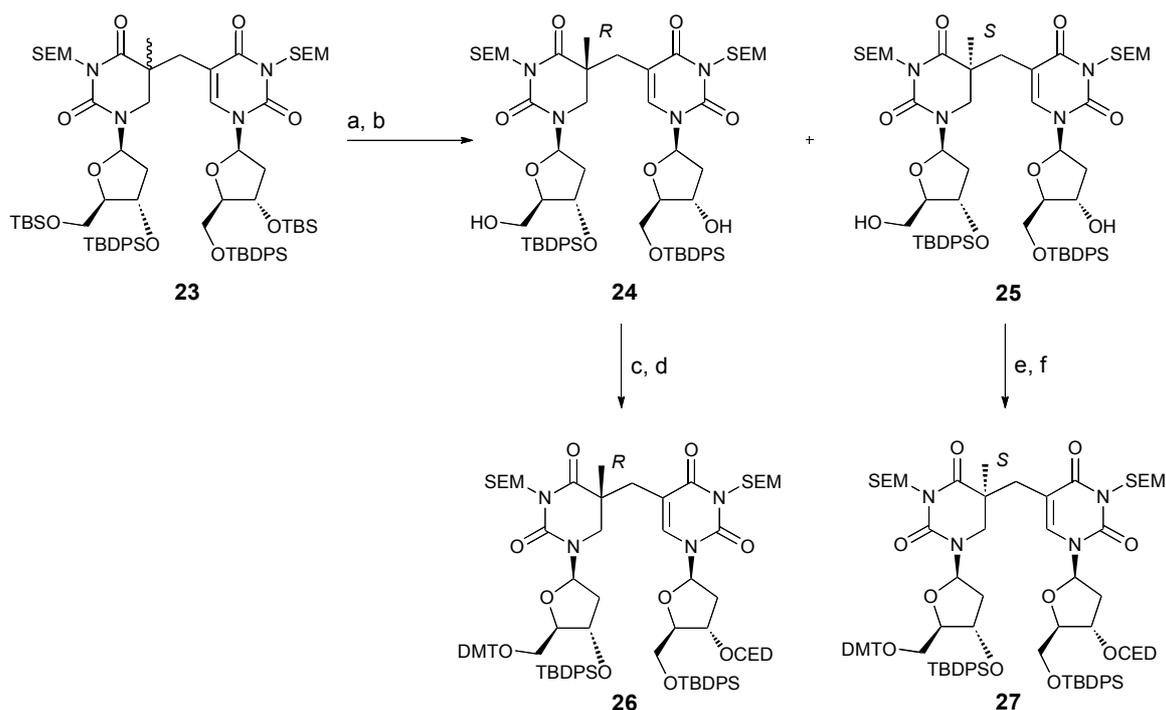
20 wurde zuerst Thymidin an der 5'-Hydroxylgruppe mit TBDPSCI unter Verwendung von DMAP als nukleophilen Katalysator geschützt. Die Variante mit DMAP und Pyridin erwies sich dabei als selektiver für die primäre 5'-Hydroxylgruppe als die von *Bürkstümmer* verwendete mit Imidazol. Bei dieser Reaktion ist die Kontrolle des Reaktionsverlaufs unerlässlich, da auch die 3'-Hydroxylgruppe konkurrierend reagiert. Anschließend wird die sekundäre Alkoholgruppe nach *Ogilvie et al.* mit TBSCl, Imidazol und Hünigbase geschützt.^[164] Da bei der Enolkupplung auch die protische Amidgruppe stört, wurde diese mit SEMCl in Gegenwart von Diisopropylethylamin umgesetzt.^[165] Diese Reaktion gelang trotz eines Überschusses an SEMCl von zwei Äquivalenten und teilweise sehr langen Reaktionszeiten von bis zu 5 Tagen nur in Ausbeuten von 61 %. Die Bromierung mit NBS wurde, nicht mit CCl₄ und Dibenzoylperoxid,^[23] sondern mit AIBN in Benzol durchgeführt. Zwar ließen sich durch diese Änderung die Ausbeuten nicht steigern, jedoch konnte die Ansatzgröße um den Faktor fünf angehoben werden, was die gesamte Synthesezeit merklich beschleunigte. Bei der ursprünglichen Variante fielen die Ausbeuten teils drastisch ab, wenn die Ansatzgröße ein Gramm überstieg.



Schema 11: Synthese von **6**. a) TBDPSCI, DMAP, 75 %, b) TBSCl, Imidazol, 99 %, c) SEMCl, DIEA, 61 %, d) NBS, AIBN, 50 %, e) H₂, Rh/Al₂O₃, 98 %, f) TBSCl, DMAP, 79 %, g) TBDPSCI, Imidazol, 99 %, h) SEMCl, DIEA, 80 %, i) LDA dann **20**, -78° C bis RT.

Zur Herstellung des Kupplungspartners **22** wurde Thymidin mit Wasserstoff und Ruthenium auf Aluminiumoxid zu Dihydrothymidin **21**, epimer am C5, reduziert.^[166] Als Lösungsmittel wurde eine 1:1-Mischung aus Wasser und Methanol verwendet.

Da **21** vom Edukt Thymidin nur äußerst schlecht abzutrennen war, musste dieses vollständig umgesetzt sein, weshalb eine sehr lange Reaktionszeit von fünf bis sieben Tagen notwendig war. Die Schützung des Dihydrothymidins erfolgte analog zu der Schützung von Thymidin zu **19**. Für die 5'-Hydroxylgruppe wurde jedoch TBSCl und für die 3'-OH-Gruppe TBDPSCI verwendet. Wie bereits durch frühere Arbeiten im Arbeitskreis *Carell* bekannt, zeigte sich, dass die Verwendung von kommerziellem LDA für die Enol-Bromidkupplung ungeeignet war, weshalb dieses immer frisch aus Diisopropylamin und *n*-BuLi hergestellt wurde. Das so erhaltene Lithiumdiisopropylamin wurde anschließend bei -78 °C zum geschützten Dihydrothymidin **22** gegeben. Nach der Bildung des Enols wurde das Allylbromid **20** hinzugefügt.^[86] Das durch diese Reaktion entstandene Diastereomergemisch des vollgeschützten Sporenphotoprodukts **23** wurde durch Behandlung mit *para*-Toluolsulfonsäure in Methanol bei 50 °C selektiv von den TBS-Gruppen befreit (siehe Schema 12).^[167] Auf dieser Stufe, mit zwei freien Hydroxylgruppen, wurden die Diastereomere durch Normal-Phasen-HPLC voneinander getrennt. Diese Herangehensweise wurde von *Markus Friedel* als optimal für diese Separation bestimmt.



Schema 12: a) *p*TsOH, 50 °C, b) *n*PHPLC Trennung der Diastereomere, **7** 8 % und **8** 5 % über drei Schritte, c) DMTCl, DMAP, 66 %, d) CEDCl, DIEA, 66 %, e) DMTCl, DMAP, 64 %, f) CEDCl, DIEA, 44 %.

Der von *Eva Bürckstümmer* verwendete Gradient von 30 auf 60 % Essigester in Heptan wurde durch eine isokratische Trennung mit *n*-Heptan, Ethylacetat, Isopropanol und Acetonitril in den Verhältnissen 580:380:39:1 ersetzt. Bei der Optimierung der Mischung stellte sich das Gemisch aus einem basierend auf Dispersionkräften wechselwirkenden Lösungsmittel wie Ethylacetat, einem Wasserstoffbrückendonator wie *i*-Propanol und einem sehr starken Eluenten wie Acetonitril als das Beste heraus. Der Hauptvorteil liegt jedoch im isokratischen Betrieb, wodurch das Konditionieren der Säule auf die Startbedingungen überflüssig wird, was wiederum die Trennung bei mehreren Durchläufen deutlich beschleunigt. Die Ausbeuten der 5'→3' Sporenphotoprodukte sind, bezogen auf das Dihydrothymin **22**, mit 8 % (5*R*) und 5 % (5*S*) mit den Ausbeuten von *Bürckstümmer* vergleichbar (8 % bzw. 2 % für die 3'→5' Diastereomere).

Die diastereomerenreinen Verbindungen **24** und **25** wurden dann unter Standardbedingungen mit DMTCl in Pyridin umgesetzt. Durch Verwendung des von *Bürckstümmer* eingeführten DMTOTf konnten keine besseren Ausbeuten erzielt werden, weshalb auf dessen Einsatz verzichtet wurde. Auch die weitere Umsetzung mit CEDCl und Hünigbase in DCM verlief problemlos, so dass die Phosphoramidite **26** und **27** mit 88 % bzw 44 % Ausbeute erhalten wurden. Bereits bei der ersten

Umsetzung zu **27** wurde ausreichend Material für alle Versuche erhalten, weshalb diese Reaktion nicht optimiert wurde.

Die DNA-Festphasensynthese wurde im Vergleich zu dem von *Eva Bürckstümmer* verwendeten Protokoll, das eine Doppelkupplung, eine Kupplungszeit von 10 Minuten und eine Entschützungszeit von 2 Minuten für die Sonderbase verwendet, deutlich verändert. Für die Kupplungszeit wurde der doppelte Wert eines Purinphosphoramidits angewandt, also ca. 3 Minuten. Auch auf die Doppelkupplung der Spezialbase und den verlängerten *Deblock* wurde ohne sichtbare Effizienzeinbußen verzichtet. In einigen Synthesen wurde zudem die Konzentration des Sporenphotoproduktphosphoramidits erfolgreich von 0.1 M auf 0.07 M abgesenkt, um das Verhältnis von Phosphoramidit zu Oligonukleotidausbeute zu verbessern. Die Kupplungseffizienz der Spezialphosphoramidite blieb dabei immer über 70 %, bezogen auf den Trityl-Wert.

Auch bei der Entschätzung der Oligonukleotide wurden deutliche Verbesserungen durchgeführt. Die Entfernung der SEM-Gruppen wurde weiterhin mit SnCl₄ (1 M in DCM) direkt am Träger durchgeführt. Die Entschätzungszeit wurde allerdings auf ca. 30 % gekürzt und nicht bei -20 °C, sondern bei Raumtemperatur durchgeführt. Trotz dieser Vereinfachungen ging die Ausbeute, wie später gezeigt, nicht zurück. Die gleichzeitige Abspaltung der permanenten Basenschutzgruppen und des Trägers wurde mit einer gesättigten Lösung von Methylamin in Wasser/Ethanol (1:1) bei 65 °C durchgeführt. Auf diese Weise war eine vollständige Entschätzung in 1 h möglich, was die gesamte Synthese weiter beschleunigte. Die frühere Methode mit Ammoniak in Ethanol/Wasser (1:4) bei Raumtemperatur benötigte hierfür 18 Stunden. Eine wesentliche Verbesserung wurde bei der Entfernung der TBDPS-Gruppen erzielt. Das von *Bürckstümmer* verwendete 1 M TBAF in THF wurde durch den TEA·3 HF-Komplex ersetzt, mit dem das vorher *in vacuo* getrocknete Oligonukleotid 1 h bei 65 °C behandelt wurde. Das Reagenz wurde vor der Reinigung durch eine Butanolfällung von der DNA abgetrennt. TBAF, ein Phasentransferkatalysator, behinderte die HPLC-Trennung erheblich, da seine amphoteren Eigenschaften die Peakbreite massiv vergrößerten. Durch all diese Maßnahmen ließ sich so nicht nur die Prozedur beschleunigen, sondern auch die Ausbeute massiv erhöhen. Wurden von *Bürckstümmer* von den 3'→5' Diastereomeren noch maximal 6 % bezogen auf die Trägerbeladung erhalten,

konnten von den 5'→3' Sporenphotoprodukten bis zu 15 % erhalten werden. Es ist zu beachten, dass diese drastische Steigerung ohne Doppelkupplung und mit 0.07 M anstatt 0.1 M Phosphoramidit erhalten wurde. In Summe konnte auf diese Weise eine Ausbeutensteigerung von über 600 %, bezogen auf das Phosphoramidit, erzielt werden. Nur durch diese drastische Verbesserung war es möglich, die erforderlichen DNA-Mengen für enzymatische Untersuchungen und Kokristallisationen zu erhalten.

3.4 Kokristallisation von Sporenphotoprodukt enthaltender DNA mit *Geobacillus stearothermophilus* DNA Polymerase I

Um die natürliche Konfiguration endgültig klären zu können sowie um die Basenpaarungs-eigenschaften und die Duplexverzerrung zu untersuchen die durch den SP Schaden erzeugt wird, wurde versucht einen Duplex der synthetisierten, Sporenphotoprodukt enthaltenden Oligonukleotide zusammen mit der DNA Polymerase I aus *Geobacillus stearothermophilus* (\equiv *Bacillus stearothermophilus*, *B. st.* Pol I) zu kristallisieren. Hierbei diente das Protein nur als Kristallisationsrahmen. Dazu wurde die Sequenz so gewählt, dass der Schaden nicht in der aktiven Tasche, sondern in der Mitte des doppelsträngigen Bereichs lag (Tabelle 3). An dieser Stelle sind die Verzerrung des Duplex und der genaue Modus der Basenpaarung optimal analysierbar, da der Schaden gänzlich von B-Form DNA umgeben ist.

Tabelle 3: Zur Kristallisation mit *B. st.* Pol I verwendete Oligonukleotide. ODN1 und ODN2 enthalten jeweils entweder das 5'→3' *R* oder *S* Sporenphotoprodukt ohne Phosphat. ODN3 ist der Gegenstrang für die Kristallisation und ODN4 ist der Gegenstrang bei Reparaturuntersuchungen. ODN5 und ODN6 dienen als Referenz für die Oligonukleotidfragmente, welche bei einer Reparatur durch SPL entstehen.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	[M-H] ⁻ (ber.)	[M-H] ⁻ (gef.)
ODN1	AGGGT(5 <i>R</i> SP)TGGTC	3036	3035
ODN2	AGGGT(5 <i>S</i> SP)TGGTC	3036	3036
ODN3	ATGCGACCAACCCT	4194	4195
ODN4	GACCAACCCT	2957	2957
ODN5	TGGTC	1495	1496
ODN6	AGGGT	1544	1544

Die Überproduktion sowie die Reinigung von *B. st.* Pol I wurde von *Dr. Markus Müller* optimiert. Da bereits verschiedene Kokkristallstrukturen von *B. st.* Pol I und DNA bekannt sind, mussten die Kristallisationsbedingungen nicht von Grund auf neu entwickelt werden, sondern es konnten die bekannten Methoden angepasst werden.^[168-169] Die Duplexe ODN1:ODN3 bzw. ODN2:ODN3 wurden mit der gereinigten Proteinlösung gemischt und nach der *hanging-drop vapor diffusion* Methode kristallisiert. Unter geeigneten Bedingungen (45-50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.5-4.5 % MPD und 100 mM MES pH 5.8) wurden für beide Doppelstränge Kristalle mit *B. st.* Pol I erhalten (siehe Kapitel 4.4). Diese Kristalle wurden mit einer Mischung aus 24 % Saccharose, 55 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0–3.5 % MPD und 100 mM MES behandelt, um Schäden beim Einfrieren zu vermeiden, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und so bis zur Messung gelagert. Die Kristalle wurden an der PXI-Synchrotronstrahlenquelle der *Swiss Light Source* (Villigen, Schweiz) vermessen und streuten die Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von 2.15 Å (5R-SP) bzw. 2.80 Å (5S-SP).

Durch die Strukturanalyse konnte die absolute Konfiguration bestimmt und die Ergebnisse von *Bardet* und *Broderick* bestätigt werden.^[21-22] Ältere Untersuchungen von *Friedel et al.* sind dementsprechend falsch und haben zu falschen Schlussfolgerungen, wie der Synthese des 3' → 5' - 5S Schadens, geführt.^[19-20]

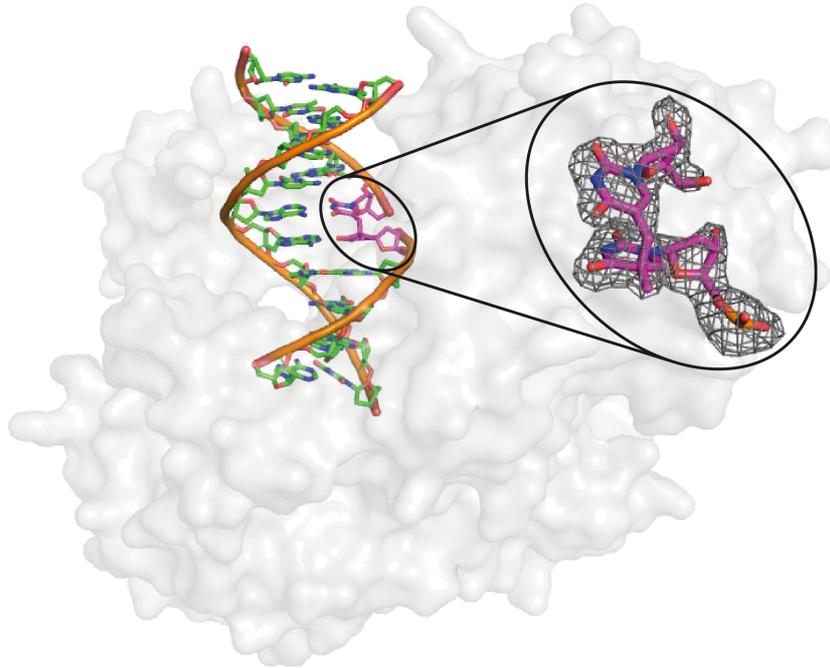


Abbildung 28: Kristallstruktur des Komplexes aus 5'→3' 5R Sporenphotoprodukt enthaltender DNA und *B. st.* Pol I (pdb: 2ylj). Das Protein ist als graue Oberfläche und die DNA bunt als Stäbchenmodell dargestellt. Der Schaden ist in Lila hervorgehoben und in der Vergrößerung mit der Elektronendichte auf 2 σ Niveau überlagert.

In Abbildung 28 ist die Kristallstruktur des *B. st.* Pol I – DNA Komplexes mit 5'→3' 5R Sporenphotoprodukt dargestellt. Neben der Bestimmung der Konfiguration konnte mit der Struktur gezeigt werden, dass das 5R SP nur eine sehr geringe Verzerrungen in der DNA verursacht. Die Basenpaarungseigenschaften sind nicht sichtbar beeinträchtigt. Alle Distanzen zwischen den Heteroatomen, welche Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, liegen zwischen 2.9 und 3.1 Å (Abbildung 29), was den Abständen für ideale H-Brücken entspricht.

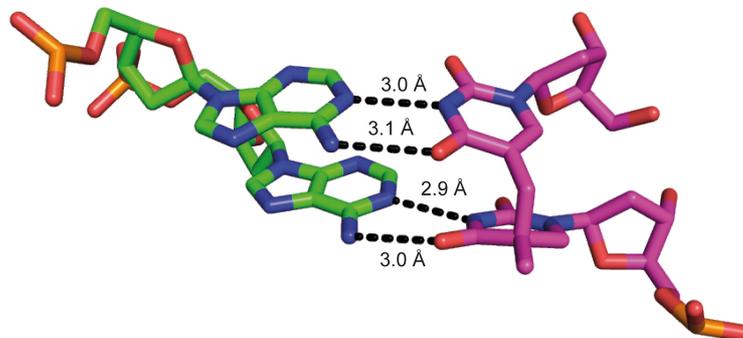


Abbildung 29: Wasserstoffbrückenbindungen im 5R SP-ApA-Basenpaar.

Eine Überlagerung von ungeschädigter DNA im Komplex mit *B. st.* Pol I (pdb 1NJY, Abbildung 30) zeigt eine Neigung der Basenebenen um einen Winkel von 30°, damit

die Bindung zwischen Methylgruppe und C5-Atom eingegangen werden kann. Dieser Knick hat jedoch nur lokale Auswirkungen (Abbildung 30, b). Auffallend ist, dass die fehlende Phosphordiesterverknüpfung zwischen den beiden Nucleosiden des Sporenphotoprodukts so gut wie keinen Einfluss auf den DNA-Duplex hat. Das Phosphat der überlagerten, ungeschädigten Nucleoside passt annähernd perfekt zwischen die 5'-Hydroxylgruppe des Thymidins und die 3'-Hydroxylgruppe des Dihydrothymidins.

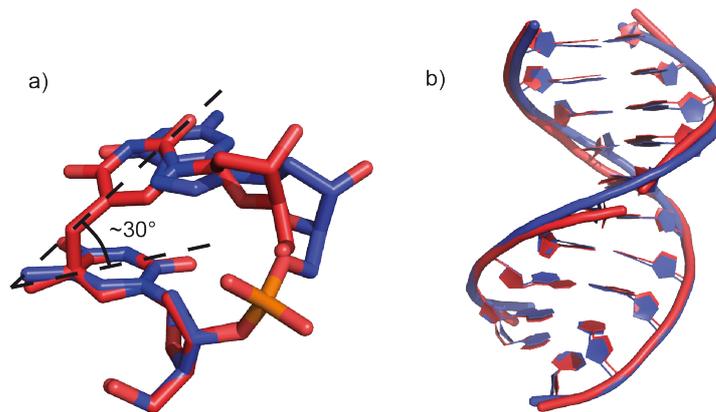


Abbildung 30: Überlagerung von 5R SP (in Rot) mit ungeschädigter DNA (in Blau, pdb 1NJY) auf a) Dinukleotid und b) auf Duplexebene.

Neben der Verdrillung der Basen ist der Winkel zwischen den beiden glykosidischen Bindungen ein guter Indikator für die verzerrenden Eigenschaften eines dimeren Schadens (Abbildung 31). Beim 5'→3' 5R Sporenphotoprodukt beträgt dieser Winkel ca. bei 20°. Dies ist einerseits deutlich größer als bei ungeschädigter DNA, wo die Bindungen im Idealfall parallel sein sollten (ca. 5° bei der Referenzstruktur 1NJY). Andererseits ist der Wert noch wesentlich kleiner als beim vergleichsweise wenig verzerrenden T(CPD)T Schaden (pdb 3MR3) wo 30° gemessen werden. Auch die Drehung der Basen ist beim CPD mit ca. 50° deutlich größer als die oben besprochenen 30° des Sporenphotoprodukts.

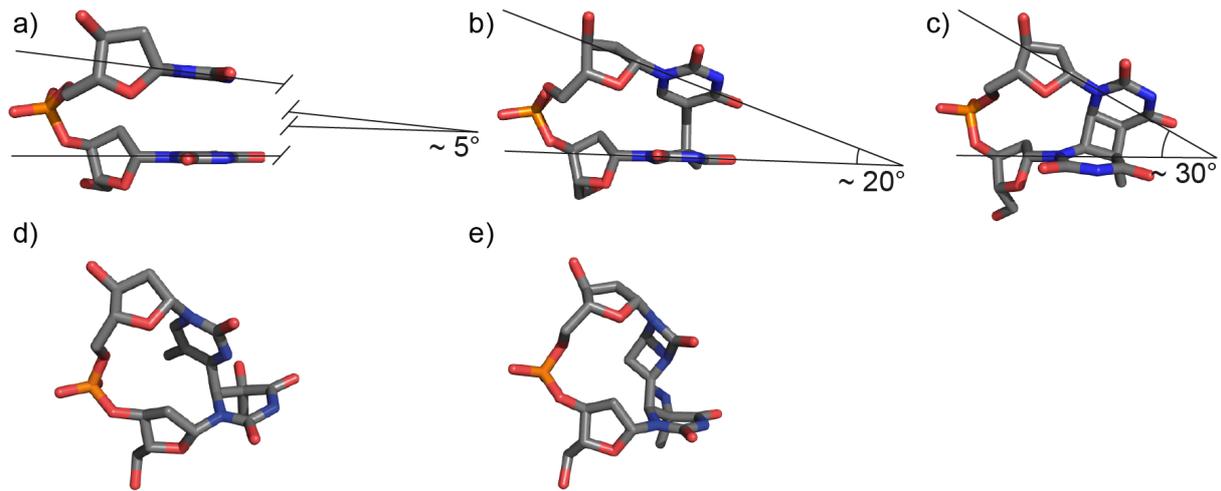


Abbildung 31: Darstellung des Winkels zwischen zwei glykosidischen Bindungen: a) ungeschädigte DNA (pdb 1NJY), b) 5R Sporenphotoprodukt und c) T(CPD)T. Bei dem d) T(6-4)T-Schaden und dem e) T(Dew)T stehen die Basen fast senkrecht zueinander. Die Phosphatgruppe des SP ist nachträglich modelliert.

Bei den anderen beiden Haupt-UV-Schäden, den (6-4) (pdb 3CVU) und den Dewar-Schäden (pdb 2WQ6), sind die 3'-Basen komplett verdreht. Die Duplexverzerrung ist dementsprechend weit dramatischer als beim CPD und somit auch dem Sporenphotoprodukt (Abbildung 31, unten). Das Sporenphotoprodukt ist damit das am schwächsten verzerrende UV-Dimer. Dies gilt sowohl im Vergleich mit Kristallstrukturen von Photoprodukten gebunden an Reparaturenzyme als auch mit NMR-Strukturen von UV-geschädigten Duplexen in Lösung.^[34] Da auch das Wasserstoffbrückenbindungsmuster zu einer TpT-Sequenz unverändert bleibt, ist davon auszugehen, dass die schädlichen Auswirkungen des Sporenphotoprodukts ebenfalls eher gering sind. Die veränderte Photochemie in Sporen verringert also nicht nur den Gesamtanteil an UV-Schäden, sondern bündelt diese zusätzlich in einem ungefährlicheren Schaden, der zudem noch einen effizienten Reparaturpfad über die Sporenphotoproduktlyase hat.

In der Kokkristallstruktur mit dem 5'→3' 5S Derivat sieht man, dass die Bindung an das Protein eine Duplexverzerrung nicht unterdrückt (Abbildung 32). Die Überlagerung von ungeschädigter DNA (pdb 1NJY) zeigt eine dramatische Verzerrung der B-Form DNA auf, was beweist, dass die Kokkristallisation mit *B. st.* Pol I durchaus in der Lage wäre starke Duplexverzerrungen abzubilden. Der Dihydrothymidinteil des 5S SP ist um 180° gedreht und die beiden freien Hydroxylgruppen sind mit 11 Å zu weit voneinander entfernt, so dass es unmöglich

ist, das offene Rückgrat mit einer Phosphatgruppe zu schließen. Es wird deutlich, dass das 5'→3' 5S Sporenphotoprodukt ein artifizielles Diastereomer ist, welches sich nicht in einer Duplexumgebung, in der die SP-Formation stattfindet, bilden kann.

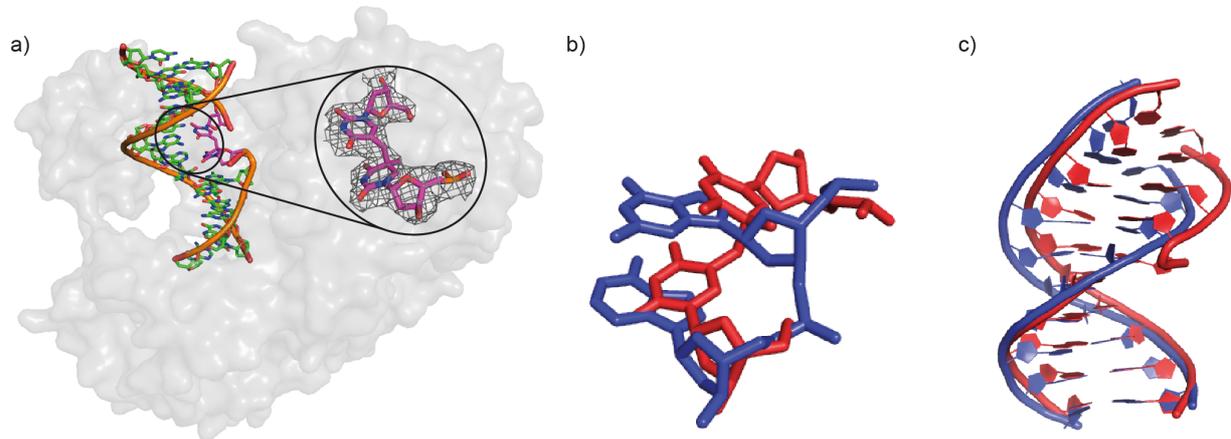


Abbildung 32: a) Überblick über die Kristallstruktur des Komplexes aus *B. st.* Pol I und 5'→3' 5S Sporenphotoprodukt enthaltender DNA (pdb 2y1i). Das Protein ist als graue Oberfläche und die DNA grün als Stäbchenmodell dargestellt. Der Schaden ist in Lila hervorgehoben und in der Vergrößerung mit der Elektronendichte bei 2σ überlagert. b) Überlagerung von 5S-SP (in Rot) mit ungeschädigter DNA (in Blau, pdb 1NJY) auf Dinukleotid und b) auf Doppelstrangebene.

Weiterhin wurde untersucht, ob das 5'→3' 5R Sporenphotoprodukt wie erwartet als Substrat der Sporenphotoproduktlyase akzeptiert und repariert wird. Die Überproduktion und die Reinigung der Sporenphotoproduktlyase aus *Geobacillus stearothermophilus* sowie die Reparatorexperimente in der *Glove Box* wurden von *Andrea C. Kneuttinger* optimiert und durchgeführt. Für die Reparatorexperimente wurden die 5R bzw. 5S SP enthaltenden Oligonukleotide ODN1 bzw. ODN2 unter anaeroben Bedingungen mit SPL gemischt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das Protein wurde ausgefällt, bevor die Reaktionslösung per HPLC analysiert wurde.

Die relevanten Retentionszeitabschnitte der Chromatogramme sind in Abbildung 33 dargestellt. Wie erwartet wird das 5R SP enthaltende Oligonukleotid ODN1 vollständig repariert. Die Sporenphotoproduktbildung wird revertiert und die benachbarten Thymidine gebildet. Da bei dem eingesetzten Analogon das Phosphat fehlt, werden durch das Wegfallen der Methylenbrücke zwei separate Stränge gebildet. Um die Identität der neu gebildeten Stränge nachzuweisen, wurden die DNA-Fragmente ODN5 und ODN6 (siehe Tabelle 3) per DNA-Festphasensynthese hergestellt und zusammen mit der Reaktionslösung koinjiziert. Da keine neuen

Absorptionsmaxima detektiert wurden, sondern nur die Signale der gebildeten Fragmente an Intensität zunahmen, konnte somit deren Identität eindeutig bewiesen werden. Das 5S SP enthaltende ODN2 wurde analog behandelt. Hierbei wurde keine Reparatur beobachtet, was die Substratspezifität der Sporenphotoproduktlyase für das 5'→3' 5R Sporenphotoprodukt noch einmal eindrücklich verdeutlicht.

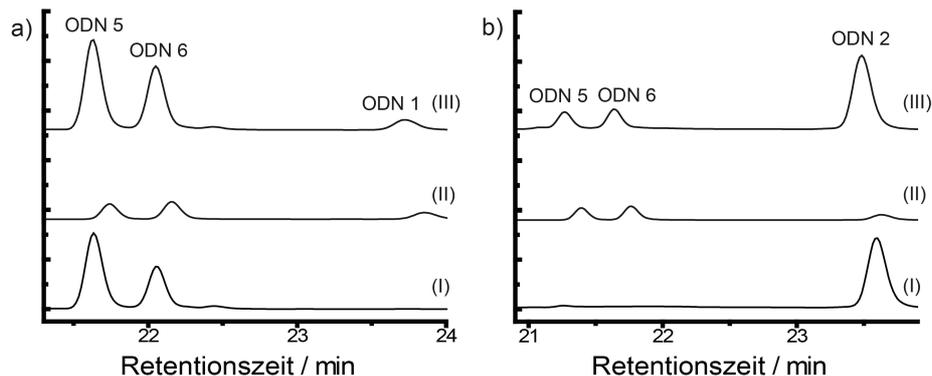


Abbildung 33: Beschreibung der HPLC-Analyse der Reparaturreaktion von SPL mit einzelsträngiger DNA. a) Chromatogramme mit 5R SP enthaltendem ODN1. (I) zeigt die inkubierte Mischung aus ODN1 und SPL. Da nur noch die beiden Fragmente ODN5 und ODN6 zu sehen sind, wurde der SP-Schaden vollständig repariert. (II) zeigt eine Mischung aus synthetisierten ODN1, ODN5 und ODN6. (III) zeigt die Koinjektion von ODN1, ODN5 und ODN6 mit (I). b) Chromatogramme mit 5S SP enthaltendem ODN2. (I) zeigt die inkubierte Mischung aus ODN2 und SPL. Da nur ODN2 sichtbar ist, wurde das 5S Diastereomer nicht repariert. (II) zeigt eine Mischung aus synthetisierten ODN2, ODN5 und ODN6. (III) zeigt die Koinjektion von ODN2, ODN5 und ODN6 mit (I).

Da DNA *in vivo* nicht als Einzelstrang, sondern als Duplex vorliegt, wurden die Reparaturuntersuchungen mit doppelsträngiger DNA wiederholt. Hierzu wurden die Oligonukleotide ODN1 bzw. ODN2 mit dem komplementären ODN4 hybridisiert und die auf diese Weise erhaltenen Duplexe mit der oben erwähnten SPL umgesetzt. Um einen stabilen Doppelstrang zu gewährleisten, wurde die Temperatur während der Umsetzung auf 20 °C reduziert. Ebenso wie beim Einzelstrang wurde ausschließlich das 5R SP repariert (siehe Abbildung 34). Da *Geobacillus stearothermophilus* zu den thermophilen Bakterien gehört und somit die Reaktionsstemperatur mit 20 °C deutlich unter dem optimalen Wert liegt, wurde hier jedoch kein vollständiger Umsatz erzielt.

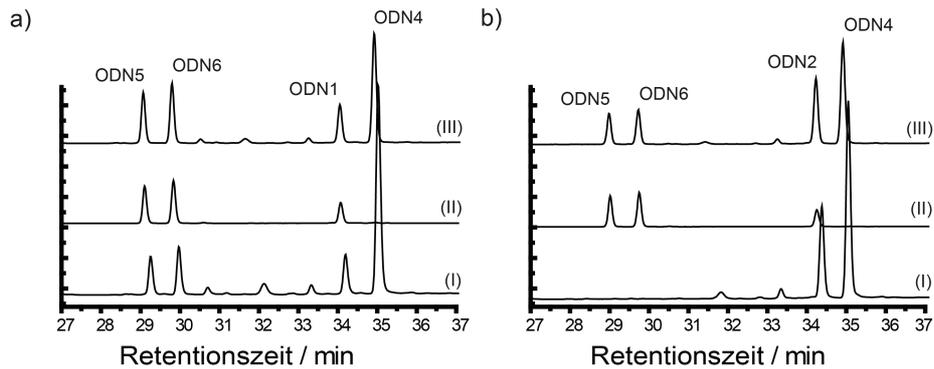


Abbildung 34: Beschreibung der HPLC-Analyse der Reparaturreaktion von SPL mit doppelsträngiger DNA, wobei ODN4 der ungeschädigte Gegenstrang ist. a) Chromatogramme mit 5R SP enthaltendem ODN1. (I) zeigt die inkubierte Mischung aus dem Duplex ODN1:ODN4 und SPL. Die Anwesenheit der Fragmente ODN5 und ODN6 beweist die Reparatur des Sporenphotoprodukts. (II) zeigt eine Mischung aus synthetisierten ODN1, ODN5 und ODN6. (III) zeigt die Koinjektion von ODN1, ODN5 und ODN6 mit (I). b) Chromatogramme mit 5S SP enthaltendem ODN2. (I) zeigt die inkubierte Mischung aus Duplex ODN2:ODN4 und SPL. Da nur ODN2:ODN4 sichtbar ist, wurde das 5S Diastereomer nicht repariert. (II) zeigt eine Mischung aus synthetisierten ODN2, ODN5 und ODN6. (III) zeigt die Koinjektion von ODN2, ODN5 und ODN6 mit (I).

3.5 Kokristallisation des Sporenphotoprodukts mit Sporenphotoproduktlyase

Um den Mechanismus der Sporenphotoprodukt-Reparatur weiter zu untersuchen, wurde das Sporenphotoprodukt, in Zusammenarbeit mit *Dr. Alhosna Benjdia* von der Arbeitsgruppe *Schlichting*, mit der Sporenphotoproduktlyase aus *Geobacillus thermodenitrificans* kristallisiert. Unter geeigneten Bedingungen (200 mM Lithiumchlorid, 100 mM Tris-HCl pH 9 und 19 – 27 % Polyethylenglycol 8000) wurden mit Hilfe der *hanging-drop vapor diffusion* Methode Kristalle mit und ohne Substrat erhalten. Als Substrat wurde dabei das 5R SP Nukleosid **28** (Abbildung 35) verwendet. Kristallisationsversuche mit verschiedenen Sporenphotoprodukt enthaltenden Oligonukleotiden (6-12mer, einzel- und doppelsträngig) blieben vorerst ohne Erfolg.

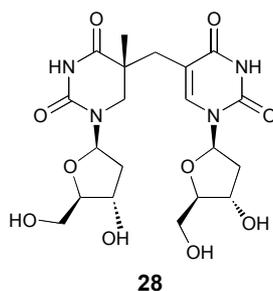


Abbildung 35: Darstellung des für Kristallisation und enzymatische Reaktionen verwendeten 5R SP Nucleosids 28.

Die Substratbindung erfolgt, wie später beschrieben (Abbildung 37), vorwiegend über die Basen. Deshalb erwiesen sich die Befürchtungen, dass das Substrat ohne Verbrückung zwischen den Zuckern zu flexibel ist und deshalb nicht ausreichend gebunden wird oder in verschiedenen Konformationen vorliegen könnte, als unbegründet. Wechselnde Konformationen sind mit Kristallstrukturanalyse, wo eine definierte, homogene Struktur unabdingbar ist, inkompatibel.

Die Kristalle wurden vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff mit Reservoirlösung behandelt, welche mit 3 mM Dithiothreitol, 500 mM NaCl und 15 % Ethylenglycol angereichert war, um Kälteschäden zu vermeiden. Zur experimentellen Phasenbestimmung wurde diesem Frostschutzmittel 100 mM „*magic triangle*“ (5-Amino-2,4,6-triiodoisophthalsäure, Jena Bioscience) zugegeben.^[170] Die Kristalle wurden an der Synchrotronstrahlenquelle PXII der *Swiss Light Source* (SLS) vermessen, wo sie bis 2.0 Å (mit SP) bzw. 2.2 Å (ohne Substrat) beugten. Die Phasen wurden durch anormale Streuung der vier Eisenatome des Eisen-Schwefel-Clusters sowie von drei proteingebundenen Iodatomen aus der „*magic triangle*“-Lösung bestimmt. Weitere Strukturen wurden durch isomorphen Ersatz unter Verwendung der substratfreien Struktur gelöst.

Die Sporenphotoproduktlyase hat eine für Radikal-SAM-Enzyme typische $(\alpha/\beta)_6$ -TIM-Fass-Struktur, welche auf einer Seite offen ist, um große Substrate wie DNA zu binden (Abbildung 36). Zusätzlich besitzt sie eine N-terminale α/β -Domäne, sowie eine lange β -Haarnadel am C-Terminus.

Der Eisen-Schwefel-Cluster wird von drei hoch konservierten Cysteinen koordiniert (Cys90, Cys94 und Cys97)^[171] und ist tief in der TIM-Fass-Struktur eingebettet, um ihn vom umgebenden Lösungsmittel abzuschirmen. Diese

Abtrennung wird durch den Kofaktor SAM, der über die Carboxyl- und Aminogruppe das vierte Eisen koordiniert, und gebundenes Substrat vervollständigt.

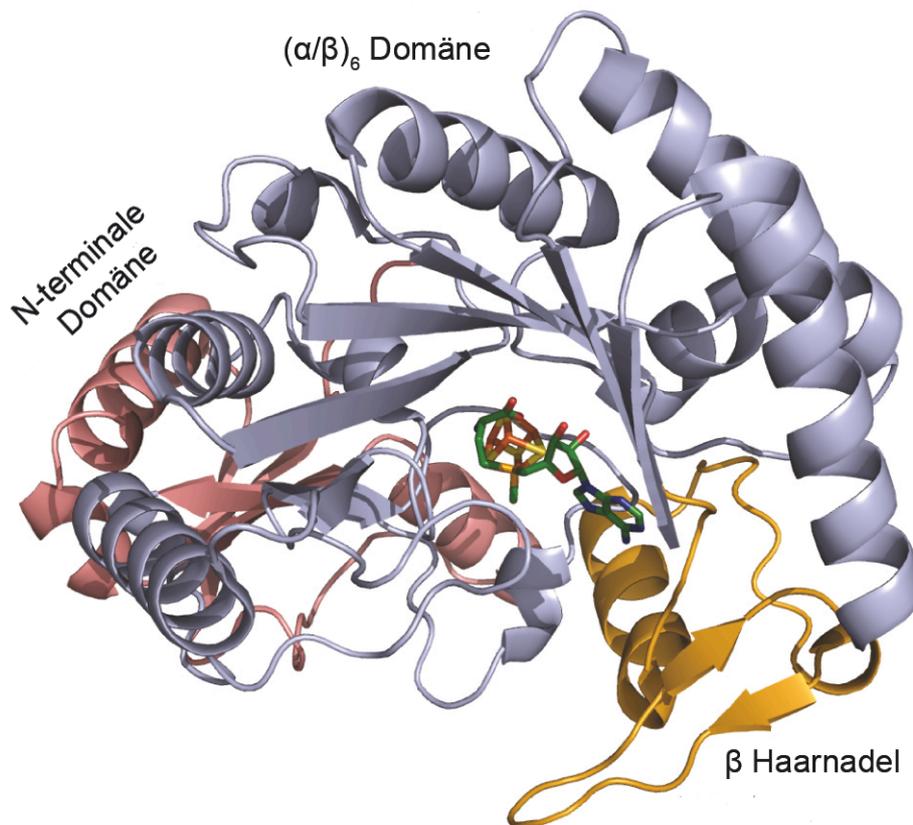


Abbildung 36: Darstellung der SPL aus *G. thermodenitrificans*. Die $(\alpha/\beta)_6$ Domäne ist in Violett, die N-terminale Domäne in Rosa und der Bereich um die β Haarnadel in Gelb dargestellt. Der Eisen-Schwefel-Cluster (orange) und SAM (grün) sind als Stabmodell gezeigt.

Das Substrat wird durch eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen fest im aktiven Zentrum gebunden (Abbildung 37 links). Bei der 5'-Base finden Interaktionen zwischen Arg193, Glu268, Tyr339 und der Carbonylgruppe am C4 sowie zwischen Tyr339 und dem N3 Stickstoff statt. Die 3'-Base wird über Wasserstoffbrückenbindungen mit Ser76, Lys77 und Ser79 gebunden. Bemerkenswert ist auch, dass im Kristallisationspuffer enthaltenes Pyrophosphat zwischen den Hydroxylgruppen der Desoxyriboseeinheiten, Arg273 und Lys309 koordiniert wird (Abbildung 37 rechts). Das Pyrophosphat nimmt also den Platz der Phosphatbrücke im natürlichen Substrat ein. Die Erkennung des Schadens erfolgt hauptsächlich über die Basen, was verdeutlicht, warum auch Substrate ohne Phosphatbrücke, wie das hier verwendete 5*R*-SP-Nukleosid und ein Sporenphotoprodukt mit Formacetalverbrückung,^[89] umgesetzt werden können. Die Interaktionen der positiv geladenen Aminosäuren mit dem Phosphatrückgrat erklärt

aber auch, warum diese Substrate langsamer umgesetzt werden als das natürliche.^[89, 141]

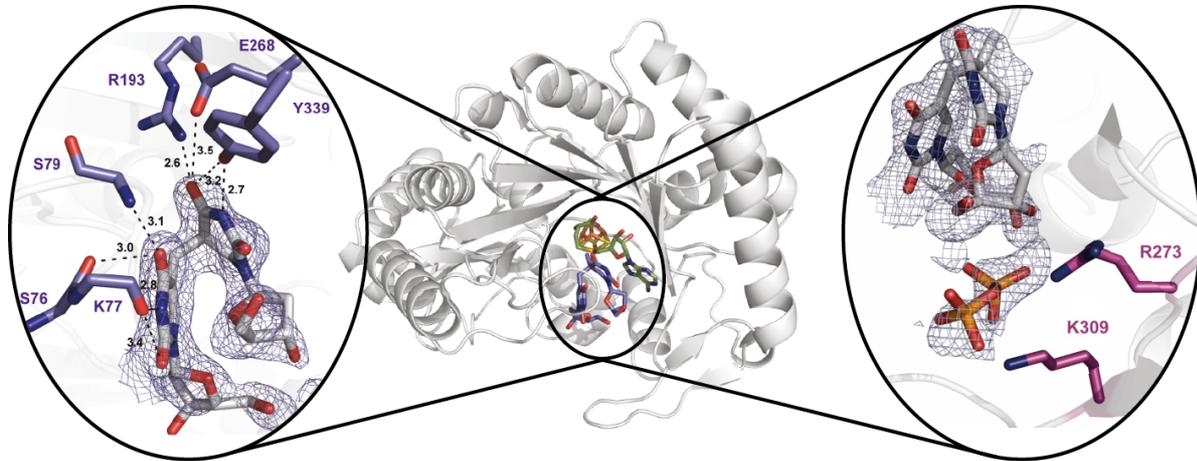


Abbildung 37: Darstellung der Substratbindung in der Sporenphotoproduktlyase. Das 5*R*-SP-Dinukleosid mit Elektronendichte (2.5σ) und Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum (Aminosäuren in Blau) bzw. zum Pyrophosphats (Aminosäuren in Magenta) wurde als Vergrößerung hervorgehoben. Distanzen sind in Å angegeben.

Die Überlagerung des 5*R*-SP-Nukleosids aus der SPL-Struktur mit der Kristallstruktur eines verbrückten Sporenphotoprodukts zeigt, dass die relevanten Stellen beinahe identisch sind (Abbildung 38).^[89] Lediglich die 5'-Desoxyribose ist verdreht, was jedoch nicht von Bedeutung ist, da die Zucker an der Reparaturreaktion nicht teilnehmen. Dies zeigt, dass mit den vorhandenen Daten die Reparatur eines natürlichen Schadens perfekt beschrieben werden kann.

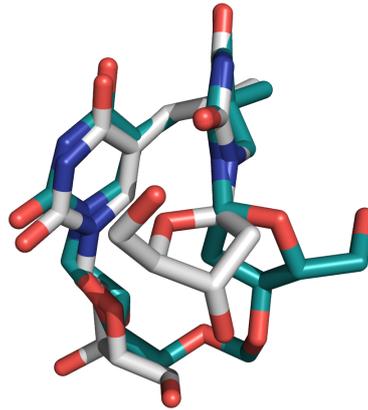


Abbildung 38: Überlagerung des 5R-SP-Dinukleosids aus der SPL-Struktur mit der Kristallstruktur eines formacetalverbrückten Sporenphotoprodukts.^[89]

Wie bei DNA-bindenden Enzymen üblich, hat die Sporenphotoproduktlyase eine große Fläche mit positiv geladenen Aminosäuren (Abbildung 39). Die Größe dieser DNA-Bindefläche passt gut zu der Interaktionsfläche von ca. 9 Basen, die durch DNase I Verdau von *Nicholson* vorhergesagt wurde.^[122] Die Orientierung des Dinukleosid-Schadens im Enzym (Abbildung 37) ähnelt sehr der anderer Photoschäden in den lichtabhängigen Photolyasen, so dass auch in der SPL ein „Flipping“-Mechanismus naheliegt.^[3, 9]

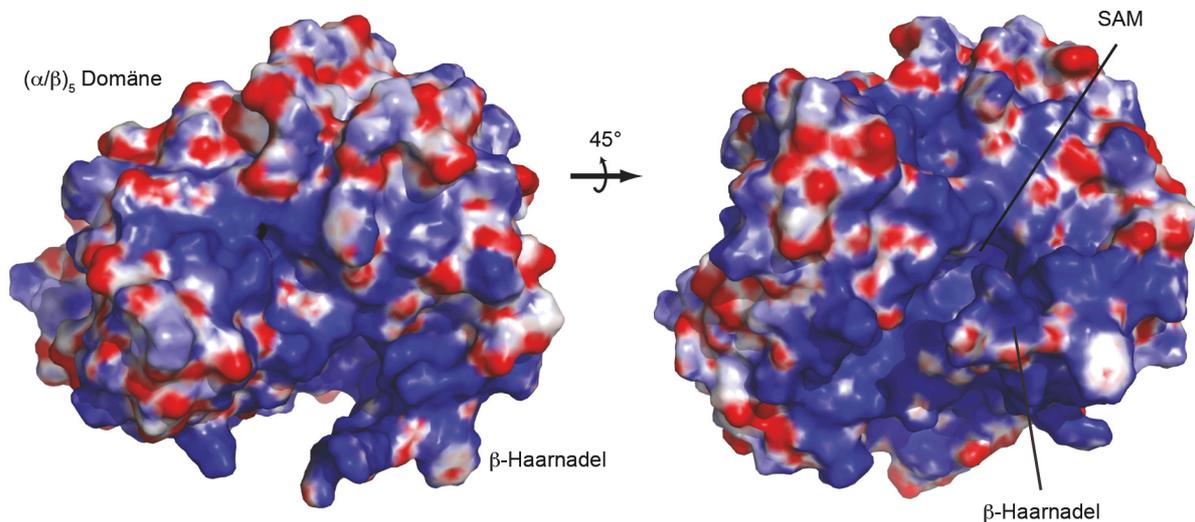


Abbildung 39: Elektrostatische Oberflächenkarte der SPL. Positiv geladene Aminosäuren werden in Blau und negativ geladene in Rot dargestellt (-10 kT/e bis 10 kT/e).

Interessanterweise befinden sich die Sulfationen an äquivalenten Positionen zu den Phosphaten in Photolyasen. Die Ähnlichkeit der Position wird durch die Überlagerung mit UV-geschädigter DNA in Komplex mit der (6-4)-Photolyase sichtbar

(Abbildung 40). Die Positionen der Sulfate und der Phosphate stimmen extrem gut überein und auch der (6-4)-Schaden sowie der Kofaktor FAD befinden sich in einer sehr ähnlicher Position zum 5R SP bzw. SAM. Es ist deutlich sichtbar, dass der Bindungsmodus in der SPL mit anderen DNA-Reparatur-Enzymen wie der (6-4)-Photolyase oder auch dem BER-Enzym FPG übereinstimmt,^[172] die ebenfalls einen „Flipping“-Mechanismus aufweisen.

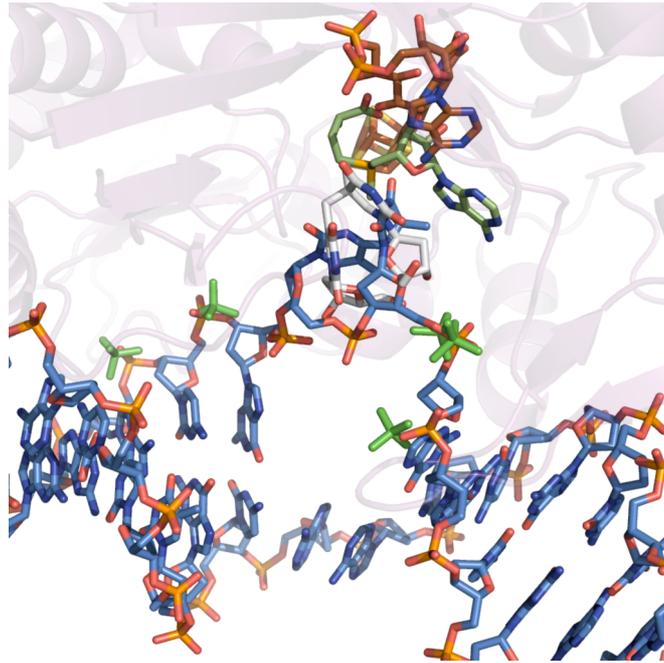


Abbildung 40: Überlagerung der SPL-Struktur mit gebundenem Substrat mit UV-geschädigter DNA in Komplex mit der (6-4)-Photolyase.^[9] Die Proteinumgebung ist in Magenta, 5R SP in Grau, der Eisen-Schwefel-Cluster in Orange, die Sulfationen der SPL-Struktur in Grün, FAD in Braun und die (6-4)-DNA in Blau dargestellt.

Die Konformationsänderungen im Enzym nach der Substratbindung passen ebenfalls zu diesem „Flipping“-Mechanismus (Abbildung 41). Die β -Haarnadelstruktur bewegt sich zum Enzym hin, um die Lücke, die bei einem Basen-„Flipping“ auftritt, zu kompensieren und das aktive Zentrum von Lösungsmittel abzuschirmen. Dabei bewegen sich ein Tyr305 und ein Arg304, wie es auch von anderen Enzymen mit „Flipping“-Mechanismus bekannt ist.^[173-174] Gleichzeitig bewegt sich Tyr98, um dem Substrat Platz zu machen und sich, wie später beschrieben, für die Reparatur optimal zu positionieren.

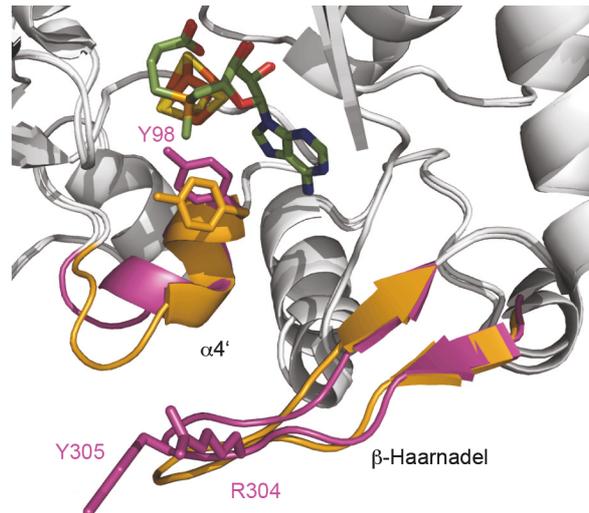
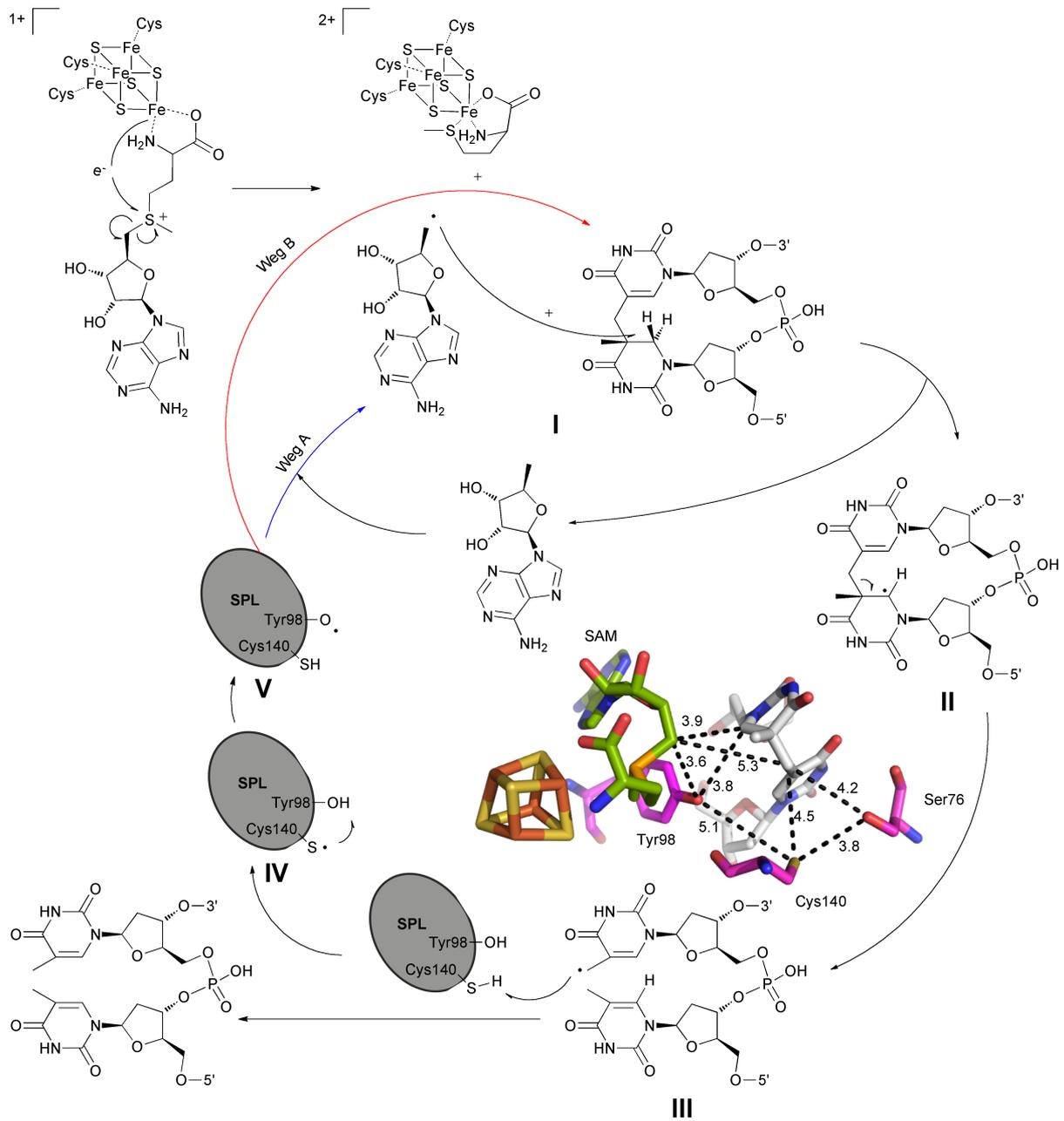


Abbildung 41: Überlagerung der SPL-Struktur mit (relevante Segmente in Magenta) und ohne gebundenes 5R SP (relevante Segmente in Orange). Änderungen finden in der $\alpha 4'$ -Helix und in der β -Haarnadelstruktur statt.

Auf Basis dieser Struktur lässt sich der in der bisherigen Literatur beschriebene Mechanismus beurteilen und verfeinern. Das C5' von SAM bzw. das 5'-dA-Radikal befindet sich mit 3.9 Å im perfekten Abstand für die Entfernung des pro*R*-Wasserstoffatoms am C6 des Dihydrothymins, wodurch die Reparatur eingeleitet wird (Schema 13, I).^[142, 175] Nach der β -Fragmentierung des SP-Schadens (II) bleibt, neben dem reparierten 5'-Thymidin, das Allylradikal auf der 3'-Base zurück (III). Ursprünglich wurde vorgeschlagen, dass jetzt direkt die Regeneration des 5'-dA-Radikals durch einen Wasserstofftransfer auf die Methylgruppe der 3'-Base erfolgt.^[135] Diese direkte Übertragung erscheint jedoch bei einer Distanz von 5.3 Å eher unwahrscheinlich. Mit einem Abstand von 4.3 Å befindet sich das Cystein 140 in einer deutlich besseren Position für diese Reaktion (IV). Nach der β -Fragmentierung sollte dieser Abstand noch einmal deutlich geringer werden, da die Basen nicht mehr verbunden sind und sich voneinander entfernen. Die Funktion als Wasserstoffdonor passt auch zu Untersuchungen, nach denen das Wasserstoffatom an dieser Methylgruppe nicht von 5'-dA stammt, sondern aus einer Quelle, die wie das Cystein mit dem Lösungsmittel Protonen austauscht.^[134]



Schema 13: Möglicher Reparaturmechanismus der Sporenphotoproduktlyase. Als Inlay ist das aktive Zentrum der SPL (magenta) mit 5R-SP (grau), SAM (grün) und Eisen-Schwefel-Cluster (orange) zusammen mit relevanten Abständen (in Å) gezeigt.

Um die Funktion dieser Aminosäure weiter zu untersuchen, wurden Reparaturstudien mit dem 5R-SP-Dinukleosid und der Wildtyp SPL sowie C140A und C140S-Mutanten durchgeführt. Beide Mutanten zeigen eine um den Faktor 2.5 verringerte Thymidinproduktion, was dafür spricht, dass diese Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Reparatur spielen (Abbildung 42). Kristallstrukturen der beiden Mutanten zeigen keine signifikanten Änderungen, was eine strukturelle Rolle

ausschließt. Die Kristallstrukturen sind wegen Redundanz nicht abgebildet, aber frei in der PDB-Datenbank verfügbar.

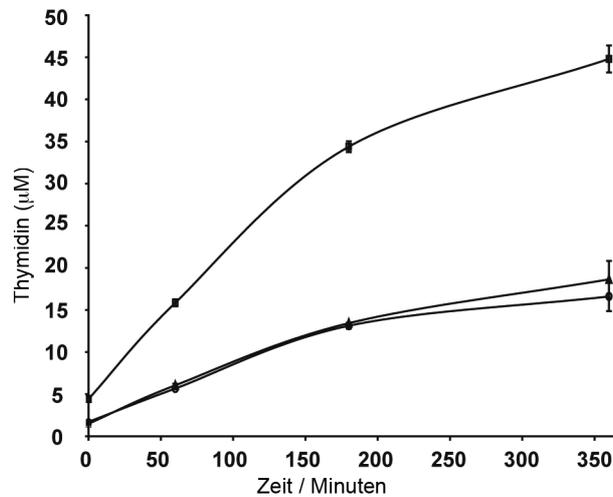


Abbildung 42: Entstandene Thymidinmenge bei der Reparaturreaktion des 5*R*-SP-Dinukleosids mit Wildtyp (Quadrate), C140A (Dreiecke) und C140S (Kreise) SPL in Abhängigkeit der Zeit.

Im Gegensatz zum sehr artifiziellen Dinukleosidschaden, welcher oft nur in Spuren umgesetzt wird, wird das SP enthaltende Oligonukleotid 5'-CAG CGG T(SP)TG CAG G-3' meist vollständig umgesetzt, was eine Analyse der Produkte durch MALDI-MS ermöglicht (Abbildung 43). Bei der Analyse der Reaktion mit dem Wildtyp Protein sind neben Spuren von Edukt ($m/z \approx 3952$) nur die Molekulargewichte der beiden nach der Reparatur entstehenden Oligonukleotide nachweisbar ($m/z \approx 1830$ für das Fragment auf der 3'-Seite und $m/z \approx 2119$ auf der 5'-Seite der Spaltung). Im Fall der C140A- und auch im Fall der C140S-Mutante erscheint in der Nähe des 3'-Fragments ein neues Signal mit $m/z \approx 1894$. Diese Differenz von $m/z = 64$ entspricht einem SO_2 -Addukt, wie es bereits für eine C140A-Mutante bei einem SP-Dinukleotid beschrieben wurde.^[136] Durch das fehlende Phosphatrückgrat in Kombination mit den flankierenden Oligonukleotidsequenzen, die auf 3'- und 5'-Seite unterschiedlich sind, kann hier die Position des SO_2 -Addukts eindeutig der 3'-Base zugeschrieben werden, was in den Untersuchungen von *M. Atta* nicht möglich war. Dies untermauert die angenommene Funktion von Cys140 als Wasserstoffdonor weiter. Das Allylradikal auf der 3'-Base kann nicht effizient kontrolliert werden und reagiert deshalb mit Dithionit aus dem Puffer.

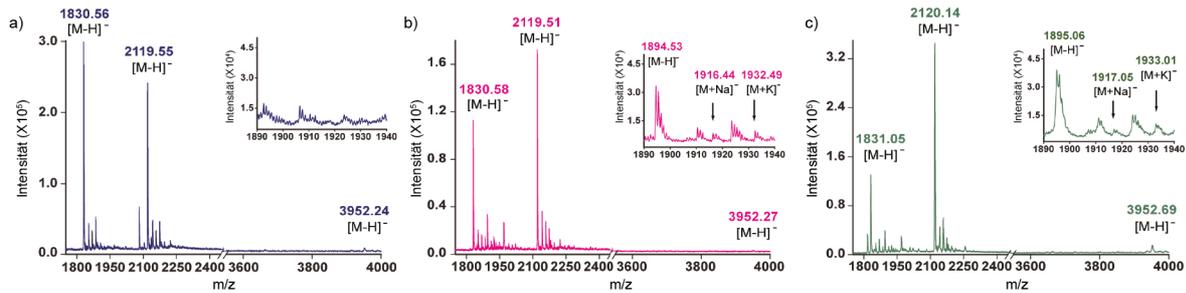


Abbildung 43: MALDI-Spektren der Reparaturreaktion zwischen dem SP geschädigter DNA und a) Wildtyp (blau), b) C140A (magenta) und c) C140S SPL (grün). Der Bereich von $m/z = 1890$ bis 1940 ist jeweils vergrößert eingefügt. Die Signale sind wie folgt zugeordnet: Edukt $m/z \approx 3952$, $m/z \approx 2119$ 5'-Fragment des reparierten Oligonukleotides, $m/z \approx 1830$ 3'-Fragment des reparierten Oligonukleotides und $m/z \approx 1894$ SO_2 -Addukt des 3'-Fragments.

Die Position von Tyr98 zwischen Cys140 und dem Kofaktor SAM lässt vermuten, dass diese Aminosäure ebenfalls am Wasserstoff- bzw. Radikaltransport beteiligt ist (Schema 13, V). Dafür spricht ebenfalls das energetische Niveau eines Tyrosylradikals, das in etwa einem Radikal auf einem Cystein entspricht.^[137] Eine Mutation dieses Tyrosins in ein Phenylalanin bzw. ein Alanin verlangsamt die Reparaturreaktion in beiden Fällen, bei Ersterem jedoch wesentlich stärker (Spektrum nicht gezeigt). Die Kristallstrukturen (in der PDB-Datenbank hinterlegt) zeigen, dass dies ebenfalls nicht auf Änderungen der Gesamtstruktur zurückzuführen ist. Die r.m.s.d beträgt hierbei 0.15 \AA für die Y98F- und 0.14 \AA für die Y98A-Mutante. Vermutlich dient das Tyr98 als Wasserstoffdonor für Cys140. Mit einem aprotischen, raumfüllenden Phenylalanin an Position 98 ist dies jedoch nicht möglich. Bei einem kleineren Alanin an dieser Stelle entsteht hingegen eine Lücke, durch die ein alternativer Radikaltransport, wenn auch mit verminderter Effizienz, möglich wäre.

Um die Bedeutung dieser beiden Aminosäuren im Katalysezyklus weiter zu untersuchen wurden von *Andrea Kneuttinger* die Cystein zu Alanin bzw. Tyrosin zu Phenylalanin Mutanten ebenfalls von der Sporenphotoproduktlyase aus *Geobacillus stearothermophilus* hergestellt und mit 5R-SP enthaltender, doppelsträngiger DNA untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei diesen Mutanten immer mehr SAM als DNA umgesetzt wird. Beim Wildtyp hingegen wird mehr DNA als SAM verwendet. Beide Mutationen bewirken also, dass SAM nicht mehr katalytisch sondern als Kosubstrat verwendet wird.

Im weiteren Verlauf der Reparaturreaktion sind nun verschiedene Varianten möglich: Unter der Annahme, dass SAM ein Kofaktor ist, also katalytisch wirkt und regeneriert wird, würde nun an der 5'-Position von 5'-dA ein Wasserstoff abstrahiert werden (Schema 13, Weg A (blau)). Diese Reaktion zum 5'-dA• ist jedoch sehr endotherm. Um sie zu ermöglichen, muss die Energie durch das Protein und eine angekoppelte, exotherme Bildung von SAM aus Methionin und 5'-dA bereitgestellt werden.^[138-139] Insgesamt erscheint die Regeneration von SAM durch ein Tyrosylradikal jedoch mit einer Energiedifferenz von ca. 60 kJ mol⁻¹ sehr unwahrscheinlich.^[137]

Eine weitere denkbare Variante wäre, dass das Radikal auf Tyr98 und Cys140 verweilt, bis neues Substrat gebunden wird. Tyrosyl- und Cysteinylnradikale sind energetisch relativ stabil und die Interaktion zwischen den beiden energetisch ähnlichen Aminosäureresten könnte das Radikal weiter stabilisieren. Ob dieses Radikal bis zur nächsten Substratbindung stabil bleibt, ist jedoch ungewiss, obwohl ein ähnlicher Mechanismus für Glycyl-Radikal-Enzyme bekannt ist.^[176] Die Beobachtung von *Li et al.*, dass nur das pro-R-Wasserstoffatom abstrahiert wird, passt jedoch nicht optimal in dieses Schema, da Tyr98 näher am pro-S-Wasserstoffatom liegt (Schema 13, Weg B (rot) und eingelegte Struktur).^[134] Eine entsprechende Bewegung der Aminosäuren nach Spaltung von SP und SAM ist jedoch nicht auszuschließen. In weiterführenden Experimenten könnte durch Kristallisation von SPL mit SAM und ungeschädigter DNA bzw. Dinukleotid untersucht werden, ob eine entsprechende Bewegung stattfindet. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass in den Experimenten von *Li* und Mitarbeitern nur eine Umsetzung pro SAM vonstatten ging, wie es bei einem großen Enzymüberschuss zu erwarten wäre. Wenn wesentlich mehr Protein vorhanden ist als DNA wird diese bereits zu Beginn der Reaktion vollständig gebunden. Das bedeutet, dass bereits mit der Initiation der Katalyse sämtliches SP repariert wird. In diesem Fall wäre die pro-R-Spezifität, wegen den Positionen von SAM und SP (Schema 13, eingelegte Struktur) einleuchtend.

Um zwischen Weg A und B zu unterscheiden sind weiterführende Experimente, beispielsweise mit deuteriertem SAM notwendig. Wenn 5'-dA• regeneriert wird (Schema 13, Weg A) sollte nach mehreren Katalysezyklen die C5'-Position vollständig mit Protonen versehen sein, während bei Weg B, wo die

Reaktion durch das Tyrosylradikal verläuft, immer zwei Deuteriumatome an C5' verbleiben sollten. Sollte sich letzterer Weg als korrekt herausstellen, was wegen der sehr hohen Aktivierungsenergie die in Weg A vorkommt (ca. 60 kJ mol^{-1}) wahrscheinlich ist, wäre die Sporenphotoproduktlyase der erste bekannte Vertreter einer neuen Klasse von Radikal-SAM-Enzymen mit einem persistenten Tyrosyl-Radikal. Diese könnte man analog zu den Glycyl-Radikal-Enzymen^[176] als Tyrosyl-Radikal-Enzyme bezeichnen.

4. Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Methoden

Für alle nicht wässrigen Reaktionen wurden ausgeheizte Glasapparaturen mit einer Stickstoff-Schutzgas-Atmosphäre verwendet. Kommerziell erhältliche Reagenzien von *Sigma-Aldrich* oder *Fluka* wurden, soweit nicht anders vermerkt, direkt ohne weitere Behandlung verwendet. Lösungen wurden in einem Rotationsverdampfer der Firma *Heidolph in vacuo*, mit einer *Vario PC2001* Membranpumpe entfernt. *Flash* Säulenchromatographie wurde unter Verwendung von *Merck Geduran Si 60* Kieselgel durchgeführt. Dünnschichtchromatographie wurde auf *Merck 60* (Kieselgel F₂₅₄) Platten durchgeführt, wobei die Substanzen entweder durch Fluoreszenzquenching oder durch Anfärben mit Anisaldehyd^[177] sichtbar gemacht wurden. ¹H und ¹³C NMR-Spektren wurden auf *Varian Mercury 200*, *Varian INOVA 400*, *Varian VNMRS 300* und *Varian VNMRS 600* Spektrometern in deuterierten Lösungsmitteln aufgenommen und auf den Lösungsmittelpeak kalibriert. Die Multiplizitäten wurden mit den Abkürzungen s = Singulett, d = Duplett, t = Triplet, q = Quartet und m = Multiplett und ihren Kombinationen bezeichnet. ESI-HRMS wurde auf einem *Thermo Finnigan LTQ FT-ICR* Gerät durchgeführt. MALDI-MS Spektren wurden auf einem *Bruker Autoflex II* aufgenommen. Für Oligonukleotide wurde HPA (50 mg 3-Hydroxypicolinsäure, 10 µL 15-Krone-5 und 10 mg Ammoniumhydrogencitrat in 1 mL Acetonitril/Wasser 1:1) und für kleine Moleküle Dihydroxybenzoesäure (DHB gesättigt in Acetonitril/Wasser 1:1) als Matrix verwendet. Molekularsieb wurde durch Ausheizen bei 350 °C *in vacuo* getrocknet. DNA Konzentrationen wurden mit einem *NanoDrop ND-1000* Spektrometer (*Peglab*) bei 260 nm bestimmt. Der Absorptionskoeffizient der Oligonukleotide wurde durch aufsummieren der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen errechnet. Für das Sporenphotoprodukt wurde der Wert eines einzelnen Thymidins verwendet, da die Dihydrothymidineinheit nicht bei 260 nm absorbiert. Da CPD, (6-4) und Dewar-Schäden ebenfalls nicht nennenswert bei 260 nm absorbieren, wurden diese bei der Berechnung vernachlässigt.

4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Trennung der Sporenphotoprodukt diastereomere wurde auf einem *Merk-Hitachi* System (*L-7400* UV-Detektor, *L-7100* Pumpe) unter Verwendung einer *VP 250/40 Nucleodur 100-5* Säule von *Macherey-Nagel* durchgeführt. Die Elution erfolgte dabei isokratisch mit einem Gemisch aus Heptan, Ethylacetat, i-Propanol und Acetonitril im Verhältniss 580:380:39:1. Die Analyse und Trennung von Oligonukleotiden wurde auf HPLCs der Firma *Waters* (analytisch: *Alliance 2695* mit *PDA 2996*; präparativ: *1525EF* mit *2484* UV Detektor) durchgeführt. Dabei wurde Gradienten aus 0.1 M NH_4OAc in Wasser (Puffer A) und in 80% Acetonitril (Puffer B) verwendet.

4.3 Oligonukleotidsynthese und Entschützung

DNA-Festphasensynthese wurde unter Standardbedingungen auf einem *Expedite 8909* von *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Für Sonderbasen wurde die Kupplungszeit verdoppelt. Phosphoramidite und Trägermaterialien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von *Amersham*, *Glen Research* oder *PE Bioscience* bezogen. Die Entschützung der SEM-Gruppen wurde durch Spülen des Trägermaterials mit 20 mL einer 1 M Lösung von SnCl_4 in DCM bei Raumtemperatur für 1 Stunde erreicht. Das Trägermaterial wurde durch Spülen mit 20 mL DCM gereinigt und anschließend getrocknet. Die Abspaltung der Oligonukleotide vom Träger, sowie die Entschützung der permanenten Basenschutzgruppen wurde durch Behandlung mit 1 mL einer gesättigten Lösung von Monomethylamin in einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und Wasser bei 65 °C für eine Stunde erreicht. Die Lösung wurde vom Träger abgetrennt und *in vacuo* getrocknet. Für die Entfernung von TBDPS-Gruppen wurde der Rückstand nun in 100 μL trockenem DMSO aufgenommen und mit 125 μL TEA•3HF versetzt. Diese Lösung wurde für eine Stunde bei 65 °C geschüttelt, auf 0 °C abgekühlt und das schutzgruppenfreie Oligonukleotid durch Zugabe von 25 μL 3 M Natriumacetat und 1 mL *n*-Butanol bei -80 °C für eine Stunde gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat durch Dekantieren von Butanol befreit, zweimal mit Ethanol gewaschen, *in vacuo* getrocknet und durch HPLC gereinigt.

4.4 *B. st. Pol I* Aufreinigung, Kristallisation und Strukturlösung

B. st. Pol I wurde nach einem von *Dr. Markus Müller* entwickelten Literaturprotokoll von *Kerstin Kurz* überproduziert und aufgereinigt.^[169] Für die Kokristallisation wurden die Oligonukleotide mit dem Primer im Proteinlagerpuffer (10 mM Na-Cacodylat pH 7, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA und 10 mM MgSO₄) hybridisiert. *B. st. Pol I* (5 mg/ml Endkonzentration) und DNA (0.5 mM Endkonzentration) wurden vereinigt, 1:1 mit Reservoirlösung (45-50 % (NH₄)₂SO₄, 3.5-4.5 % MPD und 100 mM MES pH 5.8) gemischt und mittels der *hanging-drop vapor diffusion* Methode bei 18° C kristallisiert. Vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Kristalle mit einer Mischung aus 24% Saccharose, 55% (NH₄)₂SO₄, 3.0–3.5% MPD und 100 mM MES behandelt und dann an der Strahlenquelle *PX III* der *Swiss Light Source* (Villigen, Schweiz) vermessen. Die Prozessierung der erhaltenen Reflektionsdaten wurde mit den Programmen XDS^[178] und SCALA^[179] durchgeführt. Die Strukturen wurden durch isomorphen Ersatz mit dem Programm PHASER^[180], unter Verwendung der Koordinaten 1U45, durchgeführt. Die Temperaturfaktoren wurden vor der Modellierung mit COOT^[181] auf 20 für die Proteinhauptkette bzw. 40 für die Proteinnebenketten und die DNA gesetzt. *Restrained refinement* wurde mit REFMAC5 durchgeführt.^[179] Statistiken der Datenprozessierung und des *refinement* sind in Tabelle 4 aufgeführt.

4.5 SPL aus *G. stearothermophilus*. Aufreinigung und Reparatorexperimente

Die Arbeiten an der Sporenphotoproduktlyase aus *G. stearothermophilus* wurden von *Andrea C. Kneuttinger* durchgeführt. Details sind von ihr zu erfragen. Vereinfacht wurden dabei wie folgt vorgegangen. Das codierende Gen (ADU94823) wurde unter Verwendung der Primer 5'-CACCATGAAACCGTTTGTGCCAAAACCTT-3' und 5'-TTACGTAAAATACTGCACTTGGG-3' aus genomischer DNA mittels PCR hergestellt. Das PCR Produkt wurde erst durch Ligation in den *pENTR/TEV/D-TOPO®* und anschließend mittels des *Gateway Systems* (*Invitrogen*) in den *pDEST17* Vektor übertragen und anschließend in *Tuner(DE3)pLysS* (*Novagen*) Zellen transformiert. Die Zellen wuchsen bei 37 °C in *Luria Bertani* Medium, angereichert mit 100 µg/mL Carbenicillin und 100 µM Fe(III)-Citrat, bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6-0.7, bevor durch

Zugabe von IPTG die Proteinexpression induziert wurde. Die induzierten Zellen wurden eine Stunde bei 22 °C, anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert und unter strikt anaeroben Bedingungen mit 10x *BugBuster*[®] (*Novagen*) in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 0.5 % Tween-20 und 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.0 aufgeschlossen. Das mit einem His₆-Tag versehene Protein wurde durch Nickel Affinitäts Chromatographie nach der *bach* Methode (Waschpuffer 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazole, 0.5 % Tween-20, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.0 und Elutionspuffer 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazole, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.0) gereinigt. Die SPL wurde in Lagerpuffer (50 mM HEPES (pH 8.0), 300 mM NaCl und 5 mM DTT) ankonzentriert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Reparaturexperimente wurde das Enzym für eine Stunde mit 4 mM Natriumdithionit behandelt und DNA im Verhältnis 3:1 versetzt. Die Reaktionsmischung enthielt außerdem 3 mM Natriumdithionit, 5 mM DTT und 1 mM SAM. Die Reaktion wurde über Nacht bei 37 °C bzw. 20 °C inkubiert, das Protein ausgefällt und der Überstand durch HPLC analysiert.

4.6 SPL aus *G. thermodenitrificans*. Aufreinigung, Reparaturexperimente, Kristallisation und Strukturlösung

Diese Arbeiten wurden in großen Teilen von *Dr. Alhosna Benjdia* durchgeführt, weshalb hier nur ein gekürzter Überblick gegeben wird. Details sind der entsprechenden Publikation zu entnehmen oder von *Dr. Benjdia* zu erfragen. Das SPL Gen aus *G. thermodenitrificans* wurde, optimiert für die Expression in *E. coli*, von GeneArt (Regensburg) synthetisiert. Die mit einem His₆-Tag versehene SPL wurde in *E. coli* expremiert und nach Zelllyse durch Ni-NTA- und Heparin-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Die Mutanten wurden mit QuickChange[®] Mutagenese erzeugt und ansonsten wie die Wildtyp SPL behandelt. Die Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters erfolgte anaerob mit Natriumsulfid und Ammoniumsulfat. Die SPL wurde mittels der *hanging-drop vapor diffusion* Methode in Anwesenheit von SAM bzw. Se-SAM kristallisiert. Ein Teil der Kristalle wurde außerdem mit 5R-SP-Lösung behandelt die zusätzlich Pyrophosphat/Hexamethaphosphat enthielt. Als Kryolösung diente die Reservoirolösung, welche mit 3 mM Dithiothreitol, 500 mM NaCl und 15% Ethylenglycol angereichert war, um Kälteschäden zu vermeiden. Zur experimentellen

Phasenbestimmung wurde 100 mM „magic triangle“ (5-Amino-2,4,6-triiodoisophthalsäure, Jena Bioscience) zugesetzt.^[170] Die Kristalle wurden an der Synchrotronstrahlenquelle PXI der *Swiss Light Source* vermessen. Die Phasen wurden durch anormale Streuung der vier Eisenatome des Eisen-Schwefel-Clusters, sowie von drei proteingebundene Iodatomen aus der „magic triangle“-Lösung bestimmt. Bei Substrat gebundener SPL und den Mutanten wurde die Struktur durch Fourier Synthese bestimmt. Für die Reparaturexperimente wurde die reduzierte SPL wie oben beschrieben mit SP-Dinukleosid bzw. SP-DNA behandelt. Die Thymidinproduktion wurde durch HPLC und die Reparatur der Oligonukleotide durch MALDI-TOF analysiert.

4.7 Herstellung von (6-4), Dewar und Sporenphotoprodukt enthaltender DNA durch Belichtung

Für die Herstellung von (6-4)-Schäden in DNA wurden Oligonukleotide in entgastem Wasser gelöst (20 - 50 μM) und unter anaeroben Bedingungen, in 10 cm Abstand zur UV Lampe (254 nm, Vilber Lourmat VL-215C, 2 x 15 W 254 nm Röhren, Itf Labortechnik GmbH & Co. KG) belichtet. Um die Verdunstung zu minimieren wurde die Lösung auf ca. 4 °C gekühlt. Nach der Entfernung des LM *in vacuo* wurde der Rückstand durch *rp*-HPLC gereinigt. Die Umwandlung zum Dewar Valenzisomer erfolgte aerob in einem 1 mL Reaktionsgefäß aus Polypropylen in 20 cm Abstand zur UV Lampe (365 nm, Vilber Lourmat VL-315.BL, 3 x 15 W 365 nm Röhren, Itf Labortechnik GmbH & Co. KG). Zur Herstellung von SP-Oligonukleotiden wurde DNA im Belichtungspuffer gelöst (0.125 μM Oligonukleotid, 50 mM DPA, 5 mM CaCl_2 , pH 7.0) und in einer Polypropylenschale gefrieretrocknet. Der Trockenfilm wurde unter anaeroben Bedingungen in 10 cm Abstand zur UV Lampe (254 nm, Vilber Lourmat VL-215C, 2 x 15 W 254 nm Röhren, Itf Labortechnik GmbH & Co. KG) belichtet und anschließend durch *rp*-HPLC analysiert bzw. gereinigt.

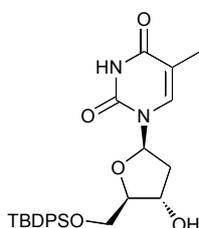
4.8 (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. Aufreinigung und Reparaturexperimente

Die Herstellung, Reinigung und Reparaturexperimente von (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* wurden von *Dorothea Matschkal* und *Dr. Emine Kaya* nach

Literaturvorschrift durchgeführt.^[9-10] Vereinfacht wurde das (6-4) bzw. Dewar-geschädigte Oligonukleotid zusammen mit der Photolyase in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin) gelöst und anschließend mit 20 cm Abstand zur Lampe (Weißlicht, 1 x 15 W Leuchtstoffröhre) bestrahlt. Vor der Analyse durch *rp*-HPLC wurde das Enzym durch Hitze denaturiert und abzentrifugiert.

4.9 Synthese der Sporenphotoprodukt-Analoga

5'-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-thymidin **29**



Eine Lösung aus Thymidin (21.5 g, 88.8 mmol), DMAP (288 mg, 2.36 mmol) und TBDPSCI (26.9g, 108 mmol) in 250 mL Pyridin wurde über Nacht bei 0 °C gerührt. Nach entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in Chloroform (100 mL) aufgenommen, mit ges. wässr. NaCl Lsg. (2 x 100 mL) extrahiert und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel-60, CHCl₃/MeOH 20:1) wurde **29** (32.0 g, 75 %) in Form eines farblosen Öls erhalten.

$R_f = 0.20$ (CHCl₃/MeOH 20:1).

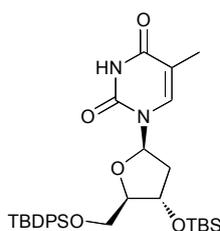
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): $\delta = 11.32$ (s, 1H; NH), 8.31 (s, 1H, CH(6)), 7.67 – 7.61 (m, 4H, C_{ar}H), 7.50 – 7.38 (m, 6H, C_{ar}H), 6.21 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, C(1')H), 5.32 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, C(3')OH), 4.34 (bs, 1H, C(3')H), 3.93 – 3.73 (m, 3H, C(4')H, C(5')H₂), 2.20 – 2.11 (m, 2H, C(2')H₂), 1.51 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, C(5)-CH₃), 1.01 (s, 9H, C(CH₃)₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ = 163.5 (CO), 150.3 (CO), 135.4 (CH(6)), 135.0 ($C_{ar}H$), 134.8 ($C_{ar}H$), 132.8 (C_{ar}), 132.4 (C_{ar}), 129.9 ($C_{ar}H$), 129.9 ($C_{ar}H$), 127.9 ($C_{ar}H$), 127.9 ($C_{ar}H$), 109.5 (C(5)), 86.4 (CH(4')), 83.6 (CH(1')), 79.1 (CH(3')), 64.0 (CH₂(5')), 26.6 (C(CH₃)₃), 18.8 (C(CH₃)₃), 11.8 (C(5)CH₃).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₂₆H₃₂N₂O₅Si+H]⁺: 481.2154; gefunden: 481.2151; berechnet für [C₂₆H₃₂N₂O₅Si+Na]⁺: 503.1973; gefunden: 503.1972.

HRMS (ESI⁻): berechnet für [C₂₆H₃₂N₂O₅Si-H]⁻: 479.2008; gefunden: 479.1995; berechnet für: [C₂₆H₃₂N₂O₅Si+HCOO]⁻: 525.2063; gefunden: 525.2049.

5'-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethyl-thymidin **30**



Nukleosid **29** (26.7 g, 57.4 mmol) wurde zusammen mit Imidazol (11.7 g, 172 mmol) in DMF (70 mL) gelöst und nach Zugabe von TBSCl (17.3 g, 115 mmol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 4 L Ethylacetat verdünnt und mit ges. wässriger NaHCO₃ (3 x 400 mL) gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde **30** (34.0 g, 99 %) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.78 (CHCl₃/MeOH 20:1).

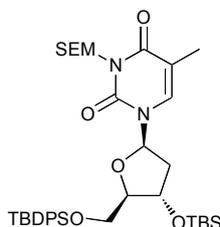
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 11.34 (s, 1H, NH), 7.65 – 7.38 (m, 11H, $C_{ar}H$, CH(6)), 6.18 (t, J = 6.9 Hz, 1H, C(1')H), 4.47 (dt, J = 3.0, 6.0 Hz, 1H, CH(3')), 3.91 – 3.80 (m, 2H, CH₂(5')), 3.74 (dd, J = 3.0, 10.4 Hz, 1H, CH(4')), 2.31 – 2.22 (m, 1H, CH₂b(2')), 2.12 (ddd, J = 3.5, 6.3, 13.2 Hz, 1H, CH₂a(2')), 1.57 (d, J = 1.0 Hz, 3H, C(5)CH₃), 1.01 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.84 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.04 (d, J = 7.2 Hz, 6H, Si(CH₃)₂).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ = 163.5 (CO), 150.3 (CO), 135.4 (CH(6)), 134.9 ($C_{ar}H$), 134.9 ($C_{ar}H$), 132.5 (C_{ar}), 132.3 (C_{ar}), 130.0 ($C_{ar}H$), 129.9 ($C_{ar}H$), 127.9 ($C_{ar}H$), 127.8 ($C_{ar}H$), 109.5 ($CH_2(5')$), 86.3 ($C_H(4')$), 83.6 ($CH_2(1')$), 71.5 ($CH(3')$), 63.4 ($CH_2(5')$), 26.6 ($C(CH_3)_3$), 25.5 ($C(CH_3)_3$), 18.7 ($C(CH_3)_3$), 17.6 ($C(CH_3)_3$), 11.8 ($C(5)CH_3$), -4.8 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃).

HRMS (ESI⁺): berechnet für $[C_{32}H_{46}N_2O_5Si_2+H]^+$: 595.3018; gefunden: 595.3022; berechnet für $[C_{32}H_{46}N_2O_5Si_2+NH_4]^+$: 612.3283; gefunden: 612.3288; berechnet für $[C_{32}H_{46}N_2O_5Si_2+Na]^+$: 617.2837; gefunden: 617.2843.

HRMS (ESI⁻): berechnet für $[C_{32}H_{46}N_2O_5Si_2-H]^-$: 593.2872; gefunden: 593.2864; berechnet für $[C_{32}H_{46}N_2O_5Si_2+HCOO]^-$: 693.2972; gefunden: 639.2919.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-thymidin **19**



Eine Lösung von **30** (34.3 g, 57.4 mmol) in DCM (250 mL) wurde mit Hünig-Base (80.0 mL, 460 mmol) und SEMCl (19.2 g, 115 mmol) behandelt. Die Reaktionslösung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit ges. wässriger NaHCO₃ Lösung (750 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel-60, Hexan/Ethylacetat 4:1) wurde das vollgeschützte Nucleosid **19** (25.5 g, 61 %) in Form eines gelben Öls erhalten.

R_f = 0.43 (Hexan/Ethylacetat 4:1).

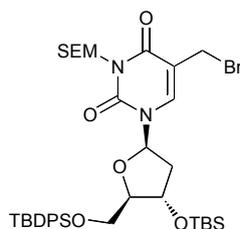
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 7.65 – 7.62 (m, 4H, C_{ar}H), 7.51 – 7.39 (m, 7H, C_{ar}H, CH(6)), 6.19 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH(1')), 5.21 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, OCH₂N), 4.49 – 4.44 (m, 1H, CH(3')), 3.93 – 3.84 (m, 2H, CH(4'), CH₂b(5')), 3.80 – 3.72 (m, 1H, CH₂a(5')), 3.59 – 3.54 (m, 2 H, SiCH₂CH₂O), 2.28 – 2.23 (m, 1H, CH₂b(2')), 2.17 (ddd, *J* = 3.9, 6.5, 13.4 Hz, 1H, CH₂a(2')), 1.61 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, C(5)CH₃), 1.02 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.84 – 0.80 (m, 2H, SiCH₂CH₂O), 0.05 (s, 3H, SiCH₃), 0.04 (s, 3H, SiCH₃), -0.03 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 101 MHz): δ = 162.5 (CO), 150.4 (CO), 135.0 (CH(6)), 134.9 (C_{ar}H), 134.9 (C_{ar}H), 132.5 (C_{ar}), 132.3 (C_{ar}), 130.0 (C_{ar}H), 129.9 (C_{ar}H), 127.9 (C_{ar}H), 127.8 (C_{ar}H), 108.7 (C(5)), 86.5 (CH(4')), 84.7 (CH(1')), 71.4 (CH(3')), 69.6 (OCH₂N), 66.3 (SiCH₂CH₂O), 63.3 (CH₂(5')), 39.9 (CH₂(2')), 26.6 (C(CH₃)₃), 25.5 (C(CH₃)₃), 18.8 (C(CH₃)₃), 17.6 (C(CH₃)₃), 17.4 (SiCH₂CH₂O), 12.5 (C(5)CH₃), -1.4 (Si(CH₃)₃), -4.8 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₃₈H₆₀N₂O₆Si₃+H]⁺: 725.3832, gefunden: 725.3834; berechnet für: [C₃₈H₆₀N₂O₆Si₃+NH₄]⁺: 742.4097; gefunden.: 742.4101; berechnet für [C₃₈H₆₀N₂O₆Si₃+Na]⁺: 742.3651; gefunden: 742.3655.

HRMS (ESI⁻): berechnet für [C₃₈H₆₀N₂O₆Si₃+HCOO]⁺: 769.3741; gefunden: 769.3760.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-5-bromomethyl-2'-desoxyuridin **20**



Das vollgeschützte Nukleosid **19** (1.00 g, 1.33 mmol) wurde zusammen mit NBS (473 mg, 2.66 mmol) in Benzol (5 mL) coevaporiert und anschließend in Benzol (30 mL) gelöst. Es wurde AIBN (38 mg, 0.27 mmol) zugegeben und für vier Stunden am

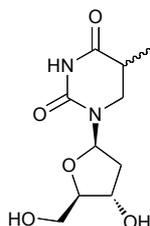
Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Reinigung das Bromid **20** (531 mg, 50 %) in Form eines gelben Öls erhalten.

$R_f = 0.28$ (Hexan/Ethylacetat 9:1).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): $\delta = 7.84$ (s, 1H, $\text{CH}(6)$), 7.68-7.64 (m, 4H, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 7.48-7.36 (m, 6H, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 6.33 (dd, $J = 7.86, 5.68$ Hz, 1H, $\text{CH}(1')$), 5.41 (d, $J = 2.13$ Hz, 2H, OCH_2N), 4.70-4.34 (m, 1H, $\text{CH}(3')$), 3.98-3.96 (m, 2H, $\text{CH}(4')$, $\text{CH}_2\text{b}(5')$), 3.91 (d, $J = 10.53$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{a}(5')$), 3.84-3.78 (m, 2H, $\text{CH}_2(5)$), 3.69 (dd, $J = 9.21, 7.52$ Hz, 2H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.38 (ddd, $J = 13.18, 5.67, 2.51$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{b}(2')$), 2.07 (ddd, $J = 13.51, 7.86, 6.02$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{a}(2')$), 1.11 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.99-0.97 (m, 2H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 0.88 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.06 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.03 (s, 3H, SiCH_3), 0.00 (s, 3H, SiCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): $\delta = 161.5$ (CO), 150.6 (CO), 137.6 ($\text{CH}(6)$), 135.7 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 135.5 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 133.1 (C_{ar}), 132.4 (C_{ar}), 130.4 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 130.4 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 128.3 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 111.3 ($\text{C}(5)$), 88.2 ($\text{CH}(4')$), 86.2 ($\text{CH}(1')$), 72.3 ($\text{CH}(3')$), 70.4 (OCH_2N), 67.9 ($\text{CH}_2(5)$), 63.8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 62.6 ($\text{CH}_2(5')$), 42.1 ($\text{CH}_2(2')$), 27.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 19.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -1.2 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), -4.4 (SiCH_3), -4.6 (SiCH_3).

HRMS (pos.): berechnet für $[\text{C}_{38}\text{H}_{59}\text{BrN}_2\text{O}_6\text{Si}_3+\text{NH}_4]^+$: 820.3203; gefunden: 820.3215.

5,6-Dihydrothymidin **21**

Thymidin (10.0 g, 41.2 mmol) wurde in einer Mischung aus Methanol (100 mL) und Wasser (100 mL) gelöst, mit Rh/Al₂O₃ (5 %, 600 mg) versetzt und eine Woche unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Mischung wurde durch Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Es wurde **21** (9.85 g, 98 %) als Diastereomerenmischung erhalten.

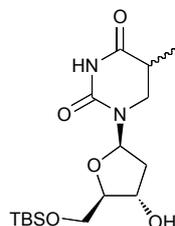
$R_f = 0.65$ (CHCl₃/MeOH 7:3).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): $\delta = 10.18$ (s, 1H, NH), 6.12 (dd, $J = 6.3$ Hz, 8.1, 1H, CH(1')), 5.11 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, C(3')OH), 4.74 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, C(5')OH), 4.13 – 4.08 (m, 1H, CH(3')), 3.62 – 3.57 (m, 1H, CH(4')), 3.46 – 3.38 (m, 2H, CH₂(5')), 3.37 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, CH_{2b}(6)), 2.64 – 2.53 (m, 1H, CH_{2a}(6)), 2.08 (ddd, $J = 6.3, 8.1, 13.4$ Hz, 1H, CH_{2b}(2')), 1.79 (ddd, $J = 3.2, 6.4, 13.3$ Hz, 1H, CH_{2a}(4')), 1.07 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, C(5)CH₃).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 101 MHz): $\delta = 173.2$ (CO), 153.0 (CO), 85.8 (CH(4')), 82.7 (CH(1')), 70.6 (CH(3')), 61.8 (CH₂(5')), 41.2 (CH₂(6)), 36.0 (CH₂(2')), 34.6 (CH(5)), 12.5 (C(5)CH₃).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₁₀H₁₆N₂O₅+H]⁺: 245.1132; gefunden: 245.1132; berechnet für [C₁₀H₁₆N₂O₅+Na]⁺: 267.0951; gefunden: 267.0952.

HRMS (ESI⁻): berechnet für [C₁₀H₁₆N₂O₅-H]⁻: 243.0986; gefunden: 243.0984; berechnet für [C₁₀H₁₆N₂O₅+HCOO]⁻: 289.1041; gefunden: 289.1037.

5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-5,6-dihydrothymidin **31**

Eine Lösung von 5,6-Dihydrothymidin (8.78 g, 36.0 mmol), DMAP (373 mg, 3.06 mmol) und TBSCl (5.97 g, 39.6 mmol) in Pyridin (100 mL) wurde bei 0 °C über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Chloroform (100 mL) aufgenommen und mit 1 M HCl (100 mL) und ges. wässriger NaCl (100 mL) gewaschen. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CHCl₃/MeOH 20:1) wurde **31** (10.1 g, 79 %) in Form eines farblosen Öls erhalten.

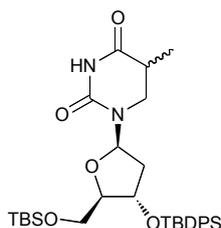
$R_f = 0.16$ (CHCl₃/MeOH 20:1).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): $\delta = 10.21$ (s, 1H, NH), 6.12 (dd, $J = 6.4, 8.0$ Hz, 1H, CH(1')), 5.15 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, (C3')OH), 4.10 (bs, 1H, CH(3')), 3.69 – 3.59 (m, 3H, CH(4'), CH₂(5')), 3.38 (dd, $J = 5.6, 12.7$ Hz, 1H, CH_{2b}(6)), 2.99 (dd, $J = 10.2, 12.7$ Hz, 1H, CH_{2a}(6)), 2.65 – 2.54 (m, 1H, CH(5')), 2.06 (ddd, $J = 6.4, 8.0, 13.2$ Hz, 1H, CH_{2b}(2')), 1.82 (ddd, $J = 3.3, 6.4, 13.2$ Hz, 1H, CH_{2b}(2')), 1.06 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH(5)CH₃), 0.87 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.05 (d, $J = 4.1$ Hz, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): $\delta = 173.1$ (CO), 152.9 (CO), 85.3 (CH(4')), 82.7 (CH(1')), 70.3 (CH(3')), 63.3 (CH₂(5')), 41.3 (CH₂(6)), 36.4 (CH₂(2')), 34.5 (CH(5)), 25.8 (C(CH₃)₃), 18.0 (C(CH₃)₃), 12.5 (C(5)CH₃), -5.4 (Si(CH₃)₂), -5.4 (Si(CH₃)₂).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₁₆H₃₀N₂O₅Si+H]⁺: 359.1997; gefunden: 359.1998; berechnet für [C₁₆H₃₀N₂O₅Si+Na]⁺: 381.1816; gefunden: 381.1815.

HRMS (ESI⁻): berechnet für [C₁₆H₃₀N₂O₅Si-H]⁻: 357.1815, gefunden: 357.1847; berechnet für [C₁₆H₃₀N₂O₅Si+Cl]⁻: 393.1618; gefunden: 393.1614; berechnet für: [C₁₆H₃₀N₂O₅Si+HCOO]⁻: 403.1906; gefunden: 403.1900.

5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-5,6-dihydrothymidin **32**

Nukleosid **31** (4.43 g, 12.3 mmol) wurde zusammen mit Imidazol (2.52 g, 37.3 mmol) und TBDPSCI (4.70 mL, 18.4 mmol) in DMF (35 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit Ethylacetat (100 mL) verdünnt und mit ges. wässriger NaHCO₃ Lösung (3 x 100 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, um **32** (7.23 g, 99 %) in Form eines farblosen Öls zu erhalten.

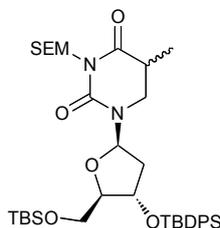
$R_f = 0.57$ (Hexan/Ethylacetat 1:2).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 7.66$ - 7.62 (m, 4H, C_{ar}H), 7.48 - 7.33 (m, 6H, C_{ar}H), 6.42 (dd, $J = 8.97, 5.60$ Hz, 1H, CH(1')), 4.32 - 4.28 (m, 1H, CH(3')), 3.90 - 3.86 (m, 1H, CH(4')), 3.53 (dd, $J = 11.10, 2.34$ Hz, 1H, CH₂b(5')), 3.29 (dd, $J = 13.07, 5.42$ Hz, 1H, CH₂b(6)), 3.21 (dd, $J = 13.11, 9.25$ Hz, 1H, CH₂a(6)), 3.16 (dd, $J = 11.16, 2.56$ Hz, 1H, CH₂a(5')), 2.56 - 2.47 (m, 1H, CH(5)), 2.01 (ddd, $J = 12.97, 5.65, 1.99$ Hz, 1H, CH₂b(2')), 1.79 (ddd, $J = 12.91, 9.06, 5.96$ Hz, 1H, CH₂a(2')), 1.20 (d, $J = 7.10$ Hz, 3H, C(5)CH₃), 1.08 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.77 (s, 9H, C(CH₃)₃), -0.11 (s, 3H, Si(CH₃)₂b), -0.13 (s, 3H, Si(CH₃)₂a).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 172.9$ (CO), 152.5 (CO), 135.9 (C_{ar}H), 135.9 (C_{ar}H), 133.7 (C_{ar}), 133.6 (C_{ar}), 130.1 (C_{ar}H), 128.0 (C_{ar}H), 86.9 (CH(4')), 84.1 (CH(1')), 73.9 (CH(3')), 63.4 (CH₂(5')), 41.9 (CH₂(6)), 38.0 (CH₂(2')), 35.6 (CH(5)), 27.1 (C(iH₃)₃), 26.0 (C(CH₃)₃), 19.3 (C(iH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 13.1 (C(5)CH₃), -5.3 (SiCH₃), -5.5 (SiCH₃).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₃₂H₄₈N₂O₅Si₂+H]⁺: 597.3175; gefunden: 597.3200.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-5,6-dihydrothymidin **22**



Zu einer Lösung von **32** (3.67 g, 615 μ mol) in Dichlormethan (20 mL) wurde Hünig-Base (8.60 mL, 49.4 μ mol) und SEMCl (6.40 mL, 18.1 μ mol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt, mit ges. wässriger NaHCO₃ Lösung (3 x 10 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Reinigung wurde **22** (3.58 g, 88 %) in Form eines gelben Öls erhalten.

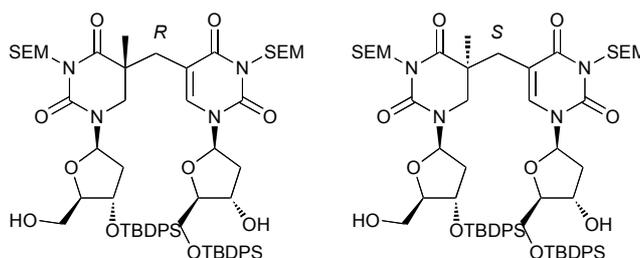
R_f = 0.27 (Hexan/Ethylacetat 7:1).

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 7.65-7.62 (m, 4H, C_{ar}H), 7.42-7.44 (m, 2H, C_{ar}H), 7.36-7.40 (m, 4H, C_{ar}H), 6.47 (dd, J = 9.08, 5.52 Hz, 1H, CH(1')), 5.21 (s, 2H, OCH₂N), 4.29-4.28 (m, 1H, CH(3')), 3.89-3.87 (m, 1H, CH(4')), 3.52 (dd, J = 11.12, 2.37 Hz, 2H, CH₂(5')), 3.25 (dd, J = 12.95, 5.22 Hz, 1H, SiCH₂CH₂bO), 3.21-3.18 (m, 1H, SiCH₂CH₂aO), 3.15 (dd, J = 11.12, 2.56 Hz, 2H, CH₂(6)), 2.73-2.32 (m, 1H, CH(5)), 2.00 (ddd, J = 12.81, 5.52, 1.72 Hz, 1H, CH₂b(2')), 1.77 (ddd, J = 12.89, 9.11, 5.88 Hz, 1H, CH₂a(2')), 1.20 (d, J = 7.06 Hz, 3H, C(5)CH₃), 1.07 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.95-0.93 (m, 2H, SiCH₂CH₂O), 0.76 (s, 9H, C(CH₃)₃), -0.01 (s, 9H, Si(CH₃)₃), -0.11 (s, 3H, SiCH₃), -0.14 (s, 3H, SiCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ = 172.97 (CO), 171.33 (CO), 135.97 (C_{ar}H), 135.95 (C_{ar}H), 133.74 (C_{ar}), 132.68 (C_{ar}), 130.10 (C_{ar}H), 128.01 (C_{ar}H), 128.00 (C_{ar}H), 86.86 (CH(4')), 84.89 (CH(1')), 74.02 (CH(3')), 70.00 (OCH₂N), 66.99 (SiCH₂CH₂O), 63.49 (CH₂(5')), 40.64 (CH₂(6)), 38.08 (CH₂(2')), 36.02 (CH(5)), 27.10 (C(CH₃)₃), 26.00 (C(CH₃)₃), 19.28 (C(CH₃)₃), 18.30 (SiCH₂CH₂O), 13.60 (C(5)CH₃), -1.20 (Si(CH₃)₃); -5.38 (Si(CH₃)₂), -5.54 (Si(CH₃)₂).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₃₈H₆₂N₂O₆Si₃+NH₄]⁺: 744.4254; gefunden: 744.4276.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **24** (5*R*) & **25** (5*S*)



Für die Herstellung der LDA-Lösung wurde Diisopropylamin (220 mg, 2.17 mmol) in THF (4.2 mL) mit *n*-BuLi (1.6 M, 1.48 mL) versetzt und für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Die frisch hergestellte LDA-Lösung wurde langsam bei -78 °C zu einer Lösung des vollgeschütztem Dihydrothymidins **22** (726 mg, 1.45 mmol) in THF (8 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2.5 h bei -78 °C gerührt und anschließend das Bromid **20** (804 mg, 1.76 mmol), gelöst in THF (11 mL), über einen Zeitraum von 30 Minuten, tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde 1.5 h bei -78 °C und 3 h bei 0 °C gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von ges. wässriger NaHCO₃ Lösung (35 mL) gestoppt wurde. Es wurde mit Chloroform (3 x 35 mL) extrahiert, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel-60, Hexan/Ethylacetat 7:1) wurde das vollgeschützte Sporenphotoprodukt, zusammen mit nicht reagiertem Dihydrothymidin **22**, als Diastereomerengemisch erhalten. Die TBS-Gruppen wurden durch zweistündiges rühren des Rohprodukts in MeOH (115 mL) mit *p*-Toluolsulfonsäure (219 mg, 115 mmol) bei 50 °C entfernt, um die Separationseigenschaften der Diastereomere zu verbessern. Die Mischung wurde durch Zugabe von ges. wässriger NaHCO₃ Lösung neutralisiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Heptan und Ethylacetat (3:1, 25 mL) aufgenommen und durch Kieselgur filtriert. Isokratische *np*-HPLC (Heptan/Ethylacetat/*i*-Propanol/Acetonitril 580:380:39:1) lieferte das

5*R*-Sporenphotoprodukt **24** (207 mg, 8%) und das 5*S*-Sporenphotoprodukt **25** (138 mg, 5 %) in Form eines farblosen Schaums.

5*R* Diastereomer **24**:

$R_f = 0.28$ (Hexan/Ethylacetat 7:1).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 7.64 - 7.60$ (m, 6H, $C_{ar}H$), 7.59 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, $CH(6B)$), 7.51 – 7.30 (m, 14H, $C_{ar}H$), 6.30 (dd, $J = 6.1, 8.5$ Hz, 1H, ($CH(1')$)), 6.19 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, $CH(1'B)$), 5.39 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, $C(3')OH$), 5.14 (s, 2H; $OCH_2N(A)$), 4.98 (dd, $J = 9.8, 19.2$ Hz, 2H, $OCH_2N(B)$), 4.71 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, $C(5')OH$), 4.39 – 4.34 (m, 1H, $CH(3'A)$), 4.31 – 4.24 (m, 1H, $CH(3'B)$), 3.90 – 3.83 (m, 2H, $CH(4'B)$, $CH_2b(5'B)$), 3.90 – 3.83 (m, 2H, $CH(4'A)$, $CH_2a(5'B)$), 3.53 – 3.47 (m, 2H, $SiCH_2CH_2O(A)$), 3.46 – 3.40 (m, 2H, $SiCH_2CH_2O(B)$), 3.26 – 3.14 (m, 2H, $CH_2(5'A)$), 3.11 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, $CH_2b(6A)$), 2.93 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, $CH_2a(6A)$), 2.54 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H, $CH_2b(5)$), 2.23 – 2.13 (m, 1H, $CH_2b(2'B)$), 2.13 – 2.02 (m, 2H, $CH_2a(2'B)$, $CH_2a(5)$), 1.82 – 1.68 (m, 2H, $CH_2(2'A)$), 1.04 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.98 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.87 (s, 3H, $C(5A)CH_3$), 0.83 – 0.69 (m, 4H, 2 x $SiCH_2CH_2O$), -0.08 (s, 18H, $Si(CH_3)_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): $\delta = 173.2$ ($CO(4B)$), 162.7 ($CO(4A)$), 152.0 ($CO(2B)$), 150.2 ($CO(2A)$), 135.2 ($CH(6B)$), 135.0 (2 x $C_{ar}H$), 134.9 (2 x $C_{ar}H$), 133.0 (C_{ar}), 132.9 (C_{ar}), 132.8 (C_{ar}), 132.7 (C_{ar}), 130.0 ($C_{ar}H$), 129.8 ($C_{ar}H$), 127.9 ($C_{ar}H$), 127.9 ($C_{ar}H$), 127.8 ($C_{ar}H$), 127.8 ($C_{ar}H$), 107.6 ($C(5B)$), 86.5 ($CH(4'B)$), 86.3 ($CH(4'A)$), 84.8 ($CH(1'B)$), 83.9 ($CH(1'A)$), 73.9 ($CH(3'A)$), 69.9 ($CH(3'B)$), 69.8 ($OCH_2N(A)$), 69.4 ($OCH_2N(B)$), 66.3 ($SiCH_2CH_2O(A)$), 65.4 ($SiCH_2CH_2O(B)$), 64.0 ($CH_2(5'B)$), 61.4 ($CH_2(5'A)$), 43.7 ($CH_2(6A)$), 41.3 ($CH_2(2'B)$), 36.1 ($CH_2(2'A)$), 31.2 ($CH_2(5)$), 26.7 ($C(CH_3)_3$), 26.6 ($C(CH_3)_3$), 19.9 ($(C(5)CH_3)$), 18.8 ($C(CH_3)_3$), 18.6 ($C(CH_3)_3$), 17.5 ($SiCH_2CH_2O(A)$), 17.3 ($SiCH_2CH_2O(B)$), -1.3 ($Si(CH_3)_3$), -1.3 ($Si(CH_3)_3$).

HRMS (ESI $^+$): berechnet für $[C_{64}H_{92}N_4O_{12}Si_4+NH_4]^+$: 1238.6127; gefunden 1238.6133; berechnet für $[C_{64}H_{92}N_4O_{12}Si_4+Na]^+$: 1243.5681; gefunden: 1243.5689.

HRMS (ESI): berechnet für $[\text{C}_{64}\text{H}_{92}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Si}_4\text{-H}]^+$: 1219.5716; gefunden: 1219.5642;
berechnet für $[\text{C}_{64}\text{H}_{92}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Si}_4\text{+HCOO}]^+$: 1265.5771; gefunden: 1265.5691.

5S Diastereomer **25**:

$R_f = 0.28$ (Hexan/Ethylacetat 7:1)

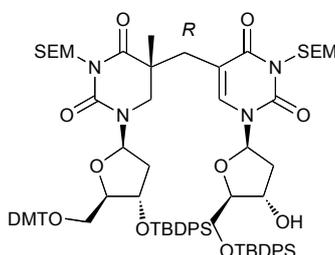
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 7.63 - 7.59$ (m, 8H, $C_{ar}H$), 7.48 – 7.37 (m, 13H, $C_{ar}H$, $CH(6)$), 6.32 (dd, $J = 5.6, 8.9$ Hz, 1H, $CH(1'A)$), 6.17 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, $CH(1'B)$), 5.36 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, $C(3')OH$), 5.17 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, OCH_2bN), 5.11 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, OCH_2aN), 5.02 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, OCH_2bN), 4.88 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, OCH_2aN), 4.72 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, $C(5')OH$), 4.40 – 4.34 (m, 1H, $CH(3'A)$), 4.27 – 4.21 (m, 1H, $CH(3'B)$), 3.92 – 3.83 (m, 3H, $CH(4'B)$, $CH(4'A)$, $CH_2b(5')$), 3.72 (dd, $J = 4.7, 10.7$ Hz, 1H, $C_{H_2a}(5'B)$), 3.57 – 3.46 (m, 2H, $SiCH_2CH_2O(A)$), 3.43 – 3.37 (m, 2H, $SiCH_2CH_2O(B)$), 3.31 – 3.21 (m, 2H, $CH_2(5'A)$), 3.18 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, $CH_2b(6A)$), 3.01 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, $CH_2a(6A)$), 2.77 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, $CH_2b(5)$), 2.21 – 2.14 (m, 2H, $CH_2(2'B)$), 2.06 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H, $CH_2b(5)$), 1.88 (ddd, $J = 3.5, 8.6, 14.7$ Hz, 1H, $CH_2b(2'A)$), 1.80 – 1.73 (m, 1H, $CH_2a(2'A)$), 1.04 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.98 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.86 (s, 3H, $(C(5A)CH_3)$), 0.84 – 0.74 (m, 4H, 2 x $SiCH_2CH_2O$), -0.05 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), -0.08 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): $\delta = 172.9$ ($CO(4A)$), 162.6 ($CO(4B)$), 151.9 ($CO(2A)$), 150.1 ($CO(2B)$), 137.9 ($CH(6B)$), 135.2 ($C_{ar}H$), 135.2 ($C_{ar}H$), 135.1 ($C_{ar}H$), 135.0 ($C_{ar}H$), 133.0 (C_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 132.7 (C_{ar}), 132.5 (C_{ar}), 130.0 ($C_{ar}H$), 129.9 ($C_{ar}H$), 129.9 ($C_{ar}H$), 129.9 ($C_{ar}H$), 127.9 ($C_{ar}H$), 127.9 ($C_{ar}H$), 127.8 ($C_{ar}H$), 107.7 ($C(5B)$), 86.8 ($CH(4'B)$), 86.4 ($CH(4'A)$), 85.3 ($CH(1'B)$), 83.9 ($CH(1'A)$), 74.0 ($CH(3'A)$), 70.4 ($CH(3'B)$), 69.8 ($OCH_2N(A)$), 69.3 ($OCH_2N(B)$), 66.3 ($SiCH_2CH_2O(A)$), 65.3 ($SiCH_2CH_2O(A)$), 64.2 ($CH_2(5'B)$), 61.5 ($CH_2(5'A)$), 44.0 ($CH_2(6A)$), 40.9 ($CH_2(2'B)$), 36.0 ($CH_2(2'A)$), 31.2 ($CH_2(5)$), 26.7 ($C(CH_3)_3$), 26.6 ($C(CH_3)_3$), 19.4 ($C(5)CH_3$), 18.7 ($C(CH_3)_3$), 18.6 ($C(CH_3)_3$), 17.6 ($SiCH_2CH_2O(A)$), 17.2 ($SiCH_2CH_2O(B)$), -1.3 ($Si(CH_3)_3$), -1.4 ($Si(CH_3)_3$).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₆₄H₉₂N₄O₁₂Si₄+NH₄]⁺: 1238.6127; gefunden: 1238.6135; berechnet für [C₆₄H₉₂N₄O₁₂Si₄+Na]⁺: 1243.5681; gefunden: 1243.5690.

HRMS (ESI⁻): berechnet für [C₆₄H₉₂N₄O₁₂Si₄+HCOO]⁻: 1265.5771; gefunden: 1265.5694; berechnet für [C₆₄H₉₂N₄O₁₂Si₄+AcO]⁻: 1279.5928; gefunden: 1279.5851.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **33**



DMTCl (87.2 mg, 257 μmol) und eine Spatelspitze DMAP wurden zu einer Lösung von 5*R*-Sporenphotoprodukt **24** (253 mg, 207 μmol) in Pyridin (5 mL) gegeben und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* gefolgt von Säulenchromatographie (Kieselgel-60, Hexan/Ethylacetat 2:1) lieferte **33** (209 mg, 66 %) in Form eines farblosen Schaums.

$R_f = 0.21$ (Hexan/Ethylacetat 2:1).

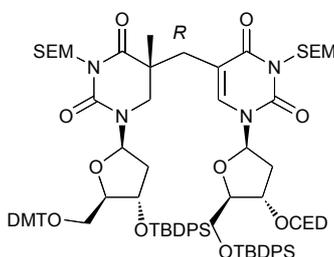
¹H NMR (Aceton-d₆, 400 MHz): δ = 7.77-7.74 (m, 4H, C_{ar}H), 7.36-7.33 (m, 4H, C_{ar}H), 7.32-7.27 (m, 16H, C_{ar}H, CH(6)), 7.20-7.16 (m, 6H, C_{ar}H), 6.87-6.78 (m, 4H, C_{ar}H), 6.35 (t, J = 6.69, 6.69 Hz, 1H, CH(1'B)), 6.19 (dd, J = 11.20, 1.97 Hz, 1H, CH(1'A)), 5.27 (s, 2H, OCH₂N(A)), 5.14 (s, 2H, OCH₂N(B)), 4.60-4.53 (m, 1H, CH(3'B)), 4.35-4.32 (m, 1H, CH(3'A)), 4.06-4.00 (m, 2H, CH(4'B), CH(4'A)), 3.98 (dd, J = 7.37, 4.66 Hz, 2H, CH₂(5'A)), 3.77 (s, 6H, 2 x OCH₃), 3.76-3.73 (m, 1H, CH₂b(5'B)), 3.67-3.60 (m, 3H, SiCH₂CH₂O(A), CH₂a(5'B)), 3.57-3.56 (m, 2H, SiCH₂CH₂O(B)), 3.11 (d, J = 13.06 Hz, 1H, CH₂b(6A)), 2.95 (d, J = 13.05 Hz, 1H, CH₂a(6A)), 2.58 (d, J = 13.92 Hz, 1H, CH₂b(5)), 2.33 (ddd, J = 13.58, 6.36, 3.93 Hz, 1H, CH₂b(2'B)), 2.20 (dd, J =

13.68, 6.81 Hz, 1H, $CH_2a(2'B)$), 2.12 (d, $J = 14.54$ Hz, 1H, $CH_2a(5)$), 1.60 (ddd, $J = 13.30, 11.41, 2.02$ Hz, 1H, $CH_2b(2'A)$), 1.43 (ddd, $J = 13.30, 3.72, 2.04$ Hz, 1H, $CH_2a(2'A)$), 1.14 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.07 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.97 (s, 3H, CH_3), 0.91-0.78 (m, 4H, 2 x $SiCH_2CH_2O$), -0.02 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), -0.04 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$).

^{13}C NMR (Aceton- d_6 , 100 MHz): $\delta = 175.2$ (CO(4A)), 165.0 (CO(4B)), 160.4 (C_{ar}), 153.8 (CO(2A)), 152.4 (CO(2B)), 150.3 (C_{ar}), 142.1 (CH(6B)), 138.0 ($C_{ar}H$), 137.8 ($C_{ar}H$), 137.6 ($C_{ar}H$), 137.3 ($C_{ar}H$), 135.2 (C_{ar}), 135.2 (C_{ar}), 135.1 (C_{ar}), 135.0 (C_{ar}), 131.9 ($C_{ar}H$), 131.8 ($C_{ar}H$), 131.7 ($C_{ar}H$), 131.7 ($C_{ar}H$), 129.7 ($C_{ar}H$), 129.6 ($C_{ar}H$), 129.6 ($C_{ar}H$), 129.4 ($C_{ar}H$), 128.3 ($C_{ar}H$), 125.5 ($C_{ar}H$), 114.7 ($C_{ar}H$), 110.1 (C(5B)), 88.9 (CH(4'A)), 88.4 (CH(1'B)), 86.9 (CH(4'B)), 86.9 (CH(1'A)), 82.4 (iH(3'A)), 82.3 (CH(3'B)), 71.9 (OCH₂N(A)), 71.7 (OCH₂N(B)), 69.2 (SiCH₂CH₂O(A)), 69.1 (SiCH₂CH₂O(B)), 67.8 (iH₂(5'B)), 66.1 (CH₂(5'A)), 56.4 (OCH₃), 46.7 (CH₂(6A)), 43.8 (CH₂(5)), 41.4 (C(5A)), 36.4 (CH₂(2'A)), 33.8 (CH₂(2'B)), 28.9 (C(CH₃)₃), 28.5 (C(CH₃)₃), 22.2 (C(5)CH₃), 21.1 (SiCH₂CH₂O(A)), 20.9 (SiCH₂CH₂O(B)), 19.6 (C(CH₃)₃), 19.5 (C(CH₃)₃), -0.1 (Si(CH₃)₃), -0.2 (Si(CH₃)₃).

MS (MALDI⁺): berechnet für $[C_{85}H_{110}N_4O_{14}Si_4+Na]^+$: 1547.1; gefunden: 1547.3.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-3'-*O*- β -cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminophosphanoxy-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **26**



Das DMT-geschützte Nucleosid **33** (218 mg, 143 μ mol) wurde in Dichlormethan (1 mL) gelöst. Es wurden Hünig-Base (37 μ L, 28 mmol) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (67.7 mg, 286 μ mol) zugegeben und die Reaktion

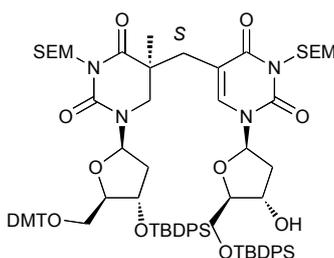
für drei Stunden gerührt. Säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel-60, Ethylacetat) lieferte **26** (278 mg, 88 %) in Form eines farblosen Schaums.

$R_f = 0.38$ (Hexan/Ethylacetat 2:1).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 200 MHz): $\delta = 149.52, 149.30$.

HRMS (ESI $^-$): berechnet für $[\text{C}_{94}\text{H}_{127}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{PSi}_4+\text{HCOO}]^-$: 1783.8469; gefunden: 1783.8307.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **34**



DMTCI (86.6 mg, 256 μmol) und eine Spatelspitze DMAP wurden zu einer Lösung von 5*S*-Sporenphotoprodukt **25** (260 mg, 213 μmol) in Pyridin (5 mL) gegeben und die Mischung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* gefolgt von Säulenchromatographie (Kieselgel-60, Hexan/Ethylacetat 2:1) lieferte **34** (207 mg, 64 %) in Form eines farblosen Schaums.

$R_f = 0.18$ (Hexan/Ethylacetat 2:1).

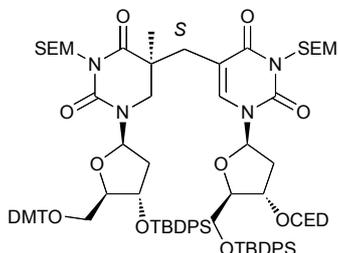
^1H NMR (Aceton- d_6 , 400 MHz): $\delta = 7.68\text{--}7.61$ (m, 4H, C_{ar}H), $7.47\text{--}7.42$ (m, 4H, C_{ar}H), $7.40\text{--}7.35$ (m, 16H, C_{ar}H , CH(6)), $7.27\text{--}7.19$ (m, 6H, C_{ar}H), $6.85\text{--}6.80$ (m, 4H, C_{ar}H), 6.44 (dd, $J = 7.82, 6.26$ Hz, 1H, CH(1'A)), 6.31 (t, $J = 6.63, 6.63$ Hz, 1H, CH(1'B)), 5.22 (d, $J = 1.67$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{N(A)}$), 5.09 (d, $J = 2.40$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{N(B)}$), $4.55\text{--}4.49$ (m, 2H, CH(3'B), CH(3'A)), $4.07\text{--}4.01$ (m, 2H, CH(4'B), CH(4'A)), 3.96 (d, $J = 5.03$ Hz,

2H, $\text{CH}_2(5'B)$), 3.77 (s, 6H, 2 x OCH_3), 3.62 (dd, $J = 11.85, 4.26$ Hz, 2H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O(A)}$), 3.55-3.47 (m, 2H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O(B)}$), 3.12 (dd, $J = 10.29, 4.17$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{b}(5'A)$), 3.07 (bs, 1H, $\text{CH}_2\text{b}(6A)$), 3.03 (d, $J = 7.22$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{a}(6A)$), 3.02-2.98 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{a}(5'A)$), 2.54 (d, $J = 13.46$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{b}(5)$), 2.33 (ddd, $J = 13.52, 6.37, 3.73$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{b}(2'B)$), 2.21 (d, $J = 13.78$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{a}(5)$), 2.14-2.13 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{a}(2'B)$), 1.99 (ddd, $J = 13.15, 6.15, 3.50$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{b}(2'A)$), 1.90-1.81 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{a}(2'A)$), 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.04 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.92 (s, 3H, $\text{C}(5)\text{CH}_3$), 0.90-0.78 (m, 4H, 2 x $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), -0.03 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), -0.05 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (Aceton- d_6 , 100 MHz): $\delta = 174.9$ ($\text{CO}(4A)$), 165.1 ($\text{CO}(4B)$), 160.5 (C_{ar}), 154.1 ($\text{CO}(2A)$), 152.3 ($\text{CO}(2B)$), 146.9 (C_{ar}), 140.4 ($\text{CH}(6B)$), 137.6 (C_{arH}), 137.5 (C_{arH}), 137.4 (C_{arH}), 137.3 (C_{arH}), 135.2 (C_{ar}), 135.2 (C_{ar}), 135.1 (C_{ar}), 135.0 (C_{ar}), 131.9 (C_{arH}), 131.9 (C_{arH}), 131.8 (C_{arH}), 131.7 (C_{arH}), 129.9 (C_{arH}), 129.7 (C_{arH}), 129.7 (C_{arH}), 129.6 (C_{arH}), 128.4 (C_{arH}), 125.5 (C_{arH}), 114.9 (C_{arH}), 110.1 ($\text{C}(5B)$), 88.9 ($\text{CH}(4'A)$), 87.9 ($\text{CH}(1'B)$), 86.3 ($\text{CH}(4'B)$), 85.1 ($\text{CH}(1'A)$), 75.2 ($\text{CH}(3'A)$), 72.6 ($\text{CH}(3'B)$), 71.9 ($\text{OCH}_2\text{N(A)}$), 71.6 ($\text{OCH}_2\text{N(A)}$), 68.6 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O(A)}$), 67.8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O(B)}$), 66.1 ($\text{CH}_2(5'B)$), 65.3 ($\text{CH}_2(5'A)$), 56.5 ($\text{O}i\text{H}_3$), 46.5 ($\text{CH}_2(6A)$), 44.3 ($\text{CH}_2(5)$), 41.4 ($\text{C}(5A)$), 38.4 ($\text{CH}_2(2'A)$), 33.9 ($\text{CH}_2(2'B)$), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.9 ($\text{C}(5)\text{CH}_3$), 20.8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O(A)}$), 20.6 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{O(B)}$), 19.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 19.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -0.1 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), -0.2 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

HRMS (ESI⁺): berechnet für $[\text{C}_{85}\text{H}_{110}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{Si}_4+\text{NH}_4]^+$: 1540.7434; gefunden: 1540.6439.

N-Trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-5-(*N*-trimethylsilylethoxymethyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenyl-3'-*O*- β -cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminophosphanoxy-thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **27**



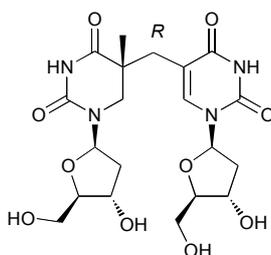
Das DMT-geschützte Nucleosid **34** (123 mg, 80.7 μ mol) wurde in Dichlormethan (1 mL) gelöst. Es wurden Hünig-Base (56 μ L, 32 mmol) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (45 mg, 0.19 mmol) zugegeben und die Reaktion für drei Stunden gerührt. Säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel-60, Ethylacetat) lieferte **27** (62 mg, 44 %) in Form eines farblosen Schaums.

R_f = 0.38 (Hexan/Ethylacetat 2:1).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 150.32, 149.76.

HRMS (ESI $^-$): berechnet für $[\text{C}_{94}\text{H}_{127}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{PSi}_4+\text{HCOO}]^-$: 1783.8469; gefunden: 1783.8329.

5*R*-(α -Thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **28**



24 (50 mg, 41 μ mol) wurde in DMSO (100 μ L) gelöst und 3HF \cdot NEt $_3$ (125 μ L) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 90 Minuten bei 65 $^\circ\text{C}$ geschüttelt, mit

Dichlormethan (1 mL) verdünnt und durch Kieselgel-60 filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Dichlormethan (3.3 mL) aufgenommen, SnCl₄ (1 M in DCM, 0.5 mL) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Wasser (5 mL) suspendiert, zentrifugiert und dekantiert. Nach *rp*-HPLC des Überstandes mit einem Wasser-Acetonitril-Gradient wurde das voll entschützte 5*R*-Diastereomer **28** in Form eines farblosen Feststoffs (5 mg, 25 %) erhalten.

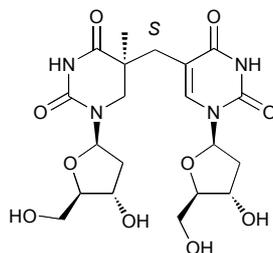
$R_f = 0.28$ (CHCl₃/MeOH 7:3).

¹H NMR (MeOH-d₄, 600 MHz): $\delta = 7.92$ (s, 1H, CH(6)), 6.37 – 6.19 (m, 2H, CH(1')), 4.42 (dt, $J = 3.4$ Hz, 6.5 Hz, 1H, CH(3')), 4.30 (dt, $J = 3.2$, 6.4 Hz, 1H, CH(3')), 3.96 (dd, $J = 3.5$, 7.1 Hz, 1H, CH(4')), 3.85 – 3.75 (m, 3H, CH₂(5'), CH(4')), 3.62 – 3.69 (m, 2H, CH₂(5')), 3.35 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, CH(6)), 3.30 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, CH(6)), 2.82 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, C(5)CH), 2.59 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H, C(5)CH), 2.31 (ddd, $J = 3.6$, 6.2, 13.6 Hz, 1H, CH(2')), 2.26 – 2.17 (m, 2H, CH(2')), 2.00 (ddd, $J = 3.2$, 6.3, 13.5 Hz, 2H, CH₂(2')), 1.22 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (MeOH-d₄, 150 MHz): $\delta = 174.8$ (CO(4)), 164.7 (CO(4)), 153.0 (CO(2)), 150.6 (CO(2)), 139.8 (CH(6)), 109.0 (C(5)), 87.5 (CH(4')), 86.0 (CH(4')), 85.0 (CH(1')), 83.8 (CH(1')), 71.2 (CH(3')), 70.9 (CH(3')), 62.1 (CH₂(5')), 61.5 (CH₂(5')), 46.4 (CH₂(6)), 41.9 (CH₂(5')), 39.8 (CH₂(2')), 36.1 (iH₂(2')), 31.0 (C(5)CH₂), 19.0 (CH₃).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₂₀H₂₈N₄O₁₀+Na]⁺: 507.1703; gefunden: 507.1695.

HRMS (ESI⁻): berechnet für [C₂₀H₂₈N₄O₁₀-H]⁻: 483,1733; gefunden: 483,1723.

5S-(α -Thymidyl)-5,6-dihydrothymidin **35**

25 (60 mg, 49 μ mol) wurde in DMSO (100 μ L) gelöst und 3HF \cdot NEt₃ (125 μ L) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 90 Minuten bei 65 °C geschüttelt, mit Dichlormethan (1 mL) verdünnt und durch Kieselgel-60 filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Dichlormethan (4 mL) aufgenommen, SnCl₄ (1 M in DCM, 0.5 mL) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Wasser (5 mL) suspendiert, zentrifugiert und dekantiert. Nach *rp*-HPLC des Überstandes mit einem Wasser-Acetonitril-Gradient wurde das voll entschützte 5S-Diastereomer **35** in Form eines farblosen Feststoffs (5 mg, 21 %) erhalten.

R_f = 0.31 (CHCl₃/MeOH 7:3).

¹H NMR (MeOH-d₄, 600 MHz): δ = 7.82 (s, 1H, CH(6)), 6.37 – 6.23 (m, 2H, CH(1')), 4.45 – 4.40 (m, 1H, CH(3')), 4.31 (dt, J = 3.1, 6.4 Hz, 1H, CH(3')), 3.94 (dd, J = 3.5, 7.0 Hz, 1H, CH(4')), 3.85 – 3.80 (m, 2H, CH₂(5')), 3.76 (dd, J = 3.9, 12.0 Hz, 1H, CH(4')), 3.69 (ddd, J = 4.4, 11.9, 25.9 Hz, 2H, CH₂(5')), 3.47 (d, J = 13.0 Hz, 1H, CH₂(6)), 3.25 (d, J = 13.0 Hz, 1H, CH₂(6)), 2.79 (d, J = 14.3 Hz, 1H, C(5)CH₂), 2.60 (d, J = 14.3 Hz, 1H, C(5)CH₂), 2.33 – 2.16 (m, 3H, CH₂(2')), 2.01 (ddd, J = 3.1, 6.3, 13.5 Hz, 1H, (CH₂(2')), 1.18 (s, 3H, C(5)CH₃).

¹³C NMR (MeOH-d₄, 150 MHz): δ = 174.8 (CO(4)), 164.7 (CO(4)), 153.0 (CO(2)), 150.6 (CO(2)), 139.8 (CH(6)), 109.0 (C(5)), 87.5 (CH(4')), 86.0 (CH(4')), 85.0 (CH(1')), 83.8 (CH(1')), 71.1 (CH(3')), 70.8 (CH(3')), 62.1 (CH₂(5')), 61.5 (CH₂(5')), 46.4 (CH₂(6)), 41.9 (C(5)), 39.8 (CH₂(2')), 36.1 (CH₂(2')), 31.0 (C(5)CH₂), 19.0 (C(5)CH₃).

HRMS (ESI⁺): berechnet für [C₂₀H₂₈N₄O₁₀+Na]⁺: 507.1703; gefunden: 507.1695;
berechnet für [C₂₀H₂₈N₄O₁₀+NH₄]⁺: 502.2144; gefunden: 502.2141.

HRMS (ESI⁻): berechnet für [C₂₀H₂₈N₄O₁₀-H]⁻: 483,1733; gefunden: 483,1723.

5. Literaturverzeichnis

- [1] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.
- [2] W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, *315*, 625-629. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction.
- [3] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell, L. O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789-1793. Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair.
- [4] H. Naegeli, K. Sugasawa, *DNA Repair* **2011**, *10*, 673-683. The xeroderma pigmentosum pathway: Decision tree analysis of DNA quality.
- [5] C. Masutani, M. Araki, A. Yamada, R. Kusumoto, T. Nogimori, T. Maekawa, S. Iwai, F. Hanaoka, *EMBO J.* **1999**, *18*, 3491-3501. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity.
- [6] H. Inui, K. S. Oh, C. Nadem, T. Ueda, S. G. Khan, A. Metin, E. Gozukara, S. Emmert, H. Slor, D. B. Busch, C. C. Baker, J. J. DiGiovanna, D. Tamura, C. S. Seitz, A. Gratchev, W. H. Wu, K. Y. Chung, H. J. Chung, E. Azizi, R. Woodgate, T. D. Schneider, K. H. Kraemer, *J. Invest. Dermatol.* **2008**, *128*, 2055-2068. Xeroderma pigmentosum-variant patients from America, Europe, and Asia.
- [7] J. Butenandt, P. M. A. Eker, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 642-654. Synthesis, Crystal Structure, and Enzymatic Evaluation of a DNA-Photolesion Isostere.
- [8] K. Haiser, B. P. Fingerhut, K. Heil, A. Glas, T. T. Herzog, B. M. Pilles, W. J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 408-411. Mechanism of UV-Induced Formation of Dewar Lesions in DNA.
- [9] M. J. Maul, T. R. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076-10080. Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase.
- [10] A. F. Glas, S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10387-10396. Crystal structure of the T(6-4)C lesion in complex with

- a (6-4) DNA photolyase and repair of UV-induced (6-4) and Dewar photolesions.
- [11] X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J.-S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32580-32590. Reaction Mechanism of (6-4) Photolyase.
- [12] J. Li, Z. Liu, C. Tan, X. Guo, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Nature* **2010**, *466*, 887-890. Dynamics and mechanism of repair of ultraviolet-induced (6-4) photoproduct by photolyase.
- [13] T. Domratcheva, I. Schlichting, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17793-17799. Electronic structure of (6-4) DNA photoproduct repair involving a non-oxetane pathway.
- [14] C. Desnous, D. Guillaume, P. Clivio, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1213-1232. Spore photoproduct: a key to bacterial eternal life.
- [15] J. E. Donnellan, Jr., R. B. Setlow, *Science* **1965**, *149*, 308-310. Thymine Photoproducts but not Thymine Dimers Found in Ultraviolet-Irradiated Bacterial Spores.
- [16] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 163-169. Effects of the binding of alpha/beta-type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of *Bacillus subtilis* and in vitro.
- [17] T. A. Slieman, W. L. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 199-205. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA.
- [18] T. Douki, J. Cadet, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 433-436. Formation of the spore photoproduct and other dimeric lesions between adjacent pyrimidines in UVC-irradiated dry DNA.
- [19] M. G. Friedel, O. Berteau, J. C. Pieck, M. Atta, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Fontecave, T. Carell, *Chem. Commun.* **2006**, 445-447. The spore photoproduct lyase repairs the 5S- and not the 5R-configured spore photoproduct DNA lesion.
- [20] M. G. Friedel, J. C. Pieck, J. Klages, C. Dauth, H. Kessler, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6081-6094. Synthesis and stereochemical assignment of DNA spore photoproduct analogues.
- [21] C. Mantel, A. Chandor, D. Gasparutto, T. Douki, M. Atta, M. Fontecave, P. A. Bayle, J. M. Mouesca, M. Bardet, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16978-

16984. Combined NMR and DFT studies for the absolute configuration elucidation of the spore photoproduct, a UV-induced DNA lesion.
- [22] T. Chandra, S. C. Silver, E. Zilinskas, E. M. Shepard, W. E. Broderick, J. B. Broderick, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2420-2421. Spore photoproduct lyase catalyzes specific repair of the 5R but not the 5S spore photoproduct.
- [23] E. Burckstummer, T. Carell, *Chem. Commun.* **2008**, 4037-4039. Synthesis and properties of DNA containing a spore photoproduct analog.
- [24] W. Siede, F. Eckardt, *Curr. Genet.* **1986**, *10*, 871-878. Analysis of mutagenic DNA repair in a thermoconditional mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Influence of DNA replication and excision repair on REV2 dependent UV-mutagenesis and repair.
- [25] R. H. Heflich, R. E. Neft, *Mutat. Res.* **1994**, *318*, 73-114. Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites.
- [26] S. Schorr, S. Schneider, K. Lammens, K. P. Hopfner, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 20720-20725. Mechanism of replication blocking and bypass of Y-family polymerase {eta} by bulky acetylaminofluorene DNA adducts.
- [27] M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1219-1232. Photosensitised pyrimidine dimerisation in DNA.
- [28] K. Heil, D. Pearson, T. Carell, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4271-4278. Chemical investigation of light induced DNA bipyrimidine damage and repair.
- [29] G. K. Schroeder, C. Lad, P. Wyman, N. H. Williams, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4052-4055. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA.
- [30] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid.
- [31] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13765-13770. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation.

- [32] D. L. Mitchell, J. Jen, J. E. Cleaver, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 225-229. Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation.
- [33] K. McAteer, Y. Jing, J. Kao, J. S. Taylor, M. A. Kennedy, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 1013-1032. Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a Cis-syn thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA.
- [34] M. Lukin, C. de Los Santos, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 607-686. NMR structures of damaged DNA.
- [35] Y. Jing, J. F. Kao, J. S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3845-3853. Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing cis-syn, (6-4) and Dewar photoproducts of TT.
- [36] W. Peng, B. R. Shaw, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10172-10181. Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC-->TT transitions.
- [37] Y. Tu, R. Dammann, G. P. Pfeifer, *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 297-311. Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in vivo.
- [38] J. S. Taylor, I. R. Brockie, C. L. O'Day, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6735-6742. A building block for the sequence-specific introduction of cis-syn thymine dimers into oligonucleotides. Solid-phase synthesis of TpT[c,s]pTpT.
- [39] T. Murata, S. Iwai, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 7279-7286. Synthesis and characterization of a substrate for T4 endonuclease V containing a phosphorodithioate linkage at the thymine dimer site.
- [40] J. S. Taylor, I. R. Brockie, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 5123-5136. Synthesis of a trans-syn thymine dimer building block. Solid phase synthesis of CGTAT[t,s]TATGC.
- [41] F. Brueckner, U. Hennecke, T. Carell, P. Cramer, *Science* **2007**, *315*, 859-862. CPD damage recognition by transcribing RNA polymerase II.
- [42] R. Pokorny, T. Klar, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer, L. O. Essen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 21023-21027. Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome.

- [43] L. M. Kundu, L. T. Burgdorf, O. Kleiner, A. Batschauer, T. Carell, *Chembiochem* **2002**, *3*, 1053-1060. Cleavable substrate containing molecular beacons for the quantification of DNA-photolyase activity.
- [44] S. Nadji, C. I. Wang, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9266-9269. Photochemically and photoenzymatically cleavable DNA.
- [45] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwogler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1763-1766. Weak distance dependence of excess electron transfer in DNA.
- [46] A. J. Varghese, S. Y. Wang, *Science* **1968**, *160*, 186-187. Thymine-thymine adduct as a photoproduct of thymine.
- [47] I. L. Karle, S. Y. Wang, A. J. Varghese, *Science* **1969**, *164*, 183-184. Crystal and molecular structure of a thymine-thymine adduct.
- [48] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, *571*, 3-17. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA.
- [49] J. A. Lippke, L. K. Gordon, D. E. Brash, W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 3388-3392. Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences.
- [50] D. E. Brash, W. A. Haseltine, *Nature* **1982**, *298*, 189-192. UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots.
- [51] W. A. Franklin, K. M. Lo, W. A. Haseltine, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13535-13543. Alkaline lability of fluorescent photoproducts produced in ultraviolet light-irradiated DNA.
- [52] T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, E. Sage, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9221-9226. Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation
- [53] J. K. Kim, B. S. Choi, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 849-854. The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'→5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement.
- [54] J. E. LeClerc, A. Borden, C. W. Lawrence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 9685-9689. The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4)

- ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*.
- [55] M. J. Horsfall, C. W. Lawrence, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 465-471. Accuracy of replication past the T-C (6-4) adduct.
- [56] J. H. Lee, G. S. Hwang, B. S. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 6632-6636. Solution structure of a DNA decamer duplex containing the stable 3' T.G base pair of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: implications for the highly specific 3' T --> C transition of the (6-4) adduct.
- [57] S. Iwai, M. Shimizu, H. Kamiya, E. Ohtsuka, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7642-7643. Synthesis of a Phosphoramidite Coupling Unit of the Pyrimidine (6-4) Pyrimidone Photoproduct and Its Incorporation into Oligodeoxynucleotides.
- [58] T. Mizukoshi, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10634-10642. Studies on the chemical synthesis of oligonucleotides containing the (6-4) photoproduct of thymine-cytosine and its repair by (6-4) photolyase.
- [59] P. Clivio, J. L. Fourrey, *Chem. Commun.* **1996**, 2203-2204. (6-4) Photoproduct DNA photolyase mechanistic studies using s⁵-(6-4) photoproducts.
- [60] S. Shachar, O. Ziv, S. Avkin, S. Adar, J. Wittschieben, T. Reissner, S. Chaney, E. C. Friedberg, Z. Wang, T. Carell, N. Geacintov, Z. Livneh, *EMBO J.* **2009**, *28*, 383-393. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals.
- [61] A. F. Glas, E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**. DNA (6-4) Photolyases Reduce Dewar Isomers for Isomerization into (6-4) Lesions.
- [62] J. Dewar, *Proc. Roy. SOC. Edinburgh* **1866**, *84*. On the Oxidation of Phenyl Alcohol, and a Mechanical Arrangement adapted to illustrate Structure in the Non-saturated Hydrocarbons.
- [63] C. K. Ingold, *J. Chem. Soc.* **1922**, *121*, 1133. History of Dewar Benzene.
- [64] J. S. Taylor, M. P. Cohrs, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2834-2835. DNA, light, and Dewar pyrimidinones: the structure and biological significance to TpT3.

- [65] D. G. Lemaire, B. P. Ruzsicska, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 755-769. Quantum yields and secondary photoreactions of the photoproducts of dTpdT, dTpdC and dTpdU.
- [66] T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, E. Sage, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9221-9226. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation.
- [67] J.-H. Lee, S.-H. Bae, B.-S. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 4591-4596. The Dewar photoproduct of thymidylyl(3' → 5')- thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in accordance with the "A rule".
- [68] J. H. Lee, G. S. Hwang, J. K. Kim, B. S. Choi, *FEBS Lett.* **1998**, *428*, 269-274. The solution structure of DNA decamer duplex containing the Dewar product of thymidylyl(3'→5')thymidine by NMR and full relaxation matrix refinement.
- [69] C. A. Smith, M. Wang, N. Jiang, L. Che, X. Zhao, J. S. Taylor, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4146-4154. Mutation spectra of M13 vectors containing site-specific Cis-Syn, Trans-Syn-I, (6-4), and Dewar pyrimidone photoproducts of thymidylyl-(3'→5')-thymidine in Escherichia coli under SOS conditions.
- [70] J. Yamamoto, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4406-4415. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6-4) photoproduct and their use in (6-4) photolyase studies.
- [71] A. J. Varghese, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *38*, 484-490. 5-Thyminylyl-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light.
- [72] J. Cadet, P. Vigni, *Bioorganic Photochemistry, Volume 1, Photochemistry and the Nucleic Acids, Vol. 1*, Wiley, New York, **1990**.
- [73] G. Lin, L. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9926-9929. Elucidation of spore-photoproduct formation by isotope labeling.
- [74] T. P. Begley, in *Comprehensive natural products chemistry, Vol. 5* (Ed.: C. D. Poulter), Elsevier Science B. V., Amsterdam, Neth., **1999**, pp. 371-399.
- [75] K. S. Lee, D. Bumbaca, J. Kosman, P. Setlow, M. J. Jedrzejas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2806-2811. Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of Bacillus species.

- [76] B. Setlow, P. Setlow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 421-423. Thymine-containing dimers as well as spore photoproducts are found in ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores that lack small acid-soluble proteins.
- [77] G. R. Germaine, W. G. Murrell, *Photochem. Photobiol.* **1973**, *17*, 145-153. Effect of dipicolinic acid on the ultraviolet radiation resistance of *Bacillus cereus* spores.
- [78] F. Tovar-Rojo, M. Chander, B. Setlow, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 584-587. The products of the spoVA operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*.
- [79] R. A. Daniel, J. Errington, *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 468-483. Cloning, DNA sequence, functional analysis and transcriptional regulation of the genes encoding dipicolinic acid synthetase required for sporulation in *Bacillus subtilis*.
- [80] B. Setlow, P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 640-643. Dipicolinic Acid Greatly Enhances Production of Spore Photoproduct in Bacterial Spores upon UV Irradiation.
- [81] T. Douki, M. Court, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **2000**, *54*, 145-154. Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts.
- [82] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 591-597. Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species.
- [83] A. Moysan, A. Viari, P. Vigny, L. Voituriez, J. Cadet, E. Moustacchi, E. Sage, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7080-7088. Formation of cyclobutane thymine dimers photosensitized by pyridopsoralens: quantitative and qualitative distribution within DNA.
- [84] M. Paidhungat, B. Setlow, A. Driks, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5505-5512. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid.
- [85] T. Douki, J. Cadet, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495-2501. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions.

- [86] S. J. Kim, C. Lester, T. P. Begley, *J. Biol. Chem.* **1995**, *60*, 6256-6257. Synthesis of the Dinucleotide Spore Photoproduct.
- [87] R. Nicewonger, T. P. Begley, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 935-936. Synthesis of the spore photoproduct.
- [88] C. Desnous, *Doktorarbeit*, Universite de Paris-Sud, Faculte des Sciences d'Orsay, Orsay, France, **2005**.
- [89] G. Lin, C. H. Chen, M. Pink, J. Pu, L. Li, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9658-9668. Chemical synthesis, crystal structure and enzymatic evaluation of a dinucleotide spore photoproduct analogue containing a formacetal linker.
- [90] A. Chandor, O. Berteau, T. Douki, D. Gasparutto, Y. Sanakis, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Atta, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26922-26931. Dinucleotide spore photoproduct, a minimal substrate of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from *Bacillus subtilis*.
- [91] J. C. Pieck, U. Hennecke, A. J. Pierik, M. G. Friedel, T. Carell, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36317-36326. Characterization of a new thermophilic spore photoproduct lyase from *Geobacillus stearothermophilus* (SplG) with defined lesion containing DNA substrates.
- [92] H. Nilsen, H. E. Krokan, *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 987-998. Base excision repair in a network of defence and tolerance.
- [93] K. Hitomi, S. Iwai, J. A. Tainer, *DNA Repair* **2007**, *6*, 410-428. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair.
- [94] P. J. Berti, J. A. 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.
- [95] T. K. Hazra, A. Das, S. Das, S. Choudhury, Y. W. Kow, R. Roy, *DNA Repair* **2007**, *6*, 470-480. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective.
- [96] 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.

- [97] D. G. Vassylyev, T. Kashiwagi, Y. Mikami, M. Ariyoshi, S. Iwai, E. Ohtsuka, K. Morikawa, *Cell* **1995**, *83*, 773-782. Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: structural basis for damaged DNA recognition.
- [98] G. Golan, D. O. Zharkov, A. P. Grollman, M. L. Dodson, A. K. McCullough, R. S. Lloyd, G. Shoham, *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 241-258. Structure of T4 pyrimidine dimer glycosylase in a reduced imine covalent complex with abasic site-containing DNA.
- [99] L. C. Gillet, O. D. Scharer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 253-276. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair.
- [100] J. T. Reardon, A. Sancar, *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **2005**, *79*, 183-235. Nucleotide excision repair.
- [101] D. E. Szymkowski, C. W. Lawrence, R. D. Wood, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9823-9827. Repair by human cell extracts of single (6-4) and cyclobutane thymine-thymine photoproducts in DNA.
- [102] S. S. Lange, K. Takata, R. D. Wood, *Nat. Rev. Cancer.* **2011**, *11*, 96-110. DNA polymerases and cancer.
- [103] L. A. Loeb, R. J. Monnat, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 594-604. DNA polymerases and human disease.
- [104] U. Huebscher, S. Spadari, G. Villani, G. Maga, **2010**.
- [105] Y. Ma, *Mol. Cell* **2004**, *16*, 701-713. A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining.
- [106] S. Schorr, S. Schneider, K. Lammens, K. P. Hopfner, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 20720-20725. Mechanism of replication blocking and bypass of Y-family polymerase {eta} by bulky acetylaminofluorene DNA adducts.
- [107] A. Alt, K. Lammens, C. Chiochini, A. Lammens, J. C. Pieck, D. Kuch, K. P. Hopfner, T. Carell, *Science* **2007**, *318*, 967-970. Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase eta.
- [108] T. D. Silverstein, R. E. Johnson, R. Jain, L. Prakash, S. Prakash, A. K. Aggarwal, *Nature* **2010**, *465*, 1039-1043. Structural basis for the suppression of skin cancers by DNA polymerase eta.

- [109] C. Biertumpfel, Y. Zhao, Y. Kondo, S. Ramon-Maiques, M. Gregory, J. Y. Lee, C. Masutani, A. R. Lehmann, F. Hanaoka, W. Yang, *Nature* **2010**, *465*, 1044-1048. Structure and mechanism of human DNA polymerase ϵ .
- [110] J. Yamamoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 339-340. Translesion synthesis across the (6-4) photoproduct and its Dewar valence isomer by the Y-family and engineered DNA polymerases.
- [111] D. Szuts, A. P. Marcus, M. Himoto, S. Iwai, J. E. Sale, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 6767-6780. REV1 restrains DNA polymerase zeta to ensure frame fidelity during translesion synthesis of UV photoproducts in vivo.
- [112] R. E. Johnson, M. T. Washington, L. Haracska, S. Prakash, L. Prakash, *Nature* **2000**, *406*, 1015-1019. Eukaryotic polymerases ι and ζ act sequentially to bypass DNA lesions.
- [113] S. Shachar, *EMBO J.* **2009**, *28*, 383-393. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals.
- [114] J. G. Jansen, *DNA Repair* **2009**, *8*, 1444-1451. Mammalian polymerase zeta is essential for post-replication repair of UV-induced DNA lesions.
- [115] J. E. Stone, D. Kumar, S. K. Binz, A. Inase, S. Iwai, A. Chabes, P. M. Burgers, T. A. Kunkel, *DNA Repair* **2011**, *10*, 826-834. Lesion bypass by *S. cerevisiae* Pol ζ alone.
- [116] M. Muller, T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 277-285. Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes.
- [117] B. D. Zoltowski, A. T. Vaidya, D. Top, J. Widom, M. W. Young, B. R. Crane, *Nature* **2011**. Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome.
- [118] C. S. Rupert, S. H. Goodgal, R. M. Herriott, *J. Gen. Physiol.* **1958**, *41*, 451-471. Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated *Hemophilus influenzae* transforming factor.
- [119] K. Hitomi, H. Nakamura, S.-T. Kim, T. Mizukoshi, T. Ishikawa, S. Iwai, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10103-10109. Role of Two Histidines in the (6-4) Photolyase Reaction.
- [120] T. Domratcheva, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18172-18182. Neutral histidine and photoinduced electron transfer in DNA photolyases.
- [121] M. Pedraza-Reyes, F. Gutierrez-Corona, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 3983-3991. Temporal regulation and forespore-specific expression of the

- spore photoproduct lyase gene by sigma-G RNA polymerase during *Bacillus subtilis* sporulation.
- [122] T. A. Slieman, R. Rebeil, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6412-6417. Spore Photoproduct (SP) Lyase from *Bacillus subtilis* Specifically Binds to and Cleaves SP (5-Thymineyl-5,6-Dihydrothymine) but Not Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-Irradiated DNA.
- [123] T.-C. V. Wang, C. S. Rupert, *Photochem. Photobiol.* **1977**, *25*, 123-127. Evidence for the monomerization of spore photoproduct to two thymines by the light-independent "spore repair" process in *Bacillus subtilis*.
- [124] R. Rebeil, Y. Sun, L. Chooback, M. Pedraza-Reyes, C. Kinsland, T. P. Begley, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4879-4885. Spore photoproduct lyase from *Bacillus subtilis* spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases.
- [125] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1097-1106. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods.
- [126] G. Layer, D. W. Heinz, D. Jahn, W.-D. Schubert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 468-476. Structure and function of radical SAM enzymes.
- [127] P. A. Frey, O. T. Magnusson, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2129-2148. S-Adenosylmethionine: A Wolf in Sheep's Clothing, or a Rich Man's Adenosylcobalamin?
- [128] M. R. Challand, R. C. Driesener, P. L. Roach, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1696-1721. Radical S-adenosylmethionine enzymes: mechanism, control and function.
- [129] P. Fajardo-Cavazos, C. Salazar, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 1735-1744. Molecular cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase (spl) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination.
- [130] A. Chandor, T. Douki, D. Gasparutto, S. Gambarelli, Y. Sanakis, Y. Nicolet, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Atta, M. Fontecave, *C. R. Chim.* **2007**, *10*, 756-

765. Characterization of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from *Clostridium acetobutylicum*: A radical-SAM enzyme.
- [131] J. M. Buis, J. Cheek, E. Kalliri, J. B. Broderick, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25994-26003. Characterization of an active spore photoproduct lyase, a DNA repair enzyme in the radical S-adenosylmethionine superfamily.
- [132] R. Rebeil, W. L. Nicholson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 9038-9043. The subunit structure and catalytic mechanism of the *Bacillus subtilis* DNA repair enzyme spore photoproduct lyase.
- [133] P. H. Szu, M. W. Ruszczycky, S. H. Choi, F. Yan, H. W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14030-14042. Characterization and mechanistic studies of DesII: a radical S-adenosyl-L-methionine enzyme involved in the biosynthesis of TDP-D-desosamine.
- [134] L. Yang, G. Lin, D. Liu, K. J. Dria, J. Telser, L. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10434-10447. Probing the reaction mechanism of spore photoproduct lyase (SPL) via diastereoselectively labeled dinucleotide SP TpT substrates.
- [135] J. Cheek, J. B. Broderick, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2860-2861. Direct H atom abstraction from spore photoproduct C-6 initiates DNA repair in the reaction catalyzed by spore photoproduct lyase: evidence for a reversibly generated adenosyl radical intermediate.
- [136] A. Chandor-Proust, O. Berteau, T. Douki, D. Gasparutto, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Fontecave, M. Atta, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36361-36368. DNA repair and free radicals, new insights into the mechanism of spore photoproduct lyase revealed by single amino acid substitution.
- [137] J. Hioe, H. Zipse, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3609-3617. Radical stability and its role in synthesis and catalysis.
- [138] S. C. Wang, P. A. Frey, *Biochemistry* **2007**, *46*, 12889-12895. Binding energy in the one-electron reductive cleavage of S-adenosylmethionine in lysine 2,3-aminomutase, a radical SAM enzyme.
- [139] S. C. Wang, P. A. Frey, *Trends. Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 101-110. S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily.
- [140] R. A. Mehl, T. P. Begley, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1065-1066. Mechanistic studies on the repair of a novel DNA photolesion: the spore photoproduct.

- [141] S. C. Silver, T. Chandra, E. Zilinskas, S. Ghose, W. E. Broderick, J. B. Broderick, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 943-955. Complete stereospecific repair of a synthetic dinucleotide spore photoproduct by spore photoproduct lyase.
- [142] F. Berkovitch, Y. Nicolet, J. T. Wan, J. T. Jarrett, C. L. Drennan, *Science* **2004**, *303*, 76-79. Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme.
- [143] K. S. Duschene, S. E. Veneziano, S. C. Silver, J. B. Broderick, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *13*, 74-83. Control of radical chemistry in the AdoMet radical enzymes.
- [144] S. D. McCulloch, R. J. Kokoska, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, T. A. Kunkel, *Nature* **2004**, *428*, 97-100. Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase eta occurs with biased fidelity.
- [145] T. Reissner, S. Schneider, S. Schorr, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3077-3080. Crystal structure of a cisplatin-(1,3-GTG) cross-link within DNA polymerase eta.
- [146] M. Durand, S. Peloille, N. T. Thuong, J. C. Maurizot, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9197-9204. Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains.
- [147] J. H. van de Sande, N. B. Ramsing, M. W. Germann, W. Elhorst, B. W. Kalisch, E. von Kitzing, R. T. Pon, R. C. Clegg, T. M. Jovin, *Science* **1988**, *241*, 551-557. Parallel stranded DNA.
- [148] T. S. Krishna, X. P. Kong, S. Gary, P. M. Burgers, J. Kuriyan, *Cell* **1994**, *79*, 1233-1243. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA.
- [149] L. Haracska, C. M. Kondratick, I. Unk, S. Prakash, L. Prakash, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 407-415. Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function.
- [150] E. Schleicher, K. Hitomi, C. W. M. Kay, E. D. Getzoff, T. Todo, S. Weber, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4738-4747. Electron Nuclear Double Resonance Differentiates Complementary Roles for Active Site Histidines in (6-4) Photolyase.

- [151] K. Condic-Jurkic, A.-S. Smith, H. Zipse, D. M. Smith, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2012**, *8*, 1078-1091. The Protonation States of the Active-Site Histidines in (6–4) Photolyase.
- [152] S. Faraji, A. Dreuw, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 227-230. Proton-Transfer-Steered Mechanism of Photo lesion Repair by (6-4)-Photolyases.
- [153] A. Glas, *Doktorarbeit, LMU (Munich)*, **2010**. Investigation of the (6-4) photoproducte.
- [154] B. Fingerhut, *Doktorarbeit, LMU (Munich)*, **2011**. Optimale Photochemische Energiekonversion und Umgebungseffekte in Reaktiver Moleküldynamik. .
- [155] B. Mennucci, E. Cancès, J. Tomasi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10506-10517. Evaluation of Solvent Effects in Isotropic and Anisotropic Dielectrics, and in Ionic Solutions with a Unified Integral Equation Method: Theoretical Bases, Computational Implementation and Numerical Applications.
- [156] Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 161103. Exchange-correlation functional with broad accuracy for metallic and nonmetallic compounds, kinetics, and noncovalent interactions.
- [157] R. A. Gaussian 09, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc.. Wallingford CT, **2009**.
- [158] A. Warshel, M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227-249. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme.

- [159] M. Valiev, E. J. Bylaska, N. Govind, K. Kowalski, T. P. Straatsma, H. J. J. v. Dam, D. Wang, J. Nieplocha, E. Apra, T. L. Windus, W. A. d. Jong, *Comput. Phys. Commun.* **2010**, *181*, 1477 NWChem: a comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations.
- [160] Y.-J. Ai, R.-Z. Liao, S.-L. Chen, W.-J. Hua, W.-H. Fang, Y. Luo, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10976-10982. Repair of DNA Dewar Photoproduct to (6-4) Photoproduct in (6-4) Photolyase.
- [161] Y. Wang, P. P. Gaspar, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5510-5519. Quantum Chemical Study of the Electron-Transfer-Catalyzed Splitting of Oxetane and Azetidine Intermediates Proposed in the Photoenzymatic Repair of (6-4) Photoproducts of DNA.
- [162] S. Kiontke, Y. Geisselbrecht, R. Pokorny, T. Carell, A. Batschauer, L. O. Essen, *The EMBO journal* **2011**. Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA.
- [163] J. M. Maul, R. M. T. Barends, F. A. Glas, J. C. Max, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076-10080. Crystal Structure and Mechanism of a DNA (6-4) Photolyase¹³.
- [164] K. K. Ogilvie, E. A. Thompson, M. A. Quilliam, J. B. Westmore, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 2865-2868. Selective protection of hydroxyl groups in deoxynucleosides using alkylsilyl reagents.
- [165] S. Phadtare, J. Zemlicka, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3675-3679. Synthesis of *N*¹-(4-hydroxy-1,2-butadien-1-yl)thymine, an analogue of 3'-Deoxythymidine.
- [166] M. M. Greenberg, M. R. Barvian, G. P. Cook, B. K. Goodman, T. J. Matray, C. Tronche, H. Venkatesan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1828-1839. DNA damage induced via 5,6-dihydrothymid-5-yl in single-stranded oligonucleotides.
- [167] C. Prakash, S. Saleh, I. A. Blair, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 19-22. Selective De-Protection of Silyl Ethers.
- [168] 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.

- [169] M. Munzel, L. Lercher, M. Muller, T. Carell, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e192. Chemical discrimination between dC and 5MedC via their hydroxylamine adducts.
- [170] T. Beck, C. E. da Cunha, G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2009**, *65*, 1068-1070. How to get the magic triangle and the MAD triangle into your protein crystal.
- [171] P. Fajardo-Cavazos, R. Rebeil, W. L. Nicholson, *Curr. Microbiol.* **2005**, *51*, 331-335. Essential cysteine residues in *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase identified by alanine scanning mutagenesis.
- [172] 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.
- [173] D. S. Daniels, T. T. Woo, K. X. Luu, D. M. Noll, N. D. Clarke, A. E. Pegg, J. A. Tainer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 714-720. DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT.
- [174] K. Paspaleva, G. F. Moolenaar, N. Goosen, *DNA Repair* **2009**, *8*, 600-611. Damage recognition by UV damage endonuclease from *Schizosaccharomyces pombe*.
- [175] J. L. Vey, J. Yang, M. Li, W. E. Broderick, J. B. Broderick, C. L. Drennan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 16137-16141. Structural basis for glycy radical formation by pyruvate formate-lyase activating enzyme.
- [176] J. Knappe, A. F. Volker Wagner, in *Advances in Protein Chemistry, Vol. Volume 58* (Ed.: J. E. D. Judith P. Klinman), Academic Press, **2001**, pp. 277-315.
- [177] K. Schwetlick, H. G. O. Becker, R. Beckert, *Organikum, Vol. 9*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2009**.
- [178] W. Kabsch, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795-800. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants.
- [179] Collaborative, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760-763. The CCP4 suite: programs for protein crystallography.

- [180] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, L. C. Storoni, R. J. Read, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 458-464. Likelihood-enhanced fast translation functions.
- [181] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501. Features and development of Coot.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATT	6-Aza-2-thiothymin
BER	<i>base excision repair</i> , Basen-Entfernungs-Reparatur
BTT	Benzylthiotetrazol
ber.	berechnet
Bu	n-Butyl
C	Cytosin
CED-Cl	Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
CPG	<i>controlled pore glass</i>
δ	NMR: chemische Verschiebung
d	Tage
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
dG	2'-Desoxyguanosin
dT	2'-Desoxythymidin
dd	doppelt destilliert
DIEA	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

eq	Äquivalent(e)
ESI	Elektronensprayionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EtOAc	Essigsäureethylester
FAD	Flavinadenindinukleotid
G	Guanin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GGR	<i>global genome repair</i> , genomweiten Reparatur
h	Stunde(n)
$h\nu$	Photoreaktion
8-HDF	8-Hydroxydesazaflavin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , hochaufgelöstes Massenspektrum
J	Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
L	Liter
Lsg.	Lösung
M	Masse
M	MS: Molekülion
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MS	Massenspektrum
MS/MS	MS eines mit MS isolierten Ions
MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotides
NER	<i>nucleotide excision repair</i> , Nukleotid-Entfernungs-Reparatur

NEt ₃	Triethylamin
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinnresonanz)
Nu	Nukleophil
PAD	Polymerase assoziierte Domäne
PDB	<i>Proteine Database</i>
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rp	<i>reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAM	S-Adenosylmethionin
SASP	<i>small acid soluble proteins</i>
SEMCI	Trimethylsilylethoxymethylchlorid
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
SP	Sporenphotoprodukt
SPL	Sporenphotoproduktlyase
T	Temperatur
T	Thymin
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBDPSCI	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilylchlorid
TCR	<i>transcription coupled repair</i> , transkriptions gekoppelten Reparatur
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLS	<i>trans lesion synthesis</i>
TMS	Trimethylsilylan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Uracil
UV	ultraviolett
Vis	<i>visible</i>
z	MS: Ladungszahl

6.2 Datensammlungs-, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistiken der Proteinkristallstrukturen

Tabelle 4: Datensammlungs-, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistiken der Kristallstrukturen von *B. st.* DNA Polymerase und Sporenphotoprodukt enthaltender DNA.

	BstPoll SPR (2y1j)	BstPoll SPS (2y1i)
Data collection		
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	88.5 93.4 105.8	88.7 93.8 107.1
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Wavelength (Å)	1.000	0.98
Resolution (Å)	50.0-2.15 (2.27-2.15)	45.0-2.70 (2.85-2.70)
<i>R</i> _{merge}	0.088 (0.453)	0.135 (0.673)
Mean <i>I</i> / σ <i>I</i>	14.9 (3.7)	12.1 (3.2)
No. of observations	231747 (31617)	152459 (22421)
No. of unique reflections	47859 (6657)	25193 (3639)
Completeness (%)	99.3 (96.0)	99.9 (100.0)
Redundancy	4.8 (4.7)	6.1 (6.2)
Refinement		
Resolution (Å)	46.8 – 2.14	68.3 – 2.78
No. reflections	64680	21822
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.1985 / 0.2410	0.2280 / 0.2725
No. atoms	5228	
Protein	4650	4650
DNA	401	401
Waters	167	7
Sulphate	10	10
<i>B</i> -factors		
Protein	26.1	22
DNA	37.4	34.8
Waters	27.8	12.5
Sulphate	47.4	34.3
R.m.s deviations		
Bond lengths (Å)	0.016	0.010
Bond angles (°)	1.53	1.21

Tabelle 5: Datensammlungs-, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistiken der Kristallstrukturen von Sporenphotoproduktlyase aus *G. thermodenitrificans*.

	SP lyase Fe edge	SP lyase Se peak	SP lyase	SP lyase + SP	Mutant C140A	Mutant C140A+Sp	Mutant C140S	Mutant Y98A	Mutant Y98F
Data collection									
Wavelength (Å)	1.7220	0.9786	0.9792	1.0000	0.9778	0.9778	0.9786	0.9786	0.9786
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁								
Unit cell parameters a, b, c	53.6, 63.2, 143.9	54.3, 62.9, 144.5	54.3, 63.1, 143.9	53.2, 58.9, 131.6	54.0, 63.0, 143.6	53.2, 59.0, 131.5	54.2, 63.1, 143.3	53.9, 62.7, 143.9	54.0, 62.7, 142.6
Resolution (Å)	40.0 - 2.1	40.0 - 3.0	47.4 - 2.2	71.9 - 2.0	43.1 - 2.0	71.9 - 2.3	47.3 - 2.0	47.3 - 2.4	43.0 - 2.3
High resolution bin	2.1 - 2.2	3.0 - 3.1	2.2 - 2.3	2.0 - 2.1	2.0 - 2.1	2.3 - 2.4	2.0 - 2.1	2.4 - 2.5	2.3 - 2.4
No.Unique reflections	46946	19154	48139	28692	33706	19013	33427	19459	22170
Completeness (%)	85.0 (32.5)	99.9 (100)	99.2 (99.1)	99.6 (99.7)	99.3 (98.0)	99.7 (99.7)	98.2 (96.4)	98.4 (97.0)	99.6 (99.4)
R merge (%)	8.6 (35.0)	16.3 (51.6)	9.4 (42.0)	7.1 (48.4)	8.1 (38.1)	6.6 (52.4)	7.8 (45.4)	12.1 (72.2)	13.2 (67.4)
I/σ	23.2 (5.4)	17.6 (6.8)	10.2 (3.1)	18.0 (4.1)	10.4 (3.2)	12.4 (3.0)	11.9 (3.1)	11.3 (2.8)	9.7 (2.6)
Redundancy	14.0	13.6	3.4	7.0	4.2	4.3	5.2	6.1	6.4
Wilson B-factor (Å ²)	32.0	34.6	31.9	28.5	29.8	53.2	30.5	46.0	47.2
Refinement									
Resolution (Å)	-	-	47.4 - 2.2	71.9 - 2.0	43.1 - 2.0	71.9 - 2.3	47.3 - 2.0	47.3 - 2.4	43.0 - 2.3
R work / R free	-	-	0.210/ 0.249	0.219/ 0.254	0.222/ 0.259	0.222/ 0.258	0.210/ 0.247	0.211/ 0.260	0.213/ 0.264
No. atoms									
Protein	-	-	2810	2802	2809	2786	2818	2795	2809
Fe-S	-	-	8	8	8	8	8	8	8
SAM	-	-	27	27	27	27	27	27	27
Water	-	-	167	112	124	62	173	88	123
SP	-	-	-	34	-	34	-	-	-
Other ligands*	-	-	39	34	23	30	24	25	20
Average B-factors (Å²)									
protein	-	-	21.6	32.3	30.0	48.0	29.5	33.3	34.7
Fe-S	-	-	13.0	22.5	22.8	39.2	22.8	23.5	24.6
SAM	-	-	18.9	25.4	26.1	41.5	22.1	24.8	27.0
Water	-	-	28.7	43.0	33.6	46.8	35.4	33.0	37.2
SP	-	-	-	41.0	-	63.2	-	-	-
Other ligands*	-	-	38.1	43.9	41.0	50.2	36.5	40.1	40.0
R.m.s. deviations									
Bond length (Å)	-	-	0.0047	0.0077	0.0046	0.0049	0.0056	0.0067	0.0064
Bond angles (°)	-	-	0.83	1.14	0.82	0.87	0.99	1.03	1.03