

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

**Synthese und Untersuchung der Reparatur von aromatischen
DNA Basenaddukten und von Cyclopentan-Analoga oxidativer
Reaktionsprodukte**

Karola Luise Gasteiger

aus

Augsburg, Deutschland

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung der LMU München vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 27.12.2014

Karola Luise Gasteiger

Dissertation eingereicht am: 27.10.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Karaghiosoff

Mündliche Prüfung am: 9.12.2014

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Journals oder auf Fachkonferenzen publiziert.

Publikationen

T. H. Gehrke[#], U. Lischke[#], K. L. Gasteiger[#], S. Schneider[#], S. Arnold, H. C. Müller, D. S. Stephenson, H. Zipse, T. Carell, *Nat. Chem. Bio.* **2013**, 9, 455–461, *Unexpected non-Hoogsteen-based mutagenicity mechanism of FaPy-DNA lesions*.

N. Kitsera, K. Gasteiger, B. Lühnsdorf, J. Allgayer, B. Epe, T. Carell, A. Khobta, *PLOS ONE* **2014**, 9(4), e94405, *Cockayne Syndrome: Varied Requirement of Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair for the Removal of Three Structurally Different Adducts from Transcribed DNA*.

S. C. Koch[#], J. Kuper[#], K. L. Gasteiger[#], R. Strasser, D. Eisen, S. Geiger, N. Wichlein, S. Schneider, C. Kisker, T. Carell, *In search for damage: Rad14 (XPA) probes DNA deformability instead of performing direct lesion recognition* (eingereicht in *Nat. Struct. Mol. Biol.*).

Konferenzbeiträge

242nd ACS-Meeting, Denver, CO (2011) – Posterpräsentation: “*Translesion Synthesis Bypass of Bulky Acetylaminofluorene DNA Adducts*”.

SFB 646 Meeting, München, Deutschland (2012) – Posterpräsentation: “*Formation of Frameshift Mutations by Low Fidelity Polymerase η* ”.

4th EuCheMS, Prag, Tschechische Republik (2012) – Posterpräsentation: “*DNA Damage Recognition by XPA/Rad14 in Nucleotide Excision Repair*”.

SFB 749 Meeting, Wildbadkreuth, Deutschland (2013) – Posterpräsentation: “*Mechanism of Mutagenesis Created by Radical Induced Oxidative FaPy-dG-Lesions*”.

Weitere Publikationen

A. Biela, F. Coste, F. Culard, M. Guerin, S. Goffinont, K. Gasteiger, J. Ciesla, D. Gasparutto, T. Carell, B. Tudek, B. Castaing, *Nucleic Acid Res.* **2014**, 42(16), 10748–10761, *Zinc finger oxidation of Fpg/Nei DNA glycosylases by 2-thioxanthine: biochemical and X-ray structural characterization*.

[#] Beitrag zu gleichen Teilen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für die Aufnahme in den Arbeitskreis, das überaus interessante Thema und die exzellenten Arbeitsbedingungen bedanken.

Herrn *Prof. Dr. K. Karaghiosoff* danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Frau *Slava Gärtner* danke ich für ihre Hilfe in allen organisatorischen Belangen. Außerdem geht mein Dank an Frau *Sabine Voß* und *Kerstin Kurz* für das Organisieren all der großen und kleinen Dinge, die man in der Chemie benötigt.

Dr. Sandra Koch möchte ich für die tolle Zusammenarbeit danken. Vielen Dank für die fachliche und persönliche Unterstützung! Es war eine Freude mit dir zu arbeiten und gemeinsam durch die Höhen und Tiefen dieser Zeit zu gehen.

Dr. Ulrike Lischke, Barbara Steigenberger und *Dr. Viviana Fluxa* möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit auf den verschiedenen Projekten danken.

Dr. Sabine Schneider danke ich für die vielen Fahrten zum Synchrotron, das Messen unserer Kristalle und die anschließende Auswertung.

Dr. Markus Müller danke ich für seine große Hilfsbereitschaft in allen biochemischen, IT und alltäglichen Fragen.

Einen großen Dank an die Korrekturleser *Dr. Sandra Koch, Dr. Markus Müller, Dr. Stefan Schiesser, Dr. Ulrike Lischke und Barbara Steigenberger*.

Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen des Arbeitskreis Carell danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Die zahlreichen Feiern und gemeinsamen Ausflüge sorgten für die nötige Ablenkung vom Laboralltag.

Ein besonderer Dank geht an all die Kollegen, die in dieser Zeit zu Freunden wurden und mit denen ich viele schöne Momente erlebt habe.

Barbara Steigenberger, Olga Kotljarova und Dr. Ulrike Lischke möchte ich für die schöne gemeinsam verbrachte Zeit bei Kaffee, Kochen, Sport und zahlreichen weiteren Freizeitbeschäftigungen danken.

Dr. Stefan Schiesser danke ich für all die spaßigen Momente seit dem ersten Semester. Durch dich wurden die langen Zugfahrten und Tage im Labor deutlich unterhaltsamer, nicht zu vergessen deine stetige Hilfsbereitschaft in allen Synthesefragen.

Dr. Ben danke ich für seine Aufmunterungen, wenn ich mal zu lächeln vergaß ;)

Es bleiben noch viele Weitere, die mir durch ihre Freundschaft, durch gemeinsam verbrachte Abende und durch so Vieles mehr neue Energie gaben – unter anderem *Dr. Andrea Kneuttinger, Silvia Laube, Dr. Christian Deiml* und *Dr. Markus Müller*.

Diese Aufzählung ist sicherlich unvollständig, deshalb ein herzliches Dankeschön an alle, die sich angesprochen fühlen!

Meinen Praktikanten und Masterranden, insbesondere *Charlotte Ebert* möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Ich wünsche euch noch eine schöne Zeit im AK und anderswo.

Mein größter Dank gilt meiner geliebten Familie, die mich stets unterstützt hat. Meinen Eltern *Jutta* und *Gerhard Gasteiger* und meiner Schwester *Lisa* möchte ich für ihre Liebe, Unterstützung und ihr Vertrauen danken. Ihr seid immer für mich da – vielen Dank dafür!

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
1. Einleitung	1
1.1 DNA-Reparaturmechanismen	1
1.2 Nukleotidexzisionsreparatur	2
1.3 Auf NER-Defekten basierende Krankheiten	3
<i>Xeroderma Pigmentosum</i>	3
<i>Cockayne Syndrom</i>	4
<i>Trichothiodystrophie</i>	5
1.4 Substrate für NER	5
1.4.1 UV-Schäden	6
1.4.2 Adduktschäden	9
Aromatische Addukte	9
Cisplatin Addukte	14
1.5 DNA-Struktur/Reparatur Beziehung	15
1.6 NER – Schadensdetektion	16
1.7 TFIIH – Schadensverifizierung	21
1.8 Welche Rolle spielt XPA?	28
1.9 Oxidative DNA-Schäden	31
1.9.1 Oxidation von Guanin	32
1.9.2 Die Formamidopyrimidin DNA-Schäden	34
1.9.2.1 Stabilität der natürlichen Formamidopyrimidine	34
1.9.2.2 Bioisostere Analoga der FaPy-Schäden	36
1.9.3 Mutagenität oxidativer Schäden	38
2. Aufgabenstellung	39
3. Ergebnisse und Diskussion	40

3.1	Synthese des dG(C8)-AAF Phosphoramidits	40
3.2	Synthese des dG(N^2)-AAF Phosphoramidits	45
	Synthese von 3-Brom-2-nitrofluoren	45
3.3	DNA Festphasensynthese und Aufreinigung der Oligonukleotide	50
	Aufreinigung und Charakterisierung der modifizierten Oligonukleotide	54
3.4	Thermodynamische Effekte des dG(C8)-AAFs auf die DNA Duplexstabilität	55
3.5	<i>Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)</i>	57
3.5.1	EMSA mit radioaktiv markierter DNA	57
3.5.2	EMSA mit Fluorescein markierter DNA	59
3.6	Kristallisation der minimal DNA bindenden Domäne von Rad14	60
3.6.1	Kristallisation von $^{35}\text{SeMet}$ Rad14 ₁₈₈₋₃₀₆ mit dG(C8)-AAF dsDNA	60
3.6.2	Kristallisation von $^{35}\text{SeMet}$ Rad14 ₁₈₈₋₃₀₆ mit 5-BrdU/dG(C8)-AAF dsDNA	61
3.6.3	Kristallisation von Rad14 ₁₈₈₋₃₀₂ mit 5-IdU/dG(C8)-AAF dsDNA	62
3.7	Kristallstrukturanalyse von Rad14 ₁₈₈₋₃₀₂ im Komplex mit dG(C8)-AAF DNA	63
3.8	Diskussion	71
3.8.1	Schadenserkennung von dG(C8)-AAF durch Rad14	71
3.8.2	<i>In vivo</i> Studien zur Reparatur von AAF-Schäden	75
3.9	Carbozyklische FaPy-dG Nukleotide als bioisostere Analoga	77
3.9.1	Zusammenfassung der Publikation	77
3.9.2	Beitragserklärung	77
4.	Ausblick	127
5.	Experimentalteil	128
5.1	Methoden zur DNA Synthese, Entschützung und Aufreinigung	128
5.2	Biochemische Methoden und Materialien	130
5.3	Material und Methoden zur organischen Synthese	133
5.4	Synthese des dG(C8)-AAF Phosphoramidits	136
5.5	Synthese des dG(N^2)-AAF Phosphoramidits	146
6.	Anhang	155

6.2	Kristallstrukturdaten.....	157
6.3	Abkürzungsverzeichnis	158
6.4	Literaturverzeichnis.....	164

Zusammenfassung

Die Nukleotidexzisionsreparatur entfernt viele strukturell unterschiedliche DNA-Schäden, wie sterisch anspruchsvolle aromatische DNA-Addukte, Photoschäden oder auch Strangverknüpfungen, die durch Cisplatinchemotherapeutika entstehen. Das XPA Protein ist in der NER von zentraler Bedeutung. Ist das Protein defekt, findet keine Reparatur statt, was schwerwiegende Folgen für den Organismus hat. Die Rolle von XPA bzw. von Rad14, dem Hefehomolog von XPA, in der Reparatur besser zu verstehen, war Teil dieser Arbeit. Dazu wurden die beiden Hauptprodukte von Acetylaminofluoren (AAF), das dG(C8)-AAF und das dG(N^2)-AAF synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut. Mittels gelelektrophoretischer Bindungsstudien wurden die Affinitäten der minimal DNA-bindenden Domänen von XPA und Rad14 bestätigt. Desweiteren wurde gezeigt, dass bei höheren Proteinkonzentrationen ein zweites XPA/Rad14 Molekül kooperativ an die geschädigte DNA bindet. Die Co-Kristallisation von Rad14 mit einer dG(C8)-AAF enthaltenden, doppelsträngigen DNA lieferte schließlich eine Kristallstruktur (**Abbildung 1**), welche Einblick in den Bindungsmechanismus des Proteins an geschädigte DNA gibt. Zwei Rad14 Proteine binden in einem Abstand von 13 Nukleotiden an den DNA Duplex. Eines bindet ober- und eines unterhalb des Schadens, ohne direkte Interaktionen zwischen den Proteinen und dem Schaden aufzubauen. Der aromatische Rest des AAFs ist in den DNA Duplex gedreht und stapelt mit den darüber und darunter liegenden Basen. Beide Proteine schieben eine β -Schleife ober- und unterhalb des 13mer Erkennungsmotivs in den Duplex, wodurch die Enden der Doppelhelix entwunden werden. Die Bindung der beiden Proteine führt außerdem zu einem starken Knick der DNA, was Teil des Schadenserkennungsmechanismus seine könnte. Durch Protein-Protein *crosslink* Experimente konnte bestätigt werden, dass dieser 2:1 Komplex auch in Lösung vorliegt. Dass die Interkalation der β -Schleife essentiell für die Bindung ist, wurde mit Fluoreszenzdepolarisationsexperimenten bestätigt. Diese zeigen, dass eine Mutation des an der Interkalation beteiligten Phe262 zu einem Alanin zum vollständigen Affinitätsverlust des Proteins führt.

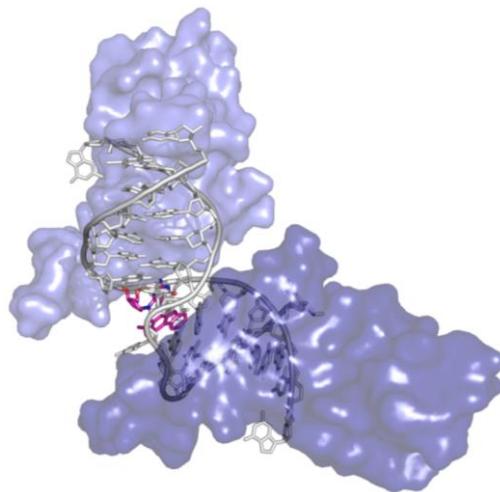


Abbildung 1: Co-Kristallstruktur von Rad14 (hell- und dunkelblau) im Komplex mit doppelsträngiger DNA (grau) mit einem zentralen dG(C8)-AAF Schaden (magenta).

Die Struktur zeigt, dass Rad14 Schäden in der DNA erkennt, indem es offenbar deren Biegsamkeit überprüft. Dieser Mechanismus ist anders als der bei der Schadenserkennung durch XPC oder XPE und bietet einen komplett neuen Einblick in die NER.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung des Mutagenitätsmechanismus von oxidativen Formamidopyrimidinschäden (FaPy). Kristallstrukturen der DNA Polymerase I aus *Bacillus stearothermophilus* (Bst Pol I) zeigen die Polymerase bei der fehlerfreien Replikation von carbozyklischem FaPy-dG und FaPy-dA sowie bei einem Fehleinbau gegenüber des jeweiligen Schadens. Überraschenderweise bleibt die *anti*-Konformation der Nukleotide um die glykosidische Bindung sowohl bei der fehlerfreien als auch bei der fehlerhaften Replikation erhalten. Das ist möglich weil die Nukleotide eine *Hoogsten*-Basenpaarung mit den gegenüber eingebauten Basen eingehen. Um zu bestätigen, dass dieser Mechanismus nicht nur auf Besonderheiten des Carbozyklus zurückzuführen ist, wurden in dieser Arbeit das carbozyklische 2'-Desoxyguanosin (cdG) synthetisiert und mit dem natürlichen verglichen. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die bevorzugte Konformation der glykosidischen Bindung zwischen N9 und C_{1'} gelegt. Mittels quantitativer 2D NMR Spektroskopie und theoretischen Berechnungen konnte gezeigt werden, dass carbozyklische Nukleotide, welche für die Co-Kristallisation von oxidativ geschädigter DNA verwendet wurden, ein ähnliches *syn/anti* Verhältnis aufweisen, wie die natürlichen Nukleotide und somit gute Imitate für diese sind.

Summary

The nucleotide excision repair pathway can remove a wide variety of structural different DNA lesions, like aromatic bulky adducts, UV-lesions or crosslinks derived from cisplatin chemotherapeutics. The XPA protein is of central importance in the NER pathway. A defect of the protein leads to a complete loss of repair activity with severe consequences for the organism. The focus of this thesis was to gain a better understanding of the role of XPA and its yeast homolog Rad14 in the repair pathway. Therefore the two main reaction products of acetyl aminofluorene (AAF), the dG(C8)-AAF and the dG(N^2)-AAF, were synthesized and incorporated into oligonucleotides. The binding affinities of the minimal DNA binding domains of XPA and Rad14 were determined with gelshift assays. It could be shown that at higher protein concentrations a second XPA/Rad14 molecule binds to the damaged DNA. Co-crystal structures with Rad14 in complex a dG(C8)-AAF containing doublestranded DNA (**Figure 1**) gave insight into the binding mechanism of the protein to damaged DNA. Two Rad14 proteins bind to the DNA along a stretch of 13 nucleotides, up- and downstream of the damaged base, without any direct contacts to the lesion. The aromatic unit of the AAF is flipped into the duplex and stacks with the surrounding base pairs. Both proteins intrude a β -hairpin at both ends of the 13mer recognition motif, thereby unwinding the ends of the double helix. The binding of the proteins is accompanied by a strong kink of the DNA, which could be part of the damage recognition mechanism. Protein-protein crosslink experiments proved that the 2:1 complex also forms in solution. Fluorescence depolarization studies show that intercalation of the β -hairpin is essential for protein binding. A mutation of Phe262, which takes part in the intercalation, to an alanine leads to a complete loss of protein binding.

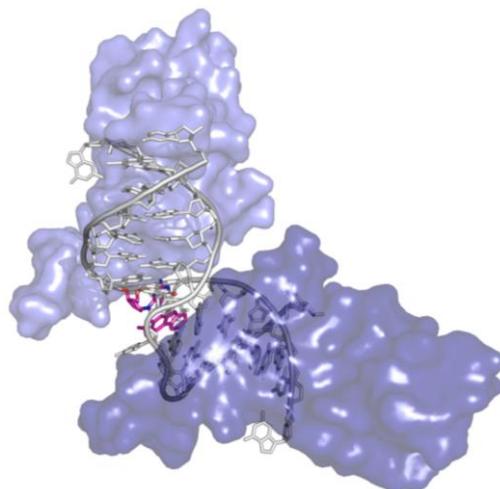


Figure 1: Co-crystal structure of Rad14 (light and dark blue) in complex with doublestranded DNA (grey) containing a central dG(C8)-AAF lesion (magenta).

The structures show that Rad14 recognizes lesions apparently by probing the deformability of damaged DNA. This mechanism is distinct from the XPC and XPE mediated lesion recognition process and provides a complete new insight into the NER.

The second part of this thesis focussed at the mechanism of mutagenesis of the oxidative formamidopyrimidine (FaPy) lesions. Crystal structures with the DNA polymerase I of *Bacillus stearothermophilus* (Bst Pol I) show the polymerase during errorfree and errorprone replication of carbocyclic FaPy-dG and FaPy-dA. Surprisingly the FaPy nucleotides kept their *anti*-geometry around the glycosidic bond in both cases, the errorfree and errorprone replication. This is possible because the lesion can build a Hoogsten-basepair with the incorporated base. To confirm that this mechanism is not only due to specifics of the carbocycle, the carbocyclic 2'-deoxyguanosine (cdG) was synthesized and compared with the natural dG. Particular attention was given to the preferred conformation of the glycosidic bond between N9 and C_{1'}. Using quantitative 2D NMR spectroscopy and theoretical calculations it was shown that carbocyclic nucleotides, which were used for the crystallisation experiments, have a similar *syn/anti* ratio compared to the natural nucleotides and thus are good mimics of those.

1. Einleitung

1.1 DNA-Reparaturmechanismen

Pro Tag und Zelle entstehen geschätzt etwa 10^4 bis 10^6 Schäden an der DNA eines Säugetiers.^[1-2] Exogene Substanzen, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), aromatische (heterozyklische) Amine oder alkylierende Agenzien, welche über die Nahrung oder Atemwege aufgenommen werden, können mit der DNA reagieren. Auch energiereiche UV- oder γ -Strahlung führen zu sperrigen Verknüpfungen der Basen oder zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Neben diesen äußerer Einflüssen ist die DNA auch empfindlich gegenüber endogenen Prozessen. Dazu gehören Hydrolyse, sowie die Reaktion mit verschiedenen reaktiven Substanzen, die während des Zellstoffwechsels entstehen. Die Akkumulierung von Schäden über die Zeit hinweg wird unter anderem für die Entstehung von Krankheiten, wie Krebs, und das Altern verantwortlich gemacht.

Um den schädlichen Einflüssen entgegenzuwirken und die genomische Integrität zu erhalten, haben alle Organismen ein Netzwerk an effizienten Reparaturmechanismen entwickelt.^[3] Ein Mechanismus, der aufgrund seiner breit gefächerten Substratspezifität besonders hervorsticht, ist die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Mit diesem Reparaturweg beschäftigt sich die vorliegende Arbeit und er wird in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben. Ein weiterer bedeutender Mechanismus ist die Basenexzisionsreparatur (BER). Auf diesem Weg werden vor allem oxidative Schäden, hervorgerufen durch reaktive Sauerstoffspezies, behoben. Hierbei wird der Schaden mit Hilfe einer DNA-Glykosylase erkannt und die modifizierte Base entfernt. Die entstandene Lücke wird durch den Einbau der korrekten Base mittels einer DNA-Polymerase und anschließende Ligation des DNA Rückgrats geschlossen. Die postreplikative Rekombinations-Reparatur nutzt die genetische Information des noch intakten Strangs, um das DNA-Addukt zu umgehen und ermöglicht trotz vorhandener Schäden eine nahezu fehlerfreie Replikation der DNA. Um Fehlpaarungen durch den Einbau der falschen Nukleotide zu verhindern, besitzen viele DNA-Polymerasen einen Korrekturlese-Mechanismus. Werden Fehlpaarungen während der Replikation übersehen, können diese mittels der sogenannten *Mismatch*-Reparatur (MMR) behoben werden. Einige DNA-Polymerasen, wie die DNA-Polymerase III (in Prokaryoten) und die DNA-Polymerasen δ und ϵ (in Eukaryoten), besitzen außerdem eine einzigartige $3' \rightarrow 5'$ -Exonukleaseaktivität. Sie halten nach dem falschen Einbau einer Base während der Synthese an, verlagern das $3'$ -Ende der wachsenden DNA-Kette mit der fehlgepaarten Base zum Exonukleasebereich und schneiden diese heraus. Anschließend wird das $3'$ -Ende erneut auf die Polymeraseregion

übertragen und der entsprechende Bereich korrekt kopiert. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen vollzieht sich auf zwei unterschiedlichen Reparaturwegen: Durch homologe Rekombination (*homologous recombination - HR*) und durch die nicht-homologe Endverknüpfung (*nonhomologous end joining - NHEJ*).^[4] **Abbildung 2** gibt einen Überblick über die Ursachen einiger DNA-Schäden und deren Reparatur.

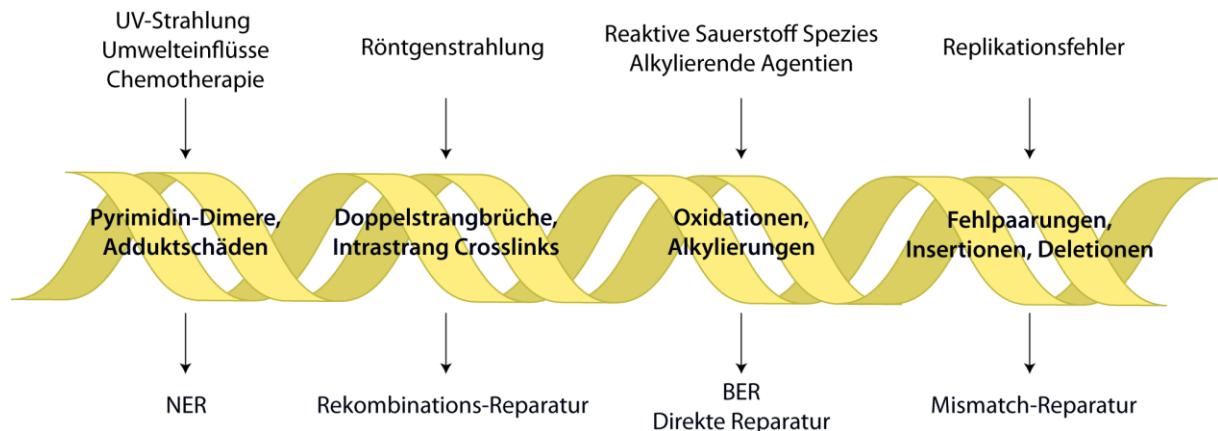


Abbildung 2: Ursachen für wichtige DNA-Schäden und deren Hauptreparaturwege.^[4]

Zusätzlich zu den vielfältigen Reparaturwegen haben Organismen einen Mechanismus entwickelt, Schäden in der DNA während der Replikation zu tolerieren. Dieser Mechanismus wurde erst in den späten 1990er Jahren entdeckt und ist als *translesion DNA Synthesis* (TLS) bekannt. Hierbei kommen spezielle Polymerasen mit einer geringeren Genauigkeit (*low fidelity* Polymerasen) zum Einsatz, die aufgrund ihrer strukturellen Beschriftenheit über den Schaden hinweglesen können.^[5-11] Humane Zellen besitzen mindestens vier spezialisierte *low fidelity* Polymerasen (Pol η , Pol κ , Pol ι und REV1), welche zur Y-Familie gehören und weitere *low fidelity* Polymerasen, die zu anderen Familien zählen (Pol ζ , Pol μ und Pol λ). Sind in einem Organismus verschiedene Mitglieder der Y-Familie vorhanden, so haben diese meist eine unterschiedliche Substratpräferenz sowie TLS-Effizienz.^[12]

1.2 Nukleotidexzisionsreparatur

Die Nukleotidexzisionsreparatur entfernt sterisch anspruchsvolle Basenaddukte, die durch UV-Licht, Umweltmutagene und Chemotherapeutika verursacht werden.^[13-14] Die NER unterteilt sich in zwei Reparaturwege, die sich lediglich durch ihren Schadenserkennungsmechanismus unterscheiden. Die *global genome repair* (GGR)

untersucht das gesamte Genom nach DNA-Schäden. **Abbildung 3** zeigt schematisch den Mechanismus der GGR. Die Transkriptions gekoppelte Reparatur (*transcription coupled repair*, TCR) wird durch eine Blockierung der RNA Polymerase II durch einen Schaden eingeleitet.^[15-16] Dieser Stopp rekrutiert die *Cockayne* Syndrom Faktoren A und B (CSA bzw. CSB) zur Schadensverifizierung. Die anschließende Reparatur der DNA verläuft in beiden Wegen auf die gleiche Weise. Zuerst wird die Doppelhelix durch den TFIIH-Komplex, zu dem die Helikasen XPB und XPD gehören, aufgewunden und vermutlich durch XPA und RPA stabilisiert, sodass die geschädigte DNA in einer Blase einzelnsträngig vorliegt. Daraufhin erfolgt die Doppelinzision des beschädigten DNA-Stranges durch die Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF in 5'- und 3'-Position zum Schaden, in der Folge wird ein Oligonukleotid, bestehend aus 24 bis 32 Nukleotiden entfernt.^[17-18] Die Lücke wird anschließend durch die replikativen Polymerasen δ und ϵ oder die TLS Polymerase κ in Anwesenheit von PCNA, RFC und RPA wieder aufgefüllt.^[19] Insgesamt sind etwa 30 Proteine an der NER beteiligt. Sind eines oder mehrere der Proteine funktionsunfähig, so kann dies zu schwerwiegenden Krankheiten führen.

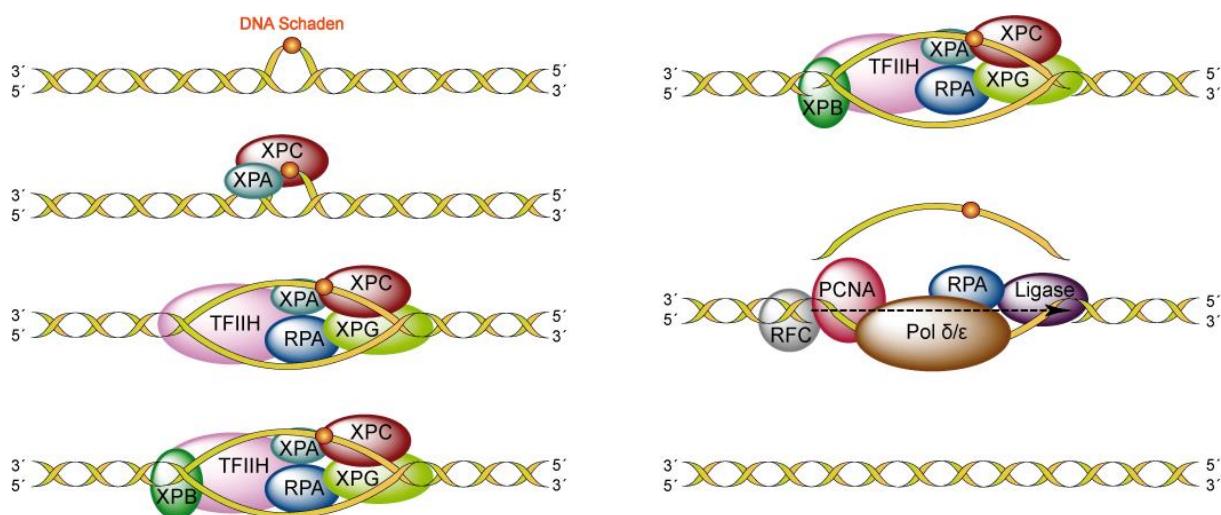


Abbildung 3: Überblick über den *global genome* Reparaturweg.^[20]

1.3 Auf NER-Defekten basierende Krankheiten

Xeroderma Pigmentosum

Xeroderma Pigmentosum (XP), auch bekannt als *Melanosis lenticularis progressiva* oder Mondscheinkrankheit, ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Krankheit, deren Hauptmerkmal eine besonders hohe UV-Empfindlichkeit der Haut und der Augen ist. XP-

Patienten haben ein mehr als 1000fach erhöhtes Hautkrebsrisiko im Vergleich zu gesunden Menschen.^[21-22] Die ersten Hauttumore treten bei ihnen bereits in einem Alter von etwa acht Jahren auf, also durchschnittlich 50 Jahre früher als in der restlichen Bevölkerung. Etwa 20–30% der XP-Patienten sind außerdem von neurologischen Degenerationen betroffen, die durch ein frühzeitiges Absterben der Neuronen bedingt sind.^[23-24] XP wurde zum ersten Mal in 1874 von *Kaposi* und *Von Hebra* beschrieben.^[25] Der Zusammenhang dieser Krankheit mit einer fehlerhaften DNA-Reparatur wurde dann 1968 von *Cleaver* entdeckt.^[26-27] Es gibt sieben verschiedene XP-Komplementärgruppen (XP-A bis XP-G), die durch eine fehlerhafte Nukleotidexzisionsreparatur bedingt sind, abhängig davon, welches Gen betroffen ist.^[28] Die unterschiedlichen Phänotypen konnten durch diverse *knock-out* Experimente ermittelt werden und es wurde deutlich gezeigt, wie wichtig das NER-System für Organismen ist.^[29-34] Ein Verlust der NER-Aktivität führt im Allgemeinen neben einer deutlich erhöhten Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht auch zu einer vermehrten Tumorentwicklung nach Exposition gegenüber chemischen Karzinogenen. Den stärksten Ausprägungsgrad zeigt ein Defekt des XPA-Proteins. Homozygote XPA-/- Mausmutanten haben beispielsweise keinerlei funktionierende NER und sind nach der Behandlung mit PAKs besonders anfällig für Tumore der Haut, des Lymphsystems und der Leber.^[31, 33] 1971 wurde dann eine achte XP Form entdeckt, die keine Defekte der NER, sondern eine fehlerhafte Replikation aufwies.^[35] 1972 wurde diese Form von *Cleaver* mit XP-Variant (XP-V) benannt.^[36-37] 1999 identifizierte *Hanaoka* das XPV (POLH) Gen als jenes, welches für die TLS Polymerase η kodiert.^[38] Pol η gehört zur Y-Familie der TLS Polymerasen und ist spezialisiert auf die Replikation von DNA in Gegenwart von Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPDs) und sterisch anspruchsvollen DNA-Addukten.^[6, 39-41]

Cockayne Syndrom

Das *Cockayne* Syndrom (CS) wurde erstmals 1936 von *Edward Alfred Cockayne* beschrieben^[42] und äußert sich durch Symptome wie Kleinwuchs, verlangsame geistige Entwicklung, neurologische Fehlbildungen, vogelähnliche Gesichter, verfallene Zähne und grauem Star.^[23, 43] Im Gegensatz zu XP zeigen CS-Patienten keine ungewöhnliche Pigmentierung der Haut oder erhöhtes Hautkrebsrisiko.^[24] CS-Patienten haben eine mittlere Lebenserwartung von 12.5 Jahren. CS Zellen haben eine fehlerhafte TCR mit zwei Komplementärgruppen (CS-A und CS-B) aber eine funktionierende GGR.^[44] Da bei XP-Patienten viele der CS-Symptome nicht auftreten, kann der CS Phänotyp nicht durch einen

TCR-Defekt alleine erklärt werden. Daher nimmt man an, dass in CS Zellen nicht nur die Reparatur beeinträchtigt ist, sondern auch die Transkription an sich.^[45-46]

Trichothiodystrophie

Eine weitere Krankheit, die sich auf eine fehlerhafte NER zurückführen lässt, ist die *Trichothiodystrophie* (TTD). TTD-Patienten haben aufgrund des stark reduzierten Gehalts an cysteinreichen Matrixproteinen in den Haaren besonders brüchiges Haar.^[47] Weitere Symptome sind eine verlangsamte Entwicklung, ungewöhnlich geformte Gesichter, schuppende Haut und Kleinwuchs.^[48-49] Obwohl die Haut einiger Patienten sensibel auf Sonnenlicht reagiert, gibt es keine Aufzeichnungen über ungewöhnliche Pigmentierung oder erhöhtes Krebsrisiko.^[50] TTD ist die Folge von Mutationen in den XPB-, XPD- und TTD-A-Genen, welche alle Untereinheiten des TFIIH Komplexes sind.^[51-53]

1.4 Substrate für NER

Die NER hat eine besonders breite Substratspezifität. Es wird eine große Anzahl an strukturell nicht verwandten Schäden erkannt und repariert.^[13, 54-56] Besonders bedeutend sind hierbei DNA Schäden, die durch energiereiche UV-Strahlung des Sonnenlichts entstehen.^[57] Außerdem werden sterisch anspruchsvolle, sogenannte *bulky* DNA-Addukte, hervorgerufen durch mutagene Chemikalien aus der Umwelt oder durch zytotoxische Medikamente, wie sie beispielsweise in der Chemotherapie verwendet werden, repariert.^[45, 58] NER ist auch an der Reparatur von DNA *crosslinks* beteiligt. Diese entstehen durch Chemikalien, die an zwei verschiedenen Stellen Bindungen mit der DNA eingehen können. Dies kann entweder am gleichen Strang (intrastrang *crosslinks*) sein oder aber an beiden Strängen (interstrang *crosslinks*).^[59] Für die Reparatur von interstrang *crosslinks* ist eine Kombination aus NER und TLS und/oder homologer Rekombination nötig, da die NER einen intakten Strang als Templat für die Reparatur des defekten Strangs benötigt.^[60] Klassische Beispiele für *crosslink*-induzierende Reagenzien sind *cis*-Dichlorodiaminoplatin (Cisplatin), Stickstoff *mustards* und Psoralene.^[59, 61]

1.4.1 UV-Schäden

Das UV-Spektrum ist in drei Wellenlängenbereiche unterteilt: UVA- (320–400 nm), UVB- (290–320 nm) und UVC-Strahlung (200–290 nm). Die kürzeren Wellenlängen, die sogenannte UVC-Strahlung wird größtenteils durch die Ozonschicht von der Erdoberfläche abgehalten. Für die Entstehung von DNA Photoschäden besonders bedeutend ist die UVB-Strahlung, da Photoschäden maximal bis zu einer Wellenlänge von 300 nm entstehen. In diesem Bereich liegen die Absorptionsmaxima der wichtigsten DNA Basen (Thymin, Cytosin sowie 5-Methylcytosin). Energiereiche UV-Strahlung führt hauptsächlich zur Bildung von mutagenen Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPD) und Pyrimidin(6-4)-pyrimidon ((6-4)PP) Photoprodukten.^[62-64] Es wird angenommen, dass pro Stunde starker Sonneneinstrahlung etwa 40 000 Schäden in der menschlichen Haut entstehen.^[65] Im Gegensatz zu Prokaryoten und manchen Eukaryoten, die Photoschäden zusätzlich mit Hilfe von Photolyasen entfernen können, sind menschliche Zellen für deren Reparatur vollständig auf NER angewiesen.^[66]

CPDs sind die am häufigsten gebildeten UV-Schäden. Sie entstehen durch eine $[2\pi+2\pi]$ Cycloadditionsreaktion aus dem angeregten Trippletzustand der C5-C6 Doppelbindungen zweier benachbarter Pyrimidinbasen (**Abbildung 4**). Theoretisch können *cis/trans* und *syn/anti* Diastereomere gebildet werden. In doppelsträngiger DNA kann allerdings aus sterischen Gründen ausschließlich das *cis-syn* Produkt entstehen. Das *trans-syn* Konformer bildet sich nur in einzelsträngiger DNA.

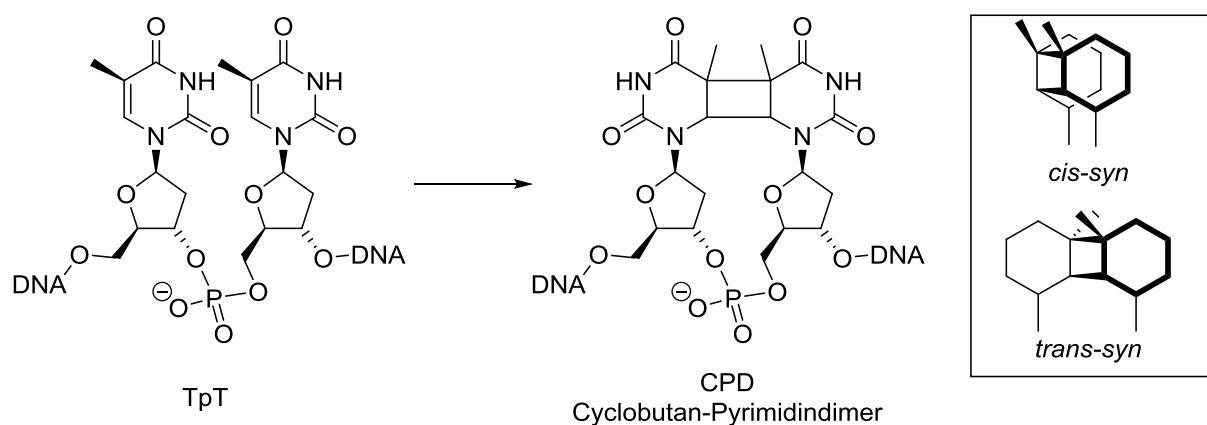


Abbildung 4: Entstehung und Strukturen des CPD-Photoprodukts aus zwei benachbarten Thymidinen.

CPDs werden vor allem zwischen zwei Thymidinen gebildet, da diese die niedrigste Triplettenenergie aufweisen und somit den besten Akzeptor beim Energietransfer innerhalb der

DNA darstellen.^[67-68] Besonders mutagen sind allerdings Dimere aus Cytosinen. Die häufigste bei Replikation von CPDs entstehende Mutation ist eine dC → dT Transversion.^[69-72] Ein möglicher Grund dafür ist, dass eine Deaminierung von dC zu dU im Photodimer aufgrund der verlorenen Ringaromatizität viel schneller stattfindet als bei einem intakten dC. Im Photodimer wird ein dC *in vivo* innerhalb eines Tages deaminiert. Dieser Prozess steht damit in zeitlicher Konkurrenz zur Reparatur und Zellteilung.^[73-74] Gegenüber den entstandenen Uracilen wird nun während der Replikation Adenosin eingebaut, was letztendlich zur dC → dT Transversion führt. Ein weiterer Grund ist die sogenannte A-Regel der Polymerasen. Wird ein Substrat von ihnen nicht erkannt, wird bevorzugt ein dA gegenüber eingebaut. Dies führt im Falle eines dC ebenfalls zur Transversionsmutation.

(6-4)PP Photoprodukte sind die am zweithäufigsten entstehenden UV-Schäden, machen aber nur etwa 20–30% der Photoschäden aus. Sie entstehen durch eine Paternó-Büchi-Reaktion der C5-C6 Bindungen einer 5'-Pyrimidinbase und der C4-Carbonylgruppe eines 3'-Thymidins beziehungsweise der 4-Iminogruppe eines 3'-Cytosins.^[75-76] Weitere UVB-Bestrahlung von (6-4)PP kann zu einer Umlagerung in das Dewar-Isomer führen (**Abbildung 5**).^[77]

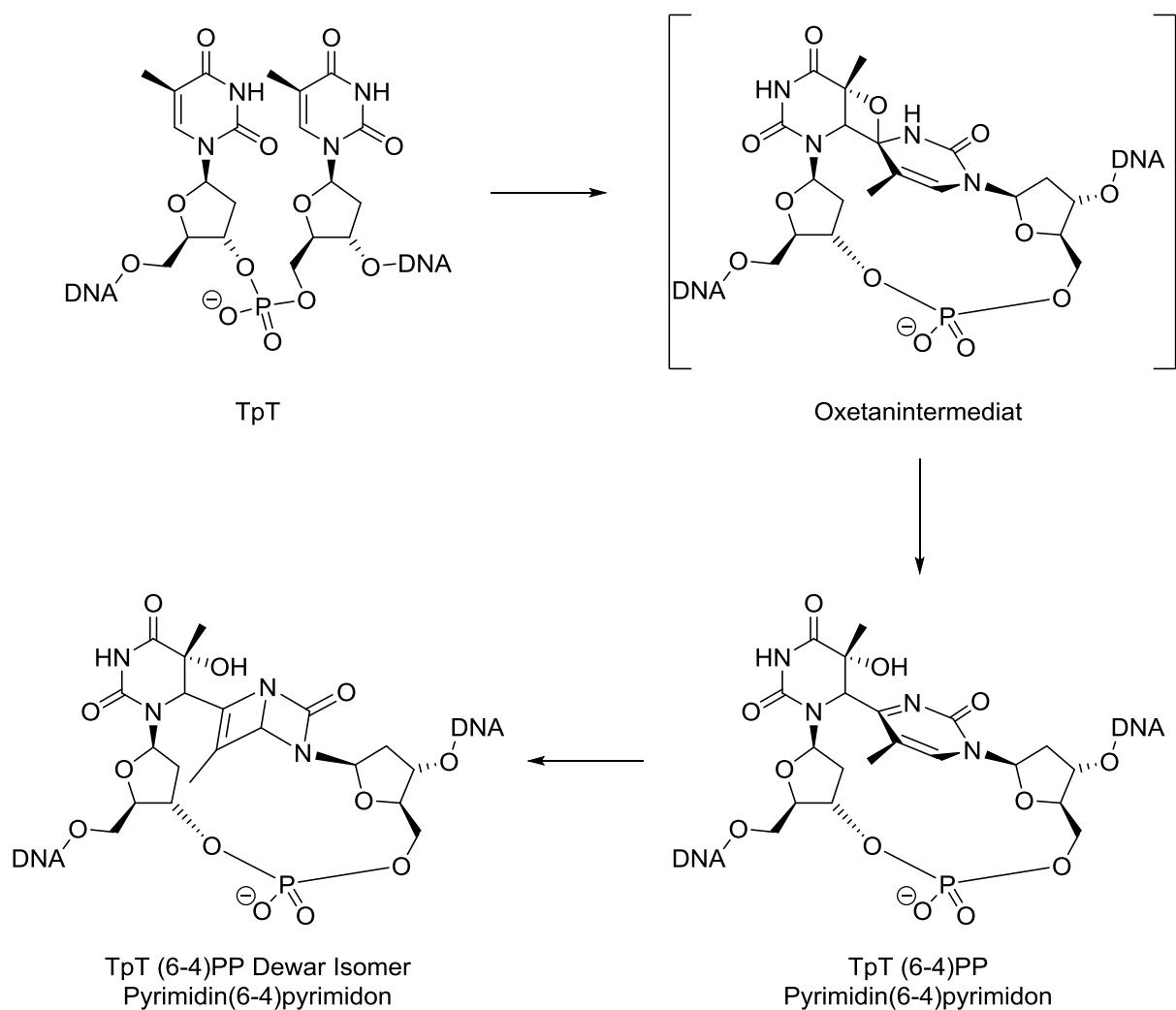


Abbildung 5: Entstehung und Strukturen des (6-4)PP und dem Dewar-Photoprodukts.

Obwohl der CPD und der (6-4)PP Schaden auf ähnliche Weise entstehen, ist ihre Auswirkung auf die DNA-Struktur äußerst verschieden. CPDs induzieren nur einen leichten Knick der Doppelhelix und beeinträchtigen kaum die Watson-Crick Basenpaarung.^[78-80] (6-4)PP Schäden dagegen führen zu einem deutlichen Knick in der Doppelhelix und stören die Basenpaarung an der Schadensstelle.^[81] Dies äußert sich auch in einer unterschiedlich starken NER Antwort auf die beiden Schäden: (6-4)PPs sind deutlich bessere NER Substrate als CPDs.^[82-85]

1.4.2 Adduktschäden

Den größten Anteil an Karzinogenen machen elektrophile Substanzen aus. Viele werden erst durch Metabolisierung zu reaktiven Elektrophilen aktiviert, wie beispielsweise (heterozyklische) aromatische Amine oder PAKs.^[86-90] Die Elektrophile reagieren mit den nukleophilen Atomen der DNA, bevorzugt mit N7, C8 und N² von Guanosin sowie N3 und N⁶ von Adenosin. Die N7-Position des Guanosins ist aufgrund der hohen Elektronendichte und der guten Zugänglichkeit in der großen Furche der DNA besonders reaktiv. Durch benachbarte Guanosine wird die Elektronendichte der N7-Position sogar noch erhöht, was dann zu sogenannten Mutations-*hotspots* führt. Möglicherweise entstehen auch die dG(C8)-Addukte durch Umlagerung aus den dG(N7)-Addukten.^[91-92]

Aromatische Addukte

Sperrige (*bulky*) DNA-Addukte, sind Produkte der Reaktionen von (metabolisch) aktivierten aromatischen Aminen oder polzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) mit der DNA. Diese entstehen häufig durch unvollständige Verbrennung von organischen Materialien, wie beim Braten und Grillen von Fisch und Fleisch oder sind in Tabakrauch und Fahrzeugabgasen enthalten.^[93-96] Schon vor über 200 Jahren erkannte man den Zusammenhang zwischen der zunehmenden Verschmutzung durch Abgase im Zuge der Industrialisierung und der Entstehung von Krebs.^[97] Bis heute sind schädliche PAKs, aus Automobil- und Industrieabgasen oder Zigarettenrauch, eine große Bedrohung für unsere Gesundheit.^[95-96, 98] Ein bekannter und sehr gut untersuchter Vertreter der PAKs ist das Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P). B[*a*]P ist an sich eher unreaktiv wird aber durch metabolischen Abbau zu einem starken Karzinogen. Bei diesem Prozess, der eigentlich der Entgiftung dient, werden PAKs in Phenole oder Dihydrodiole umgewandelt, welche einfach ausgeschieden werden. Ein kleiner Teil der Moleküle wird aber zu elektrophilen Epoxiden oxidiert, welche dann in die DNA interkalieren und unter anderem mit der exozyklischen Aminogruppe des Guanosins reagieren können.^[97, 99]

Das Aflatoxin B1 (AFB1) ist eine der am stärksten krebserregenden Substanzen überhaupt und wird von den Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* gebildet (**Abbildung 6**).^[100] Diese befallen bevorzugt Getreide oder Erdnüsse und können auf diese Weise in unsere Nahrung gelangen. Das starke Lebergift wird, wie das Benzo[*a*]pyren, durch Cytochrom P450 in das Epoxid umgewandelt, welches mit der DNA Addukte bilden kann. Allerdings reagiert das

Aflatoxin bevorzugt mit der N7 Position des Guanosins und führt zum entsprechenden ringgeöffneten Formamidopyrimidin und in der Folge zu Depurinierung.^[101-102]

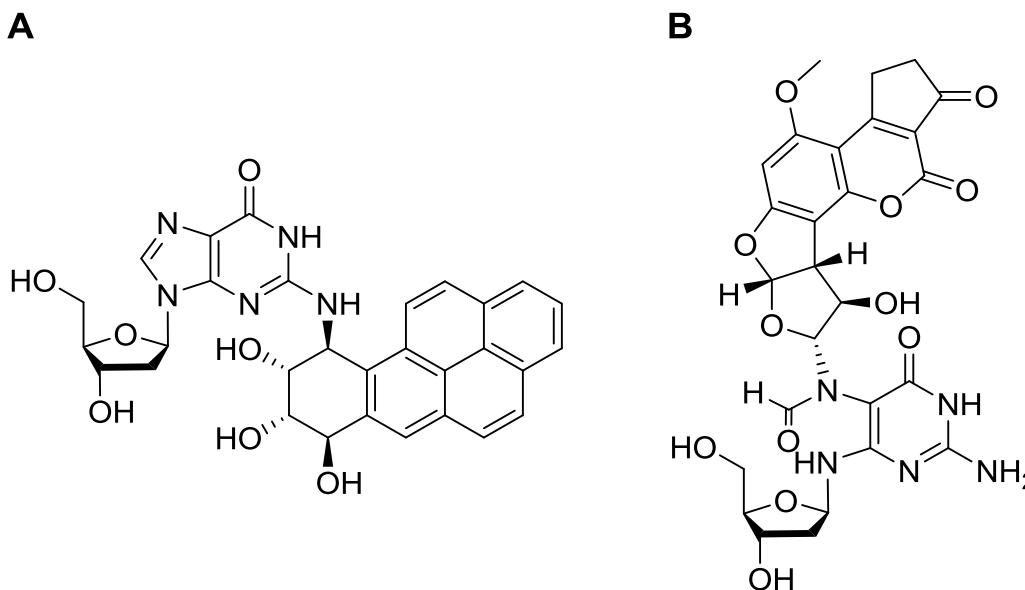


Abbildung 6: A) (7R)- N^2 -(10-(7 β ,8 α ,9 α -trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren)-yl)-desoxyguanosin. (dG(N^2)-BP) wird durch Reaktion von 7 β ,8 α -Dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren (BPDE) mit 2'-Desoxyguanosin gebildet. B) 8,9-Dihydro-8-(N5-formyl-2',5',6'-tri-amino-4'-oxo-N5-pyrimidyl)-9-hydroxy-aflatoxin B₁ (dG(N7)-AFB₁).

Zu den am besten untersuchten Prototypen für aromatische Amine gehören das 2-Aminofluoren (AF) und das *N*-Acetyl-2-aminofluoren (AAF). AAF wurde ursprünglich als Insektizid synthetisiert und 1940 patentiert, kam aber aufgrund seiner Kanzerogenität nie in den Handel.^[103] Die Metabolisierung von AF und AAF ist in (Abbildung 7) dargestellt.^[86-87, 89-90, 103-105]

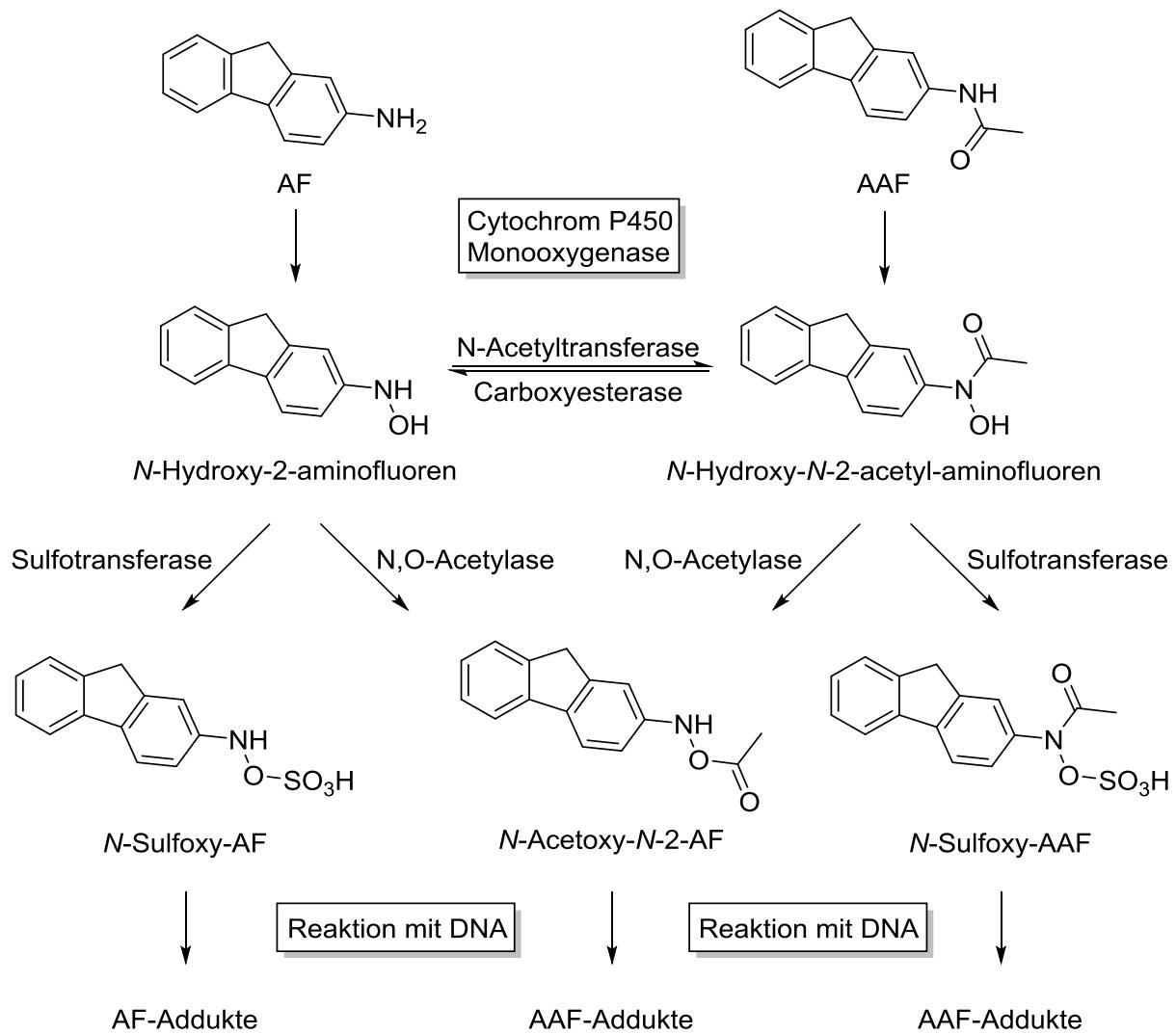


Abbildung 7: Metabolische Aktivierung von AF und AAF durch Cytochrom P450.

AF und AAF werden in der Leber durch *N*-Oxidation mit Hilfe einer Cytochrome P450 Monooxygenase in *N*-Hydroxy-2-aminofluoren und *N*-Hydroxy-*N*-2-acetylaminofluoren umgewandelt. *N*-Hydroxy-2-aminofluoren kann entweder durch die Bildung eines Arylnitrenium-Ions direkt mit der DNA reagieren oder mittels einer Sulfotransferase oder einer *O*-Acetylase zu einem reaktiven Ester umgesetzt werden. Außerdem kann *N*-Hydroxy-2-aminofluoren durch eine *N*-Acetyltransferase in *N*-Hydroxy-*N*-2-acetylaminofluoren umgewandelt werden. *N*-Hydroxy-*N*-2-acetylaminofluoren wird dann durch eine Sulfotransferase in den reaktiven Ester überführt. Die aktivierten Ester können über Nitreniumzwischenstufen nun mit den Basen der DNA reagieren. Dies geschieht bevorzugt an der C8- oder *N*²-Position des Guanosins. Aus Untersuchungen mit *E. coli* ist bekannt, dass AF als Addukt an der C8-Position des Guanins hauptsächlich Basenpaarsubstitutionen verursacht,

während AAF in repetitiven DNA-Sequenzen vor allem zu -1 und -2 *frameshift*-Mutationen führt, was den Verlust von einem oder mehreren Basenpaaren bedeutet. Ihre biologische Auswirkung ist also trotz ähnlicher struktureller Beschaffenheit sehr unterschiedlich.^[106-108] Das AF-Addukt kann zwei verschiedene Konformationen um die glykosidische Bindung einnehmen. In der einen bleibt das Guanosin in der *anti*-Konformation, welches die Hauptkonformation ist. So kann weiterhin eine normale Watson-Crick-Basenpaarung eingegangen werden. Hier ist der Fluorenring in die große Furche der DNA gedreht. In der anderen Konformation ist der Fluorenring in die Helix interkaliert und das Guanosin nimmt eine *syn*-Konformation bezüglich der glykosidischen Bindung ein. Eine Basenpaarung ist nicht möglich.^[109] Das AAF-dG Addukt liegt nur in der *syn*-Konformation vor und kann unter keinen Umständen eine Basenpaarung mit dem gegenüberliegenden Cytosin eingehen (**Abbildung 8**).^[109]

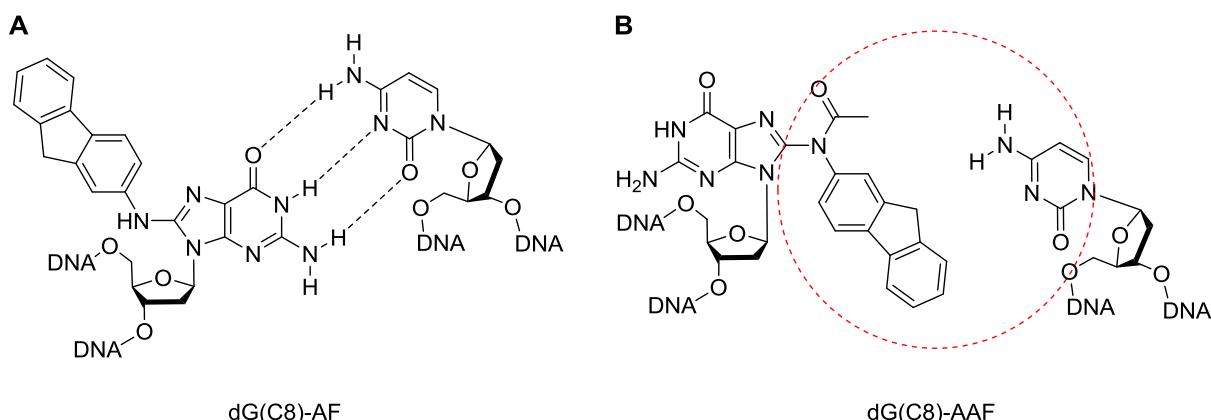


Abbildung 8: **A)** dG(C8)-AF in *anti*-Konformation mit Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) zu einem gegenüberliegenden dC. **B)** dG(C8)-AAF in *syn*-Konformation ohne die Möglichkeit Wasserstoffbrücken auszubilden.

Die Reaktion von AF und AAF mit der DNA liefert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* etwa 5–15% des N^2 -Addukts.^[110-111] Es wird angenommen, dass die Arylnitreniumionen auch die N7-Position des Guanosins direkt angreifen und anschließend ein Transfer des Arylamins von der N7-Position zur C8-Position des Guanosins stattfindet.^[91-92] Alternativ können Carbokationen, die durch die Arylnitreniumionen Resonanz stabilisiert sind, das Guanosin auch unter Bildung des N^2 -Addukts angreifen. Hierbei wird meistens das C-Atom, das *ortho* zur Aminogruppe steht, kovalent an die N7-Position gebunden.^[112] **Abbildung 9** zeigt die beiden mesomeren Grenzstrukturen, die für die Ausbildung von C8- und N^2 -Addukten verantwortlich sind.

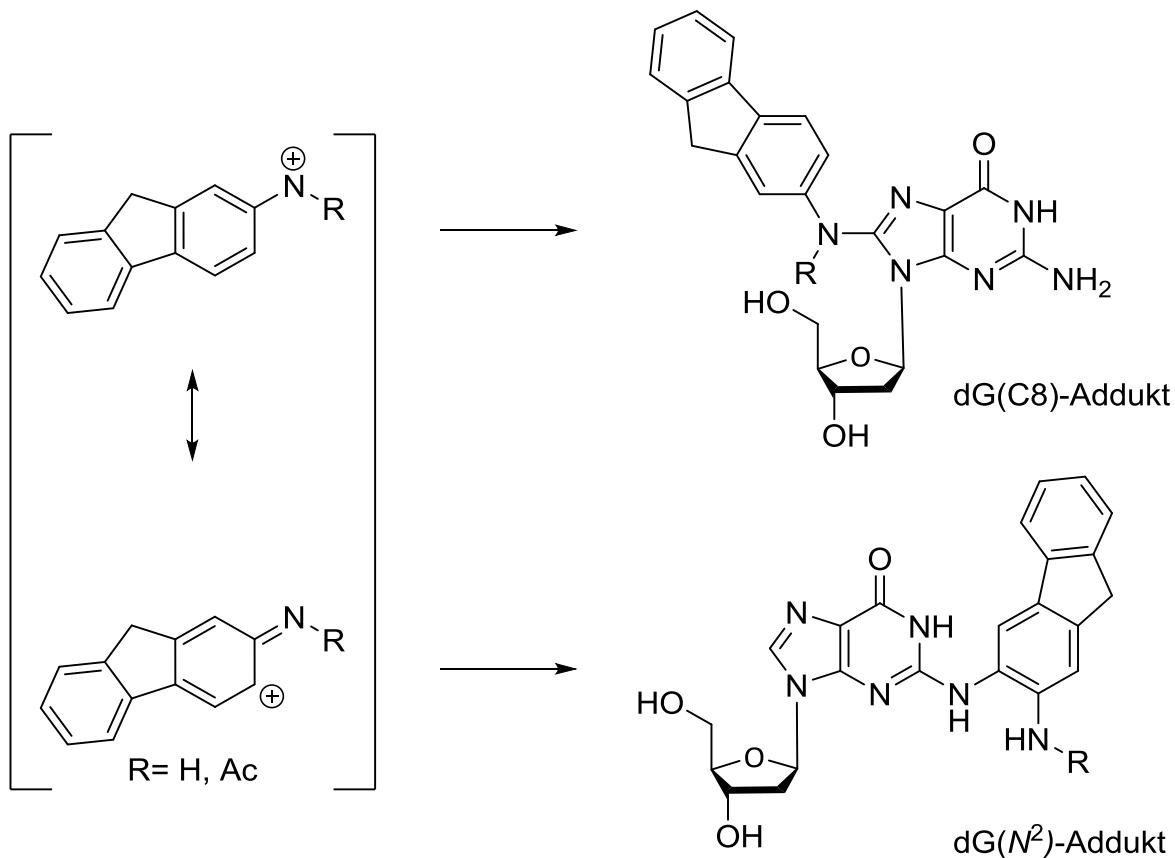


Abbildung 9: Mesomere Grenzstrukturen der Arylnitreniumionen, welche mit 2'-Desoxyguanosin reagieren und die C8- und N²-Addukten bilden.

Analytische Untersuchungen zeigen, dass die Bildung von N²-Addukten durch Arylamine deutlich geringer ist als die Entstehung von C8-Addukten. Bei *in vitro* Untersuchungen in Leberzellen von Ratten entstanden ca. 60% des AAF(C8)-dGs, 20% des C8-AF-dGs und 6% des N²-AAF-dGs. *In vivo* entstand das AAF(N²)-dG ebenfalls in kleineren Mengen, zu 80% entstand hier allerdings das nicht acetylierte AF(C8)-dG.^[110-111] Da sich gezeigt hat, dass die C8-Addukte nur eine mäßige Mutagenität aufweisen, wird angenommen, dass die N²-Addukte biologisch eine bedeutendere Rolle einnehmen. Dies basiert auch auf der Beobachtung, dass die N²-Addukte im Gewebe der mit AAF gefütterten Tiere, über längere Zeit bestehen bleiben, während AAF(C8)-dG und AF(C8)-dG schnell mittels Exzisionsreparatur entfernt werden. In der Leber von Ratten, die einmalig mit AAF gefüttert wurden, konnte AAF(C8)-dG nur am Tag nach der Behandlung festgestellt werden, während AAF(N²)-dG noch 14 Tage später nachgewiesen werden konnte.^[110-111] Diese Erkenntnisse führten dazu, dass in den letzten Jahren die N²-Addukte weiter in den Fokus für gentoxische Studien rückten.^[113] Auch hier äußern sich die unterschiedlichen Beeinträchtigungen der Helix in der NER Antwort.^[114-115] Neueste *in vivo* Studien mit *knock out* Experimenten lieferten eine Erklärung für die

unterschiedliche Reparaturrate der beiden Addukte. Während die C8-Addukte leicht von den Proteinen der GGR erkannt und somit schnell entfernt werden, wird das N^2 -Addukt nur mittels TCR repariert.^[116]

Cisplatin Addukte

Cis-Diaminodichloroplatinum (kurz Cisplatin) ist eines der am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika für ein breites Spektrum an Krebsarten. Cisplatin enthält ein neutrales, quadratisch planar komplexiertes Platin(II), welches von zwei Aminogruppen und zwei Chlorid-Liganden in *cis*-Konfiguration koordiniert wird. Im Zytoplasma der Zellen, wo die Salzkonzentration geringer ist als im Blutplasma, werden die beiden Chloride durch Wasser oder Hydroxidionen substituiert. Dadurch entsteht ein geladener und aktivierter elektrophiler Komplex, der mit den nukleophilen Stellen der DNA reagiert. Bevorzugt führt die Platinierung zu intrastrang N7-N7-*crosslinks* zwischen benachbarten Pyrimidinen.^[56, 117] Es können aber auch Monoaddukte oder interstrang *crosslinks* entstehen. Als Hauptprodukte entstehen hierbei 1,2-d(GpG) oder 1,2-d(ApG) und 1,3-d(GpTpG) intrastrang *crosslinks* (**Abbildung 10**) mit völlig unterschiedlichen Auswirkungen auf die Duplexstruktur.

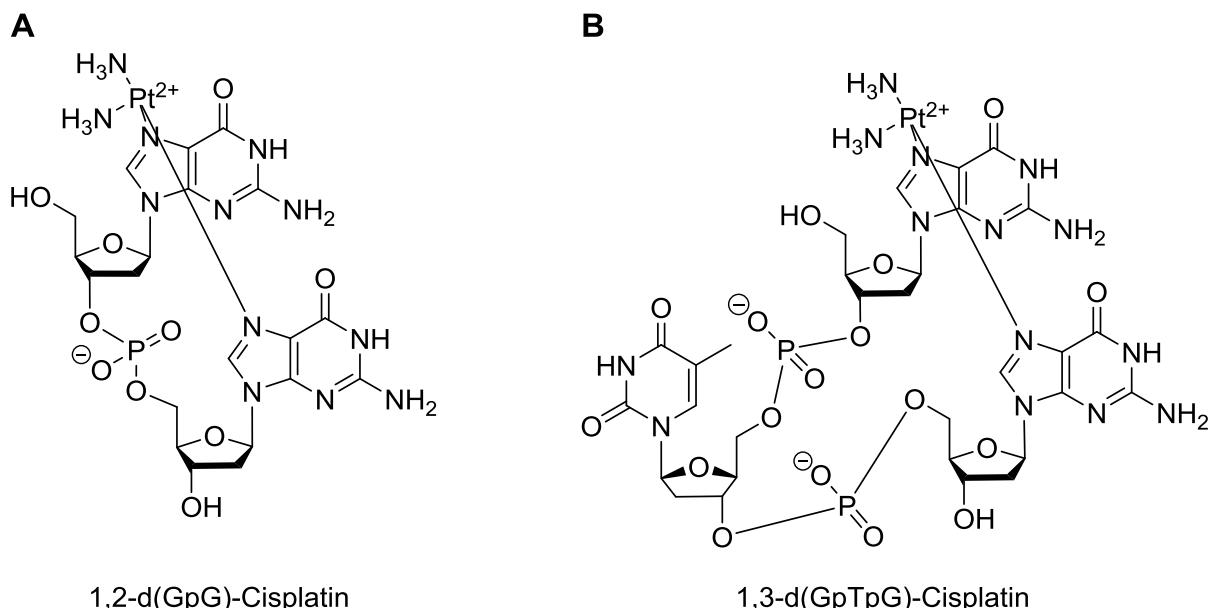


Abbildung 10: A) Intramolekularer 1,2-d(GpG)-Cisplatin und B) 1,3-d(GpTpG)-Cisplatin *crosslink*.

1,2-Addukte induzieren einen starken Knick der DNA mit einem Winkel von bis zu 80°, doch bleibt die Basenpaarung fast intakt.^[118-119] 1,3-Addukte dagegen biegen die DNA fast nicht, aber entwinden die Helix zum Teil. Die Basenpaarung um den Schaden herum ist deutlich

gestört.^[119] Wie bei den UV-Schäden äußern sich die unterschiedlichen Beeinträchtigungen der Helix in der NER Antwort: Das 1,3-Addukt wird deutlich besser erkannt, als das 1,2-Addukt.^[120-122]

Interstrang *crosslinks* zwischen zwei Guanosinen entstehen zwar nur zu einem vergleichsweise kleinen Prozentsatz (ca. 2%), aber gerade diese sind klinisch besonders relevant, da sie gegenüber NER resistent sind.^[117, 121, 123]

1.5 DNA-Struktur/Reparatur Beziehung

Die breite Substratvielfalt führte schon früh zu der Vermutung, dass bei der NER nicht der Schaden an sich erkannt wird, sondern die daraus resultierende Strukturveränderung der DNA. Die Gruppe von *Naegeli* fand 1997 heraus, dass für die Erkennung eines Schadens, dieser neben einer fehlerhaften Basenpaarung auch eine Verformung der DNA-Helix hervorrufen muss.^[124] Sie konnten zeigen, dass weder eine modifizierte Riboseeinheit im DNA-Doppelstrang mit intakter Watson-Crick-Basenpaarung, noch eine DNA-Blase aus drei nicht gepaarten Basen, jeweils für sich alleine vom NER-System erkannt und repariert werden. Als die modifizierte Riboseeinheit allerdings in einer DNA-Blase platziert wurde, entstand daraus ein gutes NER-Substrat.^[124-125] Aus dieser Beobachtungen heraus wurde das „*bipartite substrate discrimination*“-Modell entwickelt.^[124-125] Dieses besagt, dass nur DNA, die sowohl eine gestörte Basenpaarung als auch eine chemische Modifikation aufweist, zu einem Substrat für NER wird. Diese Hypothese erklärt auch, warum Schäden, die die DNA-Helix stärker verformen, effizienter repariert werden.^[126] So weisen (6-4)PP Schäden eine deutlich höhere Reparaturrate als CPDs auf und 1,3-d(GpNpG) eine höhere als 1,2-d(GpG) Cisplatin-*crosslinks*. Ähnliches gilt für aromatische Kohlenwasserstoffe und Amine, die bei der Adduktbildung in der großen oder kleinen DNA-Furche Platz finden, ohne die Basenpaarung zu stören (z.B. dG(C8)-AF). Diese sind generell schlechtere Substrate für NER, während Addukte, die die Basenpaarung behindern (z.B. dG(C8)-AAF), schnell repariert werden.^[114-115] Allerdings sind auch Addukte von Benzo[*a*]pyren und Benzo[*c*]phenantren bekannt, auf welche dieses Prinzip nicht zutrifft.^[127-129] Heute nimmt man allgemein an, dass bei der Schadenserkennung alle Parameter eine Rolle spielen, welche die thermodynamische Stabilität der DNA beeinflussen. Die Reparaturrate ist offenbar proportional zur Verringerung der thermodynamischen Stabilität des Duplex, welche durch einen bestimmten Schaden hervorgerufen wird.^[45, 126, 130]

1.6 NER – Schadensdetektion

Obwohl die genaue Abfolge, wie die Proteine an der Schadensstelle assemblieren noch nicht vollständig geklärt ist, ist inzwischen klar, dass die NER-Maschinerie nicht als zusammenhängender stabiler Komplex vorliegt. Verschiedene Experimente mit fluoreszenzmarkierten Proteinen (ERCC1^[131], XPB^[132] und XPA^[133]) in Kombination mit *photobleaching* Techniken konnten zeigen, dass sich die Proteine frei im Zellkern bewegen und sich nacheinander an der Schadensstelle einfinden. Daraus lässt sich ableiten, dass Erkennungsfaktoren existieren müssen, die den ersten Schritt der Schadensdetektion vollbringen und anschließend die weiteren NER Proteine zur Schadensstelle rekrutieren.

Im transkriptionsgekoppelten Reparaturweg fungiert die RNA-Polymerase II als Schadenssensor. Wird die Polymerase während der Transkription aktiver Gene durch einen vorhandenen Schaden blockiert^[134-135], schließt sich das CSB Protein an und es bildet sich unter ATP-Hydrolyse ein stabiler CSB-RNAP-DNA Komplex.^[136-137] Ist der Schaden zu groß um überlesen zu werden, führt das zur Rekrutierung weiterer Proteine wie CSA^[138], TFIIH^[139] und XPG^[140] zur Schadenstelle. Die Reparatur wird dann initiiert.^[16]

Bei der GGR ist der Mechanismus der Schadenserkennung, beziehungsweise die dafür verantwortlichen Proteine, immer noch Bestandteil heißer Diskussionen.

In zahlreichen biochemischen Experimenten wurden mehrere Proteine (UV-DDB^[141-143], XPC-HR23B^[85, 144-146], XPA^[55, 147-148], RPA^[149-152]) als potenzielle Erkennungsfaktoren identifiziert. Sie alle zeigen eine deutliche Bindungsaffinität zu geschädigter DNA, jedoch sehr abhängig von der verwendeten Methode und dem DNA-Substrat. Allerdings binden alle diese Proteine, wenn auch schwächer, ebenso an ungeschädigte DNA. XPC-HR23B bindet spezifisch an unterschiedlichste DNA-Schäden, wie (6-4)PP^[83, 145-146], Cisplatin^[17, 144, 153-155], AAF^[144] und Cholesterol-Addukte^[83, 85]. Es erkennt allerdings kaum CPD-Schäden^[83], obwohl deren Reparatur vollständig von der Präsenz von XPC abhängig ist.^[156] Die Affinität von XPC zu CPDs kann allerdings durch Fehlpaarungen gegenüber des Schadens erhöht werden.^[85] Auch XPA alleine oder in Kombination mit RPA bindet bevorzugt an DNA mit großen aromatischen Addukten, wie AAF^[157-158] oder Benzo[a]pyren^[157] sowie Cisplatin-Schäden^[17, 55, 151, 159-161]. In Photoaffinitäts-*crosslinking* Experimenten wiesen sowohl XPC-HR23B^[162], als auch XPA^[163] eine hohe Affinität und Bindung zu geschädigter DNA auf. Andere wiederum zeigten, dass weder XPC noch XPA direkt an den Schaden binden.^[152] In **Tabelle 1** ist eine Zusammenfassung der relativen Bindungsaffinitäten der Proteine bzw. Proteinkomplexe gegeben. Rekonstitutionsexperimente in NER-defekten Zellen mit Zugabe

der Proteine in unterschiedlicher Reihenfolge lieferten ebenfalls gegensätzliche Ergebnisse. Bei *Sugasawa et al.* zeigten Zellen eine schnellere Reparaturrate, wenn diese mit XPC-HR23B vorinkubiert wurden.^[144] Bei Vorinkubation der geschädigten Plasmide mit XPA-RPA war die Reparatur hingegen verlangsamt. In anderen Experimenten von *Wakasugi et al.* war die Reparatur wiederum effektiver, wenn geschädigte DNA mit XPA/RPA vorinkubiert wurde.^[163] Für eine frühe Rolle von XPC in der NER spricht, dass XP-C Zellen nur einen Defekt der GGR haben aber die TCR funktioniert.^[156, 164-165] In XP-A Zellen sind dagegen beide Reparaturwege defekt.^[166]

Tabelle 1: Relative Bindungsaffinitäten der DNA-Schadenerkennungsproteine XPA (alleine oder in Kombination mit RPA), RPA oder XPC (alleine oder in Kombination mit HR23B).^[167]

DNA-Schaden- erkennungsprotein	Erkannte DNA-Schäden/-Strukturen						
	(6-4)PP	CPD	AAF	Cisplatin crosslinks	Basenaus- wölbungen	DNA-Blasen (Fehl- paarungen)	Drei- und Vierweg- gabelungen
XPA/RPA/XPA- RPA	++	++	++	+++	++	+++	+++
XPC/XPC-HR23B	++++	++	+++	++++	?	++++	?

Der Beweis, dass XPC der erste Faktor ist, der sich an UV-Schäden einfindet, gelang schließlich 2001 der Gruppe von *Zeeland*: Der Zellkern lebender Zellen wurde mit UV-Licht an definierten Positionen durch die Poren eines Polycarbonat Filters bestrahlt.^[168-170] Die dadurch generierten CPD und (6-4)PP Schäden, sowie die entsprechenden NER Faktoren wurden mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass sich in XP-A Zellen XPC an den UV-Schäden einfand umgekehrt jedoch nicht.^[168] Demnach benötigt XPA die Präsenz von XPC, um zur Schadensstelle rekrutiert zu werden. Weitere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass XPC ferner dazu benötigt wird, die DNA um den Schaden herum zu öffnen und die weiteren NER-Faktoren zu rekrutieren.^[169-170]

Einen Hinweis auf die Schadenserkennungsstrategie von XPC lieferten verschiedene Experimente mit unterschiedlichen DNA Schäden. Sie führten alle zu dem Schluss, dass XPC die DNA eher struktur- als schadensspezifisch bindet. Der XPC-HR23B Komplex erkennt einzelsträngige DNA^[171] und Schäden, die die DNA Helix destabilisieren. Außerdem wurde gezeigt, dass der Komplex asymmetrisch zum Schaden an die DNA bindet.^[163, 171] Interessant

ist, dass der Komplex auch 3–5 ungepaarte Basen erkennt unabhängig davon, ob ein Schaden vorhanden ist oder nicht.^[85] Allerdings findet letztendlich nur bei bestehendem Schaden eine Reparatur statt.^[85, 125] XPC fungiert so vermutlich als Sensor für ungepaarte Basen und bindet im Komplex mit HR23B^[172-173] und Centrin2^[173] an NER-spezifische Schäden, Blasen und Loop-Strukturen. Dies erklärt, warum Schäden wie (6-4)PP, dG(C8)-AAF und intrastrang Cisplatin *crosslinks*, die zu einer deutlichen Störung der helikalen DNA Struktur führen^[174], besonders gut erkannt werden. CPDs dagegen, welche die Form der Helix kaum beeinträchtigen, werden deutlich schlechter gebunden.^[83-85] Wie oben erwähnt, kann die Bindung von XPC-HR23B zu CPDs durch den Einbau von Fehlpaarungen erhöht werden.^[85] Auf diese Weise konnte eine Kristallstruktur von Rad4-Rad23, dem Hefe Homolog von XPC-HR23B, im Komplex mit einem CPD-Schaden und zwei gegenüberliegenden, ungepaarten dTs erhalten werden (**Abbildung 11**). Diese zeigt, dass das Protein die destabilisierte Doppelhelix-Struktur erkennt ohne direkt an den Schaden zu binden.^[175]

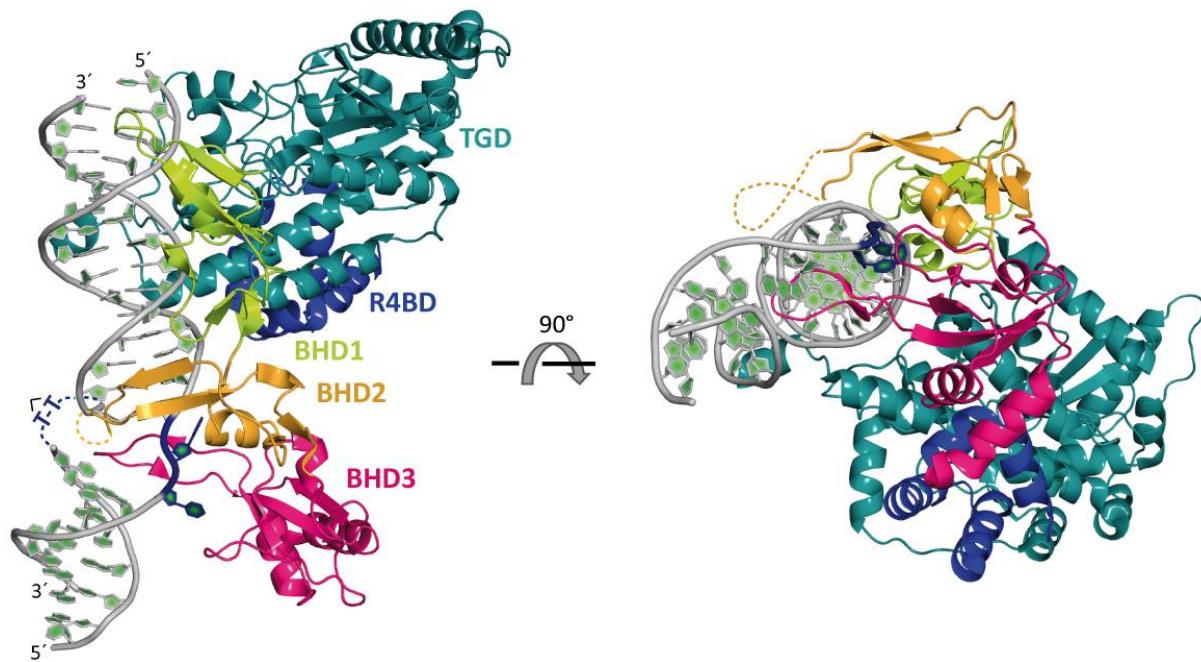


Abbildung 11: Kristallstruktur von Rad4-Rad23 im Komplex mit einer CPD geschädigten DNA.^[175] Die beiden verknüpften CPD-Thymidine sind schematisch in dunkelblau eingezeichnet. Die gegenüberliegenden fehlgepaarten Thymidine sind ebenfalls in dunkelblau. TDG ist in cyan, R4BD in blau, BHD1 in grün, BHD2 in orange und BHD3 in pink. Die gestrichelten Linien verweisen auf ungeordnete Regionen. (PDB-Code: 2QSG)

Rad4 bindet hier mit drei β -hairpin Domänen (BHD1–3) und einer Transglutaminase-homologen Domäne (TGD) an die DNA. BHD1 und TGD binden an eine Region mit elf vollständig gepaarten Basenpaaren. Einige Nukleotide entfernt schiebt BHD3 einen β -hairpin in die Watson-Crick Helix und dreht damit die beiden geschädigten Nukleotide heraus.

Dadurch wird der Duplex in einem Winkel von 42° geknickt. Die gegenüber des Schadens liegenden, ungeschädigten Thymidine werden währenddessen in einer Mulde zwischen BHD2 und BHD3 gehalten. Der CDP Schaden ist dadurch soweit von Rad4 entfernt, dass das Protein keine Bindungen zu diesem eingehen kann. Rad4 wechselwirkt mit der doppelsträngigen DNA 3' zur geschädigten Stelle und mit dem ungeschädigten, aber fehlgepaarten Dinukleotid gegenüber dem Schaden. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den oben erwähnten biochemischen Experimenten.

Letztendlich erklärt es allerdings nicht, warum der CPD Schaden – ohne vorhandene Fehlpaarung – so effizient durch NER entfernt wird, obwohl XPC-HR23B diesen kaum erkennt. Das spricht für die Existenz weiterer Schadenserkennungsfaktoren. Und tatsächlich deuten einige neuere Untersuchungen darauf hin, dass das *UV-damage DNA-binding* Protein (UV-DDB) eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von XPC-HR23B zu CPD-Schäden spielt.^[176-177]

Das UV-DDB Protein besteht aus den beiden Untereinheiten DDB1 und DDB2.^[141, 178] Es zeigt im Vergleich zu XPC eine 100- bis 1000-fach erhöhte Bindungsaffinität zu (6-4)PP und CPD Schäden mit Präferenz für das (6-4)PP.^[142-143, 179-184] Außerdem bindet es an abasische Stellen sowie kleine Blasenstrukturen, wenn auch weniger stark.^[143, 184] Obwohl UV-DDB für die NER *in vitro* und *in vivo* entbehrlich ist, rekrutiert es XPC zu im Zellkern induzierten UV-Schäden.^[176-177, 185] Diese Wechselwirkung ist vermutlich besonders bedeutsam für die Reparatur von CPD Schäden. Tatsächlich ist in DDB2-defekten Zellen die Reparatur von CPDs deutlich reduziert, was sich im XP Komplementärtyp E äußert.^[186-187]

Die Kristallstruktur von UV-DDB im Komplex mit (6-4)PP DNA in **Abbildung 12** zeigt, dass dieser Schadenssensor perfekt dafür geeignet ist um Dinukleotid-Schäden (intrastrang *crosslinks*), insbesondere UV-induzierte Dipyrimidine zu erkennen.^[188]

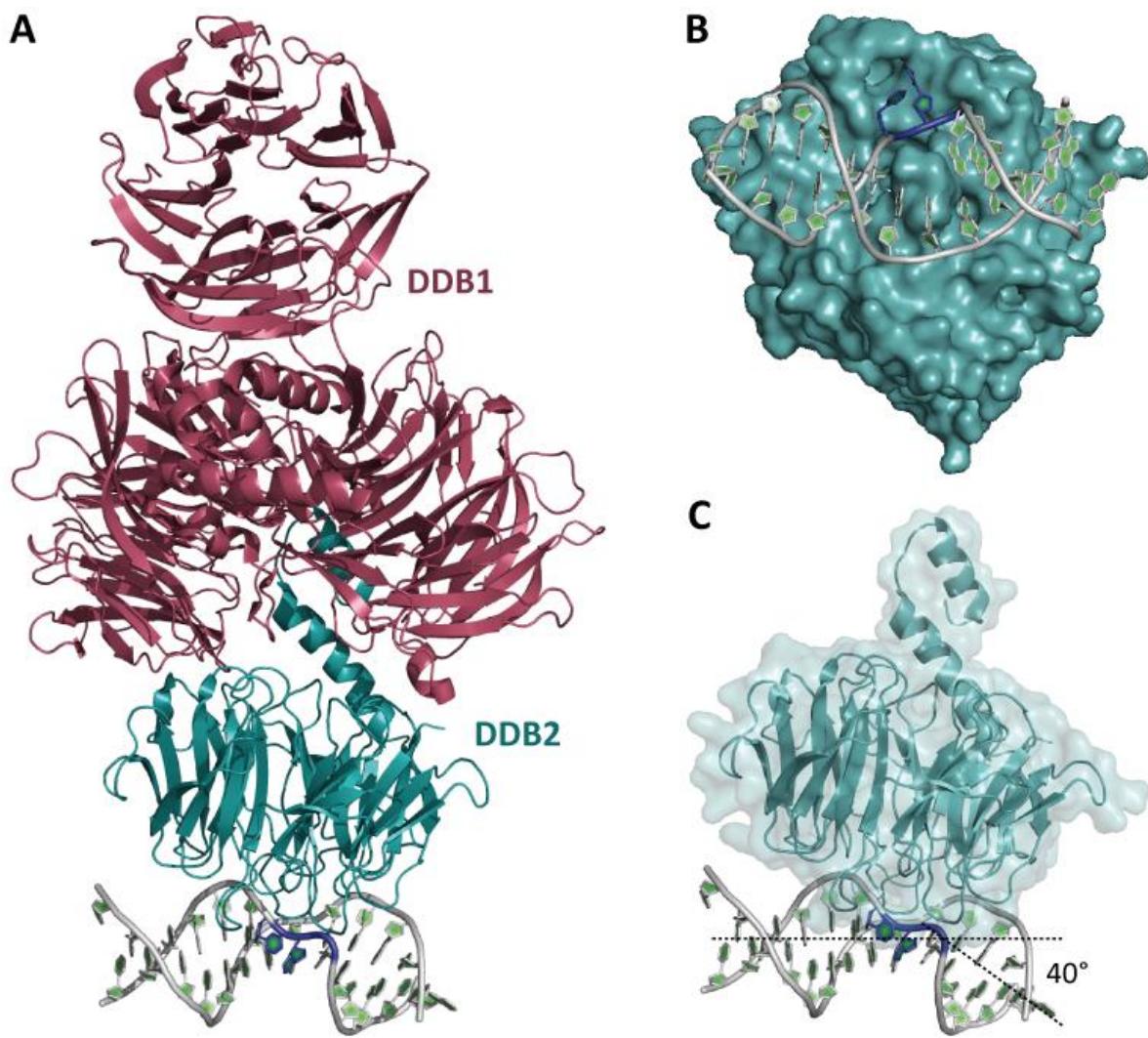


Abbildung 12: UV-DDB im Komplex mit einer (6-4)PP geschädigten DNA.^[188] **A)** DDB1 in rot, DDB2 in cyan, DNA in grau, (6-4)PP Dinukleotid in dunkelblau. **B)** Oberflächenstruktur von DDB2, das geschädigte Dinukleotid ist in eine Tasche in der Oberfläche des Proteins gedreht. **C)** DNA wird um ca. 40° geknickt. (PDB-Code: 3EI1)

Im Gegensatz zu XPC bindet DDB2 hauptsächlich an den lädierten Strang und dreht das geschädigte Dinukleotid aus dem Duplex in eine Bindungstasche an der Oberfläche. Diese bietet genau ausreichend Platz für das (6-4)-Photodimer und könnte ebenso ein CPD beherbergen. DDB2 (XPE) bindet mit dem gesamten Durchmesser seines β -Propellers an die DNA, welcher gegenüber der DDB1-bindenden Seite liegt. Durch Insertion eines *hairpins* in die kleine Furche der DNA wird der Duplex um den Schaden herum entwunden. Die DNA wird in einem Winkel von 40° geknickt und das geschädigte Dinukleotid aus der Helix in die Bindungstasche herausgedreht.

DDB2 prüft offenbar die Helix lokal auf leichte Störungen, die die Photoschäden verursachen und bindet an das Phosphordiester Rückgrat des Schadens. Mit der Oberflächentasche bindet

DDB2 außerdem die geschädigten Basen und stabilisiert dadurch deren herausgedrehte Konformation. Auf diese Weise dreht DDB2 keine ungeschädigten Basen heraus, was erklärt warum auch Schäden erkannt werden, die den Duplex nur minimal destabilisieren (CPD). Dies führt dazu, dass DDB2 eine hohe Spezifität für UV-Schäden aufweist und vornehmlich auf deren Detektion limitiert ist.

1.7 TFIIH – Schadensverifizierung

Im Anschluss an die Schadenserkennung findet die Verifizierung des Schadens statt. An dieser Stelle vereinen sich beide NER-Wege (GGR und TCR). Mechanistisch geschieht von nun an das Gleiche. Bei der GGR verursacht die Bindung der beiden Proteine, XPC und UV-DDB, einen Knick der DNA und führt zu einer lokalen Entwindung. Dadurch entsteht vermutlich eine spezifische Konformation, die als Signal für die Fortsetzung des Prozesses gilt und der TFIIH-Komplex (Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase II) wird durch Proteininteraktionen zur Schadensstelle rekrutiert.^[168, 172, 189-192] Dieser ist eigentlich Bestandteil der Transkription, kann aber im Falle eines DNA Schadens innerhalb von Minuten zur Schadensstelle berufen werden, um NER Reaktionen durchzuführen.^[3] TFIIH besteht aus zehn Untereinheiten, die ringförmig angeordnet sind.^[193] Zum Kernkomplex gehören die ATP-abhängigen Helikasen XPB und XPD sowie eine Cdk-aktivierende Kinase (CAK)^[194] Untereinheit. XPB ist hauptsächlich eine DNA-abhängige ATPase mit geringer 3' → 5' Helikaseaktivität, die sowohl für die Transkription als auch für die NER benötigt wird.^[195] XPD ist dagegen eine echte DNA Helikase mit 5' → 3' Polarität und ausschließlich für die NER zuständig.^[196-197] Beide öffnen die DNA Helix unter Verbrauch von ATP und bilden dadurch eine Blase aus 27 Nukleotiden, asymmetrisch um den Schaden herum (22 Nukleotide in 5'- und fünf Nukleotide in 3'-Richtung vom Schaden).^[198]

Es wird vermutet, dass XPD unter anderem die Existenz eines Schadens verifiziert^[199-200], bevor weitere NER Faktoren an die Schadensstelle rekrutiert werden. Dieser Gedanke entspringt der Beobachtung, dass die Helikaseaktivität von Rad3, dem XPD Homolog aus Hefe, durch einen vorhandenen DNA-Schaden inhibiert wird.^[200-201] Außerdem konnte durch *crosslinking* Experimente gezeigt werden, dass XPD aber nicht XPA oder XPC in engem Kontakt mit einem Psoralen-Schaden steht, obwohl dieser Kontakt die Anwesenheit der beiden letzteren Proteine bedingt.^[152] Dies sind weitere Hinweise, die das zweistufige Model der Schadenserkennung von *Naegeli* unterstützen.

Kristallstrukturen des katalytischen Zentrums von XPD aus verschiedenen Organismen (*Sulfolobus acidocaldarius*^[202] (SaXPD; **Abbildung 13**), *Thermoplasma acidophilum*^[203] (TaXPD) und *Sulfolobus tokodaii*^[204]) enthalten eine vier Domänen Organisation mit einem 4Fe4S Eisen-Schwefel-Cluster, einer bogenartigen und zwei kanonischen Helikase-Domänen.

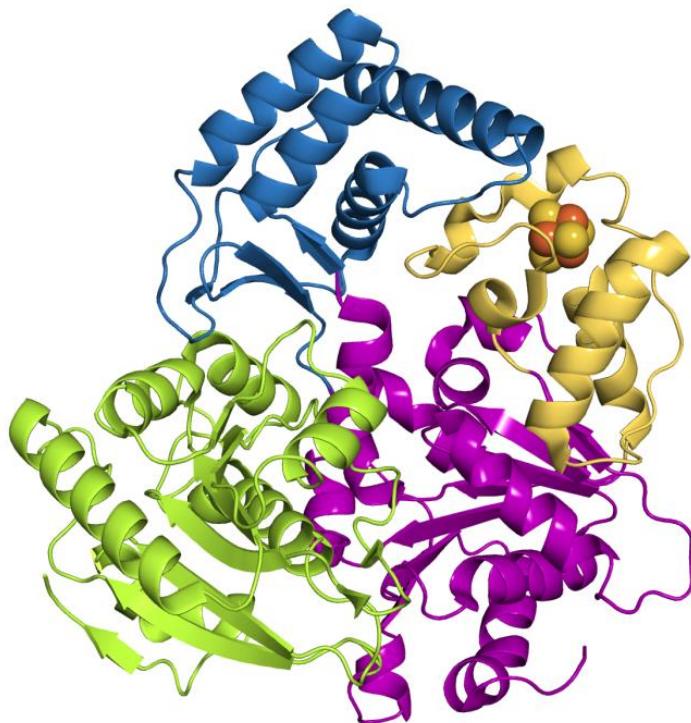


Abbildung 13: Kristallstruktur von SaXPD. (PDB-Code: 3CRV)

Zusammen formen sie einen Tunnel groß genug um einzelsträngige DNA zu beherbergen (**Abbildung 14**).^[202-204] Es wird vermutet, dass der FeS-Cluster als eine Art molekularer Pflug dienen könnte, der blockierende Schäden durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen sucht.^[205-206] Dabei könnte ein Strang des Duplexes mit Hilfe der ATP-abhängigen Motordomänen durch den Tunnel gezogen werden.

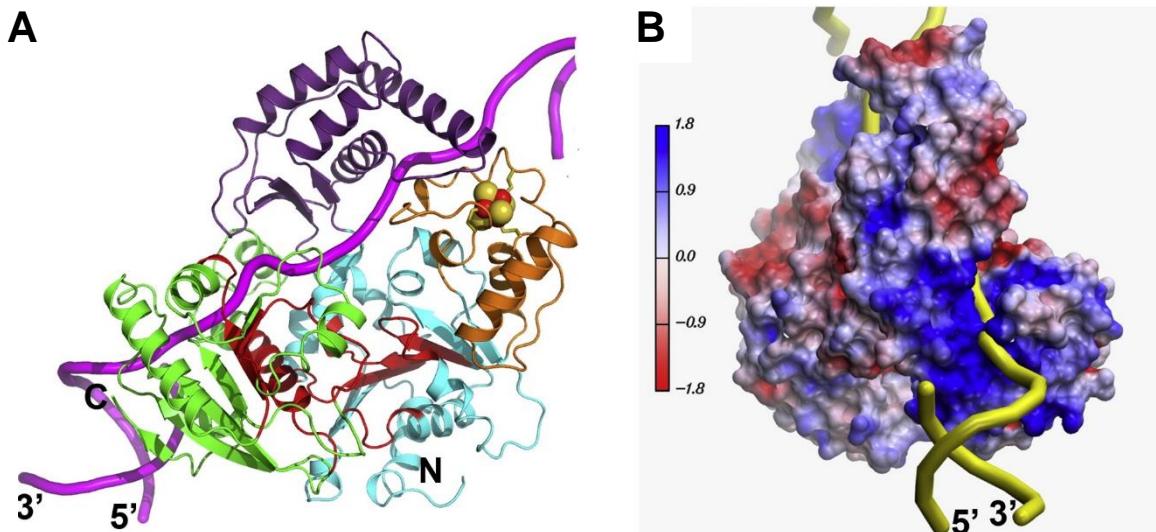


Abbildung 14: Auf der Struktur basierendes Modell der Interaktion zwischen SaXPD und DNA. **A)** SaXPD-DNA Bindungsmodell (das DNA Phosphatrückgrat in hellem violett). Die einzelsträngige DNA wurde durch Überlagerung mit einer bekannten Helikase-DNA Struktur (PDB-Code: 2P6R)^[207] in die SaXPD Struktur über die Konservierten HD2 Helikase Motive IV und VI eingefügt. Die Helikasemotive sind in rot abgebildet. **B)** Elektrostatische molekulare Oberfläche (blau positiv und rot negativ) der DNA-bindenden HD2 Mulde. Die DNA (gelb) ist gemodelt wie in A.^[202]

Da der Tunnel aber nicht eng genug ist, um geschädigte von ungeschädigten Basen zu unterscheiden, schlagen *Wolski et al.* vor, dass jede einzelne Base während des Entwindungsprozesses durch Insertion in eine benachbarte Bindungstasche an der Proteinoberfläche analysiert werden könnte. Geschädigte Basen würden nicht in die Tasche passen und somit die Helikaseaktivität blockieren (**Abbildung 15**).^[203]

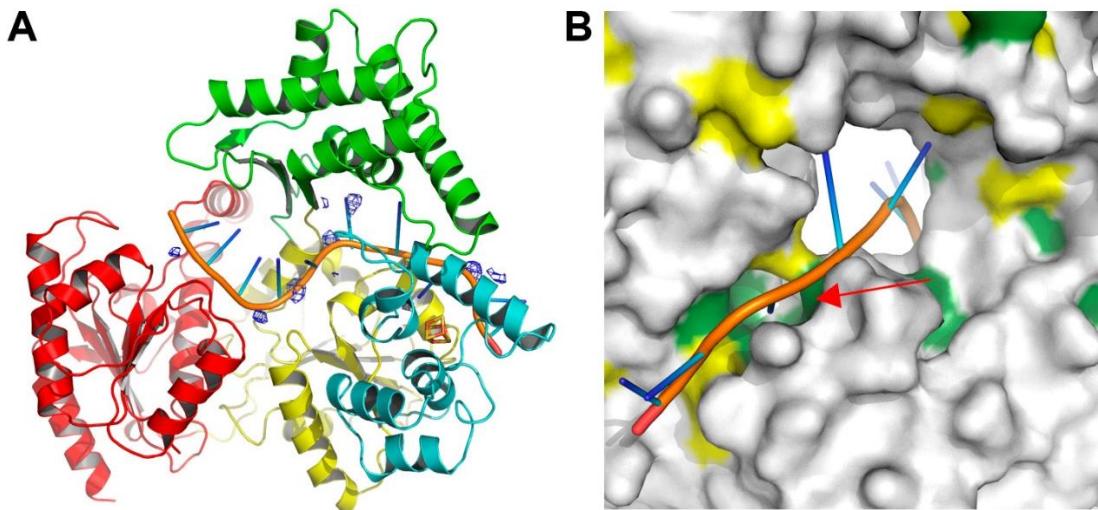


Abbildung 15: A) Modell von TaXPA im Komplex mit einzelsträngiger DNA durch Überlagerung der TaXPA Struktur^[203] mit der Struktur der NS3-Helikase im Komplex mit einzelsträngiger DNA^[208]. B) Oberflächenstruktur von XPD, die Farben zeigen die Konservierung der Sequenz, grün: konserviert, gelb: stark konserviert, grau: nicht konserviert. Die DNA kommt in dieser Struktur durch das Loch und passt genau in die konservierte Tasche (roter Pfeil), die möglicherweise eine Rolle in der Schadensdetektion spielen könnte oder die DNA mit dem FeS-Cluster verbinden könnte.^[203]

Fuss und *Tainer* haben aufgrund der Erkenntnisse über XPD ein neues Modell für die Schadensverifizierung entwickelt – das sogenannte „bind-pry-unwind“-Modell:^[209] XPB, XPD und CAK des TFIIH Komplexes sind hierbei essentiell für die Koordination der Schadenserkennung, -verifizierung, -reparatur und Signalisierung. Die Schadenserkennungsproteine rekrutieren im Anschluss an die Schadensdetektion nicht nur den TFIIH-Komplex und die weiteren NER-Faktoren, sondern fixieren gleichzeitig die DNA. *Kim et al.* schlugen vor, dass XPB während der Transkription das Entwinden der DNA erleichtern, indem es die DNA unterhalb der Transkriptionsblase, fixiert durch die Transkriptionsfaktoren und RNAP II, verdreht.^[210] Auf ähnliche Weise könnte XPB hier die DNA öffnen. Durch diesen Prozess wird die Schadenserkennung mit der DNA-Öffnung verknüpft. Dies ist auch im Einklang mit der geringeren Helikaseaktivität von XPB und dessen starker konformationellen Änderung bei Bindung an die DNA. Außerdem kann sich dadurch TFIIH entweder direkt neben XPC-HR23B oder neben RNAPII positionieren, was einen gemeinsamen Mechanismus von XPB in GGR, TCR und Transkription ermöglicht. XPB hat einen kurzen DNA-Bindungskanal, der TFIIH senkrecht zur DNA und 5' zum jeweiligen Erkennungsprotein positionieren könnte. Anschließend könnte XPB die DNA aufbrechen, wobei sich TFIIH zur DNA neigt und XPD so positioniert, dass es den geschädigten Strang 5' zum Schaden etwa 22 Basen entfernt bindet. *Fuss* und *Tainer* vermuten, dass die Entfernung zwischen XPB und XPD die Größe und Asymmetrie der geöffneten DNA-Blase vorgibt, da diese genau den 27

Nukleotiden entspricht, die bei der NER entfernt werden. Die Bindung von XPD an die DNA wird von CAK erkannt, welches daraufhin TFIIH verlässt.^[3] Dieser Schritt signalisiert, dass der Reparaturprozess fortgeführt werden kann. Die XPD-Helikase entwindet nun den Duplex solange, bis der 4FeS-Cluster den Schaden erreicht hat und durch ihn blockiert wird.^[199-200] Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass XPD abhängig vom Schaden unterschiedliche Konformationen einnimmt.^[211] Nach dem Stop verankern XPD und XPC den TFIIH-Komplex sowie die restliche NER-Maschinerie und bilden somit eine feste Plattform für die Bindung der Nukleasen ERCC1-XPF und XPG.^[212]

Nach dem gängigen Modell schließen sich RPA, XPA und XPG vermutlich unabhängig voneinander der Schadensstelle an und bilden zusammen mit TFIIH den Präinzisionskomplex.^[133, 168, 213-214] Hier sind nun alle NER Faktoren, außer ERCC1-XPF, präsent und stabil an die geöffnete DNA-Blase gebunden.

Das Replikationsprotein A (RPA) bindet spezifisch an einzelsträngige DNA und besteht aus drei Polypeptiduntereinheiten, RPA-70, RPA-34 und RPA-14.^[215-216] Die RPA-70 Untereinheit enthält die Bindungsaktivität für einzelsträngige DNA.^[217-218] Es wird für den beidseitigen Einschnitt^[219-221] und die Reparatur-Syntheseschritte^[222-223] benötigt. Die genaue Rolle von RPA ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es wurde vorgeschlagen, dass es an den nicht geschädigten Strang in der geöffneten DNA Blase bindet und damit hilft, die Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF korrekt zu positionieren und deren Aktivität zu stimulieren.^[224-225] Durch die Bindungsaffinität zu geschädigter DNA wurde RPA außerdem als Schadenserkennungsfaktor genannt.^[149-152] Allerdings ist es wahrscheinlicher, dass RPA nicht die DNA Schäden erkennt, sondern an die lokal entwundenen einzelsträngigen Regionen bindet.^[150, 160, 226] Außer Frage steht, dass die Spezifität für geschädigte DNA in Kombination mit XPA deutlich erhöht wird und beide Proteine somit wohl kooperativ dazu beitragen, RPA auf dem ungeschädigten Strang zu positionieren.^[55, 147, 149]

XPG gehört zur Familie der strukturspezifischen FEN-1 Endonukleasen (*Flap* Endonuklease)^[227] Sie schneidet spezifisch DNA an Klappen- (*flap*) oder Blasen-Strukturen und schneidet am 3'-Ende von einzelsträngige DNA.^[228-230] Zusätzlich stabilisiert XPG die geöffnete DNA-Blase im Präinzisionskomplex und ermöglicht dadurch erst den 5'-Einschnitt durch ERCC1-XPF.^[231-232] ERCC1-XPF trifft als letzter Faktor an der Schadensstelle ein^[168, 213-214] und wird offenbar durch Wechselwirkung mit XPA dorthin rekrutiert.^[147, 233-236] In **Tabelle 2** sind die wichtigsten Proteine der NER, sowie deren Funktionen und Interaktionspartner dargestellt. ERCC1-XPF ist eine strukturspezifische Endonuklease, die die DNA spezifisch auf der 5'

Seite einer Doppel-/ Einzelstrang-Gabelung schneidet.^[103, 237] Der beidseitige Schnitt der DNA, ERCC1-XPF 5' und XPG 3' zum Schaden führt dazu, dass schließlich ein etwa 30 Nukleotide langes Stück herausgeschnitten wird. Anschließend entfernt sich der TFIIH-Komplex von der DNA, um die Neusynthese zu ermöglichen, und reassoziiert mit CAK. Die Neusynthese des fehlenden DNA-Abschnitts erfolgt durch die DNA Polymerasen δ/ϵ oder die TLS Polymerase κ , wobei dieser Prozess durch weitere Faktoren (PCNA, RFC, RPA) unterstützt wird. Zuletzt erfolgt die Ligation des synthetisierten Abschnitts durch die DNA-Ligase I.

Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten an der NER beteiligten Proteine, deren Funktion, Interaktionspartner sowie die aus einem Defekt resultierenden Krankheiten. Abkürzungen: GGR: *globale genome* Reparatur, ODR: Reparatur oxidativ geschädigter DNA, ERCC1: *Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 1*, XP: *Xeroderma Pigmentosum*, CS: Cockayne Syndrom, TTD: *Trichothiodystrophie*.

Protein/ Proteinkomplex	Funktion	Interaktionspartner	Krankheit
		XPA	
XPC-HR23B	Schadenserkennung	TFIIP	XP (GGR)
		DDB	
	Schadenserkennung		
DDB	(Abasische Stellen, UV-Schäden)	XPC RPA	XP (leichte Ausprägung)
	Chromatinremodelling		
	Schadenserkennung?	RPA	
XPA	Schadensverifizierung?	XPC	XP
	Anordnungsplattform?	TFIIP ERCC1	
	Bindung an einzelsträngige DNA	XPA XPG	nicht bestimmt
RPA	DNA Synthese	PCNA/RFC	
XPB	3'→5' Helikase	XPA XPC	XP
XPD	5'→3' Helikase	XPG XPF	XP/CS TTD
ERCC1-XPF	5'-Endonuklease	XPA TFIIP	XP DSBR?
		RPA	XP
XPG	3'-Endonuklease	TFIIP PCNA?	XP/CS ODR?

1.8 Welche Rolle spielt XPA?

Das *Xeroderma Pigmentosum complementation group A* (XPA) Protein besteht aus 273 Aminosäuren (ca. 31 kDa) und kann sowohl als Homodimer oder auch in einem Komplex mit anderen NER-Proteinen auftreten.^[157-158, 238] XPA, möglicherweise im Komplex mit RPA, wurde ebenfalls als Schadenserkennungsfaktor vorgeschlagen, da es an verschiedene geschädigte DNA-Substrate bindet.^[239-240]

Das XPA Protein besteht aus mehreren funktionellen Domänen: Die N-terminalen Domäne (Aminosäuren 4-97) enthält RPA34- und ERCC1-bindende Regionen.^[233-236, 239] Die C-terminalen Domäne (Aminosäuren 226–273) bindet an TFIIH.^[241-242] Der Bereich Met98 bis Phe219 wurde als minimales DNA-bindendes Fragment definiert und ist in **Abbildung 16** zu sehen.^[153] In einer kürzlich erschienenen Publikation wird eine längere DNA-bindende Domäne diskutiert (XPA₉₈₋₂₃₉).^[243]

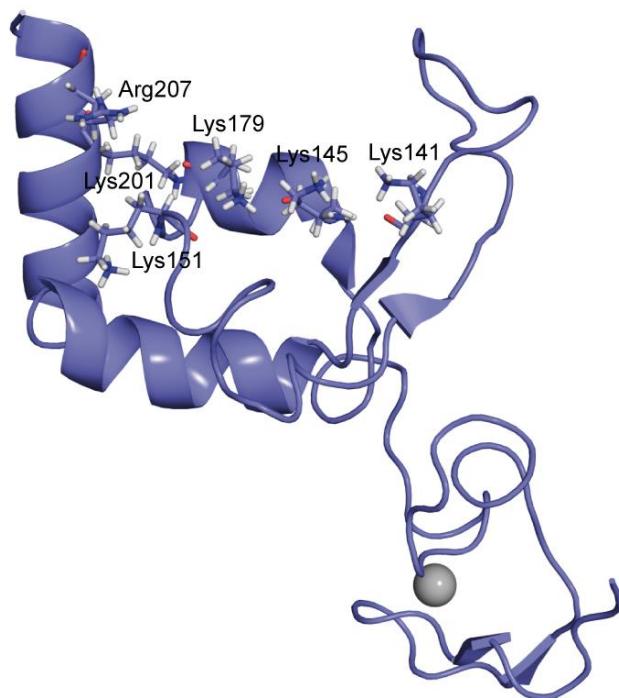


Abbildung 16: Minimales DNA-bindendes Fragment von XPA.^[238] (PDB-Code: 1XPA). Die Aminosäuren, welche die positiv geladene Tasche bilden, sind als sticks dargestellt, das Zink-Ion ist in grau hervorgehoben.

Im N-terminalen Bereich der zentralen Domäne von XPA liegt das Zinkfinger-Motiv (Aminosäuren 102–129).^[238] Das Zink-Ion wird von vier essentiellen Cysteinen koordiniert (Cys105-X₂-Cys108-X₁₇-Cys126-X₂-Cys129) und dient vermutlich der Stabilität der funktionalen Domäne des Proteins.^[244] Durch Mutation eines oder aller Zink-bindenden

Cysteine kommt es zu einem Funktionsverlust von XPA und einer fast vollständigen Hemmung der NER. In der C-terminalen Subdomäne (Aminosäuren 138–209) befindet sich die essentielle Binderegion zu RPA70, der größten ssDNA-bindende Untereinheit des trimeren RPA Proteins.^[147, 149] Diese Region faltet sich in eine α/β -Struktur mit positiv geladener Tasche, die eine geeignete Größe für die Aufnahme von dsDNA hätte. Sie weist außerdem zahlreiche basische, positiv geladene Aminosäuren an ihrer Oberfläche auf, welche mit den negativ geladenen Phosphatresten des DNA-Rückgrats in Wechselwirkung treten könnten. Daher wurde vermutet, dass XPA die DNA mit Hilfe dieser Tasche nach ungewöhnlichen DNA Strukturen absucht.^[238]

Der genaue Bindungsmechanismus von XPA an die geschädigte DNA, sowie dessen genaue Rolle im NER-Prozess sind bisher jedoch ungeklärt. Allerdings steht fest, dass XPA essentiell sowohl für die GGR als auch die TCR ist.^[166] Obwohl es relativ klein ist, wechseltwirkt es mit einer Vielzahl anderer NER Proteine^[147, 149, 233, 235-236, 241-242, 245] und könnte auf diese Weise als eine Art Gerüst für den Inzisionskomplex fungieren.^[45] XPA zeigt eine leichte Präferenz für UV- und Addukt geschädigte DNA gegenüber ungeschädigter DNA.^[55, 167, 246] Wie XPC, wenn auch schwächer, erkennt XPA nur (6-4)PP Schäden und keine CPDs.^[55] Eine besonders hohe Bindungsaffinität zeigt XPA zu aromatischen DNA-Addukten und Cisplatin induzierten *crosslinks*. Das Protein ist jedoch nicht in der Lage eine durch UV-Schäden (CPD, (6-4)PP) destabilisierte Doppelhelix-Struktur zu erkennen. Allerdings hat XPA nur geringe DNA Bindungskonstanten von 10^5 – 10^6 M⁻¹ und nur eine 2–5fach erhöhte Selektivität für geschädigte DNA.^[55] Trotzdem wurde das Protein als Schadenserkennungs- bzw. Schadensverifizierungsfaktor vorgeschlagen, da seine DNA-Bindungsaktivität durch RPA^[55, 147, 149] oder ERCC1^[233, 242] verstärkt wird. XPA erkennt außerdem defekte Watson-Crick Basenpaarung, auch in Abwesenheit von Schäden, verursacht durch Fehlpaarungen, Blasen- und Schleifenstrukturen oder Dreiweggabelungen.^[148, 159, 247] Dies wird ebenfalls durch die Komplexierung mit RPA verstärkt. Eine Untersuchung der Bindungseigenschaften in Gegenwart verschiedener Schäden zeigte, dass XPA geknickte doppelsträngige DNA-Strukturen bevorzugt bindet und die höchste Affinität zu Drei- oder Vierweggabelungen mit einem zentralen Knick aufweist^[159, 248] aber nicht an einzelsträngige DNA bindet. Dies ist konsistent mit dem NMR-Modell von *Ikegami et al.*, das zeigt, dass XPA eine zentrale DNA-Bindungsspalte aufweist, die die passende Größe für doppelsträngige DNA hat.^[238] Eine Doppelmutante, in der zwei Lysine der positiv geladenen Tasche von XPA zu Glutaminsäuren mutiert wurden (Lys141Glu/Lys179Glu), zeigte einen besonders starken Reparaturdefekt. *Photocrosslinker* Experimente zeigten, dass diese Mutante keine Kontakte mit geknickten

DNA Strukturen ausbilden kann.^[248] Daher wurde vermutet, dass das Protein mit der positiv geladenen Tasche die DNA nach geknickten Strukturen absucht.

Große DNA Addukte erhöhen die lokale konformationelle Flexibilität der DNA.^[249] *Naegeli et al.* konnten zeigen, dass die Reste Lysin141 und Lysin179 zur Überprüfung der steigenden Verformbarkeit des DNA-Stranges, welche für geschädigte Stellen charakteristisch ist, dienen. Es wird vermutet, dass beide Lysine eine Wechselwirkung mit dem DNA-Rückgrat eingehen, wobei die Bindung als RPA-XPA-Dimer bevorzugt an eine geknickte DNA stattfindet.^[248] Es könnte somit eine Art an DNA-Schäden erkennen, die die DNA-Helix destabilisieren, indem sie einen deutlichen Knick induzieren (1,2-d(GpG) Cisplatinaddukt) bzw. stabilisieren (dG(C8)-AAF) können.

XPA könnte in Kombination mit RPA als Protein, das einzelsträngige DNA bindet, den Duplex nach Knicks und entwundenen Stellen absuchen. Somit könnte ein Schaden detektiert, verifiziert und schadensspezifisch NER Faktoren rekrutiert werden, sowie die korrekte dreidimensionale Anordnung der NER-Intermediate koordiniert werden.^[159] Auf diese Weise könnten XPC, UV-DDB und XPA/RPA in einem kooperativen Mechanismus als Schadenserkenner fungieren. Dies würde erklären, warum so viele strukturell unterschiedliche Schäden trotz der zum Teil geringen Schadensaffinität der einzelnen Proteine vor dem Hintergrund der gesamten genomischen DNA erkannt werden. Auf diese Frage wird im Hauptteil dieser Arbeit näher eingegangen.

1.9 Oxidative DNA-Schäden

Die DNA ist nicht nur äußeren Einflüssen ausgesetzt, sondern wird auch von spontaner Zersetzung oder durch endogene Prozesse bedroht. Spontane Hydrolyse führt zu abasischen Stellen oder Deaminierung.^[2, 250] Während des normalen zellulären Stoffwechsels oder durch UV- und ionisierende Strahlung werden reaktive freie Radikale generiert. Durch den körpereigenen Metabolismus unserer Zellen werden reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS; *reactive oxygen/nitrogen species*), alkylierende Agenzien, Östrogen- und Cholesterolmetaboliten und reaktive Carbonylspezies gebildet.^[251] Werden diese Substanzen nicht schnell genug von Abbauenzyme wie Katalasen, Glutathionperoxidases oder Superoxiddismutases abgebaut, können sie das genetische Material schädigen. ROS, zu denen hochreaktive Hydroxylradikale $[\text{OH}]^{\cdot}$, Superoxidradikale $[\text{O}_2]^{^{\cdot}-}$, Singuletsauerstoff ${}^1\text{O}_2$ oder Wasserstoffperoxid H_2O_2 gehören^[252], greifen neben der DNA auch Lipide und Proteine an.^[252-257] Die Ziele, sowie die entstehenden Modifikationen, sind von verschiedenen Faktoren abhängig, wie dem Ort der ROS Produktion oder der Oxidierbarkeit des Biomoleküls. Doch während modifizierte Lipide und Proteine durch normalen Umsatz beseitigt und fortwährend erneuert werden, muss die DNA, deren Erneuerung einzig auf Kopien von sich selbst beruht, repariert werden. Die Folgen der Reaktion von DNA mit ROS bzw. RNS sind Einzelstrangbrüche und die Bildung über 70 bisher bekannter oxidativer Basen und Zuckerprodukte,^[250] welche zum Zelltod oder zu Mutationen führen können. Allerdings ist das Level an oxidierten Nukleotiden mit $1:10^8$ relativ gering.^[253]

Des Weiteren ist auch die Reaktivität der einzelnen ROS unterschiedlich. Hydroxylradikale sind besonders reaktiv und reagieren mit allen vier Nukleobasen sowie der Desoxyribose. Sie gelten als Hauptverursacher oxidativer Schäden an der DNA und entstehen unter anderem durch H_2O_2 , welches ein Nebenprodukt der Zellatmung ist. Dessen Weiterreaktion über die Fenton-Reaktion unter Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) lässt Hydroxylradikale entstehen. Diese Reaktion findet in den Mitochondrien statt, weshalb dort etwa zehnmal mehr DNA-Schäden zu finden sind als in nicht-mitochondrialer DNA. Auch Entzündungen erhöhen lokal den oxidativen Stress. ${}^1\text{O}_2$ kann nur mit Guanin eine Reaktion eingehen.^[253] $\text{O}_2^{\cdot+}$ reagiert weder mit den Basen noch dem Zucker.

Guanosin hat als Monomer mit 1.29 V (gegenüber der Normwasserstoffelektrode (NHE)) das geringste Redoxpotential im Vergleich zu den anderen Nukleobasen und ist daher besonders anfällig für Oxidationen. Aufgrund von π -stacking erniedrigt sich innerhalb einer DNA-Helix das Redoxpotential für dG umso weiter, je mehr Purinbasen im DNA-Strang

aufeinanderfolgen (1.10–1.24 V gegenüber der NHE). Häufig existieren nicht-kodierende, dGdC-reiche Sequenzen zwischen den Genabschnitten eines Organismus, was vermuten lässt, dass sie in genomischer DNA als Schutz vor Oxidation kodierender Gensequenzen dienen. Adenin hat mit 1.42 V (gegenüber der NHE) das zweitniedrigste Redoxpotential.^[254] Daher werden dA und dG viel häufiger oxidiert als die anderen Basen.^[258-259]

1.9.1 Oxidation von Guanin

Abbildung 17 gibt einen Überblick über die wichtigsten Oxidationsprodukte von 2'-Desoxyguanosin.

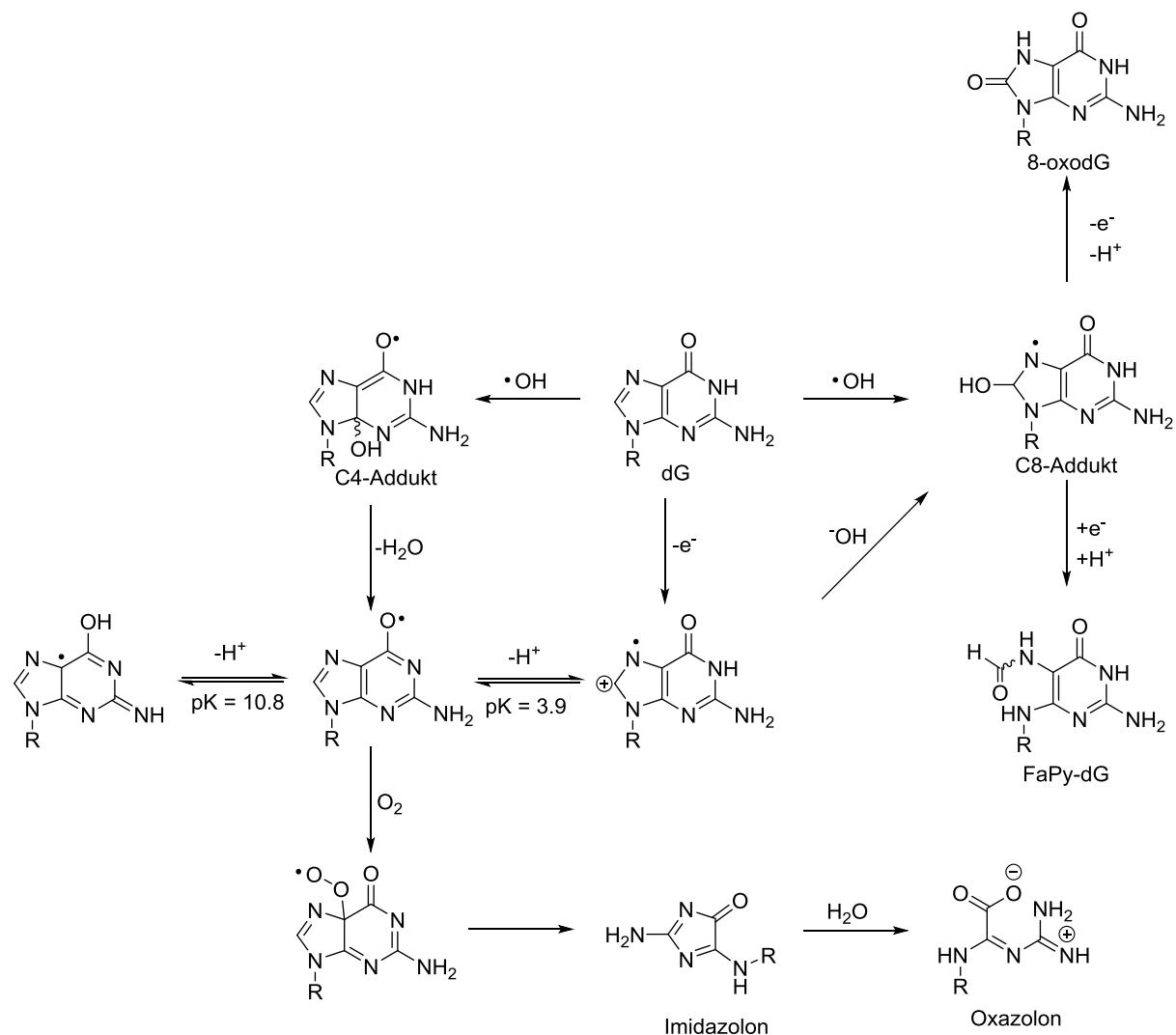


Abbildung 17: Oxidation von 2'-Desoxyguanosin.

Sowohl Reaktionen mit Hydroxylradikalen oder Singulett-Sauerstoff, als auch Ein- oder Zweielektronen-Oxidationen sind verantwortlich für die Entstehung von oxidativen dG Schäden. Die Oxidation durch die Abstraktion eines Elektrons oder durch Reaktion mit einem Hydroxylradikal führen zu den gleichen Produkten. Einelektronen-Transfers werden beispielsweise durch ionisierende Strahlung, Typ I *photosensitizer* oder multiple Oxidantien, wie Nitrosoperoxycarbonate ermöglicht.^[260] Die Abstraktion eines Elektrons von Guanin führt zu einem Radikalkation, welches unter protischen Bedingungen mit dem Guaninradikal im Gleichgewicht liegt. Unter basischen Bedingungen kann letzteres zum Radikalanion deprotoniert werden.^[261-262] Die Addition eines Hydroxylions an das Guanin-Radikalkation führt zu einem „redoxambivalentem“ C8-Hydroxylradikal. Die Bildung des C8-Addukts kann auch durch den direkten Angriff eines Hydroxylradikals an die C8-Position des ungeschädigten Guanins hervorgerufen werden.^[262] Je nach Bedingungen, kann das Addukt weiter zum 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-OxodG) oxidiert werden oder zum 2,6-Diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidin (FaPy-dG) reduziert werden. Bei der Reduktion zum Fapy-dG wird die Bindung zwischen C8 und N9 gespalten. Die Reaktion von O₂ mit dem Guaninradikal lässt ein Peroxylradikal entstehen. Dieses kann weiter zum relativ instabilen 2,5-Diamino-4H-imidazol-4-on (Imidazolon; dIz) reagieren und in wässriger Lösung zum 2,2,4-Triamino-5-(2H)-oxazolon (Oxazolon, dZ) hydrolysiert werden. Beides sind häufige Produkte dieses Weges.^[263-264] Das Guanylradikal kann auch durch den Angriff eines Hydroxylradikals an die C4 Position generiert werden.^[262] Der Angriff eines Hydroxylradikals an ein ungeschädigtes Guanin geschieht zu etwa 17% an der C8- und zu 60–70% an der C4-Position.^[262] Mit 0.74 V gegenüber NHE hat 8-OxodG ein noch niedrigeres Oxidationspotential als das ungeschädigte Guanin. Dies erklärt seine hohe Reaktivität und weitere Degradierung zu stabileren Produkten.^[265]

8-OxodG ist ein sehr häufig gebildeter und gut untersuchter oxidativer Schaden. Er entsteht etwa 2000mal pro Tag und Zelle. Etwa eines aus 40 000 Guaninen im Genom liegt schätzungsweise unter normalen Umständen als 8-oxodG vor, das sind zu jederzeit insgesamt > 30 000 8-OxodGs im Genom einer menschlichen Zelle.^[266] 8-OxodG führt zu dG → dT Transversionen^[267], da während der Replikation dA etwa in gleicher Menge gegenüber des Schadens eingebaut wird wie dC. Aufgrund dieses hohen mutagenen Potentials wird es häufig als biologischer Marker bei der Untersuchung oxidativer Schäden verwendet. Sowohl das 8-OxodG als auch das ringgeöffnete Hydrolyseprodukt FaPy-dG, entstehen aus derselben radikalischen Vorstufe (**Abbildung 18**).

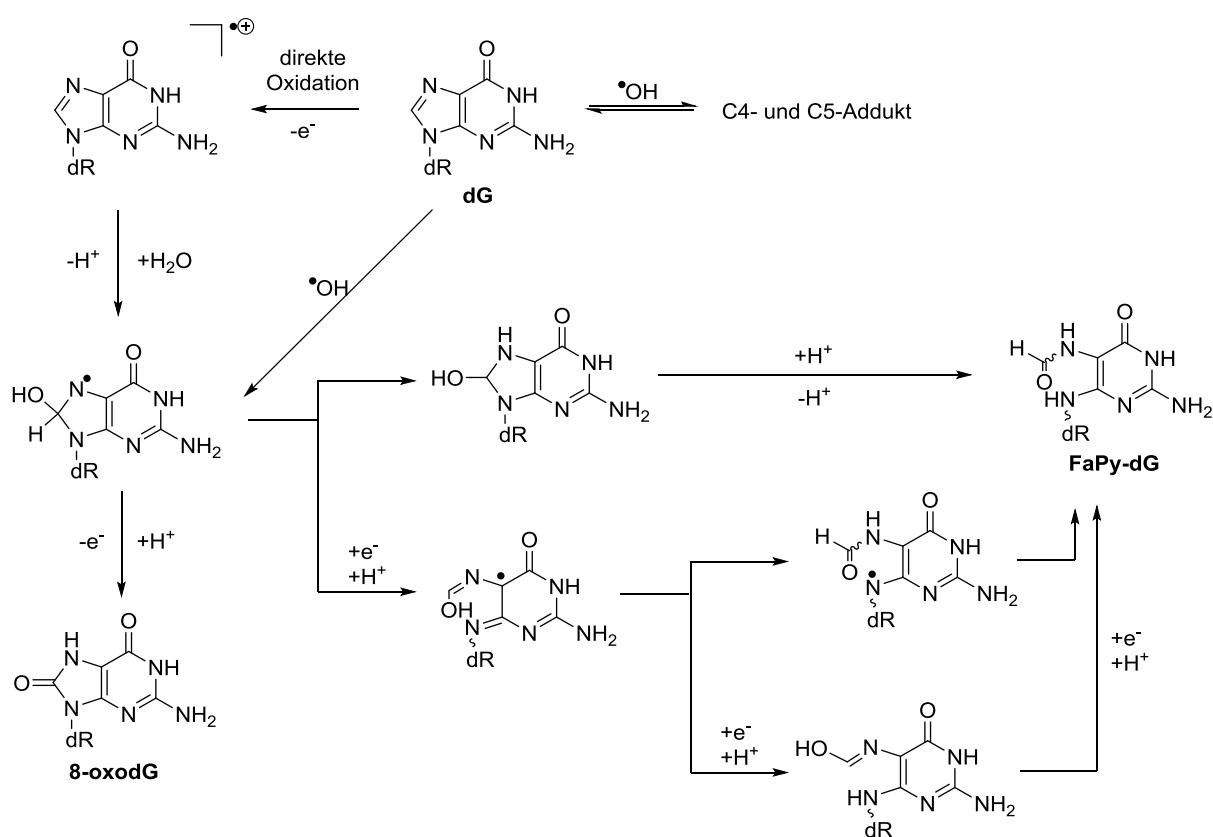


Abbildung 18: Entstehung von FaPy-dG.

Beiden Schäden geht die formale Addition eines Hydroxylradikals an die C8-Position des 2'-Desoxyguanosins voraus. Das FaPy-dG ist ein primäres Oxidationsprodukt, das sich unter reduktiven Bedingungen bei gleichzeitiger Generierung von Hydroxylradikalen nachweisen lässt, während das 8-oxodG unter aeroben oxidativen Bedingungen *in vivo* vorherrscht.

1.9.2 Die Formamidopyrimidin DNA-Schäden

1.9.2.1 Stabilität der natürlichen Formamidopyrimidine

Die Formamidopyrimidine entstehen vermutlich aus einer β -Spaltung des formalen C8-Hydroxylradikals. Das am Stickstoff lokalisierte Radikal ist die gemeinsame Vorstufe der Fapy- und 8-OxodG Schäden. Das Verhältnis, in welchem FaPy- und 8-OxodG-Schäden entstehen, ist abhängig von den oxidativen Bedingungen unter welchen sie entstehen.^[258] 8-OxodG braucht eine weitere Einelektronen-Oxidation, FaPy-dG dagegen entsteht formal durch Fragmentierung des Radikals gefolgt von Reduktion. Die FaPy-Schäden haben also die gleiche Oxidationsstufe, wie die ungeschädigten Nukleotide. Aufgrund ihrer chemischen

Struktur können die Formamidopyrimidine leicht anomerisieren sowie in die stabilere Pyranoseform umlagern (**Abbildung 19**).^[268-269] Der Grund dafür ist, dass der Stickstoff der glykosidischen Bindung nicht mehr Bestandteil des aromatischen Systems ist. Die Spaltung des Imidazolteils am Purinring führt zu einer raschen Hydrolyse der *N,O*-glykosidischen Bindung (im sauren Milieu).

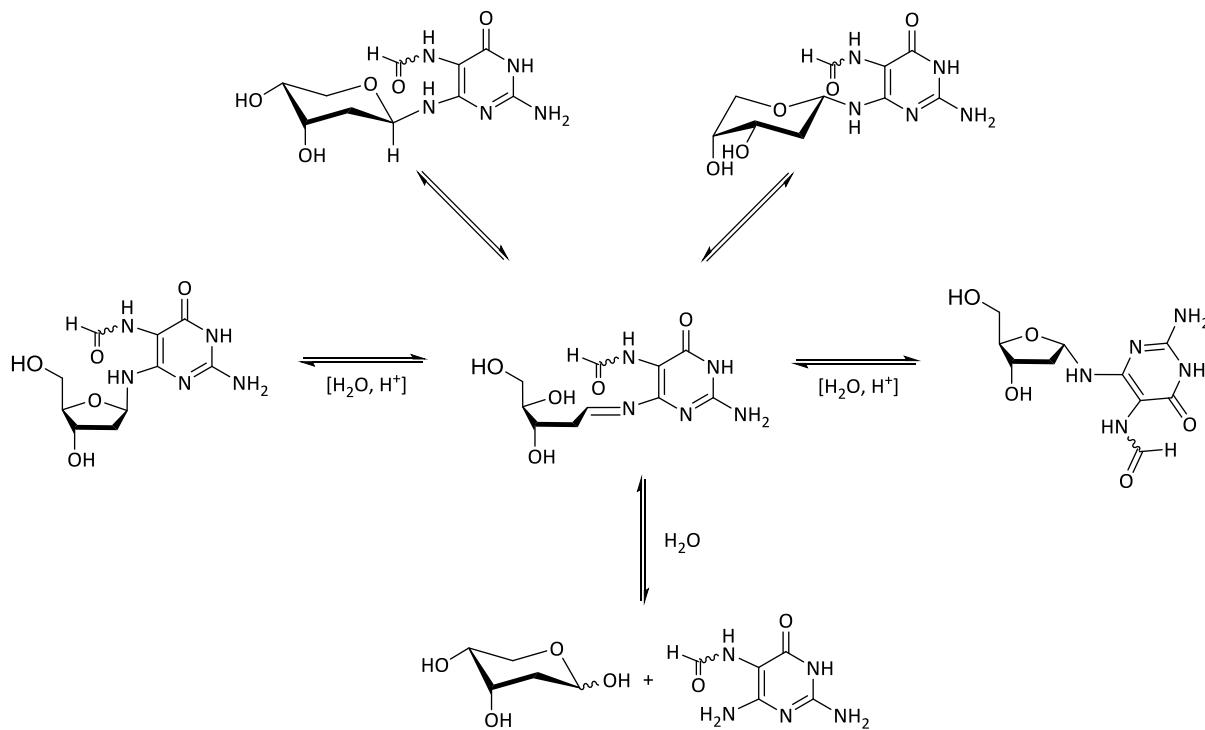


Abbildung 19: Epimerisierung von FaPy-dG.

In der DNA kann die Furanose durch ein sich 5' befindliches Phosphat nicht in die Pyranoseform umlagern, jedoch bereitet die Umlagerung bei der Synthese von FaPy-Oligonukleotiden Schwierigkeiten. Bei der Oligonukleotidsynthese liegt die 5'-Hydroxylgruppe kurzzeitig frei vor, was zumindest zu einer teilweisen Umlagerung führt. Die Epimerisierung während der Festphasen DNA-Synthese kann durch die Verwendung von Nitropyrimidin als Formamid-Vorstufe umgangen werden.^[270-272] Dazu wird das Phosphoramidit mit einer elektronenziehenden Nitrogruppe als Formamid-Vorstufe in ein Dinukleotid eingebaut. Im Dinukleotid kann dann die Nitrogruppe reduziert und formyliert werden und anschließend der Baustein zur Festphasensynthese verwendet werden. Zuvor musste man Oligonukleotide mit FaPy-Schäden mittels *reversed* DNA-Synthese herstellen, was die Synthese deutlich erschwerte.^[270-271] Die Synthese wurde weiter verbessert indem das Nitropyrimidin direkt in die Oligonukleotide eingebaut wurde und anschließend im

Oligonukleotid reduziert und formyliert werden konnte.^[118] Allerdings lassen sich auf diese Weise nur α/β -Gemische erhalten.

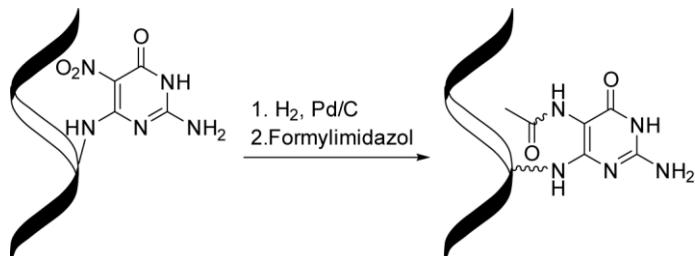


Abbildung 20: Schematische Darstellung der postsynthetischen Herstellung eines α/β -FaPy-dGs im DNA Einzelstrang.

1.9.2.2 Bioisostere Analoga der FaPy-Schäden

Um eine definierte α - oder β -Konfiguration zu erhalten, wurden bioisostere FaPy-Analoga entwickelt. Zwei wichtige Analoga sind die C-Nukleoside^[273-274] und die carbozyklischen FaPys^[275]. Diese Analoga sollten dieselben Strukturen und Bindungseigenschaften haben, wie die natürlichen Basen, aber stabile Anomere sein. Durch ihre Verwendung können anomererenreine FaPy-Analog enthaltene Oligonukleotide in hoher Reinheit und zufriedenstellender Ausbeute synthetisiert werden, um die Schadensklasse der Formamide ausreichend zu untersuchen. Da DNA-Polymerasen die Nukleotide nach ihrer Zuckereinheit auswählen, ist es wichtig, dass die strukturellen Konformationen der Analoga ähnlich der natürlichen Desoxyribose sind.^[276-278]

In den C-Nukleosiden der *Greenberg*-Gruppe ist der N9 Stickstoff durch einen Kohlenstoff ersetzt (**Abbildung 21A**).^[273-274] Dadurch ändert sich allerdings die Geometrie der Verbindung zwischen der Base und dem Zucker von trigonal planar (N_{sp}^2) zu tetraedrisch. Vergleicht man die Schmelztemperaturen von DNA Duplexen, die entweder das kanonische Nukleotid, ein natürliches Formamidopyrimidin oder ein C-Nukleosid gepaart mit der richtigen Base enthalten, ist die des ungeschädigten am höchsten und die des C-Nukleosids am niedrigsten.^[271, 274] Zwischen den α - und β -Anomeren des C-Nukleosids zeigte sich kein Unterschied der Schmelztemperatur.^[271]

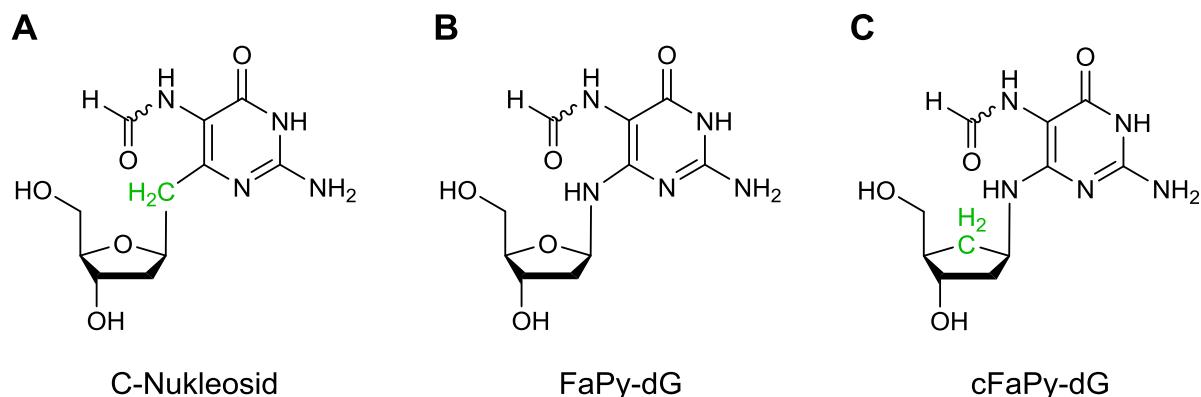


Abbildung 21: A) C-Nukleosid der Greenberggruppe. Der N9-Stickstoff ist durch eine CH₂-Gruppe (grün) ersetzt. B) Natürliches FaPy-dG. C) Carbozyklisches FaPy-dG. Hier ist der Ringsauerstoff der Ribose durch eine CH₂-Gruppe (grün) ersetzt.

In den carbozyklischen Fapy-Analoga der *Carell*-Gruppe (**Abbildung 21C**) ist der Sauerstoff der 2'-Desoxyribose durch eine Methylgruppe ersetzt.^[275] Der Carbozyklus verhindert die Anomerisierung, aber die Basen können wie die natürlichen Nukleoside Basenpaarungen eingehen. Schmelztemperaturmessungen von DNA Duplexen mit carbozyklischen Nukleotiden zeigten, dass sich diese im Vergleich zu den nativen Duplexen kaum änderten, wenn sie mit dA, dC, dG oder dT gepaart waren. Die Duplexe mit den carbozyklischen Nukleosiden waren sogar leicht stabiler als die mit den natürlichen.^[279] Die carbozyklischen FaPy-Basenpaare waren leicht instabiler als die natürlichen Basenpaare.^[279]

Untersuchungen über den Einfluss des Carbozyklus auf die *syn/anti* Konfiguration zeigten nur geringe Unterschiede zwischen 2'-Desoxyribose und Carbozyklus. NOESY-Experimente zeigten, dass auch bei den Carbozyklen die *anti*-Konformation bevorzugt ist.^[270, 280] Für normale Nukleotide wurde berichtet, dass die Duplexstabilität und -struktur kaum von der Sauerstoffsubstitution durch die Methylengruppe beeinflusst wird.^[281-283] Theoretische Berechnungen der *syn/anti* Konfiguration zeigten, dass die *anti*-Konformation etwa 6 kcal/mol stabiler ist als die *syn*-Konformation.^[279, 284]

Aufgrund des oben dargestellten chemischen Verhaltens der Formamidopyrimidine wurde in der Arbeitsgruppe *Carell* eine 12-stufige Synthese eines 3',5'-silylgeschützten, stabilen α -oder β -konfigurierten cFaPy-dG Derivates entwickelt.^[285]

1.9.3 Mutagenität oxidativer Schäden

Die oxidativen Guanosinschäden führen zu einer Vielzahl von Mutationen *in vivo*, vor allem zu $dG:dC \rightarrow dT:dA$ Transversions- und $dG:dC \rightarrow dA:dT$ Transitionsmutationen.^[286-287] *Primer*-Verlängerungsstudien mit stabilisierten Fapy-dG Analoga^[279, 288] zeigten entweder korrekte Insertion von dC und Fehleinbau von dA.^[289]

Im Allgemeinen reduzieren oxidative Schäden die Replikationseffizienz von Polymerasen und führen häufig zum Einbau falscher Basen,^[289-290] wobei das mutagene Potential oxidativer Schäden des Adenins geringer ist als das von geschädigten Guaninen.^[291] Der Einbau der korrekten Nukleotide gegenüber Fapy-Schäden durch das Klenow exo⁻ Fragment der DNA Polymerase I von *E. coli* ist im Vergleich zu den ungeschädigten Nukleotiden langsamer.^[289-290] Die Einbaueffizienz (V_{max}/K_m) von dT gegenüber Fapy-dA beträgt nur etwa 30% des nativen Nukleotids.^[290] Gegenüber eines Fapy-dGs wird ein dC etwa 50mal schwerer eingebaut als gegenüber eines ungeschädigten dGs und der Strang wird bis zu 80mal langsamer verlängert.^[289] Die Genauigkeit der Polymerasen wird ebenfalls beeinträchtigt. Das Klenow exo⁻ Fragment baut gegenüber eines Fapy-dAs mit 5mal höherer Wahrscheinlichkeit ein dA ein, als bei einer ungeschädigten Base.^[290] Dies macht aber nur etwa 2% aus. Der Einbau eines dAs gegenüber von Fapy-dG ist dagegen deutlich höher, allerdings abhängig von der 3' benachbarten Base.^[287] Fapy-dG ist dabei weniger mutagen als 8-OxodG. Gegenüber beiden Schäden wird hauptsächlich dA falsch eingebaut, allerdings erreicht das Level gegenüber dem Fapy-dG nie mehr als 2%, während gegenüber dem 8-OxodG zwischen 3–10% dA eingebaut werden.

Die Mechanismen der Mutagenität der 8-Oxo-Schäden wurden intensiv biochemisch^[292-293] und strukturell mit verschiedenen *high fidelity*^[269, 292, 294] und *low fidelity*^[295-299] Polymerasen untersucht und sind inzwischen gut bekannt. Kristallstrukturen und biochemische Daten über das 8-OxodG in Studien mit verschiedenen Polymerasen zeigten, dass dieser Schaden entweder eine *syn*- oder eine *anti*-Konformation bezüglich der glykosidischen N9-C1' Bindung einnehmen kann.^[292, 294] Die *anti*-Konformation ermöglicht hierbei fehlerfreies Überlesen der replikativen Polymerasen, während die *syn*-Konformation zu Mutationen führt.^[292, 298] Dieses Konfomer ist in der Lage stabile nicht kanonische *Hoogsteen* Basenpaare mit dA auszubilden, die nur geringe Verzerrungen in der aktiven Tasche der Polymerase hervorrufen.^[292-299] Für die Fapy-Schäden wurde bisher ein ähnlicher Mechanismus angenommen^[286, 290], der allerdings noch nicht bestätigt werden konnte.^[300] Besonders Kristallstrukturen, die einen Einblick in die Mechanismen geben könnten, gab es bisher kaum.

2. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, einen tieferen Einblick in die Rolle des XPA Proteins beziehungsweise dessen Homolog aus Hefe, Rad14, in der NER zu erhalten. Da bekannt ist, dass XPA/Rad14 eine starke Bindungsaffinität zu *bulky* DNA Addukten aufweisen, wurde das Acetylaminofluoren als Modellsystem gewählt. Es sollten Oligonukleotide mit verschiedenen Sequenzen hergestellt werden, die entweder ein dG(C8)-AAF oder ein dG(N^2)-AAF Addukt enthielten. Dazu sollten zunächst die Phosphoramiditverbindungen der beiden Addukte synthetisiert werden, welche dann mittels DNA Festphasensynthese in die entsprechenden Oligonukleotide eingebaut werden sollten. Mit diesen Oligonukletiden sollte dann mittels UV-Vis Spektroskopie die Auswirkung des AAF-Schadens auf den DNA Duplex ermittelt werden. Des Weiteren sollten sie für Bindungsstudien mit XPA/Rad14 sowie für die Co-Kristallisation mit der DNA-bindenden Domäne von Rad14 verwendet werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass carbozyklische Analoga gute Analoga für die natürlichen Basen sind und somit unter anderem für Co-Kristallisationsexperimente geeignet sind. Dazu sollte ein carbozyklisches Nukleotid synthetisiert werden und mittels quantitativer 2D NMR-Spektroskopie mit dem natürlichen verglichen werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese des dG(C8)-AAF Phosphoramidits

Um die Rolle von XPA/Rad14 im Zusammenhang mit der Reparatur von *bulky* DNA Addukten genauer zu untersuchen, wurden Oligonukleotide hergestellt, die ein dG(C8)-AAF Addukt an einer definierten Stelle enthielten. Diese wurden dann für Bindungsstudien und *crosslink* Experimente sowie für die Kristallisation mit Rad14 verwendet.

Die Herstellung dG(C8)-Addukt modifizierter Oligonukleotide wurde früher durch postsynthetische Umsetzung mit den entsprechenden *N*-Hydroxy- oder *N*-Acetoxyarylaminen verwirklicht.^[301-302] Aufgrund der Toxizität dieser Substanzen ist der Umgang mit ihnen allerdings gefährlich. Außerdem ist dadurch die Sequenzauswahl der Oligonukleotide sehr begrenzt.

Die moderne Methode zur Herstellung dG(C8)-Addukt modifizierter Oligonukleotide verläuft über die automatisierte Festphasensynthese unter Verwendung der entsprechenden Phosphoramidite. Auf diese Weise können die modifizierten Nukleotide gezielt in beliebige Sequenzen eingebaut werden.

Eine Syntheseroute für die Herstellung von dG-Arylamin-Addukt Phosphoramiditen wurde zuerst von *Wang* und *Rizzo* beschrieben.^[303] Schlüsselschritt der Synthese ist die *Buchwald-Hartwig*-Kupplung.^[304] Diese Reaktion bietet eine Synthesemöglichkeit von Arylaminen aus Arylhalogeniden und Aminen, in diesem Fall die Kupplung des aromatischen Amins an das geschützte 8-Brom-2'-desoxyguanosin.

Gillet et al. passten die Synthese dann den besonderen Anforderungen der Herstellung des dG(C8)-AAF Phosphoramidits an.^[115] So musste für die selektive Acetylierung der *N*⁸-Position neben der ebenso verfügbaren *N*²-Aminogruppe, das *N*²-Amin mit einer sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe geschützt werden. Dafür eignet sich besonders gut eine Dimethoxytritylgruppe (DMTr). Außerdem ist diese basenstabil und übersteht die stark basischen Bedingungen während der *Buchwald-Hartwig*-Kupplung. Nach der Acetylierung kann die DMTr-Schutzgruppe leicht unter schwach sauren Bedingungen abgespalten und durch eine basenlabile Schutzgruppe für die DNA-Festphasensynthese ersetzt werden.^[115] Diese stellte die nächste Herausforderung dar. Für die Standard DNA Synthese wird die *N*²-Position des Guanins mit Dimethylformamid (DMF) oder *i*Butyryl geschützt. Allerdings würde bei der im Anschluss an die Festphasensynthese stattfindende Entschützung der Oligonukleotide, welche normalerweise unter relativ stark basischen Bedingungen bewerkstelligt wird, die *N*⁸-Acetylgruppe abgespalten. Daher wurde für exozyklische

N^2 -Aminogruppe eine *i*Propylphenoxyacetyl Schutzgruppe (*i*PrPac) verwendet, welche sich unter sogenannten *ultramild* Bedingungen (10% Diisopropylamin, 0.25 M β -Mercaptoethanol in Methanol, 55 °C, 18 h, 650 rpm) entfernen lässt. Die schwach basischen Bedingungen bei der *ultramild* Entschützung gewährleisten den Erhalt der Acetylgruppe.

Unter Verwendung dieser besonderen Schutzgruppen wurde das dG(C8)-AAF Phosphoramidit **12** nach *Gillet et al.* entsprechend dem in **Abbildung 22** gezeigten Schema synthetisiert.^[115]

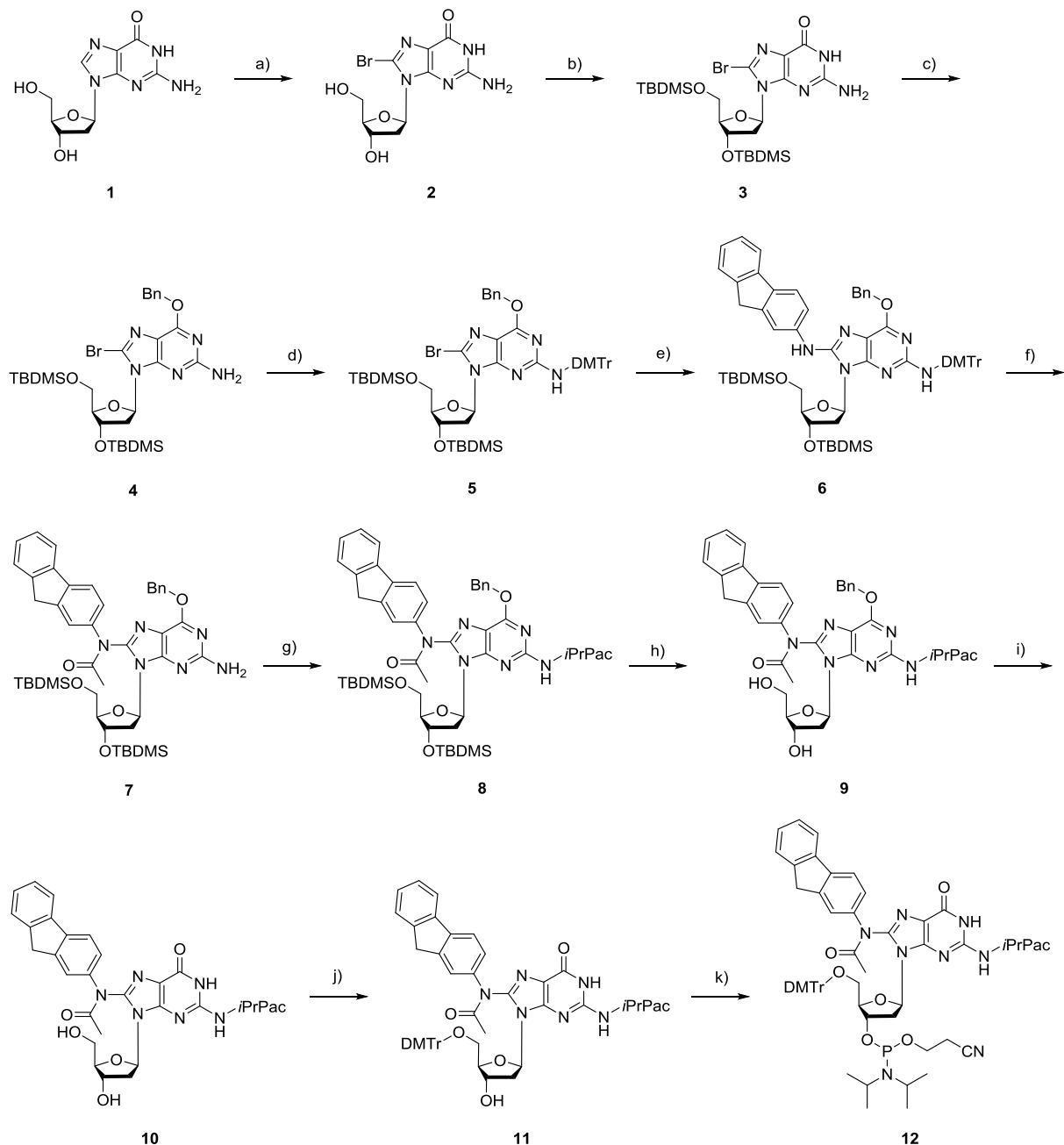


Abbildung 22: Syntheseweg des dG(C8)-AAF Phosphoramidits **12**.^[115, 303] a) NBS, MeCN/H₂O, RT, 30 min, 85%; b) TBDS-Cl, Imidazol, DMF, RT, 4 h, 96%; c) PPh₃, Benzylalkohol, DIAD, 1,4-Dioxan, RT, 5 h, 80%; d) DMTr-Cl, Pyridin, RT, 3 h, 97%; e) 2-Aminofluoren, Pd₂(dba)₃, *rac*-BINAP, NaOrBu, Toluol, 110 °C, 1.5 h, 75%; f) Ac₂O, 4-DMAP, Et₃N, Pyridin, RT, 5 h, dann HCl 0.01 M in MeOH, RT, 18 h, 93% über zwei Stufen; g) iPrPac-Cl, Pyridin, RT, 3 h, 97%; h) TBAF (1 M in THF), HOAc, THF, RT, 18 h, 78%; i) Pd/C (10% Pd), H₂, EtOH, 86%; j) DMTr-Cl, Pyridin, RT, 3 h, 96%; k) (iPr₂N)₂POEtCN, DIAT, DCM, RT, 2 h, 100%. (DMTr-Cl: Dimethoxytritylchlorid; DIAD: Diisopropylazodicarboxylat; DIAT: Diisopropylamintetrazolid).

Zuerst wurde die C8-Position des 2'-Desoxyguanosins **1** mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch bromiert und anschließend das Produkt mittels Fällen aus Aceton gereinigt. Die Bromierung verläuft über eine aromatische Substitution des gebundenen Wasserstoffs durch ein Bromiumions. Das bromierte 2'-Desoxyguanosin **2**

wurde als hellbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 85% erhalten (Lit.: 80%). Zur Schützung der funktionellen Gruppen von Verbindung **2** für die *Buchwald-Hartwig*-Kupplung wurden basenstabile Schutzgruppen verwendet, da diese unter stark basischen Bedingungen abläuft. Um die 3'-und 5'-Hydroxygruppen zu schützen, wurde 8-Brom-2'-desoxyguanosin **2** mit *t*Butyldimethylsilylchlorid und Imidazol in DMF umgesetzt, wobei die entsprechenden Silylether entstanden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel wurde das silylgeschützte Nukleotid **3** mit 96% Ausbeute erhalten (Lit.: 98%). Zum Schutz der *O*⁶-Position wurde mittels einer Mitsunobureaktion eine Benzylschutzgruppe eingeführt. Dazu wurde Verbindung **3** mit Benzylalkohol, Triphenylphospan und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) in DMF umgesetzt. DIAD und Triphenylphosphin bilden hierbei ein Addukt, welches schon durch schwache Säuren protoniert werden kann. Das Sauerstoffatom des Benzylalkohols greift nun nukleophil das positiv geladene Phosphorzentrum an. Unter Abspaltung eines Hydrazinderivats wird der Phosphor oxidiert. Das Sauerstoffanion in C6-Position greift das Phosphor-Alkohol-Addukt am benzyischen C-Atom in einer S_N2-Reaktion an. Hierbei wird Triphenylphosphinoxid als gute Abgangsgruppe abgespalten. Nach säulenchromatischer Aufreinigung konnte benzylgeschützte Nukleotid **4** in einer Ausbeute von 80% (Lit.: 78%) erhalten werden. Die exozyklische *N*²-Aminogruppe wurde mit Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) geschützt. Dazu wurde Verbindung **4** mit DMTr-Cl in trockenem Pyridin 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatischer Aufreinigung erhielt man das geschützte Nukleosid **5** in 97% Ausbeute (Lit.: 94%).

Das vollständig geschützte 8-Brom-2'-desoxyguanosin **5** wurde nun nach dem Schema in **Abbildung 22** in sieben Schritten zum Phosphoramidit **12** umgesetzt.

Für die *Buchwald-Hartwig*-Kupplung wurde **5** mit kommerziell erhältlichem 2-Aminofluoren (1.8 Äq.), *rac*-2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP), Tris-(dibenzyliden-aceton)-dipalladium (Pd₂(dba)₃) und Natrium-*t*butanolat (Na*t*OBu) in trockenem Toluol umgesetzt. Dazu wurde das Reaktionsgemisch nach zehn Minuten bei Raumtemperatur für 1.5 h bei 110 °C unter Argonatmosphäre gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde 8-(*N*-2-Aminofluoren)-*O*⁶-benzyl-3',5'-*O*-bis(*tert*-butyl-dimethylsilyl)-*N*²-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin (**6**) als hellbrauner Schaum in 75% Ausbeute erhalten (Lit.: 72%). Da eine Kupplung mit *N*-Acetyl-2-aminofluoren nicht mit zufriedenstellender Ausbeute möglich ist, wurde die Acetylgruppe im Anschluss an die *Buchwald-Hartwig*-Kupplung eingeführt.^[305] Für die Acetylierung der *N*⁸-Position wurde **6** mit Essigsäureanhydrid und 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) in Pyridin bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach vollständiger Acetylierung wurde das Produkt mit Ethylacetat extrahiert und

mit Wasser gewaschen. Ohne weitere Aufreinigung wurde die DMTr-Schutzgruppe an der N^2 -Position in einer 0.01 M methanolischen HCl-Lösung abgespalten. Nachdem mittels Säulenchromatographie aufgereinigt wurde, erhielt man Produkt **7** in einer Ausbeute von 93% (Lit.: 78%) als leicht bräunlichen Schaum. Im Anschluss wurde die N^2 -Aminogruppe des Guanosins mit *i*Propylphenoxyacetylchlorid für die DNA Festphasensynthese geschützt. Dazu wurde **7** mit *i*PrPac-Cl in Pyridin bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach vollständiger Umsetzung lieferte säulenchromatische Aufreinigung Verbindung **8** als leicht bräunlichen Schaum in 97% Ausbeute (Lit.: 95%). Anschließend wurden die beiden *t*Butyldimethylsilylschutzgruppen der 3'- und 5'-Hydroxylgruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF; 1 M in THF) und Essigsäure in THF abgespalten. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde Verbindung **9** als weißer Schaum mit einer Ausbeute von 78% erhalten (Lit.: 79 %). Die Benzylschutzgruppe an der O^6 -Position wurde mittels Hydrierung entfernt. Die Umsetzung von Verbindung **9** zu Produkt **10** erfolgte durch katalytische Reduktion mit Pd/C (10% Pd/C) in Ethanol unter Wasserstoffatmosphäre. Das Nukleosid **10** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung als weißen Schaum in 86% Ausbeute (Lit.: 88%) erhalten. Für die DNA Festphasensynthese wurde im nächsten Schritt die 5'-Hydroxygruppe mit einer DMTr-Gruppe geschützt. Diese ist sterisch sehr anspruchsvoll und reagiert daher bevorzugt mit der primären 5'-Hydroxylgruppe neben der sekundären 3'-Hydroxylgruppe. Die selektive Schützung erfolgte durch Umsetzung von **10** mit 1.1 Äquivalenten DMT-Cl in trockenem Pyridin bei Raumtemperatur. Addukt **11** wurde nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie in 100% Ausbeute erhalten. Im letzten Syntheseschritt wurde in einer S_N2 -Reaktion das dG(C8)-AAF Phosphoramidit **12** für die Festphasensynthese hergestellt. Dazu wurden Verbindung **11** und DIAT unter Argonatmosphäre in trockenem Dichlormethan (DCM) gelöst, entgast und mit dem *Bannwarth*-Reagenz (*i*Pr₂N)₂PCH₂CH₂CN, versetzt. Aufreinigung erfolgte über Säulenchromatographie und man erhielt das Phosphoramidit **12** mit einer Ausbeute von bis zu 100% (Lit.: 100%). Um eine Oxidation des Phosphors zu verhindern, wurden die Fraktionen während der Aufreinigung im Argongegenstrom aufgefangen.

3.2 Synthese des dG(N^2)-AAF Phosphoramidits

Synthese von 3-Brom-2-nitrofluoren

Für das dG(N^2)-AAF Phosphoramidit musste zunächst das 3-Brom-2-nitrofluoren **17** ausgehend von kommerziell erhältlichem 2-Aminofluoren **13** nach dem Schema in **Abbildung 23** hergestellt werden.

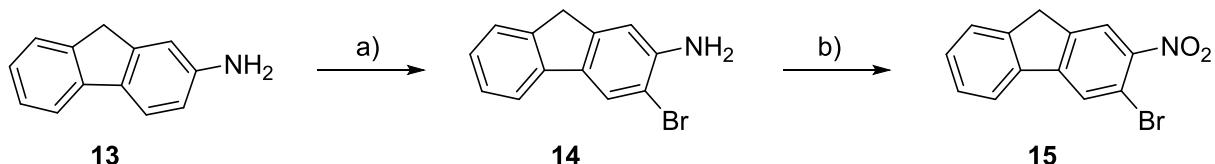


Abbildung 23: Synthese von 2-Nitro-3-Bromfluoren **15** ausgehend von 2-Aminofluoren **13**. a) HBr 48%, DMSO, 80 °C, 5 h, 91%; b) *m*CPBA, DCM, RT, 48 h, 76%.

2-Aminofluoren **13** wurde bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid gelöst und mit einem Äquivalent HBr (48%) versetzt. Die Lösung wurde 4 Stunden auf 80 °C erhitzt, dann mit Natriumsulfit-Lösung neutralisiert und mit DCM extrahiert. Nach Aufreinigung durch Säulenchromatografie wurde 2-Amino-3-bromfluoren **14** als hellbrauner Feststoff mit 91% Ausbeute erhalten. Über die Protonenkopplungen im COSY-Spektrum von Verbindung **14** in **Abbildung 24** konnte gezeigt werden, dass die Bromierung am C3 stattgefunden hat.

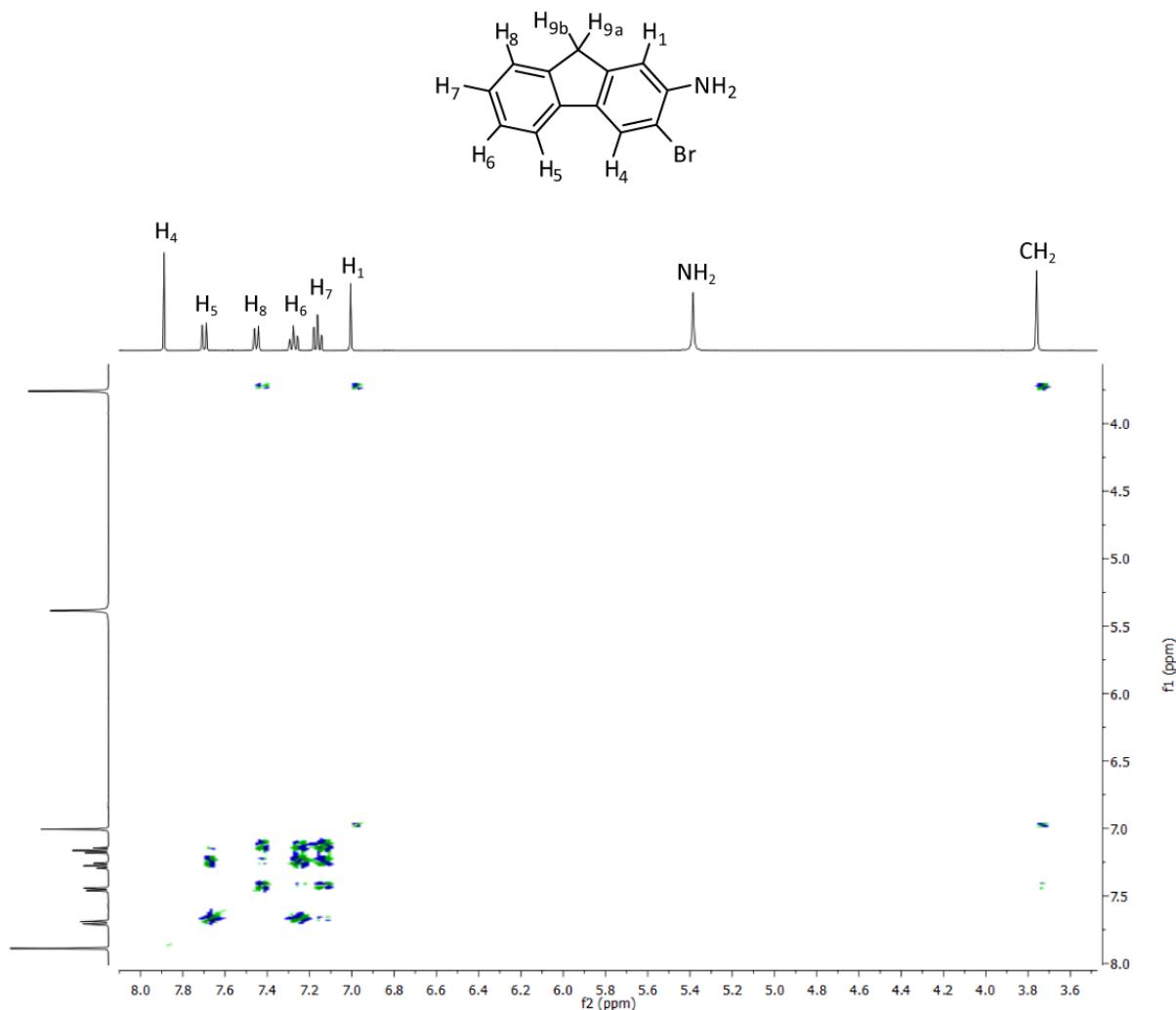


Abbildung 24: 2D-COSY Spektrum von 2-Amino-3-Bromfluoren 14.

Im ¹H-Spektrum (400 MHz, DMSO-*d*6) wurden die Signale den Protonen wie folgt zugeordnet: Das Singulett bei $\delta = 7.89$ wurde H₄ zugeordnet, welches mit keinem Proton in der Nähe koppeln kann. Dem H₁ wurde das Signal bei $\delta = 7.01$ zugeordnet. Dieses Signal bildet ein Triplet mit einer Kopplungskonstante von $^3J = 0.9$ Hz. Kopplungspartner sind die beiden Protonen der Aminogruppe, welche ein breites Singulettsignal bei $\delta = 5.39$ hervorrufen. Die Protonen am zweiten aromatischen Ring koppeln untereinander. Das Signal des H₅ liegt bei $\delta = 7.70$ und weist eine *ortho*-Kopplungskonstante mit $^3J = 7.5$ Hz auf. Das Signal des Protons am C6 ist ein Triplet vom Duplett bei $\delta = 7.28$. Die Kopplungskonstanten betragen $^3J = 7.5$ Hz (2x) und $^4J = 1.1$ Hz. Das Signal von H₈ ist ein Duplett vom Triplet bei $\delta = 7.45$ mit $^3J = 7.4$ Hz (2x) und $^4J = 0.9$ Hz. H₇ spaltet als Duplett vom Triplet auf und liegt bei $\delta = 7.16$. Die Kopplungskonstanten betragen $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz. Das Signal der Protonen am C9-Kohlenstoff ist ein Singulett bei $\delta = 3.76$. Die Aminogruppe dirigiert den

Zweitsubstituenten in *ortho*- und in *para*-Position. Im 2-Aminofluoren ist letztere Position nicht zugänglich, wodurch die Substitution selektiv in *ortho* erfolgt.

Das 2-Amino-3-bromfluoren **14** wurde zusammen mit 75%iger *meta*-Chlorperbenzoësäure (*m*CPBA) im Überschuss in Dichlormethan gelöst. Nach 72 Stunden röhren bei Raumtemperatur wurde die gelbbraune Suspension mit gesättigter Natriumhydrogensulfat-Lösung neutralisiert und mit Dichlormethan extrahiert. 3-Brom-2-nitrofluoren **15** wurde nach Aufreinigung mittels Säulenchromatografie als gelbes Pulver mit einer Ausbeute von 76% erhalten.

Die Oxidation der Aminogruppe zur Nitrogruppe erfolgt zunächst über die Bildung des Hydroxylamins, welches dann zur Nitrosoverbindung weiterreagiert. Diese kann dann bei ausreichender Reaktionszeit, wie in **Abbildung 25** gezeigt, zur Nitrogruppe reagieren.

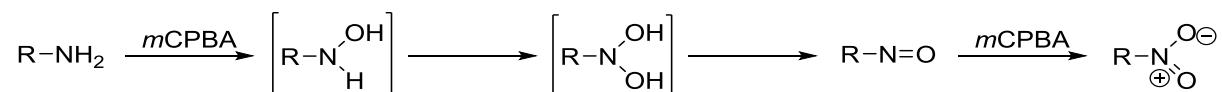


Abbildung 25: Oxidation der Aminogruppe zur Nitrogruppe.

Nach Synthese von **15** wurde dieses an die *N*²-Position des geschützten 2'-Desoxyguanosin **19** gekuppelt (**Abbildung 26**). Die Synthese wurde nach *Bonala et al.* durchgeführt.^[306]

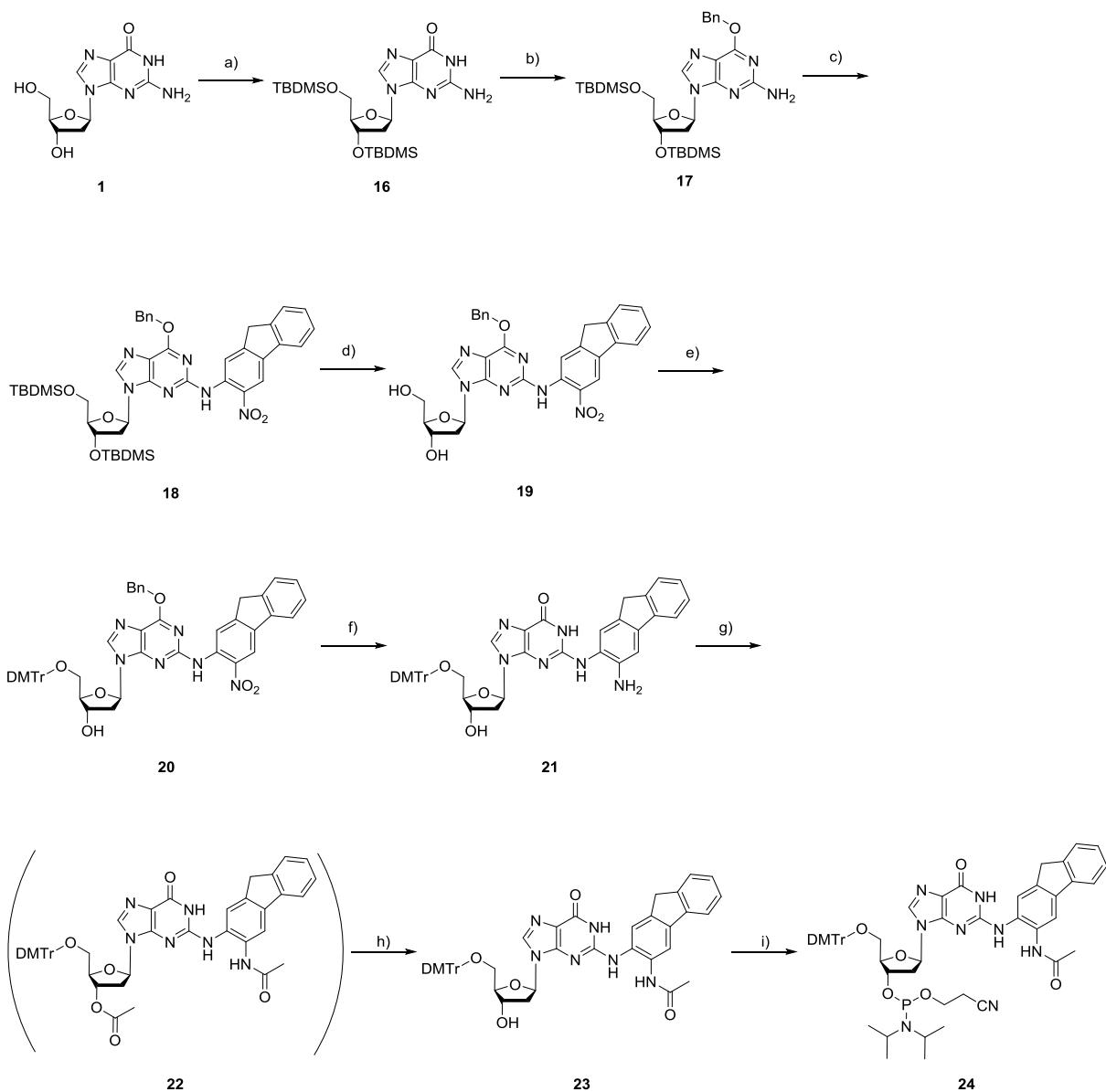


Abbildung 26: Syntheseweg des dG(N^2)-AAF Phosphoramidits. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF/THF, RT, 5 h, 100%; b) Benzylalkohol, PPh_3 , DIAD, Dioxan, RT, 5 h, 86%; c) 15, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, BINAP, Dioxan, 110 °C, 18 h, 46%; d) TBAF (1 M in THF), HOAc, THF, RT, 18 h, 94%; e) DMTr-Cl , Pyridin, RT, 3 h, 87%; f) Pd/C (10% Pd), H_2 , EtOAc ; g) Ac_2O , Pyridin, RT, 12 h; h) NH_3 , MeOH , RT, 3 h, 76% über drei Stufen; i) $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, DIAT, DCM, RT, 2 h, 100%.

Wie für das dG(C8)-AAF musste zunächst der Grundkörper des 2'-Desoxyguanosin für die *Buchwald-Hartwig-Kupplung* geschützt werden. Für die Schützung der beiden Hydroxylgruppen wurde 2'-Desoxyguanosin 1 mit einem Überschuss an TBDMS-Chlorid und Imidazol in DMF suspendiert und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Ethanol zugegeben und die Suspension 16 Stunden bei -18°C aufbewahrt. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und Verbindung 16 wurde als weißer pulveriger Feststoff erhalten. Die Umsetzung erfolgte zu 100%. DMF eignet sich hier als polares,

aprotisches Lösungsmittel besonders gut, da die Reaktion über polare Übergangszustände verläuft. Verbindung **16** konnte ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet werden. Die Carbonylgruppe an der C6-Position wurde über eine Mitsunobu-Reaktion mit Benzylalkohol und Triphenylphosphan in Gegenwart von DIAD in trockenem 1,4-Dioxan geschützt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde Verbindung **17** als weißer Schaum in 86% Ausbeute erhalten.

Das geschützte Guanosin **17** und 3-Brom-2-nitrofluoren **15** (1.3 Äq.) wurden zusammen mit 10 mol% $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und 30 mol% *rac*-2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) unter Argonatmosphäre entgast und in Toluol gelöst. Die Suspension wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und zwei Äquivalente NaOtBu wurden zugegeben. Anschließend wurde die Suspension 18 Stunden bei $110\text{ }^\circ\text{C}$ unter Argon gerührt. Nach säulenchromatografischer Aufreinigung wurde **18** als orangeroter Schaum mit bis zu 46% Ausbeute erhalten (Lit.: 76%). Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Angaben der Literatur überein.^[306] Nach der Kupplung wurden die TBDMS-Schutzgruppen an den beiden Hydroxylgruppen wieder entfernt. Verbindung **18** wurde dazu mit Essigsäure und TBAF in THF bei Raumtemperatur umgesetzt. Das entschützte Addukt **19** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung als oranger Schaum mit einer Ausbeute von 82% erhalten werden (Lit.: 100%). Die 5'-Hydroxygruppe wurde nun mit DMTr-Cl für die Festphasensynthese geschützt. Für eine selektive Schützung der 5'- neben der 3'-Hydroxygruppe wurden 1.1 Äquivalenten DMTr-Cl mit Verbindung **19** in trockenem Pyridin für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte das geschützte Nukleosid **22** in 87% Ausbeute als oranger Schaum erhalten werden (Lit.: 80%).

Im nächsten Schritt wurden mittels heterogener katalytischer Hydrierung gleichzeitig die Nitrogruppe am Aromaten reduziert und die benzylgeschützte O^6 -Position der Base Guanosin entschützt. Als Katalysator wurde Palladium aufgezogen auf Aktivkohle verwendet. Palladium liegt hier in Oxidationsstufe +II vor und wird vor der Katalyse durch das Wasserstoffgas zum katalytisch wirksamen $\text{Pd}(0)$ reduziert. Da die Bindungsenthalpie eines Wasserstoffmoleküls 434 kJ mol^{-1} beträgt und somit relativ hoch ist, ist eine Hydrierung ohne Katalysator nicht möglich.^[307] **20** wurde zusammen mit Pd/C (10% Pd) in Ethylacetat für 18 Stunden bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Silika abfiltriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und dann erneut über einen Spritzenfilter filtriert, um letzte Katalysatorspuren zu entfernen. Die Acetylierung der Aminogruppe erfolgte ohne weitere Aufreinigung. Nachdem das

Lösungsmittel vollständig um Vakuum entfernt worden war, wurde der Rückstand dazu in Pyridin aufgenommen und mit Essigsäureanhydrid umgesetzt. Da hierbei auch die $O^{3'}$ -Position acetyliert wird, musste diese durch Rühren in Ammoniak wieder entschützt werden. Die Acetylgruppe an der Aminogruppe ist dabei stabil. Anschließende Aufreinigung über Säulenchromatographie lieferte **23** als orangen Schaum in einer Ausbeute von 76% (Lit.: 87%). Für die Herstellung des Phosphoramidits **24** wurde **23** zusammen mit DIAT gründlich entgast und unter Argonatmosphäre in trockenem und ebenfalls entgastem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde mit Bannwarth-Reagenz ($(iPr_2N)_2PEtCN$) versetzt und dann für zweieinhalb bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatischer Aufreinigung, wobei die Fraktionen im Argongegenstrom gesammelt wurden um die Oxidation des Phosphors zu verhindern, konnte das Phosphoramidit als gelber Schaum in einer Ausbeute von 100% erhalten werden (Lit.: 100%).

3.3 DNA Festphasensynthese und Aufreinigung der Oligonukleotide

Bei der DNA Festphasensynthese wird das Oligonukleotid synthetisiert, während es kovalent an einen festen polymeren Träger gebunden ist. Dieser besteht in der Regel aus *controlled pore glass* (CPG) oder Polystyrol (*polystyrene beads*). Die Oligonukleotidsynthese erfolgt dabei nach der von *Caruthers* entwickelten so genannten Phosphoramidit-Methode. Die Synthese startet mit dem jeweiligen Nukleosid der zu synthetisierenden Basensequenz. **Abbildung 27** zeigt schematisch den Reaktionszyklus der DNA Synthese. Das Startnukleosid ist bereits über die 3'-Hydroxygruppe mit einem basenlabilen Ester als *linker* an die Festphase gebunden und trägt am 5'-OH-Ende eine DMTr-Schutzgruppe. Eine Schützung mit temporären Schutzgruppen wie DMTr ist deshalb notwendig, um eine gezielte Freisetzung der reaktiven Funktion und damit eine selektive Kopplung der Nukleotide an den Strang zu gewährleisten.

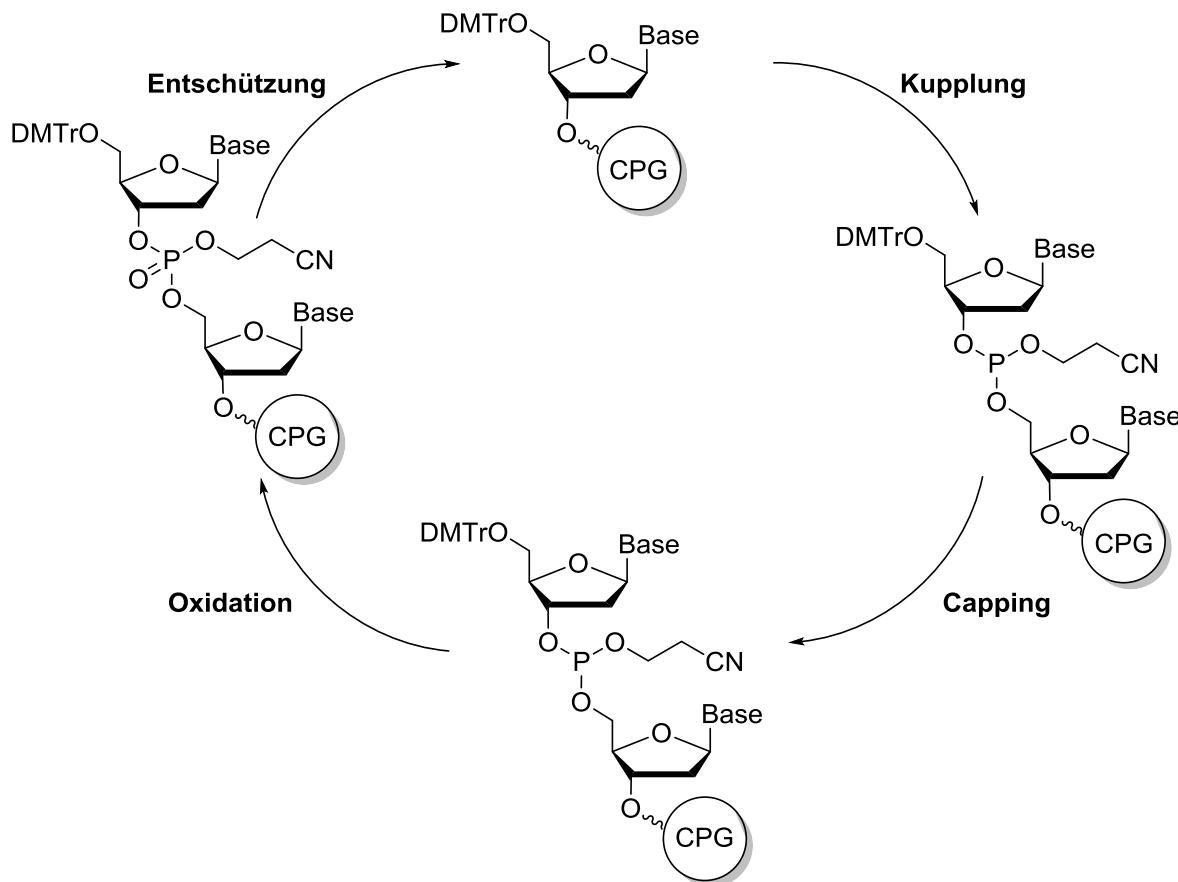


Abbildung 27: Reaktionszyklus der DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramidit-Methode.

Die Kopplung eines weiteren Nukleosids an das erste erfolgt durch einen nukleophilen Angriff des freien 5'-OH-Endes und der daraus resultierenden Phosphodiesterbrückenbildung. Dazu wird die DMT-Schutzgruppe am 5'-OH-Ende durch Behandlung mit verdünnter Dichloressigsäure in DCM entfernt. Damit die Hydroxygruppe mit dem 3'-Phosphoramidit reagieren kann, muss das 3'-Phosphoramidit zuerst aktiviert werden. Die Aktivierung erfolgt durch Protonierung der Diisopropylaminogruppe des Phosphoramidits mit Hilfe von 5-Benzylthio-1H-tetrazol (BTT; Abbildung 28). Nun kann das Tetrazolid-Derivat nucleophil nach S_N2-Mechanismus am Phosphoratom angreifen und Diisopropylamin als gute Abgangsgruppe abspalten.

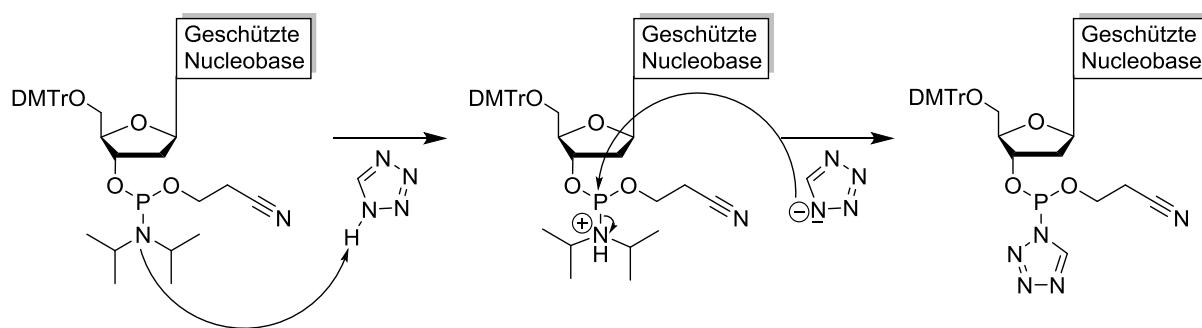


Abbildung 28: Aktivierung eines 5'-DMTr geschützen Nukleosid-3'-Phosphoramidits mit Tetrazol.

Der Kopplungsschritt läuft nicht zu 100% vollständig ab. Daher muss verhindert werden, dass restliche freie OH-Gruppen im nächsten Synthesezyklus weiterreagieren können, was zu unspezifischen und kürzeren Oligonukleotiden führen würde. Dazu wurde ein *capping* der freien OH-Gruppen durchgeführt. Die reaktiven Gruppen wurden Phenoxyessigsäureanhydrid in Acetonitril und Lutidin sowie *N*-Methylimidazol in Acetonitril blockiert. Das nach der Kopplung vorliegende Phosphit muss nun in das gewünschte Phosphat überführt werden. Dies geschieht durch Oxidation des Phosphits mit einer Lösung aus Iod und Lutidin in Acetonitril und Wasser. Dieser Synthesezyklus wurde nun wiederholt, bis die entsprechende der Sequenz erhalten wurde.

Als Maß für die Kopplungseffizienz wurde die Menge des im ersten Schritt des Reaktionszyklus entstandenen Dimethoxytrityl-Kations photometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm (Expedite) bzw. spannungsabhängig (ABI) bestimmt. Unter der Kopplungseffizienz versteht man in der DNA-Synthese die Effizienz, mit der ein neues Phosphoramidit an die wachsende Oligonukleotid-Kette gekoppelt wurde, also die Ausbeute eines Reaktionszyklus.

Die Oligonukleotide wurden auf einem *PerSeptive Biosystems Expedite 8900 Synthesizer* oder einem *ABI 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems)* unter Verwendung der Standard Phosphoramidit Protokolle für die Festphasen DNA Synthese hergestellt. Die modifizierten Phosphoramidite wurden, wie die Standardbasen als 0.1 M Lösung in Acetonitril verwendet. Ausgenommen das dG(N^2)-Addukt, welches aufgrund der schlechten Löslichkeit in Acetonitril in einem 1:1 Gemisch aus Acetonitril und DCM gelöst wurde. Die Kupplungszeiten der modifizierten Phosphoramidite wurden auf 30 Minuten verlängert. Es wurden *ultramild* geschützte Basen verwendet, die sich nach DNA Synthese unter besonders milden basischen Bedingungen entschützen lassen, um ein Abspalten der basenlabilen Acetylgruppe zu verhindern. Die *ultramild* Phosphoramidite sind mit *iPrPac* an der

N^2 -Position von dG, Phenoxyessigsäure (Pac) an der N^6 -Position von dA und einer Acetylschutzgruppe an der N^4 -Position von dC geschützt (**Abbildung 29**).

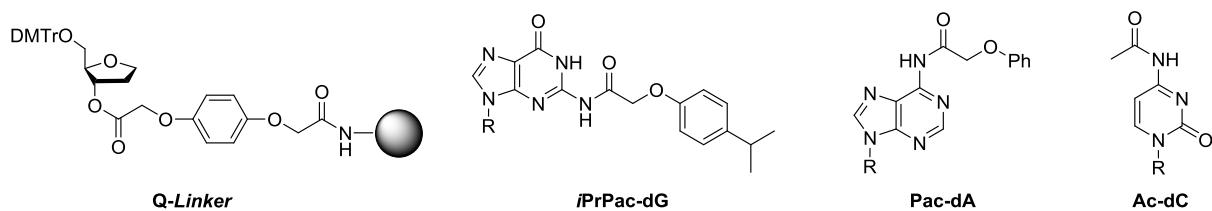


Abbildung 29: Linker und die geschützten Basen, wie sie für die *ultramild* DNA Synthese verwendet werden. Die DNA ist über einer Hydrochinon- O,O' -diacetat-linker (*Q-Linker*) mit der Festphase verknüpft. Die N^2 -Position von Guanin ist mit einer *iso*Propylphenoxyacetylgruppe geschützt, die N^6 -Position von dA mit einer Phenoxyacetyl- und die N^4 -Position von dC mit einer Acetylgruppe.

Auch das *capping* erfolgte unter milderen Bedingungen mit Phenoxyacetalanhydrid in Lutidin und Acetonitril, da sonst eine Umacetylierung an der N^2 -Gruppe während des *cappings* stattfinden kann. Die *iPrPAC*-Schutzgruppe könnte durch eine Acetylgruppe ersetzt werden, die sich unter den gewählten milden Abspaltungsbedingungen nach der DNA-Synthese nicht mehr entfernen lässt. Als Linker zwischen Nukleotid und Festphase diente ein *Q-linker* auf Hydroquinon-Basis (5'-Dimethoxytrityl-*N*-acetyl-2'-desoxycytidin-3'-hydroquinon- O,O' -diacetat), der sich im Gegensatz zu dem Standard Succinat-linker ebenfalls unter den besonders milden Entschützungsbedingungen spalten lässt.

Die Standardbedingung für die Entschützung der Basen und Abspaltung des Oligonukleotids von der Festphase ist die Behandlung mit Ammoniaklösung für mehrere Stunden. Diese Methode kann für die mit AAF-modifizierten Oligonukleotide aufgrund der basenlabilen Acetylgruppe nicht verwendet werden. Daher wurden die Oligonukleotide unter besonders milden Bedingungen mit 10% Diisopropylamin und 0.25 M β -Mercaptoethanol in Methanol bei 55 °C über 20 h von der Festphase abgespalten und entschützt. Das β -Mercaptoethanol dient als Schutz vor Oxidation des AAF-dG Addukts während der langen Inkubationszeit. Da die Acetylgruppe des N^2 -Adduktes deutlich stabiler ist, konnte hier unter den Standardbedingungen (Ammoniumhydroxid in Ethanol (3:1) bei 18 °C über 18 h) entschützt werden.

Beide dG-AAF Addukte konnten erfolgreich eingebaut werden, das C8-Addukt mit etwa 50–60%iger Effizienz und das N^2 -Addukt mit bis zu > 90%iger Effizienz. Eine vollständige Liste der synthetisierten Oligonukleotide befindet sich im Experimentalteil.

Aufreinigung und Charakterisierung der modifizierten Oligonukleotide

Nach Entschützung und Abspaltung von der Festphase wurden die Oligonukleotide im Vakuum gefriergetrocknet und in ddH₂O wieder aufgenommen. Die Oligonukleotide wurden mittels präparativer *reversed phase* HPL-Chromatographie (RP-HPLC) aufgereinigt. Aufgrund der zusätzlich detektierbaren Wellenlänge des aromatischen Rings bei 305 nm konnten die modifizierten Oligonukleotide leicht identifiziert werden. Außerdem verschiebt sich durch den aromatischen Ring die Retentionszeit des Strangs um ca. 5 Minuten, was die Separation erleichtert. Im Anschluss wurden die gereinigten Oligonukleotide über eine C18-Umkehrphasen-Säule für die weitere Verwendung entsalzt.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch die Rohchromatogramme von Oligonukleotiden, die entweder ein dG(C8)-AAF oder ein dG(*N*²)-AAF enthalten, sowie die HPL-Chromatogramme der beiden Stränge nach deren Aufreinigung. Die modifizierten Oligonukleotide konnten mit einer Reinheit von $\geq 99\%$ erhalten werden.

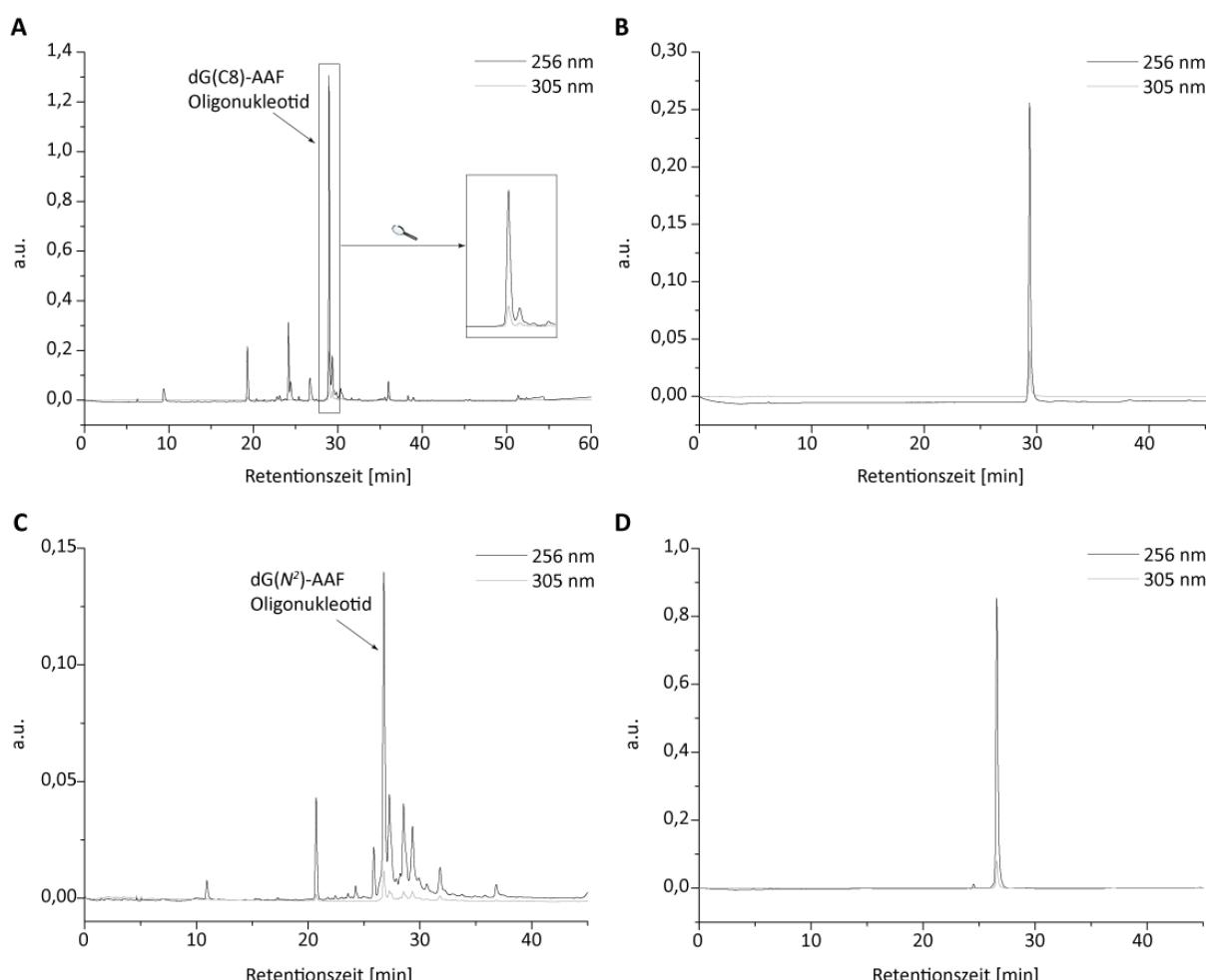


Abbildung 30: HPL-Chromatogramme von synthetisierten AAF-Addukt enthaltenden Oligonukleotide. Bei einer Wellenlänge von 256 nm absorbiert das Oligonukleotid (schwarz), das aromatische System des

Acetylaminofluorens kann durch die zusätzliche Detektion bei einer Wellenlänge von 305 nm (grau) sichtbar gemacht werden. **A)** Rohchromatogramm von ODN1 mit dG(C8)-AAF direkt nach der Entschüttung und Abspaltung von der Festphase. Zusätzlich zum Produktsignal sind einige Abbruchfragmente zu sehen. **B)** Chromatogramm des aufgereinigten dG(C8)-AAF Strangs ODN1. **C)** Rohchromatogramm von ODN18 mit dG(N^2)-AAF. **D)** Chromatogramm des aufgereinigten dG(N^2)-AAF Strangs ODN18.

Die Identifizierung der modifizierten Oligonukleotide erfolgte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Die entsalzten Oligonukleotide wurden dafür in Wasser gelöst und zusammen mit einer Hydroxypicolinsäure/Kronenether-Matrix aufgebracht. **Abbildung 31** zeigt die Massenspektren einiger Oligonukleotide.

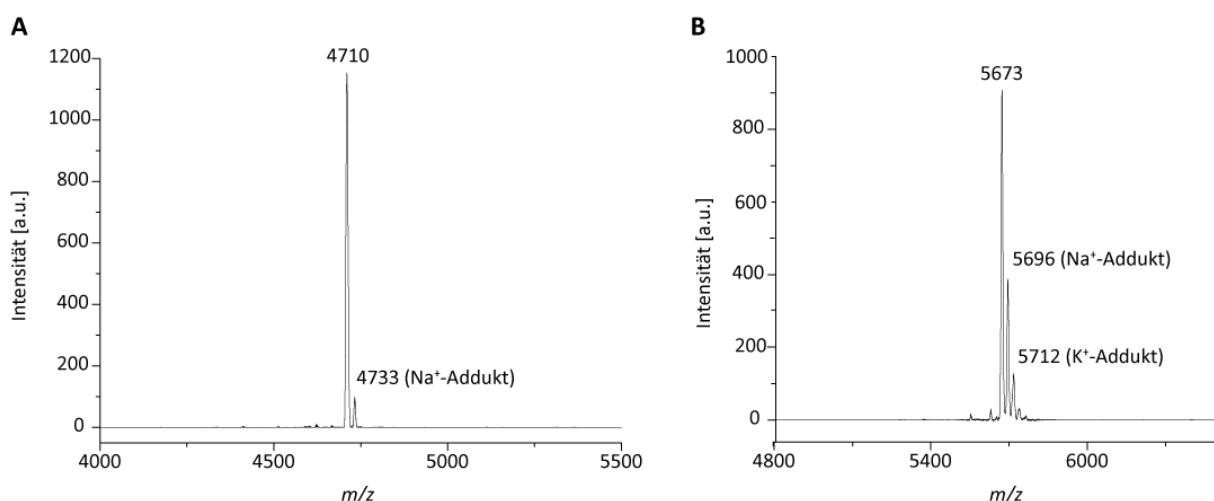


Abbildung 31: MALDI-TOF Massenspektren von aufgereinigten und entsalzten AAF-Addukt enthaltender Oligonukleotide aus **Abbildung 30**. **A)** ODN1 mit dG(C8)-AAF; $m/z_{ber} = 4710$. **B)** ODN18 mit dG(N^2)-AAF; $m/z_{ber} = 5673$.

3.4 Thermodynamische Effekte des dG(C8)-AAFs auf die DNA-Duplexstabilität

Schäden an der DNA können die Stabilität eines DNA-Duplexes positiv oder negativ beeinflussen.^[308-309] Um den Einfluss des dG(C8)-AAF DNA-Schadens auf die Duplexstabilität der Oligonukleotidsequenz (ODN1) zu bestimmen, wurden die thermodynamischen Parameter des Aufschmelzen eines Doppelstrangs mit einem zentralen dG(C8)AAF untersucht, welche im Komplex mit Rad14 kristallisiert wurde. Zum Vergleich wurde die gleiche Sequenz mit einem zentralen ungeschädigten dG verwendet. Der Vergleich von natürlichem dG mit dG(C8)-AAF erlaubt eine Quantifizierung des Effektes des aromatischen Systems auf die thermodynamische Stabilität des untersuchten DNA-

Doppelstrangs. Beide Stränge wurden mit der komplementären Sequenz hybridisiert. Die Schmelzpunkte wurden UV-spektroskopisch für einen Konzentrationsbereich von $0.3 \leq \frac{C_T}{2} \leq 7 \mu\text{M}$ (in 200 μL 10 mM Tris Puffer, pH 7.4, und 150 mM NaCl) gemessen.

Abbildung 32A zeigt die Schmelzkurven der geschädigten bzw. ungeschädigten Duplexe von ODN1 bei einer DNA-Konzentration von 2 μM . Es zeigt sich eine Verringerung der Schmelztemperatur des geschädigten zum ungeschädigten Strang von 12 °C. Die thermodynamischen Parameter ΔG°_{298K} , ΔH° und ΔS° wurden durch lineare Regression (**Abbildung 32B**) bestimmt.^[285, 310-311]

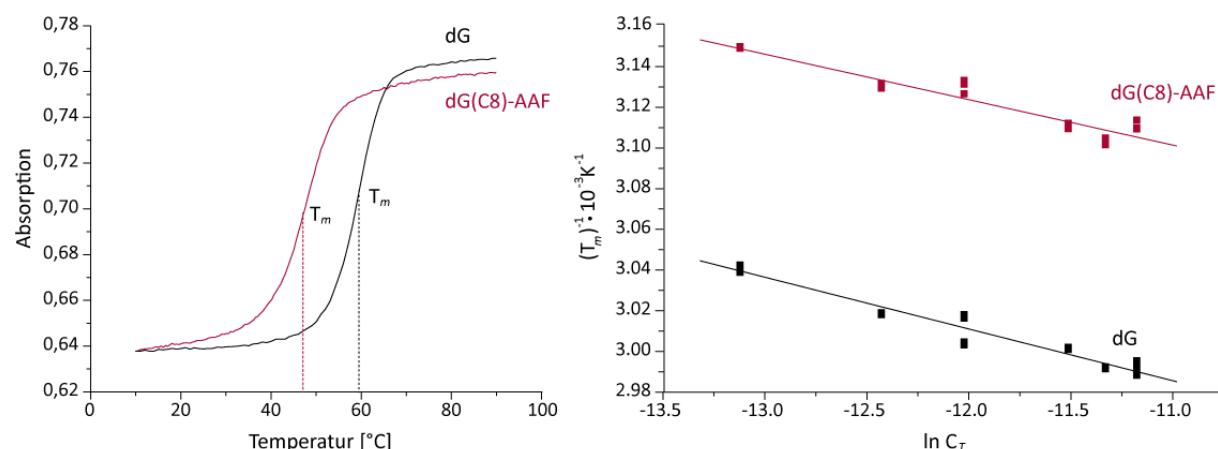


Abbildung 32: A) Schmelzkurven der Duplexe mit der Sequenz 5'-GCT CTA CG*T CAT CAC-3' (ODN1) mit $G^* = dG(C8)$ -AAF (rot) oder $G^* = dG$ (UD; schwarz) und jeweils einem gegenüberliegendem dC bei einer Konzentration von 2 μM . **B)** Van't Hoff-Diagramm der Doppelstränge mit dG(C8)-AAF (rot) oder dG (schwarz).

Die Ergebnisse der Berechnungen der thermodynamischen Parameter sind in **Tabelle 3** aufgeführt. ΔH° und ΔG°_{298K} erhöhen sich jeweils um etwa 3 kcal mol⁻¹ während die Schmelzentropie ΔS° ($\Delta\Delta S^\circ = 0 \text{ cal (mol K)}^{-1}$) sich nicht verändert. Dies zeigt, dass der Schaden vor allem eine thermodynamisch begründbare destabilisierte Region im Duplex hervorruft.

Tabelle 3: Thermodynamische Parameter der Duplexe (ODN1) mit entweder einem zentralen dG oder einem dG(C8)-AAF. Die Schmelztemperatur wurde bei einer Konzentration von 2 μM bestimmt.

Substrat	T_m [°C]	ΔH° [kcal mol ⁻¹]	ΔS° [cal (mol K) ⁻¹]	ΔG°_{298K} [kcal mol ⁻¹]
dG:dC	60	-73 ± 0.5	274	8.7
dG(C8)-AAF:dC	48	-70 ± 0.5	274	11.7

3.5 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Mittels EMSA wurden die Bindungseigenschaften von Rad14 an geschädigte DNA getestet. Dies sollte zum Einen bestätigen, dass Rad14 an die in dieser Arbeit verwendeten DNA Schäden ebenso bindet, wie das humane Homolog XPA. Desweiteren sollte gezeigt werden, dass bei den für die Kristallisation verwendete minimal DNA bindende Domäne von Rad14 (Rad14_{188–302/306}; vgl. **Kapitel 3.6**) die Bindungseigenschaften erhalten bleiben. Als Substrate wurden dG(C8)-AAF, dG(N^2)-AAF sowie Fluoresceinthiocyanat-dU (FITC-dU) geschädigte DNA Duplexe verwendet.¹

3.5.1 EMSA mit radioaktiv markierter DNA

Fluorescein, eine übliche Markierung für EMSA, wird von XPA/Rad14 als Schaden in der NER erkannt und gebunden.^[312] Daher war eine Markierung der DNA mit FITC für die Bindungsstudien mit AAF geschädigter DNA nicht möglich. Stattdessen wurde der jeweilige nicht geschädigte Gegenstrang am 5'-Ende mit ³²P markiert (Firma Hartmann Analytics). Für die Bindungsstudien wurden zu einer konstanten Menge an dsDNA (0.33 nM) steigende Konzentrationen an Protein im Bindungspuffer zugegeben (10 µL Endvolumen) und 30 min bei 30 °C (Rad14) oder 37 °C (XPA) inkubiert. Nach Auf trennung über native Gelektrophorese in 0.25× TBE-Puffer bei 100 V konnte die radioaktiv markierte DNA bzw. die DNA/Proteinkomplexe mittels Autoradiographie (StormTM860, GE) sichtbar gemacht werden. Die Detektion erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 h bei –80 °C. Die Gele in **Abbildung 33A** und **B** zeigen eine Bindung sowohl von XPA als auch von Rad14 an dG(C8)-AAF geschädigte DNA. Auch bei der für die Kristallisation verwendeten verkürzten Rad14 Variante (Rad14_{188–302}) blieben die Bindungseigenschaften erhalten (**Abbildung 33C**).

¹ Alle hier und im Folgenden verwendeten Proteine wurden von S. Koch hergestellt.

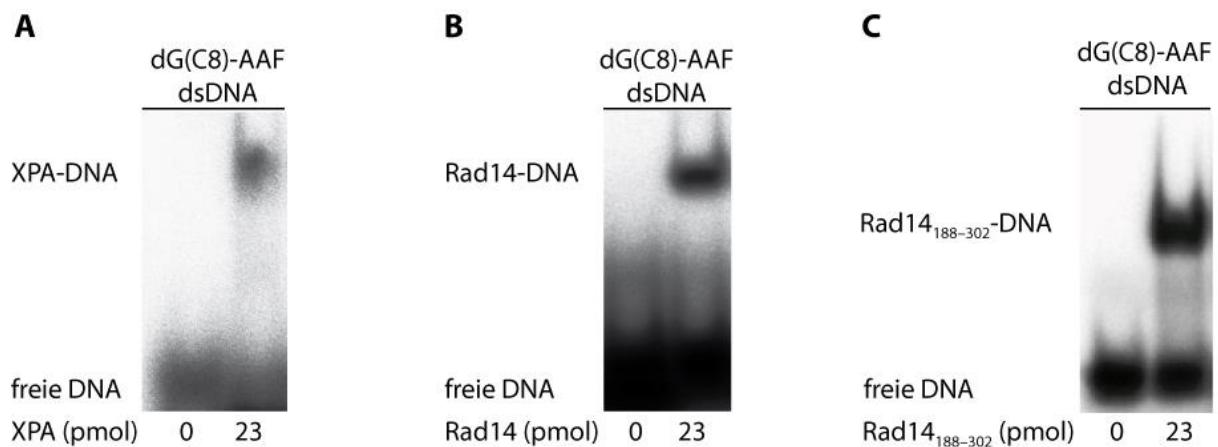


Abbildung 33: EMSA Gele mit dG(C8)-AAF dsDNA (ODN2). **A)** Zeigt die Bindung von humanem XPA an die geschädigte DNA. **B)** Rad14 aus *S. cerevisiae* bindet ebenso wie das humane XPA Protein an dG(C8)-AAF geschädigte DNA. **C)** Die Bindungseigenschaften bleiben auch bei der gekürzten Rad14 Variante (Rad14₁₈₈₋₃₀₂) erhalten.

Bei höherer Proteinkonzentration zeigt sich die Bildung des eines 2:1 Komplexes (**Abbildung 34**). Aus Bindungsstudien mit XPA und dG(C8)-AAF geschädigter DNA ist bereits bekannt, dass XPA bei geringen Konzentrationen des Proteins zunächst als Monomer an die DNA bindet. Wird die Proteinkonzentration erhöht, bindet kooperativ ein zweites XPA Molekül, was die Stabilität des Protein/DNA Komplexes erhöht.^[158]

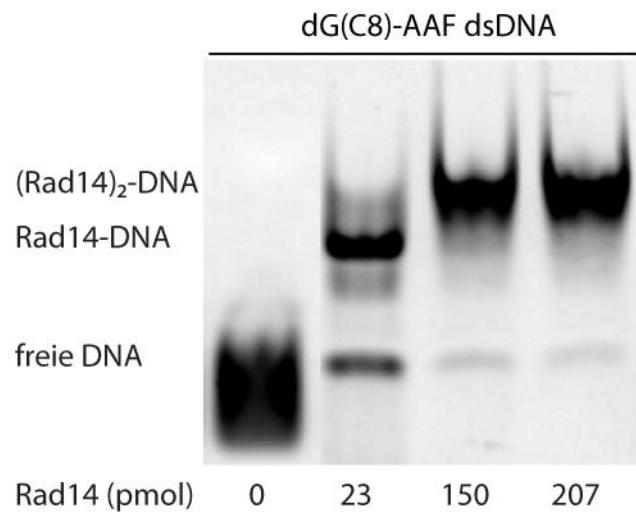


Abbildung 34: EMSA-Gel von dG(C8)-AAF dsDNA mit steigender Konzentration an Rad14. Bei einer geringen Konzentration des Proteins sieht man den 1:1 Komplex aus DNA und Rad14 sowie noch freie DNA (Spur 2). Bei hohen Rad14 Konzentrationen sieht man deutlich die Bildung des 2:1 Komplexes (Spur 3 und 4).

Auch das dG(N^2)-AAF Addukt wird sowohl von dem humanen XPA als auch von Rad14₁₈₈₋₃₀₂ gebunden. Die EMSA Gele von beiden Komplexen sind in **Abbildung 35** gezeigt.

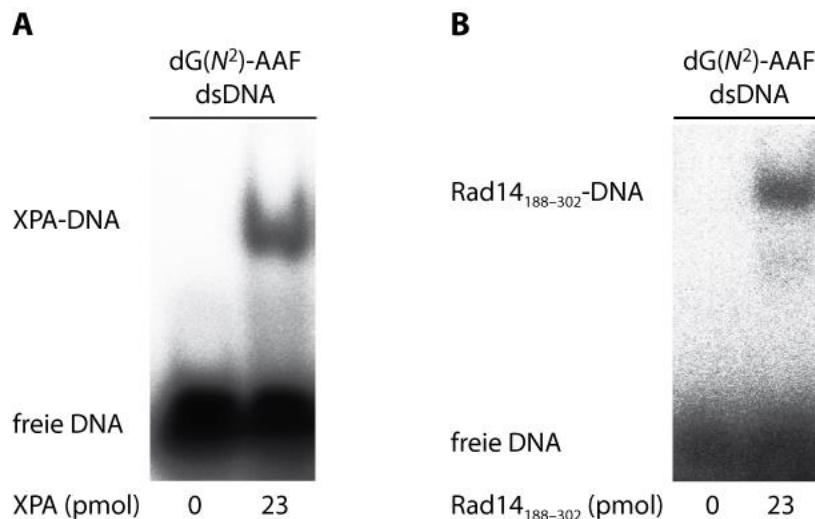


Abbildung 35: EMSA Gele von **A)** XPA und **B)** Rad14₁₈₈₋₃₀₂ mit doppelsträngiger dG(N^2)-AAF DNA (ODN7).

3.5.2 EMSA mit Fluorescein markierter DNA

Wie zuvor schon erwähnt wird Fluorescein von XPA/Rad14 als Schaden in der NER erkannt.^[312] Dies bietet den Vorteil, dass eine Fluoresceineinheit in der DNA gleichzeitig als Schaden und als Fluoreszenzmarker sowohl für die Visualisierung der geschädigten DNA/Proteinkomplexe bei der Gelelektrophorese als auch für Fluoreszenz-polarisationsexperimente verwendet werden kann. Oligonukleotide mit einem internen FITC-dU konnten bei der Firma *Metabion* bestellt werden. Die Bindungsaffinität von Rad14 zu den für weitere Experimente (vgl. **Kapitel 3.7**) verwendeten FITC modifizierten DNA Duplexen wurde mittels EMSA bestätigt.² Zu einer konstanten Menge FITC-dU-dsDNA (2 μ M) wurden steigende Konzentrationen an Protein in Bindungspuffer zugegeben (10 μ L Endvolumen) und 30 min bei 30 °C (Rad14) oder 37 °C (XPA) inkubiert. Auf trennung erfolgte über native Gelelektrophorese in 0.25× TBE-Puffer bei 100 V, die anschließende Detektion an einem *Image Reader LAS 3000* (**Abbildung 36**).

² Die Bindungsstudien mit FITC-DNA wurden von *S. Koch* durchgeführt.

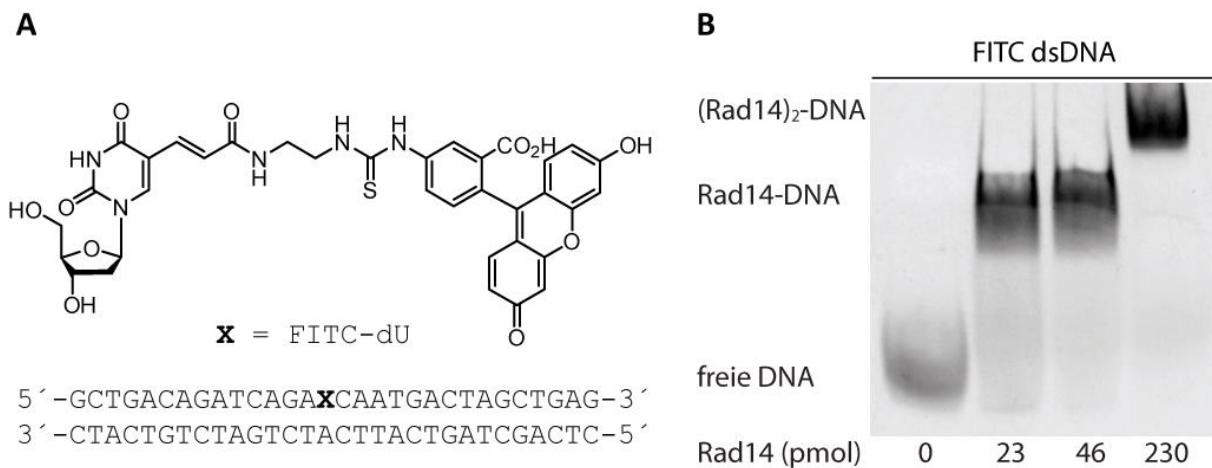


Abbildung 36: EMSA Gel von Rad14_{188–302} mit FITC-markierter dsDNA. **A)** Struktur von FITC und Sequenz des verwendeten Oligonukleotids. **B)** Das Protein bindet zunächst als Monomer (Spur 2 und 3) mit hoher Affinität an FITC modifizierte DNA. Bei höheren Proteinkonzentrationen bindet ein zweites Rad14 Molekül an die DNA (Spur 4).

3.6 Kristallisation der minimal DNA bindenden Domäne von Rad14

Für alle im Folgenden aufgeführten Kristallisationsansätze wurde dsDNA mit der Sequenz 5'-GCT CTA CG*T CAT CAC-3' (ODN1) mit einem zentralen dG(C8)-AAF (= G*) verwendet. Andere Ansätze mit kürzeren oder längeren Sequenzen (ODN3 und 4) sowie mit Überhangstrukturen dieser Sequenzen blieben erfolglos.

3.6.1 Kristallisation von ^{SeMet}Rad14_{188–306} mit dG(C8)-AAF dsDNA

Für die Strukturaufklärung der DNA bindenden Domäne von Rad14 (Aminosäuren 188–306) wurde Selenomethionin markiertes Protein (^{SeMet}Rad14_{188–306}) mit einem dG(C8)-AAF DNA Duplex kristallisiert. Hierfür wurde ^{SeMet}Rad14_{188–306} mit einem C-terminalen Strep-Tag verwendet.^[313] Die Kristalle wurden bei einer Proteinkonzentration von 5.8 mg/mL mit einem molaren Verhältnis von Protein:DNA von 1:1 und unter den folgenden Bedingungen erhalten: 0.1 M Calciumacetat, 0.1 M Tris-HCl pH 7, 22% PEG 8000. Die Platten wurden bei 4 °C angesetzt und gelagert. Nach zwei bis drei Tagen wuchsen die Kristalle als feine Plättchen. **Abbildung 37** zeigt die Co-Kristalle von ^{SeMet}Rad14_{188–306} mit dG(C8)-AAG geschädigter dsDNA.

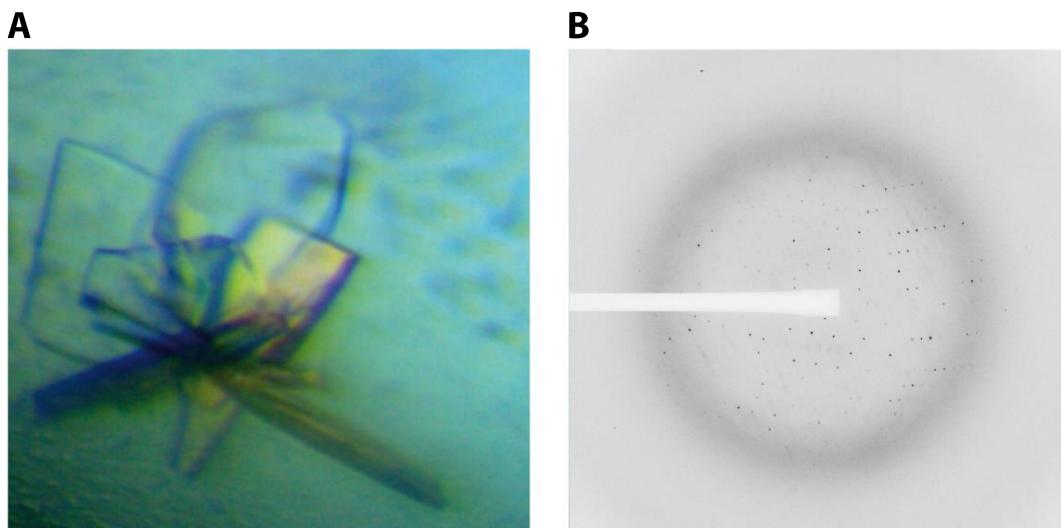


Abbildung 37: **A)** Co-Kristalle von $^{SeMet}Rad14_{188-306}$ im Komplex mit dG(C8)-AAF dsDNA. **B)** Diffraktionsmuster des Co-Kristalls.

Die Kristalle wurden in entsprechender Gefrierschutzlösung aus Mutterlösung mit 15% Ethylenglykol in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie wurden an der PXI Strahlenquelle (Mikrofokus) der *Swiss Light Source* (SLS) in Villigen, Schweiz, vermessen und streuten mit einer Auflösung von bis zu 3.1 Å. Die Kristalle gehörten zur monoklinen Raumgruppe $P2_1$, mit einer Einheitszelle von $a = 66.4$ Å, $b = 51.7$ Å, $c = 68.8$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 109.6^\circ$. Mit Hilfe dieser Kristalle konnte die Struktur von Rad14 aufgeklärt werden. Allerdings waren große Teile der DNA ungeordnet.

3.6.2 Kristallisation von $^{SeMet}Rad14_{188-306}$ mit 5-BrdU/dG(C8)-AAF dsDNA

Um eine bessere Elektronendichte für die DNA zu erhalten und um die Position des Schadens ausmachen zu können, wurden im Gegenstrang zum geschädigten Strang alle drei Thymidine durch 5-Brom-2'-desoxyuridine (5-BrdU) ersetzt. Die asymmetrische Verteilung der schweren Bromatome in der Sequenz sollte die Interpretation der Struktur erleichtern. Die Kristalle konnten unter den folgenden Bedingungen erhalten werden: 0.1 M Calciumacetat, 0.1 M Tris-HCl pH 7, 22% PEG 8000. Das Protein wurde in einer Konzentration von 5.8 mg/mL verwendet mit einem Protein:DNA Verhältnis von 1:1. Die Kristallisationplatten wurden bei 4 °C gelagert, wo die Kristalle nach zwei bis fünf Tagen ebenfalls als feine Plättchen (**Abbildung 38**) gewachsen waren.

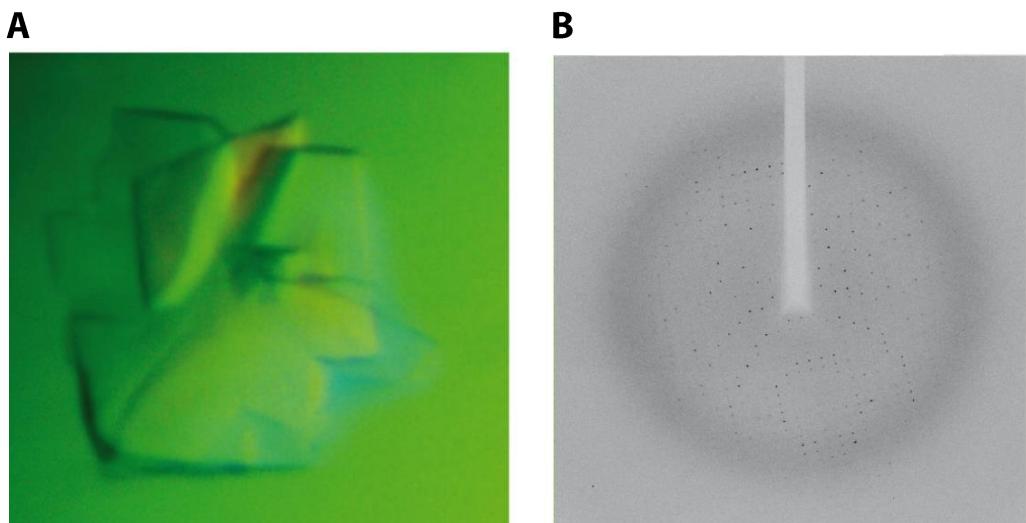


Abbildung 38: **A)** Co-Kristall von $^{SeMet}Rad14_{188-306}$ im Komplex mit 5-BrdU/dG(C8)-AAF dsDNA. **B)** Diffraktionsmuster des Co-Kristalls.

Die Kristalle wurden in Kryolösung mit 15% Ethylenglykol in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der PXIII Strahlenquelle der SLS in Villigen, Schweiz, mit einer Wellenlänge von 1.0 Å gemessen. Die Kristalle beugten die Röntgenstrahlen bis 3.2 Å (**Abbildung 38B**). Die Protein/DNA Co-Kristalle gehörten zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$, mit einer Einheitszelle von $a = 50.1$ Å, $b = 66.2$ Å, $c = 118.1$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Aufgrund der geringen Dicke der Kristalle entstanden an diesen sehr schnell Strahlenschäden. Außerdem wurden die Bromatome durch die starke Strahlung zu schnell von der DNA abgespalten, so dass die Struktur nicht weiter aufgeklärt werden konnte. Daher wurden sowohl die Kristallisationsbedingungen als auch das Proteinkonstrukt von *S. Koch* in Zusammenarbeit mit der Gruppe von *C. Kisker* am Wirchow Institut in Würzburg optimiert.^[313]

3.6.3 Kristallisation von Rad14₁₈₈₋₃₀₂ mit 5-IdU/dG(C8)-AAF dsDNA

Um die starken Strahlungsschäden an den Kristallen beim Messen möglichst gering zu halten, wurden die drei 5-BrdUs durch 5-Iod-2'-desoxyuridne (5-IdU) im Gegenstrang ersetzt. Da Iod deutlich schwerer und größer ist als Brom, liefert es stärkere Signale, wodurch die Messzeit reduziert werden konnte.

Letztendlich lieferte eine um vier Aminosäuren gekürzte Rad14 Variante (Rad14_{188–302}), mit einem His- anstatt eines Strep-Tags, in Kombination mit dem 5-IdU/dG(C8)-AAF Duplex Kristalle, die mit ausreichender Auflösung streuten. Die trigonal bipyramidalen Kristalle (**Abbildung 39**) wuchsen nach fünf bis acht Tagen ebenfalls bei 4 °C unter den folgenden Bedingungen: 0.2 M Ammoniumnitrat, 40% (v/v) MPD. Die Proteinkonzentration betrug 3.0 mg/mL. Das Protein:DNA Verhältnis lag bei 2:1. Die Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der ID29 Strahlenquelle der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESFR) in Grenoble, Frankreich, gemessen. Die Kristalle streuten mit einer Auflösung von 1.8 Å. Die Co-Kristalle gehörten zur tetragonalen Raumgruppe P4₁, mit einer Einheitszelle von $a = 53.72 \text{ \AA}$, $b = 53.72 \text{ \AA}$, $c = 130.55 \text{ \AA}$.

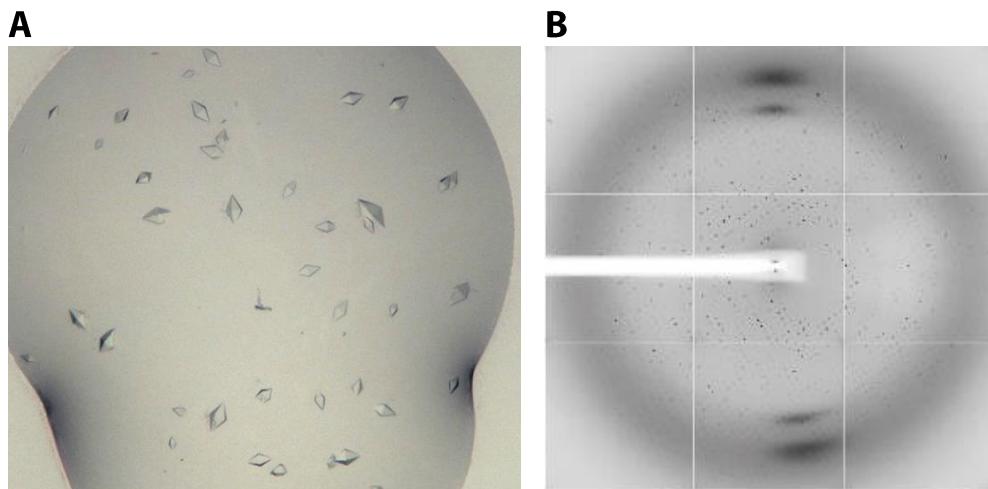


Abbildung 39: **A)** Kristalle von Rad14_{188–302} im Komplex mit 5-IdU/dG(C8)-AAF DNA. **B)** Röntgenbeugung des Co-Kristalls.

3.7 Kristallstrukturanalyse von Rad14_{188–302} im Komplex mit dG(C8)-AAF DNA³

Die Co-Kristallstruktur wurde mit Rad14_{188–302} im Komplex mit einem 15mer DNA Duplex (ODN1) mit einem zentralen dG(C8)-AAF sowie drei asymmetrisch im Gegenstrang verteilten 5-IdUs erhalten. In **Abbildung 40** ist die errechnete Co-Kristallstruktur abgebildet. Die Struktur von Rad14_{188–302} wurde durch *molecular replacement* unter Verwendung der zuvor gelösten Struktur des Selenomethionin markierten Proteins bestimmt.

³ Alle hier und im Folgenden gezeigten Kristallstrukturen wurden von Jochen Kuper und Sabine Schneider gelöst.

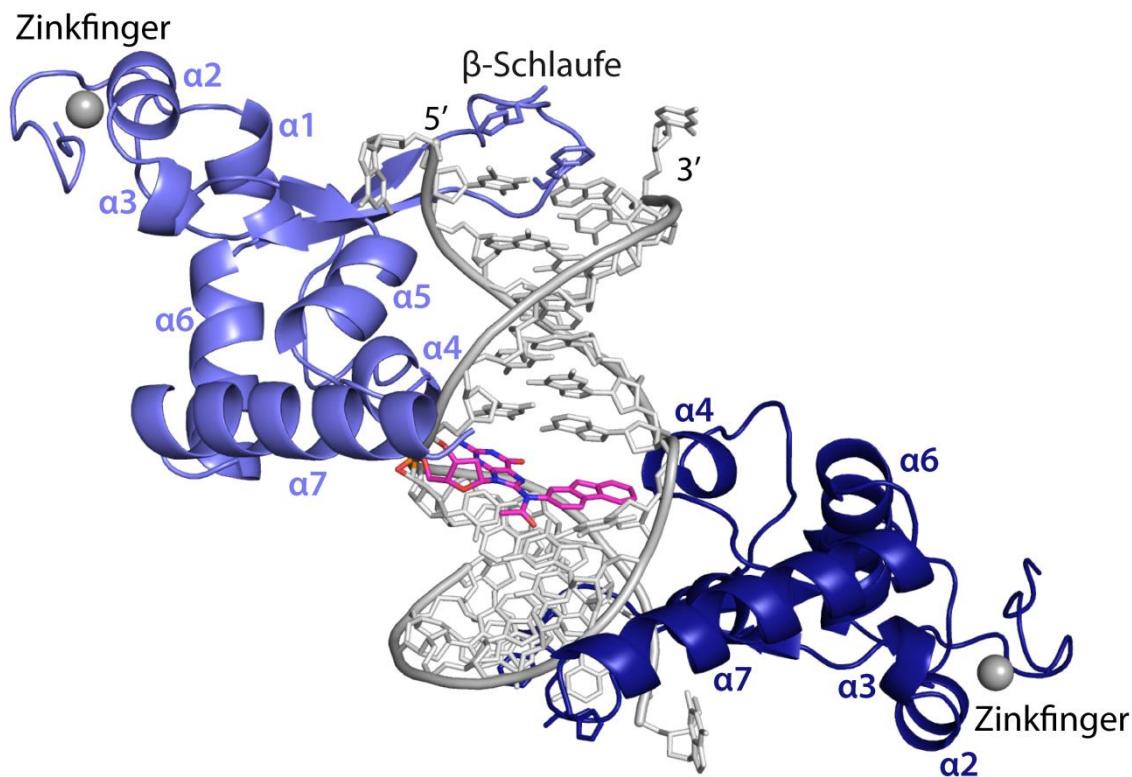


Abbildung 40: Co-Kristallstruktur von Rad1₁₈₈₋₃₀₂ mit einem 15mer DNA-Duplex (ODN1). Der Duplex (grau) enthält ein zentrales dG(C8)-AAF (magenta). Es binden zwei Proteinmoleküle (hell- und dunkelblau) ober- und unterhalb des Schadens an die DNA. Jeweils sechs bp vom Schaden entfernt insertiert jedes Rad14-Molekül, in einem Abstand von 13 Basenpaaren (bp), eine β -Schleife in den Duplex und schmilzt die Enden auf.

Die DNA mit dem dG(C8)-AAF Schaden liegt in der Struktur in zwei möglichen Orientierungen, gedreht um 180°, mit einer pseudo C2-Symmetriearchse vor (**Abbildung 41**).

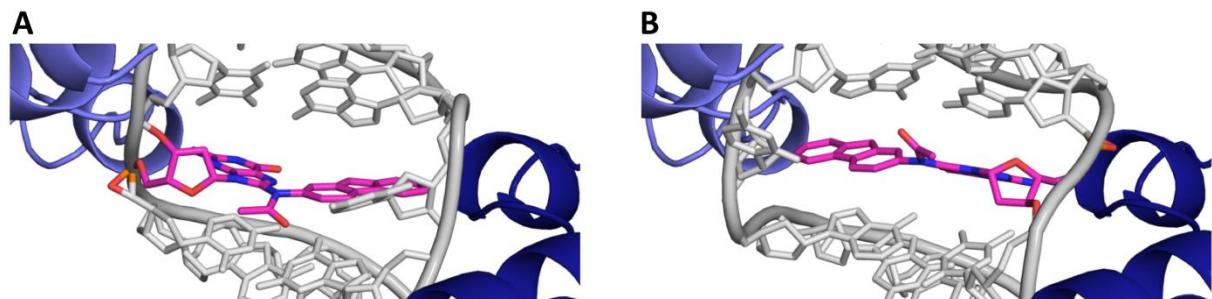


Abbildung 41: Der Duplex liegt in der Struktur in zwei verschiedenen Orientierungen **A**) und **B**) mit einer pseudo C2-Symmetriearchse vor. Aus den Signalen der Iodatome lässt sich ableiten, dass die beiden Orientierungen in einem Verhältnis von etwa 45% zu 55% vorliegen.

Aus der Kristallstruktur erkennt man, dass Rad14, ähnlich wie das humane XPA in der NMR-Struktur, eine α/β -Faltung aufweist (**Abbildung 42**). Dies lässt auf eine starke strukturelle Konservierung schließen, obwohl die Sequenzübereinstimmung nur bei etwa 26.5% liegt.^[314]

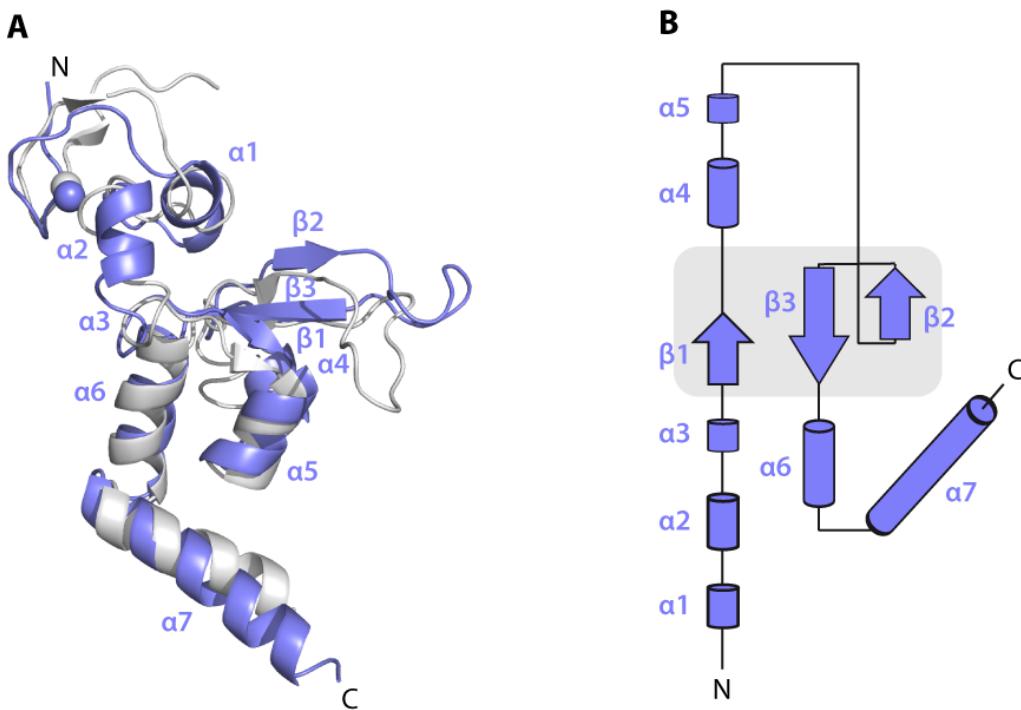


Abbildung 42: A) Überlagerung der erhaltenen Rad14 Kristallstruktur (hellblau) mit der NMR-Struktur der minimal DNA bindenden Domäne von XPA (grau) (PDB-Code: 1XPA).^[238] B) Schematischer Überblick über die Domänen von Rad14₁₈₈₋₃₀₂.

Es binden zwei Rad14 Moleküle an eine DNA, eines ober- und eines unterhalb des Schadens. Diese 2:1 Stöchiometrie wurde auch schon in den EMSA Gelen der Bindungsstudien gezeigt (**Kapitel 3.5.1**). Die beiden Rad14 Proteine liegen 13 Nukleotide auseinander, wobei sich der AAF-Schaden in der Mitte dieser Sequenz befindet. Interessanterweise bestehen keine direkten Interaktionen zwischen den Proteinen und dem Schaden. Der aromatische Rest des Aminofluorens ist in den DNA Duplex gedreht und *stacked* mit den darüber und darunter liegenden Basen. Die Elektronendichte des gegenüberliegenden dC ist ungeordnet. Die jeweils sechs Basenpaare ober- und unterhalb des Schadens sind vollständig gepaart.

Beide Proteine interkalieren mit einer β-Schleife ober- und unterhalb des 13mer Erkennungsmotivs in den Duplex, wodurch die Enden der Doppelhelix entwunden werden. Der Aufschmelzprozess trennt die Basen an den Duplexenden um etwa 18.5 Å (C1'-C1' Abstand zwischen Basenpaar 1 und 15). Die Enden sind in der Struktur teilweise ungeordnet.

Die Interkalation der β-Schleife geschieht offenbar mit den Aminosäuren His258 und Phe262, welche auf das sechste Basenpaar stapeln. Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen des letzten Basenpaares vollständig aufgebrochen, was zu einzelsträngigen Bereichen führt (**Abbildung 43**).

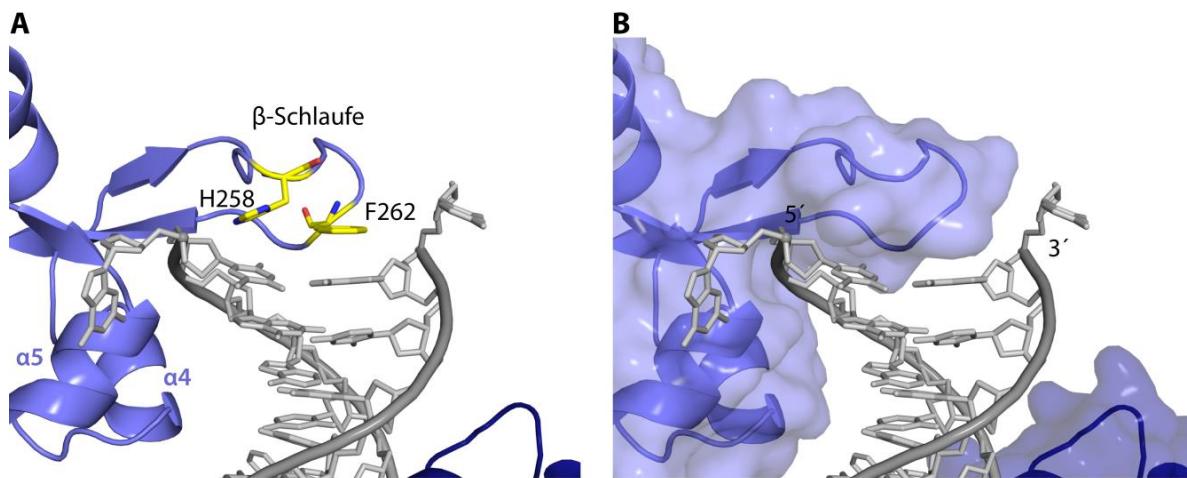


Abbildung 43: A) Die Aminosäuren His258 und Phe262 (gelb) stapeln auf das Basenpaar sechs Basenpaare vom Schaden entfernt und brechen damit die H-Brücken des obersten Basenpaares auseinander. B) Das 5'-Ende des Strangs liegt in der Mulde, die durch die β-Schleife und α4 gebildet wird.

Die Struktur zeigt zudem einen starken Knick der DNA an der Stelle des Schadens von etwa 70° (Abbildung 44). Der Knick wird vermutlich durch π -stacking Wechselwirkungen des in den Duplex gedrehten aromatischen Systems stabilisiert.

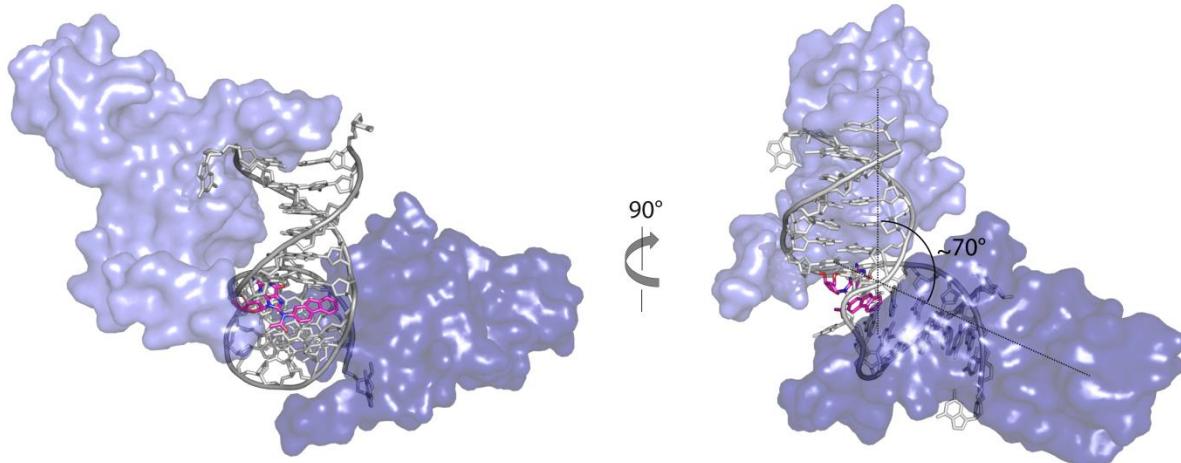


Abbildung 44: Bindung der beiden Proteine (hell- und dunkelblau) knickt die DNA (grau) um ca. 70° . Das aromatische System des Acetylaminofluorens (magenta) ragt in den Duplex und stabilisiert den Knick durch π -stacking Wechselwirkungen.

Die DNA biegt sich in die große Furche der DNA wodurch sich der Phosphodiesterabstand zwischen den beiden Strängen am engsten Punkt der konkaven Seite von 16.8 Å in normaler B-DNA auf 11.7 Å verringert.

Ermöglicht wird dieser Biegungsprozess durch Wechselwirkungen der Proteine mit der DNA mit den Resten der β-Schleife (Asn256, His258, Phe262 und Gln266), der α4 Helix (Lys229

und Thr230), der Schleife zwischen α 4 und α 5 (Thr239) sowie α 7 (Arg293 und Arg294). Den Großteil der Protein-DNA Wechselwirkungen macht die β -Schleife aus. Sie repräsentiert den Ankerpunkt für den Bindungsprozess. Die Interkalation von His258 und Phe262 in den Duplex fixiert die DNA. Die jeweiligen 5'-Enden auf beiden Seiten der DNA liegen in einer Mulde, die durch die β -Schleife, dem Ende der α 4 Helix und der antiparallelen β -Faltblatt Domäne gebildet wird (**Abbildung 42 und 43**).

Weitere Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA werden durch Lys229, Thr230 und Gln266 hergestellt, welche Wasserstoffbrücken zu den Phosphatresten der zweiten und dritten Base des 5'-Endes ausbilden (**Abbildung 45**). Eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen His258 und dem Phosphatrest der ersten 5'-Base führt zu teilweise ungeordneten *stacking* Wechselwirkungen. Asn256 und Gln266 sind an den Wasserstoffbrückenbindungen zur Base 2 und dem Phosphordiester der Base 4 beteiligt.

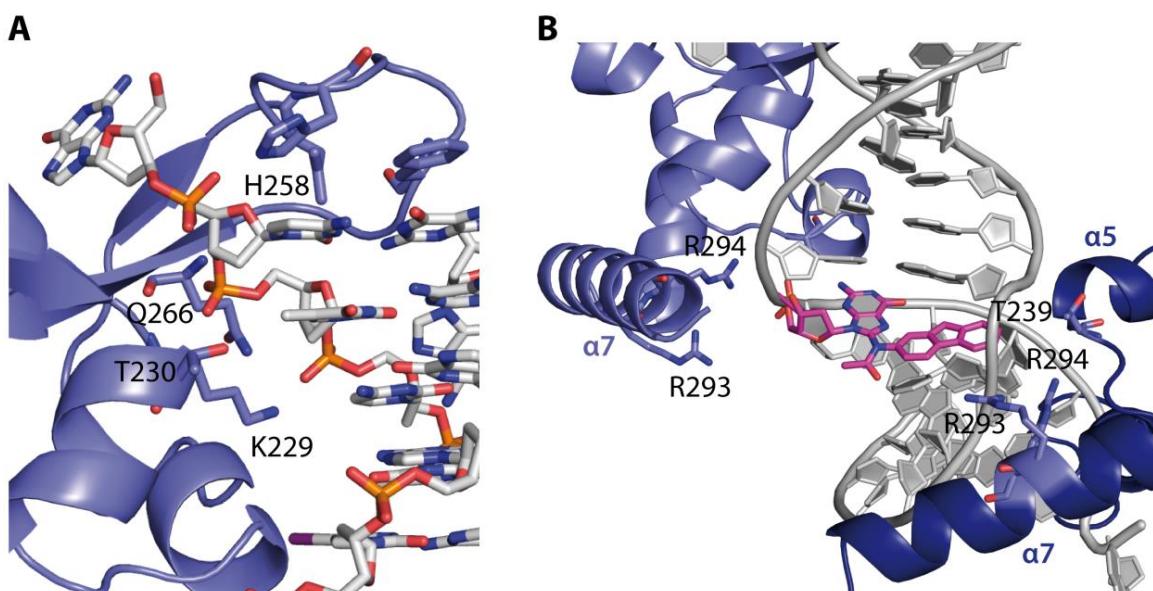


Abbildung 45: A) Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren Lys229, Thr230, Gln266 und His258 und dem Phosphatrückgrat der Basen am 5'-Ende der DNA. B) Die Aminosäuren (Darstellung als *sticks*) Thr239 der α 5 Helix sowie Arg293 und Arg294 der α 7 Helix interagieren mit dem Phosphatrückgrat auf Höhe des Schadens.

Außer den Wechselwirkungen mit His258 und Phe262 finden alle Interaktionen ausschließlich mit den Phosphatresten des DNA Rückgrats statt. Die kombinierten Aktionen der interkalierten Phe262 und His258 Reste und den Argininen der α 7 Helix (Arg293 und Arg294), die durch Wechselwirkungen das Rückgrat nahe des Schadens fest halten, zwingen die DNA sich in die große Furche zu biegen. Die gebogene Konformation der DNA wird durch eine Interaktion von Thr239, das zwischen α 4 und α 5 liegt, gestützt.

Um zu bestätigen, dass die kristallographisch beobachteten Bindungen auch in Lösung vorliegen, wurde ein Protein-Protein-*crosslink* Experiment durchgeführt. Dafür wurden mit Hilfe der Kristallstruktur zwei Lysine (Lys233) in den beiden Rad14 Molekülen identifiziert, die in einem Abstand von ca. 21 Å zueinander liegen. Für das Experiment wurde ein aminreaktiver Bis(NHS)PEG₅ *crosslinker* ausgewählt, dessen reaktive NHS-Gruppen durch den PEG₅-Linker einen Abstand von ca. 21 Å haben.

Rad14₁₈₈₋₃₀₂ wurde mit einem 19mer DNA Duplex (ODN4) mit einem zentralen dG(C8)-AAF Schaden zur Komplexbildung inkubiert. Anschließend wurde der Bis(NHS)PEG₅ *crosslinker* mit steigender Konzentration dazugegeben. Die erhaltenen Komplexe wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und es zeigte sich ein definierter, konzentrationsabhängiger (Rad14)₂-Komplex. Dieser wurde tryptisch und chymotryptisch verdaut und die erhaltenen Fragmente wurden mittels HPLC-MS/MS Analyse untersucht (**Abbildung 46**).

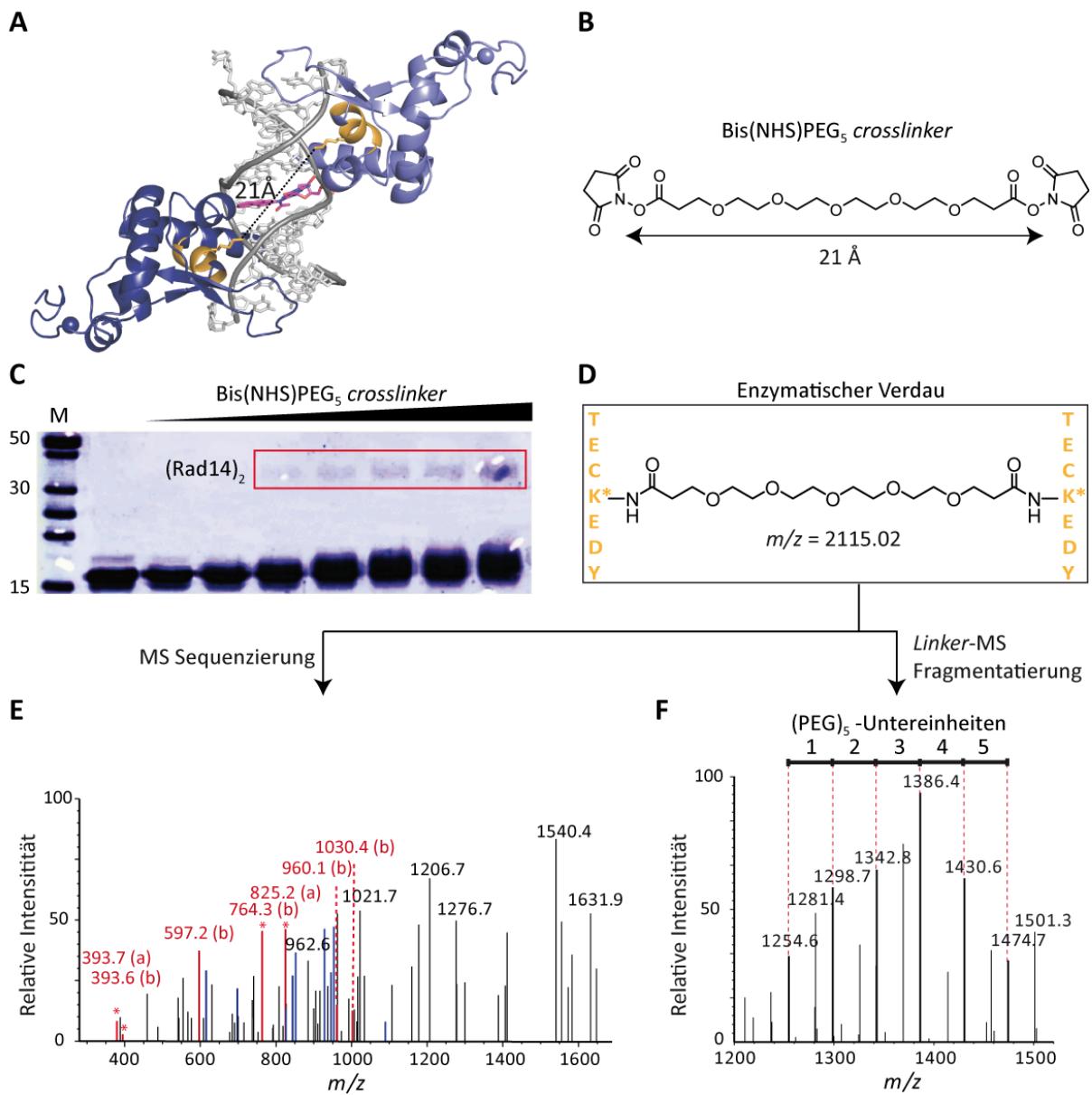


Abbildung 46: **A)** Der Abstand zwischen den beiden Lysinen (Lys233, als sticks dargestellt) in der Aminosäuresequenz TECKEDY (orange) beträgt etwa 21 Å. **B)** Struktur des verwendeten Bis(NHS)PEG₅-crosslinkers. Durch die fünf PEG-Einheiten haben die beiden aminreaktiven NHS-Ester einen Abstand von ca. 21 Å. **C)** SDS-Gel des Protein/DNA Gemisches (ODN4), das mit steigender Menge an Bis(NHS)PEG₅-crosslinkers inkubiert wurde. Die Banden des verknüpften Rad14-Dimers sind in der roten Box hervorgehoben. **D)** Dipeptid mit der Aminosäuresequenz TECKEDY (orange). K* sind die beiden durch den crosslinker verknüpften Lysine. **E)** Das MS/MS-Spektrum (HCD-Zelle) zeigt die Peptid-Sequenz und ermöglicht deren Identifikation (a- und b-Ionen sind in rot, die x- und y-Ionen in blau abgebildet). **F)** Die massenspektrometrische Analyse zeigt die PEG-Fragmente des crosslinkers mit einem Massenunterschied von jeweils $\Delta m = 44$ Da.

Obwohl in jedem der beiden Rad14 Proteine elf Lysine vorhanden sind, wurde nur die Bildung einer einzelnen verknüpften Spezies beobachtet. Das Massenspektrum zeigte ein Elternionensignal mit dem exakten Molekulargewicht von $m = 2115.02$ Da des verknüpften Dipeptids mit der Sequenz TECKEDY. Mittels Fragmentierung konnte das verknüpfte Dipeptid über Datenbanksuche und dem typischen Fragmentierungsmuster des auf

Ethylenglykol (PEG) basierendem *crosslinkers*, mit einer Serie von fünf Fragmentionen mit einem Massenunterschied von jeweils $\Delta m = 44.03$ Da passend zu den fünf PEG Einheiten, identifiziert werden. Die verknüpften Peptidsequenzen wurden mittels MS Sequenzierung bestimmt und als TECKEDY identifiziert. Dies und die Abwesenheit anderer verknüpfter Peptidsequenzen zeigen, dass der kristallographisch beobachtete 2:1 Komplex auch in Lösung vorliegt. Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieses Experiments ist die Tatsache, dass sich ebendieser Komplex, mit derselben Entfernung der beiden Proteine auch mit einem längeren DNA Duplex bildet. Das heißt, die Größe des Erkennungsmotivs von 13 Basenpaaren ist unabhängig von der Länge der DNA. Dies stützt die Beobachtung, dass die β -Schleife mit Phe262 und His258 in den Duplex interkaliert und damit einzelsträngige Stellen in definierten Abständen von sechs Basenpaaren zum Schaden kreiert.

Um die Bedeutung dieser Interkalation zu untersuchen, wurde eine Mutante hergestellt, in der Phe262, welches Bestandteil der interkalierenden β -Schleife ist, durch Alanin ersetzt ist (Rad14_{F262A}).^[313] Mittels Fluoreszenzdepolarisationsstudien wurden die Bindungseigenschaften von Rad14_{WT} und Rad14_{F262A} zu einem Fluorescein enthaltendem DNA Duplex verglichen.⁴ Die Ergebnisse in **Abbildung 47** zeigen den vollständigen Bindungsverlust von Rad14_{F262A} zur geschädigten DNA.

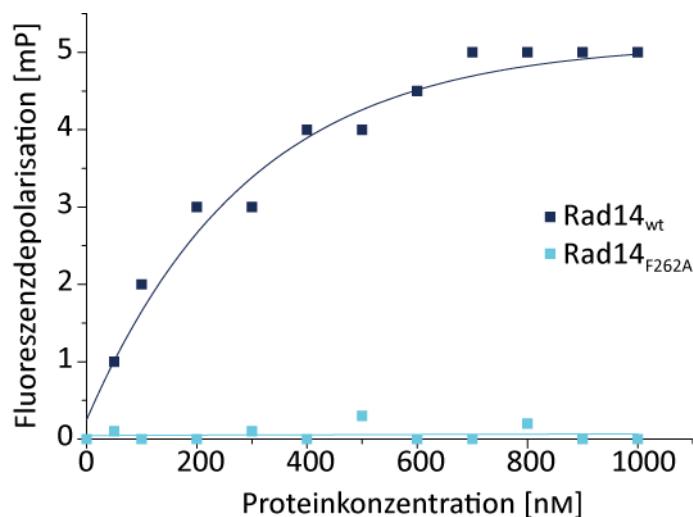


Abbildung 47: Fluoreszenzdepolarisationsmessung mit FITC geschädigter DNA und Rad14_{WT} bzw. Rad14_{F262A}. Die zunehmende Polarisation bei ansteigender Konzentration von Rad14_{WT} (dunkelblau) zeigt eine deutliche Bindung des Proteins an die DNA (Die Bindung des Proteins an diesen Duplex wurde schon in **Kapitel 3.5.2** mittels EMSA gezeigt). Rad14_{F262A} (hellblau) bindet dagegen nicht an die DNA.

⁴ Durchgeführt von S. Koch

Dies zeigt, dass die Interkalation der β -Schleife essentiell für die Bindung des Proteins an die DNA ist.

3.8 Diskussion

3.8.1 Schadenserkennung von dG(C8)-AAF durch Rad14

Durch die NER werden erfolgreich verschiedenste strukturell unterschiedliche Schäden erkannt und entfernt. Inzwischen ist ein Großteil des Reparaturprozesses bekannt. Der Schadenserkennungsmechanismus aber und die daran beteiligten Proteine, insbesondere die Rolle von XPA, sind bis heute nicht ganz aufgeklärt. In den 90er Jahren wurde XPA für die Schadenserkennung verantwortlich gemacht, da es eine Affinität für geschädigte DNA aufweist.^[55, 148] Doch in den letzten Jahren deuteten immer mehr Untersuchungsergebnisse auf XPC und XPE (UV-DDB) als Schadenserkenner hin.^[144, 168] Die Experimente von *Zeeland et al.* zeigten, dass XPC als erstes Protein, vor XPA, an UV geschädigter DNA ankommt und somit vermutlich für deren Detektion verantwortlich ist.^[85, 168] Weitere Hinweise lieferten Kristallstrukturen der beiden Proteine mit UV geschädigter DNA.^[175, 188] Während UV-DDB mit dem geschädigten Dinukleotid Wechselwirkungen eingeht und somit sehr auf bestimmte Strukturen limitiert ist, erkennt XPC vor allem ungepaarte Nukleobasen und destabilisierte Bereiche im Duplex, geht aber keine direkte Interaktion mit dem Schaden ein.

Ein ähnliches Verhalten zeigt sich bei der Struktur des XPA Homologs Rad14 mit AAF geschädigter DNA in dieser Arbeit. Die beiden Rad14 Moleküle bilden hauptsächlich Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat der DNA aus und gehen keinerlei Bindung mit dem Schaden selber ein. Aber im Gegensatz zu XPC testet das Protein offenbar die durch destabilisierte Bereiche entstehende Biegung der DNA. Für die Biegung binden zwei Rad14 Proteine an die DNA und fügen beide exakt sechs Basenpaare vom Schaden entfernt eine β -Schleife in den Duplex, wodurch ein 13mer Erkennungsmotiv entsteht. Zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Rückgrat am 5'-Ende des Duplex festigen die Interkalation der β -Schleife, vergleichbar mit Fingern einer Hand, die den Duplex umgreift. **Abbildung 48** zeigt schematisch alle wichtigen Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen und der DNA. Eine Interaktion der α 7 Helix mit dem Rückgrat und Wechselwirkungen von Arg294

und Thr239 (zwischen $\alpha 4$ und $\alpha 5$) mit dem DNA Rückgrat nahe des Schadens fixieren die DNA, während die „Finger“ den Duplex in die gebogene Konformation drücken.

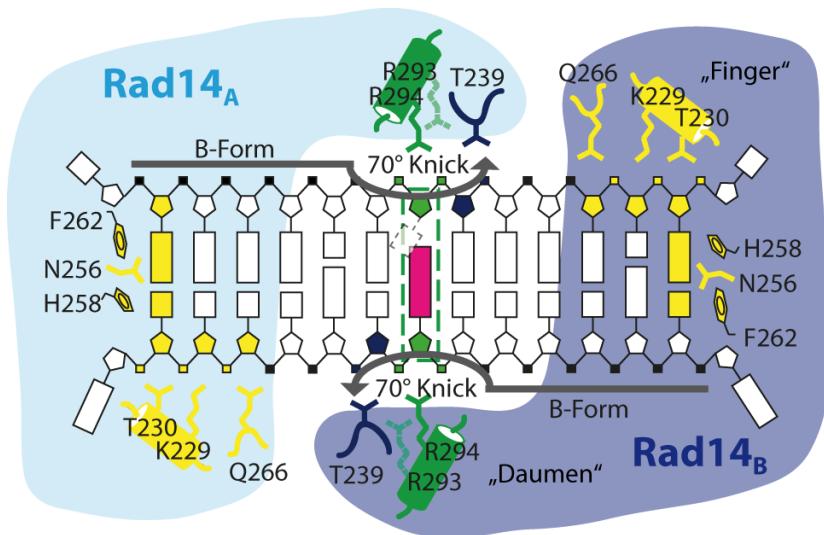


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen den beiden Rad14 Proteinen (A in hellblau und B in dunkelblau) und dem 15mer Duplex mit zentralem dG(C8)-AAF (pink). Die β -Schleife sowie die Aminosäuren Gln266, Lys229 und Thr230 (gelb) bilden zusammen die „Fingerdomäne“. Der „Daumen“ wird von der $\alpha 7$ Helix mit Arg294 (grün) gebildet. Arg293 (grün) wechselwirkt mit dem Phosphatrückgrat beider Einzelstränge auf Höhe des Schadens. Das gestrichelte graue Rechteck stellt das dC gegenüber des dG(C8)-AAFs. Für die Base fehlt die Elektronendichte, vermutlich, weil das dC flexibel ist.

Der Duplex wird in einem Winkel von ca. 70° gebogen und das dG(C8)-AAF interkaliert vollständig in den Duplex und stabilisiert offenbar diese Struktur durch π -stacking Wechselwirkungen. Von *bulky* DNA Addukten an einzelnen Basen, wie dem dG(C8)-AAF ist nicht bekannt in welchem Ausmaß sie den Duplex biegen. Aber man kann davon ausgehen, dass deren Auswirkungen relativ gering sind. Für dG(C8)-AAF und dG(C8)-AF nimmt man an, dass sie in zwei unterschiedlichen Konformationen in der DNA vorkommen. Entweder mit der dG-Base oder der Fluoreneinheit im Duplex.^[174, 315] Die gemessenen Schmelzpunkte der dG(C8)-AAF Duplexe in **Kapitel 3.4** zeigten eine starke Verringerung der Schmelztemperatur von $\Delta T_m = 12^\circ\text{C}$ ($\Delta \Delta H^\circ = 3 \text{ kcal/mol}$) gegenüber dem ungeschädigten Referenzstrang. Der Schaden hatte allerdings keine Auswirkungen auf ΔS ($\Delta \Delta S^\circ = 0 \text{ cal/molK}$). Daraus lässt sich schließen, dass der Schaden eine thermodynamisch destabilisierte Region im Duplex hervorruft, was am besten mit einer Konformation erklärt wird, in der die AAF-Einheit in den Duplex ragt. Dies ist möglich, wenn das dG(C8)-AAF eine *syn*-Konformation bezüglich der glykosidischen Bindung einnimmt. Diese ermöglicht es der dG Base aus der großen Furche herauszuragen. In der Struktur mit dem dG(C8)-AAF kann ein Bindungsprozess beobachtet werden, der zu einer vollständigen Interkalation des AAFs und der Base in den Duplex führt. Das AAF nimmt den Platz des gegenüberliegenden

dCs ein, welches aus der DNA herausgedreht wird (Elektrondichte für diese Base fehlt). Es ist sehr wahrscheinlich die komplette Interkalation der dG(C8)-AAF Einheit, die sich wie ein volles Basenpaar verhält, was den Knick nach der Bindung von Rad14 stabilisiert. Diese Konformation des dG(C8)-AAFs, vollständig im Duplex liegend, wurde zuvor noch nie beobachtet. Dies lässt vermuten, dass Rad14 die DNA aktiv testet und sich der Schaden durch die Bindung der beiden Proteine entsprechend anordnet, um die Biegung der DNA zu stabilisieren. Vergleicht man diese Konformation der geschädigten Base mit der aus der ersten erhaltenen Co-Kristallstruktur ($^{35}\text{SeMet}$ Rad14₁₈₈₋₃₀₆/dG(C8)-AAF DNA), erkennt man, dass in dieser das AAF im Duplex liegt, während die Base außerhalb der DNA liegt (**Abbildung 49**).⁵ Eine NMR-Struktur eines dG(C8)-AF enthaltendem DNA Doppelstrangs zeigt eine ähnliche Anordnung des Schadens.^[316] Auch ist die DNA hier nicht so stark geknickt, wie in der zweiten Struktur. Möglicherweise zeigt die erste Struktur eine Vorstufe der vollständigen Bindung von Rad14, bevor der Knick durch die Interkalation stabilisiert wird.

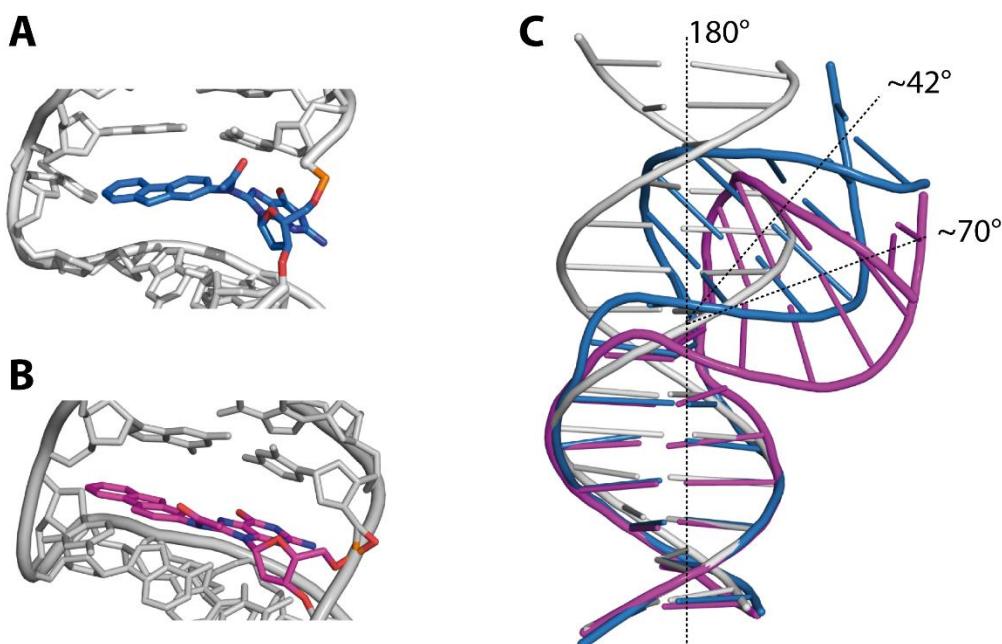


Abbildung 49: A) Konformation des dG(C8)-AAFs (blau) der $^{35}\text{SeMet}$ Rad14₁₈₈₋₃₀₆/dG(C8)-AAF DNA Struktur. Das Fluoren interkaliert in den Duplex, während die Base außerhalb des Duplexes liegt. B) Konformation des dG(C8)-AAFs (magenta) in der zweiten Struktur. Das dG(C8)-AAF interkaliert komplett in den Duplex. C) Überlagerung von ungeschädigter B-DNA (grau) mit den Duplexen aus den erhaltenen Kristallstrukturen von $^{35}\text{SeMet}$ Rad14₁₈₈₋₃₀₆/dG(C8)-AAF DNA (blau) und Rad14₁₈₈₋₃₀₂/5-IdU-dG(C8)-AAF DNA (magenta).

Die relativ wenigen Wechselwirkungen, die zu der geknickten DNA Struktur führen, lassen vermuten, dass Rad14 vor allem an schon geknickte DNA Strukturen bindet oder an

⁵ Mit Hilfe der gelösten Struktur von Rad14₁₈₈₋₃₀₂/5-IdU-dG(C8)-AAF DNA konnten rückwirkend auch die anderen beiden Strukturen ($^{35}\text{SeMet}$ Rad14₁₈₈₋₃₀₆/dG(C8)-AAF DNA und $^{35}\text{SeMet}$ Rad14₁₈₈₋₃₀₆/5-BrdU-dG(C8)-AAF DNA) besser interpretiert werden.

Strukturen, die leicht verformt werden können. Dies ist im Einklang mit den bekannten biochemischen Daten, die zeigen, dass XPA effizient an DNA-Blasen und Dreiweggabelungen bindet.

Frühere Bindungsstudien mit DNA, die entweder durch einen starren 1,2-d(GpG) Cisplatschaden stark geknickt war oder die einen flexiblen dinuklearen Cisplatin *crosslink* enthielt, der den Duplex zwar deutlich destabilisiert aber keinen Knick verursacht bzw. stabilisiert, zeigten, dass XPA nur für ersteren eine Affinität aufweist.^[159] Daher wurde angenommen, dass XPA auf einen vorhandenen Knick in der DNA angewiesen ist, um diese zu binden. Allerdings konnten *Janicijevic et al.* mittels SFM (*scanning force microscopy*) zeigen, dass die Bindung von CFP-XPA (CFP: *cyan fluorescent protein*) an mit Cholesterol geschädigte DNA diese in einem Winkel von $42\pm26^\circ$ biegt.^[317] Inwiefern eine Stabilisierung des Knicks durch den Schaden notwendig ist bedarf weiterer Untersuchungen. Denn Cholesterol hat kein so ausgeprägtes π -System wie das Aminofluoren, welches mit den Basen *stacken* könnte. Auch warum FITC so effizient als Schaden erkannt wird, ist auf dieser Grundlage überraschend. Denn aufgrund der relativ langen Verbindung zwischen Base und dem aromatischen System ist dieses sehr flexibel, was es unwahrscheinlich erscheinen lässt, dass es in den Duplex hineingedrückt wird und somit einen Knick durch π -stacking stabilisiert.

Andererseits erklärt dieses Modell gut, warum CPD Schäden schlechte Substrate sind und von Rad14 bzw. XPA nicht erkannt werden. CPDs beeinflussen die Duplexstruktur und deren Stabilität kaum. Außerdem lassen sich diese Schäden schwer in eine stark geknickte Struktur einfügen. Die steife Verknüpfung der CPDs ist in der großen Furche der DNA lokalisiert und verhindert damit eine Biegung in Richtung des Vierrings in diese Furche. Die Struktur des (6-4)PP Schadens zeigt, dass dieser ebenfalls bedingt durch seine chemische Verknüpfung eine Biegung in Richtung großer Furche verhindert.

DNA mit 1,2-d(GpG) Cisplatin Schäden ist durch die Platinverknüpfung dagegen schon stark in Richtung der großen Furche geknickt und ist damit schon in der richtigen Konformation für die Erkennung durch Rad14/XPA. Dies konnte in einer weiteren Co-Kristallstruktur von Rad14₁₈₈₋₃₀₂ zusammen mit einem 16mer Duplex mit einem 1,2-d(GpG) Cisplatin *crosslink* gezeigt werden.^[313]

Die wenigen Wechselwirkungen, die fast ausschließlich mit dem Phosphatrückgrat der DNA stattfinden, gewähren vermutlich eine gewisse Sequenzunabhängigkeit der Schadenserkennung. Die Reste, die als kritisch für die Schadenserkennung von Rad14 identifiziert wurden, sind streng in XPA konserviert. Mit Ausnahme von Thr239, welches in XPA durch ein Lysin ersetzt ist. Doch obwohl die Seitenkette des Lysins etwas länger ist als die eines Threonins, könnte es immer noch die gleiche Funktion wie dieses haben

Die beiden Rad14 Strukturen bieten so einen Einblick in einen neuen Mechanismus, der es Rad14/XPA erlaubt DNA Schäden zu erkennen. Dies geschieht offenbar nur durch testen der Biegung, ohne direkte Wechselwirkung mit dem Schaden. Dies ermöglicht das breite Schadensspektrum, das durch die NER erkannt und repariert werden kann. Rad14/XPA ist notwendig für die effiziente Erkennung von bestimmten NER aktivierenden Schäden. NER Substrate, wie UV-Schäden, welche eine solche Struktur nicht stabilisieren, benötigen andere XP Proteine, wie XPC und XPE für ihre Detektion. Sowohl die Eigenschaft von Rad14 den Duplex außerhalb des 13mer Erkennungsmotivs aufzubrechen und somit einzelsträngige Bereiche zu schaffen, als auch die geknickte DNA Struktur, sind möglicherweise nötig um weitere NER Faktoren zu rekrutieren und/oder zu aktivieren. Auch die Bindung von XPC und UV-DDB führt zu einer Biegung der DNA von 39–49° bzw. 54–57°.^[143, 317] Hier wird die gebogene Struktur der DNA als Signal für die Rekrutierung des TFIIH-Komplexes vermutet. Es wäre auch denkbar, dass XPA alleine oder im Komplex mit anderen Proteinen an DNA bindet, die schon durch andere Faktoren geknickt ist. Somit könnte eine Rolle von XPA in der Schadensverifizierung spielen, was die Notwendigkeit von XPA im *global genome* und transkriptionsgekoppelten Reparaturweg erklären würde.^[144]

3.8.2 In vivo Studien zur Reparatur von AAF-Schäden

Wie wichtig XPA für die Reparatur von AAF-Schäden ist, wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von A. Khobta in Mainz gezeigt. Dort wurde die Reparatur von dG(C8)-AAF bzw. dG(N^2)-AAF in Zellen mit verschiedenen NER-Defekten untersucht.

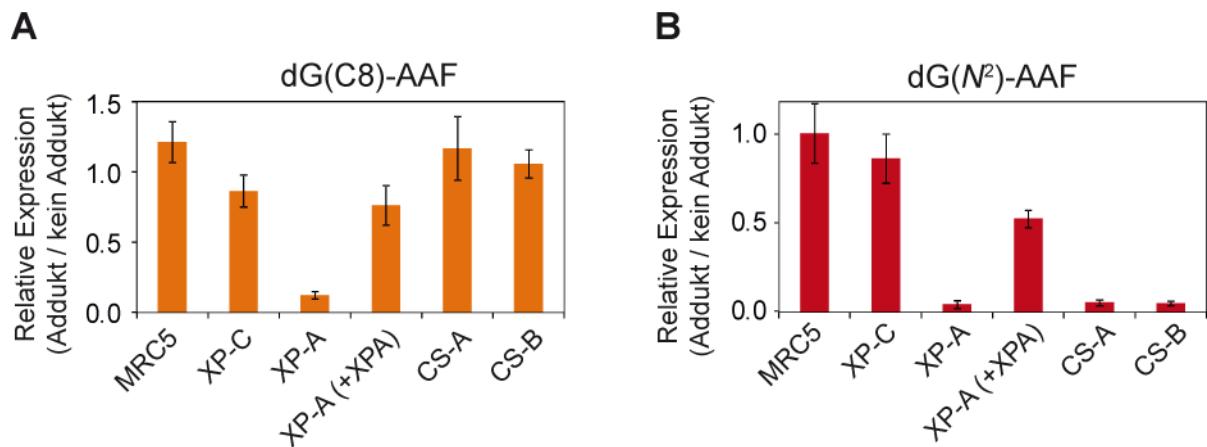


Abbildung 52: Expressionslevel von EGFP in gesunden und NER defekten Zellen bei eingebautem **A)** dG(C8)-AAF und **B)** dG(N^2)-AAF im Verhältnis zu ungeschädigter DNA.

Die in der Gruppe von *A. Khobta* erhaltenen Ergebnisse zeigen einen deutlichen Transkriptionsblock in XP-A Zellen, sowohl durch das C8- als auch durch das N^2 -Addukt.^[318] Dies zeigt, dass XPA für die Reparatur beider Schäden zwingend notwendig ist. XPC ist dagegen für die Reparatur nicht relevant, was bedeutet, dass der Schaden auch in XPC Zellen erkannt und repariert wird. Dies zeigt, dass die Schadensdetektion auch ohne XPC möglich ist, was für die Existenz anderer Erkennungsfaktoren, wie XPA, spricht.

3.9 Carbozyklische FaPy-dG Nukleotide als bioisostere Analoga

Unexpected non-Hoogsteen-based mutagenicity mechanism of FaPy-DNA lesions.

T. H. Gehrke[#], U. Lischke[#], K. L. Gasteiger[#], S. Schneider[#], S. Arnold, H. C. Müller, D. S. Stephenson, H. Zipse, T. Carell, *Nat. Chem. Bio.* **2013**, 9, 455–461 ([#] Beitrag zu gleichen Teilen).

3.9.1 Zusammenfassung der Publikation

8-Oxopurine (8-OxodG/8-OxodA) und Formamidopyrimidine (FaPydG/FaPydA) gehören zu den häufigsten oxidativen DNA Schäden und sind mitverantwortlich für die Entstehung von Krebs und das Altern. Es wird vermutet, dass ihre Mutagenität aus einem Konfigurationswechsel der N9–C1'-glykosidischen Bindung von *anti* zu *syn* resultiert. Dieser erlaubt es den Schäden während der Replikation nicht-kanonische Hoogsteen Basenpaare mit den ankommenden Triphosphaten auszubilden. Hier zeigen wir biochemische Daten und die erste Kristallstruktur von DNA mit carbozyklischem FaPydA und FaPydG im Komplex mit einer high-fidelity Polymerase. Kristallographische Schnapschüsse zeigen, dass die cFaPy-Schäden die *anti*-Geometrie der glykosidischen Bindung sowohl während der fehlerfreien als auch während der fehlerhaften Replikation beibehalten. Die beobachteten dG•dC → dT•dA Transversionsmutation resultieren aus der Verschiebung der Basen und Tautomerisierung.

3.9.2 Beitragserklärung

Es wurde das carbozyklische 2'-Desoxyguanosin nach dem von *Dr. Heiko Müller* entwickelten Weg synthetisiert. Dieses wurde mit Unterstützung von *Dr. Stephenson* mittels quantitativer 2D NMR-Spektroskopie mit dem natürlichen 2'-Desoxyguanosin verglichen.

Unexpected non-Hoogsteen-based mutagenicity mechanism of FaPy-DNA lesions

Tim H Gehrke^{1,3}, Ulrike Lischke^{1,3}, Karola L Gasteiger^{1,3}, Sabine Schneider¹⁻³, Simone Arnold¹, Heiko C Müller¹, David S Stephenson¹, Hendrik Zipse¹ & Thomas Carell^{1*}

8-Oxopurines (8-oxodG and 8-oxodA) and formamidopyrimidines (FaPydG and FaPydA) are major oxidative DNA lesions involved in cancer development and aging. Their mutagenicity is believed to result from a conformational shift of the N9-C1' glycosidic bonds from *anti* to *syn*, which allows the lesions to form noncanonical Hoogsteen-type base pairs with incoming triphosphates during DNA replication. Here we present biochemical data and what are to our knowledge the first crystal structures of carbocyclic FaPydA and FaPydG containing DNA in complex with a high-fidelity polymerase. Crystallographic snapshots show that the cFaPy lesions keep the *anti* geometry of the glycosidic bond during error-free and error-prone replication. The observed dG-dC→dT-dA transversion mutations are the result of base shifting and tautomerization.

Oxidative DNA damage is a very frequent mutagenic event inside a cell responsible for spontaneous cancer development, inflammation and aging¹. The bases for lesion formation are processes associated with aerobic respiration. These give rise to the formation of reactive oxygen species such as O₂[·], H₂O₂ and OH, which attack the genetic material². The purine nucleosides dG and dA are particularly vulnerable toward oxidative degradation owing to their comparably low oxidation potential³⁻⁵. Two major lesion types are formed (Supplementary Results, Supplementary Fig. 1). The two 8-oxo-type lesions 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine (8-oxodA) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) feature an oxidized C8 atom. In addition, the N7 atom carries a hydrogen atom, which changes this position from being hydrogen bond accepting to hydrogen bond donating. The second class of oxidative lesions are the ring-opened 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine lesions FaPydA and FaPydG, which have a formamide group that has the potential to form a variety of different hydrogen bonds (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1).

Whereas the mechanisms behind the mutagenicity of the 8-oxo-type lesions are today quite well investigated biochemically^{6,7} and structurally, with a variety of high-fidelity^{6,8,9} and low-fidelity¹⁰⁻¹⁴ polymerases, little is known about the mutation mechanisms associated with FaPy-type lesions¹⁵. Particularly, crystal structures that could provide insights into the mutation mechanisms are not available. Whereas the α -FaPy lesions are known to block high- and low-fidelity polymerases¹⁶, the β -anomers do not stall replicative polymerases but reduce the replication efficiency and serve as templating bases with considerable mutagenic potential¹⁷⁻¹⁹. This seems to be responsible for their moderate toxicity^{9,20}. Opposite FaPydA, the Klenow exo⁻ fragment from *Escherichia coli* DNA polymerase I is known to misincorporate dA, leading to dA-dT→dT-dA transversion mutations¹⁸. In addition, the incorporation of dC opposite FaPydA was observed^{17,21}. The oxidative dG-derived lesions are known to induce a plethora of mutations *in vivo*, of which dG-dC→dT-dA transversion mutations and dG-dC→dA-dT transition mutations are most frequently observed^{22,23}. Primer extension studies with stabilized analogs of FaPydG^{16,20} or methylated versions of FaPydG^{21,24,25} showed either correct incorporation of dC or misincorporation of dA¹⁹.

Previous crystal structures and biochemical data of the oxidized lesion 8-oxodG in complex with various polymerases clarified that this lesion can adopt either a *syn* or an *anti* conformation of the N9-C1' (glycosidic) bond (Fig. 1)^{6,8}. Whereas the *anti* conformation enables error-free bypass of the lesion by replicative polymerases, the *syn* conformation is responsible for the mutagenic effect^{6,13}. This conformer is able to form a stable noncanonical Hoogsteen base pair with dA that induces only little distortion in the active site of the polymerase^{6-8,10-14}. Although a similar mutation mechanism was proposed for the corresponding FaPy lesions^{18,22}, this has not been proven so far.

To enable biochemical and structural investigations of FaPy lesion-containing DNA, we used stabilized, bioisosteric FaPy lesion analogs in which the oxygen atom in the ribose is synthetically replaced by a methylene group (Fig. 1 (X = CH₂) and Supplementary Fig. 2; details on synthesis of cFaPydA are in Supplementary Note 1)^{16,20,26,27}. These carbocyclic analogs (cFaPydA and cFaPydG) feature the same hydrogen-bonding properties as the natural lesions but are anomerically stable during DNA synthesis and manipulation. This allows the preparation of carbocyclic β -FaPy lesion-containing oligonucleotides in sufficient quantity and excellent purity (>99%) as needed for crystallization studies. It is assumed that the naturally occurring FaPy lesions form initially as β -anomers but anomerize slowly to give a mixture of α - and β -anomers²⁸. Although the equilibrium between α - and β -anomers may be affected upon binding of the lesion by the polymerases, which could increase the amount of the α -anomer, we report here crystallographic data of only the β -configured FaPy lesion in complex with the large fragment of the high-fidelity polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* (*Bst* Pol I). The crystal structures provide snapshot-type insights into the error-free and error-prone bypass reactions.

RESULTS

Chemical and biochemical studies

We first established that the carbocyclic analogs are suitable mimics of the natural lesions. To this end, we synthesized the carbocyclic version of the dG base (cdG; Supplementary Note 1) and compared it with dG with respect to the conformation of the glycosidic bond

¹Center for Integrated Protein Science at the Department of Chemistry, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany. ²Present address: Department of Chemistry, Technical University, Munich, Germany. ³These authors contributed equally to the work. *e-mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

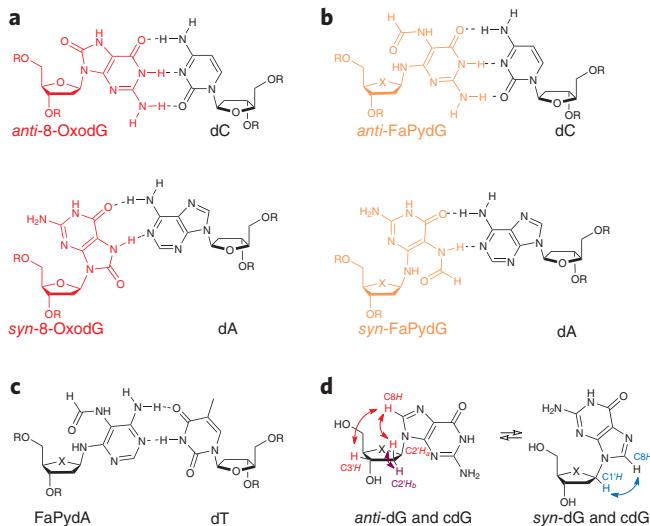


Figure 1 | Representation of the two main oxidation products of 2'-deoxyguanosine (8-oxodG, FaPydG) and FaPydA. (a) For 8-oxodG, the crystallographically observed 8-oxodG-dC and 8-oxodG-dA base pairs are shown. (b,c) Additionally, the putative base pairs formed by FaPydG and FaPydA are depicted. In the natural FaPy lesions, $X = O$, whereas in the stabilized carbocyclic analogs of FaPydG (b) and FaPydA (c), $X = CH_2$. (d) Depiction of the through-space interactions between C8H and the sugar protons in the *anti* conformer (red) and the *syn* conformer (blue). The reference NOESY signal between interactions was quantified, giving the same *syn/anti* distribution for both dG and cdG.

using quantitative two-dimensional NOESY NMR experiments (Fig. 1d and Supplementary Figs. 3 and 4).

For both cdG and dG, we observed, in total, the same through-space interactions between C8H and the hydrogen atoms at C1', C2' and C3'. The C8H-C1H' interaction is caused by the *syn* conformer, whereas the other interactions stem from the *anti* conformer. We quantified these interactions using the NOESY signal between C2'H_a and C2'H_b as internal standards and derived the same *syn/anti* ratio for dG and cdG, showing that the conformational equilibrium is unaffected by the exchange of O to CH₂ (Supplementary Table 1). This result was further secured by a theoretical study of cdG versus dG and also of cFaPydG versus FaPydG at the B3LYP/6-31+G(d) and MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) levels of theory. The obtained rotational profiles (Supplementary Note 2) around the N9-C1' bonds were found to be similar, in agreement with the NMR data. We calculated that the positions of the conformational minima are the same and that the energetic positions of the barriers are influenced by the O to CH₂ replacement by only a small extent (≤ 8 kJ mol⁻¹).

With these results, we started biochemical studies. First, primer extension experiments were performed. The data shown in Figure 2a show that *Bst* Pol I²⁹, which we used in this study as a model for high-fidelity polymerases, is able to misincorporate nucleoside triphosphates into a primer strand opposite both cFaPydG and cFaPydA and that full extension of some primers finally occurs despite the conformational flexibility in DNA^{30,31}. In single-nucleotide insertion studies, *Bst* Pol I was found to incorporate predominantly the correct dTTP opposite cFaPydA and 8-oxodA, enabling error-free bypass (Fig. 2a and Supplementary Fig. 5). Misincorporation is inefficient opposite both dA-derived lesions, showing that the misinstruction potential of cFaPydA and 8-oxodA is rather low (described below), which is in agreement with other reports and with kinetic data¹⁸. In contrast, for cFaPydG and 8-oxodG in addition to error-free bypass (insertion of dC), efficient

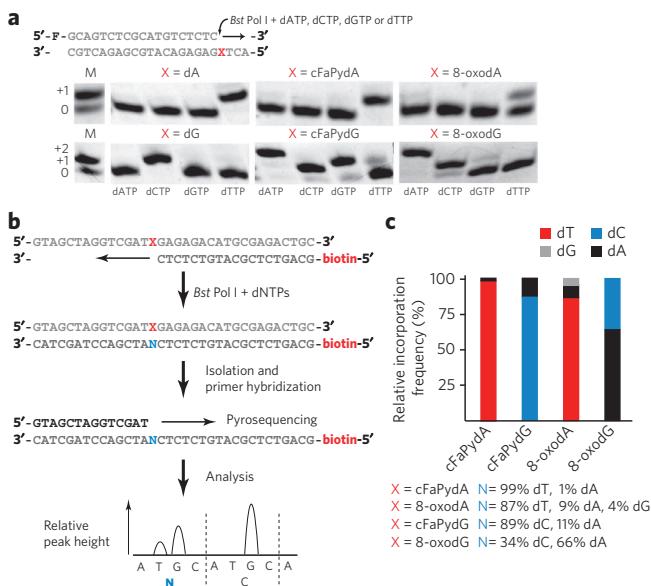


Figure 2 | Nucleotide insertion and bypass of oxidative lesions.

(a) Single-nucleotide insertion reactions opposite cFaPydA and cFaPydG in comparison to those opposite of 8-oxodA and 8-oxodG. The primer was hybridized to a lesion-free control DNA or lesion (X)-containing template strand. F, fluorescein; M, marker. (b) Schematic presentation of the analysis of the misinsertion frequency and mutagenic signature. The biotinylated primer strands from the primer extension reaction with *Bst* Pol I and all four dNTPs were isolated and subjected to pyrosequencing analysis. (c) Relative frequency of correct and incorrect lesion bypass from the pyrosequencing experiment. The given percentage values are averages of three independent experiments.

misincorporation of dA is detected (Fig. 2a). With our primer sequence, this misincorporation results immediately in the +2 primer product, showing that extension of the cFaPydG-dA mispair is also possible. In addition, misincorporation of dG (the +1 product) is observed for cFaPydG. These data establish the cFaPydG lesion as a strongly misinstructing base, in agreement with a previous study¹⁹.

To gain quantitative insight into the misincorporation events and, in particular, into the extension process that is often the limiting factor^{24,25}, we coupled a pyrosequencing step to the primer extension studies (Fig. 2b,c)³². In this assay, the fully extended primers are sequenced, giving quantitative data about the different bypass events. For the study, the cFaPy or 8-oxo lesions were inserted into a slightly longer DNA template strand (Fig. 2b and Supplementary Table 2). After hybridization to a biotinylated primer, primer extension was performed with the large fragment of *Bst* Pol I in the presence of all four canonical triphosphates. The elongated primers were extracted from the assay using streptavidin beads, annealed to a reverse primer and subsequently pyrosequenced^{32,33}. The data shown in Figure 2c confirm that cFaPydA is indeed a relatively weak mutagenic lesion, as the lesion is correctly paired with dT with a frequency of 99%. In the case of 8-oxodA, replication across the lesion with *Bst* Pol I is more error-prone: in addition to correct dTTP insertion, 9% dATP and 4% dGTP are misincorporated as well. For both dG-derived lesions, we again detected dATP misincorporations to a large extent. For cFaPydG, dATP misincorporation was observed in 11% of all cases, whereas for 8-oxodG, misincorporation of dATP was the dominant process (66%). In the pyrosequencing data, no misincorporation of dG opposite cFaPydG was observed, showing that the cFaPydG-dG mispair cannot be extended by the polymerase.

To confirm the above results, we next measured steady-state kinetic data with *Bst* Pol I under standing start conditions. The data,

Table 1 | Kinetic parameters of dNTP insertion by *G. stearothermophilus* polymerase I opposite cFaPydA and cFaPydG

Incorporation	v_{max} (μM min ⁻¹)	K_M (μM)	5'-ACTcFaPyGAGAGACATGCGAGACTGC-3'		
			3'	-CTCTCTGTACGCTCTGACG-5'	f_{ins}^a
dATP→cFaPydA	1.23×10^{-1}	359.63	2.76	7.66×10^{-3}	1.85×10^{-3}
dCTP→cFaPydA	6.49×10^{-2}	249.74	1.45	5.80×10^{-3}	1.40×10^{-3}
dGTP→cFaPydA	1.01×10^{-1}	815.96	2.25	2.76×10^{-3}	6.68×10^{-4}
dTTP→cFaPydA	9.80×10^{-2}	0.53	2.19	4.13	1.00
dATP→cFaPydG	5.43×10^{-2}	0.46	1.21	2.63	7.06×10^{-1}
dCTP→cFaPydG	6.25×10^{-2}	0.38	1.40	3.72	1.00
dGTP→cFaPydG	6.62×10^{-2}	39.87	1.48	3.71×10^{-2}	9.97×10^{-3}
dTTP→cFaPydG	4.07×10^{-2}	194.15	0.91	4.67×10^{-3}	1.26×10^{-3}

^a $f_{ins} = (v_{max}/K_M)_r / (v_{max}/K_M)_i$, where r represents a correct base pair, and i represents an incorrect base pair. The kinetic studies were performed under standing start conditions, using 1 U *Bst* Pol I, 0.25 μM dsDNA and 0.1 nM–1 mM dNTPs. All of the reactions were carried out at 55 °C for 6 min.

shown in **Table 1** (**Supplementary Fig. 6**), support that *Bst* Pol I inserts a dTTP three to four orders of magnitude faster opposite cFaPydA than it inserts dATP, dCTP or dGTP. For cFaPydG, in contrast, dCTP was most efficiently incorporated, followed by incorporation of dATP ($f_{ins} = 0.71$). Incorporation of dGTP and dTTP was found to be two to three orders of magnitude less efficient. It was previously shown that the incorporation efficiency of dTTP opposite FaPydA is just 70%¹⁸. The incorporation of dCTP opposite FaPydG is approximately 50 times slower than formation of a dC:dG base pair²⁵. These results show that the incorporation efficiencies of dTTP and dCTP opposite cFaPydA and cFaPydG are substantially reduced⁹.

Error-free cFaPy bypass

In a previous crystal structure of the 8-oxodG lesion in complex with the large fragment of *Bst* Pol I (Protein Data Bank (PDB) code **1U49**), Hoogsteen base pairing of the lesion with an incoming dATP in the post-insertion site (post-IS) was observed, explaining the mutagenic bypass reaction⁶. To investigate the mechanism behind error-free and error-prone replication through cFaPy lesions, we determined crystal structures of the large fragment of *Bst* Pol I in complex with DNA templates containing cFaPydA or cFaPydG. For the study, we either used prehybridized primer-template constructs or soaked the crystals in mother liquor containing different dNTPs. Because the polymerase is active in the crystal, as reported previously³⁴, this approach allows a direct, snapshot-like observation of the mutagenic and nonmutagenic primer extension reaction. Crystallographic data with 1.7- to 2.7-Å resolution for the error-free and error-prone translesion synthesis process through cFaPydA and cFaPydG were obtained. Data processing and structure refinement statistics are summarized in **Supplementary Tables 3** and **4**. Examples for the quality of the electron density for the structures are shown in **Supplementary Figures 7** and **8**. Overall, we found, on average, about 15% larger B-factors for the lesions in the complex structures, indicating higher flexibility of the formamidopyrimidines.

In the case of cFaPydA, we determined the structure of the lesion first in the (*n*+1) position inside the preinsertion site (pre-IS) of the polymerase (**Fig. 3a,b**). The lesion occupies the same position as an undamaged dA (PDB code **1L3S**³⁴). The polymerase is as expected in the open conformation. The O and O1 helices as well as Tyr714 occupy the same position as they do in a structure obtained with a lesion-free template strand. The lesion features the glycosidic bond in *anti* conformation. The residues Arg615, Gln797 and Tyr714 stabilize the last formed base pair in the template-primer duplex in the post-IS at position *n*–1, as reported previously²⁹.

Soaking the crystal in mother liquor containing dTTP allows the polymerase to perform the first primer extension reaction using the cFaPydA lesions as the templating base directly in the crystal. This structure is identical to a structure resulting from crystallization studies with a template-primer construct in which we synthetically preformed the cFaPydA-dT base pair (data not shown). The obtained structures show the cFaPydA lesion during error-free bypass in a Watson-Crick-type base-pairing situation with dT in the post-IS position (*n*–1; PDB code **4B9M**) (**Fig. 3c,d**). A comparison with a structure featuring an intact dA-dT base pair (PDB code **1L3T**³⁴) at this position (**Supplementary Fig. 9a**) shows that cFaPydA-dT is less buckled (12°) but has a stronger propeller twist (–15°) than the cognate dA-dT base pair (buckle = 22°; propeller = –7.4°) in the polymerase *n*–1 position. The cFaPydA lesion is displaced by about 4.3 Å (C1'–C1' distance; **Supplementary Fig. 9a**), which triggers repositioning of Tyr714 to optimize the π-stacking situation. The polymerase adopts an open-distorted conformation, which is accompanied by hinge movement of the O and O1 helices. This results in blocking of the pre-IS by the loop region between the O and O1 helix. The lesion-containing structure shows Tyr714 stacking with cFaPydA and dT. In contrast, in the reference crystal structure, which has no lesions, Tyr714 stabilizes only the template base dA. The O and O1 helices are shifted, preventing entry of a new templating base into the pre-IS. In the structure, cFaPydA forms a Watson-Crick-type base pair with dT with the formamide group oriented almost orthogonally to the heterocycle (**Supplementary Fig. 9a**). Despite the presence of the cFaPydA lesion, the primer strand and, in particular, the 3' OH group of the primer end are in the correct position for primer extension. Asp830 forms the essential hydrogen bond with the 3' OH primer end to position it for the coming reaction with the incoming triphosphate. This is most likely why the enzyme accomplishes error-free lesion bypass (insertion and extension) despite the structural distortion caused by the cFaPydA lesion.

To our surprise, we noted that the cFaPydA lesion also adopts a different conformation in the active site resulting from rotation around the C4-N9 bond. This is evident from the F_o – DF_c difference density obtained during structure refinement (**Supplementary Fig. 9b**). The occupancy adjustment of the conformations in the refinement process allowed us to estimate the abundance of the rotated state to about 5% of the molecules. This rotation establishes a relatively close distance between the N(6)H₂ of cFaPydA and N(3) of the T base (2.4 Å). The distance suggests the presence of an attractive hydrogen bond, which, however, requires one of the partners to switch into a different tautomeric state. Owing to the strong preference of dT for the keto form, despite the recent

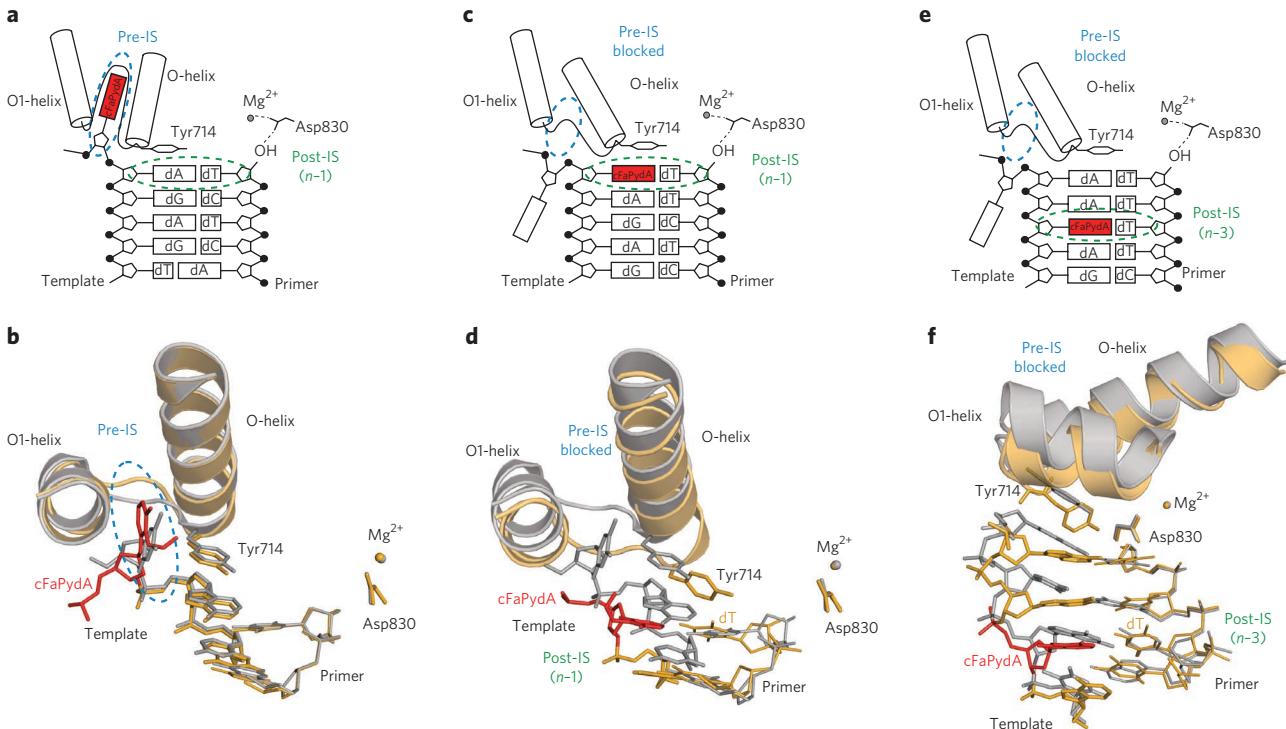


Figure 3 | Error-free reading of Bst Pol I through cFaPydA-containing template DNA. (a,b) Schematic view (a) and superposition of cFaPydA-DNA (red) in the pre-ISM of the polymerase (gold; PDB code 4B9L) with the polymerase in complex with undamaged DNA (gray; PDB code 1L3S³⁴) (b). (c-f) Structure after one (c,d; PDB code 4B9M) and three (e,f; PDB code 4B9N) rounds of correct template extension with the cFaPydA-dT base pair (red) at the post-ISM (gold) n-1 and n-3, respectively. Overlaid in gray is the polymerase in complex with undamaged DNA (PDB codes 1L3T and 1L5U³⁴).

proof of rare tautomers in polymerases^{35,36}, we believe that it is the lesion that is tautomERICALLY more flexible.

Most importantly, the primer strand and the catalytic residues in the crystal structures remain in the correct position for the polymerase to extend the primer, despite the presence of cFaPydA. Indeed, when we used a template strand with a different sequence in which the cFaPydA lesion was followed by two further dA bases (oligodeoxynucleotide ODN4; **Supplementary Table 2**), soaking the crystals with dTTP caused elongation of the primer strand in the crystal by three dTTPs showing the cFaPydA-dT base pair (**Fig. 3e,f**) in the DNA duplex binding position n-3 with little residual distortion detectable in the DNA backbone (**Fig. 3e,f**). The formamide group is, most likely because of its flexibility, not defined in this structure.

We next analyzed the error-free bypass of the cFaPydG lesion. The crystal structure of Bst Pol I in complex with DNA containing the cFaPydG in the pre-ISM is unexpected because it shows that the lesion resides outside the protein. Here, again, the pre-ISM is blocked by the hinge movement of the O-helices (**Fig. 4a,b**), and Tyr714 is shifted to stack with the primer end without changing the position of the primer 3' OH in the active site. The heterocycle of the cFaPydG lesion is only partially defined by the electron density, showing its flexible arrangement outside the pre-ISM (**Supplementary Fig. 8**). To prove the presence of the lesion in the template strand in the absence of defining electron density, we reisolated the DNA from the crystal and confirmed the presence of the lesion by HPLC-MS (**Supplementary Table 2**) after total DNA digestion. In contrast, 8-oxodG does enter the pre-ISM of the polymerase (**Fig. 4a,b**)⁶.

Soaking the crystal with dCTP results in the formation of the cFaPydG-dC pair in the n-1 position with the glycosidic bond of the lesion, still in *anti* conformation, engaged in Watson-Crick base pairing with dC (**Fig. 4c,d** and **Supplementary Fig. 8b**). This shows that the whole structure with the lesion outside the pre-ISM is

sufficiently dynamic to enable loading of the cFaPydG lesion into the active site. In comparison, with the polymerase in complex with an intact dG-dC base pair (PDB code 1L5U³⁴) at the same position, the lesion base pair shows a stronger propeller twist (−6.8°) than the dG-dC base pair (−2°) and no buckling (17.6° and 16°, respectively) of the base pair plane. Structural deviations associated with

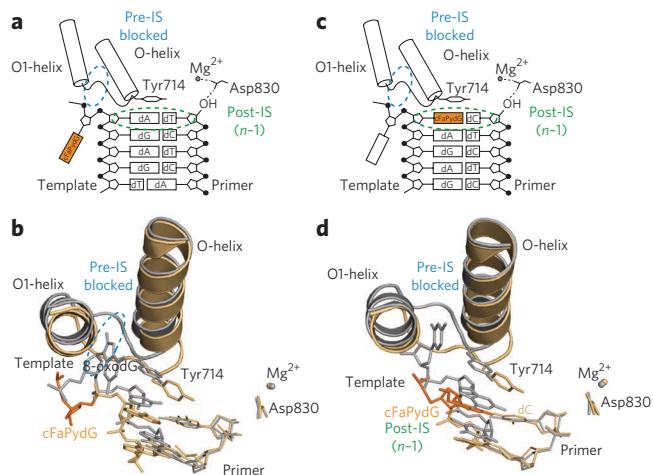


Figure 4 | Error-free reading of Bst Pol I through cFaPydG-containing template DNA. (a,b) Schematic view (a) and superposition of cFaPydG-DNA outside of the pre-ISM (orange, yellow; PDB code 4B9S) with the polymerase in complex with 8-oxodG in the pre-ISM (gray; PDB code 1U45 (ref. 6)) (b). (c,d) Schematic view (c) and structure after correct dCTP insertion with the cFaPydG-dC base pair (orange, yellow; PDB code 4B9T) in comparison with a dG-dC base pair (gray; PDB code 1L5U³⁴) at the n-1 post-ISM position (d).

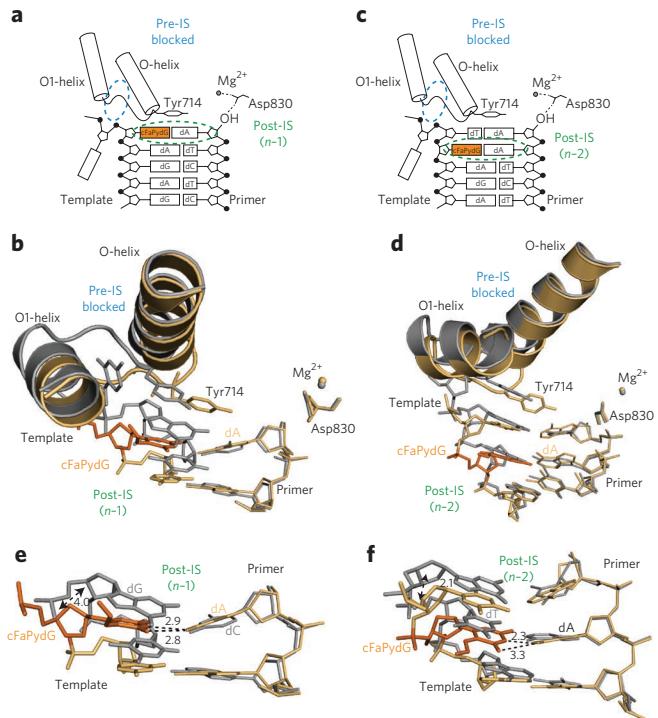


Figure 5 | Erroneous bypass and extension of cFaPydG. (a,b) Schematic view (a) and structure of Bst Pol I (yellow) in complex with cFaPydG (orange) after incorporation of a dATP in the crystal (PDB code 4B9U), superimposed with the polymerase in complex with the cognate dG-dC base pair (gray, PDB code 1L5U³⁴) (b). (c,d) Schematic view (c) and structure after elongating the cFaPydG-dA base pair (orange) at n-2 (PDB code 4B9V) in comparison with structure involving undamaged DNA (gray; PDB code 1L5U) (d). (e,f) Side view of the base pairs. The cFaPydG-dA (orange, yellow) base pair is markedly buckled, the template strand is displaced, and the DNA is widened in comparison with the cognate base pair (gray) (e). After further strand elongation, the displacement is slightly relieved, but the cFaPydG-dA base pair remains out of planarity (f). Distances in e and f are given in Å.

the presence of the lesion are again limited to the template strand, which is shifted by about 3 Å. Again, Tyr714 is repositioned to optimize the stacking interactions with the newly formed cFaPydG-dC base pair. This in turn causes a shift of Gln797 (Supplementary Fig. 10). Only small differences are observed in the primer position, once again structurally explaining the biochemically observed efficient elongation of the primer after formation of the cFaPydG-dC base pair.

Error-prone bypass of cFaPydG

When we soaked crystals containing the cFaPydG lesion in the outer protein position in mother liquor containing dATP, we observed elongation of the primer and formation of the mutagenic cFaPydG-dA base pair in the crystal (Fig. 5). The cFaPydG lesion can obviously move into the active site from its outside position even when it involves formation of a 'purine'-purine mismatch. However, whereas the 8-oxodG lesion flips under these circumstances into the *syn* conformation to enable Hoogsteen base pairing with dA (PDB code 1U49⁶), the cFaPydG lesion forms the same base pair with the glycosidic bond remaining in *anti* conformation. The result is an interaction between cFaPydG and the dA counterbase that is stabilized by two hydrogen bonds (Fig. 5a,b). To form this *anti* cFaPydG-dA base pair, a 4.0-Å dislocation of the cFaPydG lesion is required (Fig. 5e), in contrast to a canonical dG-dC base pair at the

same position. Again, this causes repositioning of Tyr714 and Gln797 to adjust the required stabilizing stacking interactions. The template strand is more strongly distorted in comparison to the cFaPydG-dC structure. The structural changes detected for the primer strand are surprisingly small in contrast, which again explains why the polymerase is able to extend a mutagenic cFaPydG-dA base pair. The strain transferred to the primer strand by the 'purine'-purine mismatch cFaPydG-dA is relieved by turning the dA base by about 10° toward the major groove (Fig. 5e and Supplementary Fig. 9e). The whole base pair is substantially forced out of planarity and more strongly buckled (26°) than the respective undamaged dG-dC base pair (PDB code 1L5U³⁴) inside the polymerase (16°). In addition, the propeller twist is more than twice as large for the damaged base (−5°) than for the dG-dC base pair (−2°). In comparison, a dG-dA mismatch, which cannot be extended by the polymerase, shows a much stronger distortion of the DNA strand, with a buckle of 38° and a propeller twist of −16° (ref. 37).

Soaking a crystal with dATP where the cFaPydG is followed by two dT in the template sequence results in a structure that shows extension of the cFaPydG-dA mismatch to the position n-2 (Fig. 5c,d). All of the observed structural perturbations are now strongly reduced. The C1'-C1' distance between the cFaPydG and a dG in the reference crystal structure is 2.1 Å (Fig. 5f and Supplementary Fig. 9f), demonstrating that once the lesion-containing base pair is formed and shifted away from the active site, further primer extensions are hard to avoid. In comparison with an analogous structure of a dG-dC base pair, the cFaPydG-dA (n-2) structure shows only small residual deviations.

DISCUSSION

The ability of cFaPydG to form an extendable base pair with an incoming dATP was expected from the biochemical data. However, it is unexpected and contradicts previous proposals that no Hoogsteen hydrogen bonding, enabled by rotation of the glycosidic bond from the canonical *anti* conformation into the *syn* geometry, is necessary. The *anti* cFaPydG-dA base pair is established without any involvement of the formamidopyrimidine substructure. Whereas for 8-oxodG, the C8-oxo group and the hydrogen-donating N7H functionality are essential to form the mutagenic 8-oxodG-dA base pair, the same atoms have no role in the case of the cFaPydG lesion. The observed *anti* cFaPydG-dA base pair consequently establishes a new mechanism for how the observed dG-dC→dT-dA transversion mutation, associated with oxidative damage, is formed. For 8-oxodG, rotation of the lesion into the *syn* conformation is essential to minimize steric problems associated with the close distance between the C8=O and the C5H₂-methylene groups of the deoxyribose in the canonical *anti* orientation⁶. The cFaPydG lesion solves this structural problem differently. The lesion turns the formamide group into an orthogonal position relative to the heterocycle and, in this way, minimizes the steric interaction between the C8=O and the C5H₂-methylene group. This reduces the need to shift the glycosidic bond from *anti* into the *syn* conformation. It is unexpected that the cFaPydG lesion can base pair with dA despite the *anti* conformation and that the cFaPydG-dA base pair is extended by the polymerase. This can be explained by the fact that the structural perturbations associated with the cFaPydG-dA base pair are limited to the template strand. Most important are the perturbations of the position of Tyr714 and Gln797, which give rise to a weakened hydrogen-bonding interaction between Gln797 and the cFaPydG-dA base pair; also, the stacking interaction of this mutagenic base pair with Tyr714 are compromised. The wider effects of these perturbations are, however, limited to the base pair in the n-2 position and not transmitted to the primer strand, which occupies the same position observed in structures with lesion-free template-primer complexes. The inability of the cFaPydG lesion to flip into the *syn* conformation clearly causes stronger structural

perturbations in comparison to 8-oxodG, which explains why mutagenic formation of the cFaPydG-dA base pair is reduced to 11% in comparison to 8-oxodG-dA, where it is 66%.

The lack of rotation influences, in particular, the planarity of the base pair. Such a deviation does not influence the strength of the hydrogen bonds but reduces the strength of stacking interactions with the other base pairs and with Tyr714. It seems that the ring-opened structure of the cFaPydG lesion, with its considerably smaller π -surface, decreases the energetic penalty for reduced stacking. A reduced aromatic character, in turn, may also allow the complex cFaPy lesion to shift more easily into other tautomeric states in comparison to the canonical bases. This is crystallographically observed for cFaPydA, but it is likely that similar tautomeric shifts are possible for cFaPydG as well.

The main difference between 8-oxo-type lesions and cFaPy-type lesions are therefore that the 8-oxo group can rotate as part of the formamide unit away from the C5H₂ group into an orthogonal position relative to the heterocycle. This gives the cFaPydG lesion more structural flexibility, which reduces the need for the lesion to rotate into the *syn* conformation. In addition, the lacking imidazole substructure reduces the energetic penalty associated with reduced stacking interactions, which makes it easier for cFaPy-containing base pairs to deviate from planarity. Although shown here only for cFaPydA, we think that cFaPy lesions can, in general, change more easily into different tautomeric states in comparison to natural purines, broadening their base-pairing properties without the need to use the formamide or the Hoogsteen base pairs. What is also interesting is the observation that cFaPydG-dG mispairs stall a replicative polymerase, whereas the cFaPydG-dA and 8-oxodG-dA mispairs, which are primarily formed, are extended to form full-length primers (Fig. 2a,c). This seems to be the reason why cFaPydG-dA and 8-oxodG-dA mismatches escape recognition by the repair system, which is triggered by a stalled replicative polymerase during replication. We would like to emphasize that our mechanistic studies show how a high-fidelity polymerase replicates cFaPydG⁵ and that mutations arise. The *in vivo* mutagenicity of the bases depends of course also on other factors, such as repair or the action of other polymerases such as low-fidelity polymerases, which can explain different cell type-specific *in vivo* mutagenicities⁹.

Received 1 October 2012; accepted 15 April 2013;
published online 19 May 2013

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Accession codes. PDB: Atomic coordinates and structure factors of the protein in complex with DNA have been deposited with the following accession codes: cFaPydA, pre-IS ([4B9L](#)); cFaPydA-dT, *n*-1 ([4B9M](#)); cFaPydA-dT, *n*-3 ([4B9N](#)); cFaPydG, outside the pre-IS ([4B9S](#)); cFaPydG-dC, *n*-1 ([4B9T](#)); cFaPydG-dA, *n*-1 ([4B9U](#)); cFaPydG-dA, *n*-2 ([4B9V](#)). Cambridge Structural Database: Small-molecular crystallographic data have been submitted under the following accession codes: **9a** ([CCDC-796512](#)); **11** ([CCDC-796513](#)).

References

1. Finkel, T. & Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247 (2000).
2. Cadet, J., Douki, T. & Ravanat, J.L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 9–21 (2010).
3. Steenken, S. & Jovanovic, S.V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 617–618 (1997).
4. Cadet, J., Douki, T. & Ravanat, J.L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1075–1083 (2008).
5. Jena, N.R. & Mishra, P.C. Formation of ring-opened and rearranged products of guanine: mechanisms and biological significance. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 81–94 (2012).
6. Hsu, G.W., Ober, M., Carell, T. & Beese, L.S. Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. *Nature* **431**, 217–221 (2004).
7. Duarte, V., Muller, J.G. & Burrows, C.J. Insertion of dGMP and dAMP during *in vitro* DNA synthesis opposite an oxidized form of 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Nucleic Acids Res.* **27**, 496–502 (1999).
8. Brieba, L.G. *et al.* Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase. *EMBO J.* **23**, 3452–3461 (2004).
9. Greenberg, M.M. The formamidopyrimidines: purine lesions formed in competition with 8-oxopurines from oxidative stress. *Acc. Chem. Res.* **45**, 588–597 (2012).
10. Brieba, L.G. & Ellenberger, T. Hold tight (but not too tight) to get it right: accurate bypass of an 8-oxoguanine lesion by DNA polymerase β . *Structure* **11**, 1–2 (2003).
11. Krahm, J.M., Beard, W.A., Miller, H., Grollman, A.P. & Wilson, S.H. Structure of DNA polymerase β with the mutagenic DNA lesion 8-oxodeoxyguanine reveals structural insights into its coding potential. *Structure* **11**, 121–127 (2003).
12. Eoff, R.L., Irimia, A., Angel, K.C., Egli, M. & Guengerich, F.P. Hydrogen bonding of 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine with a charged residue in the little finger domain determines miscoding events in *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase Dpo4. *J. Biol. Chem.* **282**, 19831–19843 (2007).
13. Vasquez-Del Carpio, R. *et al.* Structure of human DNA polymerase κ inserting dATP opposite an 8-OxoG DNA lesion. *PLoS ONE* **4**, e5766 (2009).
14. Batra, V.K. *et al.* Mutagenic conformation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP in the confines of a DNA polymerase active site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 889–890 (2010).
15. Dizdaroglu, M., Kirkali, G. & Jaruga, P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 1610–1621 (2008).
16. Büsch, F. *et al.* Dissecting the differences between the α and β anomers of the oxidative DNA lesion FaPydG. *Chemistry* **14**, 2125–2132 (2008).
17. Graziewicz, M.A. *et al.* Fapyadenine is a moderately efficient chain terminator for prokaryotic DNA polymerases. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 75–83 (2000).
18. Delaney, M.O., Wiederholt, C.J. & Greenberg, M.M. Fapy.dA induces nucleotide misincorporation translesionally by a DNA polymerase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 771–773 (2002).
19. Wiederholt, C.J. & Greenberg, M.M. Fapy.dG instructs Klenow exo⁻ to misincorporate deoxyadenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7278–7279 (2002).
20. Ober, M., Müller, H., Pieck, C., Gierlich, J. & Carell, T. Base pairing and replicative processing of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 18143–18149 (2005).
21. Tudek, B. *et al.* Mutagenic specificity of imidazole ring-opened 7-methylpurines in M13mp18 phage DNA. *Acta Biochim. Pol.* **46**, 785–799 (1999).
22. Kalam, M.A. *et al.* Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2305–2315 (2006).
23. Patro, J.N. *et al.* Studies on the replication of the ring opened formamidopyrimidine, Fapy.dG in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **46**, 10202–10212 (2007).
24. Asagoshi, K., Terato, H., Ohyama, Y. & Ide, H. Effects of a guanine-derived formamidopyrimidine lesion on DNA replication: translesion DNA synthesis, nucleotide insertion, and extension kinetics. *J. Biol. Chem.* **277**, 14589–14597 (2002).
25. Christov, P.P., Angel, K.C., Guengerich, F.P. & Rizzo, C.J. Replication past the N5-methyl-formamidopyrimidine lesion of deoxyguanosine by DNA polymerases and an improved procedure for sequence analysis of *in vitro* bypass products by mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1086–1095 (2009).
26. Ober, M., Linne, U., Gierlich, J. & Carell, T. The two main DNA lesions 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine exhibit strongly different pairing properties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 4947–4951 (2003).
27. Ober, M., Marsch, M., Harms, K. & Carell, T. A carbocyclic analogue of a protected β -d-2-deoxyribosylamine. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **60**, o1191–o1192 (2004).
28. Patro, J.N., Haraguchi, K., Delaney, M.O. & Greenberg, M.M. Probing the configurations of formamidopyrimidine lesions Fapy.dA and Fapy.dG in DNA using endonuclease IV. *Biochemistry* **43**, 13397–13403 (2004).
29. Kiefer, J.R. *et al.* Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure* **5**, 95–108 (1997).

30. Raoul, S., Bardet, M. & Cadet, J. Gamma irradiation of 2'-deoxyadenosine in oxygen-free aqueous solutions: identification and conformational features of formamidopyrimidine nucleoside derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 924–933 (1995).
31. Lukin, M. *et al.* Novel post-synthetic generation, isomeric resolution, and characterization of Fapy-dG within oligodeoxynucleotides: differential anomeric impacts on DNA duplex properties. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5776–5789 (2011).
32. Müntzel, M. *et al.* Improved synthesis and mutagenicity of oligonucleotides containing 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Chemistry* **17**, 13782–13788 (2011).
33. Stathis, D., Lischke, U., Koch, S.C., Deiml, C.A. & Carell, T. Discovery and mutagenicity of a guanidinoformimine lesion as a new intermediate of the oxidative deoxyguanosine degradation pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4925–4930 (2012).
34. Johnson, S.J., Taylor, J.S. & Beese, L.S. Processive DNA synthesis observed in a polymerase crystal suggests a mechanism for the prevention of frameshift mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3895–3900 (2003).
35. Topal, M.D. & Fresco, J.R. Complementary base pairing and the origin of substitution mutations. *Nature* **263**, 285–289 (1976).
36. Wang, W., Hellinga, H.W. & Beese, L.S. Structural evidence for the rare tautomer hypothesis of spontaneous mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 17644–17648 (2011).
37. Johnson, S.J. & Beese, L.S. Structures of mismatch replication errors observed in a DNA polymerase. *Cell* **116**, 803–816 (2004).

Acknowledgments

We are grateful to the beamline scientists at the Swiss Light Source and European Synchrotron Radiation Facility for setting up the beamlines. This research project was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through SFB 646 and SFB 749. Further support was obtained by the Volkswagen Foundation and in particular by the Excellence Cluster CiPSM. We thank K. Karaghiosoff and K. Lux for solving the crystal structures of the small molecules. We thank M. Müller for critical reading of the manuscript and many helpful discussions.

Author contributions

T.C. conceived and directed the study. He wrote the manuscript and designed experiments. T.H.G. and U.L. designed experiments. T.H.G. performed the synthesis of the lesions and of the DNA strands. U.L. and T.H.G. performed the biochemical experiments. U.L. purified the protein. K.L.G. performed the synthesis of cdG. S.A. developed the synthesis of cFaPydA. H.C.M. developed the synthesis of cdG. S.S. conducted crystallographic data collection and solved the crystal structures. H.Z. performed the theoretical studies. D.S.S. performed the NMR studies.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Additional information

Supplementary information and chemical compound information is available in the [online version of the paper](#). Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.C.

ONLINE METHODS

General experimental procedures. All reagents and solvents were purchased from Acros, Fischer Scientific (KMF Laborchemie Handels GmbH), Fluka (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH) and were used as delivered. All of the experiments involving water-sensitive compounds were performed in oven-dried glassware under a nitrogen atmosphere. Reactions were monitored by analytical thin-layer chromatography (TLC) on VWR precoated aluminum plates 60 F₂₅₄ visualized by UV light, anisaldehyde or ninhydrin staining. Melting points were obtained in open-glass capillaries with a Büchi Smp 20 melting point apparatus and are not corrected. IR spectra of the compounds were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR Spektrum 100 on an ATR unit. ¹H NMR spectra were obtained on the following spectrometers: Bruker AMX-200, ARX-300, DRX-500 and ARX-600 or Varian Mercury 200VX and VXR400S. The chemical shifts were referenced to CHCl₃ (δ 7.26) in CDCl₃, DMSO (δ 2.50) in DMSO-d₆, MeOH (δ 3.31) in CD₃OD-d₄, H₂O (δ 4.80) in D₂O and CH₃CN (δ 1.94) in CD₃CN-d₃. If necessary, peak assignment was carried out with the help of COSY, HMBC, HMQC or NOESY experiments. ¹³C spectra were obtained on a Bruker DRX-200 (50 MHz), ARX-300 (75 MHz), DRX-500 (125 MHz) or Varian VXR400S (100 MHz) spectrometer and referenced to the solvent signal. ³¹P spectra were obtained on the spectrometer Varian Mercury 200VX (81 MHz). ³¹P chemical shifts are quoted in p.p.m. using 85% H₃PO₄ as an external standard. EI mass spectra were recorded on a Varian MAT CH7A or MAT90 (Varian) mass spectrometer. FAB spectra in low and high resolution were recorded on a Finnigan MAT95 mass spectrometer. ESI spectra and high-resolution ESI spectra were obtained on the mass spectrometers Finnigan MAT95S, JEOL JMS-700 or PE ScieX API QStar Pulsar i. FT-ICR-ESI mass spectra were measured on a Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL FTMS. Final concentrations of the purified oligonucleotides and enzyme concentrations were determined with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Peqlab). MALDI-TOF mass spectra of the oligonucleotides were confirmed using a Bruker Autoflex II spectrometer. DNA-melting experiments to determine curves were performed using a Carey 100 Bio-spectrophotometer equipped with Carey temperature controller, sample transport accessory and multi cell block (Varian). Commercial oligonucleotides were purchased from Metabion or Ella Biotech (Martinsried, Germany).

Oligonucleotide synthesis. Oligonucleotide synthesis was performed on an Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesis System (PerSeptive Biosystems) using standard DNA synthesis conditions. Phosphoramidites for dA, dC, dG, dT and CPG carriers were obtained from Amersham, Glen Research or PE Biosystems. Oligonucleotides containing the cFaPydA building block were not compatible with the regular capping procedure. For these strands, the synthesis protocol was modified. The coupling time for 1 was extended to 2 \times 7 min. The standard capping solution was replaced by a mixture of pivaloyl anhydride or butyric anhydride (0.54 M) and 2,6-lutidine (10.5%) in acetonitrile. The mild capping period was 25 s after incorporation of cFaPydA and each of the following bases. In addition, deblocking cycles were shortened using dichloroacetic acid to avoid detritylation of the N6 position of the lesion. Also, the coupling time for the first following phosphoramidite after the lesion was extended to 144 s. The terminal DMT-protecting group was removed from the oligonucleotides (see deprotection and purification).

Deprotection and purification. Deprotection and cleavage of the oligodeoxynucleotides from the CPG carrier containing cFaPydA were carried out in a mixture of saturated ammonia solution in water (7 M) and ethanol (3:1) at 17 °C overnight. DNA purification was conducted on analytical and preparative HPLC (Waters) using Nucleodur or Nucleosil columns (250 \times 4 mm, C18ec, particle size 3 μ m or 250 \times 10 mm, C18ec, particle size 5 μ m) from Machery-Nagel. The applied buffer was 0.1 M triethylammonium acetate in water and 0.1 M triethylammonium acetate in an 80% aqueous MeCN buffer system. The fractions were checked for purity by analytical HPLC. The purified oligonucleotides were concentrated *in vacuo* using a Savant Speed Vac and were desalting with Sep-Pak cartridges (Waters) before use. The oligodeoxynucleotides still containing the trityl group were deprotected by addition of 100 μ L of an 80% acetic acid solution. After incubation for 20 min at room temperature, 100 μ L of water together with 60 μ L of a 3-M solution of sodium acetate were added. To this solution, 1.6 mL of ethanol were added, and the DNA was precipitated at least for 60 min at -20 °C. The DNA was isolated, decanting off the solution, and lyophilized, and samples were purified via HPLC as mentioned above.

Alternatively, the DNA was detritylated via SepPac cartridges. The cartridges were activated with acetonitrile (10 mL) and equilibrated with distilled water (10 mL). The lyophilized oligonucleotides were loaded onto the cartridge (0.2 mL/min). The column was washed with distilled water (6 mL), and then 5 mL trifluoroacetic acid (0.4%) in water was passed through it (during 90 s), followed immediately by 6 mL of 0.1 M triethylammonium acetate in water (pH 7) and then with 6 mL of water. Finally, the DNA was eluted two times each with 4 mL acetonitrile (80%) in water.

Enzymatic digestion. The DNA (2 nmol in 100 μ L H₂O) was incubated with 10 μ L buffer A (300 mM ammonium acetate, 100 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄, pH 5.7) and 20 U nuclease S1 (*Aspergillus oryzae* from Roche) for 3 h at 37 °C. After adding 12 μ L buffer B (500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), 5 U antarctic phosphatase (New England Biolabs) and 0.1 unit snake venom phosphodiesterase I (*Crotalus adamanteus* venom from USB corporation), the solution was incubated for a further 3 h at 37 °C until the digestion was completed. The sample was centrifuged (6,000 r.p.m., 10 min) and analyzed by HPLC and FT-ICR-HPLC/MS. For the analysis of the enzymatic digestion, a 3 HDO column (150 \times 2.0 mm) from Interchrom Interchrom Uptisphere was used. Eluting buffers were buffer A (2 mM NH₄HCOO in H₂O, pH 5.5) and buffer B (2 mM NH₄HCOO in H₂O/MeCN (20/80)). Gradients were as follows: 0–12 min; 0%–3% B; 12–60 min; 3%–60% B; 60–62 min; 60%–100% B; 62–90 min; 100% B; 90–95 min; 100% B–0% B; 95–130 min; 0% B, with a flow of 0.15 mL/min. The elution was monitored at 260 nm and 325 nm.

Single-nucleotide insertion. For the single-nucleotide insertion a 16-mer 5'-fluorescein-labeled primer was hybridized to either the lesion-containing template strand or the lesion-free control. The experiment was conducted by using 0.5 μ M primer (ODN2-Primer) and 1 μ M template (ODN2) to ensure all of the primer was fully hybridized. Together with *Bst* Pol I (1 U, NEB), 5 mM Mg²⁺ and 50 μ M each of the individual dNTPs, each duplex was incubated for 6 min at 55 °C. The reactions were terminated by adding 20 μ L TBE-urea sample buffer and analyzed by denaturing PAGE.

Steady-state kinetics. The primer extension was performed following the same protocol as for single-nucleotide insertion studies, except that the dNTP concentration was varied from 0.5 nM to 1 mM. Kinetic constants were derived as described in ref. 38.

Primer extension-based pyrosequencing. In a ratio of 2:1, a 34-mer template DNA strand (ODN1) was annealed to a 5'-biotinylated 19-mer primer strand (ODN1-Primer1, Metabion), ending one base 3' to the lesion. Hence, the primer extension experiments were performed under standing start conditions with *Bst* Pol I. *Bst* Pol I (1 U; NEB), 5 mM MgSO₄, 50 μ M dNTPs and 0.5 μ M dsDNA were incubated in a total volume of 20 μ L 1 \times ThermoPol Reaction Buffer (NEB) for 30 min at 55 °C. Subsequently, 2 μ L of streptavidin Sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), 40 μ L Binding Buffer (PyroMark, Qiagen) and 18 μ L ddH₂O were added to each sample. After agitation for 15 min at 1,400 r.p.m., the beads were captured with a Vacuum Prep Tool (Qiagen) and washed with 70% ethanol, 0.2 M NaOH and washing buffer (Qiagen). The elongated biotinylated primers (immobilized on the bead surfaces) were annealed to 10 pmol of the sequencing primer (ODN1-Primer2, Metabion) in 30 μ L annealing buffer (Qiagen). Pyrosequencing was performed on a PyroMark Q24 Pyrosequencer using standard conditions (Qiagen). For each dNTP, blanks were measured. The data were analyzed using the provided software, PyroMark Q24. The average values of the peak heights were calculated using Microsoft Excel, and the average blank values were subtracted. Hence, relative incorporation at every variable position was calculated and averaged from three independent experiments.

Protein crystallization. *Bst* Pol I was expressed and purified as previously described³⁹. For co-crystallization, the lesion-containing template (ODN3–ODN6) was annealed to the primer ending one base 3' to the lesion in 10 mM Na-cacodylate, pH 6.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA and 10 mM MgSO₄. Prior to crystallization, protein and DNA were mixed in a 1:3 molar ratio, resulting in final concentrations of 5 mg/ml and 0.5 mM for *Bst* Pol I and dsDNA, respectively. Crystals were grown by mixing an equal volume of protein–DNA complex with 47–51% ammonium sulfate, 3.0–4.1% MPD and 100 mM MES, pH 5.8, using the hanging-drop vapor diffusion method. The crystallization plates were incubated at 18 °C, and crystals appeared after 2 to 6 d. For primer extensions,

- the crystals were soaked overnight (single extension) or for 2–3 d (double and triple extension) in an artificial mother liquor supplement with 30 mM of the respective triphosphate. Crystals were frozen in 24% sucrose, 55% ammonium sulfate, 3.5% MPD, 100 mM MES, pH 5.8, and stored in liquid nitrogen until data collection. Data were collected at the beamlines ID14-1 (European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France) and PX I and PXIII (Swiss Light Source (SLS), Villigen, Switzerland) and processed with the programs XDS⁴⁰ and SCALA^{41,42}. Structure solution was carried out by molecular replacement with PHASER⁴³ using the coordinates of PDB code 1U45 (ref. 6). To reduce model bias, before model building in COOT⁴⁴, the temperature factors were reset to the Wilson B factor, and simulated annealing omit maps, removing the area around the lesion, were calculated with PHENIX⁴⁵. TLS and restrained refinement were carried out in REFMAC^{5,46,47} and PHENIX. All of the structural superpositions were done with LSQKAB⁴¹, and structural figures were prepared with Pymol (Delano Scientific). Data processing and refinement statistics are summarized in **Supplementary Tables 3** and **4**. The DNA geometry was analyzed with CURVES+^{48,49}.
38. Creighton, S., Bloom, L.B. & Goodman, M.F. Gel fidelity assay measuring nucleotide misinsertion, exonucleolytic proofreading, and lesion bypass efficiencies. *Methods Enzymol.* **262**, 232–256 (1995).
39. Münzel, M., Lercher, L., Müller, M. & Carell, T. Chemical discrimination between dC and 5MedC via their hydroxylamine adducts. *Nucleic Acids Res.* **38**, e192 (2010).
40. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
41. CCP4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763 (1994).
42. Evans, P. Joint CCP4 and ESF-EACMB. *Newsletter Prot. Crystallogr.* **33**, 22–24 (1997).
43. McCoy, A.J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
44. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
45. Adams, P.D. *et al.* PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1948–1954 (2002).
46. Winn, M.D., Murshudov, G.N. & Papiz, M.Z. Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions. *Methods Enzymol.* **374**, 300–321 (2003).
47. Murshudov, G.N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
48. Olson, W.K. *et al.* A standard reference frame for the description of nucleic acid base-pair geometry. *J. Mol. Biol.* **313**, 229–237 (2001).
49. Lavery, R., Moakher, M., Maddocks, J.H., Petkeviciute, D. & Zakrzewska, K. Conformational analysis of nucleic acids revisited: Curves+. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5917–5929 (2009).

Supplementary Information

Unexpected non-Hoogsteen–based mutagenicity mechanism of FaPy-DNA lesions

Tim H. Gehrke,^{1, #} Ulrike Lischke,^{1, #} Karola L. Gasteiger,^{1, #} Sabine Schneider,^{1,2,#} Simone Arnold,¹ Heiko C. Müller,¹ David S. Stephenson,¹ Hendrik Zipse,¹ and Thomas Carell^{1,*}

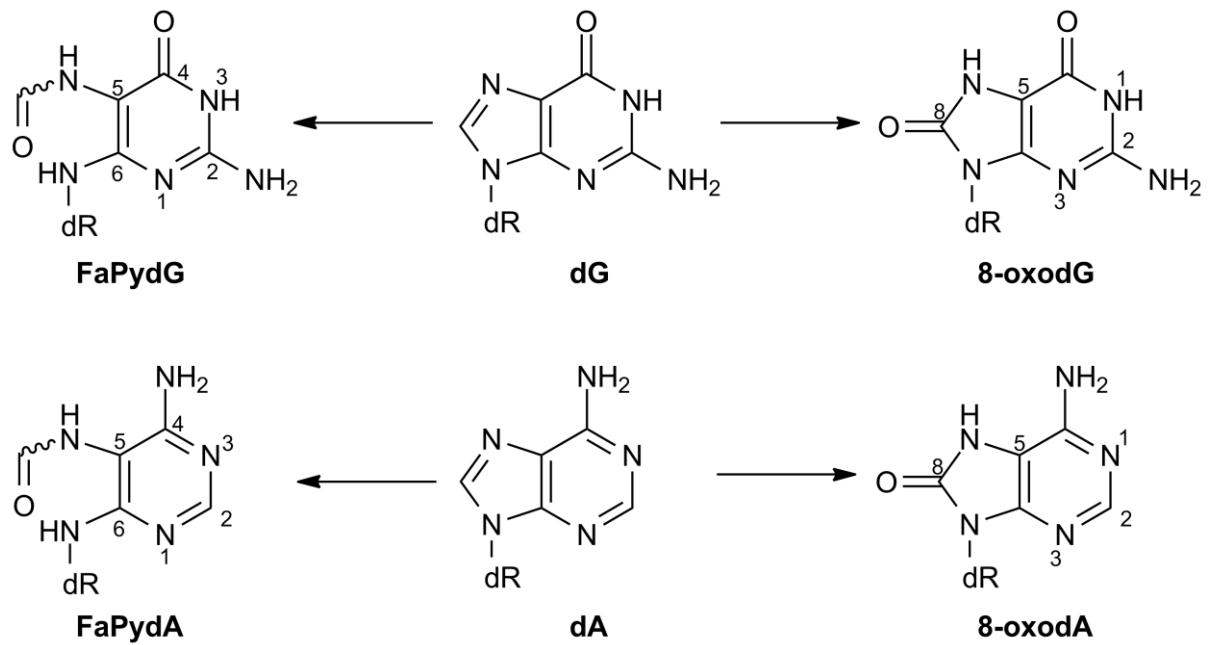
*Corresponding author: Thomas Carell, Center for Integrated Protein Science CIPS^M at the Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-University Munich, Butenandtstr. 5-13 (F), D-81377 Munich, Germany Tel.: +49 (0)89 2180 77750; Fax: +49 (0)89 2180 77756, Email: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

These authors contributed equally to the work.

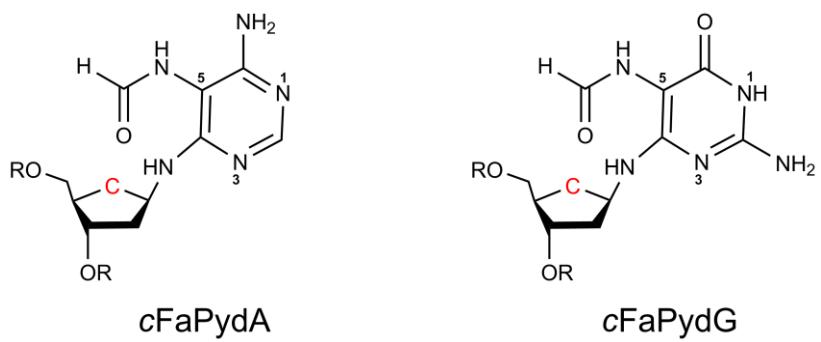
¹Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-University, Butenandtstr. 5-13 (F), D-81377 Munich (Germany)

²Present address: Department of Chemistry, Technical-University, Lichtenbergstr. 4, D-85747 Garching, Munich (Germany)

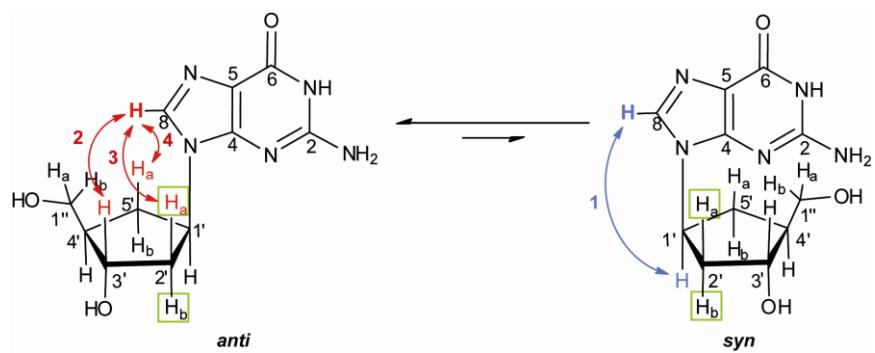
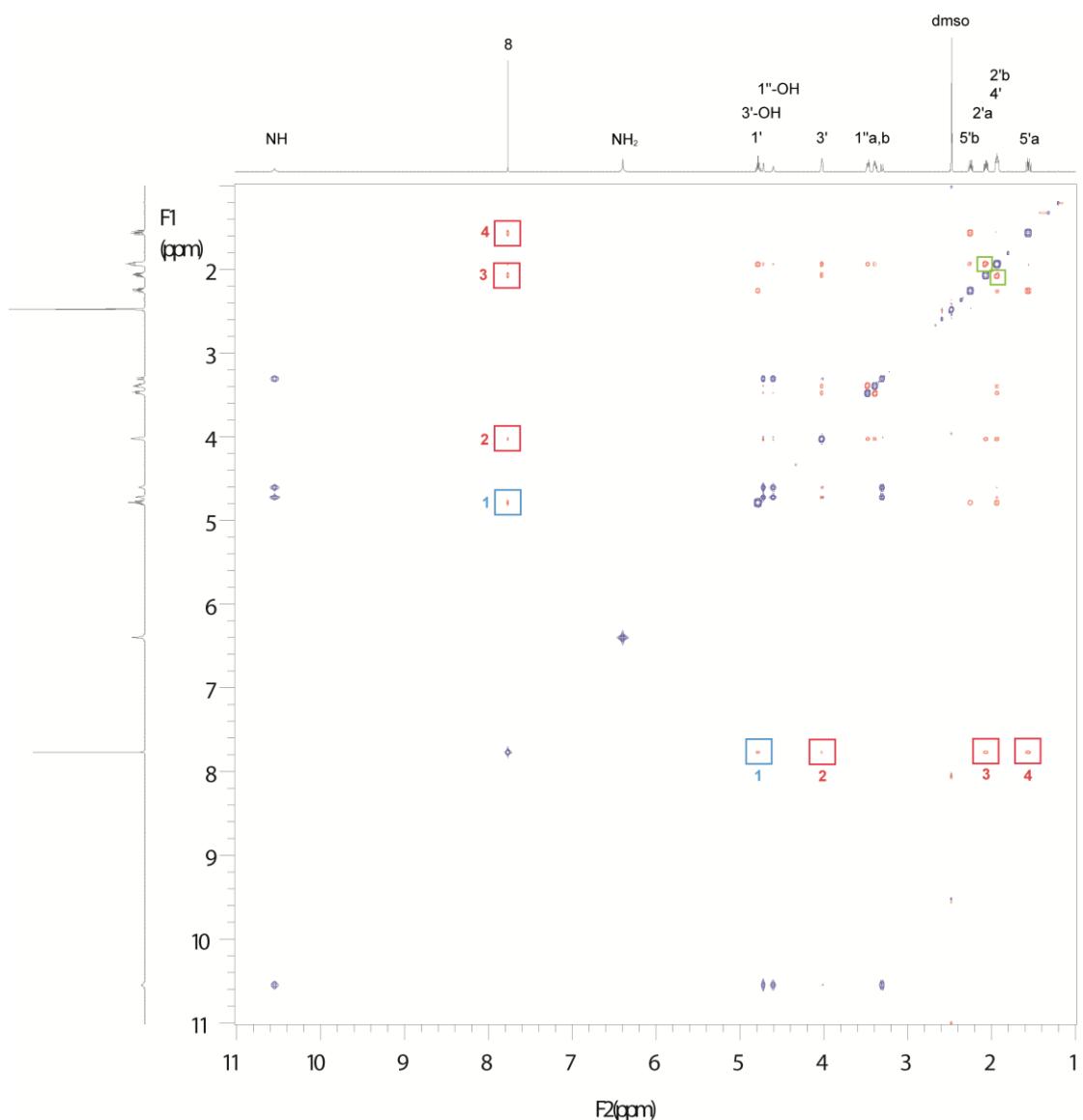
Supplementary Results



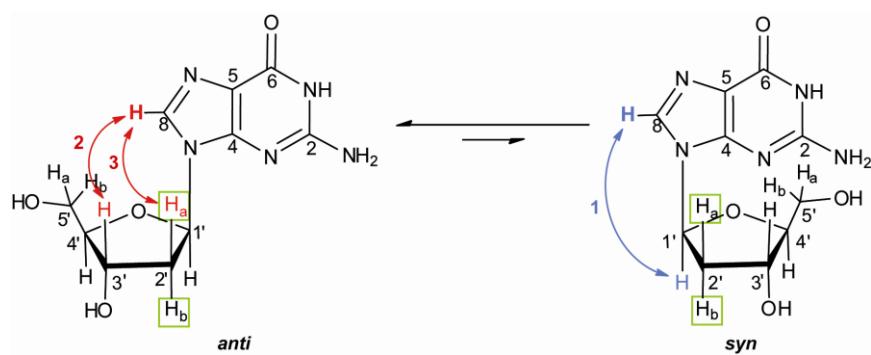
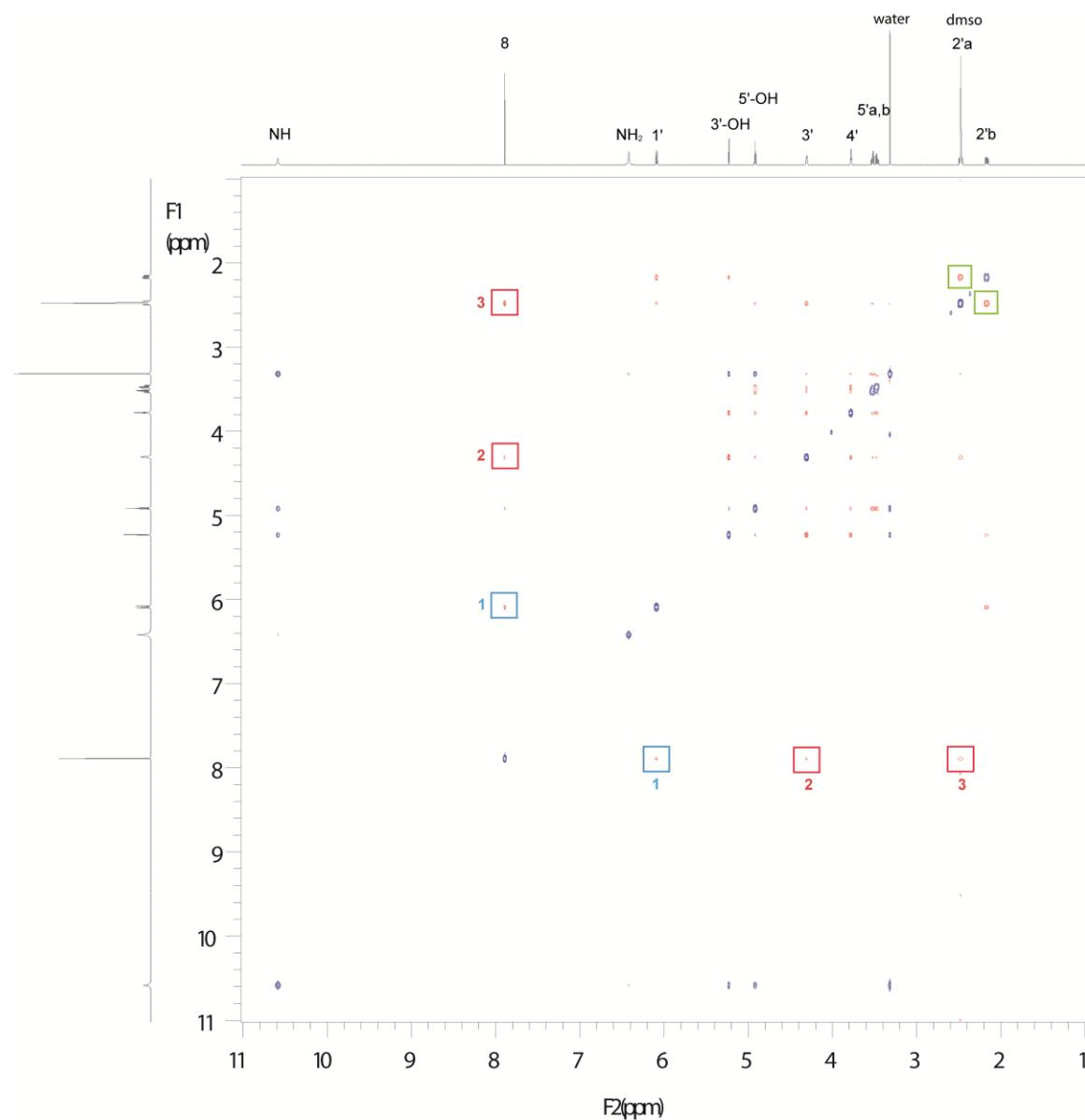
Supplementary Figure 1: The two main oxidation products of 2'-deoxyguanosine (dG), 8-oxodG and FaPydG and their counterparts from 2'-deoxyadenosine (dA), 8-oxodA and FaPydA, respectively (dR = 2'-deoxyribose).



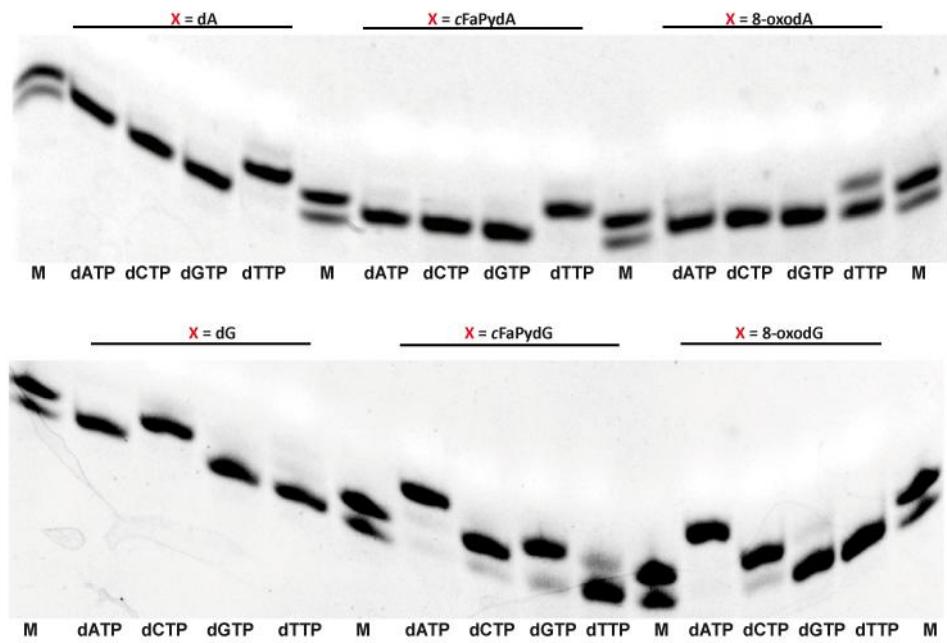
Supplementary Figure 2: Depiction of the carbocyclic analogs of FaPydA and FaPydG used for this study.

a**b**

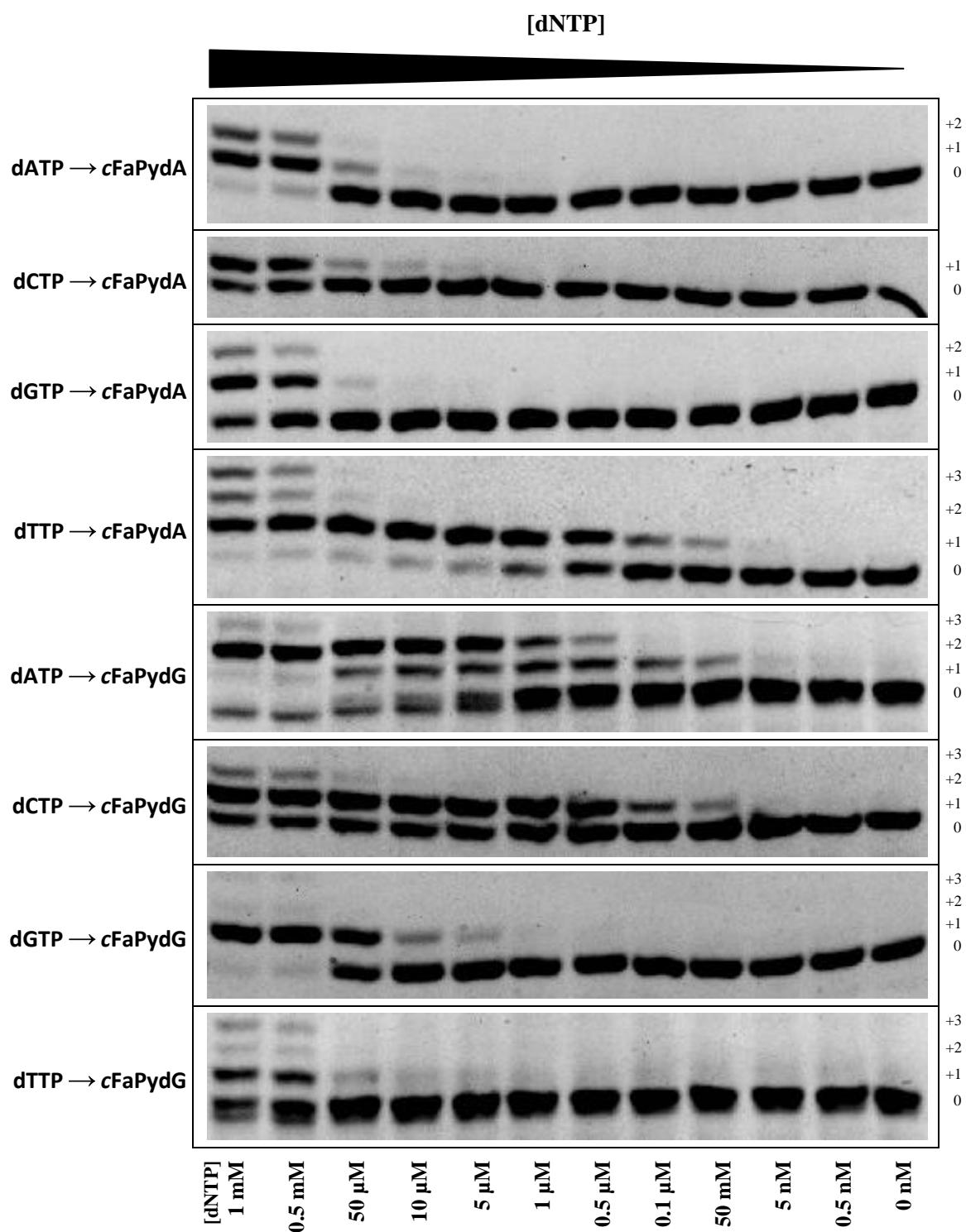
Supplementary Figure 3: Noesy (600 MHz, DMSO-d₆) of carbocyclic dG **16**. The interactions between the C8H and the C3'H, C2'H_a and C5'H_a of the *anti*-cdG are shown in red and the interactions between the C8H and the C1'H of the *syn*-cdG are shown in blue. The reference interactions of C2'H_a and C2'H_b are shown in green.

a**b**

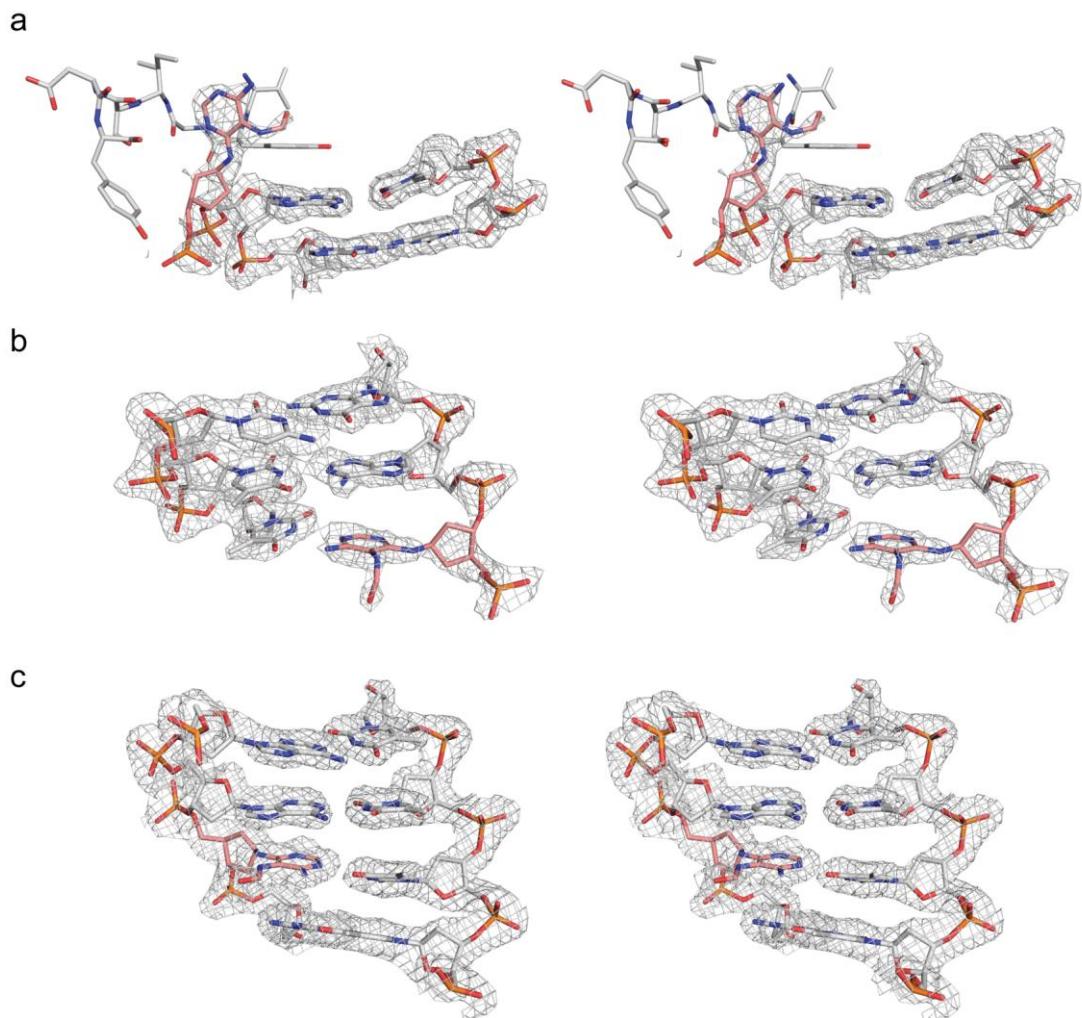
Supplementary Figure 4: NOESY (600 MHz, DMSO- d_6) of dG. The interactions between the C8H and the C3'H and C2'H_a of the *anti*-dG are shown in red and the interactions between the C8H and the C1'H of the *syn*-dG are shown in blue. The reference interactions of C2'H_a and C2'H_b are shown in green.



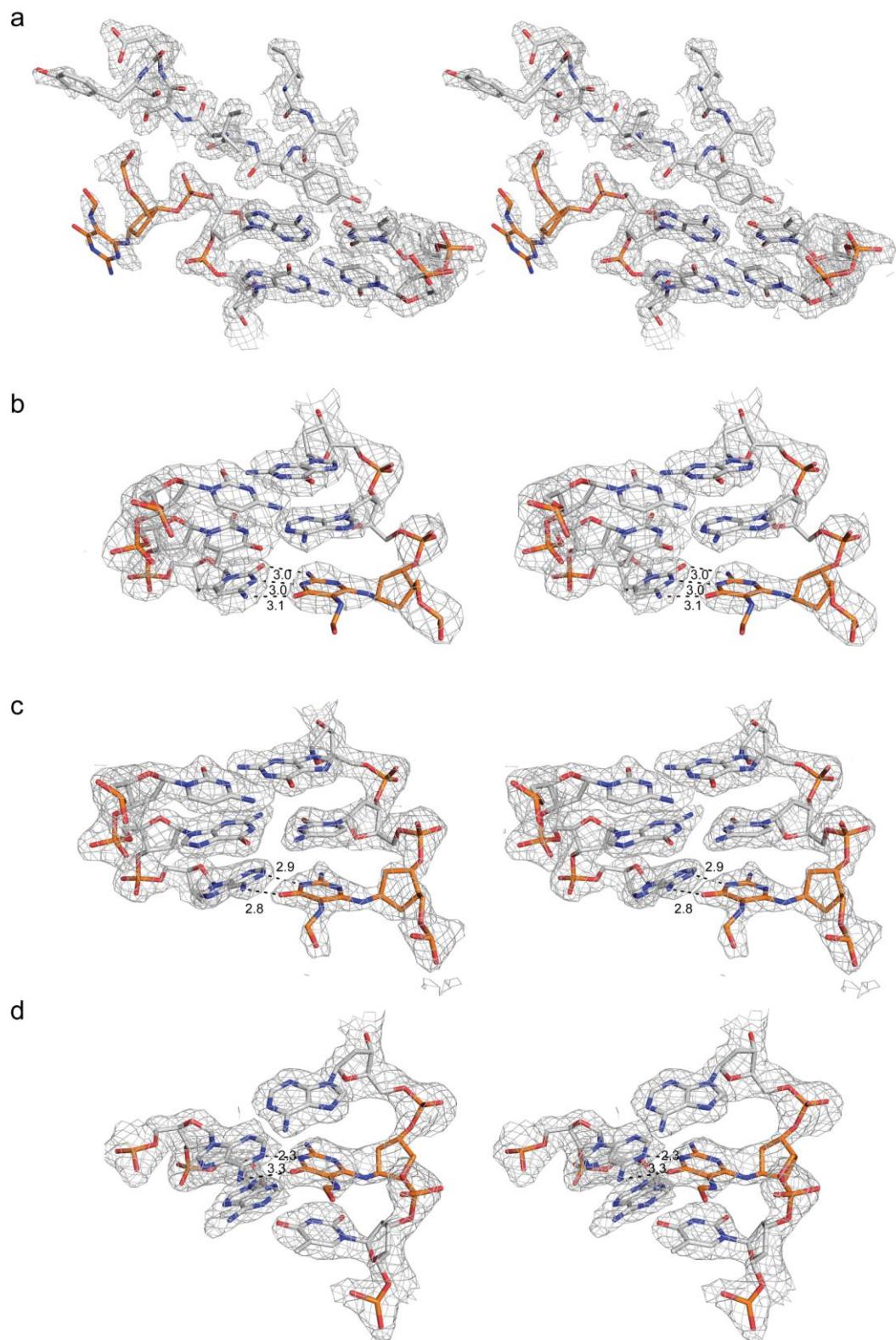
Supplementary Figure 5: Nucleotide insertion and bypass of oxidative lesions. Single nucleotide insertion reactions opposite cFaPydA and cFaPydG in comparison to 8-oxodA and 8-oxodG. f = fluorescein, M=Marker. The primer was hybridized to a lesion-free control DNA or lesion (= X) containing template strand.



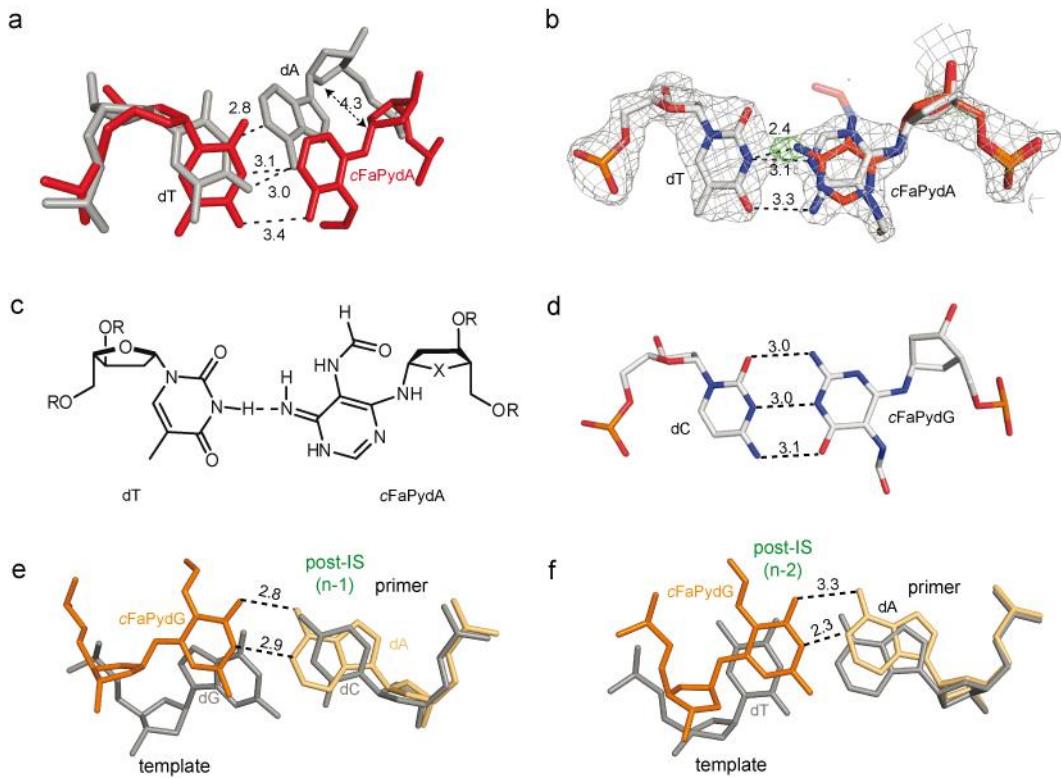
Supplementary Figure 6: Incorporation of dNTP by *G. stearothermophilus* Polymerase I opposite *cFaPydA* and *cFaPydG*. The concentration of *Bst* Pol I and dsDNA was constant throughout the experiment. Experiments were carried out at 55°C.



Supplementary Figure 7: Stereo view of the electron density for the cFaPydA lesion complexes. (a) cFaPydA in the pre-ISM of the polymerase. (b) cFaPydA•dT at the post insertion site (n-1) after a single insertion event. (c) cFaPydA•dT base pair after 3 extension reactions in the crystal at n-3. Composite-omit 2Fo-DFc electron density map is contoured at 1 σ level. The lesion is highlighted in red.

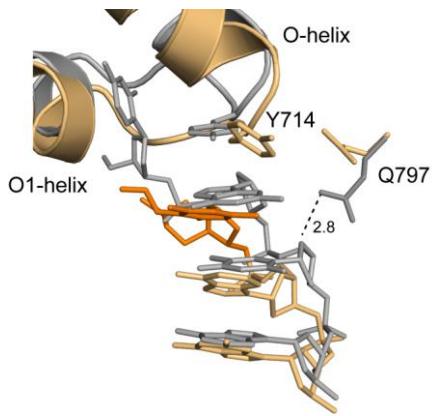


Supplementary Figure 8: Stereo view of the electron density for the cFaPydG lesion complexes.
 a) cFaPydG at the pre-IS. Due to the flexibility only the sugar is defined in the electron density. b) cFaPydG•dC at the post-IS (n-1). Despite the dynamic character of the lesion, which is emphasized by the higher B-factors and weaker electron density, the lesion can be clearly placed. c) cFaPydG•dA mismatch at n-1 and d) n-2. Composite-omit 2Fo-DFc electron density map is contoured at 1σ level. The lesion is highlighted in orange.



Supplementary Figure 9: *Bst* Pol I reading through *cFaPydA*- and *cFaPydG*-containing template DNA.

(a) Comparison of *cFaPydA*•dT (red) with the correct dA•dT base pair (grey; PDB code 1L3T¹) at the post-IS (n-1). Superposition was carried out with the coordinates of the polymerase used as reference frame. (b) Alternative conformation (red) of *cFaPydA* at the post-IS as indicated by the positive 2Fo-DFc difference electron density (green). The 2Fo-DFc (blue) and Fo-DFc (green) electron density are contoured at 1 σ and 2.5 σ , respectively. (c) Depiction of the alternative *cFaPydA*•dT base pair. (d) Structure of the *cFaPydG*•dC base pair. (e) and (f) Structure of *Bst* Pol I in complex with *cFaPydG* after incorporation of a dATP at n-1 (PDB Code 4B9U) and n-2 (PDB code 4B9V). (e) Side view of superimposition with the cognate dG•dC base pair (grey, PDB code 1L5U¹) (f) Side view of superimposition with undamaged DNA (grey; PDB Code 1L5U).



Supplementary Figure 10: Rotamer change of Q797. Superposition of the *Bst* Pol I-DNA complexes of *c*FaPydG•dC (n-1) and dG•dC (PDB code 1L5U). In the complex with the lesion-free DNA Q797 forms a hydrogen bond with the sugar O5 of the base at the post-IS n-2. For clarity the primer strand was removed.

Supplementary Table 1: Quantitative integrals of the interactions between the C8H and the C3'H and C2'H_a of the *anti*-conformers and the C8H and the C1'H of the *syn*-dG. As reference the integral of the C2'H_a and C2'H_b interactions were chosen. In brackets are the integrals divided by the reference integrals.

Interactions	Peak integral (relative integral)	
	Carbocyclic dG	dG
C2H _a -H _b (reference)	464	559
C8H-C1'H	62 (0.13)	74 (0.13)
C8H-C2'H _a	23 (0.06)	33 (0.06)
C8H-C3'H	107 (0.23)	156 (0.28)

Supplementary Table 2: Synthesized oligonucleotides containing the carbocyclic analogues of FaPydA and FaPydG and the 8-oxo-type lesions.

Name	Sequence	M _(calc) (amu)	M _(found) ^a (amu)
Strands for Primer Extension coupled Pyrosequencing			
ODN1-cFaPydA	5'-GTAGCTAGGTCGAT cFaPydA GAGAGACATGCGAGACTGC-3'	10596.8	10598.7
ODN1-cFaPydG	5'-GTAGCTAGGTCGAT cFaPydG GAGAGACATGCGAGACTGC-3'	10612.9	10612.7
ODN1-8-oxodA	5'-GTAGCTAGGTCGAT 8-oxodA GAGAGACATGCGAGACTGC-3'	10597.9	10597.2
ODN1-8-oxodG	5'-GTAGCTAGGTCGAT 8-oxodG GAGAGACATGCGAGACTGC-3'	10612.8	10612.4
ODN1-Primer 1	5'-Biotin-GCAGTCTCGCATGTCTCTC-3'		
ODN1-Primer 2	5'-GTAGCTAGGTCGA-3'		
Strands for Single Nucleotide Insertions and Primer Extensions			
ODN2-cFaPydA	5'-ACT cFaPydA GAGAGACATGCGAGACTGC-3'	7122.6	7124.4
ODN2-cFaPydG	5'-ACT cFaPydG GAGAGACATGCGAGACTGC-3'	7138.9	7139.7
ODN2-8-oxodA	5'-ACT 8-oxodA GAGAGACATGCGAGACTGC-3'	7122.6	7122.0
ODN2-8-oxodG	5'-ACT 8-oxodG GAGAGACATGCGAGACTGC-3'	7138.6	7137.2
ODN2-Primer	3'-CTCTCTGTACGCTCTGACG-fluo-5'		
Strands for Crystallization			
ODN3-cFaPydA	5'-CAG cFaPydA AGAGTCAGGCT-3'	4643.0	4640.4
ODN4-cFaPydA	5'-CAA cFaPydA AGAGTCAGGCT-3'	4626.2	4625.3
ODN5-cFaPydG	5'-CAT cFaPydG AGAGTCAGGCT-3'	4634.0	4632.0
ODN6-cFaPydG	5'-CAA cFaPydG CGAGTCAGGCT-3'	4618.0	4618.8
ODN7-cFaPydA	5'-CAT cFaPydA CGAGTCAGGCT-3'	4593.9	4593.6

^aMALDI-TOF; matrix: hydroxypicolinic acid

Supplementary Table 3: Data collection, processing and structure refinement statistics of the carbocyclic FaPydA-structures.

PDB code	<i>c</i> FaPydA (pre-IS) 4B9L	<i>dT-c</i> FaPydA (n-1) 4B9M	<i>dT-c</i> FaPydA (n-3) 4B9N
Data collection			
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	88.4, 93.7, 105.1	88.4, 93.7, 105.1	88.4, 93.7, 105.1
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	45.4-2.05 (2.16-2.05)	50.0-2.05 (2.2-2.05)	45.9- 2.2 (2.32-2.2)
<i>R</i> _{merge}	0.152 (0.604)	0.061 (0.458)	0.091 (0.586)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	6.6 (2.4)	17.5 (3.9)	16.0 (3.2)
Completeness (%)	99.8 (100)	99.7 (100.0)	99.8 /99.1
Redundancy	4.2 (4.2)	4.1 (4.1)	4.9 (4.9)
Refinement			
Resolution (Å)	45.4-2.05	50.0-2.05	45.9-2.2
No. reflections	54,997	52,362	44,989
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.187 / 0.226	0.18 /0.223	0.183 / 0.2173
No. atoms	5,385	5,384	5,395
Protein	4,683	4,680	4,673
DNA	432	472	433
Water	270	232	289
<i>B</i> -factors			
Protein	45.2	32.0	57.1
DNA	76.9	55.2	110.4
Water	35.4	46.0	42.0
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.009	0.014	0.006
Bond angles (°)	1.21	1.39	1.0

*Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

Supplementary Table 4: Data collection, processing and structure refinement statistics of the carbocyclic FaPydG-structures.

PDB code	<i>c</i> FaPydG (pre-IS) 4B9S	<i>dC-c</i> FaPydG (n-1) 4B9T	<i>dA-c</i> FaPydG (n-1) 4B9U	<i>dA-c</i> FaPydG (n-2) 4B9V
Data collection				
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			
Cell dimensions				
<i>a, b, c</i> (Å)	88.1, 93.7, 105.6	88.3, 93.8, 105.6	88.7, 93.9, 105.6	87.9, 94.0, 105.3
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	46.8-1.75 (1.84-1.75)	45.0-2.65 (2.8-2.65)	46.3-2.1 (2.21-2.1)	47.0-2.0 (2.11-2.0)
<i>R</i> _{merge}	0.043 (0.507)	0.102 (0.474)	0.103 (0.666)	0.060 (0.441)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	24.3 (3.9)	17.6 (4.0)	11.6 (3.3)	18.9 (4.6)
Completeness (%)	99.7 (99.4)	95.3 (97.1)	99.3 (99.0)	99.8 (99.8)
Redundancy	5.9 (6.1)	5.9 (5.8)	4.5 (4.6)	5.9 (6.1)
Refinement				
Resolution (Å)	46.8-1.75	45.0-2.65	46.3-2.1	47.0-2.0
No. reflections	86,204	34,272	49,156	56,504
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.181 / 0.206	0.221 / 0.273	19.1 / 22.4	0.187 / 0.215
No. atoms	5,484	5,201	5,368	5,362
Protein	4,677	4,658	4,658	4,675
DNA	439	473	495	473
Water	358	70	217	206
<i>B</i> -factors				
Protein	26.0	60.7	30.3	30.0
Ligand/ion	39.4	121.0	52.4	55.5
Water	32.0	92.9	34.4	31.4
R.m.s. deviations				
Bond lengths (Å)	0.017	0.011	0.014	0.0139
Bond angles (°)	1.8	1.56	1.6	1.6

*Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

References

1. Johnson, S.J., Taylor, J.S. & Beese, L.S. Processive DNA synthesis observed in a polymerase crystal suggests a mechanism for the prevention of frameshift mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3895-3900 (2003).

Supplementary Note 1

Overview of the synthesis of carbocyclic FaPydA

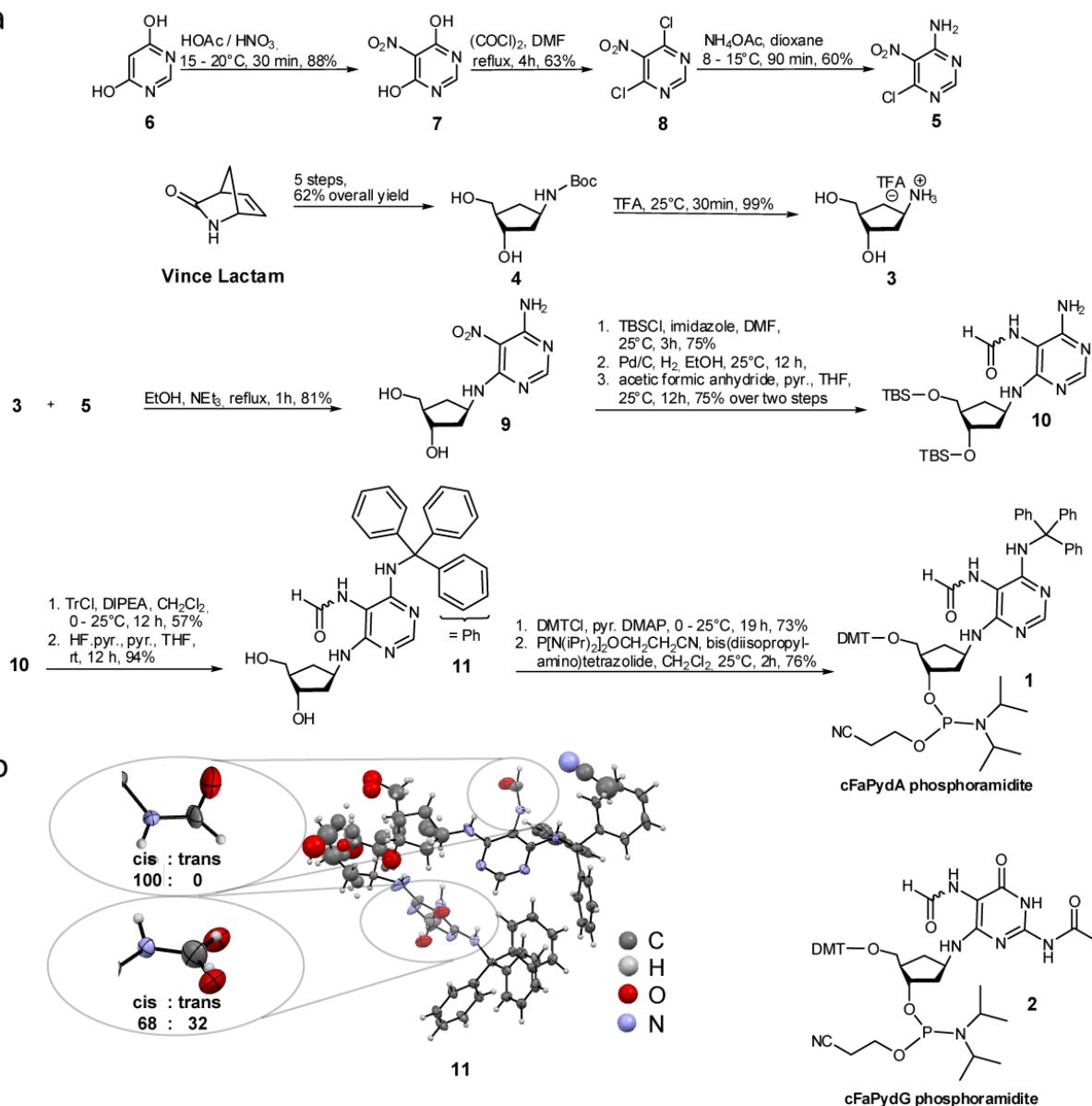
Here we report the synthesis of a new phosphoramidite building block for the preparation of carbocyclic FaPydA containing DNA (*c*FaPydA) **1** (**Supplementary Fig. 1**). Together with the corresponding building block for FaPydG (*c*FaPydG) **2** lesion containing DNA duplexes were prepared and crystallized in complex with the large fragment of the high fidelity polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus*.

For the synthesis of *c*FaPydA we prepared the enantiomerically pure amino cyclopentane unit (**3**) starting from Vince lactam *via* the Boc-protected aminocyclopentane (**4**) (**Supplementary Fig. 1**). The pyrimidine moiety (**5**), which serves as a precursor for the pyrimidine heterocycle, was obtained from 4,6-dihydroxy-pyrimidine (**6**) *via* compound (**7**) and (**8**) in three steps. Coupling of (**3**) and (**5**) was gave compound (**9**) in yields of above 80%. Subsequent protection of the two OH-groups with TBSCl, followed by reduction of the nitro group with Pd/C under hydrogen atmosphere, provided the unstable amine, which was not isolated but *in situ* converted into the formamide (**10**) with formyl acetic anhydride. Due to the directing effect of the two pyrimidine ring nitrogens the formylation occurred exclusively at position N5. Compound (**11**) was obtained after protection of the N4 nitrogen with triphenylmethyl-chloride (TrCl) in pyridine, which is an unusual protecting group for this position. Deprotection of the 3' and 5' OH groups under mild conditions was conducted using HF·pyridine in pyridine. The pseudo- β -furanosidic configuration of the precursor (**11**) was proven by X-ray crystallography. The structural data show the *cis* rotamer of the formamide group to be the main isomer in the crystal (-N5H-CHO) (**Supplementary Figure 1b**). The formamide group adopts a position orthogonal to the pyrimidine ring in order to avoid unfavorable steric interactions. NMR spectroscopic analysis of the compound (**10**) in different solvents confirms a strong solvent-dependency of the *cis/trans* equilibrium with the compound preferring the *cis* conformation as observed in the crystal structure. The rotation barrier calculated from temperature dependent NMR experiments to $71.7 \pm 2.9 \text{ kJmol}^{-1}$ (DMSO- d_6) is in good agreement with literature values for unsubstituted formamide ($75.5 \pm 1.1 \text{ kJmol}^{-1}$, DMSO- d_6) (**Supplementary Fig. 2**).

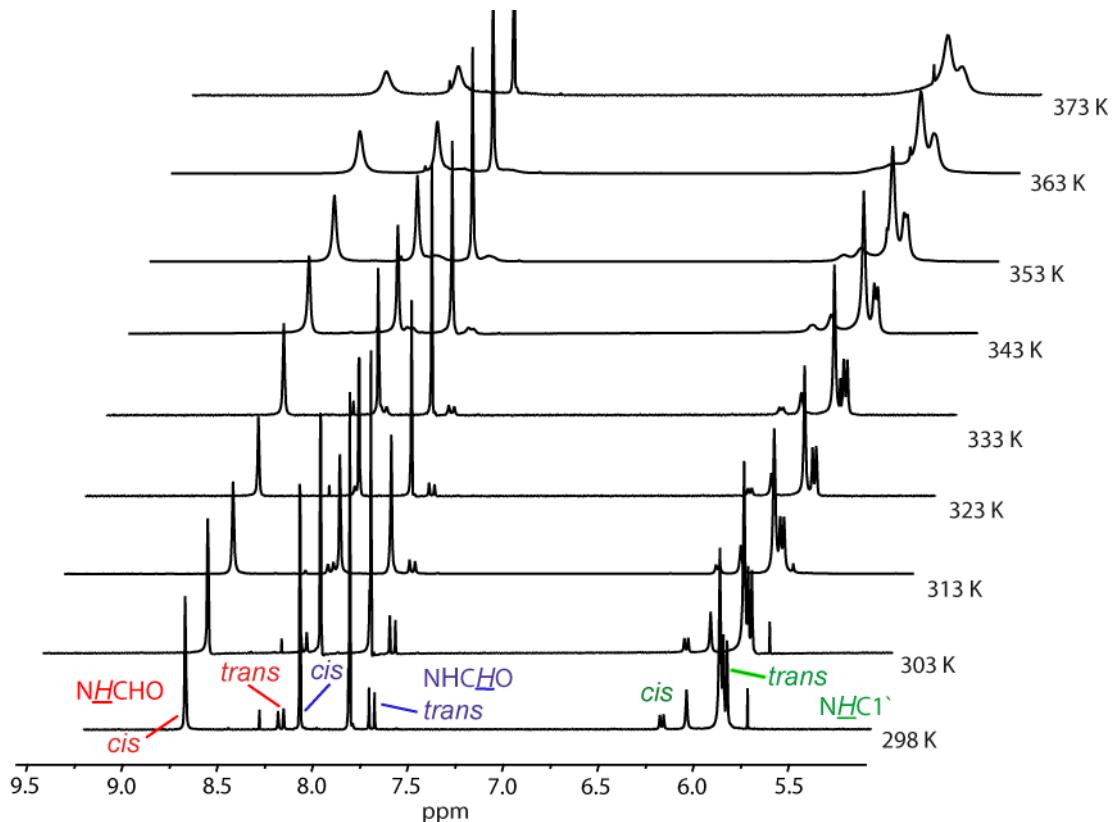
The final functionalization of the 5' hydroxyl group with 4,4'-dimethoxytrityl chloride (DMTCl) for DNA synthesis was carried out under standard conditions followed by conver-

sion of the 3' OH group into the phosphoramidite (**1**) using 3-(bis(diisopropylamino)phosphanoxy)-propanenitrile (for detailed procedures see below).

a



Supplementary Figure 1: (a) Synthesis of the protected carbocyclic lesion analog **cFaPydA** (**1**). The carbocyclic FaPydG (**2**) was synthesized as previously reported. (b) Crystal structure of compound **11** with resolved *cis* and *trans* rotamers of the formamide units.

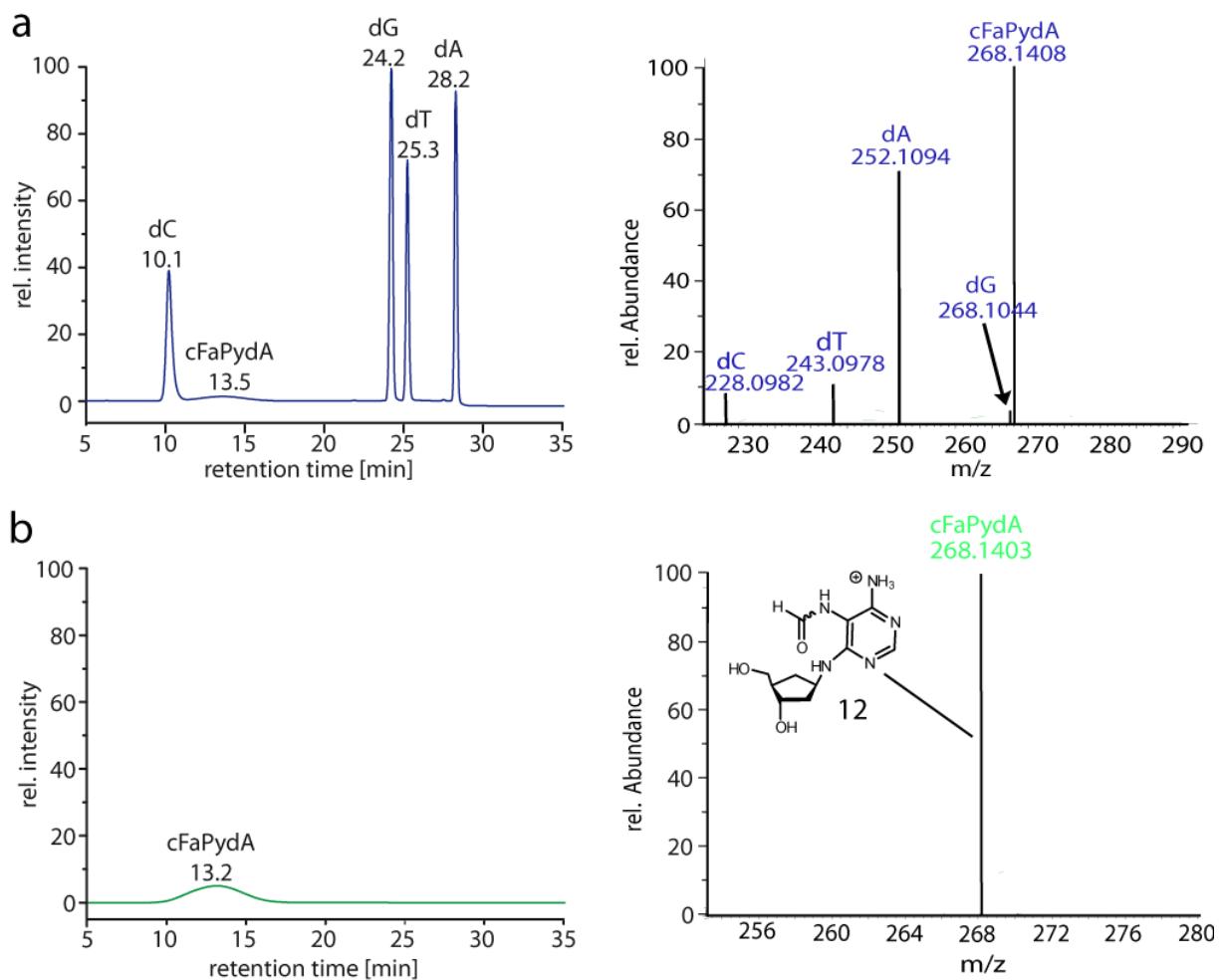


Supplementary Figure 2: ^1H -NMR (400 MHz, DMSO-d_6) of compound **1** at different temperatures. The formamide protons are marked in red and blue. The *cis* protons are shifted upfield due to the anisotropic effect. Protons of the $\text{C}1'\text{NH}$ are highlighted in green.

Both phosphoramidites (**1** and **2**) were subsequently incorporated into different oligonucleotides (**Supplementary Information - Table 2**).

To this end the standard DNA synthesis protocol was adjusted. The coupling time of the carbocyclic FaPy-phosphoramidites was extended from 96 sec to 10 min for the *c*FaPydG compound (**2**) and even to 14 min for the *c*FaPydA (**1**) lesion due to the steric problems associated with the bulky triphenylmethyl (trityl) group of **1**. The acidic deprotection steps during DNA synthesis were shortened in order to avoid cleavage of the acid sensitive trityl group. The DNA was subsequently cleaved from the solid support and deprotected using saturated ammonia solution in ethanol. Final deprotection of the trityl group of **1** was achieved with 80% acetic acid in aqueous solution for 20 min at rt. After precipitation of the DNA purification was performed by HPL-chromatography. Correct incorporation of the *c*FaPydA building block was proven by enzymatic digestion, followed by high resolution LC-MS characterization of the digest (**Supplementary Fig. 3**). In these experiments we detected next to the four canonical nucleotides dA, dC, dG and dT, a fifth broad peak with a retention time of 13.5 min

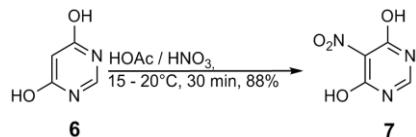
and a molecular weight of $m/z = 268.1408$, is excellent agreement with the expected molecular weight ($m/z = 268.1404$) for the fully deprotected *c*FaPydA compound (**12**) (**Supplementary Fig. 3b**). The broad appearance of the peak is attributed to the *cis/trans* interconversion of the formamide group on the column.



Supplementary Figure 3: (a) HPLC/MS (ESI^+) of the digested oligonucleotide **ODN7** with *c*FaPydA (top, blue), (b) monomeric carbocyclic nucleoside *c*FaPydA **12** (bottom, green). The numbers in the HPLC-chromatograms are retention times in min. The numbers in the mass spectra are the found molecular weights.

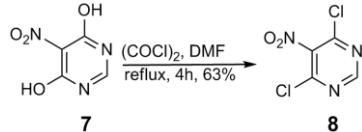
Detailed synthesis of carbocyclic FaPydA nucleoside phosphoramidite 1

4,6-dihydroxy-5-nitropyrimidine 7



To a cooled solution consisting of conc. acetic acid (60 mL) and nitric acid (20 mL) 4,6-dihydroxypyrimidine **6** (20.0 g, 178 mmol) was added slowly over 30 min. The solution was kept between 10 and 20 °C. After stirring for another 30 min between 10 and 20 °C, the solution was additionally stirred for 10 min at rt. The reaction was then poured onto ice (150 mL) and the resulting precipitate was filtered off and dried under high vacuum. 4,6-dihydroxy-5-nitropyrimidine **7** (25 g, 160 mmol) was isolated as a yellow solid. mp: 320 °C(lit °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.72 (s, 1H, H_{Ar}), 13.21 (br s, 2H, 2 x OH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 119.9 (C-NO₂), 150.9 (CH), 155.5 (2 x C-OH); IR (ATR): 3027, 2937, 1726, 1664 1555, 1468, 1350, 1310, 1280, 1196, 884, 788, 631 cm⁻¹; EI-HRMS (m/z): [M]⁺ calcd. for C₄H₃N₃O₄, 157.0118; found, 157.0118.

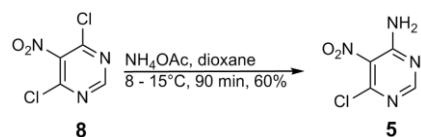
4,6-dichloro-5-nitropyrimidine 8



To a suspension consisting of 4,6-dihydroxy-5-nitropyrimidine **7** (500 mg, 3.18 mmol) and oxalyl chloride (2.0 mL, 22.4 mmol, 7 eq), 1 mL of DMF (12.8 mmol, 4 eq) was added carefully. The reaction mixture was heated under reflux for 4 h while the reaction mixture changed from red to yellow. The mixture was dried under high vacuum and to the resulting solid was added ice (5 mL). The solution was extracted with toluene (3 x 20 mL) and the organic phase was washed another time with water. The organic layer was dried over MgSO₄ and the organic solvent was removed under reduced pressure. 4,6-dichloro-5-nitropyrimidine **8** was recrystallized from *n*-hexane to give colorless plates.

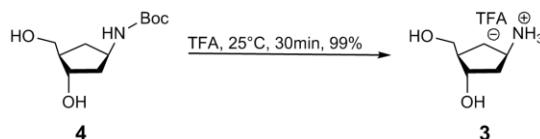
mp: 101 °C; TLC (toluene:EtOAc, 10:1 v/v): R_f = 0.60; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.75 (s, 1H, CH_{Ar}); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 119.9 (C-NO₂), 150.9 (C-H), 155.5 (C-Cl); IR (ATR) 3055, 1682, 1588, 1534, 1428, 1357, 1313, 1127, 1050, 976, 855, 834, 785, 718 cm⁻¹; EI-HRMS (m/z): [M]⁺ calcd. for C₄H³⁵Cl₂N₃, 192.9440; found, 192.9433.

4-amino-6-chloro-5-nitropyrimidine 5



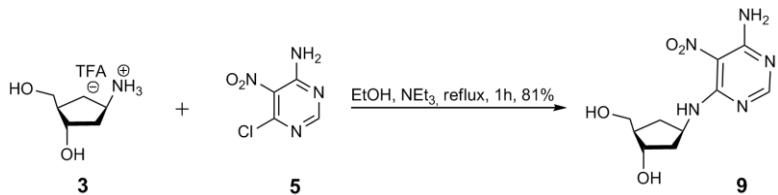
To a suspension of 4,6-dichloro-5-nitropyrimidine **8** (800 mg, 4.12 mmol) in dioxane, kept at 8 °C in an ice bath, a freshly prepared solution of conc. acetic acid (1.6 mL) in ammonium hydroxide (28 %, 3.2 mL) was slowly added *via* syringe pump to the suspension. The solution did not warm up over 15 °C and was stirred for another 90 min under ice cooling. The product was then precipitated by adding ice cold distilled water (18 mL). The resulting yellow solid was filtrated and recrystallized from benzene to separate it from the diaminated product. The recrystallized product **5** could be obtained as small yellow needles (425 mg, 2.43 mmol, 60 %). mp: 155 °C; TLC (CHCl₃:MeOH, 10:1 v/v): R_f = 0.36; FTIR (ATR): 3307, 3144, 1647, 1575, 1519, 1396, 1340, 1233, 1042, 964, 861, 777 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.95 (s, 1H, H_{Ar}), 8.67 – 8.80 (br s, 2H, NH₂); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 115.3 (C_{Ar}), 152.0 (C_{Ar}), 155.4 (C_{Ar}), 160.31 (C_{Ar}); EI-HRMS (m/z): [M]⁺ calcd. for C₄H₃³⁵ClN₄O₂, 173.9945; found, 173.9948.

(1*S*,2*R*,4*R*)-4-ammonium-2-(hydroxymethyl)cyclopentanol-trifluoroacetate 3



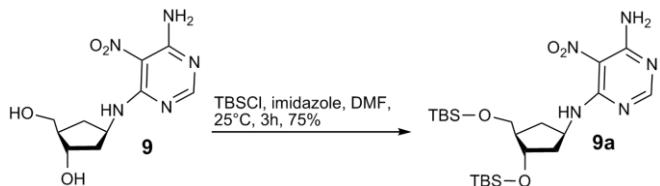
The carbamate *tert*-Butyl *N*-(*1R,3S,4R*)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentylcarbamate **4** was synthesized according to literature from Vince lactam and added to 10 ml of trifluoroacetic acid in water (95:5). The reaction was stirred for 30 min at rt. This was followed by removal of acid and water under reduced pressure. The resulting colorless oil of **3** (420 mg, 1.71 mmol, 99%) was dried under high vacuum overnight and used without any further purification. mp: 3 – 4 °C; FTIR (ATR): 3295, 3045, 2938, 1785, 1668, 1532, 1432, 1392, 1369, 1350, 1178, 1130, 1077, 1017, 920, 880, 839, 798, 777, 722 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O-d₂): δ 1.07 (dt, ²J_{H,H} (C5'H_b,C5'H_a) = 13.3 Hz, ³J_{H,H} (C5'H_b,C1'H,C4'H) = 9.1 Hz, 1 H, C5'H_b), 1.63–1.70 (m, 1 H, C2'H_b), 1.72–1.81 (m, 2 H, C2'H_a, C4'H), 2.03–2.11 (m, C5'H_a), 3.27 (dd, ²J_{H,H} (C1'H_b,C1'H_a) = 11.1 Hz, ³J_{H,H} (C1'H_b,C4'H) = 6.27 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.33 (dd, ²J_{H,H} (C1'H_a,C1'H_b) = 11.2 Hz, ³J_{H,H} (C1'H_a,C4'H) = 5.8 Hz, 1 H, C1'H_a), 3.44–3.52 (m, 1 H, C1'H), 3.83 (m, 1H, C3'H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O-d₂): δ 30.24 (C'5), 38.95 (C'2), 48.90 (C'4), 49.65 (C'1), 63.18 (C''1), 73.08 (C'3), 116.60 (q, TFA), 164.20 (q, TFA); ¹⁹F NMR (200 MHz, D₂O-d₂): δ -76.30 (s, 3 F, CF₃CO₂⁻); EI-HRMS (m/z): [M + H⁺]: calcd. for [C₆H₁₃NO₂+H]⁺, 132.1019; found, 132.1020.

N-4-[(1'R,3'S,4'R)-3'-Hydroxy-4'-(hydroxymethyl)-cyclopentyl]amino}-5-nitro-6-amino-pyrimidine 9.



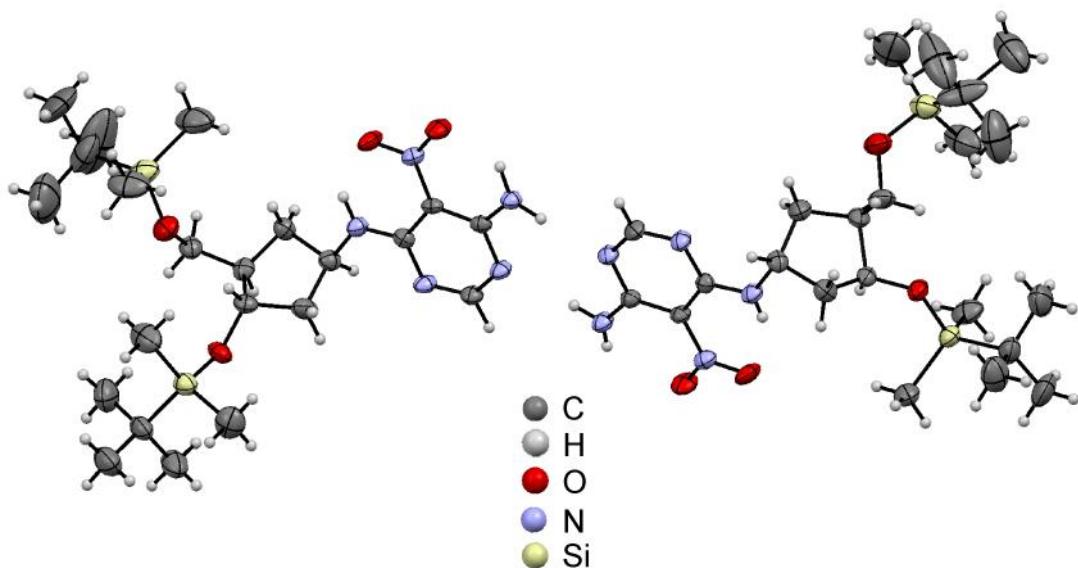
The crude oil of **3** (420 mg, 1.71 mmol), was dissolved in 2.1 mL of dry ethanol, and 4-amino-6-chloro-5-nitropyrimidine **5** (302 mg, 1.73 mmol, 1 eq) together with triethylamine (1.68 mL, 12.1 mmol, 7 eq) was added. The mixture was refluxed for 1 h. After cooling to room temperature, the resulting yellow precipitate **9** (377 mg, 1.40 mmol, 81 %) was filtered, washed with ethanol, dried under high vacuum and used in the following reaction without any further purification. mp: decomp. > 169 °C; TLC (CHCl₃:MeOH, 4:1 v/v): R_f = 0.40; FTIR (ATR): 3447, 2928, 1651, 1605, 1515, 1398, 1369, 1257, 1137, 1043, 1004, 794, 586, 557, 425 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.24–1.34 (m, 1 H, C5'H_a), 1.76 (ddd, ²J_{H-H} (C2'H_b,C2'H_a) = 13.2 Hz, ³J_{H-H} (C2'H_b, C1'H) = 7.72 Hz, ³J_{H-H} (C2'H_b, C3'H) = 6.53 Hz, 1 H, C2'H_b), 1.85–1.93 (m, 2 H, C2'H_a, C4'H), 2.25 (dt, ²J_{H-H} (C2'H_a,C2'H_b) = 13.0 Hz, ³J_{H-H} (C2'H_a,C1'H,C3'H) = 8.1 Hz), 1.31 (dt, ²J_{H-H} (C5'H_a,C5'H_b) = 13.1 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_a,C1'H,C4'H) = 7.88 Hz, 1 H, C5'H_a), 3.38 (dd, ²J_{H-H} (C1'H_b,C1'H_a) = 10.5 Hz, ³J_{H-H} (C1'H_b,C4'H) = 5.72 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.44 (dd, ²J_{H-H} (C1'H_a,C1'H_b) = 10.5 Hz, ³J_{H-H} (C1'H_a,C4'H) = 5.50 Hz, 1 H, C1'H_a), 3.96 (dt, ³J_{H-H} (C3'H,C2'H_b) = 6.25 Hz, ³J_{H-H} (C3'H,C2'H_a,C4'H) = 4.41 Hz, 1 H, C3'H), 4.60 (br, 2 H, 2 x OH), 4.71 (m, 1 H, C1'H), 7.97 (s, 1 H, C1H), 8.51 (br, 1 H, NH), 8.58 (br, 1 H, NH), 9.15 (d, ³J_{H-H} (C1'NH, C1'H) = 7.52 Hz, 1 H, C1'NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 34.11 (C'5), 41.50 (C'2), 48.90 (C'4), 50.12 (C'1), 62.52 (C'1), 72.08 (C'3), 111.68 (C5), 155.99 (C6), 158.77 (C4), 159.42 (C2); ESI-HRMS (m/z): [M + H⁺] calcd. for [C₁₀H₁₅N₅O₄+H]⁺, 270.1197; found, 270.1199.

N-4-[(1'R,3'S,4'R)-3'-[(tert-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl]-cyclopentyl]amino}-5-nitro-6-amino-pyrimidine 9a.



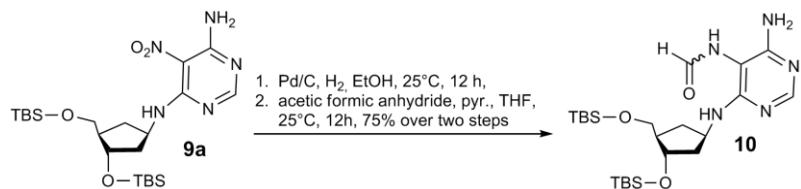
Compound **9** (450 mg, 0.90 mmol) was dissolved in dry DMF (15 mL). To the solution was given imidazole (184 mg, 2.71 mmol, 3 eq) and *tert*-butyldimethylsilylchloride (408 mg, 2.71 mmol, 3 eq) and the reaction was stirred at rt for 3 h. After complete conversion of the starting material, the reaction mixture was diluted with ethylacetate (125 mL) and washed with saturated NaHCO₃ (125 mL) and brine (4 x 125 mL.). The combined aqueous phases were extracted once again with 100 mL of ethylacetate. The collected organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified *via* column chromatography (CHCl₃ : MeOH 20:1 → 10:1). The product was obtained as a yellow solid (336 mg, 0.68 mmol, 75 %). Crystals for X-ray analy-

sis were received by dissolving **9a** in *n*-heptane at 40 °C. After slowly cooling the solution to rt, **9a** crystallized in colorless plates over a period of 14 days at rt (**Supplementary Figure 4**). mp: 50 °C; TLC (CHCl₃:MeOH, 10:1 v/v): R_f = 0.59; FTIR (ATR): 3397, 3344, 3274, 3122, 2953, 2927, 2855, 1583, 1546, 1522, 1471, 1390, 1358, 1247, 1116, 1094, 1038, 1006, 960, 936, 870, 832, 796, 775 cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 0.03 (s, 3 H, Si-CH₃), 0.04 (s, 3 H, Si-CH₃), 0.04 (s, 3 H, Si-CH₃), 0.04 (s, 3 H, Si-CH₃), 0.87 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 0.88 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 1.31 (dt, ²J_{H-H} (C5'H_b,C5'H_a) = 13.1 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_b,C1'H,C4'H) = 8.8 Hz, 1 H, C5'H_b), 1.75 (ddd, ²J_{H-H} (C2'H_b,C2'H_a) = 13.1 Hz, ³J_{H-H} (C2'H_b,C1'H) = 7.7 Hz, ³J_{H-H} (C2'H_b,C3'H) = 6.7 Hz, 1 H, C2'H_b), 2.04 (m, 1 H, C4'H), 2.09 (ddd, ²J_{H-H} (C2'H_a,C2'H_b) = 12.6 Hz, ³J_{H-H} (C2'H_a,C1'H) = 7.8 Hz, ³J_{H-H} (C2'H_a,C3'H) = 4.4 Hz, 1 H, C2'H_a), 1.31 (dt, ²J_{H-H} (C5'H_a,C5'H_b) = 13.1 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_a,C1'H,C4'H) = 7.88 Hz, 1 H, C5'H_a), 3.56 (dd, ²J_{H-H} (C1'H_b,C1'H_a) = 10.1 Hz, ³J_{H-H} (C1'H_b,C4'H) = 5.0 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.61 (dd, ²J_{H-H} (C1'H_a,C1'H_b) = 10.1 Hz, ³J_{H-H} (C1'H_a,C4'H) = 5.0 Hz, 1 H, C1'H_a), 4.17 (m, 1 H, C3'H), 4.77 (m, 1 H, C1'H), 7.20 (br, 1 H, NH), 8.01 (s, 1 H, C1H), 8.57 (br, 1 H, NH), 9.02 (d, ³J_{H-H} (C1'NH, C1'H) = 7.2 Hz, 1 H, C1'NH); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ -5.49 (Si-CH₃), -5.41 (Si-CH₃), -4.78 (Si-CH₃), -4.61 (Si-CH₃), 17.98 (Si-C(CH₃)₃), 18.31 (Si-C(CH₃)₃), 25.80 (Si-C(CH₃)₃), 25.91 (Si-C(CH₃)₃), 33.97 (C'5), 42.20 (C'2), 49.75 (C'4), 50.27 (C'1), 63.27 (C'1), 73.10 (C'3), 112.69 (C5), 156.57 (C6), 159.33 (C4), 159.48 (C2); ESI-HRMS (m/z): [M + H⁺] calcd. for [C₂₂H₄₃N₅O₄Si₂+H]⁺, 498.2926; found, 498.2926.



Supplementary Figure 4: Crystal structure of compound **9a** recrystallized from *n*-heptane.

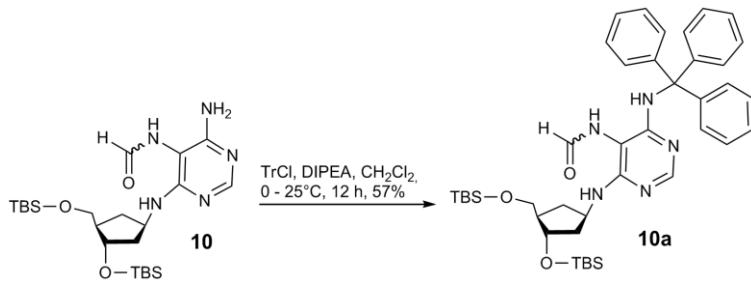
N-4-{[(1'R,3'S,4'R)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-{[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl}-cyclopentyl]amino}-5-formylamino-6-amino-pyrimidine 10.



The silylether **9a** (200 mg, 0.40 mmol) was dissolved in dry ethanol (5 mL) and the reaction mixture was degassed carefully. The solution was given to a degassed suspension of Pd/C (100 mg) in dry ethanol (5 mL). The mixture was flushed with hydrogen and stirred for 3 h under the hydrogen atmosphere (1.2 bar) at rt. Under exclusion of oxygen, the charcoal and palladium were filtered off, using a 0.2 μ m nylon syringe filter (MilliporeTM). The solvent was evaporated under reduced pressure at rt and the air sensitive amine was carefully co-evaporated three times using dry pyridine (3 x 1 mL) under high vacuum. The amine was then dissolved in 10 mL of degassed THF (abs.), 815 μ L of dry pyridine were added and the solution was cooled to 0 °C. Meanwhile a solution consisting of formic acid (501 μ L) and acetic acid anhydride (1.28 mL) was heated to 60 °C for 15 min and the mixed anhydride was afterwards cooled to 0 °C and carefully degassed. From this solution 617 μ L of the mixed anhydride were promptly added to the amine and the reaction was stirred at 0 °C overnight reaching rt. After evaporation of the solvents the resulting crude reaction mixture was purified by column chromatography (CHCl₃:MeOH 20:1 → 10:1). The resulting formamide **10** could be obtained as white foam (147 mg, 0.30 mmol, 75 % over two steps). The *cis*- and *trans*-formamide ratio in DMSO was 3:1 and in CDCl₃ 1:1. mp: 141 – 143 °C; TLC (CHCl₃:MeOH 10:1 v/v): R_f = 0.19; FTIR (ATR): 3338, 2929, 2856, 1685, 1589, 1501, 1470, 1360, 1327, 1250, 1077, 1005, 938, 832, 772, 667 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 0.03 (s, 12 H, 4 x Si-CH₃), 0.87 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 0.87 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 1.10 (ddd, ²J_{H-H} (C5'H_b,C5'H_a) = 12.6 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_b,C1'H,C4'H) = 9.3 Hz, 1 H, C5'H_b), 1.68–1.82 (m, 2 H, C2'H_b,C2'H_a), 1.84–1.92 (m, 1 H, C4'H), 2.11 (ddd, ²J_{H-H} (C5'H_a,C5'H_b) = 12.8 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_a,C1'H,C4'H) = 9.3 Hz, 1 H, C5'H_a), 3.51 (dd, ²J_{H-H} (C1'H_b,C1'H_a) = 9.5 Hz, ³J_{H-H} (C1'H_b,C4'H) = 5.0 Hz, 1 H, C1'H_b), 3.55 (dd, ²J_{H-H} (C1'H_a,C1'H_b) = 9.5 Hz, ³J_{H-H} (C1'H_a,C4'H) = 5.3 Hz, 1 H, C1'H_a), 4.08 (ddd, ³J_{H-H} (C3'H,C2'H_a) = 7.2 Hz, ³J_{H-H} (C3'H,C2'H_b,C4'H) = 4.30 Hz, 1 H, C3'H), 4.50 (m, 1 H, C1'H), 5.86 (d, ³J_{H-H} (C1'NH, C1'H) = 7.80 Hz, 0.75 H, [cis-formamide]C1'NH), 5.89 (br, 1 H, NH), 6.07 (br, 1 H, NH), 6.20 (d, ³J_{H-H} (C1'NH,C1'H) = 7.80 Hz, 0.25 H, [trans-formamide]C1'NH), 7.72 (d, ³J_{H-H} (NHCHO,NHCHO) = 11.6 Hz, 0.25 H [trans-Formamide]NHCHO, 7.84 (s, 0.75 H, [cis-formamide]C2H), 7.84 (s, 0.25 H, [trans-formamide]C2H), 8.10 (d, ³J_{H-H} (NHCHO,NHCHO) = 1.40 Hz, 0.75 H [cis-formamide]NHCHO, 8.20 (d, ³J_{H-H} (NHCHO,NHCHO) = 11.8 Hz, 0.25 H [trans-formamide]NHCHO, 8.70 (d, ³J_{H-H} (NHCHO,NHCHO) = 1.0 Hz, 0.75 H [cis-formamide]NHCHO); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ -5.44 (Si-CH₃), -5.42 (Si-CH₃), -4.82 (Si-CH₃), -4.62 (Si-CH₃), 17.71 (Si-C(CH₃)₃), 18.00 (Si-C(CH₃)₃), 25.72 (Si-C(CH₃)₃), 25.80 (Si-C(CH₃)₃), 33.67 ([trans-formamide]C'5), 33.82 ([cis-formamide]C'5), 40.73 ([trans-formamide]C'2), 41.40 ([cis-formamide]C'2), 48.69 (C'1), 49.49 ([trans-formamide]C'4), 49.53 ([cis-formamide]C'4), 63.74 ([cis-formamide]C'1), 63.85 ([trans-formamide]C'1), 72.84 ([cis-formamide]C'3), 72.94 ([trans-formamide]C'3), 93.99 ([cis-formamide]C5),

94.18 ([*trans*-formamide]C5), 155.46 ([*cis*-formamide]C2), 155.89 ([*trans*-formamide]C2), 157.72 ([*cis*-formamide]C4), 158.69 ([*cis*-formamide]C6), 159.08 ([*trans*-formamide]C4), 160.25 ([*trans*-formamide]C6), 160.92 ([*cis*-formamide]CHO), 165.58 ([*trans*-formamide]CHO); ESI-HRMS (m/z): [M + H⁺] calcd. for [C₂₃H₄₅N₅O₃Si₂+H]⁺; 496.3134; found, 496.3131.

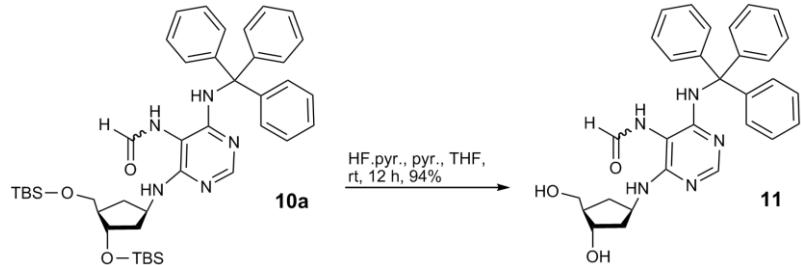
N-4-{[(1'R,3'S,4'R)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-{[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl}-cyclopentyl]amino}-5-formylamino-6-tritylamino-pyrimidine 10a



The protected silyl ether **10** (555 mg, 1.12 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ and stirred in a Schlenk-flask over molecular sieve (4 Å) for 30 min. The solution was cooled in an ice bath and triphenylmethyl chloride (376 mg, 1.35 mmol, 1.2 eq) was added to the solution. The mixture was stirred overnight reaching rt. The solvent was removed under vacuum and the crude product was purified *via* column chromatography (CHCl₃:MeOH: 200:1 → 20:1). The resulting product **10a** could be isolated as white foam (462 mg, 0.63 mmol, 57 %). The *cis*- and *trans*- formamide ratio in AcCN was 2:1 in CDCl₃ both conformers were observed in a ratio of 1:1. mp: 133 – 134 °C; TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1 v/v): R_f = 0.48; FTIR (ATR): 3335, 2914, 2360, 2336, 2060, 2009, 1678, 1588, 1478, 1442, 1326, 1266, 1184, 1155, 1032, 899, 748, 728, 698, 655, 636, 626, 614 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, MeCN-d₃): δ 0.05 (s, 4 H, [*cis*-Formamide]Si-CH₃), 0.06 (s, 8 H, [*trans*-Formamide]Si-CH₃), 0.88 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 0.90 (s, 9 H, Si-C(CH₃)₃), 1.09–1.17 (m, 1 H, C5'H_b), 1.65 (ddd, ²J_{H-H}(C2'H_b,C2'H_a) = 13.0 Hz, ³J_{H-H}(C2'H_b,C1'H) = 8.6 Hz, ³J_{H-H}(C2'H_b,C3'H) = 6.6 Hz, 1 H, C2'H_b), 1.84–1.96 (m, 2 H, C2'H_a,C4'H), 2.14–2.22 (m, 1 H, C5'H_a), 3.50 (d, ²J_{H-H}(C1''H_b,C1''H_a) = 5.6 Hz, 0.5 H, [*trans*-formamide]C1''H_b,C1''H_a), 3.58 (d, ²J_{H-H}(C1''H_b,C1''H_a) = 5.7 Hz, 1.5 H, [*cis*-formamide]C1''H_b,C1''H_a), 4.12–4.16 (dt, ³J_{H-H}(C3'H,C2'H_b) = 6.6 Hz, ³J_{H-H}(C3'H,C2'H_a,C4'H) = 4.3 Hz, 1 H, C3'H), 4.43–4.54 (m, 1 H, C1'H), 5.14 (d, ³J_{H-H}(C1'NH, C1'H) = 7.6 Hz, 0.75 H, [*cis*-formamide]C1'NH), 5.40 (d, ³J_{H-H}(C1'NH, C1'H) = 7.7 Hz, 0.25 H, [*trans*-formamide]C1'NH), 6.93 (d, ³J_{H-H}(NHCHO,NHCHO) = 11.7 Hz, 0.25 H, [*trans*-formamide]NHCHO), 7.18–7.28 (m, 10 H, -Trityl), 7.31–7.34 (m, 5 H, -Trityl), 7.42 (s, 0.75 H, [*cis*-formamide]NHCHO), 7.51 (s, 0.25 H, [*trans*-formamide]C2H), 7.59 (s, 0.75 H, [*cis*-formamide]C2H), 7.92 (d, ³J_{H-H}(NHCHO,NHCHO) = 11.7 Hz, 0.25 H, [*trans*-formamide]NHCHO), 8.32 (d, ³J_{H-H}(NHCHO,NHCHO) = 1.2 Hz, 0.75 H, [*cis*-formamide]NHCHO), 9.02 (br, 0.25 H, [*trans*-formamide]NH), 9.04 (br, 0.75 H, [*cis*-formamide]NH); ¹³C NMR (100 MHz, MeCN-d₃): δ -4.73 (Si-CH₃), -4.71 (Si-CH₃), -4.02 (Si-CH₃), -3.83 (Si-CH₃), 19.08 (Si-C(CH₃), 19.41 (Si-C(CH₃), 26.69 (Si-C(CH₃)₃, 26.79 (2 x Si-C(CH₃)₃, 26.85 (Si-C(CH₃)₃, 35.50 (C5'), 43.10 (C2'), 50.83 (C1'), 51.34 (C4'), 65.29 (C1''), 71.77 (Cq from -trityl), 74.75 (C3'), 97.66 (C5), 127.91 (CH-Trityl), 128.98 (CH-Trityl), 130.2 (CH-Trityl), 147,35 (C- from Trityl), 155,93 (C2), 158,28 (C4), 158,99 (C6),

162.58 (CHO); ESI-HRMS (m/z): [M + H⁺] calcd. for [C₄₂H₅₉N₅O₃Si₂+H]⁺, 738.4229; found, 738.4238.

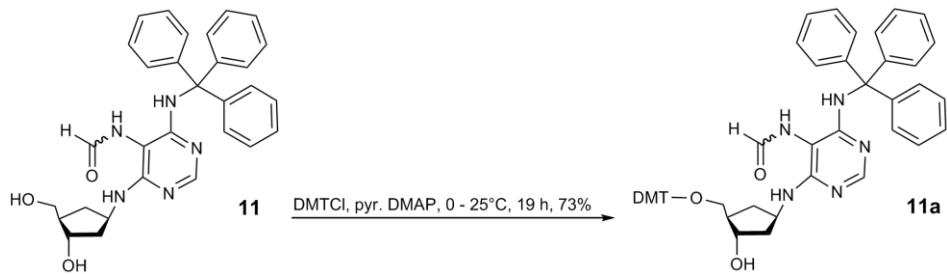
N-4-{[(1'R,3'S,4'R)-3'-hydroxy-4'-(hydroxymethyl)cyclopentyl]amino}-5-formylamino-6-tritylamino-pyrimidine 11



The silylether **10a** (3 x 125 mg, 3 x 169 μ mol) and dry tetrahydrofuran (3 x 3.5 mL) were given into three sealable polypropylene tubes. Dry pyridine (3 x 131 μ L) and HF·pyridine complex (~ 65% HF content, 3 x 131 μ L) were added, and the sealed tubes were stirred overnight at room temperature. To the reaction was given methoxytrimethylsilane (3 x 405 μ L) and the reaction mixtures were stirred again for 2 h. Afterwards the solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting white solid was dried *in vacuo*. The diol was purified *via* column chromatography (chloroform: methanol: 20:1 \rightarrow 10:1) (243 mg, 477 μ mol, 94%). Crystals suitable for X-ray analysis were obtained by dissolving **11** in acetonitrile and appeared after 7 days at rt as colorless crystals (**Supplementary Fig. 1b**).

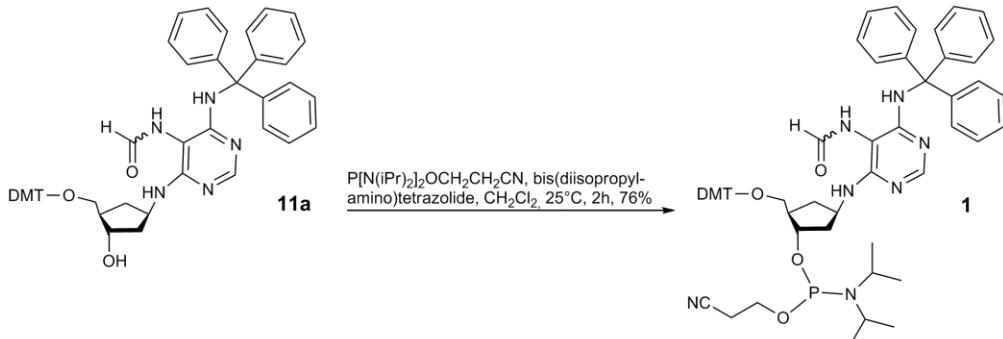
TLC (CHCl₃:MeOH, 10:1 v/v): R_f = 0.12; FTIR (ATR): 3423, 2956, 2928, 3856, 2360, 1725, 1700, 1580, 1492, 1470, 1443, 1255, 1117, 1073, 1038, 1004, 938, 874, 834, 773, 745 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, MeCN-d₃): δ 1.17 (dt, ²J_{H-H}(C5'H_b,C5'H_a) = 13.0 Hz, ³J_{H-H}(C5'H_b,C1'H,C4'H) = 8.3, 1 H, C5'H_b, 1.69 (m, 1 H, C2'H_b), 1.82–1.96 (m, 2 H, C2'H_a,C4'H), 2.20 (dt, ²J_{H-H}(C5'H_a,C5'H_b) = 12.9 Hz, ³J_{H-H}(C5'H_b,C1'H,C4'H) = 8.3, 1 H, C5'H_a, 3.47–3.55 (m, 2 H, C1'H_b,C1'H_a), 4.00–4.04 (m, 1 H, C3'H), 4.41–4.50 (m, 1 H, C1'H), 5.35 (d, ³J_{H-H}(C1'NH,C1'H) = 7.67 Hz, 0.75 H, [cis-formamide]C1'NH), 5.95 (d, ³J_{H-H}(C1'NH,C1'H) = 7.7 Hz, 0.25 H, [trans-formamide]C1'NH), 6.99 (d, ³J_{H-H}(NHCHO,NHCHO) = 11.4 Hz, 0.25 H [trans-formamide]NHCHO), 7.18–7.22 (m, 3 H, 3 x *para*-H of trityl), 7.24–7.29 (m, 6 H, 6 x CH-Trityl), 7.31–7.35 (m, 6 H, 6 x CH-Trityl), 7.50 (s, (NHCHO,NHCHO), 0.75 H [cis-formamide]NHCHO), 7.51 (s, 0.75 H, [cis-formamide]C2H), 7.59 (s, 0.25 H, [trans-formamide]C2H), 7.92 (d, ³J_{H-H}(NHCHO,NHCHO) = 11.75 Hz, 0.25 H, [trans-formamide]NHCHO), 8.31 (d, ³J_{H-H}(NHCHO,NHCHO) = 1.16 Hz, 0.75 H, [cis-formamide]NHCHO), 8.57 (br, 1 H, NH), 2 x OH not observed; ¹³C NMR (100 MHz, MeCN-d₃): δ 35.76 (C5'), 43.09 (C2'), 50.44 (C4'), 50.94 (C1'), 65.04 (C1'H), 71.73 (C- from Trityl), 74.77 (C3'), 97.61 (C5), 127.89 (CH-Trityl), 128.96 (CH-Trityl), 130.18 (CH-Trityl), 147.35 (CH- from Trityl), 155.11 (C2), 155.90 (C4), 158.27 (C6), 162.65 (CHO); ESI-HRMS (m/z): [M + H⁺] calcd. for [C₃₀H₃₁N₅O₃+H]⁺, 510.2500; found, 510.2503.

N-4-[(1'R,3'S,4'R)-4'-{[(Dimethoxytrityl)oxy]methyl}-3'-hydroxycyclopentyl]amino}-5-(formylamino)-6-tritylamino-pyrimidine 11a



Compound **11** (214 mg, 0.42 mmol) was dissolved two times in dry pyridine (2 x 1 mL) and concentrated *in vacuo* two times. The residue was dissolved again in dry pyridine (8.5 mL) and stirred for 12 h over 4 Å molecular sieves. The solution was then cooled in an ice bath and dimethoxytritylchloride (DMTCI) (86 mg, 0.25 mmol, 0.6 eq) was given to the solution. After another hour additional DMTCI (86 mg, 0.25 mmol, 0.6 eq) was added. The mixture was stirred for another hour at 0 °C and finally for 18 h at rt. The reaction was terminated adding 5 mL of MeOH. The molecular sieves were filtered off and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting crude yellow product was purified *via* column chromatography using a CHCl₃:MeOH gradient: 200:1 → 100:1 → 50:1 → 10:1 with 0.5% pyridine. Compound **11a** was isolated as a white foam (249 mg, 0.31 mmol, 73 %); mp: 60–61 °C; (CHCl₃:MeOH, 20:1 v/v): R_f = 0.29; FTIR (ATR): 3444, 2968, 2915, 2836, 2360, 2338, 1724, 1607, 1508, 1456, 1446, 1285, 1244, 1175, 1152, 1136, 1068, 1030, 982, 903, 861, 822, 791, 726, 704, 651 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, MeCN-d₃): δ 1.17 (dt, ²J_{H-H}(C5'H_b,C5'H_a) = 12.6 Hz, ³J_{H-H}(C5'H_b,C1'H,C4'H) = 9.6 Hz, 1 H, C5'H_b), 1.69 (ddd, ²J_{H-H}(C2'H_b,C2'H_a) = 13.4 Hz, ³J_{H-H}(C2'H_b,C1'H,C5'H_b) = 8.1 Hz, ³J_{H-H}(C2'H_b,C1'H,C5'H_a) = 7.2 Hz, 1 H, C2'H_b), 1.86–1.92 (m, 1 H, C2'H_a), 1.99–2.10 (m, 1 H, C4'H), 2.23–2.33 (m, 1 H, C5'H_a), 3.01–3.05 (m, 1 H, C1''H_b), 3.07–3.10 (m, 1 H, C1''H_a), 3.77 (s, 6 H, 2 x OCH₃), 3.94–4.03 (m, 1 H, C3'H), 4.43–4.53 (m, 1 H, C1'H), 5.20 (d, ³J_{H-H} (C1'NH,C1'H) = 7.6 Hz, 0.75 H, [cis-Formamide]C1'NH), 5.43 (d, ³J_{H-H} (C1'NH,C1'H) = 7.7 Hz, 0.25 H, [trans-Formamide]C1'NH), 6.09 (s, 1 H, OH), 6.85–6.89 (m, 4 H, 4 x *meta*-H of *para*-CH₃OPh), 6.99 (d, ³J_{H-H} (NHCHO,NHCHO) = 12.0 Hz, 0.25 H [trans-formamide]NHCHO), 7.18–7.23 (m, 5 H, CH- of DMT and Trityl), 7.24–7.35 (m, 20 H, CH- of DMT and Trityl), 7.49 (s, 0.75 H, [cis-formamide]NHCHO), 7.53 (s, 1 H, C2H), 7.92 (d, ³J_{H-H}(NHCHO,NHCHO) = 11.7 Hz, 0.25 H, [trans-formamide]NHCHO), 8.34 (d, ³J_{H-H}(NHCHO,NHCHO) = 1.1 Hz, 0.75 H, [cis-Formamide]NHCHO), 8.58 (br, 1 H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, MeCN-d₃): δ 36.38 (C5'), 42.52 (C2'), 48.55 (C4'), 50.41 (C1'), 55.97 (2 x OCH₃) 66.28 (C1''), 71.42 (C- from Trityl), 74.31 (C3'), 68.69 (C- from DMT), 97.32 (C5), 114.06 (4 x *meta*-C of *p*-CH₃OPh), 127.55 (CH- from Trityl), 128.63 (CH- from Trityl), 128.84 (CH- from DMT), 129.13 (C from DMT), 129.85 (CH- from Trityl), 131.05 (CH- from DMT), 131.06 (CH- from DMT), 132.29 (CH- from DMT), 137.43 (CH- from DMT), 137.48 (CH- from DMT), 146.54 (CH- from DMT), 147.00 (C- from Trityl), 155.58 (C2), 157.91 (C4), 158.59 (C6), 159.64 (C- from DMT), 162.29 (CHO); ESI-HRMS (m/z): [M + H⁺] calcd. for [C₅₁H₄₉N₅O₅+H]⁺, 812.3806; found, 812.3813.

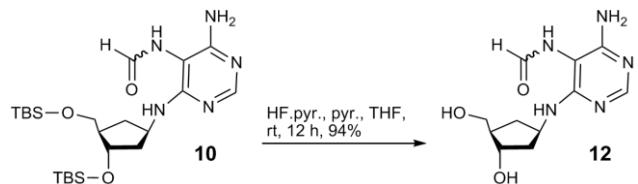
(1'S,2'R,4'R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-((5-formamido-6-(tritylamo)-pyrimidin-4-yl)amino)cyclopentyl-(2-cyanoethyl)-diisopropyl-phosphoramidite 1



Under Argon, compound **11a** (228 mg, 0.28 mmol) was dissolved in degassed dry dichloromethane (3 mL) together with diisopropylaminotetrazolate (24.3 mg, 0.14 mmol, 0.5 eq). The reaction mixture was degassed again before cooling in an ice bath and 3-(bis(diisopropylamino)phosphanoxy)propanenitrile (100 μ L, 0.32 mmol, 1.1 eq) was added and stirred overnight at room temperature. The resulting mixture was dried under reduced pressure. Pure phosphoramidite could be obtained by column chromatography (CHCl₃: MeOH 20:1; 0.5 % pyridine) on deactivated silicagel (2 % pyridine). The dried white product was dissolved in a small amount of dry degassed dichloromethane and slowly added degassed *n*-pentane (100 volume equivalents). The resulting white precipitate was isolated decanting off the solvent under argon and dried under high vacuum. The phosphoramidite **1** could be obtained as a white crystalline solid (215 mg, 0.21 mmol, 76%). The dried product could be stored under an argon atmosphere at -20 °C for at least one year without any oxidation. mp: decomp. > 113 °C (decomp.); TLC (CHCl₃:MeOH, 10:1 v/v): R_f = 0.68 mixture of stereoisomers); FTIR (ATR): 3130, 2943, 2360, 1711, 1630, 1542, 1483, 1455, 1417, 1368, 1353, 1314, 1266, 1221, 1368, 1174, 1153, 1098, 1050, 1018, 979, 913, 893, 862, 862, 817, 794, 758, 716, 676, 643 cm^{-1} ; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 1.00–1.02 (m, 3 H, [isomer 1]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.08–1.13 (m, 3 H, [isomer 2]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.17–1.22 (m, 6 H, [isomer 1 + 2]PN[CH(CH₃)₂]₂), 1.24–1.28 (m, 1 H, C5'H_b), 1.54–1.67 (m, 1 H, C2'H_b), 2.13–2.17 (m, 1 H, C2'H_a), 2.23–2.30 (m, 1 H, C4'H), 2.38–2.44 (m, 1 H, C5'H_a), 2.53–2.58 (m, 2 H, CH₂CN), 2.97–3.08 (m, 1 H, C1''H_a), 3.16–3.21 (m, 1 H, C1''H_b), 3.47–3.61 (m, 2 H, [(CH₃)₂CHN]₂PR₂), 3.67–3.76 (m, 2 H, CH₂CH₂CN), 3.77–3.79 (m, 6 H, CH₃OPh), 4.08–4.13 (m, 1 H, C3'H), 4.44–4.50 (m, 1 H, C1'H), 6.62 (br s, 1 H, NHCHO), 6.85–6.89 (m, 4 H, 4 x *meta*-H of *para*-CH₃OPh), 7.17–7.21 (m, 5 H, CH- of DMT and Trityl), 7.23–7.30 (m, 15 H, CH of DMT and Trityl), 7.37–7.42 (m, 4 H, CH- from of DMT and Trityl), 7.76 (s, 1 H, C2H), 8.09 (br s, 1 H, NHCHO), 8.68 (br, 1 H, NH); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 20.16, 20.39 (CH₂CN), 24.34, 24.44, 24.53, 24.56 (4 x PN[CH(CH₃)₂]₂), 36.09, 36.33 (C5'), 41.12, 41.31 (C2'), 43.04, 43.09 (2 x PN[CH(CH₃)₂]₂), 46.96, 47.01 (C4'), 49.87 (C1'), 55.17, 55.20 (2 x OCH₃), 58.12, 58.25 (OCH₂CH₂CN), 64.14, 64.59 (C1''), 74.81, 74.92 (C- from Trityl), 75.51, 75.62 (C3''), 85.71, 85.74 (OC(*p*-CH₃OPh)₂Ph), 85.77, 85.80 (C5), 112.95, 112.97 (4 x *meta*-C from *p*-CH₃OPh), 117.65, 117.66 (CN), 123.68 (C- from DMT), 123.68–130.11 127.55 (CH- from Trityl), 128.63 (CH- from Trityl), 128.84 (CH- from DMT), 129.13 (CH- from DMT), 129.85 (CH- from Trityl), 131.05 (CH- from DMT), 131.06 (CH- from DMT), 132.29 (CH- from DMT), 137.43 (CH- from DMT), 137.48 (CH- from DMT), 146.54 (CH-

from DMT), 147.00 (C- from Trityl), 155.58 (C2), 156.59 (C4), 158.34, 158.35 (C6), 160.25 (CHO). ^{31}P NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 148.65, 149.04 (ROP(*N*(*i*Pr)₂)CH₂CH₂CN); ESI-HRMS (m/z): [MH]⁺ calcd. for [C₅₁H₄₉N₅O₅H]⁺, 1010.4739; found, 1010.4767.

***N*-(5-(Formylamino)-4-[(1'R,3'S,4'R)-3'-hydroxy-4'-(hydroxymethyl)cyclopentyl]-amino)-6-aminopyrimidine 12**



Compound **10** (78 mg, 0.16 mmol) was dissolved in dry THF (3 mL) with dry pyridine (122 μL) and afterwards pyridine-HF complex (122 μL , 70 %) was added and the mixture was stirred overnight at rt in a sealable polypropylene tube. The diol precipitated as a white fine solid, which was centrifuged afterwards. The isolated product was resuspended in dry ethyl acetate (1 mL) and afterwards stirred for another two hours together with 370 μL MeOTMS. The product was again centrifuged, and to the decanted supernatant were given another 370 μL of MeOTMS and the solution was stirred for another hour. Both fractions were combined and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting white solid was dried under high vacuum yielding 40.0 mg (0.15 mmol) of **12** (94 %). mp: decomp. > 147 °C; TLC (Reversed Phase; MeOH:H₂O, 2:1 v/v): R_f = 0.88; FTIR (ATR): 3157, 2957, 2879, 2680, 2499, 1669, 1646, 1635, 1595, 1503, 1467, 1449, 1441, 1416, 1374, 1331, 1285, 1270, 1249, 1197, 1159, 1151, 1136, 1077, 1035, 1004, 859, 825, 802, 765, 752, 731, 707, 682 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-d₄): δ 1.30–1.37 (m, 1 H C5'H_b), 1.82–2.02 (m, 3 H, C4'H, C2'H_b, C2'H_a), 2.11 (dt, $^2J_{\text{H-H}}$ (C5'H_a, C5'H_b) = 13.3 Hz, $^3J_{\text{H-H}}$ (C5'H_a, C1'H, C4'H) = 7.7 Hz, 1 H, C5'H_a), 3.53–3.58 (m, 2 H, C1''H_b, C1''H_a), 4.05–4.09 (m, 1 H, C3'H), 4.56–4.63 (m, 1 H, C1'H), 8.02 (br s, 1 H, NHCHO), 8.24 (br s, 1 H, CHO), 8.50 (s, 1 H, C2H), 2 x OH, C1'NH, 2 x NH not detected; ^{13}C NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ 35.48(C5'), 42.61 (C2'), 50.21 (C4'), 51.67 (C1'), 64.59 (C1''), 74.34 (C3'), 93.88 (C5), 149.62 (C2), 155.96 (C4), 159.32 (C6), 164.56 (CHO); ESI-HRMS (m/z): [MH]⁺ calcd. for [C₁₁H₁₇N₅O₃H]⁺, 268.1404; found, 268.1404.

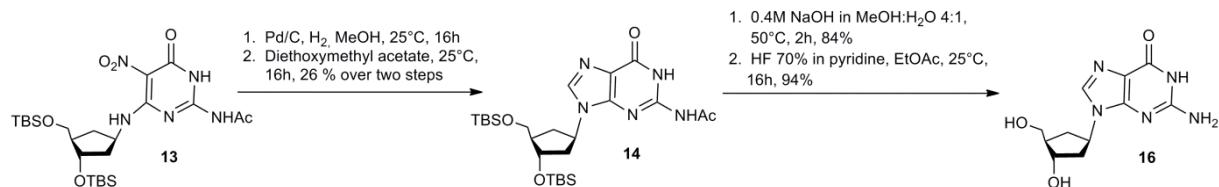
X-Ray crystallographic structures of compound 9a and 11

Single crystals of **9a** and **11** suitable for X-ray diffraction were carefully mounted on the top of a thin glass wire. Data collection was performed with an Oxford Xcalibur3 diffractometer equipped with a Spellman generator (50 kV, 40 mA) and a Kappa CCD detector, operating with Mo K α radiation (λ = 0.71071 \AA). Data collection was performed with the Crysaliis CCD software, for the data reduction the Crysaliis RED software¹ was used. Absorption correction using the SCALE3 ABSPACK multiscan method² was applied. Structures were solved and refined with SHELX-97³ and finally checked using PLATON⁴. Details for data collection and structure refinement are summarized in the corresponding cif files. CCDC-796512 (**9a**) and

CCDC-796513 (**11** 2 MeCN) contain the supplementary crystallographic data. The data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre *via* www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Overview over the synthesis of carbocyclic 2'-deoxyguanosine

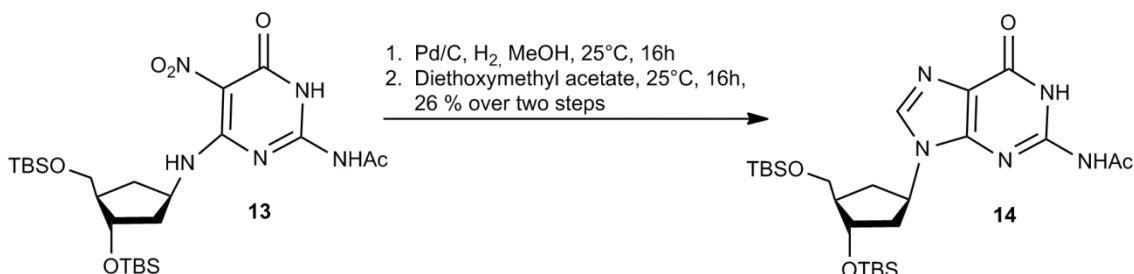
The synthesis of the carbocyclic 2'-deoxyguanosine (**Supplementary Fig. 5**) starts from **13** with reduction of the nitro group with Pd/C under hydrogen and reaction of the resulting amine with diethoxymethyl acetate to give the protected purine **14** in a 26 % yield. For the acetyl deprotection **14** was stirred in 0.4 M NaOH to give **15** in a 84 % yield, followed by TBS deprotection in HF/pyridine with 94 % yield of **16**.



Supplementary Figure 5: Synthesis of carbocyclic dG (**16**).

Detailed synthesis of carbocyclic 2'-deoxyguanosine

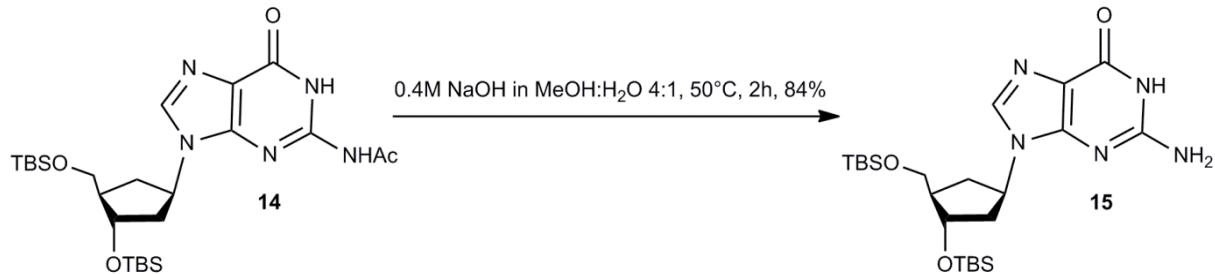
N-[9-[(1'R,3'S,4'R)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[[*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl]cyclopentyl]-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-yl]-acetamide **14**



13 (1.60 g, 2.88 mmol) was dissolved in dry methanol (30 mL). 700 mg 10 % Pd/C were added and the reaction mixture was degassed carefully. The argon atmosphere was changed into a hydrogen atmosphere and the mixture was stirred over night under hydrogen (1.2 bar) at rt. The charcoal and palladium were filtered off under exclusion of oxygen, using a 0.2 µm nylon syringe filter (MilliporeTM). The solvent was evaporated under reduced pressure at rt and the air sensitive amine was diluted in diethoxymethyl acetate (16 mL). The mixture was stirred at rt for 18 h and then heated up to 100 °C for 1 h. The cooled solution was diluted with ethyl acetate (200 mL) and washed with brine (3 x 250 mL). The organic layer was dried with MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography (CHCl₃:MeOH 80:1 → 40:1). The resulting purine **14** could be

obtained as an orange foam (400 mg, 0.75 mmol, 26 % over two steps). TLC (CHCl₃:MeOH, 10:1 v/v): R_f = 0.30; FTIR (ATR): 3155, 2952, 2927, 2855, 2739, 17112, 1680, 1611, 1553, 1471, 1463, 1397, 1375, 1361, 1321, 1251, 1116, 10889, 1051, 1004, 938, 834, 813, 775, 742, 724, 668 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.04 (s, 3H, Si-CH₃), 0.05 (s, 3H, Si-CH₃), 0.06 (s, 6H, Si-CH₃), 0.87 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 1.71 – 1.81 (dt, ²J_{H-H} (C5'H_a, C5'H_b) = 13.0 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_a, C1'H, C4'H) = 9.3 Hz, 1H, C5'H_a), 2.07 – 2.16 (m, 3H, C2'H_a, C2'H_b, C4'H), 2.30 (s, 3H, acetyl-CH₃), 2.36 – 2.45 (dt, ²J_{H-H} (C5'H_b, C5'H_a) = 13.0 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_b, C1'H, C4'H) = 8.1 Hz, 1H, C6'H_b), 3.57 – 3.62 (dd, ²J_{H-H} (C1''H_a, C1''H_b) = 10.1 Hz, ³J_{H-H} (C1''H_a, C1''OH) = 4.7 Hz, 1H, C1''H_a), 3.66 – 3.72 (dd, ²J_{H-H} (C1''H_b, C1''H_a) = 10.1 Hz, ³J_{H-H} (C1''H_b, C1''OH) = 4.5 Hz, 1H, C1''H_b), 4.28 – 4.33 (m, 1H, C3'H), 4.85 – 4.94 (p, ²J_{H-H} (C1'H, C2'H_a, C2'H_b, C5'H_a, C5'H_b) = 8.6 Hz, 1H, C1'H), 7.75 (s, 1H, C8H), 8.96 (s, 1H, NH), 11.95 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ -5.46 (Si-CH₃), -5.42 (Si-CH₃), -4.75 (Si-CH₃), -4.62 (Si-CH₃), 17.98 (Si-C(CH₃)₃), 18.34 (Si-C(CH₃)₃), 24.43 (acetyl-CH₃), 25.79 (Si-C(CH₃)₃), 25.93 (Si-C(CH₃)₃), 33.36 (C5'), 41.58 (C2'), 49.73 (C4'), 53.18 (C1'), 62.93 (C1''), 72.84 (C3'), 121.55 (C5), 137.16 (C8), 146.74 (C2), 148.16 (C4), 155.68 (C6), 171.52 (acetyl-C). ESI-HRMS (m/z): [MH]⁺, calcd. for [C₂₅H₄₆N₅O₄Si₂H]⁺: 536.3083; found, 536.3075.

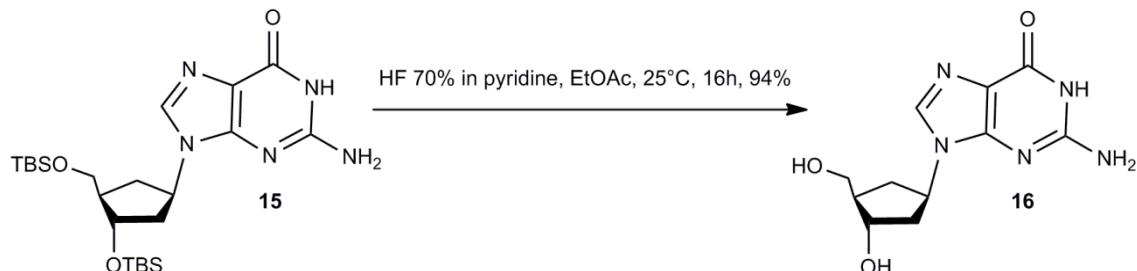
2-Amino-9-[(1'R,3'S,4'R)-3'-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[[tert-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl]cyclopentyl]-1,9-dihydro-purine-6-one 15



14 (250 mg, 0.47 mmol) was dissolved in 0.4 M NaOH in MeOH:H₂O 4:1 and stirred for 2 h at 50 °C until the reaction was complete. The mixture was neutralized with acetic acid and evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH 10:1). The resulting purine **15** could be obtained as a yellow foam (195 mg, 0.39 mmol, 84 %). TLC (CH₂Cl₂:MeOH 10:1 v/v): R_f = 0.31; FTIR (ATR): 3317, 3156, 2952, 2928, 2855, 1695, 1627, 1597, 1569, 1536, 1471, 1361, 1253, 1164, 1111, 1005, 938, 834, 813, 775, 669 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.06 (s, 3H, Si-CH₃), 0.06 (s, 3H, Si-CH₃), 0.06 (s, 3H, Si-CH₃), 0.07 (s, 3H, Si-CH₃), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0.90 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 1.69 – 1.79 (dt, ²J_{H-H} (C5'H_a, C5'H_b) = 13.0 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_a, C1'H, C4'H) = 9.4 Hz, 1H, C5'H_a), 1.94 – 2.29 (m, 3H, C2'H_a, C2'H_b, C4'H), 2.37 – 2.47 (dt, ²J_{H-H} (C5'H_b, C5'H_a) = 12.9 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_b, C1'H, C4'H) = 7.9 Hz, 1H, C5'H_b), 3.60 – 3.65 (m, 1H, C1''H_a), 3.66 – 3.72 (m, 1H, C1''H_b), 4.29 – 4.34 (dt, ³J_{H-H} (C3'H, C2'H) = 6.1 Hz, ³J_{H-H} (C3'H, C4'H) = 4.5 Hz, 1H, C3'H), 4.83 – 4.96 (p, ²J_{H-H} (C1'H, C2'H_a, C2'H_b, C5'H_a, C5'H_b) = 8.5 Hz, 1H, C1'H), 6.23 (s, 2H, NH₂), 7.64 (s, 1H, C8H), 11.92 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ -5.43 (Si-CH₃), -5.40 (Si-CH₃), -4.74 (Si-CH₃), -4.59 (Si-CH₃), 18.00 (Si-C(CH₃)₃), 18.35 (Si-C(CH₃)₃), 20.95, 25.82 (Si-C(CH₃)₃), 25.95 (Si-C(CH₃)₃), 33.30 (C5'), 41.29 (C2'), 49.80 (C4'), 52.92 (C1'), 63.13 (C1''), 72.85 (C3'), 76.68, 117.17

(C5), 136.13 (C8), 151.72 (C2), 153.21 (C4), 159.11 (C6). ESI-HRMS (m/z): [MH]⁺ calcd. for [C₂₃H₄₄N₅O₃Si₂H]⁺, 494.2977; found, 494.2974.

2-Amino-9-((1'R,3'S,4'R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one 16



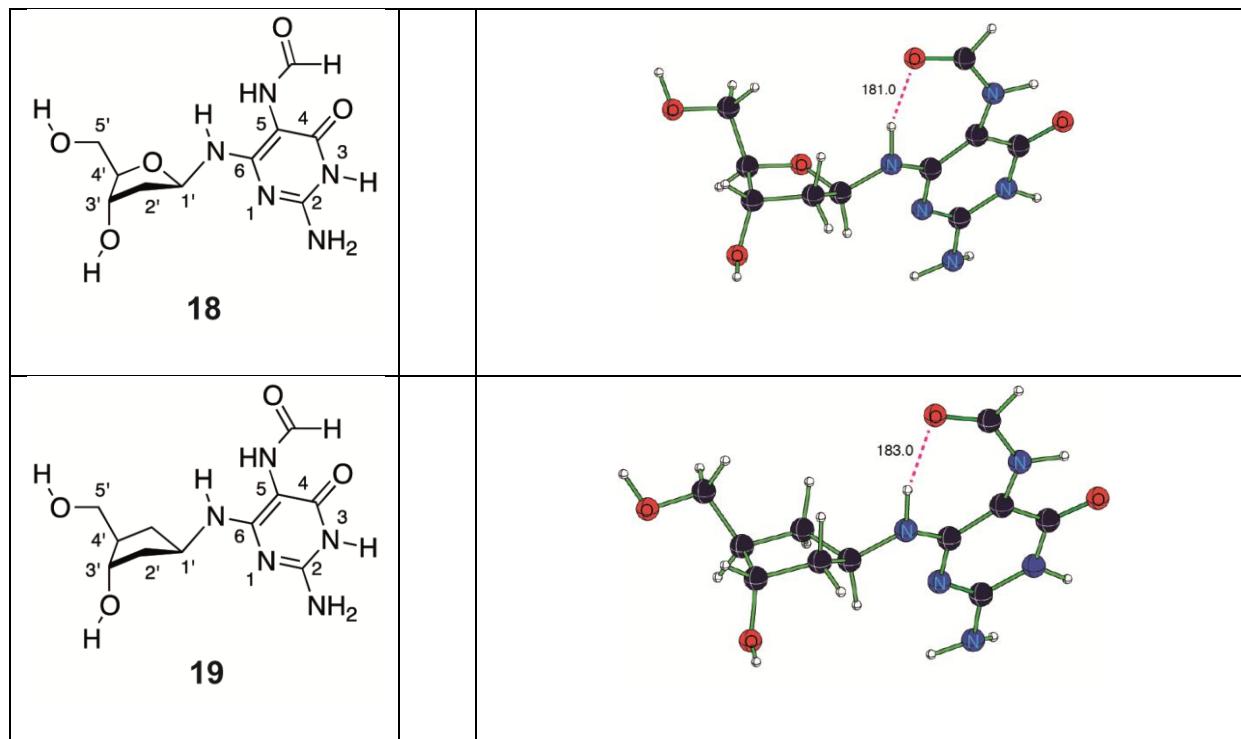
15 (180 mg, 0.36 mmol) was dissolved in ethyl acetate (9.6 mL) and HF (70 % in pyridine; 0.36 mL) was added and stirred over night. The reaction was quenched with methoxytrimethylsilane (2 mL). After evaporation under reduced pressure, the crude reaction mixture was purified by column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH 20:1 → 5:1). The carbocyclic deoxyguanosine **16** could be obtained as a white powder (90 mg, 0.34 mmol, 94 %). TLC (CH₂Cl₂:MeOH, 2:1 v/v): R_f = 0.29; FTIR (ATR): 3497, 3320, 3214, 2730, 2362, 2335, 1727, 1629, 1569, 1538, 1488, 1411, 1380, 1380, 1322, 1252, 1177, 1158, 1068, 1047, 1033, 1006, 916, 849, 776, 673 cm⁻¹; ¹H NMR (599 MHz, DMSO-d₆): δ 1.55 – 1.61 (dt, ²J_{H-H} (C5'H_b, C5'H_a) = 12.8 Hz, ³J_{H-H} (C5'H_b, C1'H, C4'H) = 9.4 Hz, 1H, C5'H_b), 1.92 – 1.99 (m, 2H, C2'H_b, C4'H), 2.05 – 2.12 (ddd, ²J_{H-H} (C2'H_a, C2'H_b) = 12.8 Hz, ³J_{H-H} (C2'H_a, C3'H) = 10.0 Hz, (C2'H_a, C1'H) = 6.3 Hz, 1H, C2'H_a), 2.25 – 2.30 (m, 1H C5'H_a), 3.38 – 3.45 (m, 1H, C1'H_a), 3.47 – 3.54 (m, 1H, C1'H_b), 4.02 – 4.08 (m, 1H, C3'H), 4.60 – 4.65 (t, ²J_{H-H} (C1''OH, C1'H_a, C1'H_b) = 5.2 Hz, 1H, C1''OH), 4.73 – 4.77 (d, ²J_{H-H} (C3'OH, C3'H) = 4.0 Hz, 1H, C3'OH), 4.76 – 4.85 (tt, ³J_{H-H} (C1'H, C2'H_b, C5'H_b) = 9.9 Hz, ³J_{H-H} (C1'H, C5'H_a) = 7.6 Hz, 1H, C1'H), 6.42 (s, 2H, NH₂), 7.79 (s, 1H, C8H), 10.57 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 34.06 (C5'), 40.66 (C2'), 49.23 (C4'), 52.06 (C1'), 62.77 (C1''), 71.50 (C3'), 116.74 (C5), 135.35 (C8), 151.07 (C2), 153.21 (C4), 156.80 (C6). ESI-HRMS (m/z): [MH]⁺ calcd. for [C₁₁H₁₆N₅O₃H]⁺, 266.1248; found, 266.1247.

1. CrysAlis RED, O.D.L., Version 1.171.27p5 beta (release 01-04-2005 CrysAlis171.NET) (compiled Apr 1 2005, 17:53:34).
2. ABSPACK, S. An Oxford Diffraction program (1.0.4, gui:1.0.3) (C) Oxford Diffraction Ltd. (2005).
3. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* **64**, 112-22 (2008).
4. Spek, A.L. PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands., (1999).

Supplementary Note 2

Theoretical studies

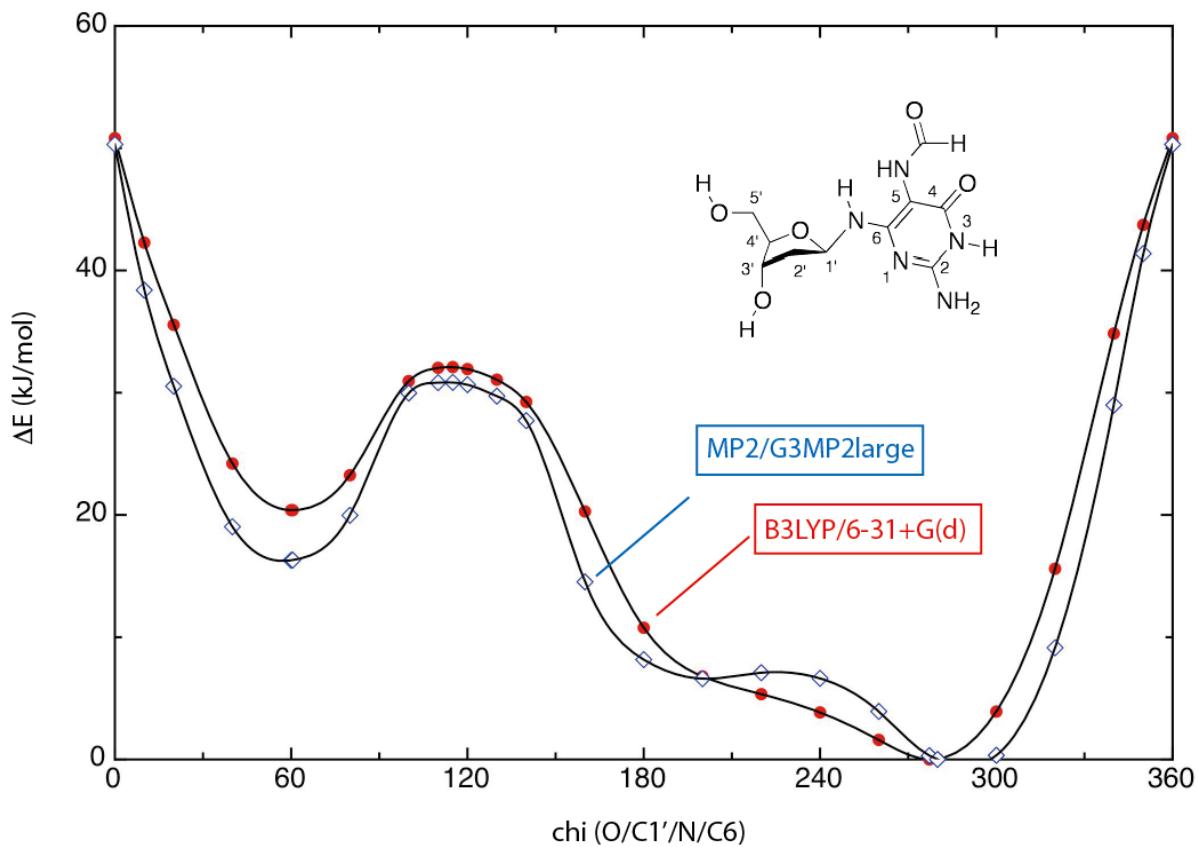
In order to identify possible differences in conformational preferences between 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine of 2'-desoxyguanosine (**18**) and its cyclopentane analogue **19**, a conformational search for both systems has been conducted at the B3LYP/6-31+G(d) level of theory. This method has recently been used by Schlegel *et al.* in a series of theoretical studies on the formation of damaged nucleobases.¹ Thermal corrections to enthalpies at 298.15 K have been calculated at the same level using the rigid rotor/harmonic oscillator model. Single point energies have subsequently been calculated at the MP2(FC)/G3MP2large level of theory and combined with thermal corrections obtained at B3LYP/6-31+G(d) level in order to calculate enthalpies at 298.15 K. The MP2(FC)/G3MP2large calculations form an integral part of the G3(MP2)B3 scheme developed for the calculation of accurate thermochemical data and the G3MP2large basis set corresponds effectively to a 6-311++G(2df,2p) basis for the systems studied here.² All calculations have been performed with *Gaussian 09*.³ In order to avoid hydrogen bonding interactions between the C3' and C5' hydroxy groups with the nucleobase, the orientation of these former groups was chosen such that the O-H bonds point away from the central furan/pentane ring system. The most favorable conformations found in the gas phase are shown in **Supplementary Figure 8** for both systems.



Supplementary Figure 1. 2D and 3D structures of formamidopyrimidine desoxynucleoside **18** and its carbocyclic analogue **19**.

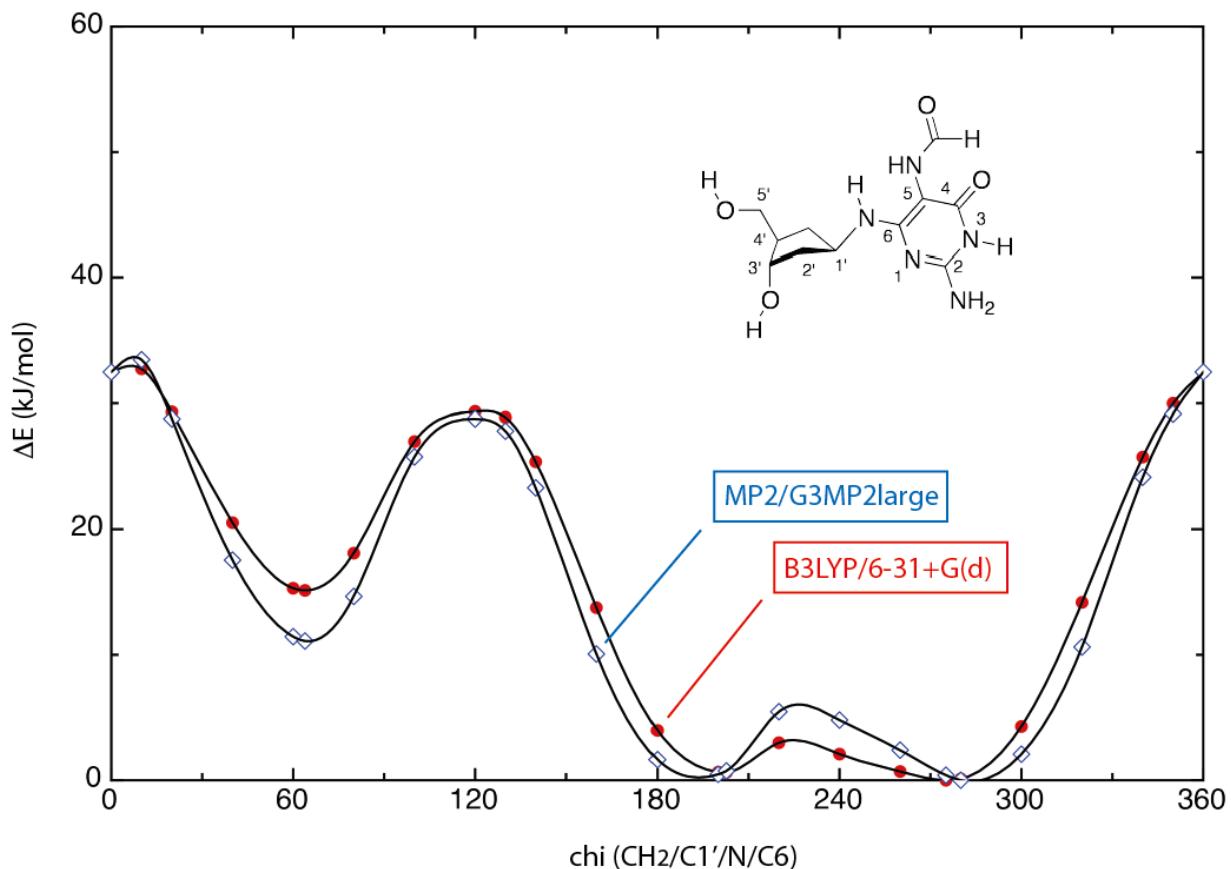
It is noteworthy that, in the absence of the interaction partners present in a polar solvent or a protein surrounding, the formamido groups form intramolecular hydrogen bonds to the anomeric amino N-H bond. The rotation angle *chi*^{4,5} around the C-N bond defined by the centers O/C1'/N/C6 in **18** amounts to *chi*(**18**) = -82.7°. In carbocyclic analog **19** an almost identical rotational angle of *chi*(**19**) = -84.9° is found.

The rotational profile in **18** was explored starting from the most favorable conformation shown in **Supplementary Figure 1** driving the *chi* angle with a step size of 20° in positive and negative directions. In selected regions additional points were added with a step size of 10°. The resulting rotational profile around the C1'-N bond is surprisingly similar at B3LYP/6-31+G(d) and MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) levels of theory (**Supplementary Fig. 2**). Minor differences concern the flat region between 180 and 210°, where MP2 theory hints at formation of a shallow minimum, while B3LYP theory does not.



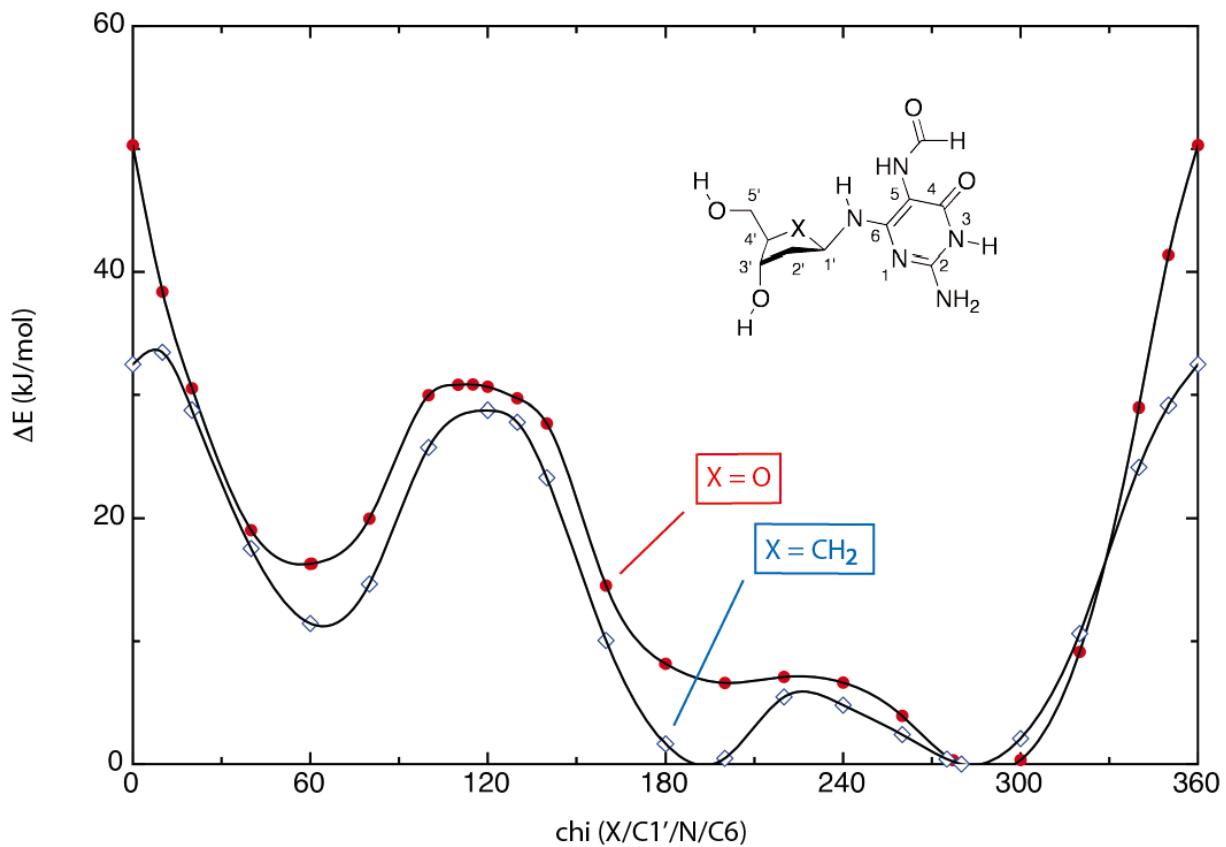
Supplementary Figure 2: Rotational profile for dihedral angle chi (O/C1'/N/C6) in formamidopyrimidine **18** at the B3LYP/6-31+G(d) and MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) levels of theory.

In analogy to the procedure chosen for **18** the rotational profile in carbocyclic analogue **19** was explored starting from the most favorable conformation shown in **Supplementary Figure 1** and a step size of 20° . Additional data points were again added in selected regions. It is again found that the rotational potential is largely similar at B3LYP/6-31+G(d) and MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) levels of theory (**Supplementary Fig. 3**). Minor differences again concern the region with chi angles from $180 - 210^\circ$, where MP2 theory predicts a more shallow potential energy surface. In contrast to heterocyclic reference system **18**, however, both methods agree in that a true minimum exists at a rotational angle of 203° , whose energy is almost identical to the global rotational minimum at $\text{chi} = +275^\circ$.



Supplementary Figure 3: Rotational profile around angle *chi* ($\text{CH}_2/\text{C}1'/\text{N}/\text{C}6$) in carbocyclic formamidopyrimidine **19** at the B3LYP/6-31+G(d) and MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) levels of theory.

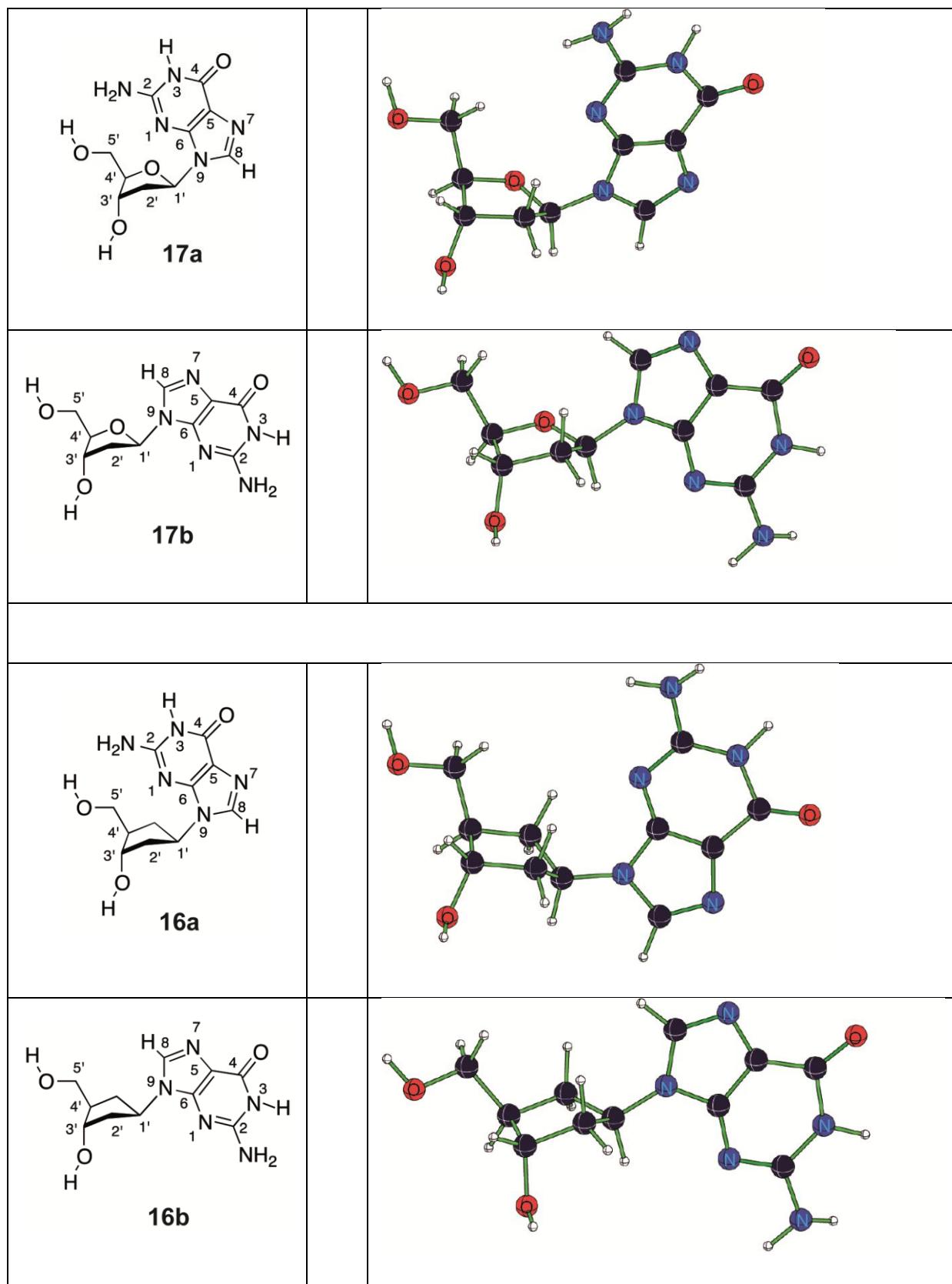
A direct comparison of the rotational potentials for heterocyclic formamidopyrimidine **18** and its carbocyclic analogue **19** as calculated at the MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) level is shown in **Supplementary Figure 4**. Both rotational potentials are largely similar in that a global minimum exists at *chi* angles around 275° and a second, less stable minimum at *chi* values around 60° . The rotational potentials differ in the magnitude of the rotational barrier through the fully eclipsed conformation at *chi* = 0° , and also in the flat region with *chi* = $180 - 210^\circ$, where a true minimum exists for **19**, but (apparently) not for **18**.



Supplementary Figure 4: Rotational profile around angle *chi* (X/C1'/N/C6) in formamidopyrimidine **18** (red dots) and its carbocyclic analogue **19** (blue diamonds) at the MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) level of theory.

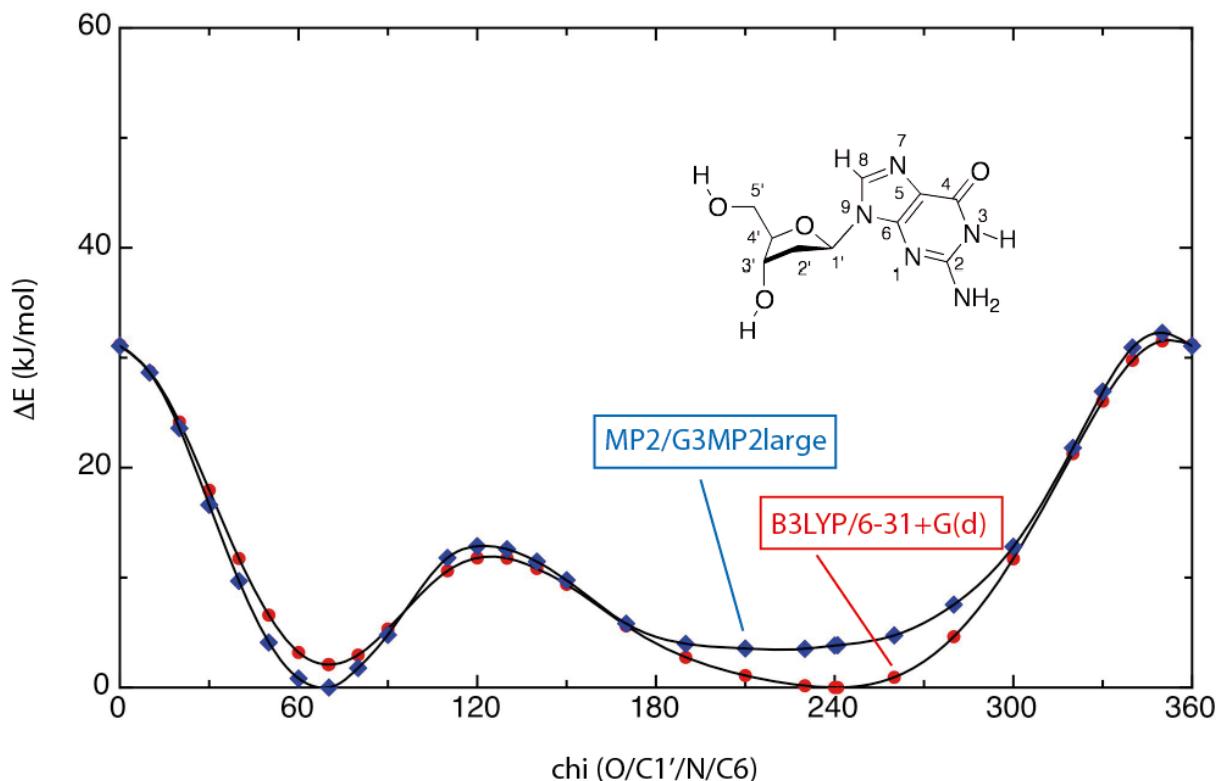
The surprisingly similar rotational potentials for **18** and **19** identified here are closely similar to those obtained at the B3LYP/6-31G(d) level for model systems carrying methyl protecting groups on the C3' and C5' hydroxy groups.⁶ This implies that the conformational similarity between the hetero- and carbocyclic systems **18** and **19** is neither dependend on the exact details of the model systems chosen for study nor on the particular level of theory.

How much of the similarity between hetero- and carbocyclic formamidopyrimidine derivatives is retained in the undamaged nucleosides was subsequently explored for 2'-deoxyguanosine **17** and its carbocyclic analogue **16** using the same theoretical approach as before. In order to avoid hydrogen bonding interactions between the C3' and C5' hydroxy groups with the nucleobase, the orientation of these former groups was again chosen such that the O-H bonds point away from the central furan/pentane ring system. The most favorable conformations found for these systems in the gas phase at MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) level are shown in **Supplementary Figure 5**.



Supplementary Figure 5: 2D and 3D structures of 2'-deoxyguanosine **17** and its carbocyclic analog **16**.

In contrast to the formamidopyrimidine derivatives studied before, two conformations **17a** and **17b** of similar stability can be identified for 2'-deoxyguanosine. The more stable conformation **17a** with $\text{chi} = +70.2^\circ$ orients the guanine base such that the N1 nitrogen atom points towards the ribose ring, while the less stable conformation **17b** with $\text{chi} = -119.0^\circ$ orients the guanine base in the opposite direction. This latter conformer is less stable than **17a** by 3.70 kJ/mol (MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) level). The relative stability of these conformers was reconfirmed at full G3(MP2)B3 level, at which the energy difference amounts to 2.9 kJ/mol. A rather similar situation is found for the carbocyclic analogue **16** with the more favourable conformer **16a** ($\text{chi} = +61.5^\circ$) and the slightly less stable conformer **16b** ($\text{chi} = -118.1^\circ$). The energy difference is again rather small with +3.9 kJ/mol at MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) and +3.0 kJ/mol at full G3(MP2)B3 level.

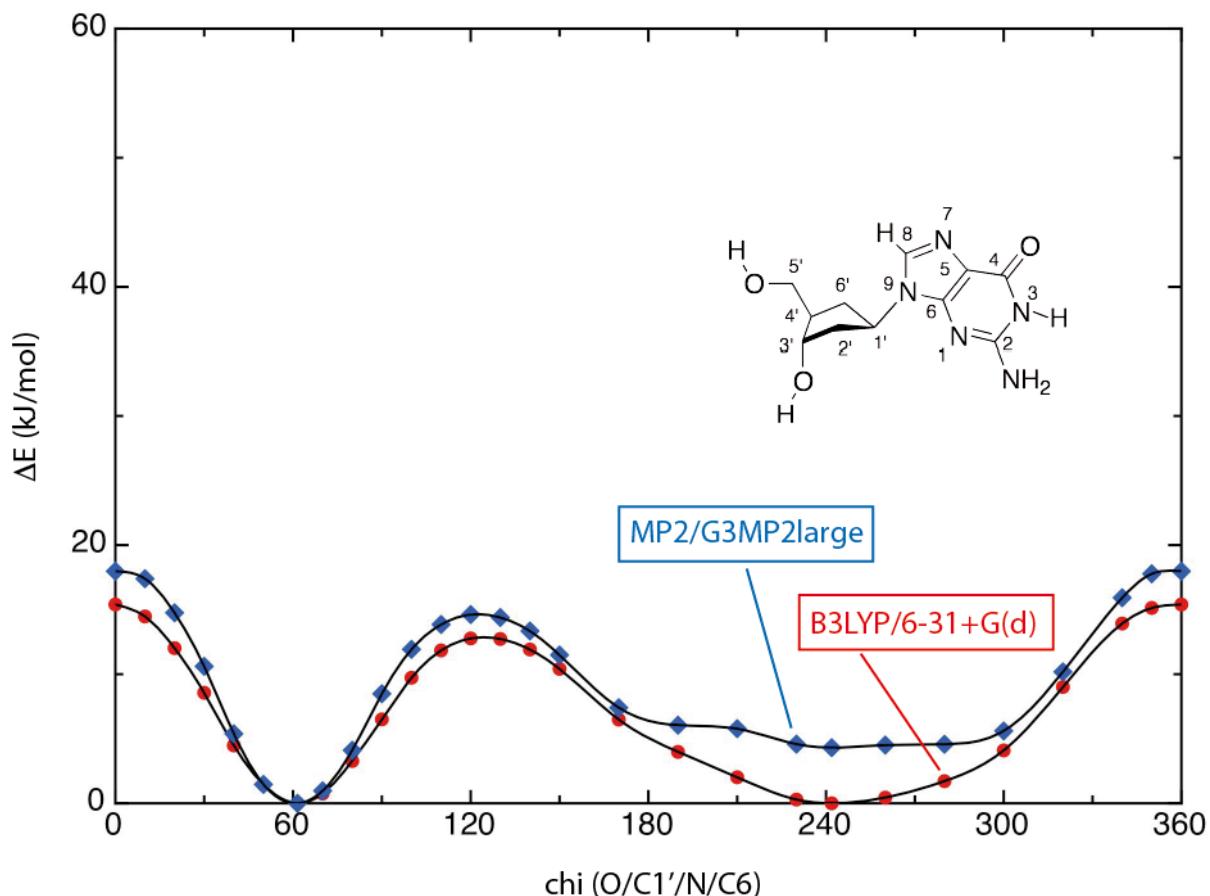


Supplementary Figure 6: Rotational profile for dihedral angle chi (O/C1'/N9/C6) in 2'-deoxyguanosine **17** at the B3LYP/6-31+G(d) and MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) levels of theory.

The rotational profile in **17** was explored starting from the local minimum shown in **Supplementary Figure 5** driving the chi angle with a step size of 20° in positive and negative directions. In selected regions additional points were added with a step size of 10° . The resulting

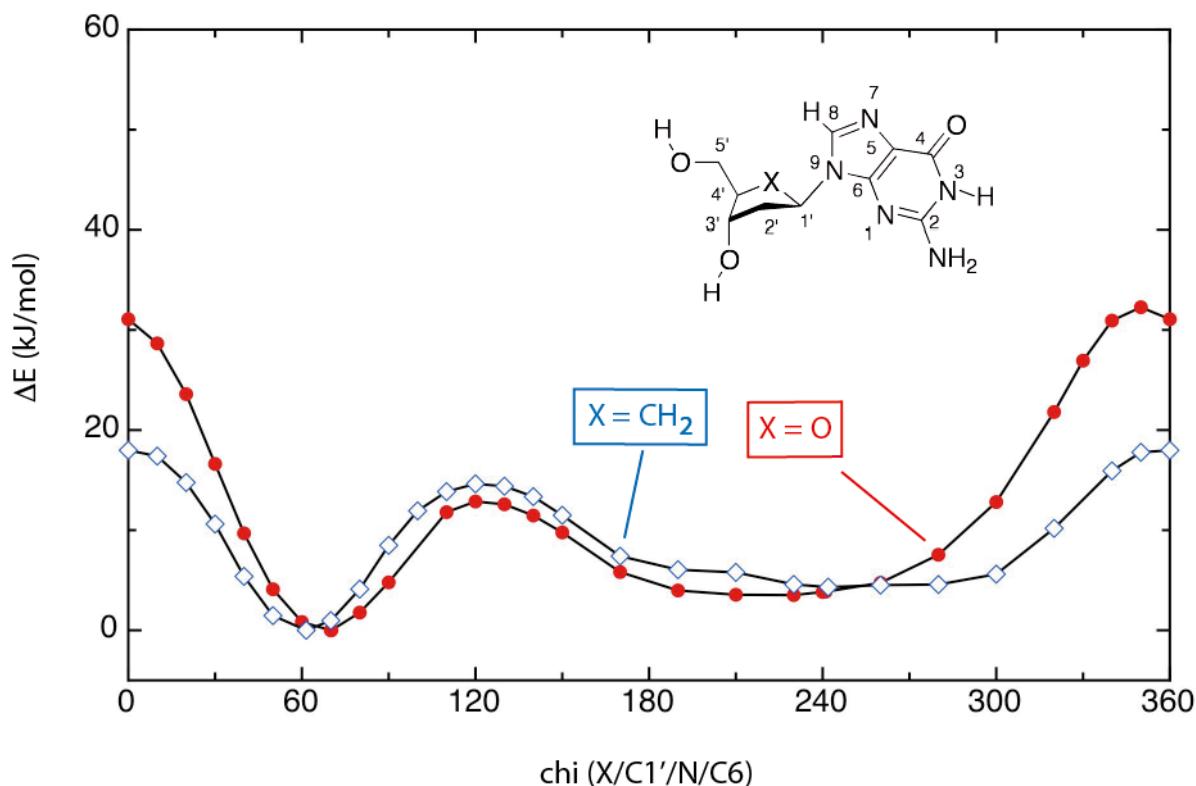
rotational profile around the C1'-N9 bond is again quite similar at B3LYP/6-31+G(d) and MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) levels of theory (**Supplementary Figure 6**). Minor differences again concern the flat region between 180 and 260°, where MP2 theory places the minimum at somewhat smaller angles (at around 210°) as compared to the B3LYP minim at 240°. The rotational barriers are also quite similar at both levels of theory, the larger barrier of just over 30 kJ/mol leading through the structure with fully eclipsed O/C/N/C dihedral angle. This is significantly lower as compared to the FaPydG derivative, where the corresponding rotational barrier is more than 20 kJ/mol higher (**Supplementary Figure 2**). A second major difference between FaPydG derivative **18** and 2'-deoxyguanosine **17** concerns the relative energies of the *gauche* conformations at rotational angles around -80 and +60 degrees. While the *gauche* conformation at -80° is the only low-energy conformation in FaPydG derivative **18**, both structures are practically isoenergetic in 2'-deoxyguanosine **17** (**Supplementary Figure 2** vs. **Figure 6**).

Repeating the above approach for carbocyclic analogue **16** and starting again from the structure shown in **Supplementary Figure 4** yields the rotational profile shown in **Supplementary Figure 7**. The latter is quite similar to that of the parent heterocyclic system **17** and displays a larger shallow region between dihedral angles of 190 to 270° and a more clearly defined *gauche* conformation with dihedral angle of *chi*(**16**) = +61.5°. Relative energies for these two minima are rather small at the B3LYP/6-31+G(d) level used for geometry optimizations, but differ slightly at MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) level at which the *gauche* conformation at around 60° is energetically preferred by 4.3 kJ/mol.



Supplementary Figure 7: Rotational profile around angle *chi* ($\text{CH}_2/\text{C}1'/\text{N}/\text{C}6$) in carbocyclic 2'-deoxyguanosine **16** at the B3LYP/6-31+G(d) and MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) levels of theory.

A direct comparison of the rotational potentials for 2'-deoxyguanosine **17** and its carbocyclic analogue **16** as calculated at the MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) level is shown in **Supplementary Figure 8**. Both rotational potentials are largely similar in that a global minimum exists at *chi* angles around 60° and a second, less stable minimum at *chi* values around $180 - 260^\circ$. The rotational potentials differ mainly in the magnitude of the rotational barrier through the fully eclipsed conformation at *chi* = 0° , which is higher in the heterocyclic parent system **17** by approx. 14.3 kJ/mol as compared to carbocyclic analogue **16**. This barrier difference is most likely due to unfavorable electrostatic interactions between the N1 nitrogen atom of the guanine ring system and the ring oxygen atom of the ribose ring, both of which carry a partial negative charge. Replacement of the oxygen by CH_2 in analogue **16** replaces this repulsive interaction by a weakly attractive component. In the more favorable low-energy region of the rotational potential between *chi* = $+50 - +280^\circ$ there is, however, hardly any difference between parent system **17** and its carbocyclic analogue **16**.



Supplementary Figure 8: Rotational profile around angle *chi* (X/C1'/N/C6) in 2'-deoxyguanosine **17** (red dots) and its carbocyclic analogue **16** (blue diamonds) at the MP2(FC)/G3MP2large//B3LYP/6-31+G(d) level of theory.

1. Ye, Y. *et al.* Mechanistic aspects of the formation of guanidinohydantoin from spiroiminodihydantoin under acidic conditions. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 526-35 (2009).
2. Curtiss, L.A., Redfern, P.C., Raghavachari, K., Rassolov, V. & Pople, J.A. Gaussian-3 theory using reduced Moller-Plesset order. *J. Chem. Phys.* **110**, 4703-4709 (1999).
3. M. J. Frisch *et al.* Gaussian 09, Revision B.01 edn (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010).
4. www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/pnuc1.html.
5. www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/pnuc2.html.
6. Ober, M., Müller, H., Pieck, C., Gierlich, J. & Carell, T. Base pairing and replicative processing of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 18143-9 (2005).

4. Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Einblicke liefern neue Hinweise darauf, wie XPA/Rad14 an die DNA bindet. Die genaue Rolle des Proteins in der NER ließ sich dadurch allerdings nicht aufklären. Um dies herauszufinden, sind weitere Untersuchungen von Nöten. Beispielsweise wäre es sehr interessant Rad14 im Komplex mit einer dG(N^2)-AAF enthaltenden DNA zu Kristallisieren, da eindeutig gezeigt werden konnte, dass dieser Schaden allein über die TCR erkannt wird, für dessen Reparatur aber XPA unbedingt nötig ist. Weitere Einblicke könnten die Kristallstrukturen des Proteins im Komplex mit ungeschädigter oder FITC geschädigter DNA liefern, was neue Einblicke in den Mechanismus der Biegung der DNA durch XPA/Rad14 geben würde. Ungeschädigte DNA sollte demnach nicht durch die Proteinbindung geknickt werden, da kein Schaden vorhanden ist, der diesen Knick stabilisieren kann. Wäre dies der Fall, würde das den vorgeschlagenen Schadenserkennungsmechanismus unterstützen. Dann wäre es interessant zu sehen, wie sich der FITC Schaden verhält. Durch die relativ lange Verbindung zwischen dem Fluoreszin und der Base, sollte der aromatische Rest nicht in den Duplex interkalieren und somit keine destabilisierten Bereiche verursachen. Er wird aber trotzdem von XPA/Rad14 als Schaden erkannt und gebunden.

Da das XPA Protein sowohl in der GGR als auch in der TCR von größter Bedeutung ist, liegt es nahe, dass es erst nach der ersten Schadenserkennung eine Rolle spielt, möglicherweise als Schadensverifizierer oder als eine Art zentrales Protein, das die anderen NER Faktoren an die Schadensstelle rekrutiert. Aus diesem Grund wäre es wichtig Strukturen des gesamten NER Komplexes zu erhalten oder zumindest Strukturen mit mehreren Proteinen, wie beispielsweise XPA zusammen mit RPA. Die Kristallisation solcher großen Komplexe erweist sich allerdings als äußert schwierig. Hier könnte die Kryomikroskopie neue Einblicke geben, welche inzwischen Strukturen bis zu wenigen Å auflösen kann.

Mittels Massenspektroskopie könnte man mit Hilfe geeigneter *crosslinker* herausfinden, welche Proteine an bestimmten Stellen der DNA binden, möglicherweise könnte man sogar einen zeitlichen Ablauf rekonstruieren.

Letztendlich konnte diese Arbeit einen wichtigen Hinweis auf die Bedeutung von XPA in der NER geben, es sind aber noch viele Untersuchungen nötig, um die genaue Rolle des Proteins herauszufinden.

5. Experimentalteil

5.1 Methoden zur DNA Synthese, Entschützung und Aufreinigung

DNA-Synthesen wurden an einem *ABI 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems)* im 1 μ mol oder 200 nmol Maßstab durchgeführt (es dienten die Standardprotokolle des Geräteherstellers als Grundlage). Zum Einbau der einzelnen Modifikationen (dG(C8)-AAF und dG(N^2)-AAF) wurden die Kupplungszeiten auf 30 min verlängert sowie. Die Phosphoramidite der Standardbasen Bz-dA, Bz-dC, *i*Bu-dG und dT sowie die *ultramild*[®] Phosphoramidite Pac-dA, Ac-dC und *i*Pr-Pac-dG und die mit der ersten Base beladenen *CPG*- oder *ultramild Q-CPG*-Träger wurden von den Firmen *Glen Research* oder *Link Technologies* bezogen. Als Aktivator wurde BTT oder *Aktivator 42[®] Solution* der Firma *Sigma-Aldrich* verwendet. Alle Reagenzien (Amidite, Oxidationslösung, Aktivator, Waschlösung und *capping*) wurden in Acetonitril (Firma *Roth* - Wassergehalt < 10 ppm) gelöst. Das dG(N^2)-AAF Phosphoramidit wurde in einem 1:1 Gemisch aus Acetonitril und DCM gelöst. Für alle anderen Lösungen wurde Acetonitril (Firma *Roth* - Wassergehalt < 30 ppm) eingesetzt. Die Konzentration der Phosphoramidite betrug 0.1 M in Acetonitril (< 10 ppm H₂O).

Aktivator: BTT oder *Aktivator 42[®] Solution*

Capping der Standardbasen:

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

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

Capping während der *ultramild* Synthesen:

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

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

Detritylierung: 3% Dichloressigsäure (DCA) in DCM

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

DNA-Entschützung: Die terminale 5'-DMTr Gruppe wurde am Ende der Synthesen abgespalten (*DMT-off* Synthese). Die Entschützung der Oligonukleotide und die Abspaltung von der Festphase erfolgte für die dG(N^2)-AAF Oligonukleotide mittels Ammoniumhydoxid

(25%) in Ethanol (3:1) in einem Thermoschüttler (mind. 1000 rpm) bei 18 °C über 18 h. Für die Entschützung und Abspaltung unter *ultramild*-Bedingungen (dG(C8)-AAF) wurde eine Lösung aus 10% Diisopropylamin und 0.25 M β -Mercaptoethanol in Methanol bei 55 °C über 18 h in einem Thermoschüttler (mind. 650 rpm) verwendet. Die Lösungen wurden anschließend an einer *SpeedVac* oder Lyophille eingeengt und das erhaltene Pellet in ddH₂O wieder aufgenommen. Um die Festphase für die anschließende HPLC-Reinigung zu entfernen wurde die Lösung durch einen 0.2 μ m Spritzenfilter filtriert.

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

HPL-Chromatographie der synthetisierten Oligonukleotide: Die analytische als auch präparative *reversed phase (RP)* HPL-Chromatographie wurde auf den Anlagen *L-7400 UV*- und *L-7420 UV/VIS-Detektor*, *L-7100-* und *L-7150 Pumpe*, *D-7200 Autosampler*, *L-7000, Interfacemodul* und *L-7612* bzw. *ERC-3415* (Firma *Merck-Hitachi*) oder *2487 Dual λ Absorbance Detector*, *1525 Binary HPLC Pump*, *2695 Separations Module* und *2996*, bzw. *996 Photodiode Array Detector* (Firma *Waters*) durchgeführt. Bei den Entgasern handelte es sich um die jeweiligen Modelle der Hersteller. Die präparativen Trennungen wurden auf folgenden *RP*-Säulen durchgeführt: *CC 250/10 Nucleosil 100-7 C18* oder *CC 250/10 Nucleodur 100-7 C18* (Firma *Macherey-Nagel*). Für die analytischen HPLC Trennungen wurden die Säulen *CC 250/4 Nucleosil 4 120-3 C18* und *CC 250/4 Nucleodur 4 120-3 C18* (Firma *Macherey-Nagel*) eingesetzt. Die präparative *Waters* HPLC erlaubte eine Beobachtung bei zwei Wellenlängen, was eine zusätzliche Detektion der aromatischen Aminofluoren Einheit bei 305 nm ermöglichte.

Für die Auftrennung von Oligonukleotiden wurden folgende Puffersysteme verwendet:

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

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

Für die Aufreinigung von Oligonukleotiden mit 11–34 Basen wurde ein Gradient von 0–40% oder 0–30% Puffer B in 45 min (analytische HPLC: Flussrate: 0.5 mL/min, präparative HPLC: Flussrate: 5 mL/min). Je nach beobachteter Retentionszeit wurde der oben angeführte Standardgradient modifiziert. Die gereinigten Oligonukleotide wurden mittels Sep-Pak® Kartuschen (Firma *Waters*) anhand des vom Hersteller empfohlenen Protokolls entsalzt.

Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden bei 260 nm wurden aus der Summe der einzelnen Extinktionskoeffizienten der Einzelnukelotide des jeweiligen DNA-Stranges berechnet. Diese betrugen für dA: 15.2 L mmol⁻¹ cm⁻¹, dC 7.1 L mmol⁻¹ cm⁻¹, dG 12.0 L mmol⁻¹ cm⁻¹ und für dT 8.4 L mmol⁻¹ cm⁻¹; β -cFaPydG 9.5 L mmol⁻¹ cm⁻¹. Für die aromatisch modifizierten Monomere nahm man den Extinktionskoeffizienten des dGs an.

Hybridisierungen wurden in einem *Mastercycler personal* Thermocycler (Firma *Eppendorf*) durchgeführt. Zur Hybridisierung wurden die beiden komplementären DNA Stränge in 5 min auf 105 °C erhitzt und anschließend mit 1 °C min⁻¹ bis auf 4 °C abgekühlt.

5.2 Biochemische Methoden und Materialien

Schmelztemperaturen und thermodynamische Parameter. Schmelzkurven wurden mit einem Cary 100 Bio Spektralphotometer mit Cary Temperature Controller, Sample Transport Accessory und Multi Cell Block der Firma Varian ermittelt. Die Duplexe (in Konzentrationen zwischen 1 und 7 μ M) wurden in einem Volumen von 200 μ L in 10 mM Tris Puffers, pH 7.4, und 150 mM NaCl gelöst und in den Küvetten mit Dimethylpolysiloxan überschichtet. Die Proben wurden mit einem Temperaturgradienten von 0.5 °C/min von 10 auf 80 °C erhitzt oder von 80 auf 10 °C abgekühlt. Pro Duplex wurden jeweils drei Schmelzprofile bei jeweils sechs verschiedenen Konzentrationen aufgenommen. Schmelzpunkte (T_m) von Oligonukleotiden ergeben sich aus dem Nulldurchgang der geglätteten zweiten Ableitung der Schmelzkurve eines Oligonukleotiddoppelstrangs. Die Enthalpie (ΔH°) und Entropie (ΔS°) wurden nach einem bekannten Protokoll mittels einer modifizierten Van't Hoff-Gleichung berechnet.^[310-311] Dazu wurden die inversen Schmelzpunkte, die bei sechs verschiedenen Duplexkonzentrationen (1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M) gemessen wurden gegen den natürlichen Logarithmus der jeweiligen Konzentration aufgetragen. Durch lineare Regression erhält man eine Gerade, aus deren Gleichung sich die Parameter ΔH° , ΔS° und ΔG° ableiten lassen.

Native Polyacrylamidgelelektrophorese. Für EMSA-Experimente (Kapitel 3.5) wurden native, nicht denaturierende Gele verwendet. In **Tabelle 3** ist die Zusammensetzung für sechs native Polyacrylamidgele angegeben.

Tabelle 3: Zusammensetzung von 4% nicht-denaturierenden Gelen.

Anzahl Gele	6
H ₂ O dd [mL]	31
30% Rotihorese [mL]	6
10× TBE [mL]	2
Glycerin [μL]	1000
10%ige APS-Lösung [μL]	300
Temed [μL]	20

Electromobility shift assays (EMSA) mit radioaktiv markierter DNA. Zunächst wurde der ungeschädigte Gegenstrang mit der T4 Polynukleotid Kinase mit [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol) am 5'-Ende markiert (Firma *Hartmann Analytics*). Anschließend wurden die ungeschädigten und geschädigten Oligonukleotide mit ihrem markierten komplementären Strang in einem äquimolaren Verhältnis vermischt und hybridisiert. Ein Standard DNA-Bindungs Reaktionsgemisch (10 μL, siehe **Tabelle 4**) bestand aus 33 fmol der markierten Duplex DNA mit variierenden Konzentrationen an aufgereinigter XPA- oder Rad14-DBD in Bindungspuffer. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C (Rad14) oder 37 °C (XPA) wurden 2 μL Auftragspuffer zugegeben und die Elektrophorese auf einem 4% nicht-denaturierendem Gel durchgeführt (100 V konstant, 60 min, 4 °C). Das Gel wurde zuvor 30 min bei 100 V laufen gelassen und als Laufpuffer wurde 1× TBE verwendet. Das Gel wurde mit Hilfe eines Phosphor *Imagers*, StormTM860 von GE, analysiert.

Tabelle 4: Zusammensetzung der EMSA-Bindungsstudien.

Radioaktiv markierte dsDNA (33 fmol)	1 μL
Rad14 (23 pmol)	x μL
Bindungspuffer	y μL
Gesamt	9 μL

Bindungspuffer: 25 mM Hepes KOH pH 8.3
100 mM KCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
45 µg/mL BSA
10% (v/v) Glycerin

Auftragspuffer: 250 mM Tris-HCl pH 7.5
40% Glycerin
0.2% Bromphenolblau

Kristallisation, Datenaufnahme, Strukturbestimmung und -verfeinerung. Für die Co-Kristallisationsexperimente wurde ein dG(C8)-AAF enthaltendes 15mer Oligonukleotid (5'-GCT CTA CG*T CAT CAC-3'; G* = AAF-dG) mit dem entsprechenden Gegenstrang ohne (5'-GTG ATG ACG TAG AGC-3') oder mit 5-Iod-2'-desoxyuridine (U*) (5'-GU*G AU*G ACG U*AG AGC-3') (Firma *Metabion*) in Kristallisationpuffer hybridisiert. Vor der Kristallisation wurden Protein und DNA in einem molaren Protein:DNA Verhältnis von 1:1 (Strep-Tag) oder 2:1 (His-Tag) 30 min bei 4 °C inkubiert. Erste Kristalle mit Selenomethionin markiertem Strep-Tag Protein (Rad14₁₈₈₋₃₀₆) im Komplex mit dG(C8)-AAF DNA wurden in 0.05 M Tris-HCl, pH 7, 0.1 M Kalciumacetat, 16–18% PEG8000 bei 4 °C erhalten. His-tagged Rad14₁₈₈₋₃₀₂ im Komplex mit dG(C8)-AAF DNA und U* wurde in 0.18 M Ammoniumnitrat und 40% 2-Methyl-1,3-propanediol (MPD) bei 4 °C kristallisiert. Die Kristalle wurden in Mutterlösung mit 15% Ethylenglykol (^{SeMet}Rad14₁₈₈₋₃₀₆) oder direkt aus dem well (Rad14₁₈₈₋₃₀₂) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und so bis zur Datenaufnahme aufbewahrt. *Single anomalous dispersion* (SAD) Daten des Selenomethionin markierten Rad14-AAF Komplexkristalls wurden am Microdiffraktometer an der PXI Strahlenquelle der *Swiss Light Source* (SLS) in Villigen (Schweiz) gemessen. Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe P2₁, mit einer Einheitszelle von a = 66.4 Å, b = 51.7 Å, c = 68.8 Å und β = 109.6°. Die Kristalle streuten die Röntgenstrahlen anisotrop über einen Bereich von 2.8 Å. Für die Strukturbestimmung wurden die Daten von vier verschiedenen Kristallen mittels *AUTOPROC*^[319-321] kombiniert und die Phasen mit *PHENIX Autosol* bestimmt.^[322-323] Ein erstes Modell wurde mit *PHENIX Autobuild* erstellt.^[324-325] Die Iod SAD Daten wurden an der ID29 Strahlenquelle der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) gemessen. Die Kristalle streuten die Röntgenstrahlen bis zu 1.8 Å und gehörten

zur tetragonalen Raumgruppe $P4_1$, mit Einheitszellen von $a = 53.72 \text{ \AA}$, $b = 53.72 \text{ \AA}$ and $c = 130.55 \text{ \AA}$. Die Strukturen wurden durch *molecular replacement* (PHASER^[326-327]) auf Basis der Koordinaten des ^{SeMet}Rad14-Proteins gelöst. Für den manuellen Aufbau des Modells wurde *COOT*^[328] verwendet und die Strukturverfeinerung wurde in *Refmac5*^[329] und *Phoenix*^[325] unter Verwendung von TLS ausgeführt.^[330-331] Die Positionen der Iodatome wurden bestimmt und ihre Verteilung durch deren anomale Signale berechnet.^[320]

Kristallisationspuffer: 50 mM HEPES pH 8.0
 50 mM MgCl₂
 5% Glycerol
 5 mM DTT
 10 μM ZnCl₂

5.3 Material und Methoden zur organischen Synthese

Alle feuchtigkeits- und sauerstoffempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten, evakuierten und mit Stickstoff bzw. Argon gefüllten Schlenkgefäßen durchgeführt. Alle Lösungsmittel und Reagenzien wurden in den kommerziell erhältlichen Reinheiten (*puriss.*, *p.a.* oder *purum*) käuflich erworben und auch so verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden von *Fluka* (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH), *Acros* (KMF Laborchemie Handels GmbH), *Aldrich*, *ABCR*, *Alfa Aesar*, *Sigma*, *TCI* oder *Merck* gekauft oder mittels 3 bzw. 4 \AA Molekularsieb selbst getrocknet. Das hierfür verwendete Molsieb wurde vor der eigentlichen Nutzung zuerst mit Wasser gewaschen um Staub zu entfernen und anschließend in einem Heizschränk für mindestens 24 h bei 120 °C vorgetrocknet und abschließend für 12 Stunden in einem Sandbad (bei ca. 340 °C) im Hochvakuum weiter ausgeheizt. Für Säulenchromatographie und Extraktionen wurden Lösemittel von technischer Qualität verwendet die vorher an einem Rotationsverdampfer (Firma *Heidolph*) mittels eines Membranpumpenvakuums (*Vario PC3001*-Membranpumpe – Firma *Vacuubrand*) destilliert wurden. Zum entgasen von Lösemittel wurden dieses dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und jeweils mittels Vakuum und Argon ein Gas austausch vorgenommen. Zum Trocknen von Substanzen im Hochvakuum verwendete man eine RZ-4 Öldrehschieberpumpe (Firma *Vacuubrand*) mit einem Vakuum zwischen 10⁻² und 10⁻³ mbar. Zum Entfernen von Wasser bzw. wässriger Puffer wurde eine SpeedVac *RVC2-25* bzw. *RVC2-33 IR* (Firma

Christ) oder eine *SpeedVac Plus SC110A* bzw. *SpeedVac SPD111V* (Firma *Savant*) verwendet. Alle Geräte waren mit den Kühlfallen *CT62-50-cooling trap* (Firma *Christ*) ausgestattet. Für die Gefriertrocknung wässriger Lösungen wurde eine *Alpha 2-4 plus* Lyophile (Firma *Christ*) verwendet.

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf vorgefertigten Aluminiumplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm, Firma *Merck*) ausgeführt. Die Substanzen wurden durch UV-Licht ($\lambda = 254$ nm oder 366 nm), Ninhydrin-Lsg. (1.5 g Ninhydrin, 100 mL *n*Butanol, 3 mL Eisessig) oder Anisaldehyd-Lsg. (0.5 mL Anisaldehyd, 50 mL Eisessig, 1 mL H₂SO₄) sichtbar gemacht. Diese Methode wurde ebenfalls zur Bestimmung der *R_f*-Werte angewendet.

Bidestilliertes Wasser (ddH₂O) wurde von der Anlage *Milli-Q Plus* (Firma *Millipore*) entnommen.

Säulenchromatographie zur Aufreinigung von Substanzgemischen wurde unter der Verwendung von Stickstoff Überdruck nach der *Flash*-Methode durchgeführt. Hierbei wurde Silicagel (Korngröße 40–63 μ m Kieselgel 60 Firma *Merck*) verwendet.

NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen: *ARX-300* und *AMX-600* (Firma *Bruker*) sowie *Mercury 200VX*, *INOVAN XL400* (400 MHz), *Varian Inova 400* (400 MHz) (Firma *Varian*). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messfrequenz und das verwendete deuterierte Solvens sind in Klammern angegeben. Die chemischen Verschiebungen δ für die ¹H und ¹³C Spektren sind in ppm relativ zu Tetramethylsilan ($\delta = 0$) und für ³¹P Spektren relativ zu Phosphorsäure (85% in Wasser, $\delta = 0$) angegeben. Die jeweiligen Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Multiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplett. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu CHCl₃ ($\delta = 7.26$) in CDCl₃, DMSO ($\delta = 2.50$) in DMSO-D₆, MeOH ($\delta = 3.31$) in CD₃OD, H₂O ($\delta = 4.80$) in D₂O, MeCN ($\delta = 1.94$) in CD₃CN oder Aceton ($\delta = 2.04$) in Aceton-D₆.

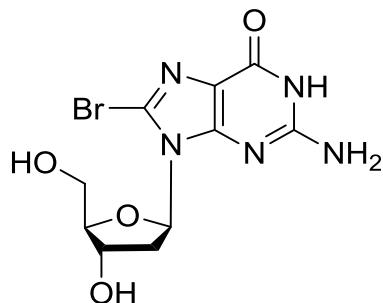
Massenspektrometrische Messungen wurden an einem *Varian MAT CH 7A* (Firma *Varian*) für Elektronenstoßionisations (**EI**) sowie an einem *Thermo Finnigan LTQ-FT-ICR* (Firma *Finnigan*) für Elektrosprayionisationen (**ESI**) durchgeführt. Für *Fast-Atom Bombardment* (**FAB**) Messungen wurde ein MAT 95 Q (Firma *Finnigan*) verwendet. Die **LC/FT-ICR-ESI** Spektren wurden an einer *LTQ Orbitrap XL FTMS* (Firma *Thermo Finnigan*) aufgenommen. Für **MALDI-TOF** Messungen benutzte man das *Autoflex II* (Firma *Bruker*) mit einem *MTP* AnchorChip var/348 Träger. Als Matrix wurde eine HPA-Matrix (50 mg

3-Hydroxypicolinsäure, 10 mg Ammoniumhydrogencitrat, 10 μ L 18-Krone-6, 1 mL ddH₂O) verwendet. Salzhaltige Proben wurden mittels eines *MF-Millipore*TM Membranfilters (0.025 μ m Porengröße) entsalzt.

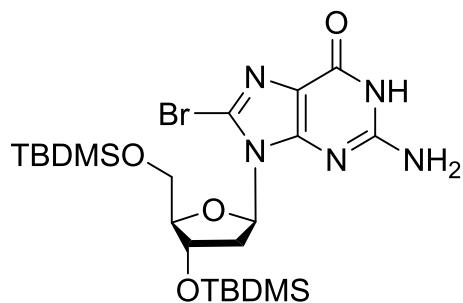
IR-Spektren wurden an einem *Spectrum BX* FT-IR System von *Perkin Elmer* mit einem *DuraSamplIR II* Messkopf von *Smiths* und einer Diamant-ATR (*Attenuated Total Reflection*) Einheit ohne weitere Präparation der Proben aufgenommen. FIR-Messungen wurden von der Schwingungsspektroskopie-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie (Haus D) Hilfe eines Polyethylen-Presslings durchgeführt. Hierfür wurde ein *Bruker IFS 66v/s* Spektrometer verwendet. Die Wellenzahlen wurden in cm⁻¹ angegeben. Die Intensität der Signale wurden mit s (stark), m (medium), w (schwach) konkretisiert. Die Bezeichnung br steht für sehr breite Signale. Pro Bande ist jeweils eine Auswahl an möglichen Schwingungen, die nach *Becker*^[332] und *Hesse, Meier, Zeeh*^[333] zugeordnet wurden, angegeben.

Schmelzpunkte wurden in offenen Glaskapillaren an einem *Melting Point B-450* (Firma *Büchi*) bestimmt und sind nicht korrigiert.

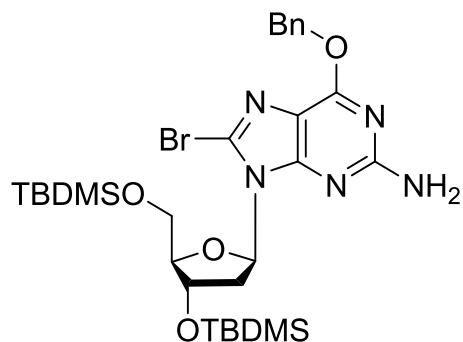
UV/VIS-Spektren wurden, sofern nicht anders angegeben, mit einem *Cary 100 Bio* mit *Cary Temperature Controller* und *Sample Transport Accessory* mit *Multi Cell Block* (Firma *Varian*) gemessen.

5.4 Synthese des dG(C8)-AAF Phosphoramidits8-Brom-2'-desoxyguanosin 2

2'-Desoxyguanosin Monohydrat **1** (10.00 g 35.06 mmol) wurde in einem Gemisch aus Acetonitril (370 mL) und Wasser (96 mL) suspendiert und *N*-Bromsuccinimid (9.36 g, 52.59 mmol, 1.5 Äq.) in drei Portionen zugegeben. Die gelbe Reaktionsmischung wurde 40 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Der gelbliche Feststoff wurde anschließend in Aceton (190 mL) suspensiert und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch über Nacht auf -20 °C gekühlt. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde mit kaltem Aceton (200 mL) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurde ein hellgelbes Pulver (10.26 g, 29.65 mmol, 85%) erhalten. R_f = 0.44 (DCM/MeOH = 1:1). **1H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 10.79 (s, 1H, N1-H), 6.48 (s, 2H, NH₂), 6.13 (dd, 3J = 7.8 Hz, 6.8 Hz, 1H, C₁-H), 5.29–5.21 (m, 1H, C_{5'}-OH), 4.85 (br d, 1H, C_{3'}-OH), 4.37 (ddd, 3J = 2.8, 2.8, 5.9 Hz, 1H, C₃-H), 3.77 (ddd, 3J = 3.0, 5.6, 5.6 Hz, C_{4'}-H), 3.65–3.55 (m, 1H, C_{5'}-H_a), 3.5–3.42 (m, 1H, C_{5'}-H_b), 3.14 (ddd, 2J = 13.2 Hz, 3J = 6.4, 8.0 Hz, 1H, C_{2'}-H_a), 2.08 (m, 1H C_{2'}-H_b). **HR-MS (ESI⁻)** *m/z* für [C₁₀H₁₁N₅O₄⁷⁹Br]⁻ ([M-H])⁻: ber.: 343.9994, gef.: 343.9996.

8-Brom-3',5'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 3

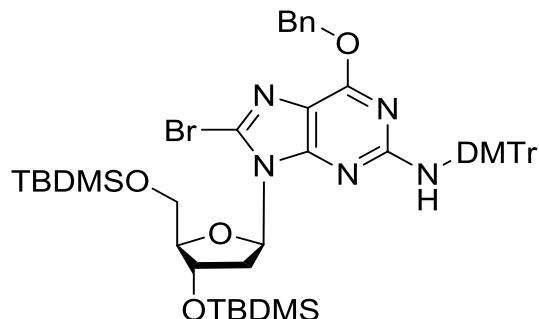
8-Brom-2'-desoxyguanosin **2** (10.15 g, 29.00 mmol) wurde in DMF (60 mL) gelöst und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (14.42 g 95.67 mmol, 3.3 Äq.) sowie Imidazol (9.97 g, 146.45 mmol, 5 Äq.) zugegeben. Die klare Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 20:1, Kieselgel) aufgereinigt. Als Produkt wurde ein leicht gelblicher kristalliner Feststoff (16.03 g, 27.90 mmol, 96%) erhalten. **R_f**-Wert = 0.56 (DCM/MeOH = 10:1). **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 10.83 (s, 1H, N1-H), 6.41 (s, 2H, NH₂), 6.12 (dd, ³J = 7.1, 7.1 Hz, 1H, C₁-H), 4.56 (ddd, ³J = 3.3, 3.3, 6.3 Hz, 1H, C_{3'}-H), 3.72 (m, 2H, C_{5'}-H_a+H_b), 3.63 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.35 (ddd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 6.7, 6.9 Hz, 1H, C_{2'}-H_a), 2.12 (ddd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 3.6, 7.0 Hz, 1H, C_{2'}-H_b), 0.87 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.80 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.09 (s, 6H, 2x Si-CH₃), -0.03 (s, 3H, Si-CH₃), -0.05 (s, 3H, Si-CH₃). **HR-MS (ESI⁻)** m/z für [C₂₂H₃₉N₅O₄Si₂⁷⁹Br]⁻ ([M-H]⁻): ber.: 572.1724, gef.: 572.1721.

*O*⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 4

Zu einer Suspension aus **3** (10.00 g, 17.45 mmol, 1 Äq.) und Triphenylphosphin (6.86 g, 26.17 mmol, 1.5 Äq.) in 250 mL Dioxan wurden Benzylalkohol (2.71 mL, 26.17 mmol,

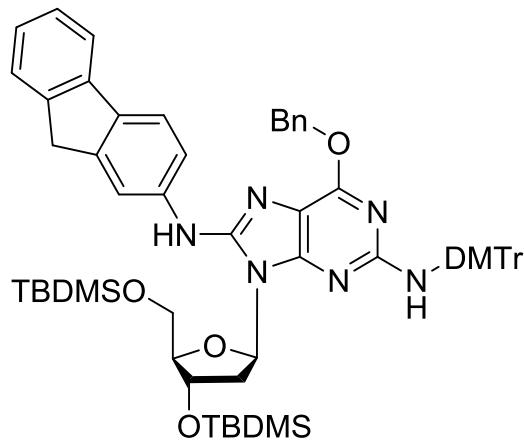
1.5 Äq.) und Diisopropylazodicarboxylat (5.14 mL, 26.17 mmol, 1.5 Äq.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 5 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (*i*Hexan/EtOAc = 10:1, Kieselgel) aufgereinigt. Als Produkt erhielt man einen farblosen Schaum (9.76 g, 14.50 mmol, 80%). R_f = 0.52 (*i*Hexan/EtOAc = 4:1). **1H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 7.47–7.45 (m, 2H, Benzyl-H), 7.41–7.26 (m, 3H, Benzyl-H), 6.45 (s, 2H, NH₂), 6.16 (t, ³J = 6.9, 6.9 Hz, 1H, C_{1'}-H), 5.45 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 4.66 (ddd, ³J = 3.6, 3.7, 6.2 Hz, 1H, C_{3'}-H), 3.75 (m, 2H, C_{5'}-H_a+H_b), 3.61 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.50 (m, 1H, C_{2'}-H_a), 2.17 (ddd, ³J = 3.9, 7.0 Hz, ²J = 13.1 Hz, 1H, C_{2'}-H_b), 0.88 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.77 (s, 1H, *t*Bu-H), 0.10 (s, 6H, 2x Si-CH₃), -0.07 (s, 3H, Si-CH₃), -0.09 (s, 3H, Si-CH₃). **HR-MS (ESI⁺)** *m/z* für [C₂₉H₄₇N₅O₄Si₂⁷⁹Br]⁺ ([M+H]⁺): ber.: 664.2350, gef.: 664.2348.

*O*⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-*O*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*²-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin 5



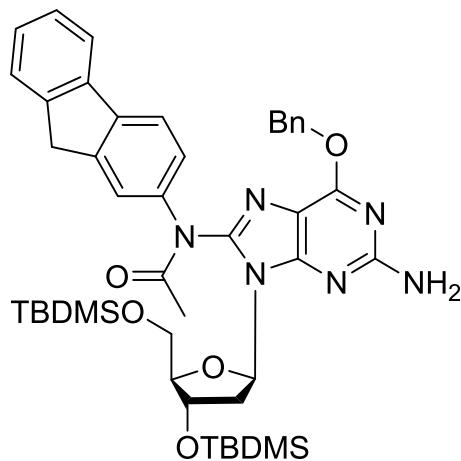
Zu einer Lösung aus **4** (9.76 g, 14.50 mmol, 1 Äq.) in trockenem Pyridin (80 mL) wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (7.37 g, 21.75 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und über Nacht unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktion mit Methanol (2 mL) gestoppt wurde, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung (*i*Hexan/EtOAc 15:1 → 10:1 → 7:1, 1% Pyridin, Kieselgel) lieferte das Produkt als farblosen Schaum (13.57 g, 14.07 mmol, 97%). R_f = 0.58 (*i*Hexan/EtOAc = 4:1). **1H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 7.31–7.11 (m, 15H, 5× Benzyl-H + 9× DMTr-9 + N²-H), 6.82–6.77 m, 4H, 4× DMTr-H), 6.04 (m, 1H, C_{1'}-H), 4.72 (br s, 2H, Benzyl-CH₂), 4.47 (m, 1H, C_{3'}-H), 3.75–3.60 (m, 8H, 2× OCH₃ + C_{5'}-H_a+H_b), 3.52 (m, 2H, C_{4'}-H + C_{2'}-H_a), 2.06 (m, 1H, C_{2'}-H_b), 0.85 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.75 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.08 (s, 6H, 2× Si-CH₃), -0.08 (s, 3H, Si-CH₃), -0.13 (s, 3H, Si-CH₃). **HR-MS (ESI⁺)** *m/z* für [C₅₀H₆₃O₆N₅Si₂⁷⁹Br]⁺ ([M+H]⁺): ber.: 964.3500, gef.: 964.3492.

8-(*N*-2-Aminofluoren)-*O*⁶-benzyl-3',5'-*O*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*²-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **6**

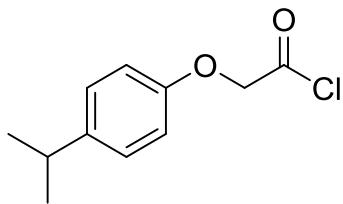


5 (3.00 g, 3.11 mmol, 1 Äq.), 2-Aminofluoren (1.01 g, 5.59 mmol, 1.8 Äq.), \pm BINAP (0.58 g, 0.93 mmol, 30 mol%) und $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.58 g, 0.31 mmol, 10 mol%) wurden dreimal entgast und in 20 mL entgastem Toluol gelöst. Die dunkelrote Reaktionslösung wurde unter Argon auf 90°C erhitzt. Nach 10 min wurde eine Suspension aus NaOtBu (0.55 g, 5.72 mmol, 1.8 Äq.) in 25 mL entgastem Toluol zugegeben und 1.5 h bei 110 °C unter Argon refluxiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (*i*Hexan/EtOAc = 8:1, 1% Pyridin, Kieselgel) aufgereinigt. Als Produkt wurde ein gelblicher Schaum (2.43 g, 2.32 mmol, 75%) erhalten. R_f = 0.51 (*i*Hexan/EtOAc = 3:1). **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆):** δ (ppm) = 8.85 (br s, 1H, N^8 -H), 7.82 (m, 1H, Fluoren-C1-H), 7.72–7.74 (m, 2H, 2× Fluoren-H), 7.57 (m, 1H, Fluoren-H), 7.55 (m, 1H, Fluoren-H), 7.30–7.15 (m, 16 H, Fluoren-2H + 5× Benzyl-H + 9× DMTr-H), 6.78 (m, 4H, 4× DMTr-H), 6.56 (s, 1H, N^2 -H), 6.20 (m, 1H, C_{1'}-H), 4.83 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 4.57 (m, 1H, C_{3'}-H), 3.88–3.78 (m, 4H, Fluoren-CH₂ + C_{5'}-H_a+H_b), 3.68 (s, 6H, 2× OCH₃), 3.60 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.29 (m, 1H, C_{2'}-H_a), 2.00 (m, 1H, C_{2'}-H_b), 0.85 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.77 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.07 (s, 6H, 2× Si-CH₃), -0.06 (s, 3H, Si-CH₃), -0.07 (s, 3H, Si-CH₃). **HR-MS (ESI⁺)** m/z für [C₆₃H₇₅N₆O₆Si₂]⁺ ([M+H]⁺): ber.: 1067.5287, gef.: 1067.5291.

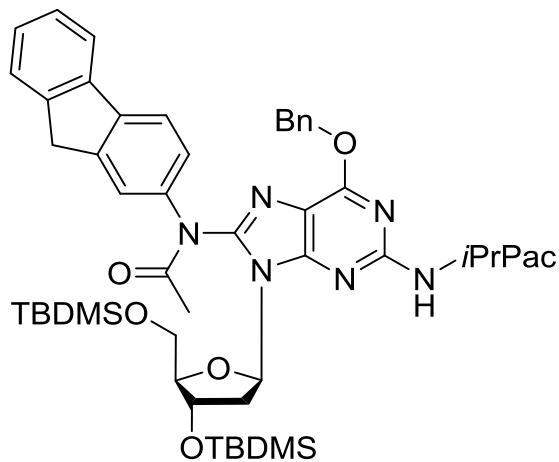
8-(*N*-Acetyl-2-aminofluoren)-*O*⁶-benzyl-3',5'-*O*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 7



Zu einer Lösung aus **6** (4.68 g, 4.56 mmol, 1 Äq.) in trockenem Pyridin (125 mL) wurden 4-DMAP (0.28 g, 2.33 mmol, 0.5 Äq.) und Triethylamin (3.08 mL, 22.80 mmol, 5 Äq.) zugegeben. Nach Zugabe von Essigsäureanhydrid (2.16 mL, 22.80 mmol, 5 Äq.) wurde die rötliche Reaktionslösung 5.5 h unter Argon bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der braune Rückstand in Ethylacetat (200 mL) aufgenommen und dreimal mit je 200 mL Wasser gewaschen. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde mit einer 0.01 M HCl-Lösung in Methanol (10 mL) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Daraufhin wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung (*i*Hexan/EtOAc = 6:1 → 3:1, Kieselgel) lieferte das Produkt als gelben Schaum (3.41 g, 4.23 mmol, 93%). R_f = 0.21 (*i*Hexan/EtOAc = 3:1). **1H-NMR** (400 MHz, DMSO-**D**₆): δ (ppm) = 7.86 (m, 2H, 2× Fluoren-H), 7.56–7.42 (m, 4H, 4× Fluoren-H), 7.40–7.24 (m, 6H, Fluoren-H + 5× Benzyl-H), 6.44 (s, 2H, N^2 -H₂), 6.08 (m, 1H, C₁-H), 5.45 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 4.61 (m, 1H, C_{3'}-H), 3.88–3.72 (m, 4H, Fluoren-CH₂ + C_{5'}-H_a+H_b), 3.64 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.22 (m, 1H, C_{2'}-H_a), 2.02 (s, 3H, N^8 -Ac), 1.85 (m, 1H, C_{2'}-H_b), 0.84 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.73 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.07 (s, 6H, 2× Si-CH₃), -0.10 (s, 6H, Si-CH₃). **HR-MS** (ESI⁺) *m/z* für [C₄₄H₅₉N₆O₅Si₂]⁺([M+H]⁺): ber.: 807.4085, gef. 807.4071.

(4-Isopropyl)-phenoxyacetylchlorid

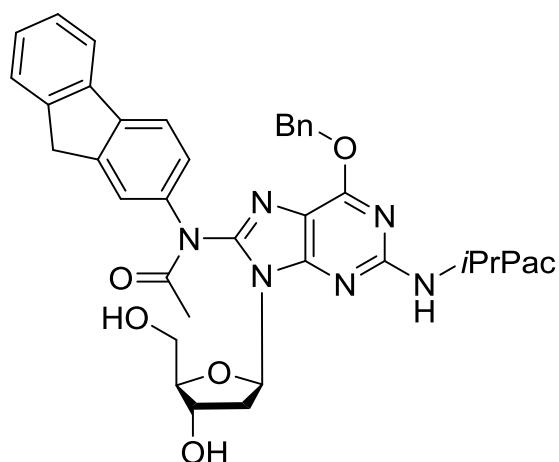
(4-Isopropyl)-phenoxyessigsäure (2.50 g, 12.87 mmol, 1 Äq.) wurde in Thionylchlorid (2 mL, 27.49 mmol, 2.1 Äq.) suspensiert und auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde durch Anlegen von Vakuum überschüssiges Thionylchlorid entfernt. Die Reaktionslösung wurde auf 120 °C erhitzt und unter Ölpumpenvakuum destilliert. Als Produkt wurde eine farblose Flüssigkeit (2.3 g, 10.84 mmol, 85%) erhalten. **¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 7.21 (m, 2H, H_{3,5}), 6.68 (m, 2H, H_{2,6}), 4.95 (s, 1H, CH₂), 2.90 (sept, ³J = 6.9 Hz, 1H, CH), 1.52 (d, ³J = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.42 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, CH₃). **¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 170.51, 155.01, 143.29, 127.62, 114.76, 73.00.

8-(N-Acetyl-2-aminofluoren)-O⁶-benzyl-3',5'-O-bis(tert-butyldimethylsilyl)-N²-isopropylphenoxyacetyl-2'-desoxyguanosin 8

Zu einer Lösung aus **7** (3.30 g, 4.09 mmol, 1 Äq.) in Pyridin (120 mL) wurde (4-Isopropyl)-phenoxyacetylchlorid (3.50 mL, 16.33 mmol, 4 Äq.) gegeben. Die dunkelrote Reaktionslösung wurde 3 h unter Argon bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der braune Feststoff wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde

mittels Säulenchromatographie (*i*Hexan/Ethylacetat = 3:1, Kieselgel) gereinigt. Als Produkt wurde ein gelblicher Schaum (3.88 g, 3.95 mmol, 85%) erhalten. R_f = 0.13 (*i*Hexan/EtOAc = 3:1). **1H-NMR (600 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 7.91–7.87 (m, 2H, 2× Fluoren-H), 7.56–7.51 (m, 4H, 4× Fluoren-H), 7.37–7.29 (m, 6 H, Fluoren-H + 5× Benzyl-H), 7.10 (d, ³*J* = 8.6, 2H, Pac-H₂), 6.81 (d, ³*J* = 8.6, 2H, Pac-H₂), 6.22 (m, 1H, C_{1'}-H), 5.59 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 4.84 (m, 3H, Pac-CH₂, C_{3'}-H), 3.92 (s, 2H, Fluoren-CH₂), 3.77–3.70 (m, 3H, C_{5'}-H_a+H_b + C_{4'}-H), 3.23 (m, 1H, C_{2'}-H_a), 2.79 (sept, ³*J* = 6.9, 1H, *i*Pr-H), 2.06 (s, 3H, *N*⁸-Ac), 1.95 (m, 1H, C_{2'}-H_b), 1.13–1.11 (m, 6H, 2× *i*Pr-CH₃), 0.80 (s, 9H, *t*Bu-H), 0.69 (s, 9H, *t*Bu-H), -0.01 (br s, 6H, 2× Si-CH₃), -0.18 (br s, 6H, 2× Si-CH₃). **HR-MS (ESI⁺)** *m/z* für [C₅₅H₇₁N₆O₇Si₂]⁺ ([M+H]⁺): ber.: 983.4923, gef.: 983.4926.

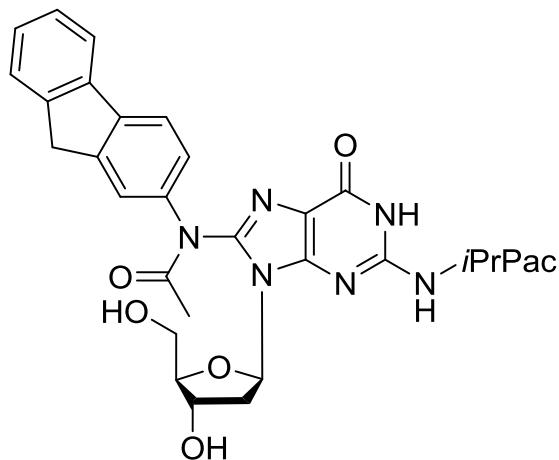
8-(*N*-Acetyl-2-aminofluoren)-*O*⁶-benzyl-*N*²-isopropylphenoxyacetyl-2'-des-oxoguanosin **9**



Eine Lösung aus **8** (3.40 g, 3.46 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (80 mL) wurde unter Argon auf 0 °C gekühlt und anschließend mit Essigsäure (1.20 mL, 20.76 mmol, 6 Äq.) und TBAF (1M in THF; 10.38 mL, 10.38 mmol, 3 Äq.) versetzt. Die gelbe Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Die säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH = 15:1, Kieselgel) lieferte als Produkt einen farblosen Schaum (2.38 g, 2.70 mmol, 78%). R_f = 0.36 (DCM/MeOH = 10:1). **1H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 7.91 (m, 1H, Fluoren-H), 7.88 (d, 1H, ³*J* = 7.5 Hz, Fluoren-H), 7.49 (m, 2H, 2× Fluoren-H), 7.38–7.27 (m, 8 H, 3× Fluoren-H + 5× Benzyl-H), 7.12 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, Pac-H₂), 6.83 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, Pac-H₂), 6.22 (m, 1H, C_{1'}-H), 5.56 (br s, 2H, Benzyl-CH₂), 5.20 (br d, 1H, C_{3'}-OH), 4.92 (s, 2H, Pac-CH₂), 4.57 (m, 2H, C_{5'}-OH + C_{3'}-H), 3.93 (s, 2H, Fluoren-CH₂), 3.81 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.65 (m, 1H, C_{5'}-H_a), 3.53 (m, 1H, C_{5'}-H_b), 3.18 (br m,

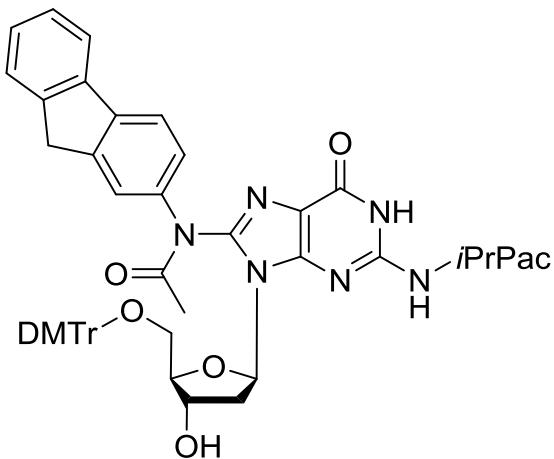
1H, C_{2'}-H_a), 2.79 (sept, ³J = 6.9 Hz, 1 H, iPr-H), 2.07 (s, 3H, N⁸-Ac), 2.04 (m, 1H, C_{2'}-H_b), 1.14–1.12 (m, 6H, 2× iPr-CH₃). **HR-MS** (ESI[−]) *m/z* für [C₄₃H₄₁N₆O₇][−] ([M−H][−]): ber.: 753.3037, gef. 753.3074.

8-(*N*-Acetyl-2-aminofluoren)-*N*²-isopropylphenoxyacetyl-2'-desoxyguanosin **10**



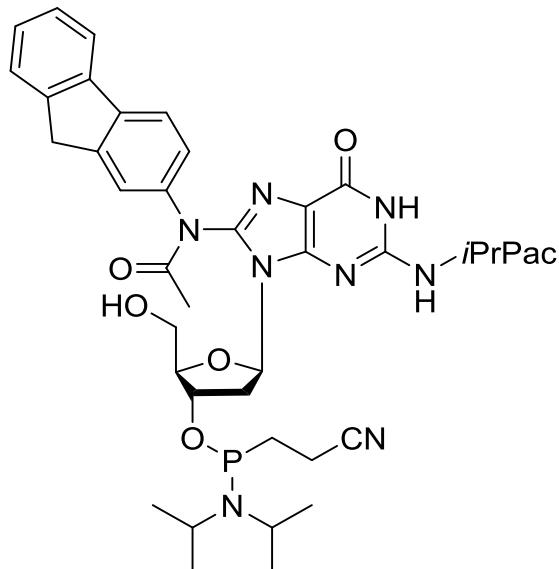
Eine Suspension aus **9** (2.80 g, 3.70 mmol, 1 Äq.) und 10%igem Pd/C (784 mg) in absolutiertem Ethanol (250 mL) wurde über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 20:1, Kieselgel) aufgereinigt. Als Produkt wurde ein farbloser Schaum (2.11 g, 3.19 mmol, 86%) erhalten. *R_f* = 0.35 (DCM/MeOH = 10:1). **1H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 11.99 (s, 1H, N1-H) 11.48 (s, 1H, N²-H), 7.95 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, Fluoren-H), 7.91 (d, 1H, ³J = 7.6 Hz, Fluoren-H), 7.56 (d, ³J = 7.2, 1H, Fluoren-H), 7.40–7.32 (m, 4H, 4× Fluoren-H), 7.12 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, Pac-H₂), 6.87 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, Pac-H₂), 6.42 (m, 1H, C_{1'}-H), 5.18 (br d, 1H, C_{3'}-OH), 4.90 (s, 2H, Pac-CH₂), 4.81 (m, 1H, C_{5'}-OH), 4.35 (m, 1H, C_{3'}-H), 3.92 (s, 2H, Fluoren-CH₂), 3.81 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.61 (m, 1H, C_{5'}-H_a), 3.49 (m, 1H, C_{5'}-H_b), 2.93 (br m, 1H, C_{2'}-H_a), 2.80 (m, 1H, iPr-H), 2.03–2.01 (m, 4H, N⁸-Ac + C_{2'}-H_b), 1.14–1.11 (m, 6H, 2× iPr-CH₃). **HR-MS** (ESI[−]) *m/z* für [C₃₆H₃₅N₆O₇][−] ([M−H][−]): ber.: 663.2567, gef.: 663.2574.

8-(N-Acetyl-2-aminofluoren)-5'-O-dimethoxytrityl-N²-isopropylphenoxy-acetyl-2'-desoxyguanosin 11

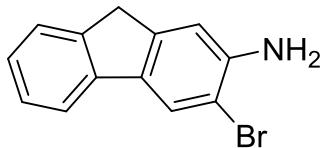


Eine Lösung aus **10** (954 mg, 1.42 mmol, 1 Äq.) und 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (576 mg, 1.70 mmol, 1.2 Äq.) in 20 mL trockenem Pyridin wurde 3 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Die Reaktion wurde mit 5 mL Methanol gestoppt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 40:1, 1% Pyridin, Kieselgel) aufgereinigt und als Produkt ein hellgelber Schaum (1.32 g, 1.36 mmol, 96 %) erhalten. R_f = 0.56 (DCM/MeOH = 10:1). **1H-NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ (ppm) = 11.7 (br s, 2H, N1-H + N²-H), 7.75–7.66 (m, 2H, 2× Fluoren-H), 7.52 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, Fluoren-H), 7.40–7.23 (m, 6H, 4× Fluoren-H + 2× DMTr-H), 7.21–7.09 (m, 9H, Pac-H₂ + 7× DMTr-H), 6.87–6.67 (m, 6H, Pac-H₂ + 4× DMTr-H), 6.19 (m, 1H, C₁-H), 5.25 (d, 1H, C₃'-OH), 4.66 (s, 2H, Pac-CH₂), 4.48 (m, 1H, C₃'-H), 4.05 (s, 2H, Fluoren-CH₂), 3.82 (m, 1H, C₄'-H), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.42 (m, 1H, C₅'-H_a), 3.26 (m, 1H, C₅'-H_b), 3.11 (m, 1H, C₂'-H_a), 2.87 (sept, ³J = 6.7 Hz, 1 H, iPr-H), 2.15 (s, 3H, N⁸-Ac), 1.95 (m, 1H, C₂'-H_b), 1.22 (m, 3H, iPr-CH₃), 1.20 (m, 3H, iPr-CH₃). **HR-MS (ESI⁻)** m/z für [C₅₇H₅₃N₆O₉]⁻ ([M-H]⁻): ber.: 965.3874, gef. 965.3834.

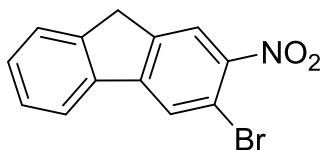
8-(N-Acetyl-2-aminofluoren)-3'-O-(2'-cyanoethoxydiisopropylamino-phosphino)-5'-O-dimethoxytrityl-N²-isopropylphenoxyacetyl-2'-desoxyguanosin 12



Unter Schutzatmosphäre wurde **11** (430 mg, 0.45 mmol, 1 Äq.) in trockenem DCM (4 mL) gelöst und Diisopropylammoniumtetrazolid^[285] (280 mg, 1.63 mmol, 3.6 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal gründlich entgast und anschließend Bannwarth-Reagenz (250 µL, 1.25 mmol, 2.7 Äq.) über ein Septum zugegeben. Das hellgelbe Reaktionsgemisch wurde 1.5 h unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 40:1, 1% Pyridin, Kieselgel) aufgereinigt, die Fraktionen wurden im Argongegenstrom aufgefangen. Als Produkt wurde ein farbloser Schaum (517.78 mg, 0.45 mmol, 100%) erhalten. R_f = 0.80 (DCM/MeOH = 10:1). **¹H-NMR (200 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 11.76 (s, 1H, N1-H), 10.93 (s, 1H, N²-H), 7.91–6.53 (m, 24H, 7× Fluoren-H + 13× DMTr-H + Pac-H₄), 6.28 (m, 1H, C₁-H), 4.78 (s, 2H, Pac-CH₂), 4.64 (m, 1H, C₃-H), 4.13 (m, 1H, C₄-H), 3.83 (m, 2H, Fluoren-CH₂), 3.63–3.62 (m, 6H, 2× OCH₃), 3.48–3.38 (m, 5H, C₅-H_a + PO-CH₂), 3.22–3.05 (m, 2H, C₅-H_b + C₂-H_a), 2.85 (m, 1H, iPr-H), 2.71–2.50 (m, 2H, N-2iPr-2H), 2.34 (m, 1H, C₂-H_b), 2.08 (s, 3H, N⁸-Ac), 1.19–1.02 (m, 18H, 2× Pac-iPr-CH₃ + 4× N-iPr-CH₃). **³¹P-NMR (200 MHz, DMSO-D₆)**: δ (ppm) = 148.83, 148.33.

5.5 Synthese des dG(N^2)-AAF Phosphoramidits2-Amino-3-bromfluoren 14

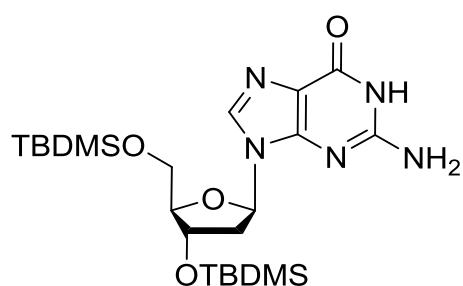
Zu einer Lösung aus 2-Aminofluoren (10.00 g, 55.18 mmol, 1 Äq.) in DMSO (450 mL) wurde HBr (48%; 9.50 mL, 55.18 mmol, 1 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C gerührt, bis eine dunkelbraune Färbung eintrat (ca. 2 h). Anschließend wurde gesättigte NaHSO₃-Lösung zugegeben und das Gemisch viermal mit jeweils 500 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 500 mL Wasser gewaschen und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (*i*Hexan/EtOAc = 10:1, Kieselgel) aufgereinigt. Als Produkt wurde ein brauner Feststoff (13.04 g, 50.35 mmol, 91%) erhalten. R_f = 0.17 (*i*Hexan/EtOAc = 8:1). **1H-NMR (400 MHz, DMSO-D6):** δ = 7.89 (s, 1H, C₄-H), 7.70 (dd, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1H), 7.49–7.41 (m, 1H, C₈-H), 7.32–7.23 (td, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, 1H, C₆-H), 7.16 (t, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, C₇-H), 7.03–6.98 (m, 1H, C₁-H), 5.39 (s, 2H, NH₂), 3.76 (s, 2H, CH₂). **13C-NMR (101 MHz, DMSO-D6):** δ = 144.72, 143.87, 141.86, 140.90, 131.57, 126.61, 125.14, 124.74, 123.60, 118.67, 111.68, 106.52, 35.93. **HR-MS (ESI⁺)** *m/z* für [C₁₃H₁₁BrN]⁺ ([M+H]⁺): ber.: 260.0069, gef.: 260.0069. **Schmelzbereich:** 143–144 °C. **IR ν (cm⁻¹)** = 3421.8 (m), 3336.9 (m), 3039.0 (w), 1612.2 (m), 1411.8 (m), 870.5 (m), 749.2 (s), 730.3 (s).

3-Brom-2-nitrofluoren 15

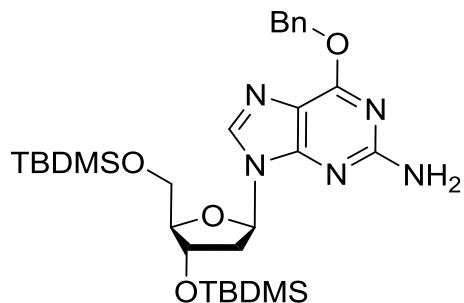
2-Amino-3-bromfluoren **14** (5.44 g, 21.02 mmol, 1 Äq.) wurde in DCM (500 mL) gelöst und 77% *m*CPBA (21.07 g, 84.08 mmol, 11 Äq.) zugegeben. Die dunkelbraune Lösung wurde 40 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Na₂S₂O₄-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*i*Hexan/DCM = 4:1, Kieselgel) aufgereinigt und lieferte einen gelben Feststoff als Reinprodukt. $R_f = 0.68$ (*i*Hexan/Ethylacetat = 2:1). **1H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆)**: $\delta = 8.50$ (s, 1H, C₁-H), 8.26 (s, 1H, C₄-H), 8.15–8.10 (m, 1H, C₅-H), 7.67 (m, 1H, C₈-H), 7.49–7.45 (m, 2H, C₆-H, C₇-H), 4.03 (s, 2H, CH₂). **13C-NMR (101 MHz, DMSO-D₆)**: $\delta = 147.61, 146.54, 144.89, 143.44, 138.08, 129.00, 127.29, 125.69, 125.43, 122.44, 121.93, 112.10, 36.45$. **HR-MS (ESI⁺)** *m/z* für [C₁₃H₇BrNO₂]⁺([M–H][–]): ber.: 287.9655, gef.: 287.9660. **Schmelzbereich:** 126–130 °C. **IR ν (cm^{–1})** = 1514.6 (m), 1327.0 (m), 870.6 (m), 749.0 (s), 765.1 (s), 701.3 (s).

3',5'-O-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 16

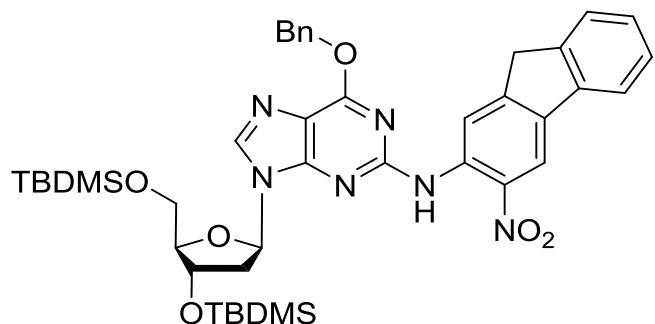


2'-Desoxyguanosin **1** (10.00 g, 35.06 mmol, 1 Äq.), *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (17.33 g, 115.00 mmol, 3.3 Äq.) und Imidazol (15.73 g, 231.05 mmol, 6.6 Äq.) wurden in 300 mL *N,N*-Dimethylformamid suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach wenigen Minuten entstand eine klare gelbliche Lösung, in der sich nach kurzer Zeit ein farbloser Niederschlag bildete. Anschließend wurden 60 mL Ethanol zugefügt und das Reaktionsgemisch 20 h bei –20° gelagert. Nach dem Abfiltrieren und Waschen mit kaltem Ethanol wurde das Produkt als farbloses Pulver erhalten (17.27 g, 36.05 mmol, 100%). $R_f = 0.52$ (DCM/MeOH = 10:1). **1H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆)**: $\delta = 10.73$ (s, 1H, N1-H), 7.89 (s, 1H, C₈-H), 6.59 (s, 2H, N²-H₂), 6.11 (dd, ³J = 6.03, 7.72 Hz, C_{1'}-H), 4.48 (dt, ³J = 2.91, 5.61 Hz, C_{3'}-H), 3.81 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.67 (ddd, ²J = 11.01, 15.55 Hz, ³J = 5.22 Hz, 2H, C_{5'}-H), 2.64 (ddd, ²J = 13.25 Hz, ³J = 5.57, 7.71 Hz, 1H, C₂-H), 2.24 (ddd, ²J = 13.19 Hz, ³J = 6.02, 3.25 Hz, 1H, C_{2'}-H), 0.89 (s, 9H, *t*Bu), 0.87 (s, 9H, *t*Bu), 0.10 (s, 6H, Si-(CH₃)₂), 0.05 (s, 3H, Si-(CH₃)₂), 0.04 (s, 3H, Si-(CH₃)₂). **HR-MS (ESI⁺)** *m/z* für [C₂₂H₄₂N₅O₄Si₂]⁺([M+H]⁺): ber.: 496.2775, gef.: 496.2768.

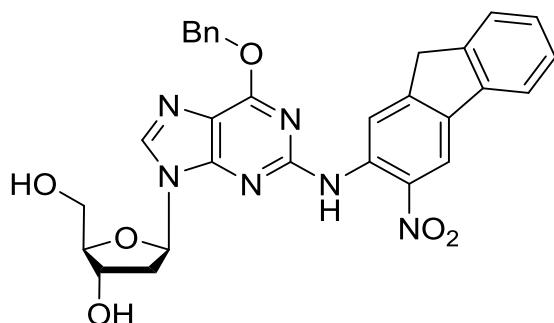
O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 17

16 (14.86 g, 29.91 mmol) wurde zusammen mit Triphenylphosphin (11.77 g, 44.86 mmol, 1.5 Äq.) in trockenem Dioxan (200 mL) gelöst. Anschließend wurden DIAD (8.81 mL, 44.86 mmol, 1.5 Äq.) und Benzylalkohol (4.64 mL, 44.86 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und das Gemisch unter Argon bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (*i*Hexan/EtOAc = 8:1, Kieselgel) aufgereinigt. Als Produkt wurde ein farbloser Schaum (15.06 g, 25.73 mmol, 86%) erhalten. R_f = 0.55 (*i*Hexan/EtOAc = 5:1). **1H-NMR (400 MHz, Aceton-D₆)**: δ = 7.97 (s, 1H, N1-H), 7.94 (s, 1H, C₈-H), 7.53–7.49 (m, 2H, Benzyl-H), 7.39–7.27 (m, 3H, Benzyl-H), 6.32 (dd, ³J = 7.3, 6.2 Hz, 1H, C_{1'}-H), 5.84 (s, 2H, NH₂), 5.51 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 4.69 (dt, ³J = 5.9, 3.2 Hz, 1H, C_{3'}-H), 3.94 (ddd, ³J = 5.2, 4.0, 3.0 Hz, 1H, C_{4'}-H), 3.88–3.77 (m, 2H, C_{5'}-H), 2.83 – 2.75 (m, 1H, C_{2'}-H), 2.36 (m, 1H, C_{2'}-H), 0.94 (s, 9H, *t*Bu), 0.91 (s, 9H, *t*Bu), 0.16 (s, 3H, Si-CH₃), 0.15 (s, 3H, Si-CH₃), 0.08 (s, 3H, Si-CH₃), 0.07 (s, 3H, Si-CH₃). **HR-MS (ESI⁺)** *m/z* für [C₂₉H₄₈N₅O₄Si₂]⁺ ([M+H]⁺): 568.3239, gefunden: 568.3241.

*N*²-(2-Nitrofluoren-3-yl)-*O*⁶-benzyl-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **18**

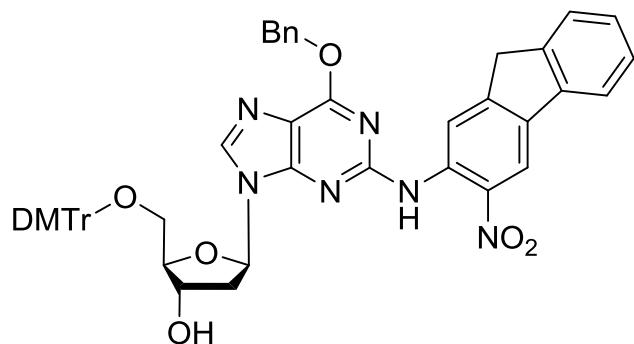


17 (2.0 g, 3.42 mmol, 1 Äq.), Bromnitrofluoren (1.48 g, 5.13 mmol, 1.5 Äq.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (77 mg, 0.34 mmol, 10 mol%) und BINAP (639 mg, 1.03 mmol, 30 mol%) wurden zusammengegeben und dreimal entgast. Das Gemisch wurde in entgastem Toluol (20 mL) gelöst und auf 90 °C erhitzt. Nach 10 min wurde NaOtBu (493 mg, 5.13 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 24 h refluxiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (*iso*-Hexan/Ethylacetat 6:1, Kieselgel) aufgereinigt. Als Produkt wurde als roter Schaum (1.26 g, 1.60 mmol, 46%) erhalten. R_f = 0,42 (*i*Hexan/Ethylacetat 3:1, Kieselgel). **¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃):** δ = 10.70 (s, 1H, *N*²-H), 9.39 (s, 1H, Fluoren-H), 8.43 (s, 1H, Fluoren-H), 8.17 (s, 1H, C₈-H), 7.71 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 1H, Fluoren-1H), 7.60 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H, Fluoren-H), 7.58–7.54 (m, 2H, 2× Benzyl-H), 7.42 (td, ³*J* = 7.4 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, Fluoren-H), 7.40–7.36 (m, 4H, Fluoren-H, 3× Benzyl-H), 6.48 (t, ³*J* = 6.3 Hz, 1H, C_{1'}-H), 5.79 – 5.65 (m, 2H, Benzyl-CH₂), 4.62 (dt, ³*J* = 5.7, 3.8 Hz, 1H, C₄-H), 4.04 (q, ³*J* = 3.5 Hz, 1H, C₃-H), 3.97 (s, 2H, Fluoren-CH₂), 3.86 (dd, ²*J* = 11.2 Hz, ³*J* = 4.1 Hz, 1H), 3.79 (dd, ²*J* = 11.2 Hz, ³*J* = 3.1 Hz, 1H), 2.68 (dt, ²*J* = 12.6 Hz, ³*J* = 6.1 Hz, 1H, C₂-H), 0.90 (s, 9H, *t*Bu), 0.89 (s, 9H, *t*Bu), 0.10 (s, 3H, Si-CH₃), 0.08 (s, 3H, Si-CH₃), 0.08 (s, 3H, Si-CH₃), 0.07 (s, 3H, Si-CH₃). **HR-MS (ESI⁻)** *m/z* für [C₄₂H₅₃N₆O₆Si₂]⁻ ([M-H]⁻): ber.: 793.3571, gef.: 793.3571.

***N*²-(2-Nitrofluoren-3-yl)-*O*⁶-benzyl-2'-desoxyguanosin 19**

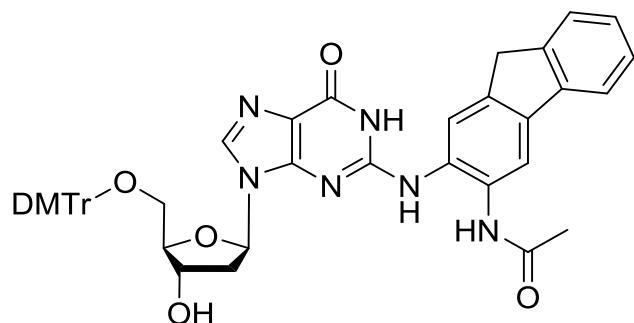
18 (1.27 g, 1.60 mmol, 1 Äq.) wurde in 50 mL trockenem THF gelöst und TBAF (1 M in THF; 6.40 mL, 6.40 mmol, 4 Äq.) sowie Essigsäure (0.55 mL, 9.60 mmol, 6 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h bei RT gerührt anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 15:1, Kieselgel) aufgereinigt. Das Produkt wurde als roter Schaum erhalten (852 mg, 1.50 mmol, 94%). R_f = 0.45 (DCM/MeOH = 10:1, Kieselgel). **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D6):** δ = 10.30 (s, 1H, N^2 -H), 9.00 (s, 1H, Fluoren-H), 8.38 (s, 1H, Fluoren-H), 8.33 (s, 1H, C₈-H), 7.89 (d, 3J = 6,8 Hz, 1H, Fluoren-H), 7.66 (d, 3J = 6,7 Hz, 1H, Fluoren-H), 7.50 (m, 2H, 2× Benzyl-H), 7.47–7.35 (m, 5H, 2× Fluoren-H, 3× Benzyl-H), 6.36 (dd, 3J = 7,6, 6,0 Hz, 1H, C_{1'}-H), 5.59 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 5,39 (s, 1H, C_{3'}-OH), 4,96 (s, 1H, C_{5'}-OH), 4.39 (s, 1H, C_{3'}-H), 4.01 (s, 2H, Fluoren-CH₂), 3.92 – 3.86 (m, 1H, C₄-H), 3.53 (dt, 2J = 9,4 Hz, 3J = 5,0 Hz, 2H, C_{5'}-H₂), 2.75–2.63 (m, 1H, C₂-H), 2.35 (ddd, 2J = 13,3 Hz, 3J = 6,1, 3,3 Hz, 1H, C_{2'}-H). **HRMS (ESI⁻)** *m/z* für [C₃₀H₂₅O₆N₆]⁻ ([M-H]⁻): ber.: 567.1841, gef.: 565.1838.

*N*²-(2-Nitrofluoren-3-yl)-*O*⁶-benzyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyguanosin 20



Zu einer Lösung aus **19** (1.69 g, 2.98 mmol, 1 Äq.) in 30 mL trockenem Pyridin wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.11 g, 3.28 mmol, 1.1 Äq.) gegeben und anschließend 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 40:1, 1% Pyridin, Kieselgel) aufgereinigt. Das Produkt wurde als roter Schaum (2.25 g, 2.58 mmol, 70%) erhalten. R_f = 0.47 (DCM/MeOH = 19:1, Kieselgel). **1H-NMR (200 MHz, CDCl₃)**: δ = 10.73 (s, 1H, *N*²-H), 9.49 (s, 1H, Fluoren-H), 8.41 (s, 1H, C₈-H), 7.92 (s, 1H, Fluoren-H), 7.79-7.12 (m, 18H, Fluoren-H + DMTr + Benzyl-H), 6.81-6.71 (m, 4H, DMTr), 6.51 (t, ³*J* = 6.3 Hz, 1H, C₁-H), 5.68 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 4.69 – 4.60 (m, 1H, C₃-H), 4.20 – 4.11 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.90 (s, 2H, Fluoren-CH₂), 3.76 (s, 6H, OCH₃), 3.50 – 3.26 (m, 2H, C_{5'}-H₂), 2.95 – 2.53 (m, 2H, C₂-H₂). **HR-MS (ESI⁺)** m/z für [C₅₁H₄₅O₈N₆]⁺ ([M+H]⁺): ber.: 869.3293, gef.: 869.3295.

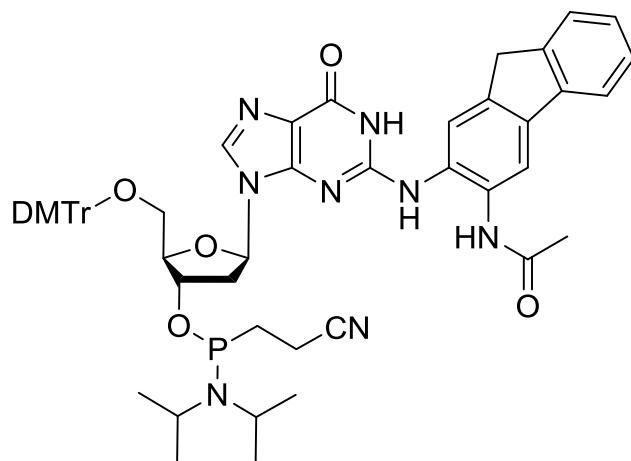
*N*²-(2-Acetylaminofluoren-3-yl)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyguanosin 21



20 (1.81 g, 2.08 mmol, 1 Äq.) und Pd/C (10% Pd; 310 mg) wurden in einem 1:1 Gemisch aus Ethylacetat und Methanol (120 mL) suspensiert und 24 h bei Raumtemperatur unter

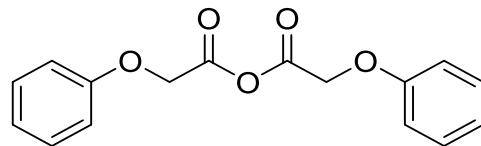
Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde Pd/C abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der entstandene rote Schaum wurde in einem 3:1 Gemisch aus Dichlormethan und Pyridin (120 mL) gelöst und unter Eiskühlung Essigsäureanhydrid (3 mL, 31.73 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von NaHCO₃-Lösung und weiterem Rühren für 30 min wurde mit Dichlormethan extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 90 mL Methanol aufgenommen und bei 0 °C mit 30 mL 25%igem Ammoniak versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 20 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 40:1 → 20:1, 1% Pyridin, Kieselgel) aufgereinigt. Das Produkt wurde als roter Feststoff (1.24 mg, 1.63 mmol, 76%) erhalten. R_f = 0.25 (DCM/MeOH = 10:1, Kieselgel). **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆):** δ = 11.32 (s, 1H, N1-H), 9.63 (s, 1H, NH), 8.70 (s, 1H, C₈-H), 8.57 (d, ³J = 4.1 Hz, 1H, Fluoren-H), 8.15 (s, 1H, N²-H), 7.93 (s, 1H, Fluoren-H), 7.61 (d, ³J = 4.5 Hz, 1H, Fluoren-H), 7.44–7.30 (m, 1H, Fluoren-H), 7.30–7.07 (m, 11H, Fluoren-H, 10× DMTr-H), 6.79 (ddd, *J* = 16.6, 8.9, 4.7 Hz, 5H, Fluoren-H, 4× DMTr-H), 6.21 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H, C_{1'}-H), 5.31 (d, ³J = 4.2 Hz, 1H, C_{3'}-OH), 4.30 (dt, ³J = 9.6, 4.5 Hz, 1H, C_{3'}-H), 3.89 (d, ⁴J = 3.4 Hz, 2H, Fluoren-CH₂), 3.79–3.76 (m, 1H, C_{4'}-H), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.18–3.02 (m, 2H, C_{5'}-H₂), 2.84 (dt, ²J = 12.9 Hz, ³J = 6.4 Hz, 1H, C_{2'}-H), 2.40–2.29 (m, 1H, C_{2'}-H). **HR-MS (ESI⁺)** m/z für [C₄₆H₄₃O₇N₆]⁺ ([M+H]⁺): ber.: 791.3193, gef.: 791.3197.

*N*²-(2-Acetylaminofluoren-3-yl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-[*N,N*-diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)phosphinyl]-2'-desoxyguanosin 22



21 (200 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.) und Diisopropylammoniumtetrazolid (168 mg, 0.98 mmol, 3.9 Äq.) wurden in 2 mL trockenem Dichlormethan gelöst und dreimal gründlich entgast. Anschließend wurde das Bannwarth-Reagenz (146 µL, 0.73 mmol, 2.9 Äq.) über ein Septum zugegeben und das gelbe Reaktionsgemisch 2 h unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 40:1, 1% Pyridin, Kieselgel) aufgereinigt, die Fraktionen wurden im Argongegenstrom aufgefangen. Als Produkt wird ein gelber Schaum (92 mg, 0.25 mmol, 100%) erhalten. R_f = 0.44 (DCM/MeOH = 10:1, Kieselgel). **³¹P-NMR (200 MHz, CDCl₃):** δ = 149.54.

Phenoxyessigsäureanhydrid



Zu einer Lösung aus Phenoxyessigsäure (31 g, 209 mmol) in Diethylether (150 mL) und dioxane (150 mL) wurde *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (22.3 g, 108 mmol, 0.52 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT für 3 h gerührt und anschließend für eine weitere Stunde auf 0 °C gerührt. Der entstandene Dicyclohexylharnstoff wurde mittels Filtration entfernt. Die Lösung wurde im Vakuum reduziert und über Nacht bei -20 °C auskristallisiert. Das Produkt wurde nach Umkristallisation aus Diethylether in Form von

farblosen Kristallen (23.4 g, 81 mmol, 87%) erhalten.^[334] **1H-NMR (200 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 7.35 (dd, ³J = 7.3, 7.8 Hz, 4H, *m*-Aryl), 7.13 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H, *p*-Aryl), 7.00 (d, ³J = 7.3Hz, 4H, *o*-Aryl), 4.82 (s, 4H, Ph-O-CH₂). **IR** ν (cm⁻¹) = 3853 (w), 3745 (w), 3061 (m), 2983 (w), 2929 (m), 2574 (m), 2188 (w), 2169 (w), 1827 (s), 1757 (m), 1731 (m), 1700 (s), 1596 (m), 1585 (m), 1494 (s), 1429 (m), 1418 (m), 1374 (m), 1307 (w), 1288 (w), 1269 (m), 1224 (s), 1089 (s), 1044 (s), 746 (s), 687 (s), 612 (w).

6. Anhang

6.1 Sequenzen der hergestellten Oligonukleotide

Tabelle 5: Oligonukleotidsequenzen mit dG(C8)-AAF Modifikation (G*).

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	m/z ber.	m/z gef.
ODN1 Ella1	GCT CTA CG*T CAT CAC	4710	4710
ODN2 19mer-overhang	TCC TCT CTT G*TT CTC TTC T	5859	5863
ODN3 15mer-overhang	CTC TCT TG*T TCT CTT	4672	4672
ODN4 34mer	GTA GCT AGG TCG ATG* CAC AGA CAT CGC ACA CGT C	10658	10656
ODN5 Khobta	CAT TGC TTC G*CT AGC ACG	5673	5673
ODN6 Wolski	GGA TGG CTT AGA GCA G*TT GC	6434	6434
ODN7 Elgi	TCA CG*G AAT CCT TCC CCC	5356	5357
ODN8 Aggarwal	CCT AG*G AGT CCT TCC CCC	5593	5593
ODN9 C1	TCT CTC G*CT CAT CCA C	5052	5052
ODN10 NMR	CGT GGA CG*C ACG TCC	4775	4775
ODN11 16mer_bulges	TGG CG*C CTA TGA GCA C	5103	5104
ODN12 11mer	TCA G*GG GTC CT	3569	3570
ODN13 PE1	CGT GGT G*CC ATC GCG AGG TC	6371	6371
ODN14 PE3	CGT GGC G*CC ATC GCG AGG TC	6356	6357
ODN15 PE4	CGT GAT G*CC ATC GCG AGG TC	6355	6355

Tabelle 6: Oligonukleotidsequenzen mit dG(N^2)-AAF Modifikation (G*).

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	m/z ber.	m/z gef.
ODN16 Ella1	GCT CTA CG*T CAT CAC	4710	4710
ODN17 34mer	GTA GCT AGG TCG ATG* CAC AGA CAT CGC ACA CGT C	10658	10657
ODN18 Khobta	CATTGCTTCG*CTAGCACG	5672	5672
ODN19 Elgi	TCA CG*G AAT CCT TCC CCC	5356	5356
ODN20 Aggarwal	CCT AG*G AGT CCT TCC CCC	5593	5593
ODN21 C1	TCT CTC G*CT CAT CCA C	5052	5051
ODN22 11mer	TCA G*GG GTC CT	3569	3569
ODN23 PE1	CGT GGT G*CC ATC GCG AGG TC	6371	6371
ODN24 PE3	CGT GGC G*CC ATC GCG AGG TC	6356	6357
ODN25 PE4	CGT GAT G*CC ATC GCG AGG TC	6355	6355

Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen mit cFaPy-dG Modifikation (G*).

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	m/z ber.	m/z gef.
ODN26 Aggarwal	CCT AG*G AGT CCT TCC CCC	5345	5345
ODN27 Castaing	CTC TT G*TT TCT CG	4203	4201

6.2 Kristallstrukturdaten

	SeMet Rad14/dG(C8)-AAF	Rad14 ₁₈₈₋₃₀₂ /5-IdU-dG(C8)-AAF
Wavelength [Å]	0.979	0.976
Resolution range [Å]	20 - 3.1 (3.2 - 3.1)	65.3 - 1.8 (1.84-1.80)
Space group	P 2 ₁	P 4 ₁
Unit cell	a = 66.4, b = 51.7, c = 68.8 β = 111.98	a = 53.8, b = 53.8 c = 130.4
Total reflections	59,565 (5,963)	253,904 (14,638)
Unique reflections	7,284 (709)	34232 (1948)
Multiplicity	8.2 (8.4)	7.4 (7.5)
Completeness (%)	99.7 (99.2)	99.8 (95.6)
Mean I/sigma(I)	21.3 (7.46)	10.7 (2.6)
Wilson B-factor	88.69	31.3
R-merge	0.07 (0.27)	0.08 (0.89)
Anomalous completeness	0.995 (0.996)	98.8 (96).4
Anomalous multiplicity	4.1 (4.1)	3.4 (3.5)
CC _{1/2}	0.998 (0.994)	0.998 (0.593)
CC*	1 (0.999)	-
Figure of merit	0.33	-
R-work		0.21 (0.312)
R-free		0.241 (0.347)
Number of non-hydrogen atoms		3,172
macromolecules		3,049
ligands		80
water		43
Protein residues		291
RMS(bonds)		0.018
RMS(angles)		2.15
Ramachandran favoured (%)		96
Ramachandran outliers (%)		0
Average B-factor		48.6
macromolecules		48.5
ligands		60.4
solvent		37

*Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

6.3 Abkürzungsverzeichnis

4-DMAP	4-Dimethylaminopyridin
(6-4)PP	Pyrimidin(6-4)-pyrimidon
8-OxodG	8-Oxo-2'-desoxyguanosin
Äq.	Äquivalente
AAF	Acetylaminofluoren
AF	Aminofluoren
AFB1	Aflatoxin B1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorption units</i>
B[a]P	Benzo[a]pyren
BER	Basenexzisionsreparatur
BHD	β - <i>Hairpin domain</i>
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Bn	Benzyl
BTT	Benzylthiotetrazol
Bz	Benzoyl
CAK	Cdk aktivierende Kinase
cal	Kalorien
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
CPG	<i>Controlled pore glass</i>
CS	<i>Cockayne Syndrom</i>
CSA	<i>Cockayne Syndrom A</i>
CSB	<i>Cockayne Syndrom B</i>

δ	NMR: chemische Verschiebung
d	NMR: Dublett
Da	Dalton
dA	2'-Desoxyadenosin
dd	Bidestilliert
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytosin
DCA	Dichloressigsäure
dG	2'-Desoxyguanosin
dG(C8)-AAF	N-(Desoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluoren
dG(N^2)-AAF	3-(Desoxyguanosin- N^2 -yl)-2-acetylaminofluoren
dIz	2,5-Diamino-4H-imidazol-4-on (Imidazolon)
ds	Doppelsträngig
dT	2'-Desoxythymidin
dU	2'-Desoxyuridin
dZ	2,2,4-Triamino-5-(2H)-oxazolon (Oxazolon)
DCM	Dichlormethan
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DIAD	Diisoproylazodicarboxylat
DIAT	Diisopropylamintetrazolid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT-Cl	Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>

EMSA	<i>Electromobility shift assay</i>
ESI	Elektronensprayionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FaPy	Formamidopyrimidin
FEN	Flap Endonuklease
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GGR	Globale Genom Reparatur
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
His	Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatographie</i>
HR	Homologe Rekombination
HR-MS	<i>High Resolution Mass Spectra</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
<i>i</i>	<i>iso</i>
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
L	Liter
Lys	Lysin
M	Molar (mol/L)
m	milli, NMR: Multiplett, IR: mittel (medium)
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Deposition Ionization- Time Of Flight

<i>m</i> CPBA	<i>methaChlorperbenzoesäure (methaChlorperoxybenzoic acid)</i>
MMR	<i>Mismatch</i> -Reparatur
MPD	2-Methyl-2,4-pentanediol
min	Minute
MS	Massenspektrum
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
<i>v</i>	IR: Wellenzahl
n	nano
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i>
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
ODN	Oligodesoxynukleotid
<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
PAC	Phenoxyacetyl
PAD	<i>Polymerase associated domain</i>
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PEG	Polyethylenglykol
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin
ppm	Parts per million
q	NMR: Quartett
<i>Q-linker</i>	Hydrochinon- <i>O,O'</i> -diacetat- <i>linker</i>
<i>R_f</i>	Retentionsfaktor
RFC	Replikationsfaktor C

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAP	RNA-Polymerase
RNS	Reaktive Stickstoff (<i>nitrogen</i>) Spezies
ROS	Reaktive Sauerstoff (<i>oxygen</i>) Spezies
RP	<i>Reversed phase</i>
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden, NMR: Singulett, IR: stark (strong)
SeMet	Selenomethionin
T	Temperatur
t	NMR: Triplet
<i>t</i>	<i>tert</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-Chlorid
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur (<i>transcription coupled repair</i>)
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIC	Transkriptionsfaktor II H
TGD	Transglutaminase-homologen Domäne
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TLS	<i>Translesion DNA synthesis</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTD	Trichothiodystrophy
UD	Ungeschädigt (<i>Undamaged</i>)
UV	Ultraviolet
UV-Vis	Ultraviolet-visible
w	IR: schwach (weak)
XP	<i>Xeroderma Pigmentosum</i>

XPA-G

Xeroderma Pigmentosum complementation group A-G

z

MS: Ladungszahl

6.4 Literaturverzeichnis

- [1] T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3610-3618, *Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid.*
- [2] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709-715, *Instability and decay of the primary structure of DNA.*
- [3] F. Coin, V. Oksenykh, V. Mocquet, S. Groh, C. Blattner, J. M. Egly, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 9-20, *Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH.*
- [4] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974, *Chemistry and biology of DNA repair.*
- [5] T. D. Silverstein, R. Jain, R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, A. K. Aggarwal, *Structure* **2010**, *18*, 1463-1470, *Structural basis for error-free replication of oxidatively damaged DNA by yeast DNA polymerase eta.*
- [6] 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.*
- [7] C. Bierumpfel, 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 eta.*
- [8] U. Hubscher, G. Maga, S. Spadari, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 133-163, *Eukaryotic DNA polymerases.*
- [9] S. Prakash, R. E. Johnson, L. Prakash, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 317-353, *Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function.*
- [10] A. Alt, K. Lammens, C. Chiocchini, 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.*
- [11] Y. Zhao, C. Bierumpfel, M. T. Gregory, Y. J. Hua, F. Hanaoka, W. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 7269-7274, *Structural basis of human DNA polymerase eta-mediated chemoresistance to cisplatin.*
- [12] M. T. Washington, K. D. Carlson, B. D. Freudenthal, J. M. Pryor, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 1113-1123, *Variations on a theme: eukaryotic Y-family DNA polymerases.*
- [13] A. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 43-81, *DNA excision repair.*
- [14] W. L. de Laat, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 768-785, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair.*
- [15] D. E. Kainov, M. Vitorino, J. Cavarelli, A. Poterszman, J. M. Egly, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 980-984, *Structural basis for group A trichothiodystrophy.*

- [16] P. C. Hanawalt, G. Spivak, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 958-970, *Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises.*
- [17] E. Evans, J. G. Moggs, J. R. Hwang, J. M. Egly, R. D. Wood, *EMBO J.* **1997**, 16, 6559-6573, *Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors.*
- [18] H. Edenberg, P. Hanawalt, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 272, 361-372, *Size of repair patches in the DNA of ultraviolet-irradiated HeLa cells.*
- [19] T. Ogi, S. Limsirichaikul, R. M. Overmeer, M. Volker, K. Takenaka, R. Cloney, Y. Nakazawa, A. Niimi, Y. Miki, N. G. Jaspers, L. H. Mullenders, S. Yamashita, M. I. Fousteri, A. R. Lehmann, *Mol. Cell* **2010**, 37, 714-727, *Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells.*
- [20] E. C. Friedberg, *Nat Rev Cancer* **2001**, 1, 22-33, *How nucleotide excision repair protects against cancer.*
- [21] K. H. Kraemer, M. M. Lee, J. Scotto, *Arch. Dermatol.* **1987**, 123, 241-250, *Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases.*
- [22] K. H. Kraemer, M. M. Lee, A. D. Andrews, W. C. Lambert, *Arch. Dermatol.* **1994**, 130, 1018-1021, *The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm.*
- [23] I. Rapin, Y. Lindenbaum, D. W. Dickson, K. H. Kraemer, J. H. Robbins, *Neurology* **2000**, 55, 1442-1449, *Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum.*
- [24] K. H. Kraemer, N. J. Patronas, R. Schiffmann, B. P. Brooks, D. Tamura, J. J. DiGiovanna, *Neuroscience* **2007**, 145, 1388-1396, *Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship.*
- [25] F. Hebra, M. Kaposi, *New Sydenham Soc.* **1874**, 61, 252-258, *On diseases of the skin including exanthemata.*
- [26] J. E. Cleaver, *Nature* **1968**, 218, 652-656, *Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum.*
- [27] R. B. Setlow, J. D. Regan, J. German, W. L. Carrier, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1969**, 64, 1035-1041, *Evidence that xeroderma pigmentosum cells do not perform the first step in the repair of ultraviolet damage to their DNA.*
- [28] E. A. De Weerd-Kastelein, W. Keijzer, D. Bootsma, *Nat. New Biol.* **1972**, 238, 80-83, *Genetic heterogeneity of xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization.*
- [29] J. McWhir, J. Selfridge, D. J. Harrison, S. Squires, D. W. Melton, *Nat. Genet.* **1993**, 5, 217-224, *Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning.*
- [30] A. de Vries, C. T. van Oostrom, F. M. Hofhuis, P. M. Dortant, R. J. Berg, F. R. de Gruijl, P. W. Wester, C. F. van Kreijl, P. J. Capel, H. van Steeg, S. J. Verbeek, *Nature*

- 1995**, 377, 169-173, *Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA*.
- [31] H. Nakane, S. Takeuchi, S. Yuba, M. Saito, Y. Nakatsu, H. Murai, Y. Nakatsuru, T. Ishikawa, S. Hirota, Y. Kitamura, et al., *Nature* **1995**, 377, 165-168, *High incidence of ultraviolet-B-or chemical-carcinogen-induced skin tumours in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene*.
- [32] A. T. Sands, A. Abuin, A. Sanchez, C. J. Conti, A. Bradley, *Nature* **1995**, 377, 162-165, *High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC*.
- [33] A. de Vries, C. T. van Oostrom, P. M. Dortant, R. B. Beems, C. F. van Kreijl, P. J. Capel, H. van Steeg, *Mol. Carcinog.* **1997**, 19, 46-53, *Spontaneous liver tumors and benzo[a]pyrene-induced lymphomas in XPA-deficient mice*.
- [34] F. Ide, N. Iida, Y. Nakatsuru, H. Oda, K. Tanaka, T. Ishikawa, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 1263-1265, *Mice deficient in the nucleotide excision repair gene XPA have elevated sensitivity to benzo[a]pyrene induction of lung tumors*.
- [35] P. G. Burk, M. A. Lutzner, D. D. Clarke, J. H. Robbins, *J. Lab. Clin. Med.* **1971**, 77, 759-767, *Ultraviolet-stimulated thymidine incorporation in xeroderma pigmentosum lymphocytes*.
- [36] A. R. Lehmann, S. Kirk-Bell, C. F. Arlett, M. C. Paterson, P. H. Lohman, E. A. de Weerd-Kastelein, D. Bootsma, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1975**, 72, 219-223, *Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation*.
- [37] J. E. Cleaver, *J. Invest. Dermatol.* **1972**, 58, 124-128, *Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light*.
- [38] C. Masutani, R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio, F. Hanaoka, *Nature* **1999**, 399, 700-704, *The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta*.
- [39] A. M. Cordonnier, R. P. Fuchs, *Mutat. Res.* **1999**, 435, 111-119, *Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells*.
- [40] 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*.
- [41] S. Schorr, S. Schneider, K. Lammens, K. P. Hopfner, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107, 20720-20725, *Mechanism of replication blocking and bypass of Y-family polymerase {eta} by bulky acetylaminofluorene DNA adducts*.
- [42] E. A. Cockayne, *Arch. Dis. Child* **1936**, 11, 1-8, *Dwarfism with retinal atrophy and deafness*.
- [43] M. A. Nance, S. A. Berry, *Am. J. Med. Genet.* **1992**, 42, 68-84, *Cockayne syndrome: review of 140 cases*.
- [44] J. Q. Svejstrup, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 21-29, *Mechanisms of transcription-coupled DNA repair*.

- [45] L. C. Gillet, O. D. Scharer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 253-276, *Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair*.
- [46] A. J. van Gool, G. T. van der Horst, E. Citterio, J. H. Hoeijmakers, *EMBO J.* **1997**, *16*, 4155-4162, *Cockayne syndrome: defective repair of transcription?*
- [47] J. M. Gillespie, R. C. Marshall, *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80*, 195-202, *A comparison of the proteins of normal and trichothiodystrophic human hair*.
- [48] P. H. Itin, M. R. Pittelkow, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1990**, *22*, 705-717, *Trichothiodystrophy: review of sulfur-deficient brittle hair syndromes and association with the ectodermal dysplasias*.
- [49] P. H. Itin, A. Sarasin, M. R. Pittelkow, *J. Am. Acad. Dermatol.* **2001**, *44*, 891-920; quiz 921-924, *Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes*.
- [50] B. C. Broughton, M. Berneburg, H. Fawcett, E. M. Taylor, C. F. Arlett, T. Nardo, M. Stefanini, E. Menefee, V. H. Price, S. Queille, A. Sarasin, E. Bohnert, J. Krutmann, R. Davidson, K. H. Kraemer, A. R. Lehmann, *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2539-2547, *Two individuals with features of both xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy highlight the complexity of the clinical outcomes of mutations in the XPD gene*.
- [51] G. Weeda, E. Eveno, I. Donker, W. Vermeulen, O. Chevallier-Lagente, A. Taieb, A. Stary, J. H. Hoeijmakers, M. Mezzina, A. Sarasin, *Am. J. Hum. Genet.* **1997**, *60*, 320-329, *A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy*.
- [52] M. Stefanini, P. Lagomarsini, C. F. Arlett, S. Marinoni, C. Borrone, F. Crovato, G. Trevisan, G. Cordone, F. Nuzzo, *Hum. Genet.* **1986**, *74*, 107-112, *Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected by trichothiodystrophy with photosensitivity*.
- [53] G. Giglia-Mari, F. Coin, J. A. Ranish, D. Hoogstraten, A. Theil, N. Wijgers, N. G. Jaspers, A. Raams, M. Argentini, P. J. van der Spek, E. Botta, M. Stefanini, J. M. Egly, R. Aebersold, J. H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 714-719, *A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A*.
- [54] A. Sancar, *Science* **1994**, *266*, 1954-1956, *Mechanisms of DNA excision repair*.
- [55] C. J. Jones, R. D. Wood, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12096-12104, *Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA*.
- [56] R. D. Wood, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 135-167, *DNA repair in eukaryotes*.
- [57] J. E. Cleaver, *J. Dermatol. Sci.* **2000**, *23*, 1-11, *Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of xeroderma pigmentosum*.
- [58] T. Nouspikel, *Cell Mol. Life. Sci.* **2009**, *66*, 994-1009, *DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility*.
- [59] E. E. Trimmer, J. M. Essigmann, *Essays Biochem.* **1999**, *34*, 191-211, *Cisplatin*.

- [60] I. Kuraoka, W. R. Kobertz, R. R. Ariza, M. Biggerstaff, J. M. Essigmann, R. D. Wood, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 26632-26636, *Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease.*
- [61] J. E. Hearst, S. T. Isaacs, D. Kanne, H. Rapoport, K. Straub, *Q. Rev. Biophys.* **1984**, 17, 1-44, *The reaction of the psoralens with deoxyribonucleic acid.*
- [62] Y. H. You, D. H. Lee, J. H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui, G. P. Pfeifer, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 44688-44694, *Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells.*
- [63] R. P. Rastogi, Richa, A. Kumar, M. B. Tyagi, R. P. Sinha, *J. Nucleic Acids* **2010**, 2010, 592980, *Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair.*
- [64] B. Cortat, C. C. Garcia, A. Quinet, A. P. Schuch, K. M. de Lima-Bessa, C. F. Menck, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, 12, 1483-1495, *The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells.*
- [65] K. Ura, J. J. Hayes, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 2288-2293, *Nucleotide excision repair and chromatin remodeling.*
- [66] A. Sarasin, *Mutat. Res.* **2003**, 544, 99-106, *An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis.*
- [67] P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4256-4263, *Triplet State Interactions between Nucleic Acid Bases in Solution at Room Temperature: Intermolecular Energy and Electron Transfer.*
- [68] 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.*
- [69] V. I. Danilo, A. Les, J. L. Alderfer, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, 19, 179-191, *A theoretical study of the cis-syn pyrimidine dimers in the gas phase and water cluster and a tautomer-bypass mechanism for the origin of UV-induced mutations.*
- [70] N. Jiang, J. S. Taylor, *Biochemistry* **1993**, 32, 472-481, *In vivo evidence that UV-induced C-->T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products.*
- [71] 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.*
- [72] M. J. Horsfall, A. Borden, C. W. Lawrence, *J. Bacteriol.* **1997**, 179, 2835-2839, *Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer.*
- [73] A. Burger, D. Fix, H. Liu, J. Hays, R. Bockrath, *Mutat. Res.* **2003**, 522, 145-156, *In vivo deamination of cytosine-containing cyclobutane pyrimidine dimers in *E. coli*: a feasible part of UV-mutagenesis.*
- [74] M. Ruiz-Rubio, R. Bockrath, *Mutat. Res.* **1989**, 210, 93-102, *On the possible role of cytosine deamination in delayed photoreversal mutagenesis targeted at thymine-cytosine dimers in *E. coli*.*

- [75] S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 8535-8540, *Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase*.
- [76] 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*.
- [77] J. L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, 63, 88-102, *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*.
- [78] J. K. Kim, D. Patel, B. S. Choi, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 44-50, *Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity*.
- [79] 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*.
- [80] J. H. Lee, C. J. Park, J. S. Shin, T. Ikegami, H. Akutsu, B. S. Choi, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 2474-2481, *NMR structure of the DNA decamer duplex containing double T*G mismatches of cis-syn cyclobutane pyrimidine dimer: implications for DNA damage recognition by the XPC-hHR23B complex*.
- [81] 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*.
- [82] D. E. Szymkowski, C. W. Lawrence, R. D. Wood, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, 90, 9823-9827, *Repair by human cell extracts of single (6-4) and cyclobutane thymine-thymine photoproducts in DNA*.
- [83] R. Kusumoto, C. Masutani, K. Sugasawa, S. Iwai, M. Araki, A. Uchida, T. Mizukoshi, F. Hanaoka, *Mutat. Res.* **2001**, 485, 219-227, *Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro*.
- [84] J. T. Reardon, A. Sancar, *Genes Dev.* **2003**, 17, 2539-2551, *Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease*.
- [85] K. Sugasawa, T. Okamoto, Y. Shimizu, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, *Genes Dev.* **2001**, 15, 507-521, *A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair*.
- [86] D. Kim, F. P. Guengerich, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 45, 27-49, *Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines*.
- [87] W. Xue, D. Warshawsky, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, 206, 73-93, *Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review*.
- [88] F. P. Guengerich, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2007**, 21, 163-168, *Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview*.
- [89] F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 70-83, *Cytochrome p450 and chemical toxicology*.

- [90] T. Shimada, N. Murayama, H. Yamazaki, K. Tanaka, S. Takenaka, M. Komori, D. Kim, F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 529-537, *Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aryl and Heterocyclic Amines by Human Cytochromes P450 2A13 and 2A6*.
- [91] W. G. Humphreys, F. F. Kadlubar, F. P. Guengerich, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 8278-8282, *Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: evidence for initial adduct formation at the N7 position*.
- [92] R. A. McClelland, A. Ahmad, A. P. Dicks, V. E. Licence, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3303-3310, *Spectroscopic Characterization of the Initial C8 Intermediate in the Reaction of the 2-Fluorenylnitrenium Ion with 2'-Deoxyguanosine*.
- [93] R. J. Turesky, *Toxicol. Lett.* **2007**, *168*, 219-227, *Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats*.
- [94] R. J. Turesky, *Drug Metab. Rev.* **2002**, *34*, 625-650, *Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis*.
- [95] A. H. Conney, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 4875-4917, *Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture*.
- [96] B. Beije, L. Moller, *Mutat. Res.* **1988**, *196*, 177-209, *2-Nitrofluorene and related compounds: prevalence and biological effects*.
- [97] E. C. W. Friedberg, G. C.; Siede, W., *ASM Press: Washington, DC, 1995* **1995**, *DNA Repair and Mutagenesis*.
- [98] S. C. Harvey, *University Press: Cambridge* **1991**, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity*.
- [99] N. E. Geacintov, M. Cosman, B. E. Hingerty, S. Amin, S. Broyde, D. J. Patel, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 111-146, *NMR solution structures of stereoisometric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adduct: principles, patterns, and diversity*.
- [100] M. E. Smela, S. S. Currier, E. A. Bailey, J. M. Essigmann, *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 535-545, *The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis*.
- [101] F. P. Guengerich, W. W. Johnson, T. Shimada, Y.-F. Ueng, H. Yamazaki, S. Langouët, *Mutat. Res.* **1998**, *402*, 121-128, *Activation and detoxication of aflatoxin B1*.
- [102] L. L. Bedard, T. E. Massey, *Cancer Letters* **2006**, *241*, 174-183, *Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair*.
- [103] A. M. Sijbers, W. L. de Laat, R. R. Ariza, M. Biggerstaff, Y. F. Wei, J. G. Moggs, K. C. Carter, B. K. Shell, E. Evans, M. C. de Jong, S. Rademakers, J. de Rooij, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers, R. D. Wood, *Cell* **1996**, *86*, 811-822, *Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease*.

- [104] C. M. King, S. J. Land, R. F. Jones, M. Debiec-Rychter, M. S. Lee, C. Y. Wang, *Mutat. Res.* **1997**, 376, 123-128, *Role of acetyltransferases in the metabolism and carcinogenicity of aromatic amines.*
- [105] D. M. Grant, N. C. Hughes, S. A. Janezic, G. H. Goodfellow, H. J. Chen, A. Gaedigk, V. L. Yu, R. Grewal, *Mutat. Res.* **1997**, 376, 61-70, *Human acetyltransferase polymorphisms.*
- [106] X. Veaute, R. P. Fuchs, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 5603-5606, *Polymorphism in N-2-acetylaminofluorene induced DNA structure as revealed by DNase I footprinting.*
- [107] P. Belguise-Valladier, R. P. Fuchs, *J. Mol. Biol.* **1995**, 249, 903-913, *N-2-aminofluorene and N-2 acetylaminofluorene adducts: the local sequence context of an adduct and its chemical structure determine its replication properties.*
- [108] P. Belguise-Valladier, R. P. Fuchs, *Biochemistry* **1991**, 30, 10091-10100, *Strong sequence-dependent polymorphism in adduct-induced DNA structure: analysis of single N-2-acetylaminofluorene residues bound within the NarI mutation hot spot.*
- [109] L. M. Eckel, T. R. Krugh, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 89-94, *2-Aminofluorene modified DNA duplex exists in two interchangeable conformations.*
- [110] P. C. Howard, D. A. Casciano, F. A. Beland, J. G. Shaddock, Jr., *Carcinogenesis* **1981**, 2, 97-102, *The binding of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to DNA and repair of the adducts in primary rat hepatocyte cultures.*
- [111] F. A. Beland, K. L. Dooley, C. D. Jackson, *Cancer Res.* **1982**, 42, 1348-1354, *Persistence of DNA adducts in rat liver and kidney after multiple doses of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene.*
- [112] P. P. Fu, *Drug Metab. Rev.* **1990**, 22, 209-268, *Metabolism of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons.*
- [113] M. Yasui, H. Dong, R. R. Bonala, N. Suzuki, H. Ohmori, F. Hanaoka, F. Johnson, A. P. Grollman, S. Shibutani, *Biochemistry* **2004**, 43, 15005-15013, *Mutagenic properties of 3-(deoxyguanosin-N2-yl)-2-acetylaminofluorene, a persistent acetylaminofluorene-derived DNA adduct in mammalian cells.*
- [114] D. Mu, E. Bertrand-Burggraf, J. C. Huang, R. P. Fuchs, A. Sancar, B. P. Fuchs, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4869-4871, *Human and E.coli excinucleases are affected differently by the sequence context of acetylaminofluorene-guanine adduct.*
- [115] L. C. Gillet, J. Alzeer, O. D. Scharer, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 1961-1969, *Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis.*
- [116] K. G. N. Kitsera, B. Lühsdorf, J. Allgayer, B. Epe, T. Carell, A. Khobta, *PloS ONE* **2014**, accepted, *Varied requirements of the Cockayne syndrome proteins for the removal of three structurally different adducts from transcribed DNA.*
- [117] M. Kartalou, J. M. Essigmann, *Mutat. Res.* **2001**, 478, 23-43, *Mechanisms of resistance to cisplatin.*
- [118] M. Lukin, C. A. Minetti, D. P. Remeta, S. Attaluri, F. Johnson, K. J. Breslauer, C. de Los Santos, *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 5776-5789, *Novel post-synthetic generation,*

isomeric resolution, and characterization of Fapy-dG within oligodeoxynucleotides: differential anomeric impacts on DNA duplex properties.

- [119] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467-2498, *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts*.
- [120] D. E. Szymkowski, K. Yarema, J. M. Essigmann, S. J. Lippard, R. D. Wood, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 10772-10776, *An intrastrand d(GpG) platinum crosslink in duplex M13 DNA is refractory to repair by human cell extracts*.
- [121] D. B. Zamble, D. Mu, J. T. Reardon, A. Sancar, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10004-10013, *Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease*.
- [122] J. C. Huang, D. B. Zamble, J. T. Reardon, S. J. Lippard, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 10394-10398, *HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease*.
- [123] O. D. Scharer, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 27-32, *DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses*.
- [124] M. T. Hess, U. Schwitter, M. Petretta, B. Giese, H. Naegeli, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 121-128, *Site-specific DNA substrates for human excision repair: comparison between deoxyribose and base adducts*.
- [125] M. T. Hess, U. Schwitter, M. Petretta, B. Giese, H. Naegeli, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 6664-6669, *Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair*.
- [126] D. Gunz, M. T. Hess, H. Naegeli, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25089-25098, *Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism*.
- [127] M. T. Hess, D. Gunz, N. Luneva, N. E. Geacintov, H. Naegeli, *Molecular and Cellular Biology* **1997**, *17*, 7069-7076, *Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes*.
- [128] T. Buterin, M. T. Hess, N. Luneva, N. E. Geacintov, S. Amin, H. Kroth, A. Seidel, H. Naegeli, *Cancer Research* **2000**, *60*, 1849-1856, *Unrepaired Fjord Region Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in ras Codon 61 Mutational Hot Spots*.
- [129] S. Yan, M. Wu, T. Buterin, H. Naegeli, N. E. Geacintov, S. Broyde, *Biochemistry* **2003**, *42*, 2339-2354, *Role of Base Sequence Context in Conformational Equilibria and Nucleotide Excision Repair of Benzo[a]pyrene Diol Epoxide-Adenine Adducts*.
- [130] N. E. Geacintov, S. Broyde, T. Buterin, H. Naegeli, M. Wu, S. Yan, D. J. Patel, *Biopolymers* **2002**, *65*, 202-210, *Thermodynamic and structural factors in the removal of bulky DNA adducts by the nucleotide excision repair machinery*.
- [131] A. B. Houtsmuller, S. Rademakers, A. L. Nigg, D. Hoogstraten, J. H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, *Science* **1999**, *284*, 958-961, *Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells*.
- [132] D. Hoogstraten, A. L. Nigg, H. Heath, L. H. Mullenders, R. van Driel, J. H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, A. B. Houtsmuller, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1163-1174,

Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo.

- [133] S. Rademakers, M. Volker, D. Hoogstraten, A. L. Nigg, M. J. Mone, A. A. Van Zeeland, J. H. Hoeijmakers, A. B. Houtsma, W. Vermeulen, *Mol. Cell Biol.* **2003**, 23, 5755-5767, *Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions.*
- [134] B. A. Donahue, S. Yin, J. S. Taylor, D. Reines, P. C. Hanawalt, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 8502-8506, *Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template.*
- [135] S. Tornaletti, D. Reines, P. C. Hanawalt, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 24124-24130, *Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA.*
- [136] D. Tantin, A. Kansal, M. Carey, *Mol. Cell Biol.* **1997**, 17, 6803-6814, *Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes.*
- [137] E. Citterio, V. Van Den Boom, G. Schnitzler, R. Kanaar, E. Bonte, R. E. Kingston, J. H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, *Mol. Cell Biol.* **2000**, 20, 7643-7653, *ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor.*
- [138] S. Kamiuchi, M. Saijo, E. Citterio, M. de Jager, J. H. Hoeijmakers, K. Tanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 201-206, *Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair.*
- [139] D. Tantin, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 27794-27799, *RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne syndrome group B protein interact with a molecular complex containing the transcription factor IIH components xeroderma pigmentosum B and p62.*
- [140] N. Iyer, M. S. Reagan, K. J. Wu, B. Canagarajah, E. C. Friedberg, *Biochemistry* **1996**, 35, 2157-2167, *Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein.*
- [141] S. Keeney, G. J. Chang, S. Linn, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 21293-21300, *Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E.*
- [142] J. T. Reardon, A. F. Nichols, S. Keeney, C. A. Smith, J. S. Taylor, S. Linn, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 21301-21308, *Comparative analysis of binding of human damaged DNA-binding protein (XPE) and Escherichia coli damage recognition protein (UvrA) to the major ultraviolet photoproducts: T[c,s]T, T[t,s]T, T[6-4]T, and T[Dewar]T.*
- [143] Y. Fujiwara, C. Masutani, T. Mizukoshi, J. Kondo, F. Hanaoka, S. Iwai, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 20027-20033, *Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein.*
- [144] K. Sugasawa, J. M. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P. J. van der Spek, A. P. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, *Mol. Cell* **1998**, 2, 223-232, *Xeroderma*

pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair.

- [145] D. Batty, V. Rapic'-Otrin, A. S. Levine, R. D. Wood, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 275-290, *Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites.*
- [146] S. Raoul, M. Bardet, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 924-933, *Gamma irradiation of 2'-deoxyadenosine in oxygen-free aqueous solutions: identification and conformational features of formamidopyrimidine nucleoside derivatives.*
- [147] L. Li, X. Lu, C. A. Peterson, R. J. Legerski, *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15*, 5396-5402, *An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair.*
- [148] N. Buschta-Hedayat, T. Buterin, M. T. Hess, M. Missura, H. Naegeli, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 6090-6095, *Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA.*
- [149] I. Mellon, G. Spivak, P. C. Hanawalt, *Cell* **1987**, *51*, 241-249, *Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene.*
- [150] J. L. Burns, S. N. Guzder, P. Sung, S. Prakash, L. Prakash, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11607-11610, *An affinity of human replication protein A for ultraviolet-damaged DNA.*
- [151] U. Schweizer, T. Hey, G. Lipps, G. Krauss, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3183-3189, *Photocrosslinking locates a binding site for the large subunit of human replication protein A to the damaged strand of cisplatin-modified DNA.*
- [152] J. T. Reardon, A. Sancar, *Mol. Cell Biol.* **2002**, *22*, 5938-5945, *Molecular anatomy of the human excision nuclease assembled at sites of DNA damage.*
- [153] J. G. Moggs, K. J. Yarema, J. M. Essigmann, R. D. Wood, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7177-7186, *Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct.*
- [154] J. G. Moggs, D. E. Szymkowski, M. Yamada, P. Karran, R. D. Wood, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 480-491, *Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts.*
- [155] T. Hey, G. Lipps, K. Sugasawa, S. Iwai, F. Hanaoka, G. Krauss, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6583-6587, *The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay.*
- [156] J. Venema, A. van Hoffen, V. Karcagi, A. T. Natarajan, A. A. van Zeeland, L. H. Mullenders, *Mol. Cell Biol.* **1991**, *11*, 4128-4134, *Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes.*
- [157] Z. G. Yang, Y. Liu, L. Y. Mao, J. T. Zhang, Y. Zou, *Biochemistry* **2002**, *41*, 13012-13020, *Dimerization of human XPA and formation of XPA2-RPA protein complex.*

- [158] Y. Liu, Z. Yang, C. Utzat, G. Wang, A. K. Basu, Y. Zou, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7361-7368, *Cooperative interaction of human XPA stabilizes and enhances specific binding of XPA to DNA damage.*
- [159] M. Missura, T. Buterin, R. Hindges, U. Hubscher, J. Kasparkova, V. Brabec, H. Naegeli, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3554-3564, *Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair.*
- [160] I. L. Hermanson-Miller, J. J. Turchi, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2402-2408, *Strand-specific binding of RPA and XPA to damaged duplex DNA.*
- [161] T. Furuta, T. Ueda, G. Aune, A. Sarasin, K. H. Kraemer, Y. Pommier, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4899-4902, *Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells.*
- [162] E. A. Maltseva, N. I. Rechkunova, L. C. Gillet, I. O. Petruseva, O. D. Scharer, O. I. Lavrik, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1770*, 781-789, *Crosslinking of the NER damage recognition proteins XPC-HR23B, XPA and RPA to photoreactive probes that mimic DNA damages.*
- [163] M. Wakasugi, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18759-18768, *Order of assembly of human DNA repair excision nuclease.*
- [164] J. Venema, A. van Hoffen, A. T. Natarajan, A. A. van Zeeland, L. H. Mullenders, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 443-448, *The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA.*
- [165] D. Mu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7570-7573, *Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans.*
- [166] T. Kobayashi, S. Takeuchi, M. Saijo, Y. Nakatsu, H. Morioka, E. Otsuka, M. Wakasugi, O. Nikaido, K. Tanaka, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4662-4668, *Mutational analysis of a function of xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein in strand-specific DNA repair.*
- [167] B. S. Thoma, K. M. Vasquez, *Mol. Carcinog.* **2003**, *38*, 1-13, *Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair.*
- [168] M. Volker, M. J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J. H. Hoeijmakers, R. van Driel, A. A. van Zeeland, L. H. Mullenders, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 213-224, *Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo.*
- [169] S. Katsumi, N. Kobayashi, K. Imoto, A. Nakagawa, Y. Yamashina, T. Muramatsu, T. Shirai, S. Miyagawa, S. Sugiura, F. Hanaoka, T. Matsunaga, O. Nikaido, T. Mori, *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117*, 1156-1161, *In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts.*
- [170] M. J. Mone, M. Volker, O. Nikaido, L. H. Mullenders, A. A. van Zeeland, P. J. Verschure, E. M. Manders, R. van Driel, *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 1013-1017, *Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition.*
- [171] K. Sugasawa, Y. Shimizu, S. Iwai, F. Hanaoka, *DNA Repair (Amst)* **2002**, *1*, 95-107, *A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex.*

- [172] P. J. van der Spek, A. Eker, S. Rademakers, C. Visser, K. Sugasawa, C. Masutani, F. Hanaoka, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 2551-2559, *XPC and human homologs of RAD23: intracellular localization and relationship to other nucleotide excision repair complexes.*
- [173] M. Araki, C. Masutani, M. Takemura, A. Uchida, K. Sugasawa, J. Kondoh, Y. Ohkuma, F. Hanaoka, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 18665-18672, *Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair.*
- [174] M. Lukin, C. de Los Santos, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 607-686, *NMR structures of damaged DNA.*
- [175] J. H. Min, N. P. Pavletich, *Nature* **2007**, 449, 570-575, *Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein.*
- [176] M. E. Fitch, S. Nakajima, A. Yasui, J. M. Ford, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 46906-46910, *In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product.*
- [177] M. Wakasugi, A. Kawashima, H. Morioka, S. Linn, A. Sancar, T. Mori, O. Nikaido, T. Matsunaga, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 1637-1640, *DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair.*
- [178] M. Takao, M. Abramic, M. Moos, Jr., V. R. Otrin, J. C. Wootton, M. McLenigan, A. S. Levine, M. Protic, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 4111-4118, *A 127 kDa component of a UV-damaged DNA-binding complex, which is defective in some xeroderma pigmentosum group E patients, is homologous to a slime mold protein.*
- [179] R. S. Feldberg, L. Grossman, *Biochemistry* **1976**, 15, 2402-2408, *A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA.*
- [180] G. Chu, E. Chang, *Science* **1988**, 242, 564-567, *Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA.*
- [181] D. K. Treiber, Z. Chen, J. M. Essigmann, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 5805-5810, *An ultraviolet light-damaged DNA recognition protein absent in xeroderma pigmentosum group E cells binds selectively to pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts.*
- [182] A. Payne, G. Chu, *Mutat. Res.* **1994**, 310, 89-102, *Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage.*
- [183] K. Sugasawa, Y. Okuda, M. Saijo, R. Nishi, N. Matsuda, G. Chu, T. Mori, S. Iwai, K. Tanaka, F. Hanaoka, *Cell* **2005**, 121, 387-400, *UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex.*
- [184] H. Yanagawa, Y. Ogawa, M. Ueno, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13320-13326, *Redox ribonucleosides. Isolation and characterization of 5-hydroxyuridine, 8-hydroxyguanosine, and 8-hydroxyadenosine from *Torula* yeast RNA.*
- [185] Q. E. Wang, Q. Zhu, G. Wani, J. Chen, A. A. Wani, *Carcinogenesis* **2004**, 25, 1033-1043, *UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2.*

- [186] B. J. Hwang, S. Toering, U. Francke, G. Chu, *Mol. Cell Biol.* **1998**, 18, 4391-4399, *p48 Activates a UV-damaged-DNA binding factor and is defective in xeroderma pigmentosum group E cells that lack binding activity.*
- [187] J. Y. Tang, B. J. Hwang, J. M. Ford, P. C. Hanawalt, G. Chu, *Mol. Cell* **2000**, 5, 737-744, *Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis.*
- [188] A. Scrima, R. Konickova, B. K. Czyzewski, Y. Kawasaki, P. D. Jeffrey, R. Groisman, Y. Nakatani, S. Iwai, N. P. Pavletich, N. H. Thoma, *Cell* **2008**, 135, 1213-1223, *Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex.*
- [189] R. Drapkin, J. T. Reardon, A. Ansari, J. C. Huang, L. Zawel, K. Ahn, A. Sancar, D. Reinberg, *Nature* **1994**, 368, 769-772, *Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II.*
- [190] A. Tapias, J. Auriol, D. Forget, J. H. Enzlin, O. D. Scharer, F. Coin, B. Coulombe, J. M. Egly, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 19074-19083, *Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors.*
- [191] M. Yokoi, C. Masutani, T. Maekawa, K. Sugasawa, Y. Ohkuma, F. Hanaoka, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 9870-9875, *The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA.*
- [192] A. Uchida, K. Sugasawa, C. Masutani, N. Dohmae, M. Araki, M. Yokoi, Y. Ohkuma, F. Hanaoka, *DNA Repair (Amst)* **2002**, 1, 449-461, *The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH.*
- [193] P. Schultz, S. Fribourg, A. Poterszman, V. Mallouh, D. Moras, J. M. Egly, *Cell* **2000**, 102, 599-607, *Molecular structure of human TFIIH.*
- [194] R. Shiekhattar, F. Mermelstein, R. P. Fisher, R. Drapkin, B. Dynlacht, H. C. Wessling, D. O. Morgan, D. Reinberg, *Nature* **1995**, 374, 283-287, *Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH.*
- [195] F. Coin, V. Oksenyech, J. M. Egly, *Mol. Cell* **2007**, 26, 245-256, *Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair.*
- [196] F. Coin, J. C. Marinoni, C. Rodolfo, S. Fribourg, A. M. Pedrini, J. M. Egly, *Nat. Genet.* **1998**, 20, 184-188, *Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH.*
- [197] G. S. Winkler, S. J. Araujo, U. Fiedler, W. Vermeulen, F. Coin, J. M. Egly, J. H. Hoeijmakers, R. D. Wood, H. T. Timmers, G. Weeda, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 4258-4266, *TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair.*
- [198] V. Oksenyech, F. Coin, *Cell Cycle* **2010**, 9, 90-96, *The long unwinding road: XPD and XPD helicases in damaged DNA opening.*
- [199] H. Naegeli, P. Modrich, E. C. Friedberg, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 10386-10392, *The DNA helicase activities of Rad3 protein of *Saccharomyces cerevisiae* and helicase II*

of *Escherichia coli* are differentially inhibited by covalent and noncovalent DNA modifications.

- [200] N. Mathieu, N. Kaczmarek, H. Naegeli, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 17545-17550, *Strand- and site-specific DNA lesion demarcation by the xeroderma pigmentosum group D helicase*.
- [201] H. Naegeli, L. Bardwell, E. C. Friedberg, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 392-398, *The DNA helicase and adenosine triphosphatase activities of yeast Rad3 protein are inhibited by DNA damage. A potential mechanism for damage-specific recognition*.
- [202] L. Fan, J. O. Fuss, Q. J. Cheng, A. S. Arvai, M. Hammel, V. A. Roberts, P. K. Cooper, J. A. Tainer, *Cell* **2008**, *133*, 789-800, *XPD helicase structures and activities: insights into the cancer and aging phenotypes from XPD mutations*.
- [203] S. C. Wolski, J. Kuper, P. Hanzelmann, J. J. Truglio, D. L. Croteau, B. Van Houten, C. Kisker, *PLoS Biol.* **2008**, *6*, e149, *Crystal structure of the FeS cluster-containing nucleotide excision repair helicase XPD*.
- [204] H. Liu, J. Rudolf, K. A. Johnson, S. A. McMahon, M. Oke, L. Carter, A. M. McRobbie, S. E. Brown, J. H. Naismith, M. F. White, *Cell* **2008**, *133*, 801-812, *Structure of the DNA repair helicase XPD*.
- [205] A. R. Lehmann, *DNA Repair (Amst)* **2008**, *7*, 1912-1915, *XPD structure reveals its secrets*.
- [206] M. F. White, *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 547-551, *Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'-->3' DNA helicases*.
- [207] K. Buttner, S. Nehring, K. P. Hopfner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 647-652, *Structural basis for DNA duplex separation by a superfamily-2 helicase*.
- [208] J. L. Kim, K. A. Morgenstern, J. P. Griffith, M. D. Dwyer, J. A. Thomson, M. A. Murcko, C. Lin, P. R. Caron, *Structure* **1998**, *6*, 89-100, *Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding*.
- [209] J. O. Fuss, J. A. Tainer, *DNA Repair (Amst)* **2011**, *10*, 697-713, *XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase*.
- [210] T. K. Kim, R. H. Ebright, D. Reinberg, *Science* **2000**, *288*, 1418-1422, *Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH*.
- [211] C. N. Buechner, K. Heil, G. Michels, T. Carell, C. Kisker, I. Tessmer, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 3613-3624, *Strand-specific Recognition of DNA Damages by XPD Provides Insights into Nucleotide Excision Repair Substrate Versatility*.
- [212] S. J. Araujo, E. A. Nigg, R. D. Wood, *Mol. Cell Biol.* **2001**, *21*, 2281-2291, *Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome*.
- [213] T. Riedl, F. Hanaoka, J. M. Egly, *EMBO J.* **2003**, *22*, 5293-5303, *The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA*.

- [214] M. Wakasugi, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95, 6669-6674, *Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease.*
- [215] L. A. Henricksen, C. B. Umbricht, M. S. Wold, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 11121-11132, *Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization.*
- [216] M. P. Fairman, B. Stillman, *EMBO J.* **1988**, 7, 1211-1218, *Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro.*
- [217] L. F. Erdile, W. D. Heyer, R. Kolodner, T. J. Kelly, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 12090-12098, *Characterization of a cDNA encoding the 70-kDa single-stranded DNA-binding subunit of human replication protein A and the role of the protein in DNA replication.*
- [218] M. K. Kenny, U. Schlegel, H. Furneaux, J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 7693-7700, *The role of human single-stranded DNA binding protein and its individual subunits in simian virus 40 DNA replication.*
- [219] D. Mu, C. H. Park, T. Matsunaga, D. S. Hsu, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 2415-2418, *Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system.*
- [220] D. Coverley, M. K. Kenny, D. P. Lane, R. D. Wood, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 3873-3880, *A role for the human single-stranded DNA binding protein HSSB/RPA in an early stage of nucleotide excision repair.*
- [221] T. Yasuda, K. Sugasawa, Y. Shimizu, S. Iwai, T. Shiomi, F. Hanaoka, *DNA Repair (Amst)* **2005**, 4, 389-395, *Nucleosomal structure of undamaged DNA regions suppresses the non-specific DNA binding of the XPC complex.*
- [222] D. Coverley, M. K. Kenny, M. Munn, W. D. Rupp, D. P. Lane, R. D. Wood, *Nature* **1991**, 349, 538-541, *Requirement for the replication protein SSB in human DNA excision repair.*
- [223] M. K. Shivji, V. N. Podust, U. Hubscher, R. D. Wood, *Biochemistry* **1995**, 34, 5011-5017, *Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA.*
- [224] A. Bochkarev, R. A. Pfuetzner, A. M. Edwards, L. Frappier, *Nature* **1997**, 385, 176-181, *Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA.*
- [225] W. L. de Laat, E. Appeldoorn, K. Sugasawa, E. Weterings, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **1998**, 12, 2598-2609, *DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair.*
- [226] Y. Lao, X. V. Gomes, Y. Ren, J. S. Taylor, M. S. Wold, *Biochemistry* **2000**, 39, 850-859, *Replication protein A interactions with DNA. III. Molecular basis of recognition of damaged DNA.*
- [227] M. R. Lieber, *Bioessays* **1997**, 19, 233-240, *The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair.*

- [228] A. O'Donovan, A. A. Davies, J. G. Moggs, S. C. West, R. D. Wood, *Nature* **1994**, 371, 432-435, *XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair.*
- [229] E. Evans, J. Fellows, A. Coffer, R. D. Wood, *EMBO J.* **1997**, 16, 625-638, *Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein.*
- [230] M. Hohl, F. Thorel, S. G. Clarkson, O. D. Scharer, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 19500-19508, *Structural determinants for substrate binding and catalysis by the structure-specific endonuclease XPG.*
- [231] M. Wakasugi, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 16030-16034, *The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair.*
- [232] A. Constantinou, D. Gunz, E. Evans, P. Lalle, P. A. Bates, R. D. Wood, S. G. Clarkson, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 5637-5648, *Conserved residues of human XPG protein important for nuclease activity and function in nucleotide excision repair.*
- [233] M. Saijo, I. Kuraoka, C. Masutani, F. Hanaoka, K. Tanaka, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 4719-4724, *Sequential binding of DNA repair proteins RPA and ERCC1 to XPA in vitro.*
- [234] C. H. Park, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 5017-5021, *Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins.*
- [235] A. Nagai, M. Saijo, I. Kuraoka, T. Matsuda, N. Kodo, Y. Nakatsu, T. Mimaki, M. Mino, M. Biggerstaff, R. D. Wood, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 211, 960-966, *Enhancement of damage-specific DNA binding of XPA by interaction with the ERCC1 DNA repair protein.*
- [236] L. Li, S. J. Elledge, C. A. Peterson, E. S. Bales, R. J. Legerski, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 5012-5016, *Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1.*
- [237] T. Matsunaga, D. Mu, C. H. Park, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 20862-20869, *Human DNA repair excision nuclease. Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies.*
- [238] T. Ikegami, I. Kuraoka, M. Saijo, N. Kodo, Y. Kyogoku, K. Morikawa, K. Tanaka, M. Shirakawa, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 701-706, *Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA.*
- [239] L. Li, C. A. Peterson, X. Lu, R. J. Legerski, *Mol. Cell Biol.* **1995**, 15, 1993-1998, *Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair.*
- [240] G. Mer, A. Bochkarev, R. Gupta, E. Bochkareva, L. Frappier, C. J. Ingles, A. M. Edwards, W. J. Chazin, *Cell* **2000**, 103, 449-456, *Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA.*
- [241] C. H. Park, D. Mu, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 4896-4902, *The general transcription-repair factor TFIIH is recruited to the excision repair complex by the XPA protein independent of the TFIIIE transcription factor.*

- [242] S. Nocentini, F. Coin, M. Saito, K. Tanaka, J. M. Egly, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22991-22994, *DNA damage recognition by XPA protein promotes efficient recruitment of transcription factor II H.*
- [243] N. Sugitani, S. M. Shell, S. E. Soss, W. J. Chazin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *Redefining the DNA-Binding Domain of Human XPA*.
- [244] E. H. Morita, T. Ohkubo, I. Kuraoka, M. Shirakawa, K. Tanaka, K. Morikawa, *Genes Cells* **1996**, 1, 437-442, *Implications of the zinc-finger motif found in the DNA-binding domain of the human XPA protein.*
- [245] D. Mu, D. S. Hsu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8285-8294, *Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease.*
- [246] P. Robins, C. J. Jones, M. Biggerstaff, T. Lindahl, R. D. Wood, *EMBO J.* **1991**, 10, 3913-3921, *Complementation of DNA repair in xeroderma pigmentosum group A cell extracts by a protein with affinity for damaged DNA.*
- [247] D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, *Nature* **1993**, 363, 114-115, *DNA repair. Engagement with transcription.*
- [248] U. Camenisch, R. Dip, S. B. Schumacher, B. Schuler, H. Naegeli, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, 13, 278-284, *Recognition of helical kinks by xeroderma pigmentosum group A protein triggers DNA excision repair.*
- [249] R. J. Isaacs, H. P. Spielmann, *DNA Repair (Amst)* **2004**, 3, 455-464, *A model for initial DNA lesion recognition by NER and MMR based on local conformational flexibility.*
- [250] M. Sander, J. Cadet, D. A. Casciano, S. M. Galloway, L. J. Marnett, R. F. Novak, S. D. Pettit, R. J. Preston, J. A. Skare, G. M. Williams, B. Van Houten, B. B. Gollapudi, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, 208, 1-20, *Proceedings of a workshop on DNA adducts: biological significance and applications to risk assessment Washington, DC, April 13-14, 2004.*
- [251] R. De Bont, N. van Larebeke, *Mutagenesis* **2004**, 19, 169-185, *Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data.*
- [252] B. C. Dickinson, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 504-511, *Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses.*
- [253] J. Cadet, T. Douki, J. L. Ravanat, *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 49, 9-21, *Oxidatively generated base damage to cellular DNA.*
- [254] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 617-618, *How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution.*
- [255] A. J. S. C. S. Vieira, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6986-6994, *Pattern of OH Radical Reaction with Adenine and Its Nucleosides and Nucleotides. Characterization of Two Types of Isomeric OH Adduct and Their Unimolecular Transformation Reactions.*
- [256] A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 18, 1033-1077, *Reactions of oxyl radicals with DNA.*

- [257] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J. L. Ravanat, *Mutat. Res.* **2003**, 531, 5-23, *Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features.*
- [258] E. Gajewski, G. Rao, Z. Nackerdien, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **1990**, 29, 7876-7882, *Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals.*
- [259] G. V. G. Buxton, C. L.; Helman, W. P.; Ross A. B., *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, 17, 513-886, *Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in Aqueous Solution.*
- [260] D. B. Medinas, G. Cerchiaro, D. F. Trindade, O. Augusto, *IUBMB Life* **2007**, 59, 255-262, *The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer.*
- [261] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503-520, *Purine Bases, Nucleosides, and Nucleotides: Aqueous Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and e- and OH Adducts.*
- [262] L. P. Candeias, S. Steenken, *Chemistry* **2000**, 6, 475-484, *Reaction of HO* with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)*.*
- [263] S. Raoul, M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, B. Morin, M. Weinfeld, J. Cadet, *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2* **1996**, 371-381, *1H, 13C and 15N nuclear magnetic resonance analysis and chemical features of the two main radical oxidation products of 2[prime or minute]-deoxyguanosine: oxazolone and imidazolone nucleosides.*
- [264] J. Cadet, M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, S. Raoul, J.-L. Ravanat, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7403-7404, *2,2-Diamino-4-[(3,5-di-O-acetyl-2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone: a Novel and Predominant Radical Oxidation Product of 3',5'-Di-O-acetyl-2'-deoxyguanosine.*
- [265] S. Steenken, S. V. Jovanovic, M. Bietti, K. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2373-2374, *The Trap Depth (in DNA) of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'deoxyguanosine as Derived from Electron-Transfer Equilibria in Aqueous Solution.*
- [266] M. K. Shigenaga, J. W. Park, K. C. Cundy, C. J. Gimeno, B. N. Ames, *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 521-530, *In vivo oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.*
- [267] M. Akbari, H. E. Krokan, *Mech. Ageing Dev.* **2008**, 129, 353-365, *Cytotoxicity and mutagenicity of endogenous DNA base lesions as potential cause of human aging.*
- [268] M. B. J. Cadet, *Z. Naturforsch.* **1985**, 40b, 1519-1531, *Isolation and Characterization of the Radiation-Induced Degradation Products of 2'-Deoxyguanosine in Oxygen-Free Solutions.*
- [269] M. M. Greenberg, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 588-597, *The formamidopyrimidines: purine lesions formed in competition with 8-oxopurines from oxidative stress.*

- [270] K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8636-8637, *Synthesis of oligonucleotides containing Fapy.dG (N6-(2-deoxy-alpha,beta-D-erythropentofuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamido pyrimidine).*
- [271] K. Haraguchi, M. O. Delaney, C. J. Wiederholt, A. Sambandam, Z. Hantosi, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3263-3269, *Synthesis and characterization of oligodeoxynucleotides containing formamidopyrimidine lesions and nonhydrolyzable analogues.*
- [272] Y. L. Jiang, C. J. Wiederholt, J. N. Patro, K. Haraguchi, M. M. Greenberg, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 141-149, *Synthesis of oligonucleotides containing Fapy.dG (N(6)-(2-deoxy-alpha,beta-D-erythropentofuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamido pyrimidine) using a 5'-dimethoxytrityl dinucleotide phosphoramidite.*
- [273] K. Haraguchi, M. O. Delaney, C. J. Wiederholt, A. Sambandam, Z. Hantosi, M. M. Greenberg, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 129-130, *Synthesis and characterization of oligonucleotides containing formamidopyrimidine lesions (Fapy.dA, Fapy.dG) at defined sites.*
- [274] M. O. Delaney, M. M. Greenberg, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 1460-1465, *Synthesis of oligonucleotides and thermal stability of duplexes containing the beta-C-nucleoside analogue of Fapy*dG.*
- [275] M. Ober, U. Linne, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4947-4951, *The two main DNA lesions 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine exhibit strongly different pairing properties.*
- [276] T. A. Steitz, Y. W. Yin, T. W. Traut, J. A. Brown, Z. Suo, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2004**, 359, 17-23, *Accuracy, lesion bypass, strand displacement and translocation by DNA polymerases.*
- [277] T. W. Traut, J. A. Brown, Z. Suo, *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, 140, 1-22, *Physiological concentrations of purines and pyrimidines.*
- [278] J. A. Brown, Z. Suo, *Biochemistry* **2011**, 50, 1135-1142, *Unlocking the sugar "steric gate" of DNA polymerases.*
- [279] M. Ober, H. Müller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18143-18149, *Base pairing and replicative processing of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion.*
- [280] W. Wang, H. W. Wu Fau - Hellinga, L. S. Hellinga Hw Fau - Beese, L. S. Beese, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 28215-28226, *Structural factors that determine selectivity of a high fidelity DNA polymerase for deoxy-, dideoxy-, and ribonucleotides.*
- [281] S. D. Bruner, D. P. Norman, G. L. Verdine, *Nature* **2000**, 403, 859-866, *Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA.*
- [282] M. Ferrero, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4319-4348, *Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides, and C-nucleosides.*
- [283] S. Smirnov, F. Johnson, R. Marumoto, C. de los Santos, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, 17, 981-991, *Structure of an 11-mer DNA duplex containing the carbocyclic nucleotide analog: 2'-deoxyaristeromycin.*

- [284] T. A. Halgren, *J. Comut. Chem.* **1999**, 20, 720-729, MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies.
- [285] M. Ober, *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 2005, Synthese eines carbozyklischen Analogons des Formamidopyrimidin-dG DNA-Schadens: Untersuchungen zur Replikation und Reparatur.*
- [286] M. A. Kalam, K. Haraguchi, S. Chandani, E. L. Loechler, M. Moriya, M. M. Greenberg, A. K. Basu, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 2305-2315, Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells.
- [287] J. N. Patro, C. J. Wiederholt, Y. L. Jiang, J. C. Delaney, J. M. Essigmann, M. M. Greenberg, *Biochemistry* **2007**, 46, 10202-10212, Studies on the replication of the ring opened formamidopyrimidine, Fapy.dG in *Escherichia coli*.
- [288] F. Büsch, J. C. Pieck, M. Ober, J. Gierlich, G. W. Hsu, L. S. Beese, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 2125-2132, Dissecting the differences between the alpha and beta anomers of the oxidative DNA lesion FaPydG.
- [289] C. J. Wiederholt, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7278-7279, Fapy.dG instructs Klenow exo(-) to misincorporate deoxyadenosine.
- [290] M. O. Delaney, C. J. Wiederholt, M. M. Greenberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 771-773, Fapy.dA induces nucleotide misincorporation translesionally by a DNA polymerase.
- [291] X. Tan, A. P. Grollman, S. Shibutani, *Carcinogenesis* **1999**, 20, 2287-2292, Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells.
- [292] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, 431, 217-221, Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase.
- [293] V. Duarte, J. G. Muller, C. J. Burrows, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 496-502, Insertion of dGMP and dAMP during in vitro DNA synthesis opposite an oxidized form of 7,8-dihydro-8-oxoguanine.
- [294] L. G. Brieba, B. F. Eichman, R. J. Kokoska, S. Doublie, T. A. Kunkel, T. Ellenberger, *EMBO J.* **2004**, 23, 3452-3461, Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase.
- [295] L. G. Brieba, T. Ellenberger, *Structure* **2003**, 11, 1-2, Hold tight (but not too tight) to get it right: accurate bypass of an 8-oxoguanine lesion by DNA polymerase beta.
- [296] J. M. Krahn, W. A. Beard, H. Miller, A. P. Grollman, S. H. Wilson, *Structure* **2003**, 11, 121-127, Structure of DNA polymerase beta with the mutagenic DNA lesion 8-oxodeoxyguanine reveals structural insights into its coding potential.
- [297] R. L. Eoff, A. Irimia, K. C. Angel, M. Egli, F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 19831-19843, Hydrogen bonding of 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine with a charged residue in the little finger domain determines miscoding events in *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase Dpo4.

- [298] R. V.-D. Carpio, T. D. Silverstein, S. Lone, M. K. Swan, J. R. Choudhury, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, *PLoS One* **2009**, 4, e5766, *Structure of Human DNA Polymerase κ Inserting dATP Opposite an 8-OxoG DNA Lesion*.
- [299] V. K. Batra, W. A. Beard, E. W. Hou, L. C. Pedersen, R. Prasad, S. H. Wilson, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, 17, 889-890, *Mutagenic conformation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP in the confines of a DNA polymerase active site*.
- [300] M. Dizdaroglu, G. Kirkali, P. Jaruga, *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 45, 1610-1621, *Formamidopyrimidines in DNA: Mechanisms of formation, repair, and biological effects*.
- [301] D. L. Johnson, T. M. Reid, M. S. Lee, C. M. King, L. J. Romano, *Biochemistry* **1986**, 25, 449-456, *Preparation and characterization of a viral DNA molecule containing a site-specific 2-aminofluorene adduct: a new probe for mutagenesis by carcinogens*.
- [302] P. Koehl, D. Burnouf, R. P. Fuchs, *J. Mol. Biol.* **1989**, 207, 355-364, *Construction of plasmids containing a unique acetylaminofluorene adduct located within a mutation hot spot. A new probe for frameshift mutagenesis*.
- [303] Z. Wang, C. J. Rizzo, *Org. Lett.* **2001**, 3, 565-568, *Synthesis of the C8-deoxyguanosine adduct of the food mutagen IQ*.
- [304] S. Shekhar, P. Ryberg, J. F. Hartwig, J. S. Mathew, D. G. Blackmond, E. R. Strieter, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3584-3591, *Reevaluation of the mechanism of the amination of aryl halides catalyzed by BINAP-ligated palladium complexes*.
- [305] L. C. Gillet, O. D. Scharer, *Org. Lett.* **2002**, 4, 4205-4208, *Preparation of C8-amine and acetylamine adducts of 2'-deoxyguanosine suitably protected for DNA synthesis*.
- [306] R. R. Bonala, M. C. Torres, S. Attaluri, C. R. Iden, F. Johnson, *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 457-465, *Incorporation of N2-deoxyguanosine metabolic adducts of 2-aminonaphthalene and 2-aminofluorene into oligomeric DNA*.
- [307] Riedel, *Anorganische Chemie*, 4. Aufl., de Gruyter, Berlin, New York, **1999**.
- [308] J. E. Yeo, A. Khoo, A. F. Fagbemi, O. D. Scharer, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 2462-2468, *The efficiencies of damage recognition and excision correlate with duplex destabilization induced by acetylaminofluorene adducts in human nucleotide excision repair*.
- [309] Y. Cai, N. E. Geacintov, S. Broyde, *Biochemistry* **2012**, 51, 1486-1499, *Nucleotide excision repair efficiencies of bulky carcinogen-DNA adducts are governed by a balance between stabilizing and destabilizing interactions*.
- [310] H. T. Allawi, J. SantaLucia, Jr., *Biochemistry* **1997**, 36, 10581-10594, *Thermodynamics and NMR of internal G.T mismatches in DNA*.
- [311] T. Zaliznyak, R. Bonala, F. Johnson, C. de Los Santos, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, 19, 745-752, *Structure and stability of duplex DNA containing the 3-(deoxyguanosin-N2-yl)-2-acetylaminofluorene (dG(N2)-AAF) lesion: a bulky adduct that persists in cellular DNA*.

- [312] E. A. Maltseva, N. I. Rechkunova, I. O. Petrusheva, W. Vermeulen, O. D. Scharer, O. I. Lavrik, *Bioorg. Chem.* **2008**, *36*, 77-84, *Crosslinking of nucleotide excision repair proteins with DNA containing photoreactive damages*.
- [313] S. Koch, *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 2014, Untersuchung der Schadenserkennung in der Nukleotidexzisionsreparatur*.
- [314] G. W. Buchko, S. Ni, B. D. Thrall, M. A. Kennedy, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2779-2788, *Structural features of the minimal DNA binding domain (M98-F219) of human nucleotide excision repair protein XPA*.
- [315] H. Mu, K. Kropachev, L. Wang, L. Zhang, A. Kolbanovskiy, M. Kolbanovskiy, N. E. Geacintov, S. Broyde, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 9675-9690, *Nucleotide excision repair of 2-acetylaminofluorene- and 2-aminofluorene-(C8)-guanine adducts: molecular dynamics simulations elucidate how lesion structure and base sequence context impact repair efficiencies*.
- [316] B. Mao, A. Gorin, Z. Gu, B. E. Hingerty, S. Broyde, D. J. Patel, *Biochemistry* **1997**, *36*, 14479-14490, *Solution structure of the aminofluorene-intercalated conformer of the syn [AF]-C8-dG adduct opposite a-2 deletion site in the NarI hot spot sequence context*.
- [317] A. Janicijevic, K. Sugasawa, Y. Shimizu, F. Hanaoka, N. Wijgers, M. Djurica, J. H. Hoeijmakers, C. Wyman, *DNA Repair (Amst)* **2003**, *2*, 325-336, *DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B*.
- [318] N. Kitsera, K. Gasteiger, B. Lühsdorf, J. Allgayer, B. Epe, T. Carell, A. Khobta, *PLoS One* **2014**, *9*, e94405, *Cockayne Syndrome: Varied Requirement of Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair for the Removal of Three Structurally Different Adducts from Transcribed DNA*.
- [319] CCP4, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760-763, *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*.
- [320] W. Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 133-144, *Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement*.
- [321] C. Vonrhein, C. Flensburg, P. Keller, A. Sharff, O. Smart, W. Paciorek, T. Womack, G. Bricogne, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 293-302, *Data processing and analysis with the autoPROC toolbox*.
- [322] T. C. Terwilliger, P. D. Adams, R. J. Read, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, P. H. Zwart, L. W. Hung, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 582-601, *Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSolv wizard*.
- [323] P. H. Zwart, P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, L. W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, E. McKee, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter, L. C. Storoni, T. C. Terwilliger, P. D. Adams, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *426*, 419-435, *Automated structure solution with the PHENIX suite*.
- [324] T. C. Terwilliger, R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, N. W. Moriarty, P. H. Zwart, L. W. Hung, R. J. Read, P. D. Adams, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2008**, *64*, 61-69, *Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard*.

- [325] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213-221, *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.*
- [326] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, L. C. Storoni, R. J. Read, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 458-464, *Likelihood-enhanced fast translation functions.*
- [327] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *J Appl Crystallogr.* **2007**, *40*, 658-674, *Phaser crystallographic software.*
- [328] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501, *Features and development of Coot.*
- [329] G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, A. A. Vagin, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355-367, *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures.*
- [330] M. D. Winn, G. N. Murshudov, M. Z. Papiz, *Methods Enzymol.* **2003**, *374*, 300-321, *Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions.*
- [331] J. Painter, E. A. Merritt, *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 109-111, *TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models.*
- [332] H. G. O. Becker, R. Beckert, G. Domschke, E. Fanghänel, W. D. Habicher, P. Metz, D. Pavel, K. Schwertlick, *Organikum* **2001**, *21*. Auflage, VCH, Weinheim.
- [333] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* **2005**, *7*. Auflage, Thieme Stuttgart.
- [334] S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12063-12064, *Dynamic combinatorial libraries of macrocyclic disulfides in water.*