





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

**Co-Kristallisation von DNA-Photolyase aus *A. nidulans*  
mit Thymidindimer enthaltender DNA  
Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Cofaktoren in Oligonukleotide**

Alexandra Mees

aus

Siegen

2005



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

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 03.06.2005

Alexandra Mees

Dissertation eingereicht am 07.06.2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Mündliche Prüfung am 21.07.2005



*La nature a l'attrait et le charme de l'infini.*

*-Man muss konsequent im Forschen sein, und die Natur täuscht niemanden. Die Schätze der Natur sind verzauberte Schätze, welche kein Spaten, sondern das Wort bloßlegt.-*

*Goethe*



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Carell für das sehr interessante und hochaktuelle Thema meiner Arbeit, für die großzügige intellektuelle und materielle Unterstützung, sowie seinen großen Ideenreichtum und Optimismus bedanken.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen, Philipps-Universität Marburg, danke ich für die enge Kollaboration in dem gemeinsamen Co-Kristallisations-Projekt der DNA-Photolyase. Frau Petra Gnau danke ich für ihre gute Zusammenarbeit und Hilfe in den langen Stunden im Kühlraum.

Herrn Prof. A. P. M. Eker von der Erasmus University Rotterdam gebührt mein Dank für die Überexpression der Photolyase und die Inkorporation des  $F_0$ -Cofaktors in das Enzym. Weiterhin danke ich A. Yasui für die Bereitstellung des Expressionskonstrukts.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Leonhardt danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt der Massen- und NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg und der Ludwig-Maximilians-Universität München. Herrn Dr. Klaus Steinbach danke ich für seine schnellen und immer exakten Massebestimmungen. Herrn A. Mbonimana und Herrn G. Häde danke ich für die grossen Bemühungen beim Messen einiger Kernresonanzspektren meiner Verbindungen. Herrn Dr. W. Spahl, Herrn Dr. G. Fischer und Frau D. Ewald danke ich für die guten Hochauflösungen mittels FAB-Methode und ihr Engagement. Weiterhin danke ich Dr. D. Stevenson und Frau C. Dubler der NMR-Abteilung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Uwe Linne für die unverzügliche Aufnahme jeglicher Massenspektren und seine große Hilfsbereitschaft.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen des Manuskriptes dieser Arbeit danke ich Sascha Breeger, Ulrich Hennecke und Dave Hammond.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Johannes Gierlich bedanken. Er war mir eine große Hilfe bei allem, was mit Computerproblemen zusammenhängt. Außerdem bedanke ich mich für die MD-Simulation der Desazaflavin-DNA-Stränge.

Ulrich Hennecke danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und meinem Labornachbarn Matthias Ober für *Modelling*-Studien und für Stimmhorn.

Simone Arnold, Sascha Breeger und Eva Jahn danke ich für ihre Freundschaft und eine schöne Zeit innerhalb und außerhalb der Universitätsmauern in München.

Frau S. Voß danke ich für ihre offene und kreative Art und alle organisatorischen Tätigkeiten.

Dr. Michaela Cichon danke ich für die schöne Zeit in Marburg und für ihre Freundschaft und den Spaß bei sportlichen Betätigungen.

Großen Dank möchte ich Frau S. Gärtner, Ina Pinnschmidt und Katja Kräling aussprechen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Michel Digoh möchte ich besonders danken, für seine Unterstützung und seine stete Freundschaft.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Reinhard Kipping für die grenzenlose Unterstützung und meinem Schwesterherz Verena für ihre stete Anwesenheit via Telefonkontakt und die guten und aufmunternden Gespräche.

Joan Arbona danke ich für Rückhalt und Nähe, trotz der großen Entfernung.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mich immer in jeglicher Hinsicht grenzenlos unterstützt haben.

*Meinen Lieben*



<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>V</b>
<b>SUMMARY</b>		<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>		<b>1</b>
1.1 DNA		1
1.2 Einfluss von UV-Licht auf epidermale DNA		2
1.3 Photoschäden		4
1.4 DNA-Reparatur		6
1.5 DNA-Photolyasen		9
1.5.1 Überblick		9
1.5.2 Struktur		10
1.5.2.1 Apoenzym (Primärstruktur)		11
1.5.2.2 Cofaktoren		12
1.5.2.3 Kristallstruktur		13
1.5.3 Reparaturmechanismus		16
1.5.3.1 Schadenserkennung/Bindung		17
1.5.3.2 Photoreaktivierung		20
1.6 Flavin-Cofaktor		24
1.6.1 Überblick		24
1.6.2 Das Flavin-Redoxsystem		24
1.6.3 Die Photochemie der Flavine		27
1.7 Desazaflavin-Cofaktor		29
1.7.1 Überblick		29
1.7.2 Das Desazaflavin-Redoxsystem		30
1.7.3 Die Photochemie der Desazaflavine		34
1.7.4 Das Desazaflavin als Cofaktor in DNA-Photolyasen		34
<b>2 AUFGABENSTELLUNG</b>		<b>36</b>
<b>3 EINBAU VON FLAVIN- UND DESAZAFLAVIN-NUKLEOTIDEN IN DNA</b>		<b>39</b>

<b>3.1</b>	<b>Flavin in Oligonukleotiden</b>	<b>39</b>
3.1.1	Überblick	39
3.1.2	Synthese des Flavin-Coenzym und Inkorporation in Oligonukleotide	41
3.1.3	Allgemeine Charakteristika von Flavin enthaltenden DNA-Doppelsträngen	43
3.1.4	<i>Molecular Modelling</i>	46
3.1.5	Fluoreszenz-Untersuchungen an Flavin enthaltenden DNA-Einzelsträngen	49
3.1.5.1	Der Effekt der Basensequenz	49
3.1.6	Fluoreszenz-Untersuchungen an Flavin enthaltenden DNA-Doppelsträngen	50
3.1.6.1	Der Effekt der Basensequenz	50
3.1.6.2	Der Effekt der Gegenbase auf die Fluoreszenz des Flavins in DNA-Doppelsträngen	52
3.1.7	Diskussion der Ergebnisse	53
<b>3.2</b>	<b>Desazaflavine in Oligonukleotiden</b>	<b>56</b>
3.2.1	Überblick	56
3.2.2	Synthese eines Desazaflavin-DNA-Bausteins	61
3.2.2.1	DNA-Synthese	69
3.2.2.2	Reinigung der DNA-Stränge	70
3.2.2.3	Eigenschaften von Desazaflavin enthaltender DNA	72
3.2.2.4	Molecular Modelling	73
3.2.3	Synthese von Desazaflavin-DNA- <i>Hairpin</i> -Bausteinen	75
3.2.4	Zusammenfassung und Ausblick	76
<b>4</b>	<b>CO-KRISTALLSTRUKTUR DER DNA-PHOTOLYASE AUS <i>A. NIDULANS</i></b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>Synthese des F<sub>0</sub>-Cofaktors</b>	<b>78</b>
<b>4.3</b>	<b>Synthese des CPD-Schadens</b>	<b>86</b>
<b>4.4</b>	<b>Kristallisation der Photolyase mit Thymidindimer enthaltender DNA</b>	<b>89</b>
4.4.1	Einleitung	89
4.4.2	Rekonstitution des Photolyase-Proteins	89
4.4.3	DNA-Synthese	91
4.4.4	Reinigung und Charakterisierung der DNA-Stränge	92
4.4.5	Kristallisation	95
4.4.6	Struktur-Analyse	95
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>108</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>110</b>

<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>111</b>
5.1	Material und Methoden	111
5.2	Synthese des Riboflavin-DNA-Bausteins	116
5.3	Synthese der Desazaflavin-Nukleotide	120
5.3.1	Desazaflavin-DNA-Baustein	120
5.3.2	Desazaflavin-DNA- <i>Hairpin</i> -Bausteine	128
5.4	Synthese von F <sub>0</sub>	132
5.5	Synthese des Formacetal-CPD	137
5.6	Synthese der DNA-Stränge	141
5.6.1	Oligonukleotid-Synthese via Phosphoramidit-Chemie	141
5.6.2	Oligonukleotid-Synthese via <i>H</i> -Phosponat-Chemie	141
5.6.3	Entschützung der synthetisierten Oligonukleotide	142
5.6.4	Reinigung der Oligonukleotide	142
5.7	<b>Co-Kristallisation der DNA-Photolyase aus <i>A. nidulans</i> mit CPD enthaltender DNA</b>	<b>144</b>
5.7.1	Proteinkonzentrierung	144
5.7.2	Protein-Konzentrationsbestimmung	144
5.7.3	Filtration	145
5.7.4	Bindungsansatz	145
5.7.5	Kristallisation	146
5.7.6	Co-Kristallisation der DNA-Photolyase mit einem 16mer-Oligonukleotid	146
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>151</b>



## Zusammenfassung

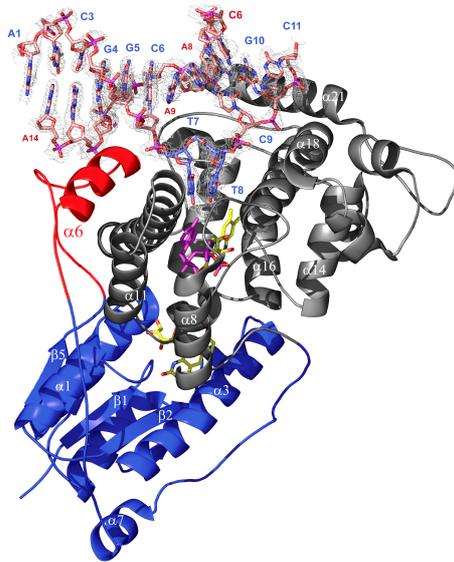
Seit Beginn des Lebens auf der Erde sind die Zellen und somit die DNA dem Sonnenlicht ausgesetzt. Kurzwellige UV-Strahlung ist die Ursache für schwerwiegende genomschädigende Effekte, die durch die Bildung von Photoprodukten in der DNA hervorgerufen werden. Die häufigsten UV-induzierten DNA-Schäden sind *cis,syn*-Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD), die zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen, meist Thymidinen, gebildet werden. Bleiben solche Photoschäden unrepariert, so können sie den Auslöser für Mutagenese und Carcinogenese darstellen. Aus diesem Grund ist es von großem aktuellem Interesse, den Mechanismus der Detektion und Reparatur von UV-Licht-induzierten DNA-Schäden aufzuklären. In Prokaryonten, Pflanzen und einigen Vertebraten sind DNA-Photolyasen für die Reparatur dieser Photoschäden verantwortlich. Photolyasen sind Coenzym-abhängige Reparaturenzyme, die den Dimer-Schaden in einer ebenfalls durch Sonnenlicht initiierten Katalyse wieder in die Monomere spalten und somit die Wiederherstellung intakter DNA ermöglichen.

Obwohl die Kristallstrukturen von drei Photolyasen bereits gelöst wurden, war bis heute keine Co-Kristallstruktur dieses Enzyms zusammen mit dem Substrat, CPD enthaltender DNA, existent. Gerade aber die Struktur des Photolyase/Substrat-Komplexes ist von enormer Bedeutung, um den genauen Bindungs- und Reparaturmechanismus des Enzyms vollständig aufklären zu können.

Photolyasen der Desazaflavin-Klasse besitzen als Photoantenne ein 8-Hydroxy-5-desazaflavin, den  $F_0$ -Cofaktor. Da bei der Überexprimierung der Photolyase aus *A. nidulans* in *E. coli* der  $F_0$ -Cofaktor nicht hergestellt werden kann, wurde in dieser Arbeit zunächst das  $F_0$  chemisch synthetisiert und anschließend in das Enzym inkorporiert. Als DNA-Substrat wurde ein Thymidindimer-Schaden mit Formacetalbrücke über DNA-Synthese an der festen Phase in Oligonukleotide eingebaut und dann zusammen mit DNA-Photolyase kristallisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Co-Kristallstruktur der Photolyase von *A. nidulans* im Komplex mit CPD enthaltender Duplex-DNA erhalten. Die Röntgen-Struktur zeigt bei einer Auflösung von 1.8 Å den Dimer-Schaden vollständig aus

der Duplex-DNA heraus in die aktive Tasche des Enzyms gedreht und unter Synchrotron-Strahlung bei 100 K in zwei Thyminen gespalten. Dieser Vorgang wird durch ein zusätzliches Knicken der DNA um  $50^\circ$  begleitet. Die hier dargestellte Struktur imitiert einen strukturellen Zustand während lichtinduzierter DNA-Reparatur, in dem das Zurückdrehen der Thyminen in die Duplex-DNA noch nicht stattgefunden hat. Die in dieser Arbeit beschriebene Co-Kristallstruktur ist die erste Struktur, durch die der zuvor immer nur vielfach postulierte Dinukleotid-*Flipping*-Mechanismus von Photolyasen bestätigt werden konnte.



Die Photolyasen der Desazaflavin-Klasse besitzen als Cofaktoren eine Flavin- und eine Desazaflavin-Einheit. Auf Grund der interessanten chemischen und physikalischen Eigenschaften bildeten diese Cofaktoren auch für sich betrachtet den Gegenstand weiterer vielseitiger und fundamentaler Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Flavin-Cofaktoren spielen in der Natur der Enzyme eine entscheidende Rolle in der Katalyse von Redoxreaktionen. Durch das wachsende Interesse an Biokatalysatoren basierend auf Oligonukleotid-Strukturen ist der Einbau von Coenzymen in DNA oder RNA von besonderer Bedeutung. Die Konstruktion von Flavin-abhängigen Ribozymen mit Eigenschaften, die in das Gebiet der Redoxkatalyse reichen, erfordert detaillierte Kenntnisse über die Fluoreszenz-Eigenschaften des Coenzym in einer Oligonukleotid-Umgebung. Hierzu wurde ein Riboflavin-Cofaktor in DNA, welche die Protein-Umgebung von Coenzym-abhängigen Enzymen ersetzen soll, inkorporiert. In dieser Arbeit wird die erste Untersuchung des komplexen

Fluoreszenzverhaltens der künstlichen Flavin-Base in DNA beschrieben. Das Coenzym ist überraschend nützlich für das präzise Monitoring der Nukleobasen in seiner Nachbarschaft. Die hier gewonnenen Ergebnisse stellen die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen zur Verwendung von Flavin enthaltenden bioanalytischen Bauteilen dar.

Der Desazaflavin-Cofaktor ist ein weiteres weitverbreitetes Coenzym mit variierenden Funktionsmöglichkeiten. So spielt er als Redox-Cofaktor  $F_{420}$  in methanogenen Bakterien eine Rolle, und als  $F_0$  hat er die Aufgabe einer lichtsammelnden Photoantenne in zahlreichen Photolyasen inne. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein zum Einbau in DNA geeigneter Desazaflavin-Baustein synthetisiert werden. Hier ist es zum ersten Mal gelungen, ein Desazaflavin innerhalb eines Oligonukleotids über Phosphodiesterbrücken zu inkorporieren. Zusammen mit eingebautem Flavin-Cofaktor und Pyrimidindimer-Schaden kann ein neues vollständiges Modellsystem der Photolyase mit der DNA als starrer Organisationseinheit generiert werden. Hierdurch können Distanzabhängigkeiten der Energietransferprozesse zwischen Desazaflavin und Flavin und Reparaturprozesse systematisch untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen erheblich zur Aufklärung eines der wichtigsten Genom-Reparatur-Prozesse der Natur bei.

## Summary

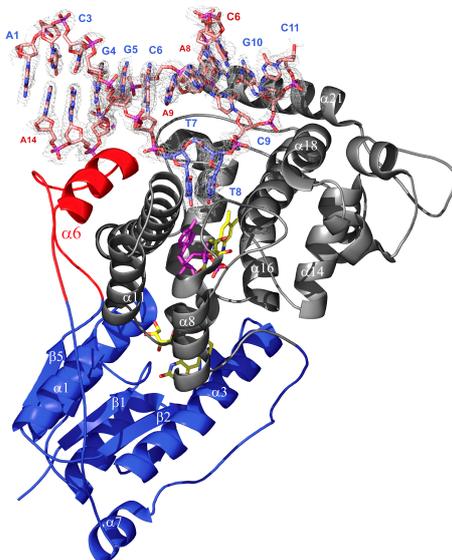
Since the beginning of life on earth, cells and their DNA have been exposed to sunlight. Short-wavelength UV-irradiation causes severe genomic damage as a result of the formation of photoproducts in DNA. The major UV-induced DNA lesion is the *cis,syn* cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) which is formed between two adjacent pyrimidine bases, normally thymidines. These photolesions, if left unrepaired, can be mutagenic and carcinogenic. For this reason it is currently of great interest to learn about the detection and repair of UV-induced DNA lesions. In prokaryotes, plants and some vertebrates DNA photolyases are responsible for the repair of these photolesions. Photolyases are coenzyme-dependent repair enzymes which cleave the dimer into the monomers in a sunlight-initiated process thereby regenerating the intact DNA.

Although three crystal structures of photolyases have been solved, it has been difficult to obtain a co-crystal structure of this enzyme together with the substrate: DNA containing CPD lesions. The structure of the photolyase/substrate complex is of great importance, as this facilitates the complete elucidation of the binding and repair mechanisms of the enzyme.

Photolyases of the deazaflavin-class contain as a light harvesting cofactor 8-hydroxy-5-deazaflavin, the  $F_0$  cofactor. Since the  $F_0$  cofactor cannot be synthesized during the overexpression process of *A. nidulans* photolyase in *E. coli*, the  $F_0$  was synthesized chemically as a part of this work and then incorporated into the enzyme. For the DNA substrate, a thymidine dimer lesion with a formacetal bridge was incorporated into oligonucleotides by solid phase synthesis and then crystallised with the protein.

In this Ph. D. thesis a co-crystal structure of *A. nidulans* photolyase in complex with CPD-containing duplex DNA was successfully elucidated. The 1.8 Å crystal structure shows the dimer lesion being completely flipped out of the duplex DNA into the active site of the enzyme and split into the two corresponding thymines by synchrotron radiation at 100 K. This process is accompanied by additional bending of the DNA to about 50°. The structure apparently mimics a structural sub-state during light-driven DNA repair in which back flipping of the thymines into duplex DNA

has not yet taken place. The co-crystal structure described in this thesis represents the first structure which can confirm the hitherto only postulated dinucleotide flipping mechanism of photolyases.



Photolyases of the deazaflavin class possess as cofactors one flavin and one deazaflavin moiety. Due to their interesting chemical and physical properties even these cofactors themselves can form the basis of variable and fundamental investigations.

In nature flavin-dependent enzymes play a crucial role in the catalysis of redox reactions. Due to growing interest in biocatalysis based on oligonucleotide structures, the incorporation of coenzymes into DNA or RNA is of high interest. The construction of flavin-dependent ribozymes with properties that extend into the domain of redox catalysis requires detailed knowledge of the fluorescence properties of coenzymes in an oligonucleotide environment. A riboflavin cofactor was incorporated into DNA which could potentially replace the protein environment of coenzyme-dependent enzymes. This thesis presents the first study of the complex fluorescence behaviour of an artificial flavin base in DNA. The coenzyme is surprisingly useful for the precise monitoring of nucleobases in its vicinity. The described results will be the basis for further investigations into flavin-containing bioanalytical devices.

The deazaflavin cofactor is another very common coenzyme with differing functions. It acts as redox cofactor  $F_{420}$  in methanogenic bacteria and as  $F_0$  it is a light harvesting

photoantenna in many photolyases. In this work a deazaflavin building block was synthesized which was incorporated into DNA. For the first time a deazaflavin has been incorporated within an oligonucleotide via phosphodiester bonds. Together with an embedded flavin cofactor and pyrimidine lesions, a new complete model system of photolyase with DNA as a fixed pre-organising template can be generated. This will allow systematic investigations into the distance dependence of energy transfer processes between deazaflavin and flavin, and into repair processes.

The results from this thesis yielded fascinating insights into one of the most important genome repair processes in nature.

# 1 Einleitung

## 1.1 DNA

DNA ist der Träger der genetischen Information jeder prokaryontischen und eukaryontischen Zelle. Der genetische Code beruht auf der Abfolge von vier Nucleosiden, dem Adenosin, Guanosin, Cytosin und Thymin. Ihre Zucker- und Phosphordiester-Einheiten bilden das Rückgrat der DNA. Der Erhalt der in der Doppelhelix durch die Basensequenz festgelegte Erbinformation ist zum Überleben und zur Reproduktion eines Organismus von außerordentlicher Bedeutung. Die DNA als chemisches Makromolekül ist empfindlich gegenüber verschiedensten chemischen Reaktionen. Zahlreiche Faktoren aus der Umwelt und endogenen Ursprungs schädigen die DNA im Genom. Zur ersten Kategorie zählen vornehmlich Einflüsse wie Chemikalien und verschiedene Arten von Strahlung, z. B. ionisierende oder UV-Strahlung.<sup>[1]</sup> Im zweiten Fall werden neben Wasser als Resultat des normalen Zellmetabolismus viele reaktive Nebenprodukte erzeugt. Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid-Radikalanionen, Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikale werden im oxidativen Metabolismus generiert und können mit DNA zu zahlreichen Oxidationsprodukten reagieren.<sup>[2, 3]</sup> Weiterhin zählen Basenfehlpaarungen und nicht ganz fehlerfrei arbeitende DNA-Polymerasen und DNA-Reparatursysteme zu den endogenen Faktoren.

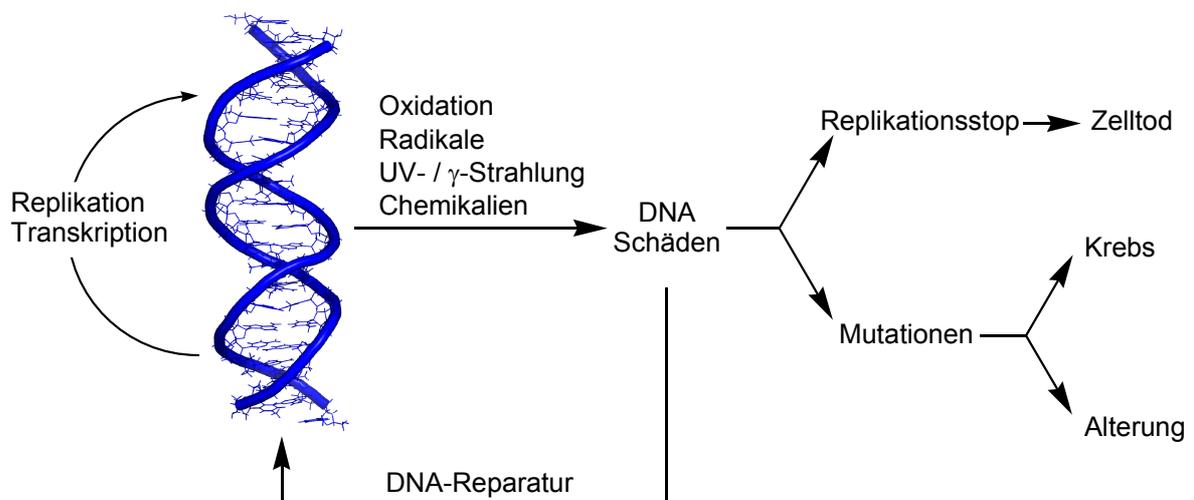


Abb. 1. DNA als Lebensgrundlage und als Ziel von Schädigungen.

## 1. Einleitung

---

Schäden in der DNA können zu Mutationen führen, die die Codierungssequenz der DNA verändern und die Ursache für die Entstehung von Krebs darstellen.<sup>[4]</sup>

### 1.2 Einfluss von UV-Licht auf epidermale DNA

Die Haut (Kutis) setzt sich aus der Oberhaut (Epidermis) und der Lederhaut (Dermis) zusammen. Die Epidermis besteht aus mehrschichtigem, keratinisiertem Plattenepithel. Sie lässt mehrere deutlich unterscheidbare Schichten erkennen. Dies geht darauf zurück, dass in den basalen Lagen der Epidermis laufend Zellen neu gebildet werden, die in etwa drei Wochen an die Oberfläche wandern und dabei eine Umwandlung erfahren, bis sie schließlich abgestoßen werden. Insgesamt überwiegen in der Epidermis die Zellen, die im Laufe der Zeit keratinisieren, die Keratinocyten. Außerdem kommen im basalen Bereich der Epidermis noch drei weitere Zellarten vor (ca. 15%), darunter die Melanocyten (Pigmentzellen).<sup>[5]</sup>

Sonnenlicht ist essentiell für menschliches Leben, eine zu starke Exposition kann jedoch schwerwiegende Folgen nach sich ziehen. Chronisches Aussetzen der Haut gegenüber UV-Strahlung führt zur Photoalterung (Sonnenbrand, Falten, Flecken, Hauttexturveränderungen), Immunsuppression u.s.w.<sup>[6]</sup>

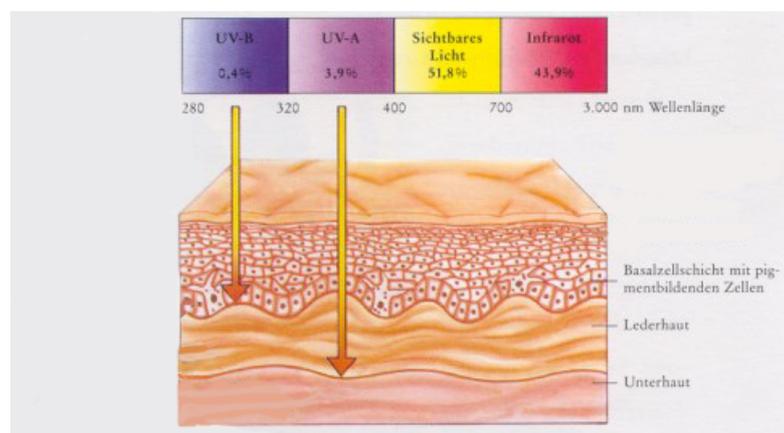


Abb. 2. Eindringtiefen von UVB- und UVA-Strahlung in die Epidermis und Dermis.

UV-Strahlung erzeugt des weiteren DNA-Schäden, die ein kritisches Ereignis in der Photoalterung und Photocarcinogenese darstellen.<sup>[7]</sup> Exposition gegenüber UV-Licht induziert eine große Bandbreite von DNA-Schäden in Hautzellen, entweder durch direkte Absorption (UVB) oder durch oxidativen Stress (UVA und UVB) (Abb. 2).

Durch direkte Absorption können Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) als einige der häufigsten Photoschäden in DNA generiert werden (siehe Kapitel 1.3).

Das 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-oxoG) ist der Hauptvertreter von DNA-Schäden, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden. Es kann die Transversion von G:C zu T:A während der DNA-Replikation induzieren, was häufig in Hautregionen exponiert zum Sonnenlicht auftritt.<sup>[8]</sup>

Diese DNA-Schäden werden für die Entstehung von Krebs und für die Alterung verantwortlich gemacht.<sup>[8-10]</sup>

Es existieren drei Hauptarten von Hautkrebs, das Basalzellcarcinom, das Schuppenzellcarcinom und maligne Melanome, wobei die ersten beiden am deutlichsten mit der Exposition von Sonnenlicht korrelieren.<sup>[10, 11]</sup> Diese Krebsarten treten in den korrespondierenden Zellen der Epidermis, die eine durchschnittliche Dicke von 100 µm aufweist, entsprechend zur Eindringtiefe der UVB-Strahlung auf.

Hautzellen haben Präventionen und zahlreiche DNA-Reparatursysteme (siehe Kapitel 1.4) entwickelt, um sofort den schädlichen Effekten, die zur genomischen Instabilität führen können, entgegenzuwirken.

Die Melanocyten in der Epidermis sind hier von großer Bedeutung, da sie über den Schritt der Melanosomen-Bildung das Pigment Melanin produzieren. Das Pigment dient dem Schutz des Organismus vor ultraviolettem Licht. Wiederholte Exposition der Haut gegenüber UV-Licht induziert eine Pigmentierung und Verdickung der Epidermis, was die Toleranz gegenüber Sonnenlicht erhöht.

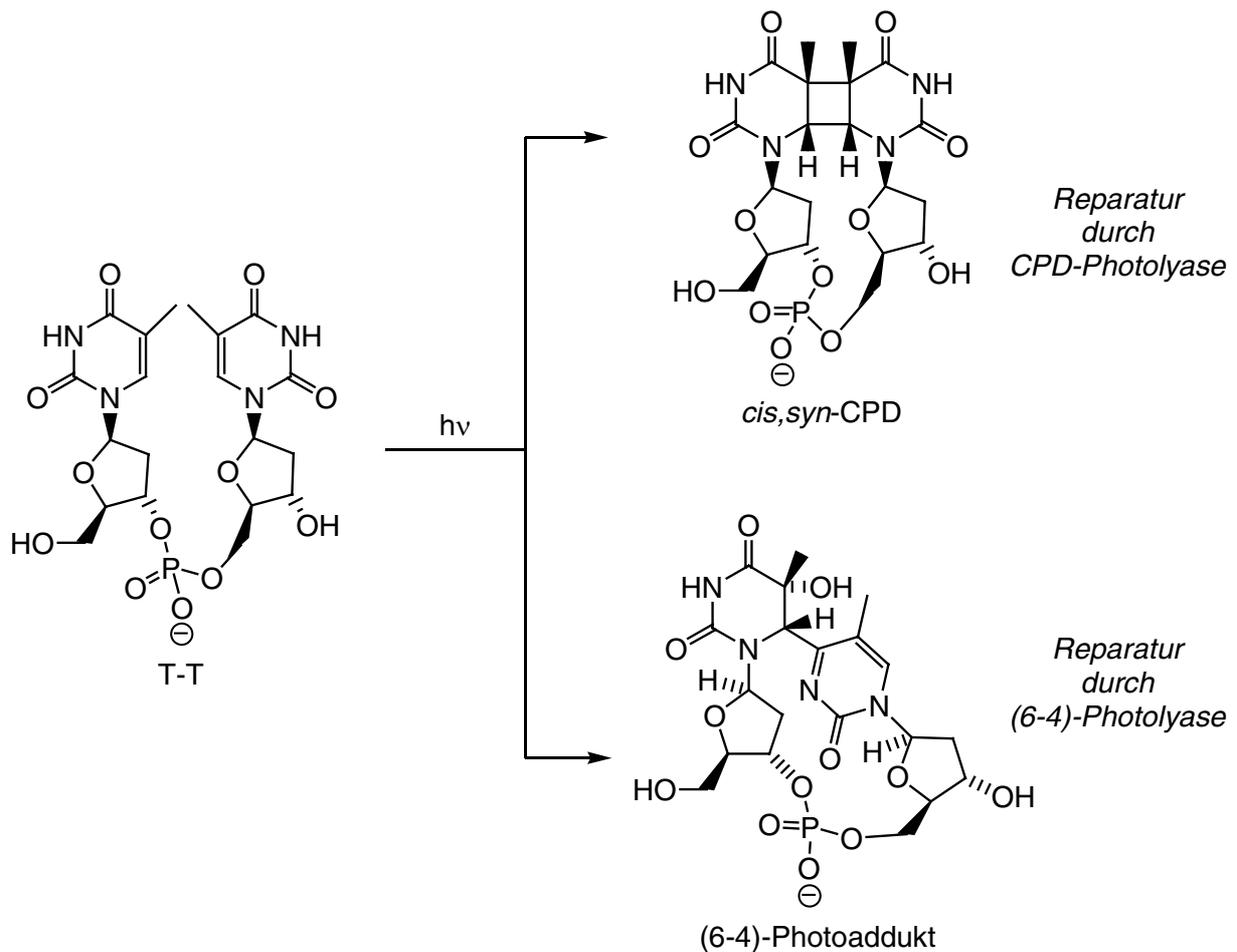
### 1.3 Photoschäden

Der Schlüsselbeweis für den Zusammenhang zwischen Photoschäden in der DNA und der Entstehung verschiedenster Arten von Hautkrebs wurde durch Studien der genetischen Krankheit *Xeroderma pigmentosum* (XP) erhalten.<sup>[4, 12, 13]</sup>

Diese autosomal rezessive Krankheit weist einen pleiotropen Phänotyp auf und manifestiert sich in einer extremen Sensitivität gegen Sonnenlicht und einer mehr als tausendfach erhöhten Prädisposition für Hautkrebs. Es konnte gezeigt werden, dass diese Symptome mit einem Defekt im Reparaturpfad für UV-induzierte DNA-Läsionen korreliert werden können. Die häufigsten Photoschäden in der DNA, die *cis,syn*-Dimere, können von XP-betroffenen Zellen nicht durch Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entfernt werden.

Die ultraviolette Strahlung des Sonnenlichts verursacht die Generierung von zahlreichen DNA-Photoschäden mit mutagenen, carcinogenen oder sogar letalen Folgen. Durch Absorption von UV-Licht wird eine kovalente Bindungsformation zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen in einer  $[2\pi+2\pi]$ -Cycloaddition katalysiert und bildet als den am zahlreichsten auftretenden DNA-Schaden das *cis,syn*-Cyclobutan-Thymidindimer (CPD) (Schema 1).<sup>[10, 14]</sup>

Etwa zehn mal seltener als zur Bildung der Cyclobutandimeren kommt es zur Entstehung des Pyrimidin-Pyrimidon (6-4)-Photoprodukts ((6-4)-Photoaddukt, siehe Schema 1).



Schema 1. UV-induzierte DNA-Photoprodukte am Beispiel von zwei benachbarten Thymidinen.

Das bei der Reaktion von zwei Thymidinen entstehende Hauptprodukt (CPD) ist in Schema 1 dargestellt. Da Thymin die niedrigste Triplet-Energie besitzt, stellt es die Energiesenke beim Energietransfer entlang der DNA-Doppelhelix dar.<sup>[15]</sup> Der gleiche Typ von Photoprodukten kann aber auch zwischen jeder anderen Art von benachbarten Pyrimidinbasen (T-C, C-C) gebildet werden.<sup>[16]</sup> Die CPD-Schäden sind in den meisten Fällen *cis,syn*-konfiguriert. Die entsprechenden *trans,syn*-konfigurierten Pyrimidindimere kommen etwa 50 mal seltener vor. Während nur das *cis,syn*-Isomer in Doppelstrang-DNA gebildet wird, wird das *trans,syn*-Isomer zu ca. 10% Häufigkeit in Einzelstrang-DNA gebildet.<sup>[16]</sup>

### 1.4 DNA-Reparatur

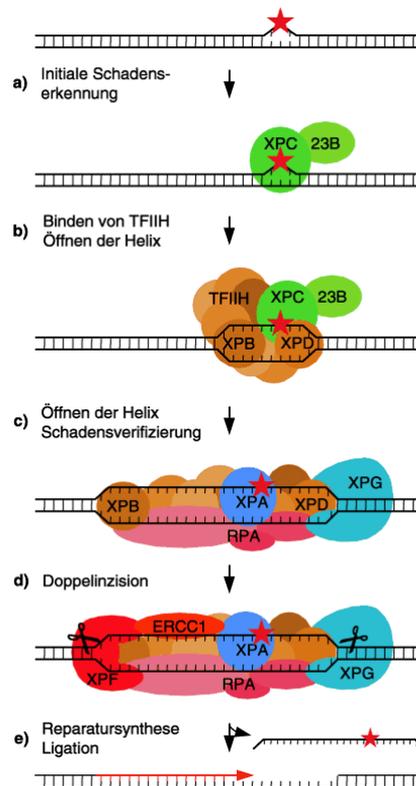
Die Erhaltung der genomischen Integrität ist für alle Organismen von außerordentlicher Bedeutung. Schätzungen haben ergeben, dass in einer einzelnen menschlichen Zelle etwa  $10^4$ - $10^6$  DNA-Schädigungsereignisse pro Tag stattfinden.<sup>[17]</sup> Modifikationen in der DNA können zu Mutationen führen, die die Codierungssequenz der DNA verändern und Krebs auslösen können. Zellen haben daher Prozesse entwickelt, um diesen negativen Auswirkungen einer beschädigten DNA effizient entgegenzuwirken. Es existieren zahlreiche effektiv arbeitende Reparaturpfade, die Läsionen in der DNA beheben können.

#### Basen-Exzisionsreparatur (BER)

Hierbei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem mehrere Proteine eine Rolle spielen. Die geschädigte Base wird durch Hydrolyse der *N*-glycosidischen Bindung, zwischen Zucker und Base, katalysiert durch eine AP-Endonuclease, herausgeschnitten. Anschließend wird die Lücke durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt und mittels einer Ligase die letzte Phosphordiesterbindung wieder geschlossen.

#### Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Bei sterisch anspruchsvollen bzw. stark helixverzerrenden Schäden greift die Nukleotid-Exzisionsreparatur ein. Sowohl Thymidindimere als auch das (6-4)-Photoaddukt werden so in höheren Organismen repariert. Bei dieser Art der Reparatur wird der veränderte Abschnitt im geschädigten DNA-Strang durch DNA-Reparatur-Endonucleasen erkannt und entfernt. Sie hydrolysieren dabei zwei Phosphordiesterbindungen in einiger Entfernung vor und nach dem geschädigten Nukleotid und schaffen so einen einzelsträngigen DNA-Abschnitt. Anschließend wird, wie bei der DNA-Basen-Exzisionsreparatur, die Lücke erst durch DNA-Polymerasen aufgefüllt und die Phosphordiesterbindung durch Ligasen geschlossen.



Schema 2. Nukleotid-Exzisionsreparatur. NER umfasst die Erkennung einer DNA-Läsion, die Bildung einer Blase, Doppelinzision des beschädigten DNA-Stranges in 5'- und 3'-Position zur Läsion, das Ausschneiden eines Oligonukleotids aus 24 bis 32 Nukleotiden sowie die Reparatursynthese und Ligation der resultierenden Lücke.

## Rekombinationsreparatur

Die Rekombinationsreparatur wurde bei Untersuchungen von Bakterien-Mutanten ohne Photolyase und ohne Exzisions-Reparatur entdeckt. Solche Mutanten sind nicht ganz hilflos dem UV-Licht ausgesetzt, aber die DNA-Replikation ist schwer gestört. Die Replikationsprodukte enthalten lange Einzelstrang-Abschnitte. Diese Lücken in der DNA regen die homologe Rekombination an. Aus mehreren Rekombinationsakten gehen schließlich ungeschädigte Genome hervor. Ein Weiterleben der Bakterien-Zelle wird so ermöglicht.

### **Postreplikative oder *Mismatch*-Reparatur**

Die für die *Mismatch*-Reparatur verantwortlichen Enzyme erkennen eine Basenfehlpaarung und können bis zu tausend Basen entfernen. Die Lücke wird durch Neusynthese geschlossen: Die DNA-Polymerase III heftet Nukleotide an das freie 3'-OH-Ende, bis eine vollständige DNA-Doppelhelix entstanden ist. Dann wird die letzte Phosphordiester-Bindung durch die Ligase geschlossen. Das Interessante bei der *Mismatch*-Reparatur ist der Umstand, dass die Enzyme aufgrund des Methylierungsgrades der Basen zwischen Eltern- und Tochterstrang unterscheiden können und so ausschließlich der neu synthetisierte Strang repariert wird.

### **Photoreaktivierung**

Die Photoreaktivierung wird auch direkte Reparatur genannt, da der durch UV-Strahlung induzierte Schaden mit Hilfe eines einzigen Enzyms, der DNA-Photolyase, erkannt und in einem Licht- und Coenzym-abhängigen Reparaturmechanismus entfernt wird. Diese Form der Reparatur ist das Hauptthema der in dieser Dissertation verfolgten Forschung, daher wird ihr ein eigener Abschnitt gewidmet.

## 1.5 DNA-Photolyasen

### 1.5.1 Überblick

Während in Säugern Pyrimidindimere ausschließlich durch NER repariert werden, greifen niedrigere Eukaryonten, Pflanzen, Bakterien und Viren auch auf BER und Photolyasen zurück, um die Dimere wieder in Monopyrimidine zu spalten.<sup>[17]</sup>

Die häufigsten durch UV-Licht induzierten Schäden in DNA sind Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD), die zweithäufigsten Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukte (Schema 1). Beide Schäden werden durch Photolyasen mit ähnlichen Aminosäuresequenzen repariert. Die Photolyasen sind spezifisch für jeweils nur einen Typ von Schaden, man unterscheidet demnach CPD-Photolyasen und (6-4)-Photolyasen. In dieser Arbeit wird nachfolgend, soweit nicht anders erwähnt, immer die CPD-Photolyase beschrieben.

DNA-Photolyasen sind Pyrimidindimer-Reparaturenzyme, die Sonnenlicht als Energiequelle nutzen. Die Photoreaktivierung dient hierbei der Umkehr der schädigenden Effekte, wie verzögertes Wachstum, Mutagenese oder letaler Wirkung, von fernem UV-Licht (200-300 nm) auf Organismen durch gleichzeitige oder nachfolgende Bestrahlung mit blauem Licht (350-450 nm).<sup>[16]</sup>

CPD-Photolyasen werden in zwei Gruppen eingeteilt. Photolyasen Typ I (*mikrobiell*) werden in vielen Mikroorganismen gefunden, während Photolyasen Typ II (*tierisch*) in höheren Eukaryonten auftreten.<sup>[16]</sup> Die Unterteilung wurde gewählt, da Pflanzen- und Tier-Photolyasen im allgemeinen einen limitierten Grad an Sequenzhomologie gegenüber mikrobiellen Photolyasen aufweisen.

## 1.5.2 Struktur

Photolyasen sind monomere Proteine mit 450-550 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 55-56 kDa.<sup>[18, 19]</sup> Sie enthalten in stöchiometrischen Mengen zwei nicht kovalent gebundene chromophore Cofaktoren.<sup>[20]</sup> Einer dieser Cofaktoren ist immer Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), während der zweite entweder 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-desazariboflavin (8-HDF) oder 5,10-Methenyltetrahydrofolat (MTHF) ist (Abb. 3).<sup>[16]</sup>

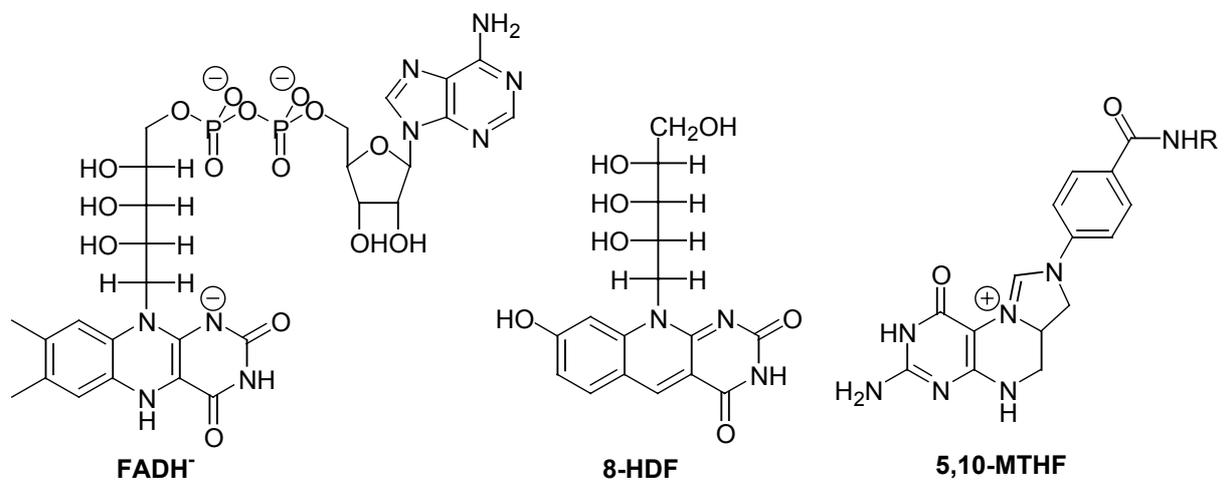


Abb. 3. Strukturen der drei Cofaktoren von DNA-Photolyasen (R = Glutamat).

Ausgehend von den unterschiedlichen zweiten Cofaktoren wurden die Enzyme in zwei Klassen unterteilt, in die Desazaflavin-Klasse- und die Folat-Klasse-Photolyasen. Die Photolyase des Cyanobakteriums *Anacystis nidulans* gehört zur Desazaflavin-Klasse, während die *E. coli*-Photolyase ein Stellvertreter der Folat-Klasse ist.

Tabelle 1 zeigt die Aufteilung einiger DNA-Photolyasen in drei Reiche.<sup>[16, 21-23]</sup>

		CPD- Photolyase	Klasse (2. Cofaktor)	(6-4)- Photolyase
Prokaryonten	<i>E. coli</i>	+	Folat	–
	<i>A. nidulans</i>	+	DFI	–
	<i>B. subtilis</i>	–	–	–
	<i>V. cholerae</i>	+	Folat	–
Eukaryonten	<i>A. thaliana</i>	+	DFI*	+
	<i>D. melanogaster</i>	+	Folat	+
	<i>C. elegans</i>	–	–	–
	<i>H. sapiens</i>	–	–	–
Archaeen	<i>M. thermo- autotrophicum</i>	+	DFI	–
	<i>T. thermophilus</i>	+	DFI*	–

Tabelle 1. Übersicht einiger DNA-Photolyasen. Einteilung der CPD-Photolyasen (entsprechend dem 2. Cofaktor) in Desazaflavin (DFI)- und Folat-Klasse, (\*: vermutlich).

### 1.5.2.1 Apoenzym (Primärstruktur)

Die Aminosäuresequenzen von rund 50 Photolyasen sind heutzutage bekannt und zeigen variierende Homologiegrade von Bereichen zwischen 15% bis ca. 70% Sequenzidentität.<sup>[16]</sup>

Den höchsten Grad an Homologie unter allen Photolyasen beider Klassen, der Desazaflavin- und Folat-Klasse, weisen die C-terminalen 150 Aminosäuren auf. Folglich wurde dieser Region die Funktion der FAD-Bindungsdomäne zugesprochen, was später durch kristallographische Daten bestätigt werden konnte.<sup>[24, 25]</sup>

Die N-terminale Region ist weniger konserviert, und es besteht im allgemeinen eine höhere Sequenzsimilarität innerhalb einer Klasse als zwischen Photolyasen, die verschiedenen Klassen angehören.<sup>[21]</sup> In der Amino-terminalen Hälfte wurde die Lokalisation des zweiten Chromophors vermutet.

Ein Protein mit hoher Sequenzhomologie zu den Photolyasen, aber ohne Vorhandensein jeglicher Photolyase-Aktivität wurde in Pflanzen, Tieren und einigen Bakterien gefunden. Diese Cryptochrome regulieren einige der Blaulicht-abhängigen Prozesse in Pflanzen wie Wachstum und Entwicklung und synchronisieren den circadianen Rhythmus in Tieren.<sup>[16, 26]</sup>

Photolyasen zeigen keine offensichtliche Sequenzhomologie zu anderen Flavin-bindenden Proteinen, z. B. zu Flavoprotein-Oxidoreduktasen.<sup>[16, 21]</sup> Dieses Fehlen von Homologie kann wie folgt erklärt werden: Photolyasen binden Flavin sowohl im Grundzustand als auch im angeregten Zustand, während im Gegensatz dazu Oxidoreduktasen nur mit einem Flavin im Grundzustand interagieren.<sup>[21]</sup> Da der angeregte Zustand eines Moleküls in einem gewissen Grad eine unterschiedliche Spezies im Vergleich zum Grundzustand darstellt, ist zu erwarten, dass ein Protein, welches Grund- und angeregte Zustände des Cofaktors bindet, nicht die gleiche Geometrie des aktiven Zentrums besitzt, wie ein Enzym, das nur vom Grundzustand des Cofaktors aus operiert.

Sequenzvergleiche innerhalb einiger Vertreter der Photolyase/Cryptochrom-Familie heben die hohe Konservierung der C-terminalen Region hervor.<sup>[16]</sup>

### 1.5.2.2 Cofaktoren

#### a) Flavin

FAD ist die meistverbreitete Form des Flavins, die in Enzymen angetroffen wird. FAD ist auch in den Photolyasen der essentielle Cofaktor und hat die Aufgabe der Katalyse. Das Coenzym ist ferner für die spezifische Bindung zu geschädigter DNA verantwortlich. In Rekonstitutions-Experimenten von Photolyasen war kein Ersatz des FAD durch Riboflavin oder FMN möglich.<sup>[27]</sup> Die aktive Form des Flavins in der Photolyase ist die zweielektronen-reduzierte anionische Form  $\text{FADH}^-$ . Mit

Ausnahme der *S. cerevisiae*-Photolyase wird der Flavin-Cofaktor aller charakterisierten Photolyasen während der Aufreinigung zur blauen neutralen Radikalform  $\text{FADH}^\bullet$  (oder auch zum  $\text{FAD}_{ox}$ ) oxidiert.<sup>[16]</sup>  $\text{FADH}^\bullet$  als katalytisch inerte Form des Flavins im inaktiven Zustand der Photolyase muss *in vivo* zum  $\text{FADH}^-$  reduziert werden, um das Enzym zu aktivieren. Man vermutet, dass die Überführung in die aktive Form des Flavins durch Photoreduktion erreicht wird.<sup>[28-31]</sup>

#### b) Desazaflavin

Der zweite Chromophor der Desazaflavin-Klasse-Photolyasen ist 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-desazariboflavin (8-HDF), auch  $F_0$  genannt. 8-HDF fungiert als Photoantenne und ist nach heutigem Stand des Wissens weder für die Katalyse notwendig, noch hat es einen Effekt auf spezifische Enzym-Substrat-Bindung. Unter limitierenden Lichtkonditionen jedoch kann der zweite Chromophor die Reparaturrate eines DNA-Schadens um das 10-100-fache steigern, abhängig von der zur Katalyse eingestrahlten Wellenlänge.<sup>[16]</sup> Der Grund hierfür liegt darin, dass das 8-HDF einen wesentlich höheren Extinktionskoeffizienten und ein Absorptionsmaximum bei höheren Wellenlängen als das  $\text{FADH}^-$  aufweist.

#### c) MTHF

Die Mehrheit der Photolyasen besitzen ein Pterin als Photoantenne. In den Photolyasen der Folat-Klasse wie der *E. coli*-Photolyase sind sie als 5,10-Methenyltetrahydrofolat präsent, wobei die Zahl der Glutamate zwischen drei bis sechs schwankt.<sup>[16]</sup>

#### 1.5.2.3 Kristallstruktur

Die Kristallstrukturen von drei Photolyasen wurden bis dato bestimmt: *E. coli*,<sup>[24]</sup> *A. nidulans*<sup>[25]</sup> und *T. thermophilus* (ohne 8-HDF).<sup>[32]</sup> Hierbei gehört die erste Photolyase zur Folat-Klasse, die zweite zur Desazaflavin-Klasse und *T. thermophilus* vermutlich auch zur letzteren Klasse.

Sie bestehen aus zwei Domänen, einer N-terminalen  $\alpha/\beta$ -Domäne und einer C-terminalen  $\alpha$ -helikalen Domäne, die beide über einen langen *Loop* miteinander verbunden sind.<sup>[16]</sup>

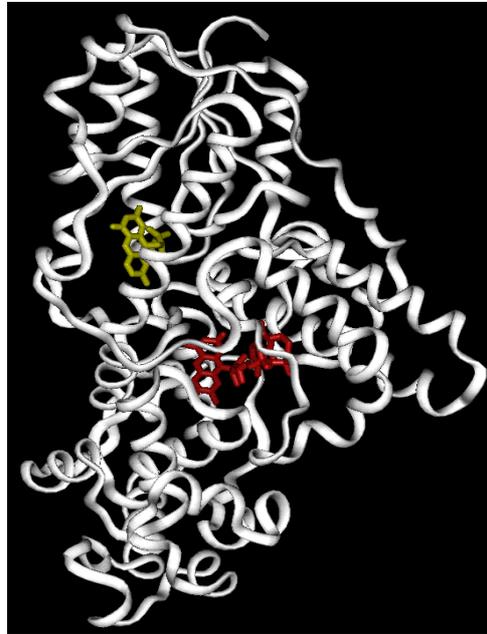


Abb. 4. Kristallstruktur der DNA-Photolyase aus *A. nidulans*; gelb: 8-HDF, rot: FAD.

### a) FAD

Der FAD-Cofaktor befindet sich tief innerhalb der  $\alpha$ -helikalen Domäne und weist eine ungewöhnliche U-förmige Konformation auf, in der die Isoalloxazin- und Adenin-Ringe eng beieinander liegen. Das Flavon ist über die flache Oberfläche der  $\alpha$ -helikalen Domäne durch eine Öffnung in der Mitte dieser Domäne zugänglich.<sup>[16]</sup> Diese ist zu klein, um eine Diffusion des Flavins in und aus dem Enzym zu erlauben, ermöglicht aber eine leichte Zugänglichkeit von Sauerstoff. Diese Tatsache erklärt die relativ leichte Oxidation von  $\text{FADH}^-$  zu  $\text{FADH}^\bullet$  in den meisten Photolyasen. Von spezieller Bedeutung ist, dass das Loch die richtigen Dimensionen und Polarität besitzt, um den Zugang eines Thymidindimers in den van der Waals-Kontakt-Abstand des Isoalloxazin-Rings des FAD zu erlauben. Hierbei wird durch die positiv geladene Grube eine Bindung des DNA-Rückgrats und dann ein Herausdrehen des Dimers in die aktive Tasche ermöglicht.

## b) Photoantenne

Das 8-HDF ist in einer flachen Spalte zwischen den beiden Domänen, der N-terminalen  $\alpha/\beta$ - und der C-terminalen  $\alpha$ -helikalen Domäne, lokalisiert. Die MTHF-Photoantenne befindet sich an einer analogen Stelle, ragt jedoch teilweise aus der Oberfläche des Enzyms heraus. Die Tatsache, dass das gesamte Desazaflavin innerhalb der Spalte liegt, liefert eine Erklärung für die festere Bindung des 8-HDF in Desazaflavin-Klasse-Photolyasen im Gegensatz zur relativ schwachen Assoziation des MTHF in Folat-Klasse-Enzymen. In allen gut charakterisierten Desazaflavin-Klasse-Enzymen liegt das 8-HDF fest gebunden zum Apoenzym vor und ist in stöchiometrischen Mengen vorhanden, das MTHF hingegen geht bei Aufreinigung des Proteins zum Teil verloren. Die Lokalisierung der beiden Photoantennen im Protein ist in Abbildung 5 anschaulich wiedergegeben.<sup>[32]</sup> Hier werden die Faltung der Photolyasen von *E. coli* (blau), *A. nidulans* (grün) und *T. thermophilus* (rot) und die Cofaktoren übereinandergelegt dargestellt. Die eingekreisten Bereiche zeigen hierbei zusätzlich die extrem verkürzten  $\alpha$ -Helices und die damit kompaktere Struktur der *T. thermophilus*-Photolyase im Vergleich zu den beiden anderen. Die relativ unflexible Struktur kann als Ursache für die thermostabilen Eigenschaften dieser Photolyase angesehen werden.

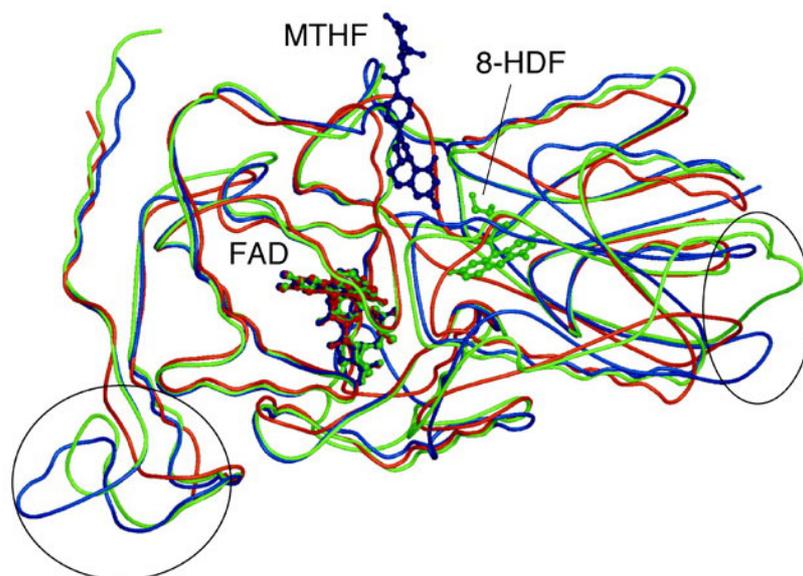


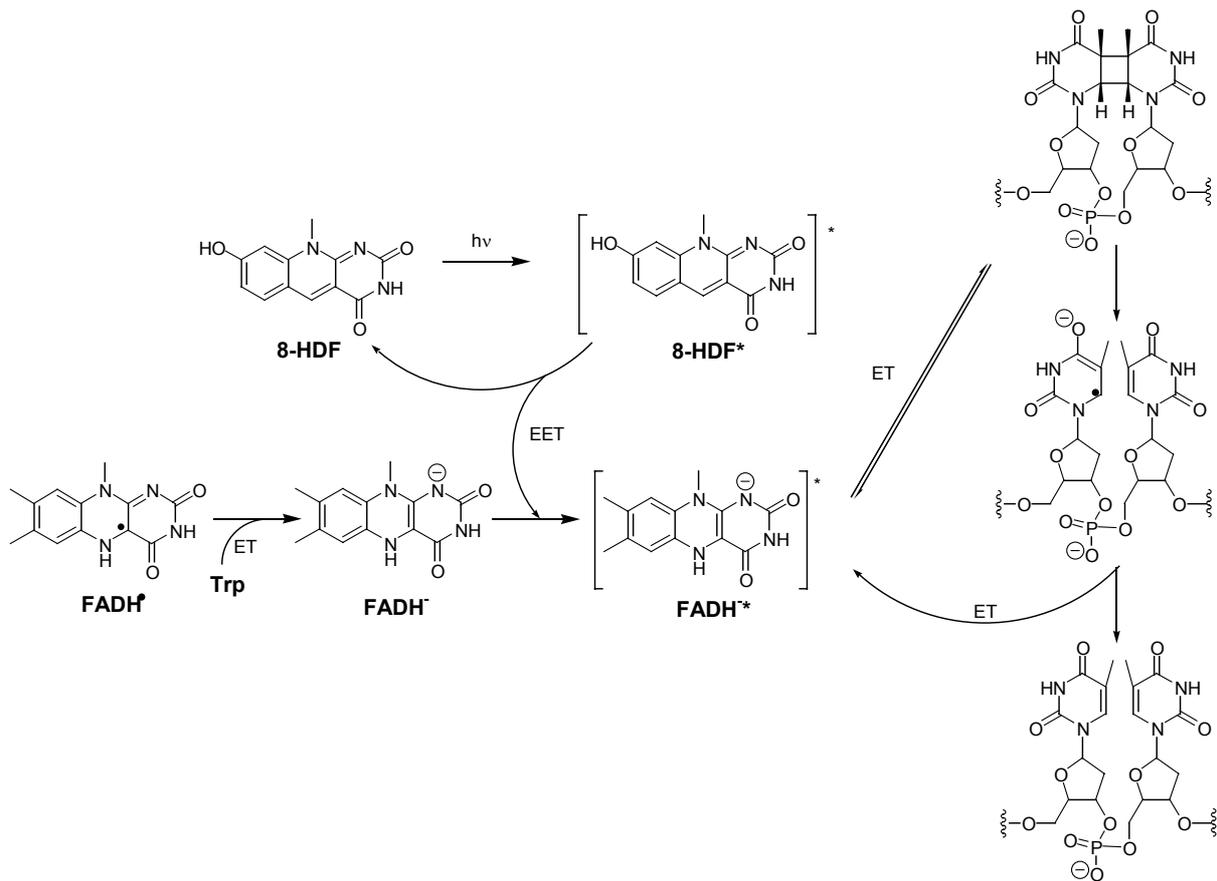
Abb. 5. Vergleich der Kristallstruktur ( $\alpha$ -Faltung) der *E. coli*- (blau), *A. nidulans*- (grün) und *T. thermophilus*-Photolyase (rot) und Lage der Photoantennen.

In der *E. coli*-Photolyase beträgt der Zentrum-zu-Zentrum-Abstand zwischen dem FAD und dem MTHF 16.8 Å und die Ebenen der Chromophore stehen nahezu senkrecht zueinander. Die beiden Chromophore in der *A. nidulans*-Photolyase sind 17.5 Å voneinander entfernt, zwischen ihnen besteht jedoch eine für den Energietransfer günstigere Orientierung.

### 1.5.3 Reparaturmechanismus

Der gesamte Reaktionsverlauf der Pyrimidindimer-Reparatur durch Photolyasen kann wie folgt zusammengefasst werden:

Das Enzym bindet einen CPD-Schaden in der DNA in einem Schritt, der völlig lichtunabhängig ist. Anschließend wird das Dimer, wie bis heute vermutet, aus der Doppelhelix heraus in die aktive Tasche gedreht (Dinukleotid-*flipping*-Modell) und bildet einen stabilen Enzym/Substrat-Komplex.<sup>[16, 21]</sup> Der nächste Schritt, die Bildung des Enzym/Produkt-Komplexes, ist lichtabhängig. Hierbei absorbiert der zweite Cofaktor, die Photoantenne, ein nahes UV-/Blau-Licht-Photon (350-450 nm) und transferiert die Anregungsenergie auf den FADH<sup>-</sup>-Cofaktor, der anschließend ein Elektron auf das Dimer überträgt. Die 5-5- und 6-6-Bindungen des Cyclobutanrings werden gespalten und generieren ein Pyrimidin und ein Pyrimidin<sup>•-</sup> Radikalanion. Letzteres kann ein Elektron zurück auf das Flavinradikal übertragen, um FADH<sup>-</sup> zu regenerieren (Schema 3). Anschließend dissoziiert das Produkt vom Enzym ab.



Schema 3. Reaktionsmechanismus von DNA-Photolyasen der Desazaflavinklasse.

EET = Anregungsenergietransfer, ET = Elektronentransfer.

### 1.5.3.1 Schadenserkennung/Bindung

Die Photolyase ist ein strukturspezifisches DNA-Bindungsprotein. Sie erkennt hierbei an der Bindungsstelle spezifisch die Struktur des DNA-Rückgrats und im besonderen die chemische Struktur des Photoschadens selbst.<sup>[16]</sup>

Dieser Bindungsmodus steht im Kontrast zu sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen, deren Spezifität hauptsächlich von der Natur der Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren in der großen und kleinen Furche des Duplex bestimmt wird.

Die Bindungsaffinität der Photolyasen ist jedoch absolut sequenzunabhängig.<sup>[33]</sup>

Photolyasen binden den Pyrimidindimer-Schaden mit nahezu der gleichen Affinität sowohl im Einzelstrang als auch in doppelsträngiger DNA.<sup>[34, 35]</sup> Die spezifische Bindungskonstante zu einem Thymidindimer in DNA beträgt  $K_s = 10^{-9}$  M, während die unspezifische für ungeschädigte DNA bei  $K_{NS} \approx 10^{-4}$  M liegt.

Die Affinität und Spezifität der Photolyase wird durch drei strukturelle Merkmale bestimmt:

- Die positiv geladene Furche in der Oberfläche der  $\alpha$ -helikalen Domäne
- Ein Loch im Zentrum dieser Furche (aktive Stelle)
- Der FAD-Cofaktor, der sich am Grund dieses Lochs befindet

An der positiv geladenen Furche kann sich die negative DNA anlagern. Das Loch weist exakt die richtigen Dimensionen für die Aufnahme eines Pyrimidindimers auf. Die Aminosäureseitenketten an der Innenseite des Lochs sind auf der einen Seite hydrophob und auf der anderen polar. Diese asymmetrische Polarität deckt sich mit der eines Pyrimidindimers, in dem der Cyclobutanring hydrophob ist und die gegenüberliegenden Seiten des Dimers Sauerstoff- und Stickstoffatome für die Bildung von Wasserstoffbrücken besitzen.

Durch Punktmutations-Studien wurden verschiedene basische Aminosäuren, welche die positiv geladene Bindungstasche bilden, durch neutrale ersetzt. Dabei zeigte sich, dass hierdurch die spezifische Bindungsaffinität stärker herabgesetzt wurde als die nichtspezifische. Dies weist daraufhin, dass der geschädigte, in seiner Struktur veränderte DNA-Strang, einen wichtigen Beitrag zur Spezifität leistet.<sup>[36, 37]</sup>

Mutationen von aromatischen oder polaren Seitenketten, die die Seitenwände der Öffnung auskleiden, reduzieren die Affinität des Enzyms zum Pyrimidindimer drastisch.<sup>[37]</sup> Besonders eine Mutation von Trp277 in der *E. coli*-Photolyase in eine nichtaromatische Seitenkette scheint eine beträchtliche Rolle bei der spezifischen Bindung zu spielen.<sup>[38]</sup>

Zusätzlich zur Struktur des DNA-Rückgrats und der des CPD-Schadens wird die Bindung durch die Art der Pentose (DNA/RNA), durch die Basenzusammensetzung des Dimers und durch die Stereochemie des CPD beeinflusst.

- Die Photolyase bindet ein rU=rU in RNA mit  $10^5$ -fach niedriger Affinität als ein dU=dU in DNA, was durch einen höheren Energieaufwand des Einbringens der 2'-OH-Gruppe in die Bindungstasche erklärt werden kann.<sup>[39]</sup>
- Weiterhin bindet das Enzym nur das *cis,syn*-Isomer des CPD, welches das einzige ist, das in doppelsträngiger DNA gebildet wird. Das *trans,syn*-Isomer, das mit geringer Häufigkeit in Einzelstrang-DNA gebildet wird, wird nicht gebunden.
- Im Hinblick auf den Effekt der Basenzusammensetzung des Dimers auf die Photolyasen-Bindungsaffinität wurde folgende Hierarchie gefunden: T=T > T=U > U=U > C=C, mit 10-fach höherer Affinität von T=T im Verhältnis zu C=C.<sup>[39]</sup> Diese Reihenfolge ließ folgenden Vorschlag in Bezug auf die Bindung durch die Photolyase zu: Das Enzym kontaktiert die Basen an C2=O (allen Pyrimidinen gemein) und C4=O (in Cytosin ersetzt durch NH<sub>2</sub>) über spezifische Wasserstoffbrücken-Donoren. T und U besitzen beide die C4=O-Gruppe, was die höhere Affinität zu Photodimeren dieser Zusammensetzung erklärt. Die höhere Affinität von T enthaltenden Dimeren gegenüber U enthaltenden Dimeren kann durch den Beitrag zur Bindung der C5-CH<sub>3</sub>-Gruppe über van der Waals- oder hydrophobe Wechselwirkungen erklärt werden.<sup>[39]</sup> Der Verlust einer Wasserstoffbrücke durch den Ersatz eines Wasserstoffbrücken-Akzeptors durch einen Donor am C4-Atom könnte letztendlich die niedrigere Enzymaffinität zu Cytosin enthaltenden Dimeren erklären.

Bis heute konnte nur die Vermutung aufgestellt werden, dass der Dimerschaden für die Reparatur aus dem DNA-Doppelstrang heraus in die aktive Tasche gedreht wird (Dinukleotid-*flipping*-Mechanismus). Diese Theorie wurde unter anderem auf die Co-Kristallstruktur der Photolyase von *T. thermophilus* mit Thymin gestützt.<sup>[32]</sup> In dieser Struktur liegt ein einzelnes Thymin in der Bindungstasche, ist im van der Waals-

Kontakt mit dem Isoalloxazin-Ring und liegt in einem "Sandwich" zwischen zwei Tryptophanen. Des weiteren erhärteten Studien mit alkylierenden Reagenzien (*chemical footprinting*) bei *E. coli*-, *S. cerevisiae*- und *M. thermoautotrophicum*-Photolyasen die Theorie des Dinukleotid-*flipping*-Modells.<sup>[36, 40, 41]</sup> Gegen diese Theorie spricht die Enzym-Substrat-Kristallstruktur der T4 Endonuklease V, einem DNA-Reparatur-enzym des T4-Bakteriophagen. Hier ist nicht der Thymidindimer-Schaden, sondern die zum 5'-T komplementäre Adenin-Base aus dem Doppelstrang herausgedreht.<sup>[42]</sup>

### 1.5.3.2 Photoreaktivierung

Photoreaktivierung ist die Umkehr der durch fernes UV-Licht (200-300 nm) generierten Photodimer-Schäden in die entsprechenden Monomere durch die Katalyse eines photoreaktivierenden Enzyms mit Hilfe von nahem UV-/blauem Licht (350-450 nm) als Energiequelle.

Das photoreaktivierende Licht (350-450 nm) kann keine angeregten Zustände des Pyrimidindimers generieren, da eine Absorption nur bei Wellenlängen  $300 \text{ nm} > \lambda > 250 \text{ nm}$  stattfindet. Somit ist eine photochemische  $[2\pi+2\pi]$ -Cycloreversion nicht möglich. Zahlreiche Untersuchungen führten zum heute generell anerkannten Mechanismus der Photoreaktivierung, in dem die photoangeregte Photolyase ein Elektron auf das Dimer überträgt und das resultierende Radikalanion in zwei Pyrimidine zerfällt.<sup>[43, 44]</sup>

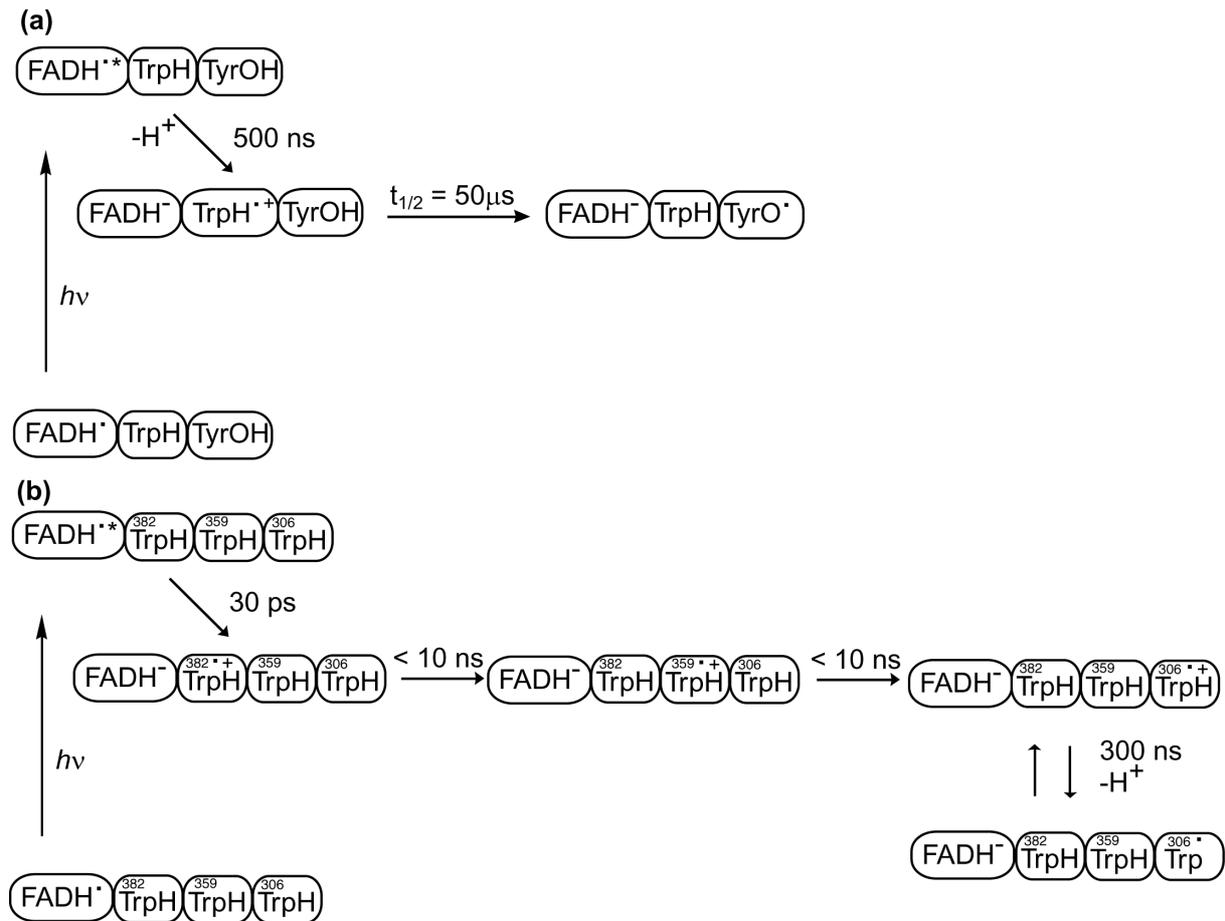
#### a) Photoaktivierung

Wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.5.2.2), wurden Photolyasen mit dem Flavin-Cofaktor in seiner semireduzierten Form, d. h. in der neutralen Radikalform  $\text{FADH}^\bullet$  isoliert. Die aktive Form des Enzyms benötigt jedoch den vollständig reduzierten, deprotonierten Cofaktor  $\text{FADH}^-$ . Die Photoaktivierung ist die lichtinduzierte Umwandlung des Flavin-Radikals zum vollständig reduzierten Flavin *in vivo*. Diese Ein-elektronen-Photoreduktion wurde von *Mathis* und *Brettel et al.* durch zeitaufgelöste UV-Vis-Absorptions- und EPR-Spektroskopie ausführlich untersucht.<sup>[28-30]</sup>

Dazu wurde die Photolyase von *A. nidulans* (ohne zweiten Cofaktor) mit einem 7 ns-Laserpuls bestrahlt, welcher das  $\text{FADH}^\bullet$  anregte. Es folgte ein schneller Elektronentransfer eines Nachbar-Tryptophans zum angeregten  $\text{FADH}^{\bullet*}$  (Schema 4 (a)). Dieser Elektronentransfer lieferte die Bildung eines vollständig reduzierten  $\text{FADH}^-$  und eines Tryptophanyl-Radikals in weniger als 500 ns. Überraschenderweise transferierte daraufhin ein Tyrosin ein Elektron zum Tryptophanyl-Radikal unter Bildung eines neutralen Tyrosyl-Radikals nach Deprotonierung ( $\text{TyrO}^\bullet$ ) mit einer Halbwertszeit von 50  $\mu\text{s}$ . Das Tyrosyl-Radikal ( $\text{TyrO}^\bullet$ ) wird daraufhin in einer bimolekularen Reaktion durch einen externen Elektronendonator reduziert. Ein weiterer Hinweis auf die Entstehung des Tyrosyl-Radikals ( $\text{TyrO}^\bullet$ ) lieferte die zeitaufgelöste EPR-Spektroskopie.<sup>[28]</sup>

Die Photoaktivierung in Photolyasen der Folatklasse involviert mehrere Tryptophan-Einheiten (Schema 4 (b)). Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen ergaben eine mehrstufige Radikaltransfer-Kaskade.<sup>[30]</sup> Ein erstes Tryptophanyl-Radikal ( $\text{TrpH}^{\bullet+}_{382}$ ) wurde 30 ps nach Anregung mit einem Laserpuls beobachtet. Darauf folgten zwei schnelle (10 ps) Elektronentransfers vom  $\text{TrpH}_{359}$  zum  $\text{TrpH}_{382}$  und vom  $\text{TrpH}_{306}$  zum  $\text{TrpH}_{359}$ . Durch eine Deprotonierung des  $\text{Trp}_{306}\text{H}^{\bullet+}$  zum  $\text{Trp}_{306}^\bullet$  innerhalb 300 ns wird der Elektronentransfer bei  $\text{Trp}_{306}$ , welches sich nah an der Oberfläche des Enzyms befindet, gestoppt. Hier kommt es dann zur finalen Reduktion des  $\text{Trp}_{306}^\bullet$  durch ein externes Reduktionsmittel. Die Abstände zwischen jedem Tryptophan "Schritt" betragen 4.2 Å, 5.2 Å und 3.9 Å; sie sind optimal für einen Elektronentransfer geeignet. Die essentielle Rolle von  $\text{Trp}_{306}$  wurde durch ortsspezifische Mutagenese bestätigt. Dabei wurde Tryptophan 306 durch Alanin ausgetauscht, wodurch die Fähigkeit der *E. coli*-Photolyase, den  $\text{FADH}^\bullet$ -Cofaktor zu reduzieren, vollständig gehemmt war. Damit ist bewiesen, dass Photolyasen den Elektronentransfer über die Aminosäure-Seitenketten nutzen, um das Flavin zu photoreduzieren.

## 1. Einleitung



Schema 4. Radikaltransfer-Kaskade der Photoreduktion des Flavin-Cofaktors in Photolyasen vom  $\text{FADH}^\bullet$ -Radikal zum vollständig reduzierten  $\text{FADH}^-$ . (a) *A. nidulans*, (b) *E. coli*.

### b) Energietransfer zwischen den Cofaktoren

Der angeregte Singulett-Zustand des Flavin-Cofaktors  $\text{FADH}^\bullet$  wird direkt durch Absorption eines Photons oder häufiger durch Resonanzenergietransfer vom zweiten Chromophor generiert.<sup>[31]</sup> Bedingt durch die etwa 5-10 mal höheren Extinktionskoeffizienten der zweiten Chromophore (8-HDF oder MTHF) in Relation zum ersten Cofaktor ( $\text{FADH}^-$ ) wird das photoreaktivierende Licht (350-500 nm) zum größten Teil vom zweiten Cofaktor absorbiert. Energietransfer durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung nach Förster bringt schließlich den ersten Cofaktor in den angeregten Singulettzustand.<sup>[45]</sup> Dieser Energietransfer ist stark abstandsabhängig, wobei die Rate proportional zu  $r^{-6}$  (mit  $r$  als Abstand zwischen den beiden

Übergangsdipolmomenten) ist. Weiterhin ist er von der relativen Orientierung zwischen den beiden Cofaktoren abhängig. In der *A. nidulans*-Photolyase beträgt der interchromophore Abstand 17.5 Å, während er in der *E. coli*-Photolyase bei 18.8 Å liegt.<sup>[16]</sup> Die günstigere Orientierung der Dipolmomente ist die Ursache für die bessere Energietransfer-Effizienz in der *A. nidulans*-Photolyase (~100%) im Vergleich zu der von *E. coli* (~70%). Die lichtsammelnde Aktivität des zweiten Chromophors ist hierbei auch daher sinnvoll, um die schwache Absorption des reduzierten Flavins bei Wellenlängen über 400 nm zu kompensieren.

### c) Elektronentransfer

Das angeregte Flavin  $\text{FADH}^*$  spaltet den Cyclobutan-Ring des Pyrimidindimers. Obwohl die Theorie der durch einen Elektronentransfer initiierten Katalyse generell anerkannt ist, mussten doch experimentelle Beweise für diesen Prozess erbracht werden. Die Gründe hierfür liegen darin, dass das angeregte Flavin in allen drei Oxidationszuständen ein effizienter Redox-Cofaktor ist und dass die Möglichkeit der sowohl reduktiven als auch oxidativen Reparatur von Pyrimidindimeren (Bildung von Radikalanionen bzw. Radikalkationen) gegeben ist. Für die Bestimmung von Richtung, Rate und Effizienz des Elektronentransfers mussten Reaktionsintermediate durch verschiedene Untersuchungsmethoden detektiert werden. Ein Beweis für ein Radikalintermediat während der Katalyse durch *E. coli*-Photolyase konnte durch zeitaufgelöste EPR erbracht werden, wobei das Signal dem Zustand  $\text{E-FADH}^{\bullet-}\cdots\text{T-T}^{\bullet-}$  zugeordnet wurde.<sup>[46]</sup> Auch durch Isotopeneffekt-Analyse wurde als Ergebnis die Entstehung eines Radikalanions als ein Intermediat der Katalyse durch Photolyasen erhalten.<sup>[47, 48]</sup> Die Reparatur eines Pyrimidindimers durch photoinduzierten Elektronentransfer wird somit durch eine Einelektronen-Reduktion des Dimers bewerkstelligt.

## 1.6 Flavin-Cofaktor

### 1.6.1 Überblick

Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) mit seinem tricyclischen Isoalloxazin-Ring ist vermutlich das vielseitigste biologische Redoxreagenz. In seiner 5'-Phosphat- (FMN) und 5'-ADP-Form (FAD) ist es als Coenzym die Schlüsselkomponente bei der Katalyse verschiedenster enzymatischer Elektronentransfer- und Sauerstofftransfer-Reaktionen.

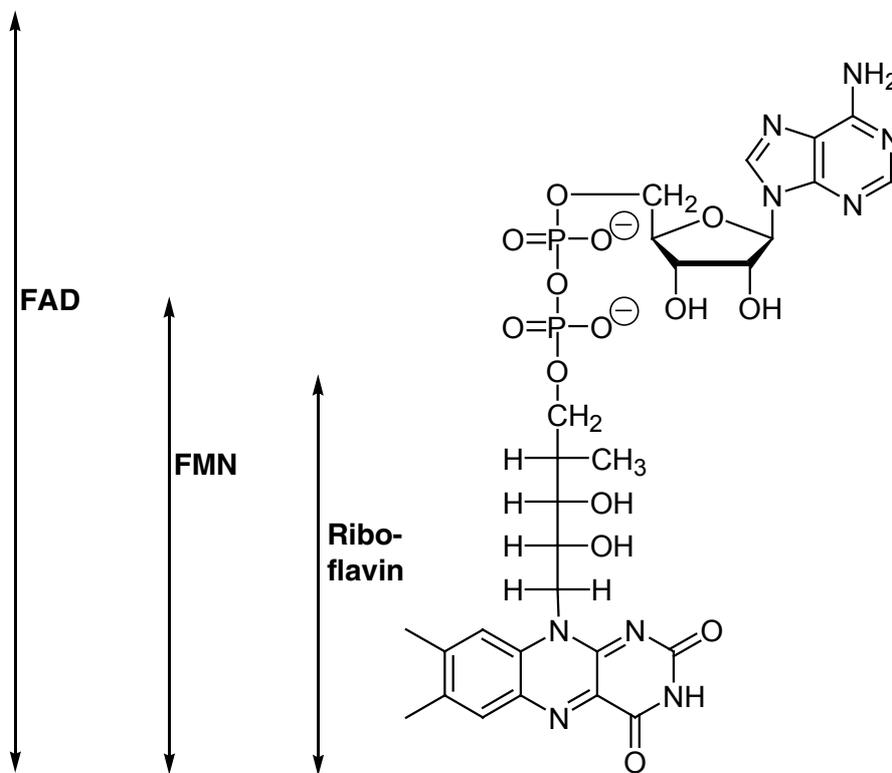


Abb. 6. Riboflavin und die von ihm abgeleiteten Cofaktoren.

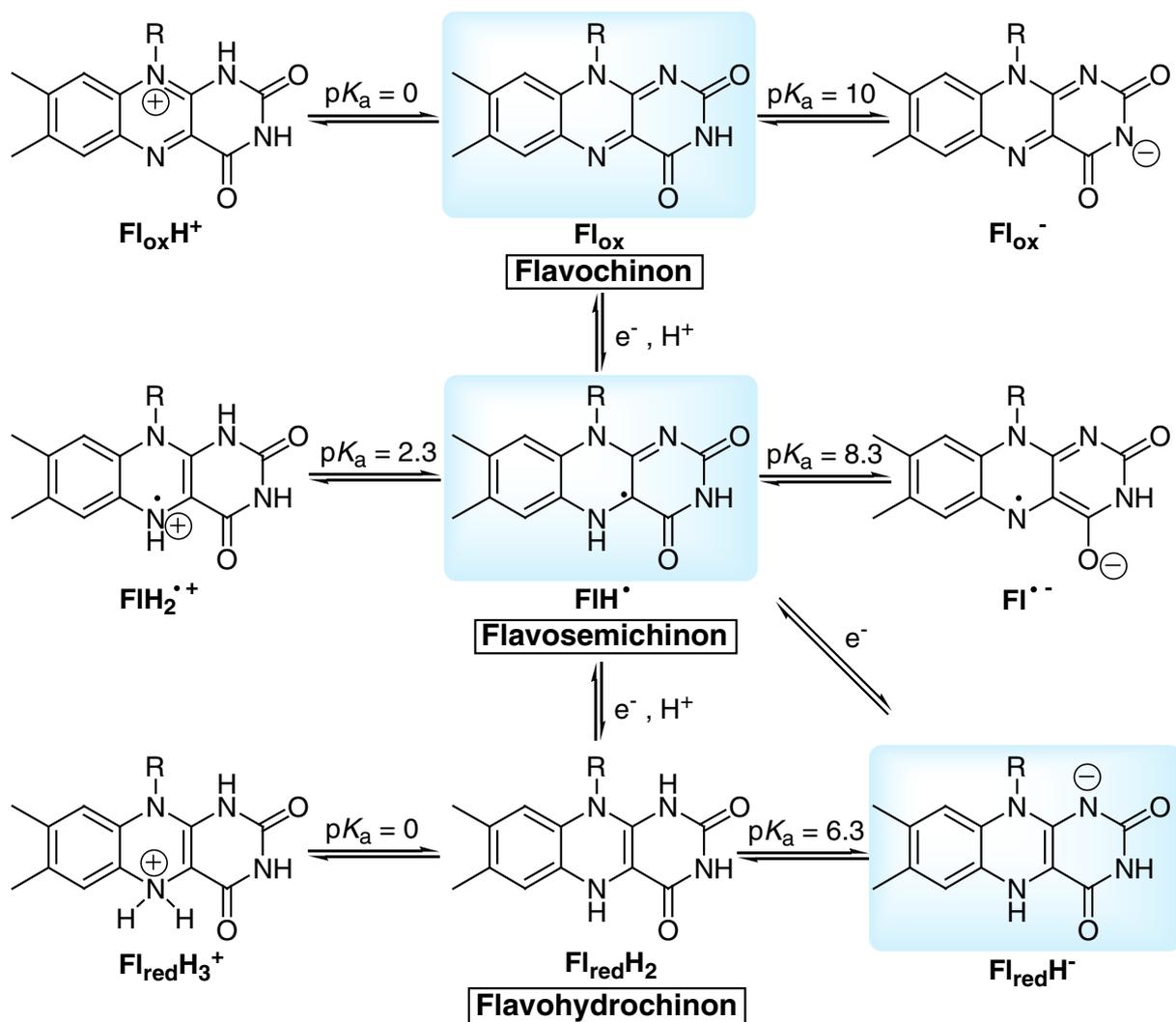
### 1.6.2 Das Flavin-Redoxsystem

Flavine können entweder einzeln oder simultan zwei Elektronen aufnehmen oder abgeben. Die Redoxreaktionen des Flavins sind hierbei thermodynamisch und kinetisch vollständig reversibel. Das Flavin-Chromophor besitzt eine "duale" Natur.

Der Flavin-Heterocyclus ist z. B. in Photolyasen ein starkes Photoreduktans in der zweielektronen-reduzierten Form ( $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$ ).

Das Flavin in seinem oxidierten Redoxzustand hingegen ist ein starkes Photooxidans und befähigt, effiziente Loch-Injektion in DNA und Thymidindimere zu bewirken, was zu oxidativer Dimer-Reparatur führt.<sup>[49,50]</sup>

Freie Flavine sind amphotere Verbindungen, d. h. in jedem Redoxzustand gibt es neutrale, kationische und anionische Spezies. Demnach werden die Redoxreaktionen des Flavins stark vom pH-Wert der verwendeten Lösung beeinflusst. Das einzigartige Redoxsystem des Flavins ist in Schema 5 dargestellt.

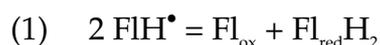


Schema 5. Das Redoxsystem amphoterer Flavin-Derivate. Blau unterlegt: Mögliche Redoxzustände des Flavin-Cofaktors in DNA-Photolyasen.

Das oxidierte Flavin (Flavochinon) liegt bei pH-Werten zwischen 0 und 10 in seiner neutralen Form ( $\text{Fl}_{\text{ox}}$ ) vor. Unter stark sauren Bedingungen, bei einem pH-Wert unter 0, findet eine Protonierung an der Stelle N(1) statt. Mit einem  $\text{p}K_{\text{a}}$  von etwa 10 dissoziiert das Proton an der Stelle N(3).

Durch Aufnahme eines Elektrons erhält man in wässrigen, neutralen Lösungen das neutrale "halbreduzierte" Flavinradikal (Flavosemichinon). Im Hinblick auf die elektronische Struktur des neutralen Radikals  $\text{FlH}^{\bullet}$ , das als solches auch – für die Reparatur inaktive Form – in der Photolyase vorliegt, wurden Untersuchungen von *Hemmerich* und *Massey* durchgeführt.<sup>[51]</sup> Als Resultat kontroverser Diskussionen konnte gezeigt werden, dass sich im  $\text{FlH}^{\bullet}$  das Proton an der Stelle N(5) und nicht an der Stelle N(1) befindet.

Je nach Polarität des Lösungsmittels existieren verschiedene tautomere und mesomere Strukturen des Flavosemichinons, was in unterschiedlich gefärbten Spezies zum Ausdruck kommt.<sup>[51, 52]</sup> Das neutrale Flavinradikal ( $\text{FlH}^{\bullet}$ ) ist in Lösung blau gefärbt. Es zeichnet sich durch seine hohe Stabilität aus, lässt sich aber trotzdem in wässrigen Lösungen auf Grund einer starken Disproportionierungstendenz (Gleichung (1)) zu nicht mehr als 2% nachweisen.<sup>[53]</sup>



Die anionische Form des Flavinradikals ( $\text{Fl}^{\bullet-}$ ) ist in Lösung rot gefärbt und weist hingegen eine relativ hohe Instabilität auf.<sup>[54, 55]</sup> Mit einem  $\text{p}K_{\text{a}}$ -Wert von 2.3 bildet sich das karminrote Kation  $\text{FlH}_2^{\bullet+}$ . Es ist im Vergleich zu den beiden anderen Molekülen recht stabil gegen Sauerstoff.<sup>[51]</sup>

Eine weitere Reduktion des Flavosemichinons führt zur Generierung des Flavohydrochinons ( $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$ ), auch Leukoflavin genannt. Es zeichnet sich durch eine außerordentlich hohe Sauerstoffempfindlichkeit aus und kann deshalb nur unter anaeroben Bedingungen erhalten bleiben. Im Gegensatz zum Flavochinon wird das vollständig reduzierte Flavohydrochinon zunächst an der Stelle N(5) protoniert ( $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_3^+$ ). Unter physiologischen Bedingungen kann die Stelle N(1) mit einem  $\text{p}K_{\text{a}}$ -

Wert von 6.3 deprotoniert vorliegen ( $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$ ).<sup>[56]</sup> Flavohydrochinone sind gute Reduktionsmittel und können die beiden Elektronen einzeln oder gemeinsam abgeben.<sup>[57]</sup> Das Flavohydrochinon-Anion weist nicht wie das neutrale Flavohydrochinon eine planare Struktur auf, sondern nimmt eine in der N(5)-N(10)-Achse geknickte Struktur (*butterfly*-Konformation) ein.<sup>[58, 59]</sup> Die Proteinhülle der Flavoenzyme kann das Redoxpotential des Flavin-Coenzym durch Kontrolle solcher Konformationsänderungen regulieren.<sup>[60-62]</sup>

Die Redoxpotentiale von freien Flavinderivaten in Wasser liegen je nach Art und Stellung der Substituenten in einem breiten Bereich von -50 bis -500 mV.<sup>[62]</sup> Diese Redoxreaktionen können entweder über Ein- oder Zweielektronenprozesse verlaufen. Hierbei ist das Redoxpotential für die Aufnahme des ersten Elektrons ( $E^\circ(\text{Fl}_{\text{ox}}/\text{FlH}^\bullet) = -240 \text{ mV}$ ) negativer als das für die Übertragung des zweiten Elektrons ( $E^\circ(\text{FlH}^\bullet/\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2) = -170 \text{ mV}$ ). Dies gilt analog auch für den umgekehrten Fall der Elektronenabgabe ausgehend vom Flavohydrochinon. Man geht davon aus, dass bei sämtlichen bekannten Flavoproteinen, bei deren Katalysetätigkeit ein Eielektronentransfer eine Rolle spielt, nur der  $\text{FlH}^\bullet/\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$ -Redoxprozess relevant ist.<sup>[63]</sup>

### 1.6.3 Die Photochemie der Flavine

Die Absorptionsspektren der Flavochinone ( $\text{Fl}_{\text{ox}}$ ) zeigen neben zwei Banden im sichtbaren/nahen UV bei 370 und 450 nm zwei weitere Maxima im fernen UV bei 220 und 260 nm (Abb. 7).

Die beiden langwelligen Banden weisen relativ hohe Extinktionskoeffizienten auf ( $\epsilon \approx 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und werden  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergängen zugeschrieben. Anregung bei diesen Wellenlängen ergibt den ersten angeregten Singulett-Zustand ( $^1\text{Fl}_{\text{ox}}$ ), der normalerweise sehr schnell durch Fluoreszenz bei etwa 520 nm relaxiert oder durch *intersystem crossing* in den ersten angeregten Triplett-Zustand ( $^3\text{Fl}_{\text{ox}}$ ) übergeht.

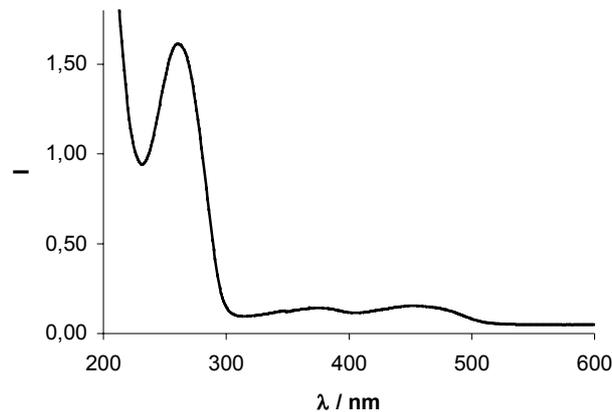


Abb. 7. Absorptionsspektrum von Riboflavin.

Für neutrale Flavinradikale ( $\text{FlH}^\bullet$ ) sind Absorptionsmaxima um 340, 500 und 580 nm charakteristisch.<sup>[51]</sup>

Neutrale Flavohydrochinone in Lösung fluoreszieren nicht. Daher wird angenommen, dass der Singulett-Zustand von freiem  $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$  sehr kurzlebig ist und die mögliche Fluoreszenz-Lebensdauer im Bereich von wenigen Pikosekunden liegt.<sup>[64]</sup>

Deprotonierte Flavohydrochinone  $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$ , der für die aktive Form von Photolyasen benötigte Zustand, sind schwach fluoreszent. Der reduzierte Cofaktor  $\text{FADH}^-$  zeigt gebunden an die Photolyase eine Fluoreszenz bei 505 nm.<sup>[38]</sup> Das Einelektronen-Oxidationspotential von  $^1\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$  wird auf etwa -2.8 V (vs SHE) geschätzt<sup>[65]</sup> und stellt damit ein enorm starkes Reduktionsmittel dar. Für den längerlebigen Triplett-Zustand  $^3\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$  wurde ein verstärkter Knick des Moleküls entlang der N(5)-N(10)-Achse und ein schwächeres Oxidationspotential ( $> -2.3$  V) vorgeschlagen.<sup>[66]</sup>

## 1.7 Desazaflavin-Cofaktor

### 1.7.1 Überblick

Während die auf Vitamin B<sub>2</sub> basierenden Flavin-Coenzyme schon seit mehr als 100 Jahren bekannt sind und erforscht werden, erregte das Riboflavin-Analoge 5-Desazariboflavin, obwohl Derivate bereits 1970 von *O'Brien et al.* synthetisiert wurden,<sup>[67]</sup> erst im Jahre 1978 durch einen Bericht von *Eirich* erhöhte Aufmerksamkeit. In diesem wurde erstmals die Existenz eines natürlich vorkommenden Desazaflavin-Coenzym beschrieben.<sup>[68]</sup> Dieses neu entdeckte Coenzym, das ein Derivat des 8-Hydroxy-5-desazariboflavins **1** darstellt, wurde auf Grund seiner intensiven Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm Coenzym F<sub>420</sub> genannt.<sup>[69]</sup> Das Coenzym F<sub>420</sub> **2** ist ein wesentlicher zellulärer Bestandteil (>100 mg/kg Zellen) von anaeroben Archäe-Bakterien, die Methan biosynthetisieren. Diese methanogenen Bakterien führen eine Acht-Elektronen-Reduktion von Kohlendioxid zu Methan durch, wobei vier H<sub>2</sub>-Moleküle katalysiert durch methanogene Hydrogenasen oxidiert werden.<sup>[69, 70]</sup>

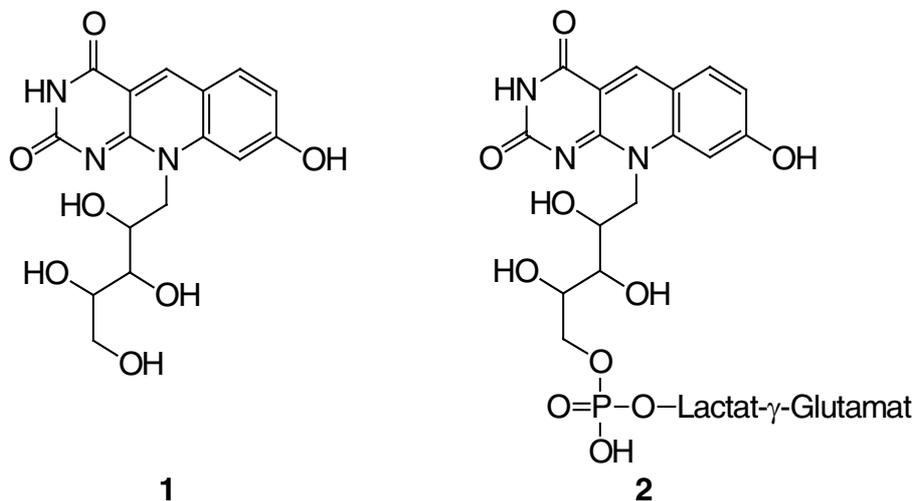


Abb. 8. Struktur von 8-Hydroxy-5-desazariboflavin und Coenzym F<sub>420</sub>.

An diesem Methanogenese-Prozess sind sechs neuartige Coenzyme beteiligt, darunter Methyl CoM und das Nickel enthaltende Tetrapyrrol-Coenzym F<sub>430</sub>.<sup>[69]</sup> Das

Coenzym  $F_{420}$  spielt ebenfalls in mehreren Enzymen der methanogenen Bakterien eine wichtige Rolle.<sup>[71]</sup> Eines dieser Enzyme ist eine  $F_{420}$ -reduzierende Hydrogenase, wobei das 5-Desazariboflavin-Derivat als Zweielektronenakzeptor zum 1,5-Dihydro-5-desazariboflavin (Schema 6) reduziert wird. Es wird angenommen, dass ein weiteres Enzym, eine Transhydrogenase, anschließend den Hydrid-Transfer von einem der beiden prochiralen Methylen-H-Atome am C(5) der Dihydroform des Desazaflavins auf das C(4) eines NADP-Moleküls katalysiert.<sup>[72]</sup>

### 1.7.2 Das Desazaflavin-Redoxsystem

Obwohl die tricyclischen 5-Desazariboflavine Analoge zum Riboflavin darstellen, werden sie auf Grund ihres Redoxverhaltens in der Literatur eher als chemische Analoge zu den monocyclischen Nikotinamiden beschrieben (Abb. 9). Der Substituent an der Stelle 5 bestimmt somit das Redoxverhalten und seine ausschlaggebende Rolle wird in der Beschreibung der 5-Desazariboflavine als "NAD in einem Flavin-Gewand" anschaulich wiedergegeben.

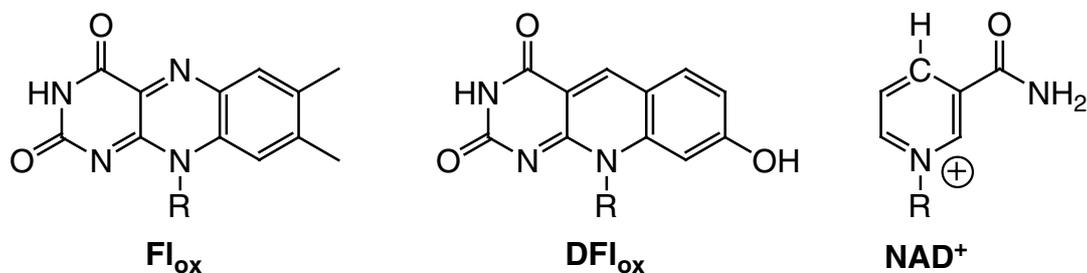
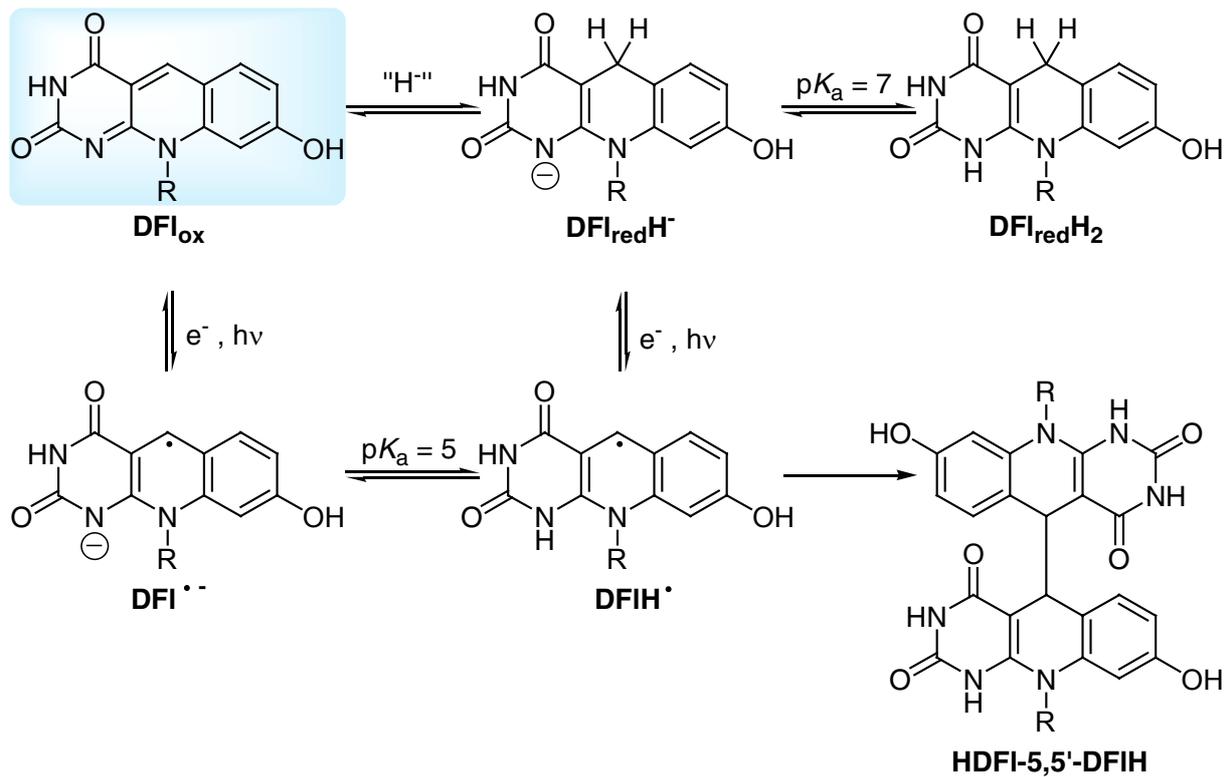


Abb. 9. Riboflavin, 8-Hydroxy-5-desazariboflavin und NAD<sup>+</sup>.

Wie bei Nicotinamiden wird die Redoxchemie vom 8-Hydroxy-5-desazariboflavin von Hydrid-Aufnahme und -Abgabe bestimmt, d. h. von "Zweielektronen"-Reaktionen (Schema 6). Der tricyclische 5-Desazaisoalloxazin-Kern ist somit ein funktionelles Hybrid (und vielleicht auch ein evolutionäres) zwischen monocyclischen Nicotinamid- und tricyclischen Flavin-Coenzymen.



Schema 6. Das Redoxsystem des 8-Hydroxy-5-desazariboflavins. Blau unterlegt: Vorliegende Form des 8-HDF- ( $F_0^-$ ) Cofaktors in DNA-Photolyasen der Desazaflavin-Klasse.

In Schema 6 ist das Redoxsystem von 5-Desazaflavinen skizziert, hier speziell vom 8-Hydroxy-5-desazariboflavin. Das 8-HDF liegt mit der Bezeichnung  $F_0$  als zweiter Cofaktor in DNA-Photolyasen der Desazaflavin-Klasse vor.

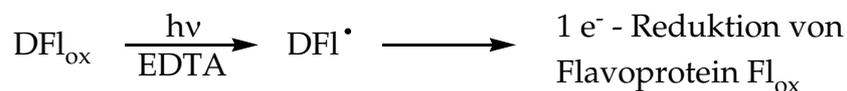
Wie viele Flavine besitzen auch 5-Desazaflavine einen amphoteren Charakter. Im oxidierten und im voll reduzierten Zustand gehen die 5-Desazaflavine Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen mit vergleichbaren  $\text{pK}_a$ -Werten wie die des Flavins (Schema 5) ein. 5-Desazaflavine im Grundzustand sind obligate Zweielektronen-, Hydrid-Transfer-Coenzyme.<sup>[69]</sup> Hierbei ist der Substituent an der Stelle 5 in Flavinen und 5-Desazaflavinen die ausschlaggebende Determinante für eine Einelektronen-Chemie. Der Ersatz des N- durch ein C-Atom beschränkt das 5-Desaza-System ausschließlich auf einen Hydrid-Transfer.

Angriff eines Hydridions  $\text{H}^-$  an der Stelle C(5) von  $\text{DFI}_{\text{ox}}$  führt zur Bildung des 1,5-Dihydro-8-hydroxy-5-desazariboflavin ( $\text{DFI}_{\text{red}}\text{H}_2$ ).

## 1. Einleitung

---

Protonierung des instabilen Radikalanions ( $\text{DFI}^{\bullet-}$ ) kann nicht an der Stelle C(5) erfolgen, da die tricyclische Konjugation durch ein  $\text{sp}^3$ -hybridisiertes C-Atom unterbrochen wäre. Die Protonierung erfolgt vielmehr an der Stelle N(1), die nicht entscheidend zur Stabilisierung des Desazaflavin-Radikals beitragen kann. Solche Desazaflavin-Radikale konnten erst bei verschärften Bedingungen (z. B. Lichtanregung, siehe Schema 6) detektiert werden.<sup>[73]</sup> Als Folgereaktion kommt es zur Bildung von stabilen C(5)-C(5')-Dimeren ( $\text{HDFI-5,5'-DFIH}$ ).<sup>[74]</sup> Von *Hemmerich* und *Massey* wurde die Photoreduktion von Flavoproteinen mit Desazaflavinen als Katalysator untersucht. In Gegenwart von EDTA und Licht wurden Flavoproteine ( $\text{Fl}_{\text{ox}}$ ) zum  $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$  reduziert. Diese Photoreduktion ging mit der Generierung von stark reduzierenden DFI-Radikalen einher.<sup>[74]</sup>

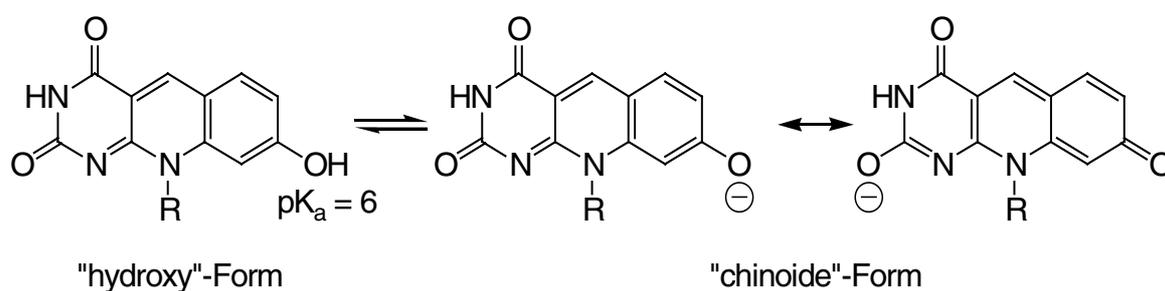


Die Instabilität von halbreduzierten 5-Desazaflavin-Radikalen ( $\text{DFIH}^{\bullet}$ ) zeigt die Bedeutung des Stickstoffatoms N(5) in Flavinen für die Stabilisierung des Semichinon-Radikals ( $\text{FIH}^{\bullet}$ ).

Das Redoxpotential für Zweielektronen-Aufnahme durch 5-Desazaflavine beträgt in Wasser etwa -300 mV (vgl. -200 mV bei Flavinen). Das Redoxpotential für Ein-elektronen-Aufnahme wurde hingegen auf etwa -800 mV (vgl. -240 mV bei Flavinen) bestimmt.<sup>[54]</sup>

Substituenten an der Position 8 können beträchtliche Auswirkungen auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Desazaflavine haben. Elektronendonoren an dieser Stelle, wie z. B. eine Hydroxy-Gruppe, verschieben das Redoxpotential von 5-Desazaflavinen zu negativeren Werten ( $E^{\circ}(\text{HDF}) \approx -350 \text{ mV}$ ).<sup>[75]</sup> Die Deprotonierung der C(8)-OH-Gruppe ( $\text{pK}_a \approx 6$ ) ergibt ein elektronenreiches, "chinoides" Anion ( $8\text{-O}^- \text{-DFI}_{\text{ox}}$ ), das relativ schwer zu reduzieren ist (Schema 7).<sup>[76]</sup>

Studien von Desazaflavin enthaltenden Modellsystemen zeigten, dass 5-Desazaflavine in ihrem oxidierten Zustand prinzipiell in der Lage sind, Pyrimidin-dimere zu spalten. In einem Modellsystem zur Untersuchung der lichtgetriebenen Spaltung des Thymidindimers in Photoreaktivierungs-Enzymen (PRE) ist nur ein 7,8-Dimethyl-5-desazariboflavin im oxidierten Zustand, nicht jedoch ein 8-Hydroxy-5-desazariboflavin, bei einem pH-Wert größer 10 befähigt, das Dimer unter Bestrahlung oxidativ zu spalten.<sup>[49]</sup> Die Quantenausbeute dieses Spaltungsprozesses war jedoch relativ gering ( $\phi < 10^{-3}$ ).



Schema 7. Deprotonierung des 8-Hydroxy-5-desazariboflavins (8-OH-DFI<sub>ox</sub>).

Auf Grund der schweren Reduzierbarkeit der elektronenreichen, anionischen Desazaflavin-Spezies nimmt man an, dass F<sub>420</sub>-Redoxenzyme (F<sub>420</sub> ist ein 8-Hydroxy-5-desazaflavinderivat) den Cofaktor deshalb in seiner protonierten Form halten müssen, um eine Reduktion zu ermöglichen.<sup>[69]</sup>

### 1.7.3 Die Photochemie der Desazaflavine

5-Desazaflavine zeigen Absorptionsmaxima um 400 nm ( $\epsilon \approx 20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) mit einer ausgeprägten Fluoreszenz um 450 nm.<sup>[77]</sup> Durch Heteroatom-Substituenten an der C(8)-Position kann es zu Verschiebungen der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima kommen.<sup>[49]</sup> Elektronendonoren als Substituenten führen im allgemeinen zu bathochromen Verschiebungen der Maxima sowie zu einer Steigerung der Quantenausbeute der Fluoreszenz.<sup>[78]</sup> Die Deprotonierung der C(8)-OH-Gruppe im 8-HDF führt zu einer weiteren Verschiebung des Absorptionsmaximums ins Rote mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{max}} \approx 420 \text{ nm}$  ( $\epsilon \approx 40000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die Phenol-Ionisation generiert ein tief farbiges delokalisiertes Anion, dessen Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{max}} \approx 470\text{-}475 \text{ nm}$  zu beobachten ist.

### 1.7.4 Das Desazaflavin als Cofaktor in DNA-Photolyasen

In der Literatur wird das deprotonierte, chinoide 8-Hydroxy-5-desazaflavin als inert gegenüber Reduktionsmitteln angegeben.<sup>[69]</sup> Die meisten bisher charakterisierten Desazaflavin enthaltenden Enzyme benötigen den Cofaktor zur Durchführung von Redoxreaktionen. Das Chromophor liegt in diesen Enzymen deshalb in seiner C(8)-OH-protonierten Form vor.

Das Coenzym  $F_{420}$  als Derivat des 8-Hydroxy-5-desazaflavins spielt jedoch nicht nur eine Rolle in der Redoxchemie (von z. B. methanogenen Metabolismen), sondern fungiert auch in Form des  $F_0$  als Antennenpigment in der lichtinduzierten enzymatischen Reparatur von UV-Licht geschädigter DNA.

DNA-Photolyasen sind bislang die einzigen Enzyme, in denen der 8-Hydroxy-5-desazaflavin-Cofaktor in der deprotonierten, redoxinaktiven Form ( $8\text{-O}^-\text{-DFI}_{\text{ox}}$ ) vorliegt.<sup>[75]</sup> Der 8-HDF-Cofaktor dient in diesen Proteinen bis zum heutigen Wissensstand ausschließlich als lichtsammelnder Chromophor und absorbiert Lichtenergie bei "ungefährlichen" Wellenlängen von 350-500 nm, bei denen Nukleobasen nicht

absorbieren. Die hohen Extinktionskoeffizienten des chinoiden 8-HDF-Cofaktors werden genutzt, um die Energie effizient mittels eines *Förster*-Energietransfermechanismus auf das Flavin-Coenzym zu übertragen, welches in der reduzierten und deprotonierten Form ( $\text{FADH}^-$ ) vorliegt.<sup>[45,79]</sup>

Die relativ starke Interaktion des 8-HDF mit dem Apoenzym erzeugt in Photolyasen eine weitere Verschiebung des Absorptionsmaximums von 20 nm ins Rote.<sup>[16]</sup> Somit werden für den  $\text{F}_0$ -Cofaktor Wellenlängen von  $\lambda_{\text{max}} \approx 435\text{-}440$  nm beobachtet.

## 2 Aufgabenstellung

In der Einleitung wurde aufgezeigt, welche essentielle Bedeutung Flavin-Cofaktoren in der Natur der Enzyme zukommt. Sie spielen hierbei in der Redoxchemie vieler zu katalysierender Reaktionen die entscheidende Schlüsselrolle.

Durch Einbau von Flavin-Cofaktoren in DNA/RNA können potentiell Ribozyme mit redoxkatalytischen Eigenschaften generiert werden. Das chemische und physikalische Verhalten einer solchen katalytisch aktiven Base in DNA erweist sich als sehr komplex. Um mehr Details über die Eigenschaften von Flavin-Cofaktoren in DNA gewinnen zu können, sollte im ersten Teil dieser Arbeit die Eignung von Riboflavin als künstliche Nukleobase und sein redoxchemisches und spektroskopisches Verhalten untersucht werden. Hierbei stellte sich auch die Frage, ob sich durch Wahl von geeigneten Flavin-Gegen- oder -Nachbarbasen solche Eigenschaften modulieren lassen und als Basis für die Entwicklung von bioanalytischen Bauteilen dienen können.

Der Desazaflavin-Cofaktor ist ein weiterer in der Natur weit verbreiteter Cofaktor mit variierenden Funktionsmöglichkeiten. So spielt er als Redox-Cofaktor  $F_{420}$  in methanogenen Bakterien eine Rolle und als  $F_0$  besitzt er die Aufgabe einer lichtsammelnden Photoantenne in zahlreichen Photolyasen. Die interessanten redoxchemischen und optischen Eigenschaften von Desazaflavinen bilden die Grundlage für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit. Hier sollte ein zum Einbau in Oligonukleotide geeigneter Desazaflavin-Baustein synthetisiert werden. Anschließend war das Ziel, das Desazaflavin über Festphasensynthese in DNA einzubauen und die modifizierte DNA auf ihre Eigenschaften hin zu untersuchen. Weiterhin könnte durch Inkorporation von Desazaflavin- und Flavin-Coenzymen sowie einem Pyrimidindimer-Schaden an jeder beliebigen Stelle in DNA ein neuartiges Modellsystem für die Untersuchung der Funktionsweise von Photolyasen erstellt werden. Mit der DNA als starre Organisationseinheit würden systematische Untersuchungen der Abstandsabhängigkeiten von Energietransferprozessen zwischen Desazaflavin und Flavin sowie Reparaturstudien ermöglicht. Eine interessante Fragestellung besteht auch darin, ob in Desazaflavin enthaltender DNA

redoxchemische Prozesse möglich sind und eine Oligonukleotid-Umgebung ähnlich wie das Protein in Coenzym-abhängigen Enzymen in der Lage ist, die katalytischen Eigenschaften des Desazaflavin-Coenzym zu beeinflussen.

Die oben beschriebenen Cofaktoren Flavin und Desazaflavin bilden die katalytische und lichtsammelnde Einheit von Photolyasen der Desazaflavinklasse und leiten das letzte Kapitel ein:

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in dem Erhalt einer Co-Kristallstruktur der CPD-Photolyase aus *A. nidulans* zusammen mit Thymidindimer enthaltender DNA.

Trotz der enormen Bedeutung der Reparatur von CPD-Schäden in der DNA durch Photolyasen liegen mehrere wichtige Details des Reparaturvorgangs noch im Unklaren. So stehen zum Beispiel Fragen nach dem genauen Bindungsmechanismus und dem Elektronentransfer-Weg vom Flavin-Cofaktor zum Dimerschaden im Vordergrund.

Bis heute wurden die Kristallstrukturen von drei CPD-Photolyasen bei atomarer Auflösung erhalten: *E. coli*,<sup>[24]</sup> *A. nidulans*<sup>[25]</sup> und *T. thermophilus*,<sup>[32]</sup> wobei letztere ohne den zweiten Cofaktor kristallisiert wurde. Um jedoch Licht in den genauen Erkennungs- und Bindungsmechanismus zu bringen, ist die Generierung einer Co-Kristallstruktur, d. h. die Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes, notwendig.

Im Falle der *T. thermophilus*-Photolyase wurde eine Co-Kristallstruktur des Enzyms zusammen mit einer einfachen Thymin-Base veröffentlicht. Die Tatsache, dass sich das einzelne Thymin in der Bindungstasche befindet, wurde als Hinweis auf ein Herausdrehen des Dimers aus dem Doppelstrang angesehen. Auch biochemische Daten,<sup>[36, 40, 80, 81]</sup> Computer Modelling<sup>[82, 83]</sup> und NMR-Spektroskopie<sup>[84]</sup> erhärteten diese Theorie. Gegen diese Theorie spricht jedoch die Enzym-Substrat-Kristallstruktur der T4 Endonuclease V, einem DNA-Reparaturenzym des T4-Bakteriophagen. Hier ist nicht der Thymidindimer-Schaden, sondern die zum 5'-T komplementäre Adenin-Base aus dem Doppelstrang herausgeflippt.<sup>[42]</sup>

## 2. Aufgabenstellung

---

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Beweis für den vielfach nur postulierten Dinukleotid-*flipping*-Mechanismus eines Thymidindimers erbracht werden. Auch die kontroversen Diskussionen über den Abstand und die Geometrie des Flavin-Cofaktors und des Dimer-Schadens zueinander sowie den Weg des Elektronentransfers könnten im Verlauf dieser Studien aufgeklärt werden. Hiermit würden bedeutende Erkenntnisse über einen der wichtigsten Genom-Reparaturprozesse in der Natur geliefert.

## 3 Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

### 3.1 Flavin in Oligonukleotiden

#### 3.1.1 Überblick

Der Flavin-Heterocyclus ist in der zweielektronen-reduzierten Form  $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$  ein starkes Photoreduktans. Der mechanistische Schlüsselschritt in der Reparatur der CPD-Schäden durch Photolyasen ist ein lichtinduzierter Elektronentransfer vom reduzierten, deprotonierten Flavin-Elektronendonator in der aktiven Tasche des Enzyms hin zum Dimer-Schaden in der DNA. Durch Einelektronen-Reduktion wird ein instabiles Thymidindimer-Radikalanion gebildet, welches spontan zerfällt.

Um den Mechanismus des reduktiven Elektronentransfers in der Photolyase aufzuklären, wurden Studien an verschiedenen Modellverbindungen vorgenommen.<sup>[79, 85-88]</sup> Von *Carell et al.* wurde unter anderem der Einbau eines Thymidindimers in Oligonukleotiden in unmittelbarer Nähe eines inkorporierten, reduzierten Flavin-DNA-Bausteins durchgeführt, um so den reduktiven Elektronentransfer vom Flavin zum Dimer-Schaden durch DNA zu untersuchen.<sup>[89]</sup> Diese doppelmodifizierte DNA-Stränge zeigen lichtinduzierte Selbstreparatur und ermöglichen einen Einblick in die Fähigkeit der DNA, einen reduktiven Elektronentransfer zu unterstützen. Der Flavin-Cofaktor in seinem reduzierten Zustand ist folglich befähigt, ein einzelnes Elektron auf einen UV-induzierten CPD-Schaden zu transferieren und somit die Reparatur dieses ansonsten mutagenen Schadens zu induzieren. In dieser Hinsicht besitzen Flavin enthaltende Oligonukleotide selbstheilende Eigenschaften.

Photoangeregte reduzierte Flavine sind starke Elektronen-Donoren und als solche fähig, alle Nukleobasen zu reduzieren.

Im Gegensatz dazu ist das Flavin in seinem oxidierten Redoxzustand ein starkes Photooxidans und fähig, effiziente Loch-Injektion in DNA (Oxidation von Purin-Basen zum Radikalkation) und in Thymidindimere zu bewirken, was zu oxidativer

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

---

Dimer-Reparatur führt <sup>[49]</sup> und zur selektiven Erzeugung von oxidativen DNA-Schäden ausgenutzt werden kann. <sup>[90, 91]</sup>

Das Flavin innerhalb eines Oligonukleotids ist somit in der Lage, Elektronen mit seiner Umgebung auszutauschen. Dieses redoxaktive Verhalten beeinflusst stark die Fluoreszenz-Eigenschaften des Flavin-Heterocyclus in der DNA. Somit kann über die Fluoreszenz als Indikator auf die Redoxeigenschaften zurückgeschlossen werden.

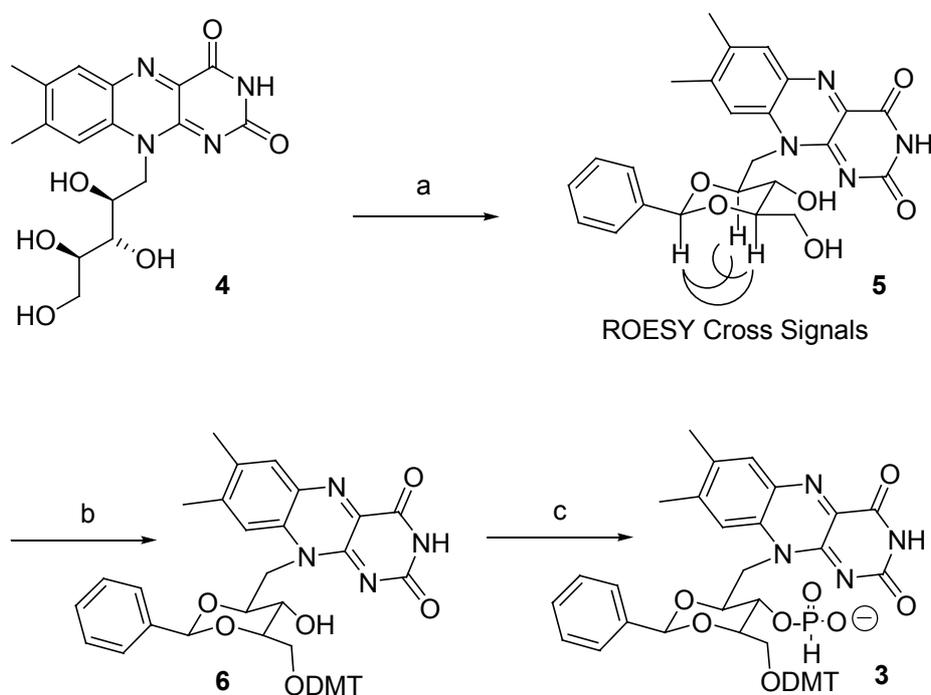
Eine mögliche Entwicklung von redoxaktiven Oligonukleotiden (z. B. Flavin-abhängigen Ribozymen mit redox-katalytischen Eigenschaften) und von auf Coenzymen basierenden DNA-Chips erfordern ein detailliertes Wissen darüber, wie eine Oligonukleotid-Umgebung die Redox- und die Fluoreszenzeigenschaften solcher Coenzyme moduliert. Bis heute wurde von *Rotello et al.* nur der Effekt einer Protein-Umgebung auf die Flavin-Fluoreszenz und sein Redoxpotential untersucht. <sup>[92]</sup> <sup>93]</sup> Hierbei beeinflusst die Protein-Umgebung die katalytischen Eigenschaften des Coenzym durch spezifische Wasserstoffbrückenbindungen, durch  $\pi$ -Stapel- und durch elektrostatische Wechselwirkungen. Oligonukleotide jedoch sollten mit ihren einzigartigen  $\pi$ -stacking- und Wasserstoffbrücken-Anordnungen ein sehr differenziertes Bild hervorrufen, die die optischen und die Redoxeigenschaften eines eingebetteten Flavin-Coenzym stark beeinflussen sollten. Ändert man den Redoxzustand des Flavins von der oxidierten in die reduzierte Form, wird dadurch das Wasserstoffbrückenbindungsmotiv der *Hoogsteen*-Seite des Flavinheterocyclus beeinflusst. Durch Paarung des Coenzym mit verschiedenen Gegenbasen könnte sich eine vielversprechende Möglichkeit ergeben, die Redox- und Fluoreszenz-Eigenschaften des Coenzym zu variieren.

Das Fluoreszenzverhalten des Flavin-Coenzym in einer Oligonukleotid-Umgebung ist sehr komplex, da es durch Elektronentransfer-Reaktionen mit den Nukleobasen beeinflusst wird. Flavine, die als Coenzyme in DNA inkorporiert wurden, liegen an Luft im oxidierten Zustand vor und sind als starke Photooxidantien befähigt, Guanin- und auch Adenin-Basen zu oxidieren.

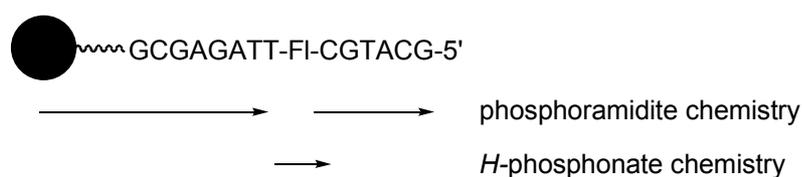
Im folgenden wird detailliert dargelegt, wie DNA-Einzel- und DNA-Doppelstränge die Fluoreszenz-Intensität des Flavin-Chromophors ändern.

### 3.1.2 Synthese des Flavin-Coenzym und Inkorporation in Oligonukleotide

Das Flavin-Nukleotid wurde in dieser Arbeit nach *Carell et al.* über drei Stufen synthetisiert.<sup>[89, 94]</sup> Schema 8 zeigt die Synthese des Flavin-Bausteins **3** und stellt schematisch das Festphasen-Verfahren für den Einbau von **3** in DNA dar.



#### DNA synthesis protocol



Schema 8. Synthese des Flavin-*H*-Phosphonats **3**. a PhCH(OMe)<sub>2</sub>, CSA, DMF, 14%; b DMTCl, Pyridin, 77%; c PCl<sub>3</sub>, 1,2,4-Triazol, *N*-Methylmorpholin, 81%.

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

---

Ausgangspunkt der Synthese war kommerziell erhältliches (-)-Riboflavin **4**, das durch Umsetzung mit einem Äquivalent Benzaldehyddimethylacetal in das 2',4'-geschützte Flavinderivat **5** überführt wurde. Bei dieser Reaktion entsteht ebenfalls das 3',5'-geschützte, sowie das 2',4'- und 3',5'-doppeltgeschützte Flavin, die aber beide säulenchromatographisch von **5** abgetrennt werden konnten. Die absolute Konfiguration von **5** konnte durch NOE-Messungen bestätigt werden. Die anschließende Schützung der primären OH-Gruppe mit Dimethoxytritylchlorid und Umwandlung der sekundären OH-Gruppe in ein *H*-Phosphonat lieferte das Flavin-Nukleotid **3** als DNA-Baustein.

Das Flavin muss hierbei, anders als die natürlichen Basen, anstatt als Phosphoramidit in Form des o. g. *H*-Phosphonats eingebaut werden. *Fontecave et al.* zeigten als erste, dass Flavinderivate in Form des Phosphoramidits durch einen Photooxidationsprozess zum Phosphoramidat oxidiert werden.<sup>[95]</sup> Somit erfordert der Einbau dieses Flavin-Bausteins in DNA eine Festphasensynthese-Methode mit einer Kombination aus Phosphoramidit- und *H*-Phosphonat-Chemie.<sup>[94, 96]</sup>

In Tabelle 2 sind die auf diesem Wege synthetisierten Flavin enthaltenden DNA-Einzel- und Doppelstränge **S1** – **S12** dargestellt. Die Tabelle zeigt neben den berechneten und gefundenen molekularen Massen, die mittels MALDI-TOF bestimmt wurden, auch die gemessenen Schmelzpunkte der Doppelstränge.

		Mol. Masse (ber.)	Mol. Masse (gef.)	T <sub>m</sub> / °C
<b>S1</b>	5'-GCGCATFTTACGCG-3'	4474.8	4475.0	
<b>S2</b>	5'-GCGCATFATACGCG-3'	4483.8	4484.0	
<b>S3</b>	5'-GCGCAFGTTACGCG-3'	4499.8	4499.9	
<b>S4</b>	5'-GCGCAAFTTACGCG-3'	4483.8	4484.0	
<b>S5</b>	5'-GCGCAATTTACGCG-3'	4261.8	4261.5	60
	3'-CGCGTTAAATGCGC-5'	4261.8	4261.7	
<b>S6</b>	5'-GCGCAAFTTACGCG-3'	4483.8	4484.0	45
	3'-CGCGTTAAATGCGC-5'	4261.8	4261.7	
<b>S7</b>	5'-GCGCAAFTTACGCG-3'	4483.8	4484.0	43
	3'-CGCGTTTAAATGCGC-5'	4252.7	4254.1	
<b>S8</b>	5'-GCGCAAFTTACGCG-3'	4483.8	4484.0	42
	3'-CGCGTTGAATGCGC-5'	4277.8	4277.8	
<b>S9</b>	5'-GCGCAAFTTACGCG-3'	4483.8	4484.0	40
	3'-CGCGTTCAATGCGC-5'	4237.7	4236.9	
<b>S10</b>	5'-GCGCATFTTACGCG-3'	4474.8	4475.0	44
	3'-CGCGTATAATGCGC-5'	4261.8	4262.9	
<b>S11</b>	5'-GCGCATFATACGCG-3'	4483.8	4484.0	43
	3'-CGCGTATTATGCGC-5'	4292.8	4294.0	
<b>S12</b>	5'-GCGCAFGTTACGCG-3'	4499.8	4499.9	53
	3'-CGCGTTCAATGCGC-5'	4277.8	4279.1	

Tabelle 2. Sequenzen der DNA-Stränge **S1** – **S12** und deren berechnete und gefundene molekulare Massen (bestimmt mittels MALDI-TOF, Matrix: 2,4,6-Trihydroxyacetophenon); Schmelztemperaturen T<sub>m</sub> der Doppelstränge **S5** – **S12** (c<sub>DNA</sub> = 3 × 10<sup>-6</sup> M, 10 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.4) detektiert bei 260 nm; F = Flavin.

### 3.1.3 Allgemeine Charakteristika von Flavin enthaltenden DNA-Doppelsträngen

Der Flavin-Heterocyclus besitzt grundsätzlich das gleiche Wasserstoffbrücken-Bindungsmotiv wie die natürliche Base Thymin. Daher wurden zunächst die potentiellen Paarungseigenschaften des Flavins in einem DNA-Duplex untersucht. Zu diesem Zweck wurden UV-Schmelzkurven von Doppelsträngen gemessen, die

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

die Flavin-Base in Kontakt mit den vier natürlichen Basen im Gegenstrang enthalten. Tabelle 2 enthält eine Liste der bestimmten Schmelztemperaturen. In Abbildung 10 a) ist eine typische UV-Schmelzkurve dargestellt. Hierin sind sowohl die Aufheiz-, als auch die Abkühlkurve gezeigt. Die Flavin enthaltenden DNA-Doppelstränge weisen hierbei deutlich ein typisches, reversibles Schmelzverhalten auf. Es wird keine Hysterese beobachtet. Abbildung 10 a) zeigt eine Schmelzkurve, die bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert wurde, bei der alle DNA-Basen absorbieren. In Abbildung 10 b) ist die gleiche Schmelzkurve gemessen bei 460 nm dargestellt. Bei dieser Wellenlänge ist nur das Flavinmolekül in der Lage, Licht zu absorbieren. Die beiden erhaltenen Schmelzpunkte ( $T_m$ ) sind, innerhalb der Fehlergrenzen, identisch, was anzeigt, dass das Flavin innerhalb der Helix platziert ist und dass es sich während des Schmelzvorgangs wie eine nichtmodifizierte Base verhält.

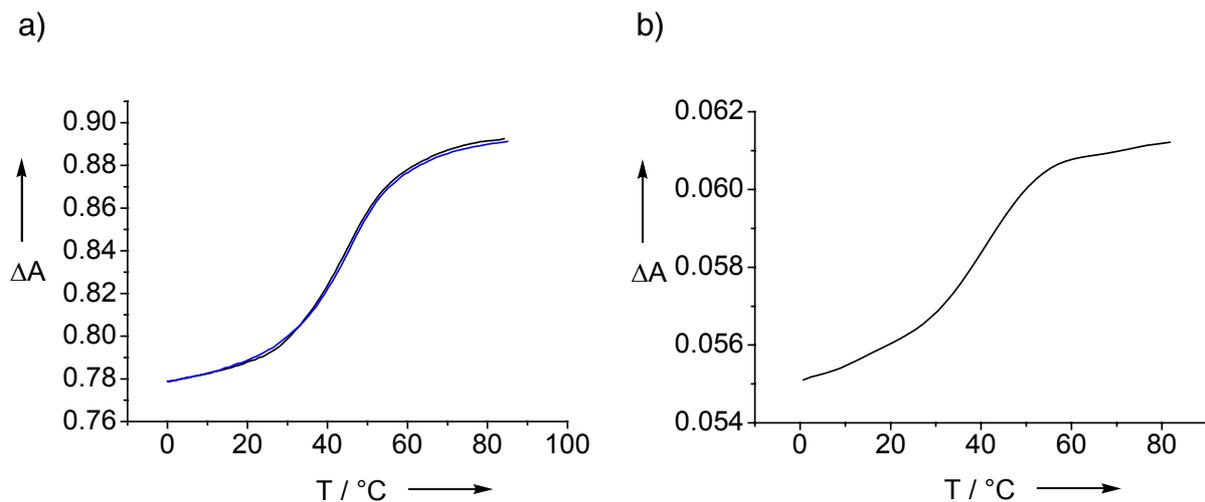


Abb. 10. UV-Schmelzkurven: a) detektiert bei 260 nm und b) detektiert bei 460 nm. ( $c_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-6}$  M in 10 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.4, Temperaturgradient 0.5 °C/min).

Im Vergleich zum ungestörten Doppelstrang **S5** mit einem T:A-Basenpaar ( $T_m = 60$  °C) wird nach Ersatz eines Thymins durch das Flavin **3** in Duplex **S6** eine relativ starke Absenkung der Schmelztemperatur ( $T_m = 45$  °C) beobachtet. Dieser Schmelzpunkt ist ähnlich dem  $T_m$ -Wert, der beim Vorhandensein einer Fehlpaarung (*mismatch*) auftritt. Ein Doppelstrang mit einer T:T-Fehlpaarung z. B. schmilzt nahezu bei der gleichen Temperatur. Noch niedrigere Schmelzpunkte können für die

"Basenpaare" Fl:G (**S8**), Fl:C (**S9**) und Fl:T (**S7**) vermerkt werden, was anzeigt, dass in der Fl:A-Situation ein Teil der Flavin-induzierten Destabilisierung im Duplex durch einen kleinen stabilisierenden Effekt, wie z. B. einer Wasserstoffbindung vom Flavin zum Adenin, kompensiert wird.

Ein sehr interessantes Verhalten weisen die gemessenen Fluoreszenz-Schmelzkurven auf. In Abbildung 11 (a) ist das Fluoreszenz-Verhalten von in den DNA-Einzelstrang **S4** eingebettetem Flavin dargestellt.

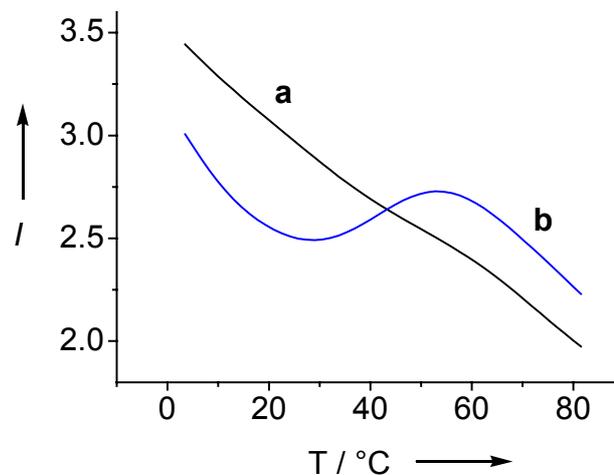


Abb. 11. Typische Fluoreszenz-Schmelzkurve eines Flavin enthaltenden DNA-Einzelstrangs gemessen mit **S4** (a) und eines Flavin enthaltenden Doppelstrangs gemessen mit **S7** (b). ( $c_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-6}$  M in 10 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.4,  $\lambda_{\text{ex.}} = 360$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 520$  nm, Temperaturgradient 2.5 °C/min).

Die Fluoreszenz des Flavins nimmt stetig mit ansteigender Temperatur ab. Der entsprechende Flavin enthaltende DNA-Doppelstrang **S7** hingegen zeigt ein sehr davon abweichendes Fluoreszenz-Verhalten mit ansteigender Temperatur (Abb. 11, Kurve (b)). Es ist ein starker Fluoreszenz-Anstieg bei der Schmelztemperatur zu beobachten. Nach vollständigem Aufschmelzen geht die temperaturabhängige Fluoreszenz-Abnahme weiter. Diese Messungen unterstreichen die Tatsache, dass die Flavin-Fluoreszenz innerhalb der DNA-Duplex-Umgebung stark *gequencht* ist.

Die CD-Spektren aller Flavin enthaltenden Doppelstränge sind typisch für einen Doppelstrang, der vollständig in der B-Form vorliegt. Abbildung 12 zeigt

exemplarisch das von Doppelstrang **S7** gemessene Spektrum. Die Maxima bei 280 und 220 nm und das Minimum bei 250 nm indizieren eine B-Konformation der Flavin enthaltenden Duplexe.

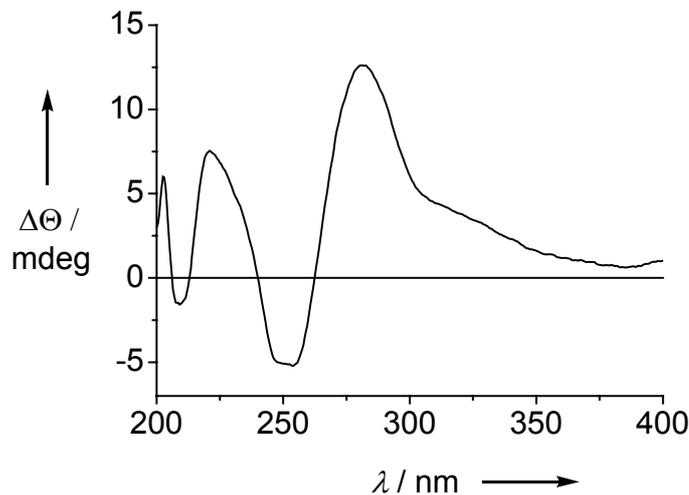


Abb. 12. CD-Spektrum des Flavin enthaltenden DNA-Doppelstrangs **S7** (gemittelt aus zehn unabhängigen Messungen;  $c_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-6}$  M in 10 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.4).

#### 3.1.4 *Molecular Modelling*

Durch die Betrachtung der spektroskopischen Daten konnten Aussagen über die Eigenschaften und die Stabilität von Flavin enthaltenden Doppelsträngen gemacht werden. Das Flavin befindet sich innerhalb des DNA-Duplex, welcher in der B-Konformation vorliegt. Die Schmelztemperaturen sind im Vergleich zu nicht-modifizierten Strängen relativ niedrig.

Um eine genauere Vorstellung der Struktur des Flavins in Doppelsträngen gewinnen zu können, wurden *Molecular Modelling*-Studien vorgenommen. Hierzu wurden zwei Flavin enthaltende Doppelstränge untersucht, die die folgenden Sequenzabschnitte aufweisen, wobei F = Flavin ist:

- a) 5' – AFT – 3'
- b) 5' – TFA – 3'

Abbildung 13 zeigt die Resultate dieser beiden mittels *Molecular Modelling* berechneten DNA-Doppelstränge, die die Flavin-Nukleobase innerhalb des Duplex enthalten.

Die *Modelling*-Resultate unterstützen die bisherige Ansicht, dass sich der Flavin-Heterocyclus innerhalb der Doppelhelix-Struktur befindet und  $\pi$ -stacking-Wechselwirkungen mit benachbarten Basen aufweist. Die Benzyliden-Schutzgruppe interferiert allerdings mit dem *stacking* des Flavins in der 5'-Richtung. Die untersuchten Doppelstränge besitzen zum einen eine Purinbase (A, Abb. 13 a)) und zum anderen eine Pyrimidinbase (T, Abb. 13 b)), die jeweils in 5'-Position bezüglich der Flavin-Base platziert sind. Beide Nukleobasen stapeln schlecht mit dem Flavin, was anzeigt, dass die  $\pi$ -stacking-Interaktion der Flavin-Base in 5'-Richtung stark reduziert ist. In 3'-Richtung ist jedoch das *stacking* in beiden Fällen nahezu perfekt. In dieser Richtung stapelt die Flavin-Base beide Male gut oberhalb einer Thymin-Base (Abb. 13 a)) und oberhalb einer Adenin-Base (Abb. 13 b)).

Diese Ergebnisse sind sehr interessant in Verbindung mit den nachfolgend dargestellten Fluoreszenz-Studien. Es ist so möglich, nicht nur die Modulierung der Flavin-Fluoreszenz durch die dem Flavin benachbarte Nukleobase zu untersuchen, sondern auch auf die Einflüsse der  $\pi$ -Stapel-Situation einzugehen.<sup>[97]</sup>

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

---

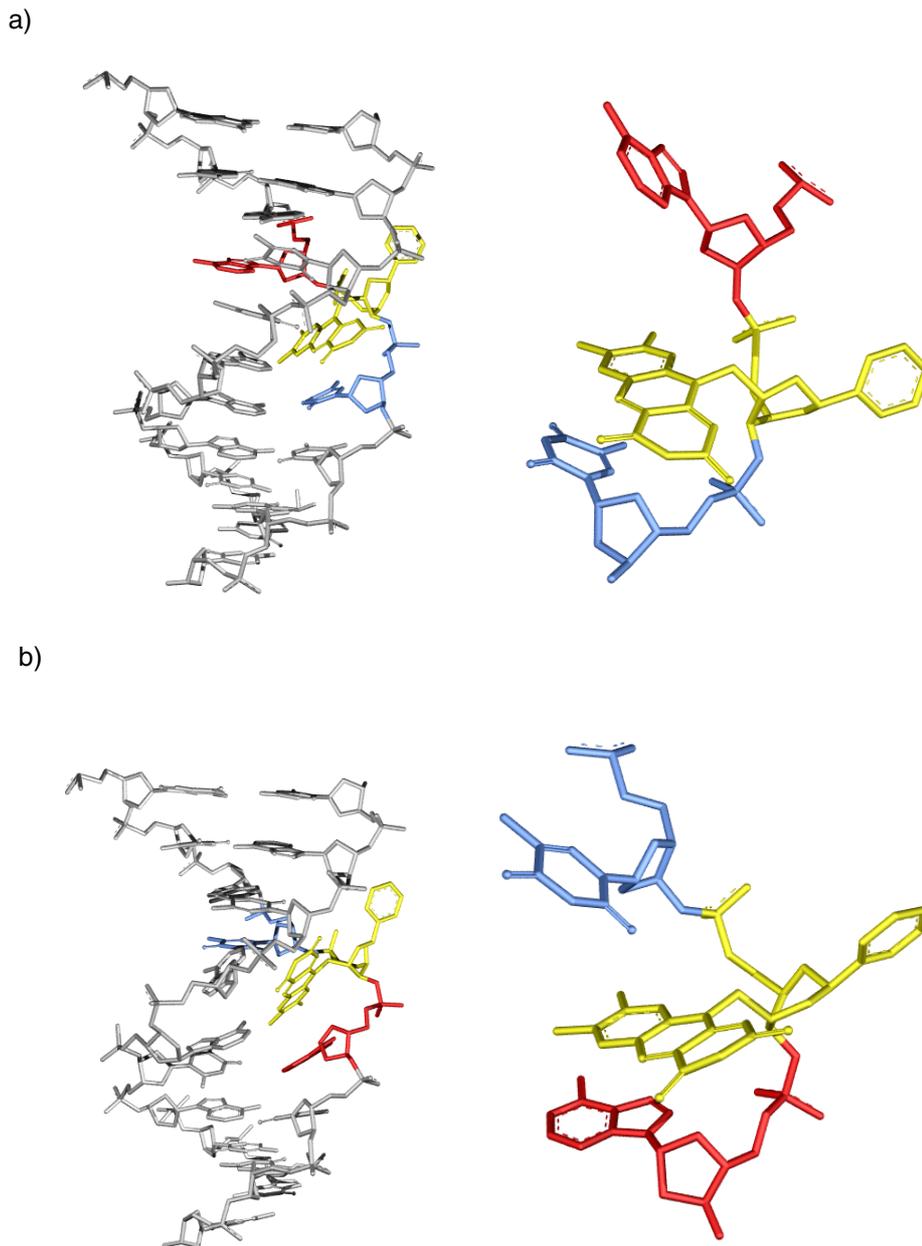


Abb. 13. *Molecular Modelling* des Flavin-Bausteins 1 innerhalb eines typischen DNA-Doppelstrangs in Wasser (*Tripos Sybyl V6.8*, Kraftfeld *mmff94s*). Sequenz: a) 5' – AFT – 3', b) 5' – TFA – 3'.

Basierend auf den hier gewonnenen *Modelling*-Resultaten, zusammen mit den CD-Spektren und Fluoreszenz-Daten, kann angenommen werden, dass das Flavin den Doppelstrang nur in seiner nächsten Nachbarschaft, vorwiegend gerichtet in die 5'-Richtung, verzerrt. Die B-Duplex-Struktur des Gesamtstrangs bleibt dabei intakt.

### 3.1.5 Fluoreszenz-Untersuchungen an Flavin enthaltenden DNA-Einzelsträngen

#### 3.1.5.1 Der Effekt der Basensequenz

Um zu evaluieren, wie stark verschiedene Nukleobasen die Flavin-Fluoreszenz beeinflussen, wurde als erstes das Fluoreszenz-Verhalten eines in den vier Einzelsträngen **S1** – **S4** eingebetteten Flavins untersucht. Die gemessenen Fluoreszenz-Spektren sind in Abbildung 14 dargestellt.

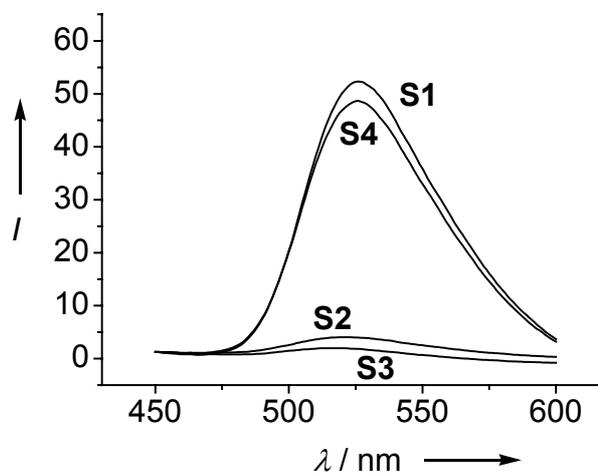


Abb. 14. Fluoreszenz-Spektren der Flavin enthaltenden DNA-Einzelstränge **S1** – **S4** ( $c_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-6}$  M in 10 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.4,  $\lambda_{\text{ex.}} = 360$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 520$  nm, RT).

Wird das Flavin von zwei Thyminbasen flankiert (Strang **S1**), so ist eine starke Coenzym-Fluoreszenz zu beobachten. Wurde das 3'-T durch ein Adenin wie in Strang **S2** ersetzt, so beobachtete man hingegen eine starke Fluoreszenz-Abnahme. Ersetzen des 5'-T durch ein Adenin (Strang **S4**) hatte jedoch fast keine *Quenchung* der Fluoreszenz zur Folge. Dies zeigt, dass das nur schwach ausgeprägte *stacking* in Richtung des 5'-Endes auch im DNA-Einzelstrang auftritt. Eine noch stärkere Fluoreszenz-Reduzierung wurde beobachtet, wenn ein Guanin in 3'-Position zum Flavin-Fluorophor platziert wurde (Strang **S3**).

Diese ansteigende *Quenchungs*-Tendenz der Fluoreszenz von T über A zu G in der 3'-Richtung (ausgehend vom Flavin) ist in Übereinstimmung mit der Abnahme der Oxidationspotentiale ( $E_{\text{Ox, T}} = 1.9 \text{ V}$ ,  $E_{\text{Ox, A}} = 1.7 \text{ V}$ ,  $E_{\text{Ox, G}} = 1.24 \text{ V}$ ).<sup>[98, 99]</sup> Die Fluoreszenz-*Quenchung* des Flavins in Anwesenheit eines Adenins und eines Guanins ist hier zum ersten Mal beobachtet worden und reflektiert wahrscheinlich die effiziente Photooxidation beider Nucleobasen durch das Flavin-Chromophor.<sup>[100, 101]</sup>

#### 3.1.6 Fluoreszenz-Untersuchungen an Flavin enthaltenden DNA-Doppelsträngen

Die oben beschriebene Photooxidation erfordert einen Elektronentransfer von der Nucleobase zum photoangeregten Flavin. Ein solcher Elektronentransfer ist stark distanzabhängig und wird daher durch die *stacking*-Situation innerhalb eines DNA-Duplex beeinflusst.<sup>[102]</sup>

Um detailliertere Erkenntnisse über diesen Effekt gewinnen zu können, wurden die Doppelstränge **S7** und **S10 – S12** synthetisiert und der Einfluss der Nucleobasen in der 3'- und 5'-Richtung auf die Fluoreszenz des Flavins weiter untersucht.

##### 3.1.6.1 Der Effekt der Basensequenz

In den vier synthetisierten DNA-Doppelsträngen **S7** und **S10 – S12** wurde immer jeweils ein Thymin als Gegenbase zum Flavinnucleotid gewählt. In diesen Doppelsträngen befindet sich das Flavin immer zwischen unterschiedlichen Nachbarbasen. Die gemessenen Fluoreszenz-Spektren sind in Abbildung 15 dargestellt.

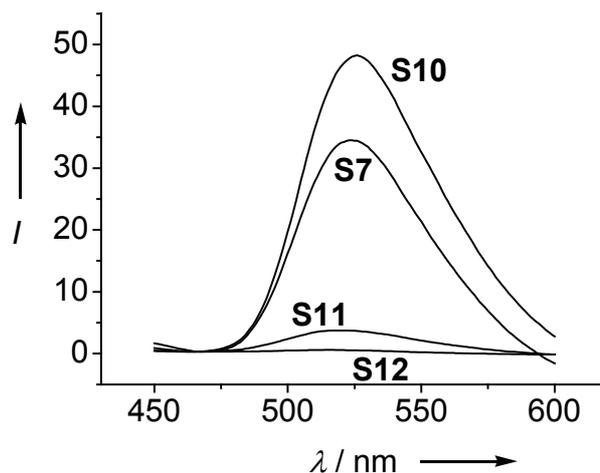


Abb. 15. Fluoreszenz-Spektren der Flavin enthaltenden DNA-Doppelstränge **S7**, **S10** – **S12** ( $c_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-6}$  M in 10 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.4,  $\lambda_{\text{ex.}} = 360$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 520$  nm, RT).

Die beobachteten Daten sind im allgemeinen denen, die von den untersuchten Einzelsträngen **S1** – **S4** erhalten wurden, sehr ähnlich. Wird das Flavin von zwei Thymin-Basen flankiert (Strang **S10**), so ist eine starke Coenzym-Fluoreszenz zu beobachten. Durch Austausch des 3'-Thymins gegen ein Adenin (Strang **S11**) wird eine starke Absenkung der Fluoreszenz hervorgerufen. Eine noch stärkere Fluoreszenz-Reduzierung wurde beobachtet, wenn ein Guanin an der 3'-Seite des Flavin-Fluorophors platziert ist (Strang **S12**). Ein Austausch der Adenin-Base von der 3'-Seite des Flavins (Doppelstrang **S11**) zur 5'-Seite (in welcher eine schlechte *stacking*-Situation gegeben ist) (Doppelstrang **S7**) ergibt wiederum einen Anstieg zu starker Fluoreszenz.

Dieses Resultat unterstreicht die Tatsache, dass die Fluoreszenz-Schwächung des Flavin-Fluorophors ausschließlich durch eine Purin-Base in 3'-Position induziert wird. Die erhaltenen Fluoreszenz-Daten unterstützen daher stark die Schlussfolgerung, dass die Fluoreszenz-Reduzierung durch ein Elektronentransfer-Phänomen verursacht wird.

In den untersuchten Doppelsträngen liegt das Flavin in einem gleichen strukturellen Kontext vor. Daher kann eine Beeinflussung der Fluoreszenz-Reduzierung durch unterschiedliche Hydratation des Flavins ausgeschlossen werden.

#### 3.1.6.2 Der Effekt der Gegenbase auf die Fluoreszenz des Flavins in DNA-Doppelsträngen

Nachfolgend wird eine systematische Untersuchung des Einflusses der Gegenbase auf die Flavin-Fluoreszenzintensität in DNA-Doppelsträngen beschrieben. Um zu evaluieren, ob die relativ starke Fluoreszenz-Modulation zur Bestimmung der Art der Flavin-Gegenbase in einem DNA-Doppelstrang ausgenutzt werden kann, wurden die vier Doppelstränge **S6** – **S9** synthetisiert. Sie enthalten alle den Flavin-Cofaktor im gleichen Sequenzzusammenhang, es liegt ihm jedoch jeweils eine andere der vier Nukleobasen als Gegenbase gegenüber. Die erhaltenen Fluoreszenz-Spektren sind in Abbildung 16 gezeigt.

Im allgemeinen war die Modulation der Fluoreszenz-Intensität relativ gering. Es wurde allerdings ein klarer Einfluss durch die Gegenbase beobachtet: Die höchste Fluoreszenz wurde durch T (Strang **S7**) und die zweithöchste durch C (Strang **S9**) als Gegenbase hervorgerufen. Eine moderate Fluoreszenz wurde mit A als Gegenbase (Strang **S6**) beobachtet und die stärkste Fluoreszenz-Abnahme wurde mit G als Gegenbase (Strang **S8**) gemessen.

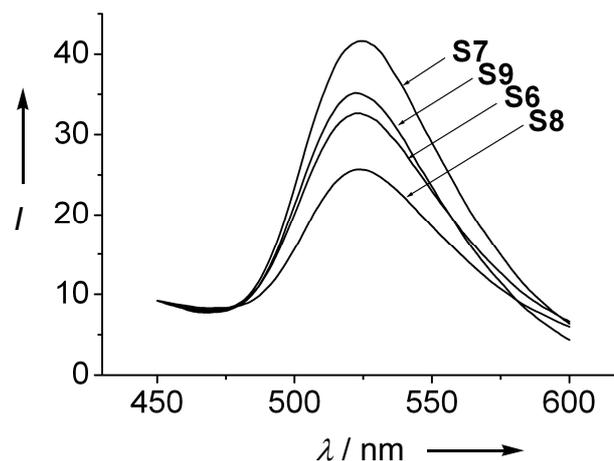


Abb. 16. Fluoreszenz-Spektren der Flavin enthaltenden DNA-Doppelstränge **S6** – **S9** ( $c_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-6}$  M in 10 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7.4,  $\lambda_{\text{ex.}} = 360$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 520$  nm, RT).

#### 3.1.7 Diskussion der Ergebnisse

Durch die rasante Entwicklung im Bereich der Biotechnologie und das immer größer werdende Interesse an der Entwicklung neuartiger Biokatalysatoren basierend auf Oligonukleotid-Strukturen, ist der Einbau von Coenzymen in DNA oder RNA von besonderer Bedeutung.<sup>[103-105]</sup> Das Fernziel der Konstruktion von Flavin-abhängigen Ribozymen mit Eigenschaften, die in das Gebiet der Redox-Katalyse reichen, erfordert detaillierte Kenntnisse über die komplexen Fluoreszenz-Eigenschaften des Coenzym in einer Oligonukleotid-Umgebung. Diese werden durch Elektronentransfer-Reaktionen mit den Nukleobasen beeinflusst, was wiederum starke Auswirkungen auf die photooxidierenden und photoreduzierenden Fähigkeiten solcher in Oligonukleotide inkorporierten katalytisch kompetenten Nukleobasen hat.

Die komplexe Eigenschaft der Fluoreszenzintensität eines Flavin-Coenzym innerhalb eines DNA-Duplex wird zunächst durch die Sequenz, genauer gesagt durch die Art der benachbarten Nukleobase beeinflusst. Die Fluoreszenz in Einzel- und Doppelsträngen ist hoch in einer reinen Pyrimidin-Umgebung und reduziert in der Anwesenheit sowohl eines Guanins als auch eines Adenins, was die photooxidierenden Eigenschaften des Flavin-Heterocyclus widerspiegelt. In Übereinstimmung mit der Tatsache, dass Guanin diejenige Base darstellt, die am einfachsten oxidiert wird, ist die stärkste Fluoreszenz-Reduktion in der Präsenz dieser Base zu beobachten.

Die Fluoreszenzintensität wird weiterhin während der Duplex-Bildung reduziert, in welcher das Flavin-Molekül in  $\pi$ -stacking-Wechselwirkung mit den umgebenden Basen eintritt, wie in den Fluoreszenz-Schmelzkurven ersichtlich ist. Eine zusätzliche, aber geringere Modulierung des Fluoreszenzsignals rührt von der Gegenbase her. Auch hier war wieder das Guanin, gefolgt von Adenin als diejenige Base gefunden worden, welche die effizienteste *Quenchung* hervorruft. Keine, oder nur sehr geringe Fluoreszenz-*Quenchung* wurde im Fall der Anwesenheit von Pyrimidin-Basen als Gegenbasen beobachtet.

Effizientes  $\pi$ -stacking ist ein weiterer Faktor, der die Fluoreszenz-Eigenschaften des Flavins moduliert. Im vorliegenden System stapelt das Flavin gut in der 3'-Richtung

und schlecht in der 5'-Richtung. Eine Purin-Base reduziert die Flavin-Fluoreszenz nur, wenn sie in 3'-Richtung zum Flavin positioniert ist, was anzeigt, dass die Fluoreszenz-Reduktion auf einem stark abstandsabhängigen Prozess, wahrscheinlich einer Elektronentransfer-Reaktion, basiert.

Das hier beschriebene komplexe Fluoreszenz-Verhalten des Flavins in DNA scheint die Chance auf Verwendung von Flavinen als effiziente Sonden in der Standard-DNA-Array-Technologie zu verringern. Dennoch ist das Coenzym überraschend nützlich für das präzise *Monitoring* der Nukleobasen in seiner Nachbarschaft. Diese Tatsache könnte für die Detektion von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) ausgenutzt werden. Ob die Modulierung der Fluoreszenz-Intensität stark genug ist, um mit Signalen konkurrieren zu können, die z. B. von *molecular beacons* erhalten werden, ist fraglich. Die Möglichkeit des *Monitorings* der Nukleobasen-Umgebung steht jedoch im genauen Widerspruch zu der Behauptung von *Fontecave et al.*, nach der die Reduktion der Fluoreszenzintensität sequenzunabhängig sei.<sup>[106]</sup> Basierend auf früheren Arbeiten von *Yoneda et al.*<sup>[107]</sup> wurde eine starke, sequenzunabhängige Fluoreszenz-*Quenchung* eines Desazaflavin-Coenzym am Ende von Oligonukleotiden während der Doppelstrang-Bildung notiert. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen enthüllten jedoch die interessante Tatsache, dass die Flavin-Fluoreszenz, im Gegensatz zu der Beobachtung der *Fontecave*-Gruppe für das Desazaflavin, stark sequenzabhängig ist.

Des Weiteren bilden die vorangegangenen dargelegten Ergebnisse die Grundlage neuartiger Coenzym enthaltender Modellsysteme für die Untersuchung des Elektronentransfers und der Dimer-Reparatur in der DNA als Organisationseinheit. Während in den bisher von *Carell et al.* üblicherweise verwendeten DNA-Einzel- und Doppelsträngen mit inkorporiertem benzylidengeschützten Riboflavin eine schlechte Stapel-Situation in der Nachbarschaft des Flavin vorlag, gaben die hier gewonnenen Erkenntnisse den Anstoß zur Entwicklung eines neuen Flavin-Bausteins in einer DNA-Haarnadel-Umgebung (*hairpin*-Struktur). Die allgemeine Struktur des neuen Bausteins ist in Abbildung 17 wiedergegeben. Auf Grund des Fehlens der sterisch anspruchsvollen Benzyliden-Schutzgruppe und des Einbaus in den Kopf des *hairpins*

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

---

konnten wesentlich stabilere Duplices erhalten werden, da der *hairpin* strukturell besser definiert ist.<sup>[108, 109]</sup>

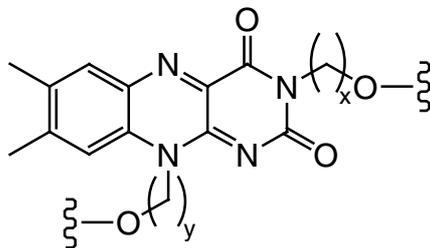


Abb. 17. Flavin-Baustein für die Untersuchung der Thymidindimer-Reparatur in DNA-*hairpins*.  $x = 3, 6$ ;  $y = 3, 6$ .

## 3.2 Desazaflavine in Oligonukleotiden

### 3.2.1 Überblick

Coenzyme katalysieren als niedermolekulare organische Moleküle chemische Reaktionen in der aktiven Tasche von bestimmten Enzymen. Hierbei beeinflusst die Proteinumgebung die katalytischen Eigenschaften des Coenzym durch  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen.<sup>[93, 110]</sup>

Die Inkorporation von Coenzymen wie Flavinen und Desazaflavinen in Oligonukleotide als Grundlage für die Konstruktion katalytisch wirkender DNA/RNA erweitert das katalytische Repertoire von Oligonukleotiden.

Besonderes Interesse gilt der Beantwortung der Frage, ob DNA/RNA in der Lage ist, die katalytischen und spektroskopischen Eigenschaften von eingebetteten Coenzymen so gut abzustimmen, wie es in der Proteinhülle eines coenzymabhängigen Enzyms möglich ist.<sup>[93, 111, 112]</sup>

Einige der wichtigsten Coenzyme, wie Riboflavin (FAD), Ribodesazaflavin ( $F_{420}$ ) oder Nicotinamid (NAD) enthalten eine von der Ribose abgeleitete Ribitylseitenkette und weisen H-Donor- und H-Akzeptorgruppen vergleichbar mit denen der herkömmlichen Nucleobasen auf. Diese Merkmale stellen eine erfolgversprechende Basis für die Realisierung einer katalytischen Funktion in DNA dar. Da die beiden Cofaktoren Flavin und Desazaflavin bekannt für ihre starke Fluoreszenz und ihre Elektronen- und Energie-Transferreaktionen sind, können sie als Grundlage für bioanalytische Anwendungen dienen.<sup>[113]</sup>

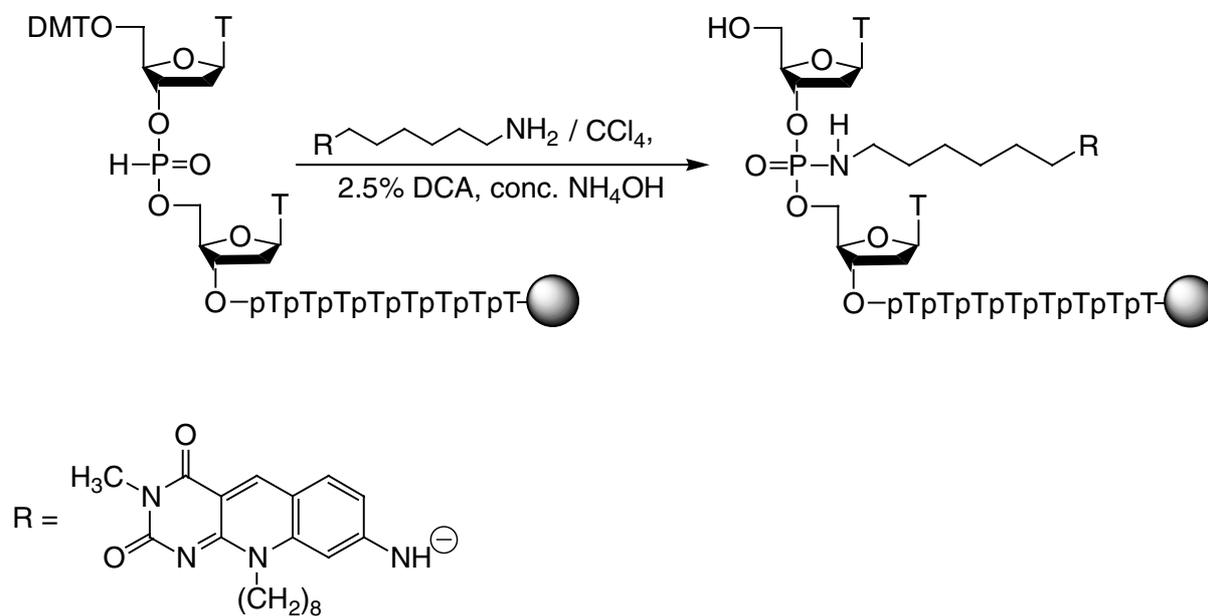
*Carell et al.* konnten zeigen, dass ein Flavin-Coenzym in der Lage ist, als katalytische Nucleobase in einer Oligonucleotid-Umgebung zu wirken und das Potential zeigt, die Redox- und Fluoreszenz-Eigenschaften zu regulieren:

Der Flavin-Cofaktor in seinem reduzierten, deprotonierten und lichtangeregten Zustand ist in einem Oligonucleotid-Umfeld fähig, ein einzelnes Elektron auf einen UV-Licht induzierten CPD-Schaden zu transferieren, und bewirkt so die Reparatur des ansonsten mutagenen DNA-Schadens.<sup>[89, 109]</sup>

Weiterhin wurde das komplexe Fluoreszenz-Verhalten eines Flavins in DNA ausführlich untersucht. An Hand der Fluoreszenz-Modulation konnte gezeigt werden, dass Nukleobasen wie die Protein-Umgebung in Enzymen die Eigenschaften des Coenzym beeinflussen können, welches z. B. die nützliche Eigenschaft aufweist, für das präzise Anzeigen der Nukleobasen-Umgebung in seiner Nachbarschaft zu dienen (siehe Kapitel 3.1).

Auf Grund der besonderen photochemischen und redoxchemischen Eigenschaften stellt das 5-Desazaflavin-Coenzym einen weiteren interessanten Ausgangspunkt für neue Forschungen im Bereich von z. B. Fluoreszenz-Sonden dar.<sup>[106, 114]</sup>

Die Integration eines 5-Desazaflavin-Bausteins in eine Thymidin-Sequenz wurde 1992 von *Yoneda et al.* erstmals durchgeführt.<sup>[114]</sup> Diese Arbeitsgruppe hat ein 5-Desazaflavin-Derivat über einen Aminoalkyl-Linker in ein Thymidin-Decamer einbauen können. Die Verbindung des 5-Desazaflavin-Derivats mit dem Rückgrat des DNA-Oligomers erfolgt über ein Phosphoramidat (Schema 9).



Schema 9. Einbau eines 5-Desazaflavin-Bausteins in ein Thymidin-Decamer nach *Yoneda et al.*

T: Thymidin, p: Phosphodiester-Bindung.

Das 5-Desazaflavin enthaltende Thymidin-Decamer wurde von der Arbeitsgruppe *Yoneda et al.* auf die Fähigkeit zur Duplexbildung durch Messung des Desazaflavin-Redoxpotentials untersucht.<sup>[107]</sup>

Bei Zugabe äquimolarer Mengen an poly-Desoxyadenosin zum Desazaflavin enthaltenden Thymidin-Decamer wurde in cyclovoltammetrischen Messungen bei 10 °C eine Verschiebung des Redoxpotentials um 120 mV beobachtet. Dieses Ergebnis ist auf eine Hybridisierung des modifizierten Thymidin-Decamers mit einem komplementären Strang (poly dA) zurückzuführen. Die Interaktion zwischen dem 5-Desazaflavin und der Nukleobase scheint auf Grund der Duplexbildung die beobachtete Veränderung des Redoxpotentials hervorzurufen.

Im Hinblick auf die Funktionsweise der Photolyase wurden zahlreiche Modellverbindungen entwickelt, die eine Nachstellung der Anordnung der Coenzyme Flavin und Desazaflavin relativ zum Pyrimidindimer-Schaden ermöglichen sollten. Diese Modellverbindungen sollten unter anderem darüber Aufschluss geben, ob der große Abstand zwischen den beiden Coenzymen, der einen optimalen Energietransfer erschwert, im Laufe der Evolution optimiert wurde oder sich zufällig ergeben hat.

Untersuchungen der Verbindungen **7 – 10** (Abb. 18) durch *Carell* und *Epple* lieferten einen tieferen Einblick in den Energietransfer zwischen dem Desazaflavin als Photoantenne und dem Flavin-Cofaktor von Photolyasen der Desazaflavinklasse.<sup>[87, 88, 115]</sup>

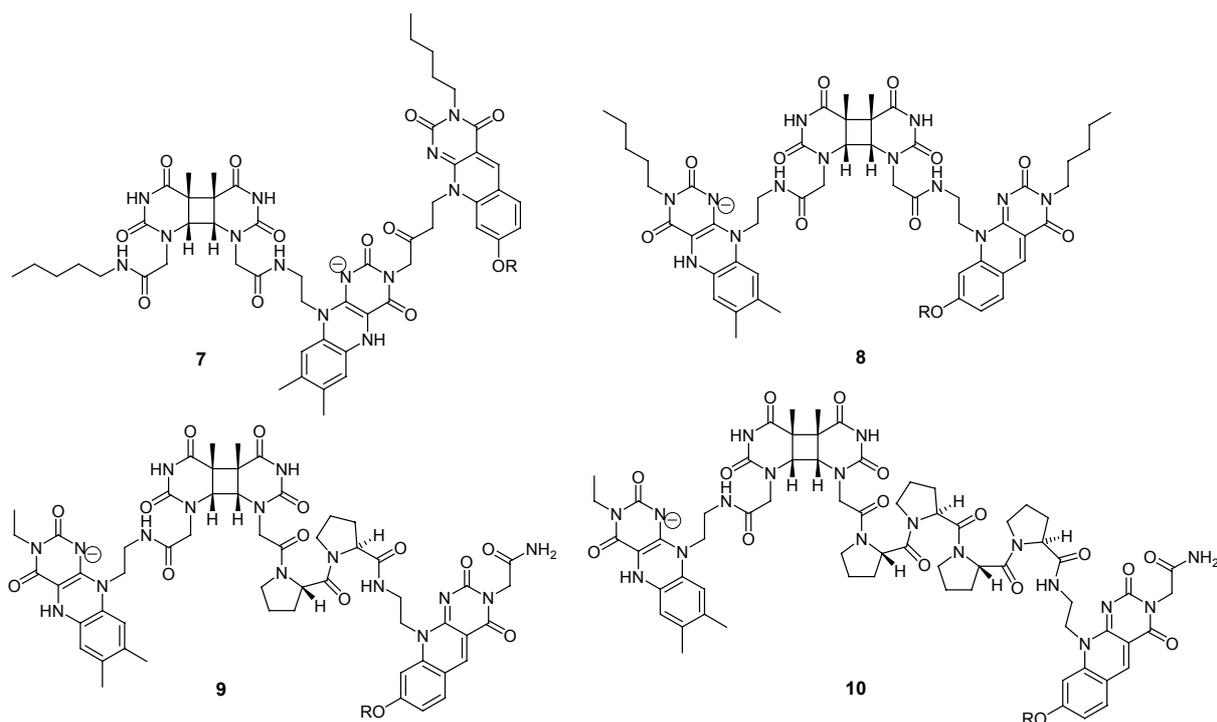


Abb. 18. Modellverbindungen 7 – 10.

Die Modellverbindungen 7 – 10 gewährleisten eine konstante Flavin-Dimer-Anordnung und einen systematisch größer werdenden Abstand zwischen dem Flavin und dem Desazaflavin. Eine Erhöhung des intramolekularen Abstands zwischen dem Flavin und dem Desazaflavin bewirkt eine Steigerung der Reparaturrate, obwohl der Energietransfer weniger effektiv wird. Bei einer kontinuierlichen Vergrößerung des Abstands zwischen Flavin und Desazaflavin bei konstantem Flavin-Pyrimidindimer-Abstand durch Einschub von Prolineinheiten resultierte eine Effizienzsteigerung der Spaltungsreaktion, obwohl die Effizienz des Energietransfers mit wachsendem Flavin-Desazaflavin-Abstand abnahm. Dieser scheinbare Widerspruch wurde mit kompetitiven Elektron-Transfer-Prozessen zwischen Flavin und Desazaflavin erklärt, die sich auf den Elektronentransfer zwischen Flavin und Dimereinheit, besonders bei kleineren Flavin-Desazaflavin-Abständen, störend auswirken. Der alternative Elektronentransfer wird durch das positivere Redoxpotential des Desazaflavins verglichen mit dem des Thymidindimers hervorgerufen.

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

---

Ein Problem dieser Modellverbindungen stellt jedoch die Flexibilität innerhalb der Moleküle dar, da hierdurch die räumliche Lage zwischen den beiden Coenzymen, vor allem bei größeren Entfernungen, nicht exakt definiert ist. Anstatt wie in Enzymen eine Proteinumgebung die exakte Lage der Coenzyme definiert, wurde für neue Modellsysteme die DNA als starre Organisationseinheit zur Untersuchung der Funktionsweise von Photolyasen gewählt. Durch Einbau von Flavin- und Dimer-Bausteinen in DNA und systematische Abstandsvariation zwischen beiden Komponenten konnten Reparaturexperimente und Abstandsabhängigkeiten von Elektronentransferprozessen vom Flavin auf das Dimer ausführlich untersucht werden. Im reduktiven Modus konnte schnelle und selektive Dimer-Reparatur beobachtet werden.<sup>[89, 108, 109]</sup>

Es wurde jedoch noch nie der Einbau eines Desazaflavin-Coenzym zusammen mit einem Flavin-Coenzym und einem Dimer-Baustein in einer Oligonukleotid-Umgebung vorgenommen.

Der Energietransfer vom Desazaflavin als Photoantenne auf das Flavin sollte die Reparatureffizienz enorm steigern, da der reduzierte Flavin-Chromophor bei Wellenlängen über 400 nm nur eine schwache Absorption zeigt.

Durch den Vergleich von durch *Behrens* untersuchte Flavin und Dimer enthaltende DNA-Stränge<sup>[116]</sup> mit Strängen, die ein zusätzlich eingebautes Desazaflavin-Chromophor enthalten, könnte der Veränderung der Reparaturrate des Dimers systematisch nachgegangen werden.

Weiterhin könnten durch Variation des Abstandes zwischen Desazaflavin- und Flavin-Einheit bei konstantem Flavin-Dimer-Abstand in der DNA als Organisationseinheit die Energietransferprozesse und die Abhängigkeit der Reparatureffizienz vom Abstand der Coenzyme zueinander nochmals exakt an einem sehr rigiden System untersucht werden.

### 3.2.2 Synthese eines Desazaflavin-DNA-Bausteins

Auf Grund der in Kapitel 3.1 gewonnenen Erkenntnisse über die Destabilisierung von DNA-Doppelsträngen durch das eingebaute Riboflavinderivat **3** wurde beschlossen, die Synthese des dem Riboflavinbaustein **3** entsprechenden 5-Desazariboflavin **11** (Abb. 19) als DNA-Baustein nicht weiter fortzusetzen. Zudem ergaben erste Syntheseveruche, dass dieser Baustein auf Grund seiner sehr schlechten Löslichkeit für den Einbau in DNA an der festen Phase wohl ungeeignet sein würde.

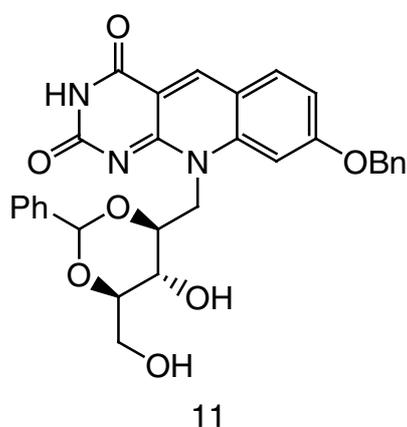


Abb. 19. 5-Desazariboflavin **11**.

Es wurde daher die Synthese eines anderen 5-Desazaflavinderivats **12** mit der in Abbildung 20 gezeigten Struktur gewählt. Hier liegt am N(10)- und N(3)-Atom eine C-Kette vor, die am Ende jeweils eine Hydroxy-Gruppe trägt. Der so ausgestattete Baustein kann somit, im Gegensatz zu den Versuchen von *Yoneda* und *Fontecave et al.*,<sup>[106, 114]</sup> nach für die Festphasensynthese erfolgten Standardschutzmethoden nicht nur ans *Ende*, sondern auch *innerhalb* eines Oligonukleotids über Phosphordiesterbindungen eingebaut werden.

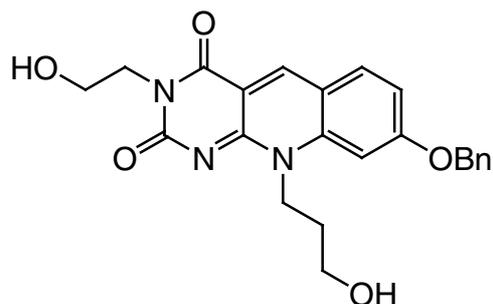
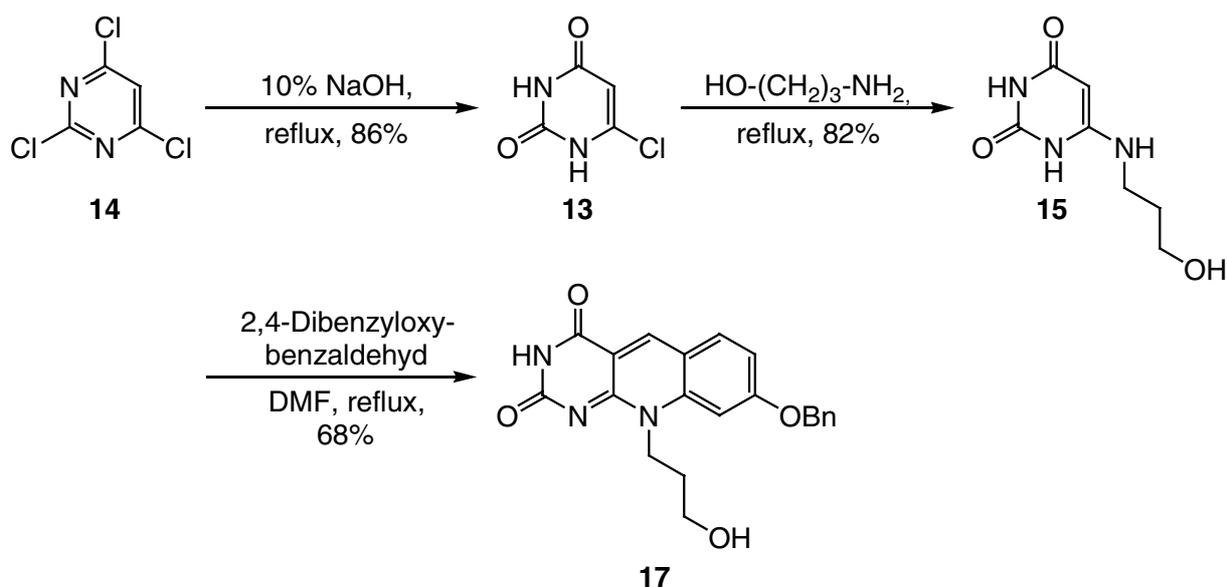


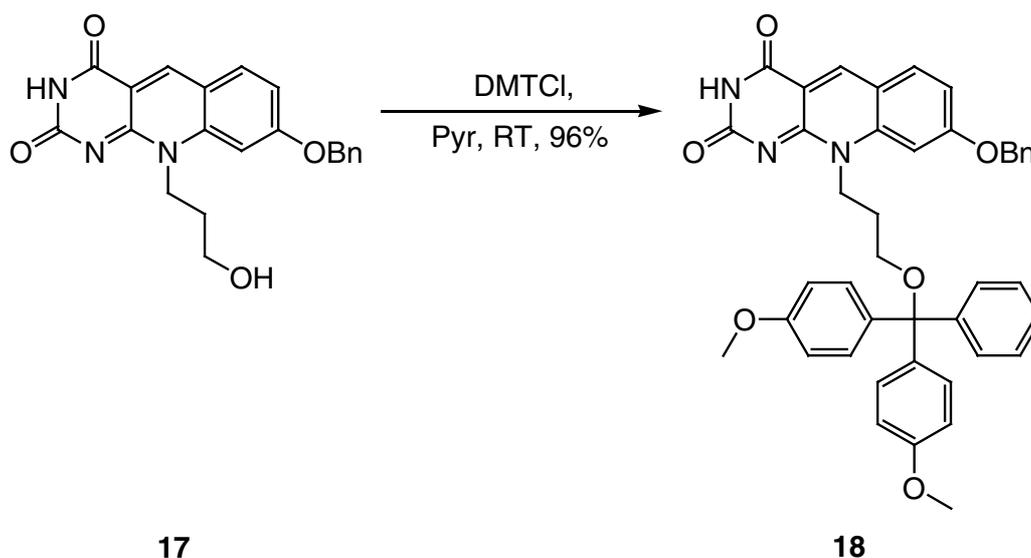
Abb. 20. 5-Desazaflavin-DNA-Baustein **12**.

Ausgehend von 6-Chloruracil **13**, das durch Umsetzung von 2,4,6-Trichloropyrimidin **14** mit NaOH-Lösung erhalten wurde, konnte durch Reaktion mit 3-Aminopropanol das Chloruracilderivat **15** synthetisiert werden. Die Umsetzung von **15** mit 2,4-Dibenzyloxybenzaldehyd **16** in DMF unter Rückfluss führte mit einer Ausbeute von 68% zum Desazaflavin **17** (Schema 10).

Das Desazaflavin **17** trägt eine 3-Hydroxypropyl-Gruppe am N(10)-Atom. Bevor sich die N-Alkylierung am N(3)-Atom des Heterocyclus anschließt, muss die Hydroxygruppe zunächst nach Standardmethoden DMT-geschützt werden. Auf Grund des noch sehr schlechten Löslichkeitsverhaltens der Verbindung **17** musste die Reaktionszeit jedoch auf 69 h erhöht werden, um eine nahezu vollständige Umsetzung erreichen zu können (DC-Kontrolle). Das geschützte Desazaflavin **18** konnte in einer Ausbeute von 96% erhalten werden (Schema 11). Eine direkte Phosphitylierung der OH-Gruppe zum Einbau des Desazaflavins in DNA ergab einen in allen organischen Lösungsmitteln nur sehr schlecht löslichen Baustein und war somit mit nur einer OH-Gruppe als endständige Base eines DNA-Strangs nicht geeignet.



Schema 10. Synthese des Desazaflavin-Derivats 17.



Schema 11. DMT-Schützung des Desazaflavin-Derivats 17.

Für die N-Alkylierung an N(3) wurde zunächst die Reaktion mit Alkyljodiden untersucht. Für Versuchszwecke wurde als erstes die Umsetzung mit 6-Iodhexan-1-ol durchgeführt. Das Alkylierungsreagenz konnte nach *Denniff* aus 6-Bromhexan-1-ol synthetisiert werden. Die Alkylierung von 18 wurde analog einer Vorschrift von *Epple* für Alkylierungen mit Ethyljodid durchgeführt.<sup>[115]</sup> Durch Umsetzung mit 6-

Iodhexan-1-ol (4.4 eq) in DMF mit Cäsiumcarbonat als Base (6.0 eq) konnte jedoch das gewünschte Produkt nicht hergestellt werden. Um festzustellen, ob prinzipiell eine Alkylierung von **18** möglich ist, erfolgte die Umsetzung mit Methyljodid unter den gleichen Bedingungen. Mittels DC-Kontrolle des Reaktionsverlaufs zeigte sich, dass bereits nach 1 h mehr als 50% des Desazaflavinderivats **18** umgesetzt worden war. Auch mit Ethyljodid konnte eine rasche Umsetzung zum Alkylierungsprodukt beobachtet werden.

Es wurde daher vermutet, dass die nicht erfolgreiche Alkylierungsreaktion mit 6-Iodhexan-1-ol auf Nebenreaktionen zurückzuführen war. Unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen war die Polymerisierung des 6-Iodhexan-1-ol denkbar.

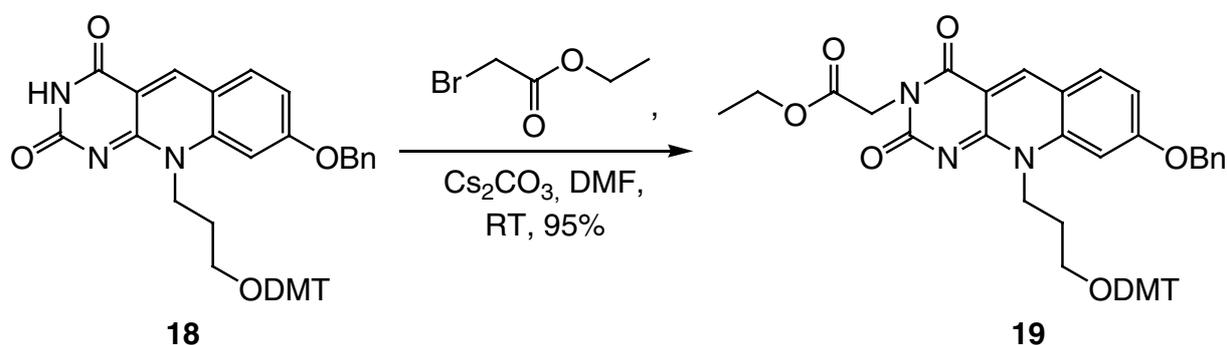
Erst durch eine Abwandlung der Reaktionsbedingungen konnte eine Alkylierung mit 2-Iodethanol beobachtet werden. Eine Erhöhung des Überschusses an 2-Iodethanol auf 7 eq bei gleichzeitiger Verminderung des Basenanteils auf 1.5 eq bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C führte zu einer teilweisen Umwandlung von **18** in das entsprechende Alkylierungsprodukt. Diese Umsetzung war jedoch mittels DC-Kontrolle nicht zu erkennen, da das Edukt **18** und das Produkt einen sehr ähnlichen  $R_f$ -Wert besitzen. Erst durch Reaktionskontrolle des Reaktionsgemischs mittels RP-HPLC-MS konnte der Alkohol an N(3)-Position detektiert werden. Auf Grund des geringen Umsatzes der Reaktion und der nur mit großem Aufwand möglichen Trennung der Verbindungen wurde diese Methode verworfen. Das Problem gleicher  $R_f$ -Werte wurde von *Behrens* auch für Flavine beobachtet, jedoch konnte hier das Problem der Trennung umgangen werden, da die Flavinderivate bereits bei RT nahezu vollständig in das Alkylierungsprodukt umgewandelt wurden.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3 dargestellt.

Alkylierungsreagenz	eq	T / °C	Umsetzung von <b>18</b>
MeI	4.4	20	+
EtI	4.4	20	+
I(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	6.8	20	-
I(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	6.8	60	+
I(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> OH	4.4	20	-
I(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> OH	7.0	20	-

Tabelle 3. *N*-Alkylierung von **18**.

Um die problematische Alkylierung mit 2-Iodethanol zu umgehen, wurde beschlossen, Bromessigsäureethylester als Alkylierungsmittel zu verwenden. Hierzu wurde das Desazaflavin **18** mit Cäsiumcarbonat (1.2 eq) und Bromessigsäureethylester (3.0 eq) in DMF bei RT umgesetzt (Schema 12). Mittels DC-Kontrolle ließ sich feststellen, dass nach 19 h nahezu eine vollständige Umsetzung in das Alkylierungsprodukt **19** stattgefunden hatte. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte **19** mit einer Ausbeute von 95% isoliert werden. Hierbei musste ein Gradient beginnend mit sehr unpolarem Laufmittel verwendet werden, da sonst trotz Zugabe von Triethylamin freiwerdendes DMT und auch nicht umgesetztes Edukt nicht vom Produkt abgetrennt werden konnten.

Schema 12. *N*-Alkylierung von **18** mit Bromessigsäureethylester.

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

---

Im nächsten Syntheseschritt musste die Estergruppe zum primären Alkohol reduziert werden. Die Reaktionsbedingungen durften hierbei weder zu mild sein, so dass die Reaktion beim Aldehyd stoppt, noch zu stark, um eine Reduktion des Heterocyclus zu vermeiden.

Natriumborhydrid ist ein mildes Reduktionsmittel und als solches im allgemeinen nur langsam in der Lage, einen Ester zum entsprechenden Alkohol zu reduzieren. Das reduzierende Potential von Borhydriden kann jedoch durch die Wahl der Reaktionskonditionen modifiziert werden. Zu den beeinflussenden Faktoren zählen die Art des Lösungsmittels und die Anwesenheit von Salzen wie LiCl, CaCl<sub>2</sub> und AlCl<sub>3</sub>, die die reduzierenden Eigenschaften erhöhen können.<sup>[117, 118]</sup>

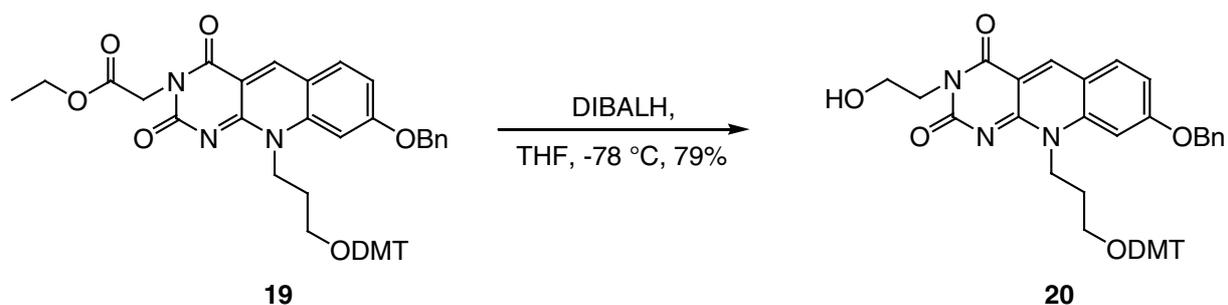
Es wurden daher Testansätze mit **19**, NaBH<sub>4</sub> und den jeweiligen Metallsalzen durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde Diglyme verwendet, da NaBH<sub>4</sub> nur hier signifikante Löslichkeit und Reaktivität zeigt.<sup>[117]</sup> Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der durchgeführten Reaktionen und Bedingungen.

Ester (eq)	Reduktionsmittel (eq)	M <sub>x</sub> Cl <sub>y</sub> (eq)	Reaktion
<b>19</b> (1)	NaBH <sub>4</sub> (0.6)	—	—
<b>19</b> (1)	NaBH <sub>4</sub> (0.6)	LiCl (0.2)	—
<b>19</b> (1)	NaBH <sub>4</sub> (0.6)	CaCl <sub>2</sub> (0.2)	—
<b>19</b> (1)	NaBH <sub>4</sub> (0.6)	AlCl <sub>3</sub> (0.2)	— +*

Tabelle 4. Reduktion von **19** mit NaBH<sub>4</sub> in Anwesenheit verschiedener Metallsalze M<sub>x</sub>Cl<sub>y</sub> in Diglyme bei einer Temperatur von jeweils 25 und 50 °C, (\* bei 50 °C).

Wie zu erwarten gewesen war, ist mit reinem NaBH<sub>4</sub> keine Reduktion des Esters zum entsprechenden Alkohol beobachtet worden. Bei RT wurde jedoch auch durch Zugabe der Metallsalze keine Reaktion hervorgerufen. Erst bei einer erhöhten Reaktionstemperatur konnte das Entstehen neuer Produkte beobachtet werden. Im Fall von AlCl<sub>3</sub> wurde der generierte Aldehyd und Alkohol beobachtet, jedoch traten hier und bei den anderen Metallsalzen erhebliche Nebenreaktionen auf.

Auf Grund der Nebenreaktionen mit  $\text{NaBH}_4$  wurde beschlossen, ein anderes Reduktionsmittel, Diisobutylaluminiumhydrid (DIBALH), zu testen. Hierzu wurde **19** in trockenem THF suspendiert und anschließend DIBALH (als Lösung in Hexan oder Dichlormethan) hinzugegeben. Es mussten hiervon jedoch im gesamten immer mindestens 5 eq hinzugefügt werden, um den zunächst entstehenden Aldehyd in den entsprechenden Alkohol zu überführen. Die Entstehung des Aldehyds und des Alkohols wurden mittels DC-Kontrolle verfolgt und konnten mittels RP-HPLC-MS im Reaktionsgemisch nachgewiesen werden. Die Abtrennung des Produktes von Aldehyd (10%) und Edukt konnte nur mittels säulenchromatographischer Reinigung mit Silica-*H* effektiv vorgenommen werden. Auf diesem Wege wurde das Produkt **20** mit einer Ausbeute von 79% in Form eines gelben Öls in ausgezeichneter Reinheit erhalten (Schema 13).

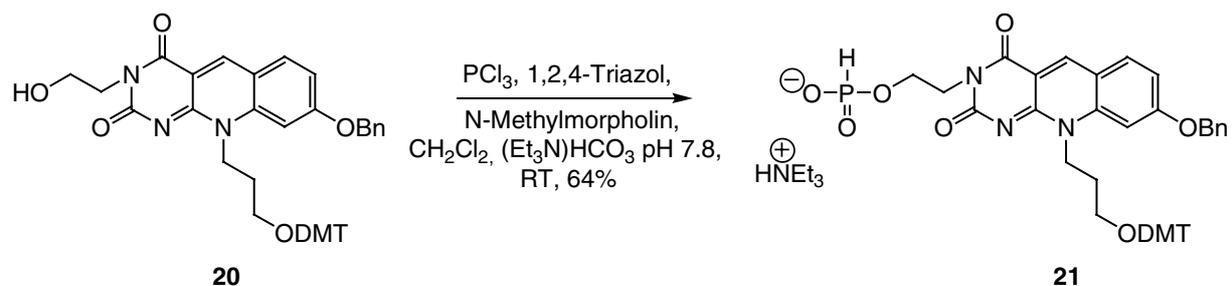


Schema 13. Reduktion von **19** mit DIBALH.

An die Reduktion zum Alkohol **20** schließt sich der letzte Schritt der für die DNA-Synthese benötigten Phosphitylierung der OH-Gruppe an. Diese kann im allgemeinen in Form des Phosphoramidits oder des *H*-Phosponats erfolgen. Die Schützung des Desazaflavins mit der Phosphoramiditgruppe war jedoch nicht möglich, da das Produkt in Gegenwart von Licht und Sauerstoff oxidiert wurde. Im  $^{31}\text{P}$ -NMR konnte nur das Phosphoramidat nachgewiesen werden. Die *H*-Phosponat-Chemie stellt die Alternative zur Phosphoramidit-Chemie in der Oligonukleotid-Synthese dar. Um das Desazaflavin **20** in das *H*-Phosponat **21** zu überführen, wurden unter Inertgasatmosphäre in Methylenchlorid 5.0 eq  $\text{PCl}_3$  und 50.0 eq *N*-Methylmorpholin gegeben und danach 16.6 eq 1,2,4-Triazol hinzugefügt. Das Desazaflavin wurde als Suspension in Methylenchlorid zugetropft und nach einer

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

Reaktionszeit von 4 h mit Pufferlösung ( $(\text{Et}_3\text{N})\text{HCO}_3$ , pH 7.8) hydrolisiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte der Desazaflavin-DNA-Baustein **21** mit einer Ausbeute von 64% in reiner Form isoliert werden. Das Vorliegen des *H*-Phosphonats wurde an Hand der charakteristischen  $^1\text{J}_{\text{P-H}}$ -Kopplungskonstante von 620 Hz mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie bestätigt.



Schema 14. Synthese des *H*-Phosphonats **21**.

3.2.2.1 DNA-Synthese

Der Desazaflavin-DNA-Baustein **21** besitzt zwei für die Synthese an der festen Phase geschützte Hydroxygruppen und kann somit auch innerhalb eines Oligonukleotids an jeder beliebigen Stelle integriert werden. Um ein Modellsystem zu generieren, mit dem die Distanzabhängigkeit der Energietransferprozesse zwischen Desazaflavin und Flavin und die vermutlich gesteigerte Reparatureffizienz des Dimers gegenüber Desazaflavin-freien Oligonukleotiden untersucht werden kann, wurden die in Abbildung 21 gezeigten Desazaflavin enthaltenden DNA-Stränge **S13** und **S14** synthetisiert. Hybridisierung mit einem Flavin- und Dimer-haltigen Gegenstrang ergibt für die oben genannten Untersuchungen geeignete Doppelstränge.

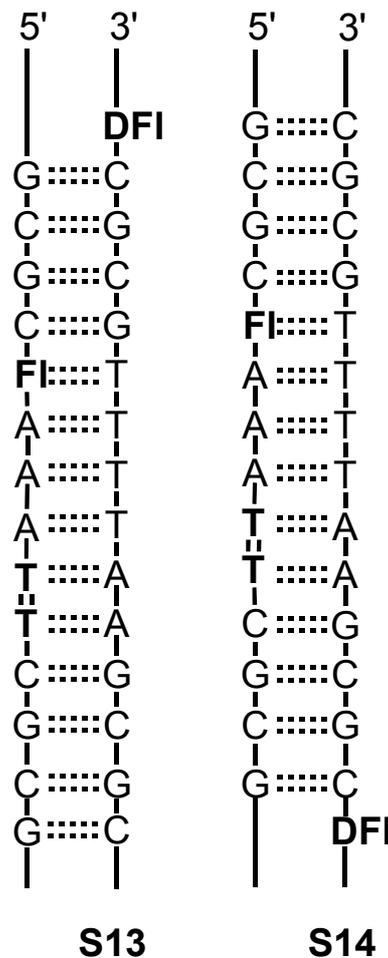


Abb. 21. DNA-Doppelstränge mit inkorporiertem Desazaflavin (DFI), Flavin (FI) und Thymidindimer (T=T).

Diese so modifizierten Doppelstränge sollten nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge eine Untersuchung des möglichen Energietransfers vom Desazaflavin auf das Flavin und der anschließenden Reparatur des Thymidindimers erlauben. Die erhaltenen Reparaturraten könnten anschließend mit den analogen Desazaflavin-freien Strängen verglichen werden.

Da der Desazaflavin-Baustein **21** in Form des *H*-Phosphonats vorliegt ist auch hier wie beim Flavin-Baustein (Kapitel 3.1) ein kombiniertes Phosphoramidit/*H*-Phosphonat-Protokoll für die DNA-Synthese an der festen Phase notwendig. Für den Einbau der Desazaflavin-Base in Oligonukleotide wurde zunächst das Protokoll für den Einbau des Riboflavin-Bausteins verwendet. Somit betrug die Kupplungszeit des Desazaflavin-*H*-Phosphonats 10 min. Die Kupplungszeit des auf das *H*-Phosphonat folgenden Nukleotids wurde wie beim Flavin auf 5 min erhöht, da sonst auf Grund der sterischen Hinderung der künstlichen Base nur geringe Einbauausbeuten erhalten werden. Auf Grund der eher geringen Kupplungsausbeute beim Einbau des Desazaflavins in die DNA wurde die Kupplungszeit auf 20 min heraufgesetzt. Alternativ wurde auch eine Synthese mit doppelter Kupplung (2x10 min) getestet. Es konnte jedoch keine wesentliche Verbesserung des Einbaus beobachtet werden. Daher wurden nur die erstmals erhaltenen modifizierten DNA-Stränge auf den erfolgreichen Einbau des Desazaflavin-Bausteins hin untersucht.

#### 3.2.2.2 *Reinigung der DNA-Stränge*

Die synthetisierten DNA-Stränge wurden vom Träger abgespalten, entschützt und mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Anschließend wurde ihre Reinheit mittels analytischer RP-HPLC kontrolliert. Abbildung 22 a) zeigt exemplarisch die HPL-Chromatogramme des synthetisierten Roh-DNA-Strangs **S14**, detektiert bei den Wellenlängen 260 und 450 nm. In Abbildung 22 b) sind die entsprechenden HPL-Chromatogramme des gereinigten DNA-Strangs dargestellt. Die starke Fluoreszenz des Desazaflavin-Bausteins (untere Chromatogramme) ist deutlich zu erkennen.

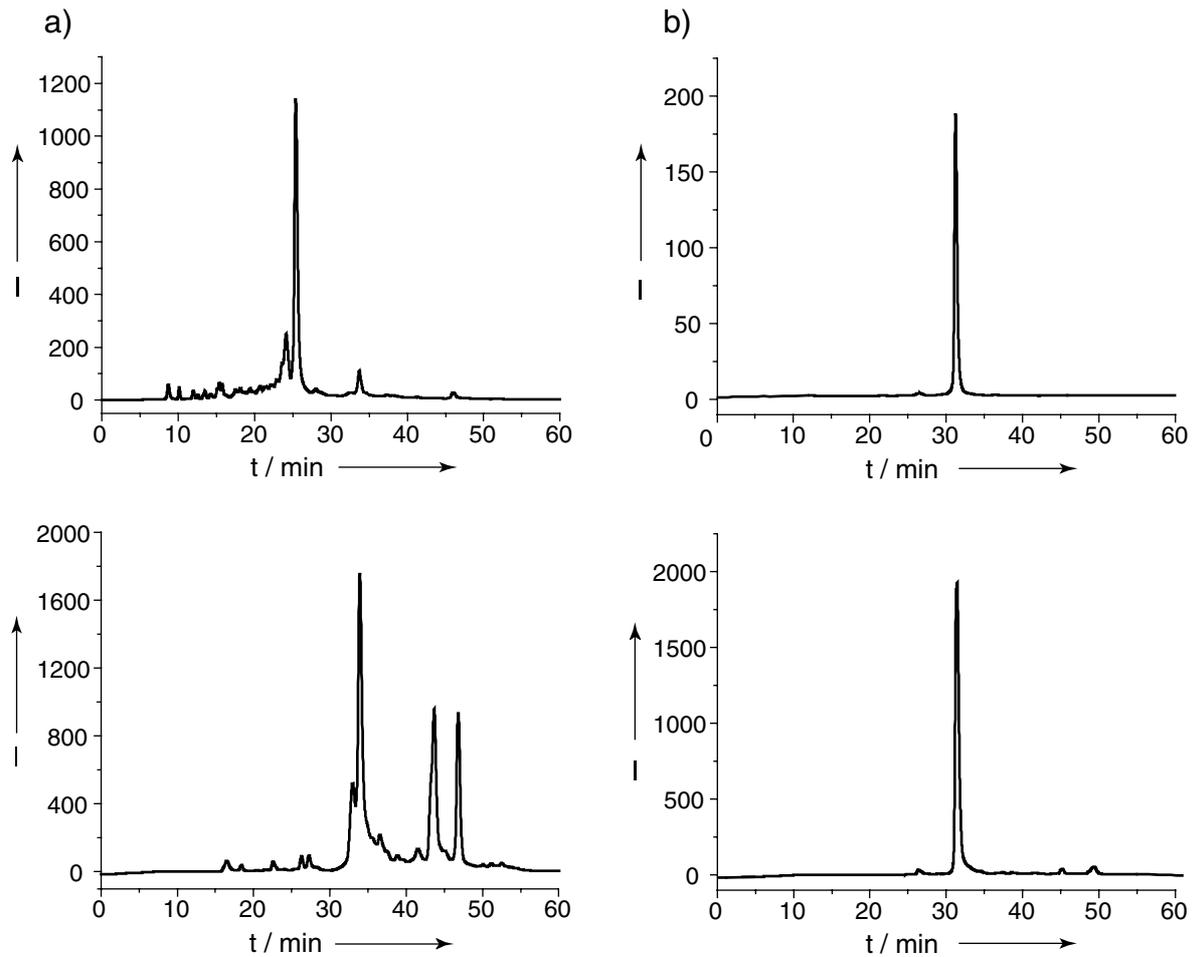


Abb. 22. HPL-Chromatogramme des Desazaflavin enthaltenden DNA-Strangs **S14**. a) Roh-DNA-Strang, b) Gereinigter DNA-Strang. Oben: detektiert bei 260 nm im UV; unten: Fluoreszenzdetektion mit  $\lambda_{\text{ex.}} = 400 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 450 \text{ nm}$ .

Um das tatsächliche Vorliegen des Desazaflavins in den DNA-Strängen **S13** und **S14** zu bestätigen, wurden ihre Massen mittels MALDI-TOF-Spektroskopie bestimmt. Für beide synthetisierte Stränge wurden die theoretisch ermittelten Molekulargewichte erhalten. Das Massenspektrum in Abbildung 23 zeigt exemplarisch den DNA-Strang **S14**.

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

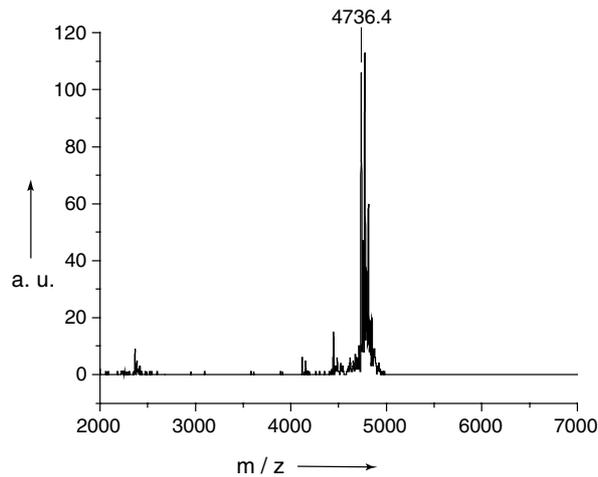


Abb. 23. MALDI-TOF-Massenspektrum des Desazaflavin enthaltenden DNA-Strangs **S14**.

#### 3.2.2.3 Eigenschaften von Desazaflavin enthaltender DNA

Zur Untersuchung der optischen Eigenschaften von Desazaflavinen in einer Oligonukleotid-Umgebung wurden UV-Vis-Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren der synthetisierten Desazaflavin enthaltenden DNA-Stränge aufgenommen. In Abbildung 24 ist exemplarisch das UV- und Fluoreszenz-Verhalten des Strangs **S14** bei pH = 7 dargestellt.

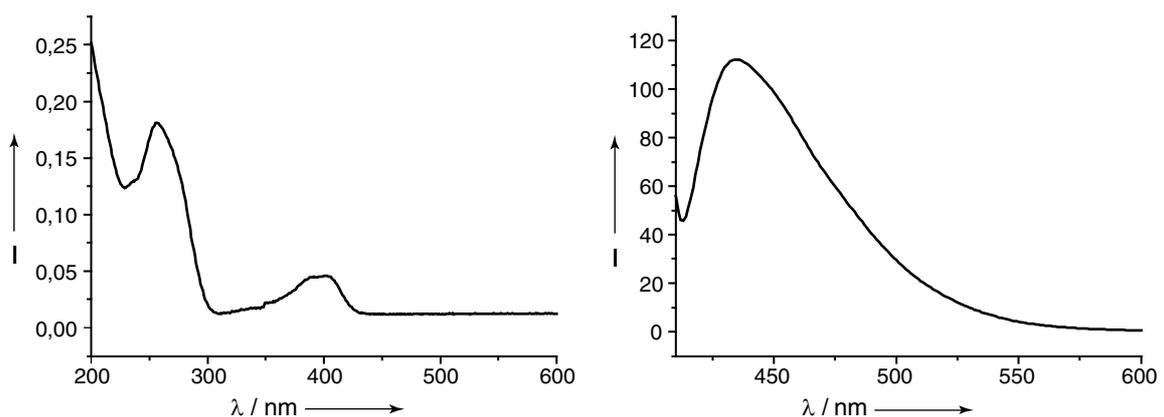


Abb. 24. UV-Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ( $\lambda_{\text{ex.}} = 400 \text{ nm}$ ) des Desazaflavin enthaltenden DNA-Strangs **S14**.

Im UV-Absorptionsspektrum erkennt man bei 260 nm das Vorliegen der Oligonukleotid-Sequenz. Das inkorporierte Desazaflavin zeigt, wie für an der Position C(8)O benzylierte oder protonierte Verbindungen ("Hydroxy"-Form) erwartet, ein Absorptionsmaximum bei 400 nm (vergleiche Kapitel 1.7). Das Fluoreszenzmaximum des Desazaflavin enthaltenden DNA-Strangs liegt bei 435 nm. Diese Verschiebung kann durch Wechselwirkungen des Desazaflavins mit der Oligonukleotid-Umgebung hervorgerufen werden. Ein ähnliches Fluoreszenz-Verhalten wird auch von *Yoneda et al.* für einen Desazaflavin-haltigen Strang beschrieben.<sup>[119]</sup> Das Absorptionsspektrum unterscheidet sich jedoch von dem in Abbildung 24 gezeigten Spektrum. Von *Yoneda* wurde ein Absorptionsmaximum von 420 nm bestimmt. Hier befindet sich ein Stickstoffsubstituent an der Stelle C(8) des Desazaflavins. Die bei höheren Wellenlängen auftretende Absorption kann durch die stärkeren Donor-Eigenschaften des Stickstoffs im Vergleich zum Sauerstoff erklärt werden.

Die UV- und Fluoreszenz-Eigenschaften eines Desazaflavins in DNA stehen somit in engem Zusammenhang mit seinem Umfeld und den Substituenten an der Stelle C(8).

#### 3.2.2.4 Molecular Modelling

Um eine genauere Vorstellung von der Struktur des in die Oligonukleotide eingebauten Desazaflavins erhalten zu können, wurden kurze Molekular-Dynamik-Simulationen durchgeführt. Hierzu wurden im Kraftfeld *Amber 7.0* zwei Doppelstränge gerechnet, in denen die Desazaflavinbase einmal mit der C2-Kette am 5'-Ende und im anderen Fall mit der C3-Kette am 3'-Ende mit der DNA verbunden ist. Die Verknüpfung des Desazaflavins bestimmt hierbei die Lage relativ zum nächsten Basenpaar. Ist das Desazaflavin über das N(10) am 3'-Ende verknüpft, so liegt es eher orthogonal auf dem nachfolgenden Basenpaar. Liegt eine Verknüpfung vom 5'-Ende mit dem N(3)-Atom vor, so kommt das Desazaflavin genau auf dem letzten Basenpaar zu liegen. Der Benzolring zeigt hingegen eine hohe Flexibilität. In der gesamten

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

---

Molekular-Dynamik-Simulation liegen die Desazaflavine stabil auf dem Doppelstrang und können  $\pi$ -stacking-Wechselwirkungen eingehen.

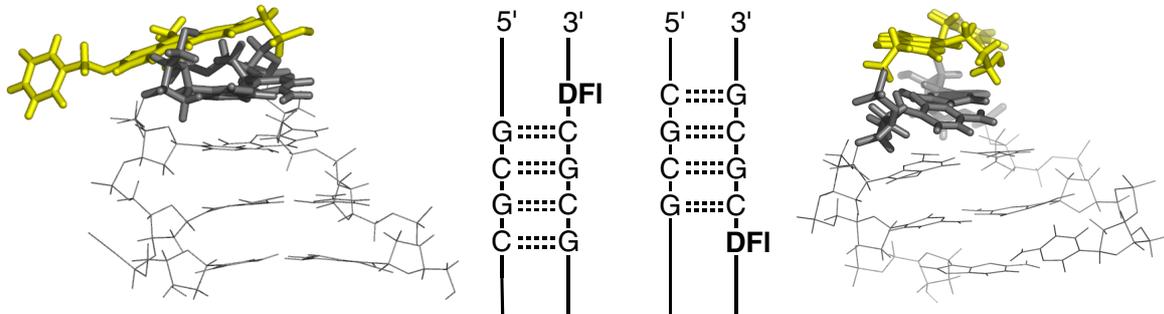


Abb. 25. Gerechnete Strukturen von Desazaflavin-überkappten DNA-Doppelsträngen (*Amber 7.0* in  $\text{H}_2\text{O}$ , 500 ps, no restraints, 12 Å periodic box).

### 3.2.3 Synthese von Desazaflavin-DNA-*Hairpin*-Bausteinen

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass Desazaflavine stabil in DNA-Doppelstränge eingebaut werden können. Eine andere Möglichkeit, Desazaflavine in eine Oligonukleotid-Umgebung einzubetten, ist die Inkorporation in DNA-*Hairpins*. Um Störungen innerhalb des doppelsträngigen Rumpfes zu vermeiden, bietet sich der Einbau der Desazaflavinbase in der Kopfregion an. Hierzu müssen Desazaflavin-Bausteine entwickelt werden, die geeignete *Linker*-Längen am N(3)- und N(10)-Atom aufweisen. Über diese beiden Stellen kann die Bindung zum DNA-Strang stattfinden. Der zuvor beschriebene Baustein mit C2- und C3-*Linkern* sollte gemäß Untersuchungen von Behrens mit einem Flavin-Baustein mit C3-, C3-*Linkern* (siehe Abb. 17) ungeeignet sein.<sup>[108]</sup> Die *Linker*-Einheit ist hier zu kurz, was zu einer Störung der Helixstruktur führt. Daher wurden für den Einbau in DNA-*Hairpins* Desazaflavin-Bausteine mit den in Abbildung 26 dargestellten Strukturen ins Auge gefasst.

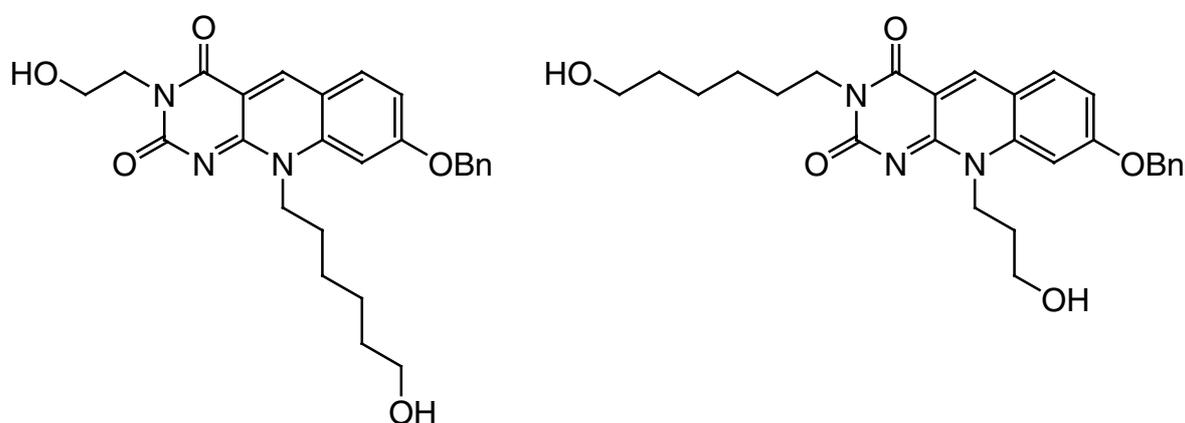
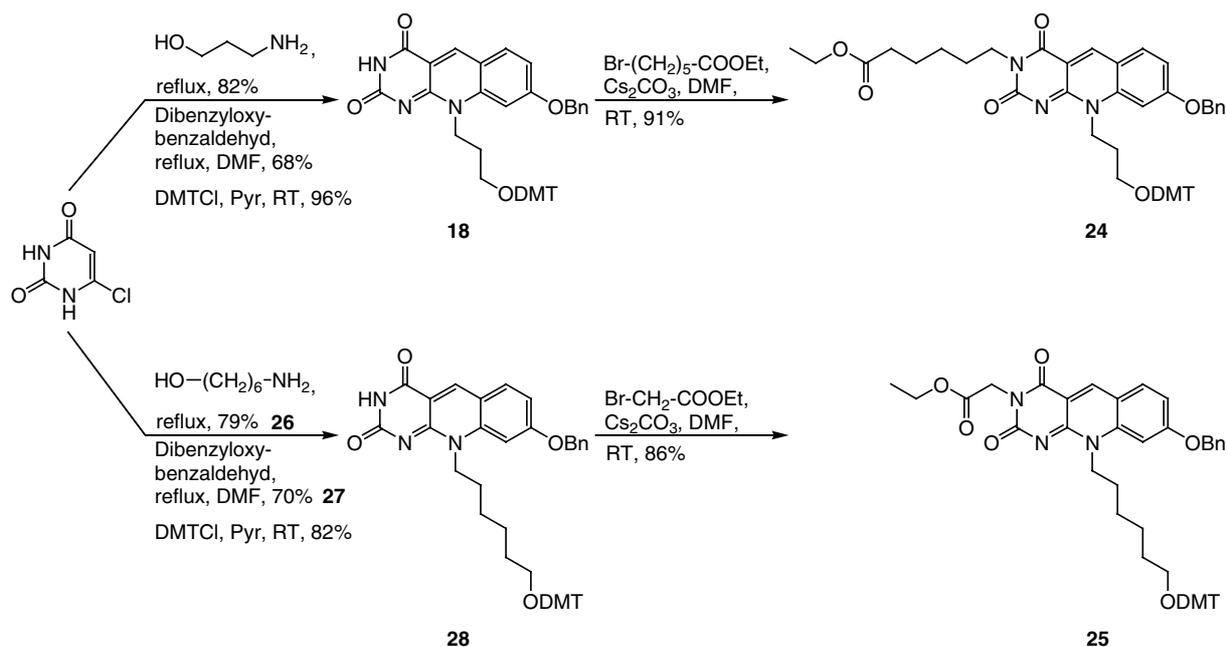


Abb. 26. Desazaflavin-Bausteine **22** und **23** für den Einbau in DNA-*Hairpins*.

Zur Verknüpfung mit der DNA besitzt der linke Baustein eine Ethylkette am N(3)- und eine Hexylkette am N(10)-Atom. Der rechte Baustein enthält eine Hexylkette am N(3)- und eine Propylkette am N(10)-Atom. Gemäß *Modelling*-Studien für Flavin-Bausteine sollten diese Verbindungen für den Einbau in DNA-*Hairpins* gut geeignet sein.<sup>[108]</sup>

### 3. Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Nukleotiden in DNA

Die Syntheseroute der Desazaflavin-Bausteine ist in Schema 15 skizziert. Die Darstellung erfolgt hierbei analog der alkylierten Desazaflavin-Verbindung **19**. Nach Alkylierung mit Bromhexansäureethylester (Verbindung **24**) bzw. Bromessigsäureethylester (Verbindung **25**) schließt sich die Reduktion zum entsprechenden Alkohol und die Phospitylierung an. Diese beiden Schritte wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.



Schema 15. Synthese der Desazaflavine **24** und **25**.

#### 3.2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Desazaflavin-Baustein synthetisiert, der über *H*-Phosphonat-Chemie sowohl an das 3'-Ende als auch an das 5'-Ende eines DNA-Stranges gebunden werden kann. Wie die *Molecular-Modelling*-Ergebnisse zeigen, scheint das Desazaflavin in einem Doppelstrang, besonders am 5'-Ende, gut mit dem benachbarten Basenpaar zu stapeln und die Duplex-Struktur wird nicht gestört. Somit ist dieser Baustein gut geeignet, um die in Abbildung 21 gezeigten Modellsysteme realisieren zu können. Die so modifizierten Doppelstränge könnten die Situation der Coenzyme in der Photolyase nachstellen und eine Untersuchung

der Wirkung des Desazaflavins als Photoantenne und der Distanzabhängigkeit des Energietransfers zwischen Desazaflavin und Flavin ermöglichen. Hierbei ist der Abstand zwischen dem Desazaflavin als lichtsammelndem Molekül und dem Flavin beliebig durch Einschub oder Weglassen von Nukleotiden variierbar. Ist ein Energietransfer vom Desazaflavin auf das Flavin möglich, so sollte die Reparatureffizienz eines Dimer-Schadens in der DNA gesteigert werden, da das reduzierte Flavin bei Wellenlängen über 400 nm nur eine schwache Absorption zeigt.

Eine sehr grundlegende Frage besteht darin, ob eine Oligonukleotid-Umgebung dazu befähigt ist, in der gleichen Weise wie das Protein-Umfeld in den Coenzym-abhängigen Enzymen, die katalytischen Eigenschaften des Desazaflavin-Coenzym zu beeinflussen. Im Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass Flavin-Coenzyme in der DNA redoxkatalytische Eigenschaften besitzen. Auch 5-Desazaflavine können sehr effizient in Gegenwart von EDTA photoreduziert werden (siehe Kapitel 1.7). Dies führt zur Bildung von hochreaktiven Desazaflavin-Radikalen mit sehr niedrigem Redoxpotential. Solche Radikale wurden von *Hemmerich* und *Massey* als Reduktans benutzt, um Flavoproteine zu photoreduzieren. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant zu untersuchen, ob ein Desazaflavin auch im Oligonukleotid-Umfeld eine katalytische Wirkung entfaltet.

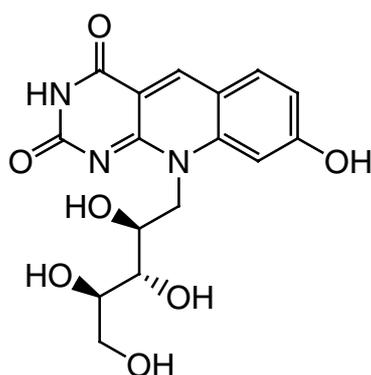
## 4 Co-Kristallstruktur der DNA-Photolyase aus *A. nidulans*

### 4.1 Einleitung

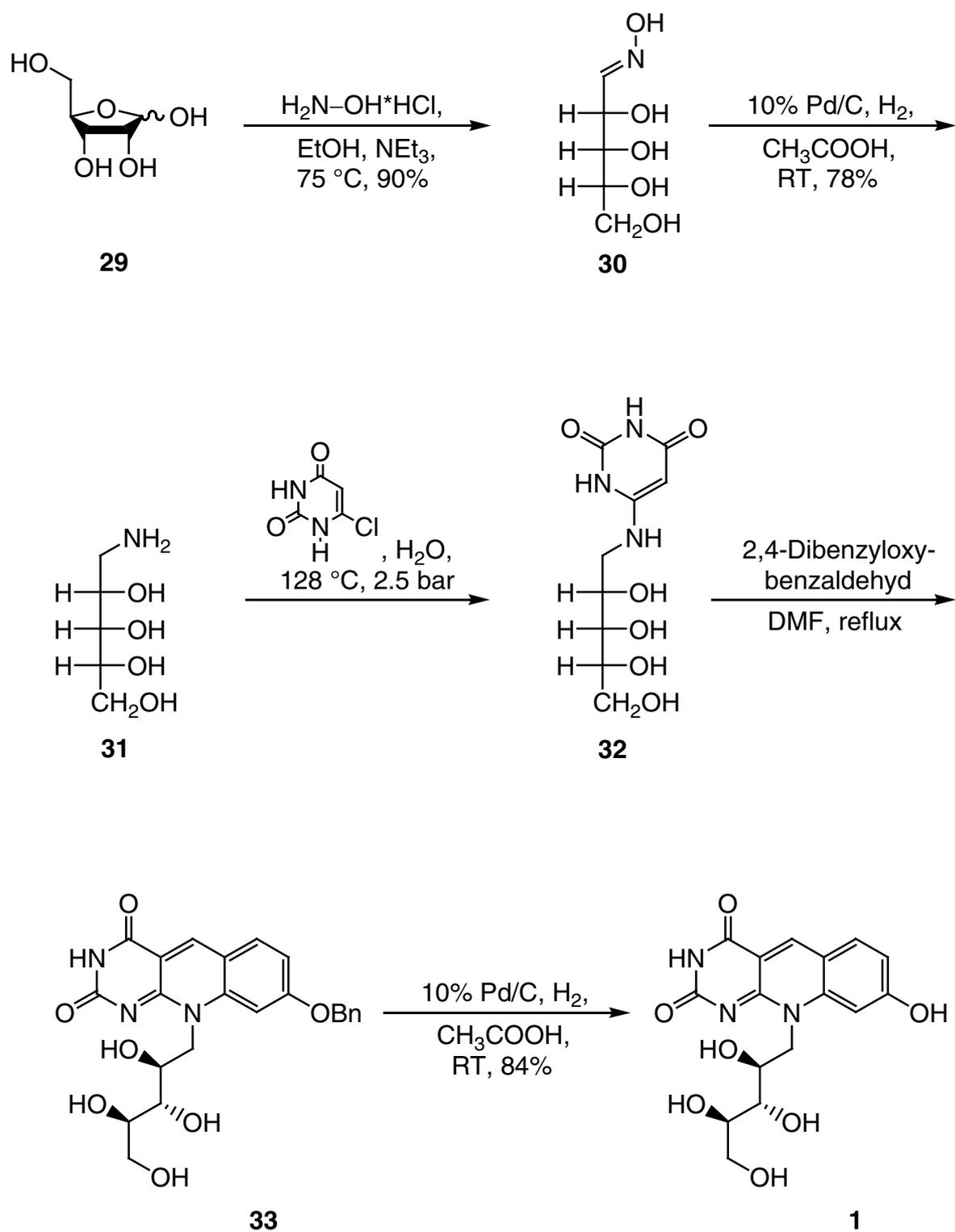
Cyclobutan-Thymidindimere sind die Hauptphotoprodukte in der DNA, die durch Einwirkung von UV-Strahlung hervorgerufen werden. Diese DNA-Schäden sind, wenn sie unrepariert bleiben, hoch mutagen und cancerogen.<sup>[1, 10]</sup> Es ist daher zur Zeit von großem Interesse, die in der Photolyase ablaufenden Mechanismen zu untersuchen, durch welche UV-induzierte Photoschäden detektiert und repariert werden. Photolyasen der Desazaflavin-Klasse sind Flavin- und Desazaflavin-abhängige Reparaturenzyme. Sie reparieren in Bakterien, Pflanzen und vielen Tieren diese Photoschäden ohne Exzisions-Prozess in einer direkten durch Sonnenlicht initiierten Katalyse. Obwohl die Kristallstrukturen von drei Photolyasen bereits gelöst wurden,<sup>[24, 25, 32]</sup> ist bis heute keine Co-Kristallstruktur dieses Enzyms zusammen mit dem Substrat, Thymidindimer enthaltender DNA, erhalten worden. Um jedoch den genauen Erkennungs- und Bindungsmechanismus der Photolyasen aufklären zu können, ist die Struktur des Enzym/Substrat-Komplexes von enormer Bedeutung.

### 4.2 Synthese des F<sub>0</sub>-Cofaktors

Um eine Protein/DNA-Co-Kristallstruktur erhalten zu können, sind sowohl das Enzym, als auch das DNA-Substrat in größeren Mengen erforderlich. Die DNA-Photolyase aus dem Cyanobakterium *Anacystis nidulans* wird in *Escherichia coli* überexprimiert.<sup>[120]</sup> *E. coli*-Zellen sind jedoch nicht befähigt, 8-Hydroxy-5-desazaflavin (F<sub>0</sub>) zu synthetisieren. Aus diesem Grund wird im Zuge der Überexprimierung das Enzym aus der Desazaflavin-Klasse ohne seinen zweiten Cofaktor F<sub>0</sub> (Abb. 27) erhalten, es wird nur die Flavin enthaltende Apophotolyase isoliert. F<sub>0</sub> ist nicht kommerziell erhältlich. Daher ist für eine Protein-Struktur, die *beide* Cofaktoren FADH<sup>-</sup> und 8-HDF einschließt, eine chemische Synthese des F<sub>0</sub>-Cofaktors notwendig.

Abb. 27. Struktur des F<sub>0</sub>-Cofaktors (8-HDF) **1**.

Ausgangspunkt für die Synthese des 5-Desazariboflavins **1** (Schema 16) ist kommerziell erhältliche D-Ribose **29**. Diese wird nach einer Vorschrift von *Kuhn et al.* mit Hydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin in Ethanol umgesetzt.<sup>[121]</sup> Das D-Ribose-Oxim **30** wurde nach Umkristallisation in Form eines weißen kristallinen Pulvers in einer Ausbeute von 90% (Literatur: 71%) erhalten. Gemäß einer Synthese nach *Maley und Plaut*<sup>[122]</sup> ergab katalytische Hydrierung des Oxims **30** in Essigsäure das Ribitylamin **31**. Zur Abtrennung der Essigsäure wurde Wasser zugegeben und die Flüssigkeit im Vakuum entfernt. Verbindung **31** wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie (Dowex 1-X8, Hydroxidform) in einer Ausbeute von 78% als gelbes Öl erhalten. Die Synthese des nachfolgenden Ribitylaminouracil-Derivats **32** stellte sich jedoch schwieriger dar als erwartet. Der Literatur zufolge ist das nach Reinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie erhaltene Öl nicht völlig rein.<sup>[122]</sup> Zur Bestimmung des Gehalts an Ribitylamin wurde mit HCl (0.01 M) titriert. Dies ergab einen Gehalt von 72% Amin. Gemäß des in der Literatur beschriebenen Syntheseweges wurden zur Synthese von **32** 2.0 eq des Amins mit 1.0 eq 6-Chloruracil **13**, das durch Reaktion von 2,4,6-Trichloropyrimidin mit NaOH gebildet werden kann,<sup>[123]</sup> umgesetzt. Das erwartete Produkt ließ sich allerdings durch anschließende pH-Wert-abhängige Ionenaustausch-Chromatographie im Gegensatz zur Literatur nicht sauber isolieren.



Schema 16. Synthese des F<sub>0</sub>-Cofaktors 1.

Trotz mehrfacher Wiederholung dieser Synthese auch unter veränderten Bedingungen ließ sich kein sauberes Produkt **32** isolieren. Um einen besseren Einblick in das Reaktionsgeschehen zu erhalten, wurde die Reaktion mittels RP-HPLC verfolgt. Hierzu wurden aus der Reaktionsmischung in unterschiedlichen Zeitabständen 50  $\mu$ L-Proben entnommen und durch RP-HPLC analysiert (Abb. 28).

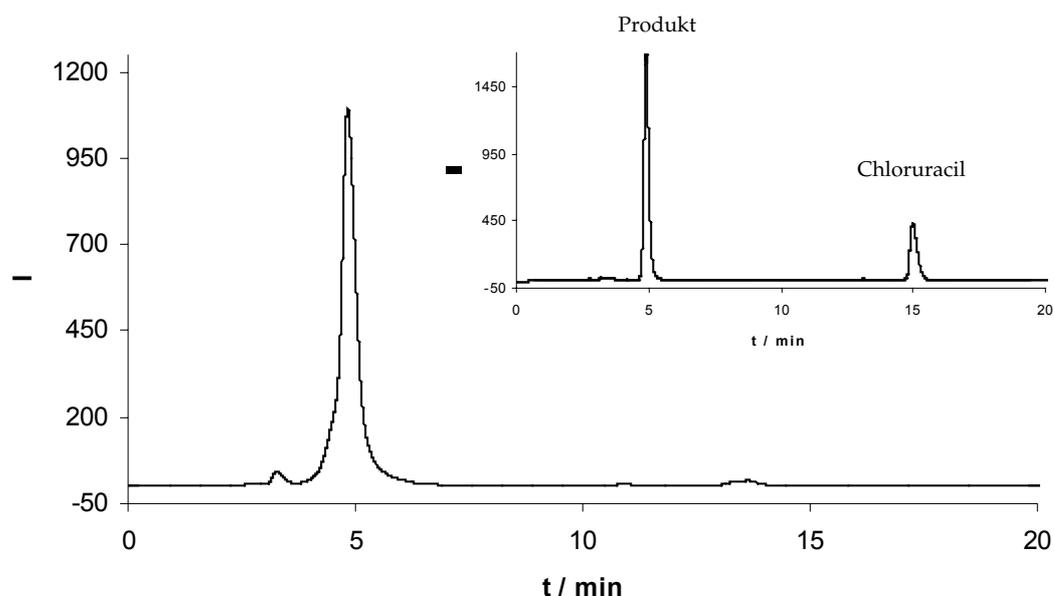


Abb. 28. HPL-Chromatogramm der Reaktion von **31** mit 6-Chloruracil **13** detektiert bei 260 nm (großes Diagramm: Verhältnis 4:1, Einschub: Verhältnis 2:1); Gradient: Methode A.

Der Einschub in Abbildung 28 zeigt, dass nach einer Reaktionszeit von 3 h noch nicht reagiertes Chloruracil bei einer Retentionszeit von 15 min neben dem Produkt (Retentionszeit bei 5 min) vorlag. Um das Chloruracil vollständig umsetzen zu können, wurde die Reaktion nun unter Einsatz von 4.0 eq des Amins durchgeführt, da im Gegensatz zum Chloruracil verbleibendes Amin die weitere Reaktion nicht stören sollte. Im HPL-Chromatogramm (Abb. 28) ist ersichtlich, dass das Chloruracil nach dieser Veränderung völlig abreagiert hatte. Es wurde beschlossen, das Produkt mit dem überschüssigen Amin als Gemisch in die Synthese der Zielverbindung einzusetzen. Die Hoffnung war, dass das Amin **31** vom schwerlöslichen benzylgeschützten Desazariboflavin **33** abgetrennt werden könnte. Diesem optimierten Protokoll zufolge wurde das erhaltene Ribitylaminouracilderivat/Amin-Gemisch unter Zusatz eines leichten Überschusses an 2,4-Dibenzyloxybenzaldehyd

in DMF unter Rückfluss erhitzt.<sup>[124]</sup> Während der Reaktion wurde beobachtet, dass die braune Reaktionslösung stark fluoreszierend wurde. Nach Eingießen der Reaktionslösung in Eiswasser wurde wie erwartet das schwerlösliche Desazariboflavin **33** als gelber Niederschlag ausgefällt, welcher durch Zentrifugieren abgetrennt werden konnte.

Nach zweimaligem Waschen mit Methanol wurde das Desazariboflavin **33** in Form eines gelben Pulvers in ausgezeichneter Reinheit isoliert.

Da von einem Produktgemisch ausgegangen wurde, ist die Ausbeute nicht exakt bestimmbar. Sie ist jedoch mit ca. 16% erhaltener Substanz bezüglich der eingesetzten Menge des Produktgemisches gering. Erhöhung der Reaktionszeit über 4 h bewirkte keine Steigerung der Ausbeute.

Abb. 29 zeigt das HPL-Chromatogramm des abzentrifugierten Rohprodukts von **33**. Die detektierte Retentionszeit liegt erwartungsgemäß zwischen der des polareren Ribitylaminouracil-Derivats **32** und der des weniger polaren 6-Chloruracils **13**.

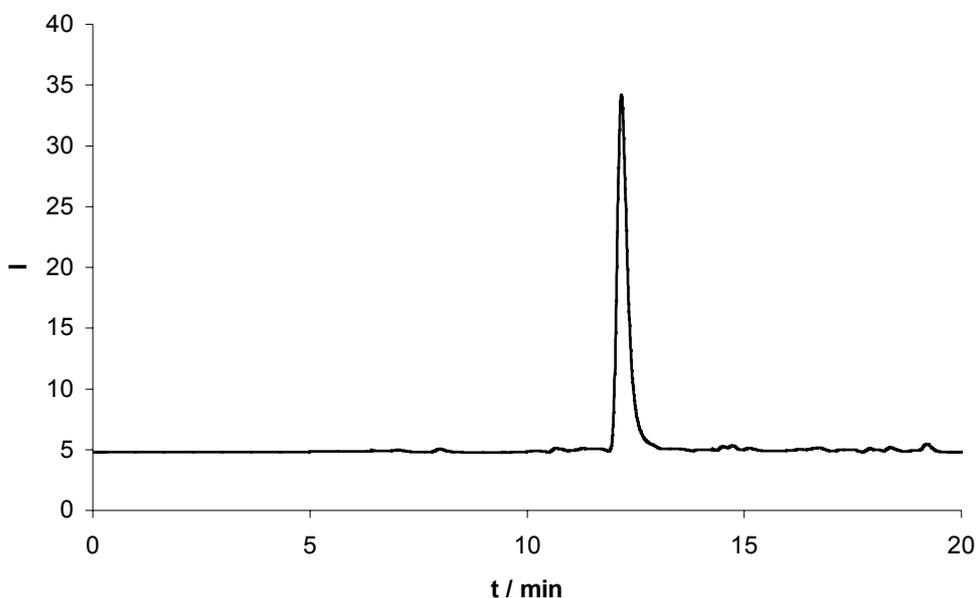


Abb. 29. HPL-Chromatogramm der Verbindung **33** gemessen bei 260 nm; Gradient: Methode A.

Für die sich anschließende Entschützung der benzylierten Verbindung **33** zum 8-Hydroxy-5-desazariboflavin **1** durch katalytische Hydrierung wurden verschiedene Katalysatoren und Lösungsmittel ausgetestet (Tabelle 5).

Katalysator	Lösungsmittel	Ausbeute / %
5% Pd/BaSO <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> COOH	5
10% Pd/BaSO <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> COOH	61
10% Pd/C	CH <sub>3</sub> COOH	84
10% Pd/C	MeOH	40

Tabelle 5. Katalytische Hydrierung von **33**.

Zu Beginn wurde Pd auf BaSO<sub>4</sub> eingesetzt, um einer Überhydrierung des Heterocyclus vorzubeugen. Die Entschützung mittels 5% Pd auf BaSO<sub>4</sub> in Eisessig ergab eine schlechte und im Fall von 10% Pd auf BaSO<sub>4</sub> nur eine mäßige Ausbeute. Daher wurde die Hydrierung unter ansonsten gleichen Bedingungen mit 10% Pd/C wiederholt. Die erzielte Ausbeute betrug 84%. Um zu überprüfen, ob mit dem gleichen Reagenz in einem anderen Lösungsmittel eine Steigerung der Ausbeute zu erreichen war, wurde die Reaktion als Alternative in Methanol durchgeführt. Die Hydrierung lieferte jedoch hier nur eine Ausbeute von 40%. Als beste Methode erwies sich daher die Entschützungsmethode mit 10% Pd/C in Eisessig, wobei bemerkt werden muss, dass angesichts der sehr schlechten Löslichkeit der benzylierten Verbindung **33** (Suspensionsbildung) eine Ausbeute von 84% ein optimales Ergebnis darstellt.

Zur Aufarbeitung wurde nach Abtrennung des Katalysators und Entfernen des Lösungsmittels der Rückstand von **1** mit konzentrierter wässriger Ammoniaklösung versetzt. Die Intention hierbei war die Generierung der deprotonierten, chinoiden Verbindung 8-O<sup>-</sup>-5-Desazariboflavin (vgl. Schema 7, Kapitel 1.7), um so als besser lösliche Salzform eine Separierung vom überschüssigen, schwerlöslichen benzyli-geschützten Edukt **33** zu ermöglichen. Durch HPLC-Kontrolle zeigte sich aber, dass auf diesem Wege das 8-OBn-5-desazariboflavin **33** nicht vom Produkt **1** abgetrennt

werden konnte, da sich auch die deprotonierte Form nicht in nennenswertem Maße löste. In einem zweiten Versuch wurde daher der Rückstand mit Trifluoressigsäure versetzt. Die protonierte Hydroxy-Form 8-OH-5-desazariboflavin ist wie die benzylierte Form nur schwer löslich. Nach Zugabe von eisgekühltem Diethylether fiel wie erwartet ein hellgelber Niederschlag aus, welcher durch Zentrifugieren abgetrennt werden konnte. Nach dreimaligem Waschen mit Diethylether konnte das Produkt **1** in nahezu reiner Form isoliert werden. Eine vollständige Abtrennung des Edukts vom 8-HDF **1** war jedoch auf diesem Wege meist nicht möglich. Aus diesem Grund schloss sich in diesen Fällen eine Reinigung mittels präparativer RP-MPLC und anschließender analytischer Reinheitsbestimmung mittels RP-HPLC an. Hierbei war der Einsatz eines in der Peptidchemie üblichen Puffers mit 0.1% Trifluoressigsäure-Zusatz notwendig, um das 8-HDF protoniert zu halten. Abbildung 30 zeigt die HPL-Chromatogramme des benzylgeschützten Edukts **33** und des F<sub>0</sub>-Cofaktors **1** vor und nach der chromatographischen Reinigung.

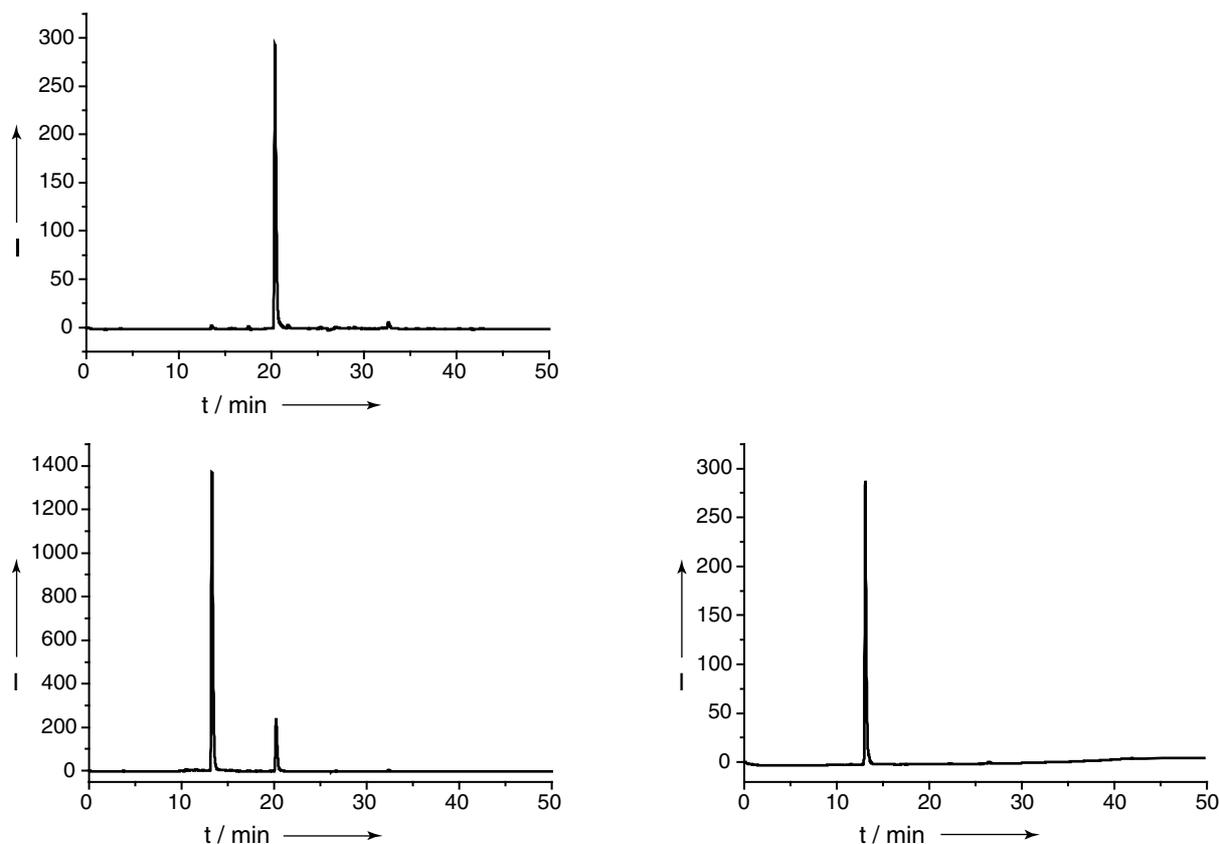


Abb. 30. HPL-Chromatogramme des gereinigten benzylgeschützten Edukts **33** (links oben) und des F<sub>0</sub>-Cofaktors **1** vor (links unten) und nach der Reinigung mittels RP-MPLC (rechts unten).

Durch verfeinerte Synthese- und Reinigungsmethoden war es hiermit gelungen, den  $F_0$ -Cofaktor 1 in ausgezeichneter Reinheit im 100 mg-Maßstab chemisch herzustellen.

Die Fluoreszenzspektren (Abb. 31) zeigen das im Kapitel 1.7.3 beschriebene unterschiedliche photochemische Verhalten der benzylierten bzw. protonierten Form des 8-HDF (OBn/OH-DFI) im Gegensatz zur deprotonierten Verbindung. Während die OBn- bzw. Hydroxy-Form ein Absorptionsmaximum von 400 nm und ein Fluoreszenzmaximum von 450 nm aufweist, zeigt die deprotonierte chinoide Form ( $O^-$ -DFI) eine bathochrome Verschiebung. Hier liegt das Maximum der Absorption bei 420 nm und das der Fluoreszenz bei 475 nm. Die Verbindung zeigt eine grünliche Färbung.

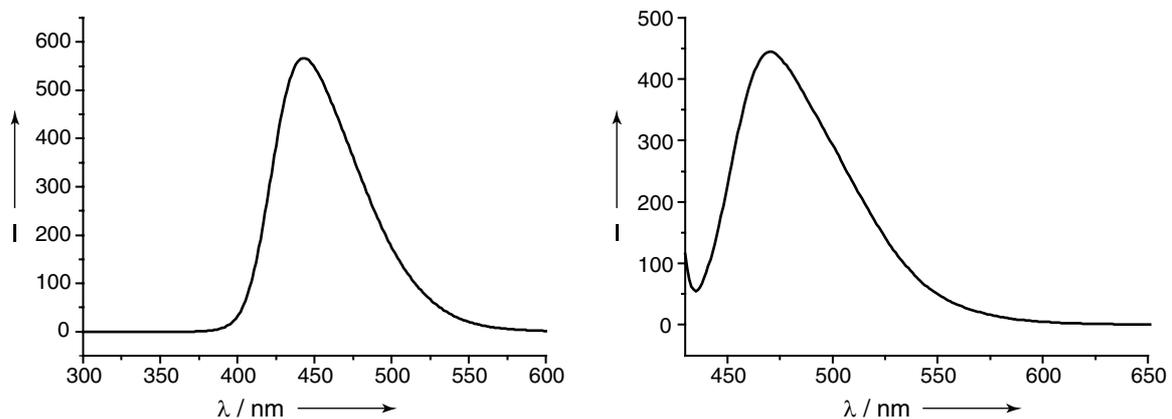


Abb. 31. Fluoreszenzspektren der benzylierten Form des 8-HDF ( $\lambda_{ex.} = 400$  nm,  $\lambda_{em.} = 450$  nm) und von  $F_0$  ( $\lambda_{ex.} = 420$  nm,  $\lambda_{em.} = 475$  nm).

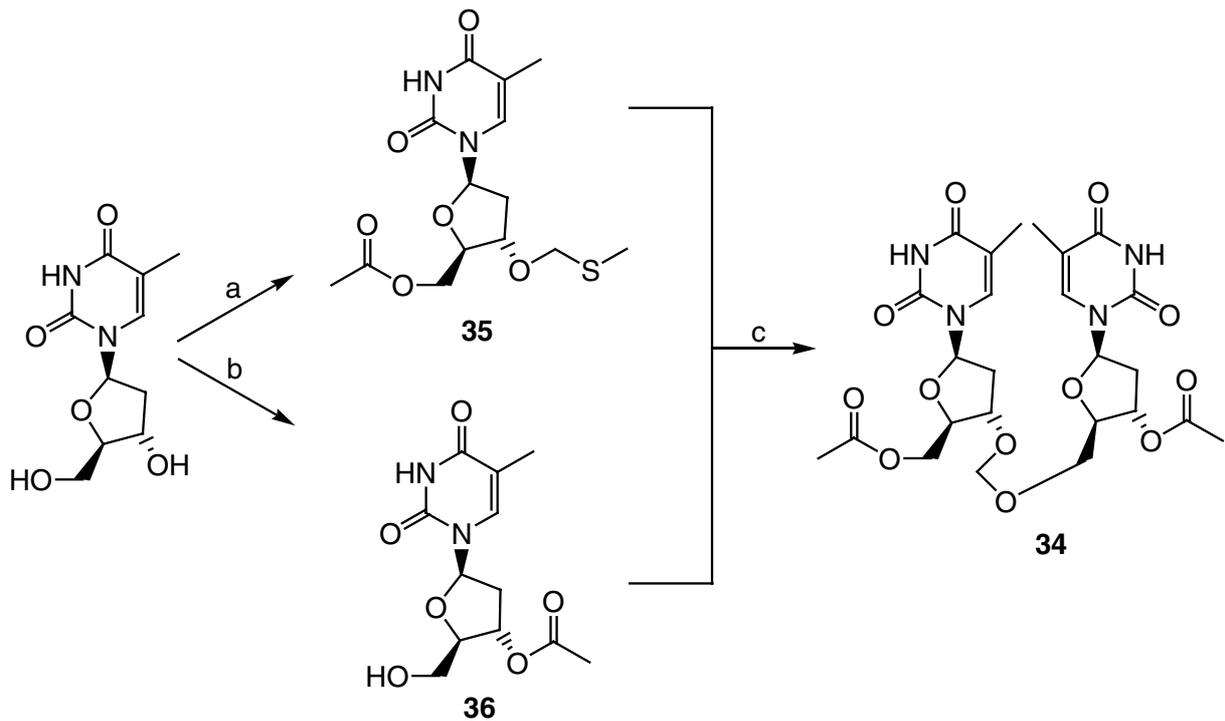
### 4.3 Synthese des CPD-Schadens

Um eine Protein/DNA-Co-Kristallstruktur erhalten zu können, wird das CPD enthaltende DNA-Substrat in größeren Mengen benötigt. Der CPD-Schaden soll hierbei als Phosphoramidit-Baustein über DNA-Synthese an der festen Synthese in Oligonukleotide eingebaut werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein künstliches Thymidindimer mit einer Formacetalbrücke synthetisiert. Der Vorteil dieses Bausteins gegenüber einem Dimer mit natürlicher Phosphodiesterbindung liegt darin, dass dieser synthetisch einfacher in ausreichenden Mengen für die Kristallisationsstudien zugänglich ist. Das synthetische CPD-Analogon besitzt die gleiche *cis,syn*-Stereochemie wie der natürliche CPD-Schaden.

Obwohl gegenüber dem natürlichen CPD das Intradimer-Phosphat durch die Formacetal-Bindung ersetzt ist, wird das künstliche Substrat effizient durch Photolyasen reaktiviert.<sup>[125]</sup> Gemäß einiger Studien (*Chemical Footprinting*), finden keine Kontakte zwischen Photolyase und dem Intradimer-Phosphat statt, so dass der synthetische Schaden als isosteres Substrat eingesetzt werden kann.<sup>[40,41]</sup>

Die in der nachfolgend beschriebenen Synthese dargestellten Vorstufen wurden von *L. Burgdorf* zur Verfügung gestellt, die letzten drei Stufen ausgehend von **37** bis hin zum Thymidindimer-DNA-Baustein wurden im Rahmen dieser Arbeit vollzogen.<sup>[126]</sup>

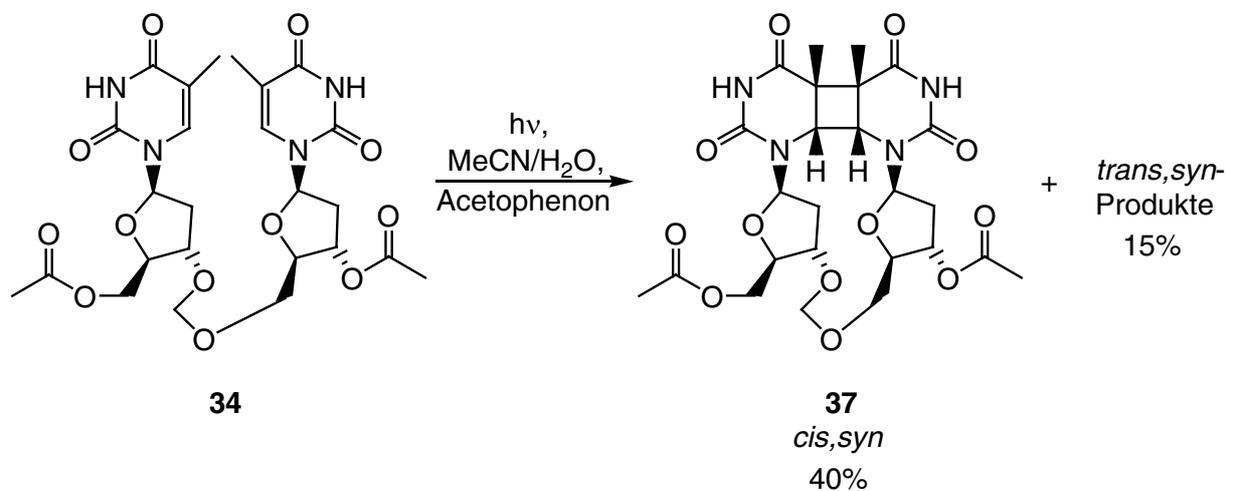
Das (5'A-O, 3'B-O)-Diacetyl-geschützte-formacetalverknüpfte-thymidindimer **34** wurde in einer sechsstufigen konvergenten Synthese erhalten (Schema 17). Hierzu wurde ein 3'-O-(Methylthiomethyl)thymidin **35** und ein Thymidin mit primärer Hydroxylgruppe **36** benötigt. Die 5'-Hydroxylgruppe von **35** und die 3'-Hydroxylgruppe von **36** waren jeweils acetylgeschützt.



Schema 17. Synthese des formacetalverknüpften Thymidinukleotids **34**.

- a) 1) AcOH, DIAD, PPh<sub>3</sub>, THF, 86%. 2) AcOH, Ac<sub>2</sub>O, DMSO, <93%.  
 b) 1) TrCl, DIEA, Pyr. 2) Ac<sub>2</sub>O. 3) AcOH, 48% über drei Stufen.  
 c) N-Iod-succinimid, Trifluormethansulfonsäure, THF, 96%.

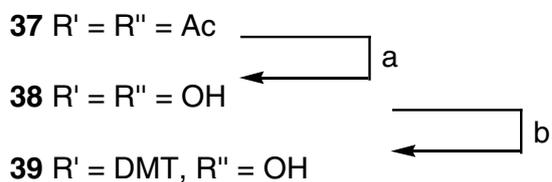
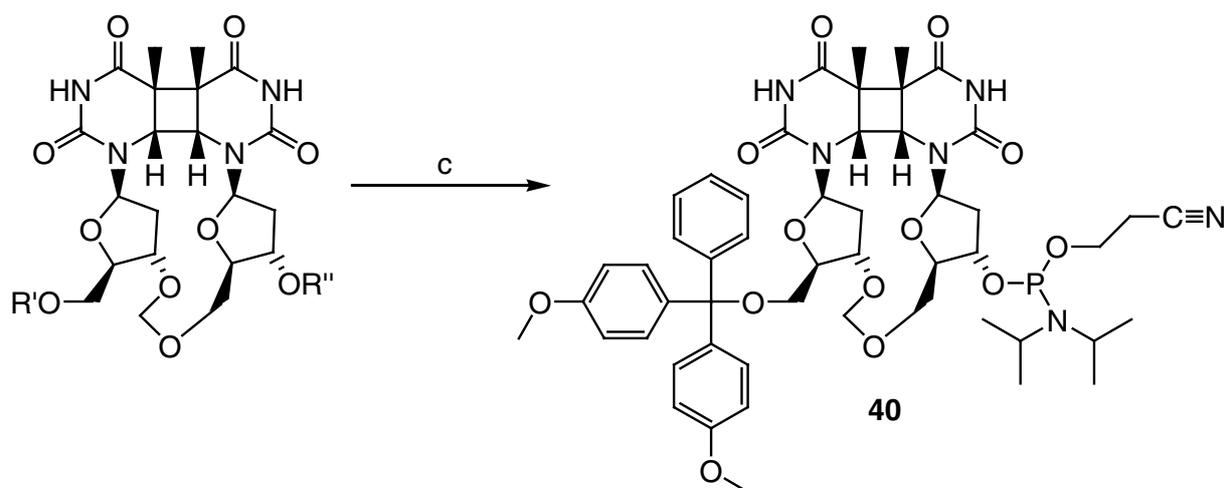
Bei der Belichtung von **34** in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch in Anwesenheit von Acetophenon als Triplettensensitizer entstanden drei Diastereomere, die sich chromatographisch trennen ließen (Schema 18).



Schema 18. Belichtung von **34**.

#### 4. Co-Kristallstruktur der DNA-Photolyase aus *A. nidulans*

Vom isolierten *cis,syn*-Dimer **37** ließen sich beide Acetylschutzgruppen in einem Schritt mit Ammoniak gesättigtem Methanol abspalten (Schema 19). Die so erhaltene Verbindung **38** wurde mit Dimethoxytritylchlorid geschützt. Hierzu wurde **38** in mit Molsieb (4 A) getrocknetem Pyridin gelöst und mit Dimethoxytritylchlorid über einen Zeitraum von 16 h zu **39** umgesetzt. Die anschließende Synthese des Phosphoramidits lieferte den Baustein **40** für die Festphasensynthese in einer Ausbeute von 65%.



Schema 19. Synthese des Thymidindimer-DNA-Bausteins **40**.

a ges.  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ , RT, 16 h, quant. b DMTCl, Pyr, RT, 16 h, 77%.  
c CED-Cl, DIEA, THF, RT, 3 h, 65%.

## 4.4 Kristallisation der Photolyase mit Thymidindimer enthaltender DNA

### 4.4.1 Einleitung

Wie bereits unter Kapitel 1.5 erwähnt, sind die Kristallstrukturen der drei CPD-Photolyasen aus *Escherichia coli*, *Anacystis nidulans* und *Thermus thermophilus* gelöst worden, wobei letztere ohne zweiten Cofaktor kristallisiert wurde.<sup>[24, 25, 32]</sup> Trotz des Vorhandenseins dieser Strukturen und der hohen Affinität von Photolyasen zu DNA-Strängen mit *cis,syn*-Thymidindimer-Schäden ( $K_D \approx 10^{-9}$  M),<sup>[16]</sup> war bis heute eine Co-Kristallstruktur dieses Enzyms zusammen mit CPD enthaltender DNA nicht zugänglich. Gerade aber die Struktur des Photolyase/Substrat-Komplexes ist von größtem Interesse und absolut unentbehrlich, um den genauen Erkennungs- und Bindungsmechanismus dieses Reparaturenzyms vollständig aufklären zu können. Die Schlüsselfragen sind hierbei die Art und Weise, wie das Thymidindimer in die aktive Bindungstasche der DNA-Photolyase gelangt, die Geometrie des Dimers in der Tasche und wie groß die Distanz zwischen dem katalytischen Cofaktor FADH<sup>-</sup> und dem Dimerschaden, dem Elektronenakzeptormolekül ist. Hier schließt sich auch die noch ungelöste Frage bezüglich der Natur des Elektronentransferwegs im von blauem Licht abhängigen Reparaturenzym an.

Um Details über Bindungsmodus und Reparatur gewinnen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Komplex zwischen der DNA-Photolyase aus *A. nidulans* und einem CPD-Schadensanalogon, integriert in einen DNA-Doppelstrang, kristallisiert.

### 4.4.2 Rekonstitution des Photolyase-Proteins

Hiefür wurde zunächst von *A. P. M. Eker et al.* rekombinante DNA-Photolyase aus *A. nidulans* in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt.<sup>[127]</sup> Anschließend konnte der in dieser Arbeit chemisch synthetisierte und gereinigte zweite Cofaktor F<sub>0</sub> (siehe Abschn. 4.2), der von *E. coli*-Zellen nicht hergestellt werden kann, in die Photolyase

der Desazaflavin-Klasse dauerhaft inkorporiert werden. Vom so mit beiden Cofaktoren Flavin und Desazaflavin rekonstituiertem Apoenzym wurden zunächst einleitende Kristallisationsstudien durchgeführt. Abb. 32 zeigt die Kristalle von der DNA-Photolyase mit inkorporiertem  $F_0$  von *A. nidulans*. Wie in der Literatur von *Eker et al.* beschrieben,<sup>[127]</sup> kristallisiert die rekonstituierte Photolyase in gelb-blauen Kristallen in einer "heubüschelartigen" Anordnung mit einer ungefähren Größe von 0.6 mm x 0.2 mm x 1.2 mm.



Abb. 32. Kristallstruktur von inkorporiertem  $F_0$  in Photolyase aus *A. nidulans*.

Kristallwachstum in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH=7.0), Präzipitant: Ammoniumsulfat  
(Rekonstitution: *Eker et al.*, Erasmus University Medical Genetics Centre, Rotterdam;

Kristallisation: *Essen und Gnau*, Philipps-Universität, Marburg.)

Von der  $F_0$  enthaltenden Photolyase wurde ein UV-Vis-Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. 33). Für den inkorporierten  $F_0$ -Cofaktor wird eine Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 435$  nm beobachtet. Die bathochrome Verschiebung wird durch die relativ starke Interaktion des 8-HDF mit dem Apoenzym hervorgerufen (vergleiche Kapitel 1.7.4). Bei 588 nm ist noch schwach die Absorption des Flavosemichinons zu erkennen.

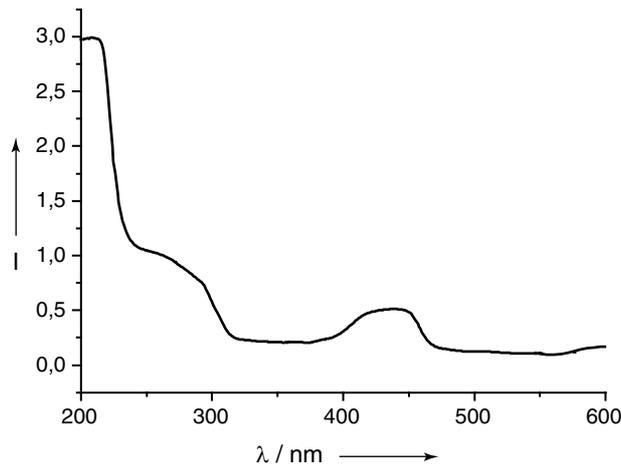


Abb. 33. UV-Vis-Absorptionsspektrum von DNA-Photolyase aus *A. nidulans* mit inkorporiertem F<sub>0</sub>-Cofaktor.

#### 4.4.3 DNA-Synthese

Um eine Protein/DNA-Co-Kristallisation realisieren zu können, ist das Vorhandensein von DNA, die den Dimerschaden an einer definierten Stelle enthält, in größeren Mengen notwendig. Vor Beginn der Co-Kristallisation musste genau festgelegt werden, welche Sequenz und welche Position vom Dimer am erfolgsversprechendsten ist. Hierbei spielt zunächst die Länge der DNA eine wichtige Rolle. Obwohl die Photolyase sowohl eine Thymin-Base, als auch ein Dinukleotid-Thymindimer bindet,<sup>[39]</sup> stellt ein Substrat in der Form NpT=TpNpNp die minimale Struktur für eine Bindung mit hoher Affinität dar,<sup>[40, 41, 128]</sup> da zwischen diesen vier Phosphaten und dem Enzym spezifische Wechselwirkungen auftreten. Die Bildung einer kontinuierlichen B-DNA ist hierbei erstrebenswert (1 *turn* von B-DNA = 10,4 bp), daher wurden Oligonukleotide mit mehr als zehn Basenpaaren vorgesehen. Da ein eventueller Doppelbasen-*Flip* des TT-Schadens eine Verbiegung der DNA verursachen könnte, wurde das zweite wichtige Kriterium, die Sequenz, so gewählt, dass das DNA-Doppelstrang-Substrat in der Schadensregion durch GC-reiche Abschnitte stabilisiert wird. Zusätzlich wurde durch Einzelbasen-Überhänge (*single overhangs*) die Möglichkeit der Verkettung mehrerer DNA-Doppelstränge während der Kristallisation gewährleistet.

Der Thymidindimer-Schaden sollte hierbei die zentrale Position innerhalb des Oligonukleotids innehaben. Es handelt sich bei diesem Schaden um das chemisch synthetisierte Analogon des *cis,syn*-Cyclobutanthymidindimers, welches eine Formacetal-Brücke enthält (Abschnitt 4.3).

Durch automatisierte DNA-Synthese an der festen Phase konnte der Formacetal-Dimer-Baustein über Phosphoramidit-Chemie in Oligonukleotide eingebaut werden. Abb. 34 zeigt die verschiedenen synthetisierten CPD-Schaden-modifizierten DNA-Doppelstränge.

14mer:

16mer:

**S15** 5' – ATC GGC T=TC GCG CA – 3'

**S18** 5' – ACA GCG GT=T GCA GGT A – 3'

**S16** 3' – TAG CCG A AG CGC GT – 5'

**S19** 3' – TGT CGC CA A CGT CCA T – 5'

**S15** 5' – ATC GGC T=TC GCG CA – 3'

**S18** 5' – ACA GCG GT=T GCA GGT A – 3'

**S17** 3' - AG CCG A AG CGC GTT-5'

**S20** 3' - GT CGC CA A CGT CCA TT -5'

Abb. 34. Synthetisierte Thymidindimer (T=T) enthaltende DNA-Einzelstränge mit den zugehörigen unterschiedlichen Gegensträngen.

Es wurden 14mer- und 16mer- Oligonukleotide mit und ohne Einzelbasen-Überhang und mit dem CPD-Schaden in zentraler Position synthetisiert.

#### 4.4.4 Reinigung und Charakterisierung der DNA-Stränge

Die vom Träger abgespaltenen und entschützten Oligonukleotide wurden in zwei bis drei Portionen aufgeteilt und jeweils mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Anschließend wurde die Reinheit der gereinigten Fraktionen nochmals mittels analytischer RP-HPLC kontrolliert. Abbildung 35 zeigt exemplarisch das HPL-Chromatogramm des nicht gereinigten 14mer-Dimer-DNA-Strangs **S15** direkt nach der Entschützung und des gereinigten DNA-Strangs, aufgenommen bei einer Wellenlänge von 260 nm.

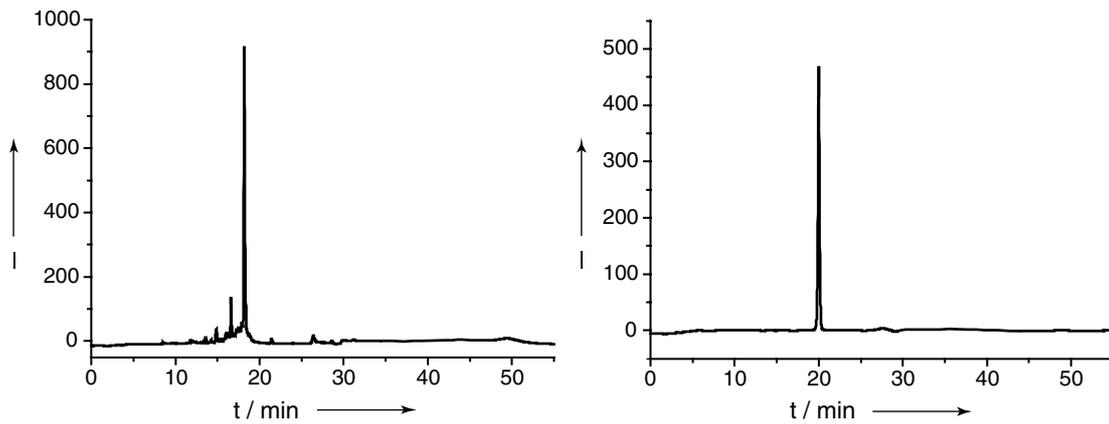


Abb. 35. HPL-Chromatogramm des rohen und des gereinigten Dimer-Strangs **S15** (14mer), aufgenommen bei 260 nm.

Die erfolgreiche Synthese und Reinheit der Thymidindimer-Stränge wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie kontrolliert. Die theoretisch ermittelten Molekulargewichte konnten mit 4188.1 für **S15** und 4895.7 für **S18** bestätigt werden.

Zur Bildung der Dimer enthaltenden DNA-Doppelstränge wurde der modifizierte CPD-Strang mit dem entsprechenden komplementären Gegenstrang im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend hybridisiert. Die erhaltenen Doppelstränge wurden mittels Kapillarelektrophorese (CE) untersucht. Abb. 36 zeigt exemplarisch das CE-Elektropherogramm vom Doppelstrang **S15/S17**, in dem zwei Signale, der CPD-Strang **S15** und der Gegenstrang **S17**, zu beobachten sind.

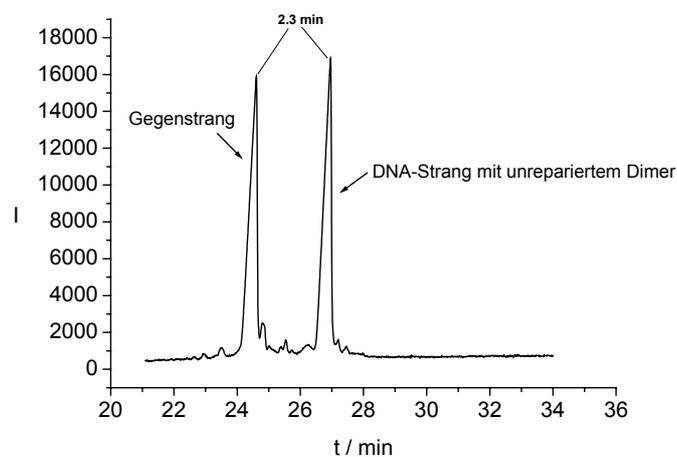


Abb. 36. CE-Elektropherogramm des CPD-Doppelstrangs **S15/S17**, der für Kristallisations-Experimente eingesetzt wurde.

#### 4. Co-Kristallstruktur der DNA-Photolyase aus *A. nidulans*

Um die Stabilität der Dimer-DNA-Doppelstränge zu überprüfen, wurden Schmelzpunktsstudien durchgeführt. Die untersuchten Doppelstränge zeigen alle überlappende Schmelz- und Abkühlkurven und keine Hysterese. In Abb. 37 ist exemplarisch die Schmelzkurve vom Dimer-DNA-Doppelstrang **S15/S17** mit einem Schmelzpunkt von 49 °C dargestellt.

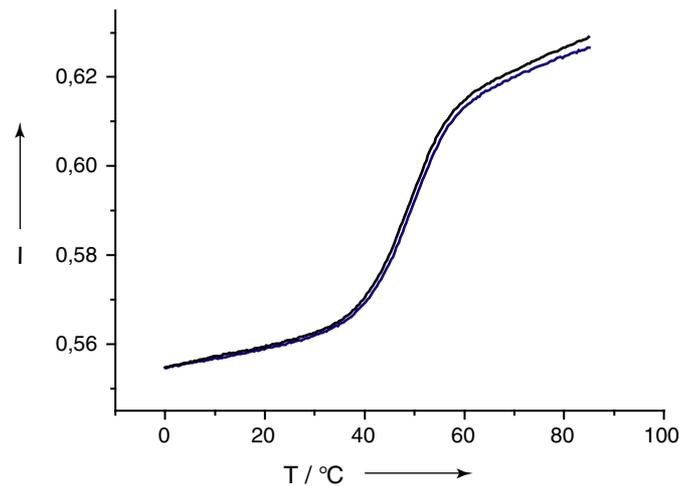


Abb. 37: Schmelzkurve des CPD-Doppelstrangs **S15/S17** gemessen bei 260 nm.

Tabelle 6 zeigt die Schmelzpunkte der in den Kristallisationsstudien eingesetzten CPD-Doppelstränge.

CPD-Doppelstrang	$T_m$ / °C
<b>S15/S16</b>	50
<b>S15/S17</b>	49
<b>S18/S20</b>	52

Tabelle 6. Schmelzpunkte einiger CPD-Doppelstränge detektiert bei 260 nm. ( $c_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-6}$  M in 10 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH = 7,4, Temperaturgradient 0,5 °C/min).

### 4.4.5 Kristallisation

Die Kristallisation der Photolyase zusammen mit dem DNA-Substrat **S15/S16** und **S15/S17** (14mer) wurde von *L.-O. Essen* und *P. Gnau* an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die Co-Kristallisation zusammen mit dem 16mer (**S18/S19**, **S18/S20**) wurde persönlich durchgeführt. Die Kristallisation erfolgte nach dem *hanging drop*-Verfahren. Die Photolyase wurde von überschüssigem Glycerin (-80 °C-Lagerungspuffer) befreit. Anschließend wurde das Enzym in seinem semi-reduzierten Zustand (FADH<sup>•</sup>) mit dem CPD-modifizierten DNA-Doppelstrang in einem berechneten Verhältnis von 1:1.1 gemischt und auf eine endgültige Proteinkonzentration von 10-18 mg/mL (je nach Kristallisationsansatz) konzentriert. Das Zusammengeben von Photolyase-Enzym und DNA-Substrat erfolgte hierbei unter strengem Ausschluss der photoreaktivierenden Wellenlängen bei Rotlicht, um einer lichtinduzierten DNA-Reparatur vorzubeugen. Erste Co-Kristalle, die das Enzym und 14mer-Oligonukleotide enthielten, konnten nach Wachstum in Dunkelheit bei 4 °C nach ca. drei Monaten beobachtet werden (Lösung 6, 30% PEG8000, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris/HCl, pH 8.5). Die anschließend optimierten Bedingungen lagen bei 12.5-17.5% PEG4000, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7.5-8.0. Beobachtung und *cryo-soaking* von Kristallen in Kristallisationspuffer mit 20% Glycerin-Zusatz wurde ebenfalls unter strengen Rotlicht-Konditionen durchgeführt.

### 4.4.6 Struktur-Analyse

Nach Datenaufnahme an einer Synchrotron-Strahlungsquelle, Lösen der Struktur und Verfeinerung zu einer Auflösung von 1.8 Å zeigten die Kristalle, welche vier Photolyase/DNA-Komplexe per asymmetrischer Einheit enthalten, die DNA-Photolyase in zwei unterschiedlichen (Bindungs-)Zuständen (Abb. 38). In zwei Komplexen ist Duplex-DNA am Enzym gebunden (Komplexe A und B), während die anderen beiden Komplexe (C und D) nur kurze Stücke von einzelsträngiger DNA aufweisen. Die nachfolgend beschriebene strukturelle Analyse bezieht sich auf Komplex A.

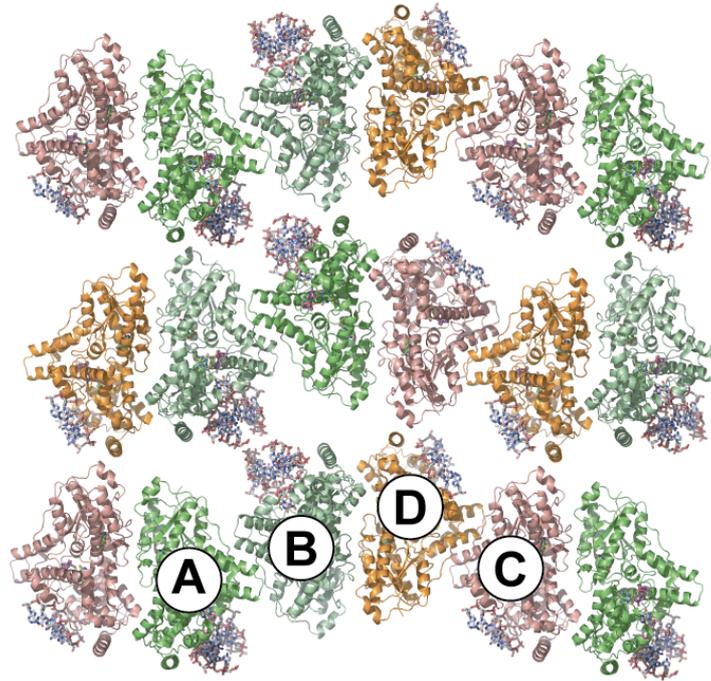


Abb. 38. Co-Kristalle der DNA-Photolyase aus *A. nidulans* und CPD-DNA mit den vier Komplexen A-D. Die Kristalle bestehen aus alternierenden Schichten von Photolyase-Molekülen im Komplex mit Duplex-DNA (grün, Komplexe A und B) oder einzelsträngigen DNA-Fragmenten (orange, Komplexe C und D).

Trotz der ausgedehnten strukturellen Verzerrung der Duplex-DNA als Folge der Bindung an die DNA-Photolyase, erfährt das Protein selbst nur geringfügige Veränderungen im Vergleich zum freien Enzym. Signifikante Unterschiede werden nur entlang der Protein/DNA-Schnittstelle gefunden, welche ungefähr  $1216 \text{ \AA}^2$  der Moleküloberfläche ausmacht. Dies ist relativ wenig im Vergleich zu anderen DNA-Reparaturenzymen (Abb. 39).

Das Protein steht in umfangreicher Wechselwirkung mit der DNA. Außerhalb der Stelle der Schadenserkennung nimmt die DNA eine B-Typ-Konformation ein (Abb. 39, 40 A), und interagiert mit dem Protein über ihr Phosphodesoxyribose-Rückgrat. Diese Tatsache stimmt mit der Erwartung für ein sequenzunabhängiges DNA-Reparatur-Enzym überein. Diese engen Kontakte wurden bereits als wichtiges Kriterium beschrieben, da z. B. im Fall der Kontakte mit dem Pentose-Part des

Rückgrats eine OH-Gruppe an C(2') (RNA) die Affinität schon um  $10^5$  reduziert (siehe Kapitel 1.5.3.1).<sup>[39]</sup>

Das Thymidindimer dagegen wird spezifisch und fest in der vorher vermuteten aktiven Tasche erkannt. Die spezifische Erkennung an der aktiven Stelle erfolgt durch ein vollständiges Herausdrehen des Dimer-Schadens aus der Duplex-DNA (*Dinukleotid-Flipping*) (Abb. 39, 40 A). Die komplementären Adenine des CPD-freien DNA-Strangs *stacken* mit ihren äußeren Nachbarbasen, aber nicht untereinander, auf Grund eines großen intrahelikalen Knicks an der CPD-Region.

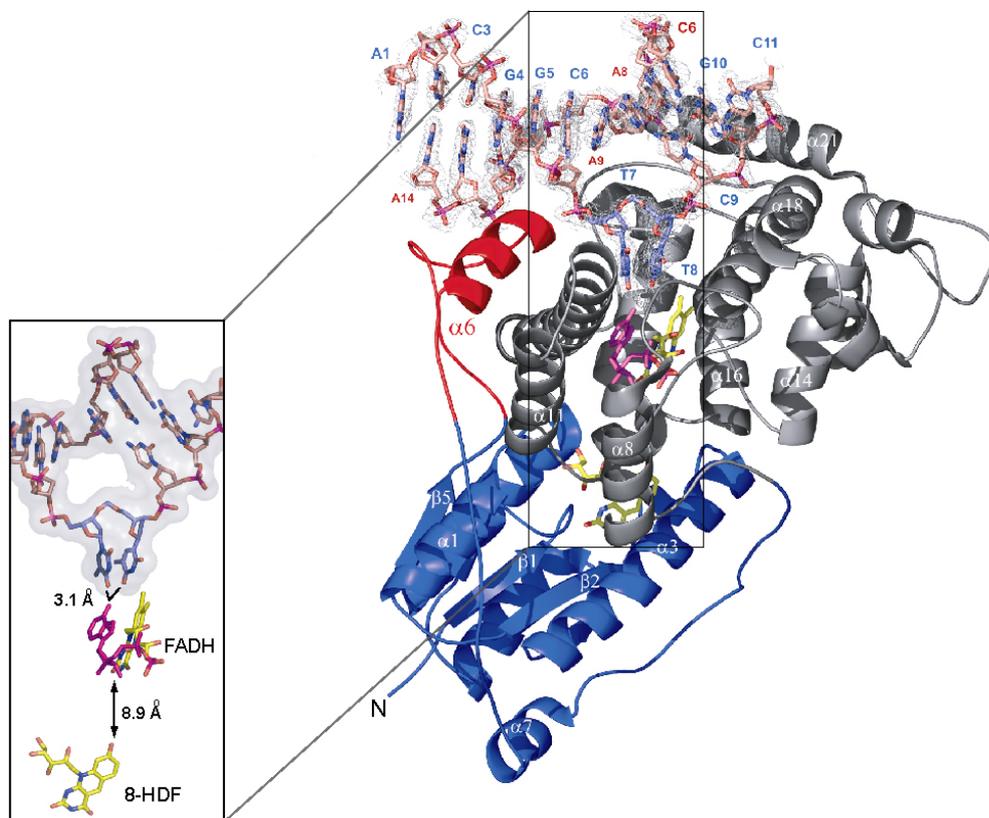


Abb. 39. DNA-Photolyase (Komplex A) mit CPD enthaltender DNA. Das Thymidindimer ist in blau dargestellt. Abgesehen von der Adenin-Einheit des FAD (pink) sind die Cofaktoren gelb gefärbt; das 8-HDF befindet sich in der blau gefärbten Bindungs-Domäne.

Die Struktur der durch den CPD-Schaden verzerrten DNA-Helix im Photolyase-Komplex wurde bis heute kontrovers diskutiert. Während vorangehende Studien zeigten, dass ein einzelner CPD-Schaden (ohne Bindung an die Photolyase!) bereits einen Knick von regulärer B-DNA um 20 bis 30 ° induziert,<sup>[129, 130]</sup> wurden für den

#### 4. Co-Kristallstruktur der DNA-Photolyase aus *A. nidulans*

CPD-DNA/Photolyase-Komplex gemäß Enzymen mit bekanntem Basen-Flipping-Mechanismus (z. B. Glycosylasen) signifikante Abknickwinkel von 35-60 ° in Erwägung gezogen.<sup>[131-133]</sup>

Die oben erwähnte, durch einen einzelnen CPD-Schaden hervorgerufene, Krümmung der DNA-Helix wurde von *Park et al.* durch die Kristallstruktur eines unkomplexierten Decamer-Duplexes mit *cis,syn*-Thymidindimer auf einen Wert von ~30 ° bestimmt (siehe Abb. 40 A, Mitte).<sup>[129]</sup> Ein tatsächlich erhöhtes Abknicken von CPD enthaltender DNA durch Bindung mit *A. nidulans*-Photolyase wurde durch AFM-Studien ermittelt, in denen durchschnittliche Biegungswinkel von 35 ° gemessen wurden.<sup>[134]</sup>

Wie die vorliegenden Studien zeigten, wird jedoch im Komplex der Dimer-DNA mit der Photolyase die DNA-Verbiegung auf einen Wert von 50 ° erhöht (Abb. 40 B).

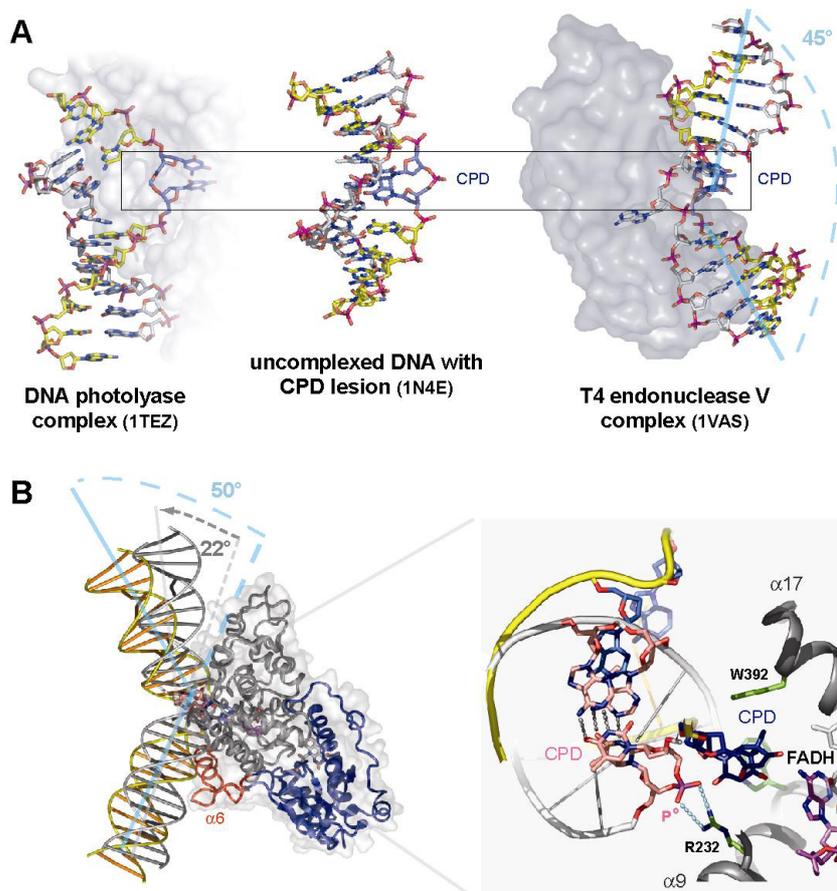


Abb. 40. A. CPD enthaltende DNA-Duplexe im Komplex mit DNA-Photolyase, mit T4 Endonuclease V oder im unkomplexierten Zustand. B. Die Gesamtkrümmung der *Model-Duplex*-B-DNA ist von 22 ° (grau) auf 50 ° im Komplex mit der Photolyase angestiegen (gelb).

Der Photolyase/DNA-Komplex unterscheidet sich damit signifikant von einem Komplex mit dem DNA-Reparaturenzym T4 Endonuclease V,<sup>[42]</sup> welches ebenfalls CPD-Schäden erkennt. Im Komplex mit dieser Glycosylase zeigt sich ein *kinking* der CPD enthaltenden DNA von 45 °. Hier wird jedoch ein Knicken der DNA in die entgegengesetzte Richtung im Vergleich zum Photolyase/DNA-Komplex hervorgerufen. Anstatt des Thymidindimers dreht die Endonuclease das Adenin gegenüber vom 5'-T des CPD-Schadens aus der Duplex-DNA, während das CPD innerhalb des Duplexes nahe zur Helix-Achse verbleibt (Abb. 40 A).

Das Auseinanderreißen der beiden Basenpaare an der CPD-Schadensregion und das partielle Entwinden der Duplex-DNA generieren ein großes Loch mit Ausmaßen von ungefähr 10 x 10 Å. Vom Grunde dieses Lochs her finden nur wenige spezifische Interaktionen zwischen der Photolyase und der DNA statt. Hierbei haben die Adenine komplementär zum CPD-Schaden van der Waals-Kontakte mit P402. Die Phosphatgruppe zwischen den beiden Adeninen ist über eine H-Brücke mit dem Amid von L403 verbunden (Abb. 41).

Im Gegensatz dazu werden ausgedehnte Salz-Brücken und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Photolyase und den Phosphaten P<sup>-1</sup>, P<sup>+1</sup>, P<sup>+2</sup> und P<sup>+3</sup> gebildet (Abb. 41). Obwohl der synthetische CPD-Schaden eine Formacetal-Gruppe anstatt des Intradimer-Phosphats P<sup>0</sup> besitzt, sind wichtige Interaktionen mit dem fehlenden P<sup>0</sup>-Phosphat unwahrscheinlich, da hier keine Aminosäurereste nahe zum herausgedrehten Thymidindimer vorliegen, die über H-Bindungen oder Salz-Brücken mit P<sup>0</sup> interagieren könnten. Dieses Fehlen der Interaktionen mit P<sup>0</sup> ist in Übereinstimmung mit biochemischen *Footprinting-Daten*,<sup>[40, 41]</sup> in denen ebenfalls das 5'-P und die drei 3'-P im Bezug auf das Dimer vom Enzym kontaktiert werden, jedoch bezeichnenderweise kein Kontakt mit dem Intradimer-Phosphat stattfindet.

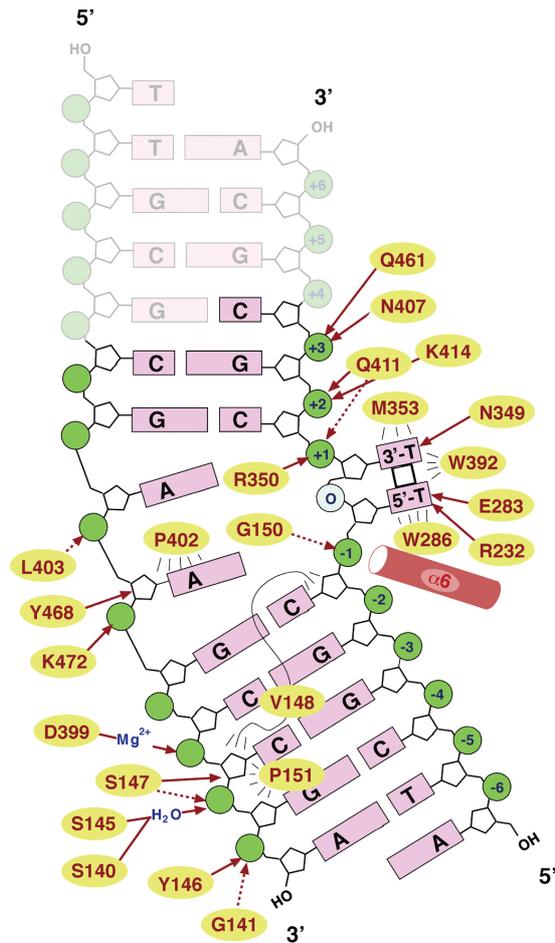


Abb. 41. Schematisches Diagramm, in dem die Wechselwirkungen zwischen der Duplex-DNA und dem Enzym dargestellt sind. Gepunktete Pfeile indizieren Wechselwirkungen mit dem Protein-Rückgrat, durchgezogene Pfeile mit Seitenketten. Die Nummerierung der Phosphatgruppen beginnt an der Intradimer-Formacetalgruppe (0).

Die entscheidende Rolle dieser Interaktionen für die Bildung eines katalytisch kompetenten CPD-DNA/Photolyase-Komplexes wird durch eine Mutation von Arginin R350 verdeutlicht, welches eine Salz-Brücke mit P<sup>+1</sup> bildet.<sup>[80]</sup> Unter mehreren *active site* Mutanten ist die R350A-Mutante als diejenige gefunden worden, die den größten Effekt ausübt, indem sie die Selektivität gegenüber der CPD enthaltenden DNA 32-fach und die Quantenausbeute der CPD-Spaltung von 98% auf ca. 60% erniedrigt. Im Gegensatz dazu beeinflussen Mutationen der Aminosäurereste, die mit P<sup>+2</sup> interagieren (Q411, K414), nur die Affinität gegenüber der CPD enthaltenden DNA.<sup>[80]</sup>

Das helikale Segment  $\alpha_6$  ragt in die kleine Furche am 5'-Ende des CPD-Schadens hinein. Wie in verschiedenen anderen DNA-Bindungsproteinen, nutzen die DNA-Photolyasen das Dipolmoment von Helices zur elektrostatischen Stabilisierung des Protein/DNA-Komplexes. Der N-Terminus von Helix  $\alpha_6$  ist zur kleinen Furche hin zum  $P^{-1}$ -Phosphat gerichtet (Abb. 39, Abb. 41). Eine analoge Interaktion kann zwischen dem  $P^{+2}$ -Phosphat und der  $\alpha_{18}$ -Helix postuliert werden, die sich um ca. 0.6 Å während der DNA-Bindung verschiebt.

Gemäß DNA-Schützungs-*Assays* sind die Interaktions-Stellen des CPD-freien Gegenstrangs innerhalb der sequenzdivergenten Klasse I- und II-Photolyasen konserviert.<sup>[41]</sup> Eine jedoch generell nicht konservierte Salz-Brücke mit dem CPD-freien Strang wird zwischen K472 und dem  $P^{-1}$ -Phosphat gebildet (Abb. 41). Da sich die Affinität von DNA-Photolyasen gegenüber CPD enthaltender doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA nicht sehr voneinander unterscheidet,<sup>[16]</sup> scheinen Interaktionen zwischen dem Enzym und dem Gegenstrang zur Stabilisierung der extremen Verbiegung der Duplex-DNA im Enzym-Substrat-Komplex beizutragen.

Negative  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Differenzelektronendichte am postulierten Cyclobutan-Ring zeigte, dass die C5-C5- und C6-C6-Bindungen des synthetisierten CPD-Schadens gespalten waren. Somit enthält die aktive Tasche in der Kristallstruktur ein repariertes Thymin-Dinukleotid (Abb. 42 B, C).

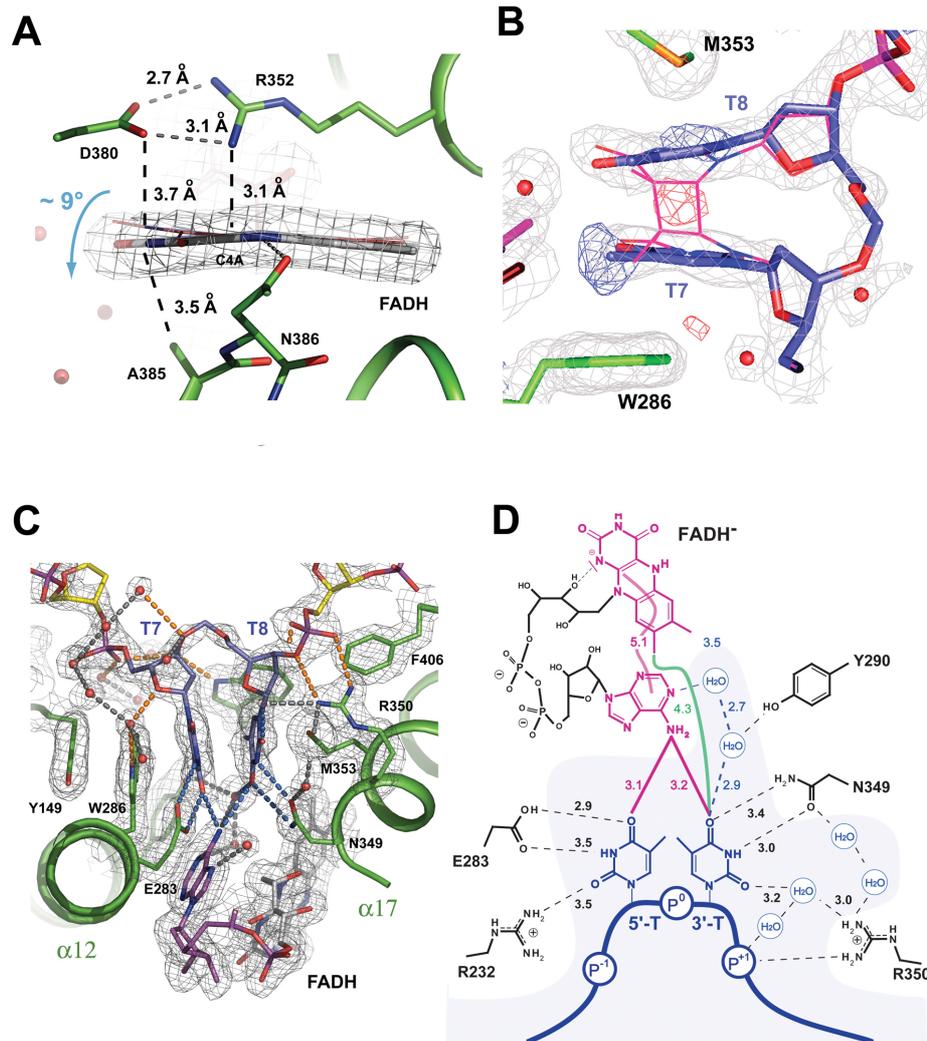


Abb. 42. Synchrotron-induzierte strukturelle Veränderungen im Photolyase/DNA-Komplex und Erkennung des CPD-Schadens. A. Die um  $9^\circ$  gebogene Isoalloxazin-Einheit des katalytischen Flavins. B. Gespaltener CPD-Schaden (blau) und seine  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte (grau); Modellierung des intakten CPD-Schadens in die aktive Tasche (pink). C. Wasserstoffbrücken-Bindungen mit dem Thymindimer sind als blaue gepunktete Linien dargestellt, andere in orange. D. Diagramm der Wechselwirkungen zwischen dem CPD-Schaden und den Aminosäureseitenketten in der aktiven Tasche; Abstände sind in Å angegeben. Mögliche Elektronentransfer-Wege über die Adenin-Einheit des  $\text{FADH}^-$  (pink) oder zwischen dem Isoalloxazin und dem 3'-T (grün).

Um eine vorangegangene DNA-Reparatur während der Kristallisation oder Kristall-Handhabung/der Ernte der Kristalle auszuschließen, wurden einzelne Kristalle mittels Kapillarelektrophorese (CE) auf die Präsenz des synthetischen CPD-Schadens hin untersucht. Die Elektropherogramme zeigten alle das in Abb. 36 dargestellte Aussehen mit Gegenstrang und unreparierter CPD-DNA. In gleicher Weise wurden Kristalle untersucht, die der Synchrotron-Strahlung ausgesetzt wurden. Die Elektropherogramme sind in Abb. 43-44 dargestellt.

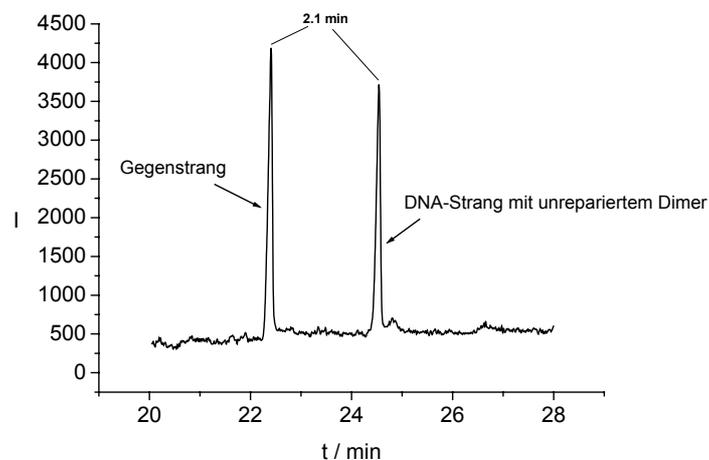


Abb. 43. CPD enthaltende Duplex-DNA, entnommen aus einem Protein-Kristall nach Bestrahlung im Synchrotron (~2 s).

In Abbildung 43 ist ein unter Rotlicht gehandhabter untersuchter Kristall mit Photolyase und CPD enthaltender Duplex-DNA (**S15/S17**) dargestellt, wobei hier die Differenz der Retentionszeiten der beiden Peaks des CPD-Strangs und des Gegenstrangs 2.1 min beträgt. Dies stimmt genau mit der einer Protein-freien Lösung des Doppelstrangs mit intaktem CPD überein. Zur Bestätigung wurde eine Co-Injektion durchgeführt (Abb 44). Hierzu wurde die gleiche Lösung, die in Abb. 43 analysiert wurde, mit frisch hergestellter Doppelstrang-DNA mit intaktem Dimer im Verhältnis 1:1 versetzt. Die Co-Injektion konnte beweisen, dass die zwei Peaks tatsächlich vom Gegenstrang und dem T=T-Dimer enthaltenden Strang stammen.

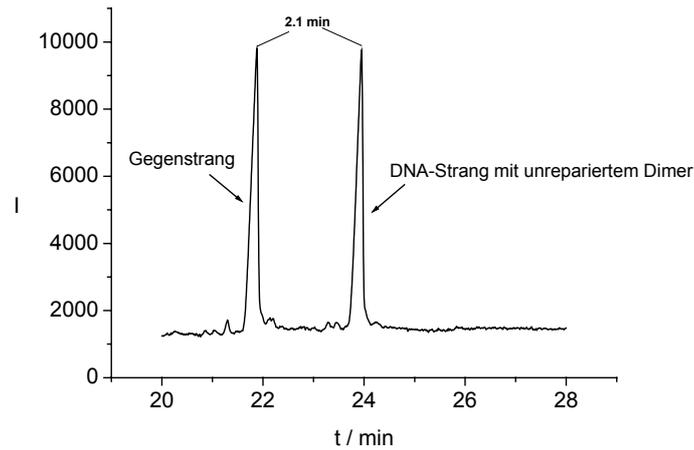


Abb. 44. Co-Injektion von Doppelstrang-DNA mit unrepariertem Dimer und Doppelstrang-DNA aus dem Kristall von Abb. 43.

Als Negativprobe wurde unter Rotlichtbedingungen Photolyase-Protein und CPD enthaltendes 14mer (**S15/S17**) im Verhältnis 1:1.1 zusammengegeben und für eine Stunde bei 366 nm bei 4 °C belichtet. Hierdurch wurde die Reparatur des Dimers hervorgerufen. Das nach der Belichtung erhaltene CE-Elektropherogramm (Abb. 45) zeigt im Gegensatz zu den vorherigen Proben einen dritten Strang, der das reparierte Dimer enthält. Die Zuordnung der Peaks erfolgte ebenfalls mittels Co-Injektion und über die relativen Retentionszeiten.

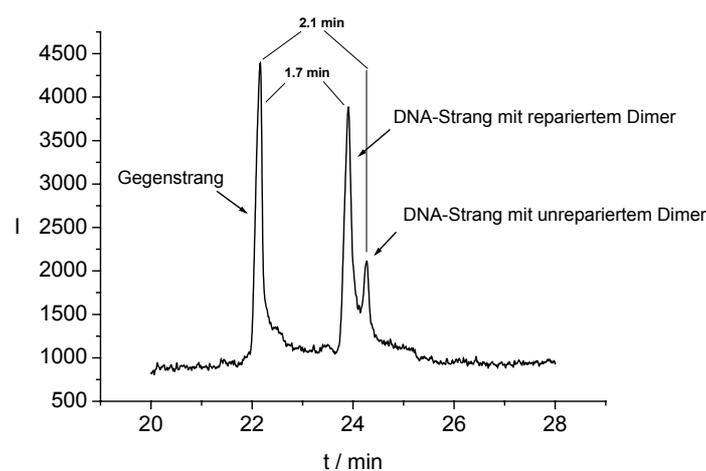


Abb. 45. CPD-Doppelstrang-DNA mit Photolyase nach Belichtung bei 366 nm.

Somit konnte bewiesen werden, dass der Cyclobutan-Ring auch nach 12 Monaten Kristallisationszeit noch intakt war. Dies zeigt, dass weder Kristallwachstum noch Ernte, welches beides unter strikten Rotlicht-Bedingungen durchgeführt wurde, eine Reparatur induziert.

In gleicher Weise zeigte eine CE-Analyse von Kristallen, die nur kurz der Synchrotron-Strahlung ausgesetzt wurden (~2 s), die Präsenz von intakten CPD-Schäden in den Kristallen.

Die beobachtete Spaltung des CPD-Schadens in zwei einzelne Thymidine trat bei der zeitlich fortschreitenden Datenaufnahme im Synchrotron-Experiment (Gesamt-Expositionszeit: 600 – 1000 s) auf. Im Gegensatz zu durch blaues Licht katalysierten Cycloreversionen von CPD-Schäden durch Photolyasen, die nur oberhalb 200 K stattfinden,<sup>[135]</sup> trat die Spaltung unter Synchrotron-Strahlung bei einer Temperatur von ca. 100 K auf. Es wurde allerdings über die Reparatur von CPD-Schäden durch  $\gamma$ -radiolytisch generierte Elektronen sogar bei 77 K berichtet.<sup>[136]</sup> Unter den Synchrotron-Bedingungen sollten solvatisierte Elektronen generiert werden, die für eine Spaltung des Dimers verantwortlich sein könnten. Gegen diese Theorie sprechen jedoch drei Kristallstrukturen, die von *Yang*,<sup>[137]</sup> *Vassilyev*<sup>[42]</sup> und *Ellenberger et al.*<sup>[138]</sup> erhalten wurden. In diesen Strukturen liegt jeweils ein intaktes Dimer vor. Der gespaltene Dimer-Schaden in der hier beschriebenen Kristallstruktur ist jedoch durch eine Beobachtung von *Eker et al.* erklärbar:<sup>[139]</sup> Der Flavin-Cofaktor kann durch Röntgenstrahlung reduziert werden. Durch hochintensive Synchrotron-Strahlung wurde im *A. nidulans*-Enzym die *andere* photochemische Reaktion der Photolyasen, die Reduktion des katalytischen Flavin-Cofaktors vom inaktiven Zustand FADH<sup>•</sup> zu FADH<sup>-</sup> (Photoaktivierung), ausgelöst. Auf ähnliche Weise könnte auch in der vorliegenden Kristallstruktur die Synchrotron-Strahlung das Flavinsemichinon reduzieren und einen Elektronentransfer auf das Dimer nach sich ziehen. Das reduzierte Flavin weist einen Knick von ~ 9 ° (*butterfly*-Struktur) entlang der N5-N10-Achse auf (Abb. 42 A). Die Spaltung des CPD-Schadens in den hier untersuchten Kristallen scheint damit durch eine tatsächliche Katalyse in der aktiven Tasche, die eine durch blaues Licht induzierte CPD-Spaltung imitiert, hervorgerufen zu sein.

Wie für eine Struktur eines *cryo-getrappten* Reaktionsprodukts zu erwarten ist, unterscheidet sich das Thymin-Dinukleotid strukturell nur leicht von einem hypothetischen CPD-Schaden innerhalb der aktiven Tasche (Abb. 4B). Die Pyrimidin-Ringe des 5'-T und 3'-T verbessern ihr *stacking*, indem sie den Neigungswinkel zwischen den Basen-Ebenen von  $56^\circ$  <sup>[129]</sup> auf  $16^\circ$  nach der Spaltung verringern.

Das *cryo-trapped* Thymin-Dinukleotid steht in vielfältiger Wechselwirkung mit der aktiven Tasche, welche so wahrscheinlich auch vor Spaltung des CPD-Schadens vorliegt. Ein L-förmiger Keil, der die in Klasse I- und (6-4)-Photolyasen konservierten Tryptophane W286 und W392 enthält, vollzieht extensive van der Waals-Wechselwirkungen mit der Ringebene des 5'-T und der Ecke des Thymin-Dinukleotids (Abb. 41, 42 B). Die L-förmige Anordnung in der aktiven Tasche kann den Cyclobutan-Ring während des Reaktionsverlaufs abschirmen, in welchem aus dem CPD-Schaden die hoch reaktive Radikalanion-Spezies generiert wird. In Einklang damit weisen Mutanten von W392 eine signifikant erniedrigte Quantenausbeute und eine zweifach reduzierte Selektivität gegenüber CPD-DNA auf.<sup>[80]</sup>

Enge Kontakte zwischen dem CPD-Schaden und dem katalytischen Flavin sind von essentieller Bedeutung für die Elektronentransfer-Reaktion. Die C(4)-Carbonylgruppen des 5'-T und des 3'-T bilden H-Brücken mit der Adenin-N(6)-Aminogruppe des FADH<sup>-</sup>-Cofaktors. Die Abstände zwischen der Aminogruppe und den Carbonylgruppen betragen für das 5'-T 3.1 und für das 3'-T 3.2 Å (Abb. 42 C, D). Zusätzlich bilden die zwei Thymine über ihre C(4)-Carbonyl- und N(3)-Imid-Gruppen H-Brücken zu den Seitenketten von Glutamat E283 und Asparagin N349. Hierbei sind diese Aminosäurereste jedoch anscheinend frei, ihre Seitenketten auch für ein alternatives H-Bindungsmuster mit Cytosin enthaltenden CPD-Schäden zu nutzen. Obwohl sie somit für eine Substratunterscheidung nicht von Bedeutung zu sein scheinen, so spielen die H-Brücken zwischen dem 3'-T und N349 und zwischen dem 5'-T und E283 jedoch für die Katalyse vermutlich eine wichtige Rolle.

Eine Mutation von E283 zu Alanin in der Hefe-Photolyase beeinflusste nicht die Substratbindung, verminderte jedoch die Quantenausbeute für die CPD-Spaltungsreaktion um 60%.<sup>[80]</sup> Daher scheint Glutamat E283 die Katalyse zu unterstützen, indem die protonierte Form das nach dem Elektronentransfer von  $\text{FADH}^-$  gebildete Radikalanion des CPD zu stabilisieren vermag (Abb. 46).

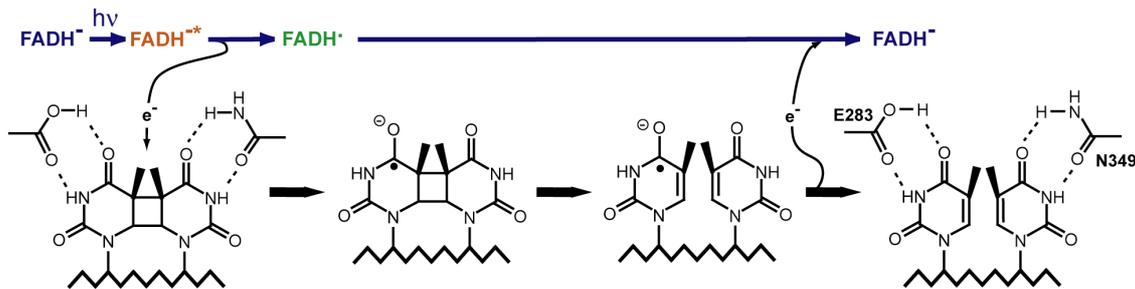


Abb. 46. Mechanismus der lichtinduzierten Reparatur von CPD-Schäden durch DNA-Photolyasen. Möglichkeit der Stabilisierung des generierten Radikalanions durch protoniertes E283. ( $h\nu$  = Blaulicht- oder nahes-UV-Photon).

Einen bisher noch ungelösten Teil des Photolyase-Mechanismus stellt die Natur des Elektronentransfer-Wegs dar, der im Photoreaktivierungs-Prozess vom  $\text{FADH}^-$ -Cofaktor zum CPD-Schaden besprochen wird. Im Vergleich zu anderen Flavoproteinen nimmt der  $\text{FADH}^-$ -Cofaktor der Photolyasen eine einzigartige U-förmige Konformation ein, und scheint auf diesem Wege einen indirekten Elektronentransfer vom angeregten Isoalloxazin über die Adenin-Einheit zum 5'-T oder 3'-T des CPD-Schadens zu erleichtern (Abb. 42 D, rote Route). Quantenchemische Berechnungen bestätigten einen solchen Elektronentransfer-Weg vom elektronenspendenden  $\pi$ -System des Isoalloxazins über die C(1')-H- und C(2')-OH-Gruppen der Ribitylkette und die Adenin-Einheit.<sup>[140]</sup> Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Struktur spricht deutlich für diesen Weg, da der Adenin-Ring den elektronenspendenden Isoalloxazin-Ring und das Thymin-Dinukleotid über zwei H-Brücken miteinander verbrückt (Abb. 42 C, D).

Nichtsdestotrotz kann ein alternativer, direkter Elektronentransfer-Weg nicht ausgeschlossen werden, da die C(4)-Carbonyl-Gruppe des 3'-T nahezu die C(8)-Methyl-Gruppe des Isoalloxazins (4.3 Å) kontaktiert (Abb. 42 D, grüne Route). Des Weiteren ist das Zentrum des elektronenspendenden Isoalloxazin-Ringsystems des FADH<sup>-</sup> nur 7 Å vom 3'-T entfernt. Weitere experimentelle und theoretische Daten sind notwendig, um zu klären, welcher der beiden Wege tatsächlich durchlaufen wird.

### 4.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Co-Kristallstruktur von *A. nidulans*-Photolyase im Komplex mit CPD enthaltender Duplex-DNA erhalten. Die untersuchte Kristallstruktur beinhaltet hierbei als Substrat einen 14mer-Doppelstrang mit Einzelbasen-Überhang, wobei ein Strang in der zentralen Position ein integriertes synthetisches Formacetal-verbrücktes *cis,syn*-Thymidindimer enthält. In der Kristallstruktur des Photolyase/DNA-Komplexes bei einer Auflösung von 1.8 Å ist der CPD-Schaden vollständig aus der Duplex-DNA heraus in die aktive Tasche gedreht. Dieser Vorgang wird durch ein zusätzliches Knicken der DNA um 50° begleitet. Hiermit konnte der strittige Punkt bezüglich des genauen Bindungsprozesses des CPD-Schadens aufgeklärt werden, der sowohl durch ein Herausdrehen einer einzelnen Base wie z. B. im T4 endo V-Enzym, als auch durch ein komplettes Herausdrehen des Dimers möglich erschien. Durch die vorliegende Arbeit konnte letztendlich der zuvor immer nur vielfach postulierte sogenannte *Dinukleotid-Flipping*-Mechanismus in der DNA-Photolyase bestätigt werden. Auch die kontroversen Diskussionen über eine Erhöhung des Biegewinkels der DNA-Krümmung innerhalb des Enzym/Substrat-Komplexes konnten hiermit aufgelöst werden.

Das in der aktiven Tasche befindliche CPD spaltet unter Synchrotron-Strahlung bei 100 K in zwei Thyminen, die in der Kristallstruktur sichtbar sind. Obwohl Photolyasen die durch blaues Licht induzierte CPD-Reparatur nur oberhalb von 200 K katalysieren, imitiert die hier dargestellte Struktur scheinbar einen strukturellen

Zustand während lichtinduzierter DNA-Reparatur, in dem das Zurückdrehen der Thymine in die Duplex-DNA noch nicht stattgefunden hat.

Wie für ein sequenz-unabhängiges DNA-Reparatur-Enzym zu erwarten, steht die Photolyase außerhalb der Schadenserkennungsregion in beträchtlicher Wechselwirkung mit dem Phosphodesoxyribose-Rückgrat der DNA in der B-Konformation. Die polare Region auf der einen und die hydrophoben Reste auf der anderen Seite, von denen das Innere der aktiven Tasche überzogen wird, scheinen maßgeblich an der Erkennung und Bindung des DNA-Dimers beteiligt zu sein. Nach einer vermuteten spezifischen Bindung des CPD durch einen aromatischen Aminosäurerest (Trp) <sup>[16]</sup> wird die geschädigte DNA in die aktive Tasche, die die richtigen Dimensionen für die Aufnahme eines CPD-Schadens besitzt, dirigiert. Hierbei interagieren die polaren Aminosäurereste über H-Brücken mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats, während der Cyclobutanring zu der hydrophoben Wandung hin ausgerichtet ist. Die in der Kristallstruktur ersichtlichen van der Waals-Wechselwirkungen der Tryptophane W286 und W392 mit dem Thymin-Dinukleotid spielen für die o. g. spezifische Bindung und für den erfolgreichen Verlauf der CPD-Spaltungsreaktion eine Rolle. Die H-Brücken zwischen dem 3'-T und N349 und zwischen dem 5'-T und E283 sind scheinbar für die Katalyse von hoher Wichtigkeit, haben jedoch für die Substratbindung offenbar keine Bedeutung.

Während in der Literatur in *Molecular dynamics*-Studien die Möglichkeit eines direkten Elektronentransfers vom katalytischen Flavin-Cofaktor auf das CPD auf Grund der großen Abstände von bis zu 19 Å (zwischen dem N(1)-Zentrum des FADH<sup>-</sup> und O(4)-Zentrum des Dimers im Fall von dUpdT) als unwahrscheinlich angesehen wurde,<sup>[141]</sup> ist gemäß der hier vorliegenden Strukturdaten mit einem Abstand von 7 Å zwischen dem Zentrum des Isoalloxazin-Ringsystems und dem 3'-T ein direkter Elektronentransfer durchaus denkbar. Auf Grund der zwei H-Brücken zwischen den beiden Thyminen und dem Adenin des FADH<sup>-</sup>, sowie der in der Photolyase vorliegenden einzigartigen U-förmigen Konformation des Cofaktors, unterstützt die hier gezeigte Struktur jedoch eher den indirekten Elektronentransfer über die Adenin-Einheit.

## 4.6 Ausblick

Eine Mutation von Glutamat E283, von welchem angenommen wird, dass es das intermediär gebildete Radikalanion des CPD zu stabilisieren vermag, in eine neutrale Aminosäure könnte in der *A. nidulans*-Photolyase eine Verminderung der Quantenausbeute hervorrufen. Dies würde eine maßgebliche Beteiligung des Aminosäurerests am Katalysevorgang untermauern.

Um einen genaueren Einblick in den Spaltungsvorgang des Dimers zu ermöglichen, könnten kurzpulsspektroskopische Messungen durchgeführt werden. Einzelsträngige DNA-Minimalsubstrate (ca. 5-6 Basen), die den Vorteil besitzen, dass sie auf eine einfachere Kristallstruktur hoffen lassen, könnten hierfür optimal geeignet sein.

Nach Abschluss dieser Studien könnte ein vollständiges Bild des Reparaturmechanismus von CPD-Photolyasen erhalten werden.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material und Methoden

Reaktionen mit luft- oder wasserempfindlichen Stoffen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

**CD-Spektren** wurden mit einem *J 810* Spektropolarimeter der Firma *Jasco* und einem CDF 426 S Temperatur Controller aufgenommen.

**Dünnschichtchromatogramme** wurden auf Fertigplatten (Kieselgel-60 F<sub>254</sub> auf Aluminium) der Firma *Merck* durchgeführt. Der Nachweis der Substanzen erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlängen 254 bzw. 366 nm oder durch Anfärben mit Tauchreagenzien für Zucker (0.5 mL Anisaldehyd, 50 mL Eisessig, 1 mL Schwefelsäure) und Amine (300 mg Ninhydrin, 100 mL *n*-Butanol, 3 mL Eisessig). Es werden jeweils das Laufmittel und der R<sub>f</sub>-Wert angegeben.

**Fluoreszenz-Spektroskopie** wurde an einem *Jasco® UV/Vis-Spektrofluorometer FP-750* durchgeführt.

**HPL-Chromatographie** wurde auf einer *Merck-Hitachi*-Anlage (L-7400 UV-Detector, L-7100 HPLC Pump, L-7200 Autosampler, L-7612 Solvent Degasser, Lab Source Pelcooler, D-7000 Interface Module, D-7000 HPLC System Manager, D-7500 Data File Conversion Utility) durchgeführt. Für die analytische RP-HPLC wurden CC 250/4 Lichrospher 100-5RP-18, CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 und CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18 Säulen der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Für die präparative RP-HPLC wurde eine VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18 Säule der Firma *Macherey-Nagel* eingesetzt. Das Lösungsmittelsystem bestand aus Puffer A: 0.1 M NEt<sub>3</sub>/HOAc in H<sub>2</sub>O, pH 7.0, Puffer B: 0.1 M NEt<sub>3</sub>/HOAc in H<sub>2</sub>O, 80% MeCN, pH 7.0 (Methode A, B) oder Puffer A: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser, Puffer B: 0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril (Methode C). Die eingesetzten Gradienten werden nachfolgend aufgeführt.

### HPLC-Methoden:

(Es ist die Zeit (h.min) und der prozentuale Anteil des Puffers B in Klammern angegeben)

Methode A (analytisch, Fluss: 1 mL/min):

0.0 (0); 2.0 (0); 30.0 (15); 35.0 (100); 40.0 (100); 42.0 (0); 45.0 (0).

Methode B (analytisch, Fluss: 1 mL/min und präparativ, Fluss: 5 mL/min):

0.0 (0); 30.0 (40); 35.0 (100); 45.0 (100); 50.0 (10); 52.0 (0); 55.0 (0).

Methode C (präparativ, Fluss: 10 mL/min):

0.0 (0); 40.0 (100); 45.0 (100); 48.0 (0).

**Infrarotspektren** wurden mit einem IFS 88 Interferometer der Firma *Bruker* aufgenommen. Die Absorptionen werden in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben und nach ihrer Intensität durch *s* (stark), *m* (mittel), *w* (schwach) charakterisiert.

**Ionenaustauschchromatographie** wurde mit Dowex 1-X8, bezogen von *Fluka* in der Cl<sup>-</sup>-Form (50-100 *mesh*), durchgeführt.

**Kapillarzonen-Elektrophorese** wurde mit einem P/ACE™ MDQ DNA System der Firma *Beckman Coulter* durchgeführt. Die Kapillare war innen mit einer Polyacrylamidschicht überzogen und hatte eine Länge von 20 cm bis zum Detektionsfenster. Als stationäre Phase wurde ein 6% iges lineares Polyacrylamidgel verwendet, das in einem Tris-Borat-EDTA-Puffer gelöst wurde. Der Puffer enthielt außerdem Harnstoff in einer Konzentration von 7 M, um die Denaturierung der DNA zu gewährleisten. Die DNA-Proben wurden durch Anlegen einer Spannung von 10 kV über 2 sec injiziert und bei 9 kV über 45 min getrennt.

**Kernspinresonanzspektren** wurden an den Geräten ARX-200, ARX-300, DRX 400, DRX 500 und AMX 600 der Firma *Bruker* und VXR 400 der Firma *Varian* bei Raumtemperatur oder 60 °C erstellt. Die chemischen Verschiebungen sind in  $\delta$ -Werten angegeben und beziehen sich im <sup>1</sup>H-NMR auf Tetramethylsilan (TMS,  $\delta = 0.00$  ppm) als internen Standard oder auf die entsprechenden Signale der verwendeten Lösungsmittel. Im <sup>31</sup>P-NMR wird 85%ige Phosphorsäure als externer Standard eingesetzt. In Klammern sind jeweils die Messfrequenz in MHz sowie das

Lösungsmittel vermerkt. Für die Signalmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s: Singulett, d: Dublett, dd: Doppeldublett, t: Triplett, m: Multipllett. Außerdem werden die Kopplungskonstante J in Hz sowie die Anzahl der signalerzeugenden Protonen angegeben.

**Massenspektren** wurden mit einem *Finnigan* MAT 95 S Massenspektrometer (Felddesorption) oder einem *HP* 5989B Massenspektrometer (Elektrosprayionisation, Quelle: *Analytica of Branford*) oder einem *Jeol* M station JMS 700 (FAB, Xenon 6 kV, Matrix: NBA) erstellt. Die Analyse von Oligonukleotiden wurde mit einem Flex III-Gerät (MALDI-TOF, HV: 19 kV, Detektor: 1.45 kV) der Firma *Bruker* durchgeführt. Als Matrix wurde THA und Citratpuffer in Ethanol verwendet (0.5 M THA/0.1 M Diammoniumhydrogencitrat 2:1, Mischung/Ethanol 1:4). Es werden die wichtigsten Signale in m/z Einheiten angegeben. Die Molmasse des Molekülions wird dabei mit M bezeichnet.

**Oligonukleotid-Synthese** erfolgte auf einem als *Expedite® Nucleic Acid Synthesis System* bezeichneten Gerät der Firma *PerSeptive Biosystems*. Pac-geschützte Phosphoramidite stammten von *Pharmacia* und *Glen Research*. Die mit geschütztem Nucleosid beladenen CPG-Träger wurden von *PE Biosystems* bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden selbst hergestellt. Es wurde Acetonitril der Firma *Riedel-de Haën* mit einem Wassergehalt von maximal 0.001% für die Aktivator-Lösung und die Phosphoramidite und von 0.030% für die übrigen Reagenzien verwendet. Alle hergestellten Lösungen wurden vor der Synthese 24 h über 4 Å-Molekularsieb getrocknet. Die Kupplung von natürlichen Oligonukleotiden erfolgte nach den vom Gerätehersteller entwickelten Protokollen. Für den Einbau des Desazaflavin-Nucleotids, des Riboflavin-Nucleotids und des Thymidin-Dimers wurde die Kupplungszeit heraufgesetzt.

**Reagenzien und Lösungsmittel** wurden bei Bedarf destilliert und getrocknet. Reagenzien für Reaktionen wurden von den Firmen *Aldrich*, *Fluka* und *Merck* in den Qualitäten *puriss.*, *p.a.* oder *purum* erhalten und eingesetzt. Chloroform für die Säulenchromatographie war technischer Qualität und wurde vor Gebrauch einfach destilliert. Methanol und Triethylamin wurden in der Qualität *puriss.* verwendet.

Acetonitril wurde im Fall der HPLC in der Qualität „*gradient grade*“ für die Flüssigkeitschromatographie“ eingesetzt.

Dichlormethan wurde in der Qualität *puriss.* bezogen und für mehrere Tage über  $\text{CaH}_2$  unter Rückfluß gekocht, dann destilliert.

Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid wurden in der Qualität *puriss.* eingesetzt und über 3 Å-Molekularsieb getrocknet.

Ethanol wurde mit Natrium und Phthalsäurediethylester 2 h unter Rückfluß erhitzt und anschließend abdestilliert.

Pyridin wurde für zwei Wochen über KOH getrocknet und dann destilliert.

Abdestillieren und Einengen von Lösungsmitteln *in vacuo* erfolgte mit einem Rotationsverdampfer der Firma *Heidolph* im Membranpumpenvakuum.

**Säulenchromatographie** wurde mit Kieselgel-60 (Korngröße 0.063-0.200 mm) als Füllmaterial durchgeführt. Das verwendete Laufmittel wird in Klammern angegeben.

**Schmelzpunkte** wurden mit Hilfe einer Schmelzpunktapparatur der Firma *Büchi* (Typ S) in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert.

**UV-Spektroskopie** wurde an einem *Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrophotometer* der Firma *Varian* durchgeführt.

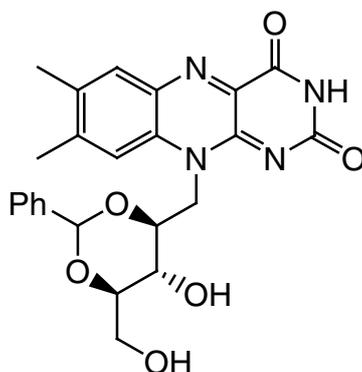
**Protein-Konzentrationsbestimmungen** wurden nach der Methode von *Bradford* durchgeführt. Der in der Lösung enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue 250 interagiert mit Proteinen an apolaren Resten und Argininen. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm.

Es wurden 200  $\mu\text{L}$  Bradfordlösung und 800  $\mu\text{L}$  entionisiertes Wasser in einer Einmalküvette vorgelegt. Anschließend wurden zwischen 0.5 und 10  $\mu\text{L}$  der zu bestimmenden Proteinlösung (1.5-20 $\mu\text{g}$  Protein) hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm ermittelt. Durch eine mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration hergestellte Eichgerade ließ sich die Proteinkonzentration einer Probe proportional zur Absorption bestimmen.

**Hanging-Drop Methode** Hier wird ein Tropfen aus Probe und Fällungsreagens auf einem silikonierten Deckglas mit 22 mm Durchmesser, hängend und luftdicht abgeschlossen über einem Reservoir mit einem Volumen von 750-1000  $\mu\text{L}$  Fällungsreagenz positioniert. In Q-Plates sind 6x4 dieser Reservoirs angeordnet, so dass auf einer Platte 24 Ansätze auspipetiert werden können. Der Vorteil dieser Kristallisationsmethode liegt darin, dass ein entstandener Proteinkristall nach unten sinkt und damit Wechselwirkungen mit der Glasoberfläche ausgeschlossen sind. Da die Konzentration des Fällungsreagens im Tropfen geringer ist, verdunstet dort Wasser bis zum Erreichen eines Gleichgewichts zwischen Reservoir und Tropfen: Die Lösung im Tropfen wird übersättigt.

## 5.2 Synthese des Riboflavin-DNA-Bausteins

10-[(2*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-5-Hydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl]methyl-7,8-dimethylbenzo[*g*]pteridin-2,4(3*H*,10*H*)-dion **5**

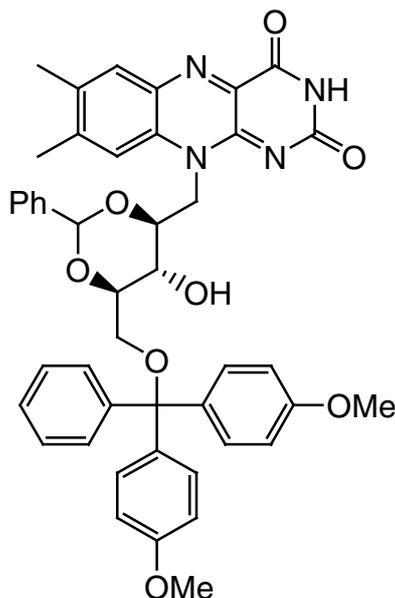


Unter Stickstoffatmosphäre wurden Riboflavin **4** (5.0 g, 13 mmol), PhCH(OMe)<sub>2</sub> (2.00 g, 13 mmol) und CSA (0.60 g, 2.6 mmol) in DMF (200 mL) suspendiert und am Rotationsverdampfer bei 50 °C und 60 mbar für 16 h rotiert. NaHCO<sub>3</sub> (2.3 g) wurde zugegeben. Das DMF wurde bei 50 °C und 12 mbar abdestilliert und anschließend unter Hochvakuum vollständig entfernt. Das gelbe Pulver wurde in CHCl<sub>3</sub> suspendiert und 15 min im Ultraschallbad beschallt. Die Suspension wurde abfiltriert und der Rückstand (Edukt) mit CHCl<sub>3</sub> (3 x 100 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde mit Wasser (3 x 200 mL) und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Si 60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 30:1, dann 20:1) wurden 0.83 g (0.179 mmol, 14%) **5** als gelbes Pulver isoliert.

Smp.: 218-220 °C (Zersetzung). R<sub>f</sub> (Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1): 0.28. IR (KBr): 3146, 2940, 1718, 1654, 1579, 1544, 1085, 1020 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Pyridin): 2.18, 2.31 (2 s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>); 4.28-4.30 (m, 2 H, H-C(3', 4')); 4.35-4.37, 4.50-4.58 (2 m, 2 H, H-C(5')); 4.70-4.78 (m, 1 H, H-C(2')); 5.19-5.38, 5.68-5.80 (2 m, 2 H, H<sub>2</sub>-C(1')); 5.85 (s, 1 H, CH<sub>Benzyliden</sub>); 6.44-6.92 (m, 1 H, HO-C(5')); 7.30-7.38, 7.56-7.57 (2 m, 5 H, CH<sub>arom.</sub>); 7.87 (s, 1 H, H-C(6)); 8.14 (s, 1 H, NH); 13.43 (s, 1 H, HO-C(3')) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, Pyridin): 19.00, 20.80, 47.77, 62.12, 64.58, 80.40, 83.58, 100.90, 118.63, 126.92 (2 C), 128.34 (2 C), 129.07, 131.76, 131.91, 134.99, 136.15, 138.03, 138.87, 146.21, 151.67,

156.83, 161.02 ppm. FAB-MS (positiv; 3-NOBA): 465 (100, [MH]<sup>+</sup>). HRMS (FAB<sup>+</sup>): ber. 464.1774, [MH]<sup>+</sup>; gef. 465.1776.

10-(((2*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-6-[Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy]methyl-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)methyl]-7,8-dimethyl-benzo[*g*]pteridin-2,4(3*H*,10*H*)-dion **6**



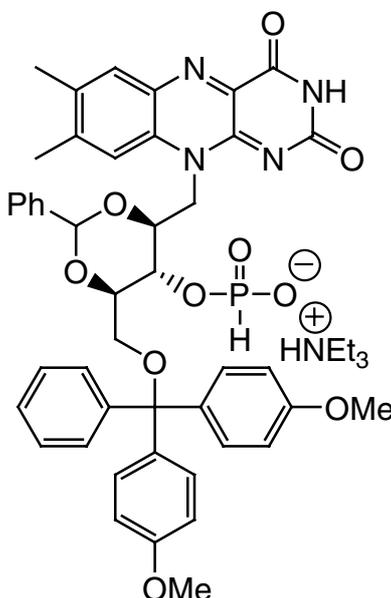
Eine Suspension aus **5** (0.60 g, 1.29 mmol) und Pyridin (40 mL) wurde für 1 h mit Molekularsieb unter Stickstoff gerührt. Nach Zugabe von Dimethoxytritylchlorid (0.74 g, 2.20 mmol) wurde die Suspension 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Methanol (5 mL) wurde 15 min gerührt, dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt und das Rohprodukt am Hochvakuum getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel 60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub> 30:1:0.2) wurden 0.76 g (0.99 mmol, 77%) **6** in Form eines gelben Pulvers erhalten.

Smp.: 179-180 °C. R<sub>f</sub> (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 20:1):0.4. IR (KBr): 3471, 3180, 2920, 1654, 1544, 1400, 1086, 1030 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.40, 2.43 (2 s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 6 H, 2 PhOCH<sub>3</sub>), 3.37-3.40, 3.48-3.50, 3.95-3.98, 4.23-4.29, 4.90-5.01 (5 m, 7 H, H-C(1', 2', 3', 4', 5')), 5.64 (s, 1 H, CH<sub>Benzyliden</sub>), 6.76-6.78, 7.15-7.42 (2 m, 18 H, CH<sub>arom.</sub>), 7.92, 8.04 (2 s, 2 H, H-C(6, 9)), 8.56 (s, 1 H, NH), 8.63 (s, 1 H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 19.47, 21.29, 47.50, 55.17 (2 C), 63.77, 68.15, 80.06, 80.57, 86.04, 100.47, 113.06

## 5. Experimenteller Teil

(4 C), 118.11, 123.73, 125.93, 126.71, 127.72, 128.01, 128.15, 128.79, 128.87, 130.09, 130.14, 130.86, 132.28 (2 C), 132.31 (2 C), 135.34, 135.39, 135.95, 136.02, 137.35, 137.56, 144.95, 148.25, 149.83, 150.76, 154.08, 158.42, 159.10. FAB-MS (positiv, 3-NOBA): 766 (20)  $[M^+]$ , 303 (100)  $[DMT^+]$ . HRMS (FAB<sup>+</sup>): ber. 766.3002  $[M^+]$ ; gef. 766.2999  $[M^+]$ .

(2*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-4-[Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy]methyl-6-[7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[*g*]pteridin-10(2*H*)-yl]methyl-2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl-Hydrogenphosphonat **3**



Unter Stickstoff wurde in einem ausgeheizten Kolben  $CH_2Cl_2$  (10 mL) und  $PCl_3$ -Lösung (2 mol/L in  $CH_2Cl_2$ , 0.64 mL, 1.28 mmol) vorgelegt und anschließend N-Methylmorpholin (405 mg, 4.00 mmol) zugegeben. Kurze Zeit später wurde 1,2,4-Triazol (277 mg, 4.00 mmol) zugegeben und die weiße Suspension 30 min bei RT gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Eine Lösung aus **6** (200 mg, 0.26 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (5 mL) wurde langsam zugetropft. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurde das Eisbad entfernt und nach weiteren 15 min Pufferlösung  $[(HNEt_3)HCO_3]$ , pH = 7.8, 1 M, 5 mL] zugegeben. Nach 30 min Hydrolyse wurde die Emulsion mit  $CH_2Cl_2$  (100 mL) und Pufferlösung (100 mL) versetzt und 1x ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet und eingengt. Das erhaltene *H*-Phosphonat wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60,  $CHCl_3/MeOH/NEt_3$  15:1:0.2, dann

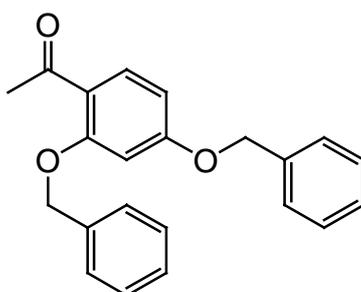
Gradient 10:1:0.2 bis 8:1:0.2) gereinigt. Die Produktfraktionen wurden einrotiert, in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) aufgenommen und nochmals mit Pufferlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, eingengt und am HV getrocknet. Das *H*-Phosphonat **3** (199 mg, 0.21 mmol, 81%) wurde als gelbes Pulver erhalten.

Smp.: 162-163 °C.  $R_f$  (Kieselgel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$  15:1:0.1): 0.18. IR (KBr): 3420, 3139, 1654, 1545, 1400, 1086, 1050, 1030.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.31 (t, 9 H,  $J=7.5$  Hz,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ ), 2.43, 2.45 (2 s, 6 H, 2  $\text{CH}_3$ ), 3.13 (q, 6 H,  $J = 7$  Hz,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ ), 3.37 (dd, 1 H,  $J = 3.1, 10.3$  Hz, H-C(5')), 3.53-3.56 (m, 1 H, H-C(5')), 3.77, 3.78 (2 s, 6 H,  $\text{PhOCH}_3$ ), 3.92-3.96, 4.39-4.55, 4.86-4.94, 5.76-5.80 (4 m, 5 H, H-C(1', 2', 3', 4')), 5.43 (s, 1 H,  $\text{CH}_{\text{Benzyliden}}$ ), 7.26 (d, 1 H,  $J_{\text{PH}} = 632$  Hz, PH), 6.76-6.84, 7.09-7.61 (2 m, 18 H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.91, 8.00 (2 s, 2 H, H-C(6, 9)).  $^{31}\text{P-NMR}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.21 (dd,  $J = 630$  Hz, PH). ESI-MS (MeOH, negativ): 829 (50) [M], 527 (100).

## 5.3 Synthese der Desazaflavin-Nukleotide

### 5.3.1 Desazaflavin-DNA-Baustein

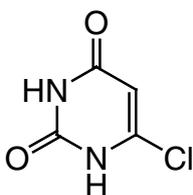
#### 2,4-Bisbenzyloxybenzaldehyd **16**



Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (25 g, 180 mmol), Benzylbromid (45.2 mL, 380 mmol) und  $K_2CO_3$  (75 g) in Aceton (300 mL) 15 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und das Filtrat eingengt. Das Konzentrat wurde in Ethylacetat (200 mL) gelöst, mit  $Na_2CO_3$  (100 mL), 3% HCl (100 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet und eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde aus einem Gemisch Chloroform/Ether 1:1 umkristallisiert. Es wurden 53.2 g (166 mmol, 92%) **16** in Form von hellgelben Kristallen erhalten.

IR ( $CHCl_3$ ): 3026 *w*, 2866 *w*, 1675 *s*, 1602 *s*.  $^1H$ -NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ ): 5.15, 5.2 (2 s, 4 H,  $CH_2$ ), 6.6 (s, 1 H,  $CH_{arom.}$ ), 7.35-7.50 (m, 11 H,  $CH_{arom.}$ ), 7.8 (d, 1 H,  $CH_{arom.}$ ), 10.4 (s, 1 H, CHO).

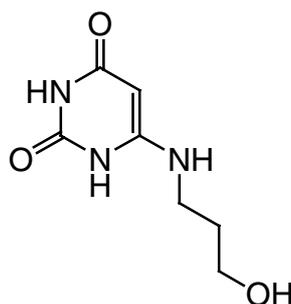
#### 6-Chlor-(1*H*,3*H*)-pyrimidin-2,4-dion **13**



2,4,6-Trichloropyrimidin (15 mL, 0.13 mol) wurde in eine Lösung von Wasser (200 mL) und NaOH (20 g) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h unter Rückfluss gekocht und anschließend abgekühlt. Die Reaktionslösung wurde mit konz. HCl (ca. 20 mL) auf pH 2 eingestellt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die ausgefallenen Kristalle wurden abgenutscht und aus Wasser umkristallisiert. Es wurden 16.43 g **13** (0.11 mol, 86%) in Form von weißen Kristallen erhalten.

Smp.: 290 °C (Lit.: 292-293 °C). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 5.74 (s, 1 H, H-C), 11.30 (s, 1 H, NH), 12.10 (s, 1 H, NH).

#### 6-Amino-3-propanol-(1*H*,3*H*)-pyrimidin-2,4-dion **15**



6-Chloruracil **13** (5.00 g, 0.034 mol, 1 eq) wurde mit 3-Aminopropanol (30 mL, 0.39 mol, 11.6 eq) zum Sieden erhitzt und 30 min refluxiert. Anschließend wurde der überschüssige Alkohol im Vakuum (45 mbar) abdestilliert. Nach Zugabe von Wasser unter Rühren wurde die abgekühlte Lösung über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die Kristalle wurden abgenutscht, aus Wasser umkristallisiert und am HV getrocknet. Es wurde **15** (5.14 g, 0.028 mol, 82%) in Form hellgelber Kristalle erhalten.

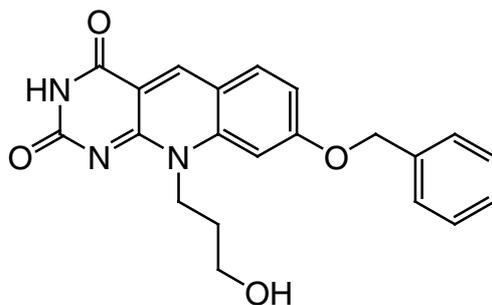
Smp.: 223-227 °C. IR (KBr): 3433 *s*, 3237 *s*, 1704 *m*, 1465 *m*, 1333 *m*, 1036 *w*. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 1.61 (quint., 2 H, J = 6.3 Hz, H<sub>2</sub>-C(2')), 3.04 (q, 2 H, J = 6.0 Hz, H<sub>2</sub>-C(1')), 3.44 (q, 2 H, J = 6.0 Hz, H<sub>2</sub>-C(3')), 4.39 (s, 1 H, H-C), 4.59 (t (br), 1 H, J = 5.0 Hz, OH), 6.08 (t (br), 1 H, J = 5.0 Hz, NH), 9.90 (s, 1 H, NH<sub>Ring</sub>), 10.14 (s, 1 H,

## 5. Experimenteller Teil

---

NH<sub>Ring</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 31.18, 38.75, 58.25, 72.40, 150.80, 154.07, 164.23.

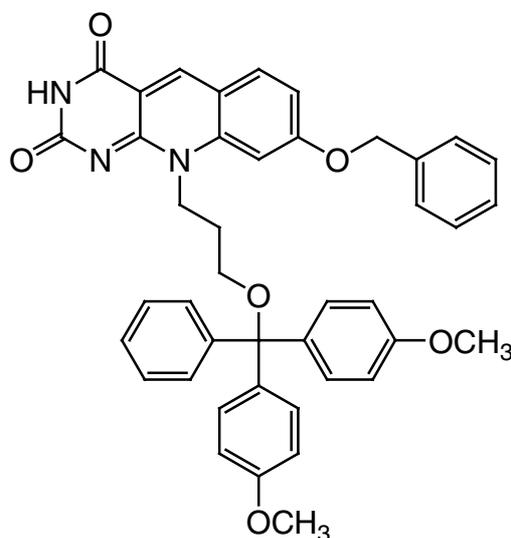
### 8-Benzyloxy-10-(3-hydroxy-propyl)-10*H*-pyrimido[4,5-*b*]chinolin-2,4-dion **17**



Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2,4-Dibenzyloxybenzaldehyd **16** (2.76 g, 8.64 mmol, 0.8 eq) und **15** (2.00 g, 10.80 mmol, 1 eq) in DMF (30 mL) gelöst und 5 h unter Rückfluss erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, erfolgte Lagerung im Kühlschrank über Nacht. Der ausgefallene gelbe Niederschlag wurde mit Lösungsmittel in PE-Röhrchen verteilt und zentrifugiert (4000 rpm, 20 min). Nach Verwerfen des Überstandes, Waschen des Präzipitats mit DMF und erneutem Zentrifugieren wurde der Rückstand aus DMF umkristallisiert. Nach Trocknen am HV wurde **17** (2.23 g, 5.90 mmol, 68%) in Form gelber Kristalle erhalten.

Smp.: 240 °C (Zers.). IR (KBr): 3419 *s*, 2990 *s*, 1685 *w*, 1651 *m*, 1594 *s*, 1564 *w*, 1524 *s*, 1489 *w*, 1463 *w*, 1405 *w*, 1373 *w*, 1243 *s*. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 1.90 (quint., 2 H, J = 6.6 Hz, H<sub>2</sub>-C(2')), 3.54 (q, 2 H, J = 5.7 Hz, H<sub>2</sub>-C(3')), 4.41-4.69 (m, 2 H, H<sub>2</sub>-C(1')), 4.90 (t, 1 H, J = 5.3 Hz, OH), 5.38 (s, 2 H, H<sub>2</sub>-C<sub>ben</sub>), 7.26 (dd, 1 H, J = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J = 1.9 Hz, H-C(7)), 7.36 (s, 1 H, H-C(9)), 7.41-7.44 (m, 3 H, H-C<sub>arom.</sub> Bn), 7.52 (d, 2 H, J = 7.4 Hz, H-C<sub>arom.</sub> Bn), 8.12 (d, 1 H, J = 9.0 Hz, H-C(6)), 8.90 (s, 1 H, H-C(5)), 11.0 (s, 1 H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 55 °C): 29.6 (C2'), 41.9 (C1'), 57.7 (C3'), 70.1 (CH<sub>2</sub>-Ph), 100.0 (C9), 111.9 (C7), 114.5 (C5a), 115.8 (C4a), 127.7 (2x, C<sub>arom.</sub> Bn, ortho), 128.0 (C<sub>arom.</sub> Bn, para), 128.3 (2x, C<sub>arom.</sub> Bn, meta), 133.5 (C6), 135.7 (C<sub>arom.</sub> Bn), 140.8 (C5), 142.1 (C9a), 156.2 (C8), 157.4 (C2), 162.0 (C10a), 164.0 (C4). MS (ESI<sup>+</sup>): 400 (M+Na<sup>+</sup>).

8-Benzyloxy-10-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propyl}-10H-pyrimido[4,5-*b*]chinolin-2,4-dion **18**



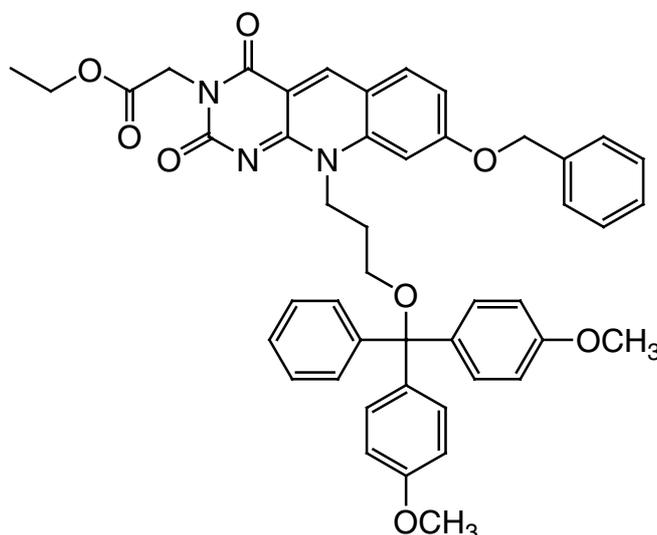
In einen ausgeheizten Kolben wurde unter Stickstoffatmosphäre trockenes Pyridin (25 mL) und Molsieb gegeben und 1 h leicht gerührt. Anschließend wurde das Desazaflavin **17** (500 mg, 1.32 mmol, 1 eq) hinzugefügt und die Suspension 17 h gerührt. Nach der Zugabe von Dimethoxytritylchlorid (763 mg, 2.25 mmol, 1.7 eq) wurde das Reaktionsgemisch 69 h (DC-Kontrolle) reagieren gelassen. Es wurde MeOH (4 mL) hinzugegeben und für weitere 15 min gerührt, wobei sich der gelbe Niederschlag auflöste. Das Gemisch wurde mit entsäuertem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) versetzt und mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3x 100 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel 60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub> 150:1:0.2 → 50:1:0.2) wurde **18** (864.6 mg, 1.27 mmol, 96%) als gelber Feststoff isoliert.

Smp.: 195-200 °C (Zers.). R<sub>f</sub> (Kieselgel 60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub> 5:1:0.2) = 0.77. IR (KBr): 3447 s, 2951 s, 1686 w, 1668 w, 1606 s, 1530 s, 1507 w, 1448 w, 1405 w, 1236 s. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.14 (quint., 2 H, J = 5.8 Hz, H<sub>2</sub>-C(2')), 3.35 (t, 2 H, J = 5.6 Hz, H<sub>2</sub>-C(3')), 3.74 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 4.90 (m, 2 H, H<sub>2</sub>-C(1')), 5.18 (s, 2 H, H<sub>2</sub>-C<sub>Bn</sub>), 6.80 (d, 4 H, J = 8.9 Hz, H-C<sub>arom.</sub> DMT), 6.86 (dd, 1 H, J = 8.8 Hz, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz, H-C(7)), 7.19-7.43 (m, 14 H, H-C<sub>arom.</sub> DMT, H-C<sub>arom.</sub> Bn), 7.84 (d, 1 H, J = 8.9 Hz, H-C(6)), 8.08 (s, 1 H, H-C(9)), 8.81 (s, 1 H, H-C(5)). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 29.5 (C2'), 41.2 (C1'), 55.0

## 5. Experimenteller Teil

(2 CH<sub>3</sub>-O), 57.3 (C3'), 71.0 (CH<sub>2</sub>-Ph), 89.0, 99.5 (C9), 111.2 (C7), 113.9 (C5a), 114.1 (4 C, DMT), 115.4 (C4a), 126.0 (1 C, DMT), 127.2 (2 C, C<sub>arom.</sub>Bn), 127.9 (C<sub>arom.</sub>Bn), 128.1 (2 C, C<sub>arom.</sub>Bn), 128.4 (2 C, DMT), 128.9 (2 C, DMT), 129.1 (4 C, DMT), 131.0 (2 C, DMT), 133.1 (C6), 135.5 (C<sub>arom.</sub>Bn), 140.1 (C5), 142.0 (C9a), 142.5 (1 C, DMT), 155.8 (C8), 157.1 (C2), 158.5 (2 C, DMT), 161.5 (C10a), 163.6 (C4). MS (FD): 679 (M<sup>+</sup>). MS (ESI+) 702.23 (M+Na<sup>+</sup>). HR-MS (ESI+) ber. für C<sub>42</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Na: 702.2580, gef. 702.2567.

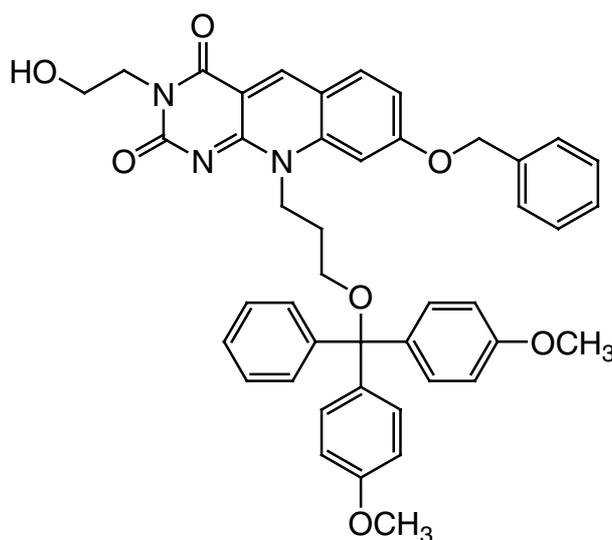
(8-Benzyloxy-10-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propyl}-2,4-dioxo-4,10-dihydro-2H-pyrimido[4,5-*b*]chinolin-3-yl)-essigsäureethylester **19**



Unter Stickstoffatmosphäre wurde zu **18** (864.6 mg, 1.27 mmol, 1 eq) DMF (42 mL) hinzugefügt und die Suspension 1 h gerührt. Nach der Zugabe von Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (497.3 mg, 1.53 mmol, 1.2 eq) wurde nochmals 1 h gerührt. Anschließend wurde Bromessigsäureethylester (0.42 mL, 3.82 mmol, 3 eq) hinzugegeben. Nach 19 h Rühren des Reaktionsgemisches bei RT wurde es mit entsäuertem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) versetzt und mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3x 100 mL) ausgeschüttelt. Danach wurde die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel 60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub>, 200:1:0.4 → 100:1:0.4) wurde **19** (920.6 mg, 1.20 mmol, 95%) in Form eines orangefarbenen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.14 (t, 3 H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_3\text{-C}$ ), 2.11 (m, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}(2')$ ), 3.33 (t, 2 H,  $J = 5.4$  Hz,  $\text{H}_2\text{-C}(3')$ ), 3.71 (s, 6 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.19 (q, 2 H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.79 (s, 2 H,  $\text{N-CH}_2\text{-CO}$ ), 5.05 (s, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}(1')$ ), 5.14 (s, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}_{\text{Bn}}$ ), 6.75 (d, 4 H,  $J = 8.9$  Hz,  $\text{H-C}_{\text{arom. DMT}}$ ), 6.96-7.07 (m, 1 H,  $\text{H-C}(7)$ ), 7.12-7.45 (m, 15 H,  $\text{H-C}_{\text{arom. DMT}}$ ,  $\text{H-C}_{\text{arom. Bn}}$ ,  $\text{H-C}(9)$ ), 7.80 (d, 1 H,  $J = 9.1$  Hz,  $\text{H-C}(6)$ ), 8.77 (s, 1 H,  $\text{H-C}(5)$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.7, 14.1, 27.3, 29.7, 45.8 (2 C), 55.2, 61.3, 100.2, 113.1, 113.2 (4 C), 127.5, 127.7 (2 C), 127.8, 128.1 (2 C), 128.6 (2 C), 128.8 (2 C), 130.0 (4 C), 133.0, 133.5 (2 C), 135.9, 140.7, 141.9, 158.4, 158.5 (2 C), 161.7, 163.5. MS (ESI+): 788.29 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ). HR-MS (ESI+) ber. für  $\text{C}_{46}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ : 788.2948, gef. 788.2947.

8-Benzyloxy-10-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propyl}-3-(2-hydroxyethyl)-10*H*-pyrimido[4,5-*b*]chinolin-2,4-dion **20**



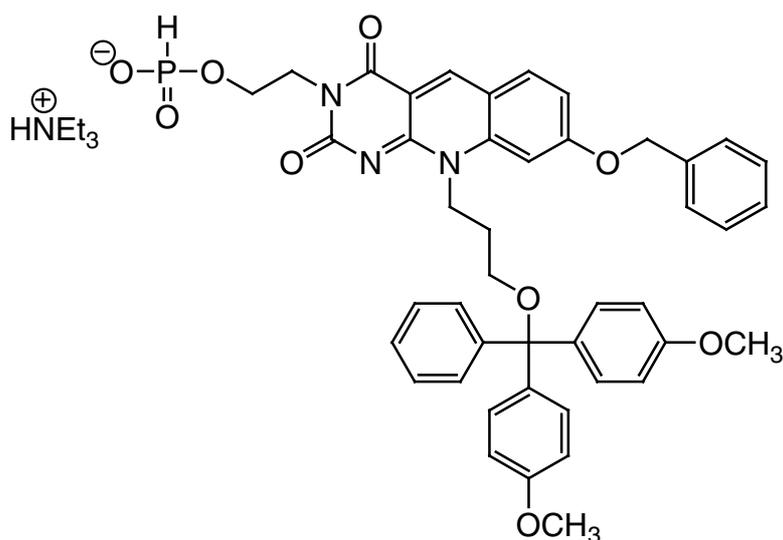
**19** (284.0 mg, 0.37 mmol, 1 eq) wurden unter Stickstoffatmosphäre in trockenem THF (16 mL) gelöst und auf  $-78$  °C gebracht. Daraufhin wurde DIBALH (1 M in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0.82 mL, 0.82 mmol, 2.2 eq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 2 h gerührt. Anschließend wurde das Gemisch bei RT für weitere 20 h gerührt. Es wurde erneut DIBALH (1 M in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1.10 mL, 1.10 mmol, 3 eq) jeweils 1 eq alle 2 h zugegeben und nochmals 20 h bei RT gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch in ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (100 mL) getropft und mit entsäuertem  $\text{CHCl}_3$  (100 mL) versetzt. Nach weiterer Extraktion mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (2x 100 mL), Trocknen der

## 5. Experimenteller Teil

organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Einengen im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silica-*H*,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$  150:1:0.6) gereinigt. Es wurde **20** (211.0 mg, 0.29 mmol, 79%) in Form eines gelben Öls erhalten.

$R_f$  (Kieselgel 60,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$  50:1:0.2) = 0.28.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.78-1.88 (m, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}(2')$ ), 3.01-3.12 (m, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}(3')$ ), 3.50-3.58 (m, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C-O}$ ), 3.67 (s, 6 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.00-4.30 (m, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C-N}$ ), 5.01 (s (br), 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}(1')$ ), 5.10 (s, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}_{\text{Bn}}$ ), 6.70 (d, 4 H,  $J = 8.9$  Hz,  $\text{H-C}_{\text{arom. DMT}}$ ), 6.82 (dd, 1 H,  $J = 8.9$  Hz,  $^4J = 1.9$  Hz,  $\text{H-C}(7)$ ), 7.18-7.40 (m, 15 H,  $\text{H-C}_{\text{arom. DMT}}$ ,  $\text{H-C}_{\text{arom. Bn}}$ ,  $\text{H-C}(9)$ ), 7.75 (d, 1 H,  $J = 8.9$  Hz,  $\text{H-C}(6)$ ), 8.74 (s, 1 H,  $\text{H-C}(5)$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 32.5, 45.7, 46.3, 56.1 (2 C), 60.2, 61.1, 77.6, 87.0, 97.8, 102.2, 110.3, 114.1 (4 C), 120.1, 126.0, 126.9 (2 C), 127.4, 128.0, 128.4 (2 C), 128.7 (2 C), 129.0 (2 C), 129.2 (4 C), 131.3 (2 C), 140.9, 142.1, 142.5, 143.0, 159.2 (2 C), 161.1, 162.3, 164.2, 165.1. MS (ESI<sup>+</sup>): 762.25 (M + K<sup>+</sup>). HR-MS (ESI<sup>+</sup>) ber. für  $\text{C}_{44}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_7\text{K}$ : 762.2582, gef. 762.2554.

8-Benzyloxy-10-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propyl}-3-(2-hydroxyethyl)-10*H*-pyrimido[4,5-*b*]chinolin-2,4-dionyl-(triethylammonium-*H*-Phosphonat) **21**



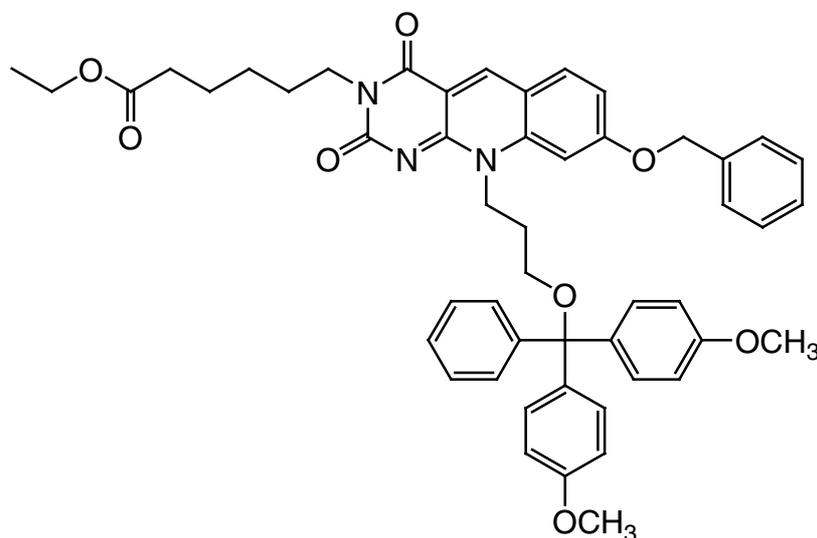
In einen ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 mL),  $\text{PCl}_3$  (2 M in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0.55 mL, 5 eq) und anschließend *N*-Methylmorpholin (1.22 mL, 11.05 mmol, 50 eq) gegeben. Danach wurden 1,2,4-Triazol (0.25 g, 3.68 mmol, 16.6 eq) hinzugefügt. Die

gelbliche Suspension wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Das in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (16 mL) gelöste Desazaflavin **20** (0.16 g, 0.22 mmol, 1 eq) wurde langsam (45 min) zugetropft und die Suspension 30 min bei 0 °C gerührt. Dann wurde 4 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Puffer ((NEt<sub>3</sub>)HCO<sub>3</sub>, pH 8.2, 4 mL) wurde 30 min hydrolysiert. Anschließend wurde 1x mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) und Puffer (100 mL) ausgeschüttelt, die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel 60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Pyr. 15:1:0.2 → 7:1:0.2) wurde das Produkt erneut 1x mit Puffer (50 mL) ausgeschüttelt. Nach Trocknen am HV wurde das *H*-Phosphonat **21** (125 mg, 0.14 mmol, 64%) in Form eines gelben Öls erhalten.

R<sub>f</sub> (Kieselgel 60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 15:1) = 0.01. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.37 (t, 9 H, J = 7.2 Hz, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 1.85 (quint, 2 H, J = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-C(2')), 3.07 (q, 6 H, J = 7.2 Hz, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 3.57 (t, 2 H, J = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-C(3')), 3.59 (q, 2 H, J = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-C-OPO<sub>2</sub>H), 3.71 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 4.19 (t, 1 H, J = 6.0 Hz, H<sub>a</sub>-C(1')), 4.30 (t, 1 H, J = 6.0 Hz, H<sub>b</sub>-C(1')), 4.67 (m, 2 H, H<sub>2</sub>-C-N(3)), 5.28 (s, 2 H, H<sub>2</sub>-C<sub>Bn</sub>), 6.75 (d, 4 H, J = 8.8 Hz, H-C<sub>arom.</sub> DMT), 6.78 (d, 1 H, <sup>1</sup>J<sub>P-H</sub> = 621.6 Hz, PH), 7.14 (d, 1 H, J = 8.8 Hz, H-C(7)), 7.27-7.32 (m, 10 H, H-C<sub>arom.</sub> DMT, H-C<sub>arom.</sub> Bn), 7.30 (d, 2 H, J=8.8 Hz, H-C<sub>arom.</sub> DMT), 7.39 (d, 2 H, J = 6.8 Hz, H-C<sub>arom.</sub> Bn), 7.80 (d, 1 H, J = 8.8 Hz, H-C(6)), 8.49 (s, 1 H, H-C(9)), 8.74 (s, 1 H, H-C(5)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.6 (3 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 29.6 (C2'), 42.1 (CH<sub>2</sub>-N(3)), 45.7 (C1'), 45.8 (3 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 55.2 (2 CH<sub>3</sub>-O), 58.1 (C3'), 76.7 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(3)), 77.8 (Ph-CH<sub>2</sub>-O), 88.0 (C<sub>quart.</sub> DMT), 97.8 (C9), 102.4 (C7), 111.0 (C5a), 113.1 (4xC, DMT), 120.0 (C4a), 126.0 (1xC, DMT), 127.0 (2xC, Ph-CH<sub>2</sub>-O), 127.4 (1xC, Ph-CH<sub>2</sub>-O), 127.8 (C6), 128.2 (2xC, DMT), 128.7 (2xC, Ph-CH<sub>2</sub>-O), 129.1 (2xC, DMT), 129.2 (4xC, DMT), 130.0 (2xC, DMT), 140.1 (1xC, Ph-CH<sub>2</sub>-O), 141.0 (C5), 142.2 (C9a), 143.0 (1xC, DMT), 159.5 (2xC, DMT), 161.1 (C2), 162.0 (C8), 164.2 (C10a), 164.5 (C4). <sup>31</sup>P-NMR (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.85. MS (FAB-): 786.33 (M<sup>-</sup>-HNEt<sub>3</sub>). HR-MS (FAB-) ber. für C<sub>44</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>P: 786.2582, gef. 786.2574.

### 5.3.2 Desazaflavin-DNA-Hairpin-Bausteine

6-(8-Benzyloxy-10-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propyl}-2,4-dioxo-4,10-dihydro-2*H*-pyrimido[4,5-*b*]chinolin-3-yl)-hexansäureethylester **24**

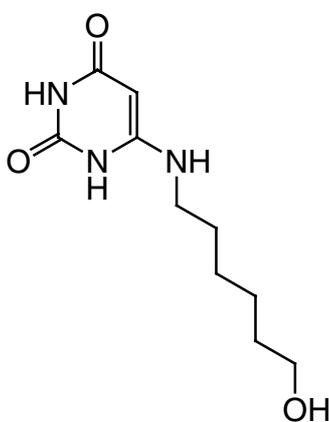


Unter Stickstoffatmosphäre wurde **18** (50.0 mg, 0.074 mmol, 1 eq) in DMF (4 mL) 45 min bei RT gerührt. Anschließend wurde  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (28.76 mg, 0.088 mmol, 1.2 eq) hinzugegeben und die Suspension 1 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von Bromhexansäureethylester (40  $\mu\text{L}$ , 0.22 mmol, 3 eq) wurde das Reaktionsgemisch 41 h rühren gelassen. Das Gemisch wurde mit entsäuertem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) versetzt und mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (3x 50 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel 60,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$  200:1:0.6  $\rightarrow$  100:1:0.6) wurde **24** (55.0 mg, 0.067 mmol, 91%) als orangefarbenes Öl isoliert.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.25 (t, 3 H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_3\text{-C}$ ), 1.35-1.45 (m, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}$ ), 1.69-1.73 (m, 4 H,  $\text{H}_2\text{-C}$ ), 2.12-2.15 (m, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}(2')$ ), 2.32 (t, 2 H,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{H}_2\text{-C-C(O)OEt}$ ), 3.37 (t, 2 H,  $J = 5.4$  Hz,  $\text{H}_2\text{-C}(3')$ ), 3.76 (s, 6 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.07 (t, 2 H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{H}_2\text{-C-N}(3)$ ), 4.13 (q, 2 H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.92 (s (br), 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}(1')$ ), 5.19 (s, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}_{\text{Bn}}$ ), 6.80 (d, 4 H,  $J = 8.9$  Hz,  $\text{H-C}_{\text{arom. DMT}}$ ), 6.86 (d, 1 H,  $J = 8.9$  Hz,  $\text{H-C}(7)$ ), 7.15-7.49 (m, 15 H,  $\text{H-C}_{\text{arom. DMT}}$ ,  $\text{H-C}_{\text{arom. Bn}}$ ,  $\text{H-C}(9)$ ), 7.82 (d, 1 H,  $J = 8.7$  Hz,  $\text{H-C}(6)$ ), 8.78 (s, 1 H,  $\text{H-C}(5)$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.7, 14.2, 24.7, 26.5, 27.3, 27.5, 29.6, 34.2,

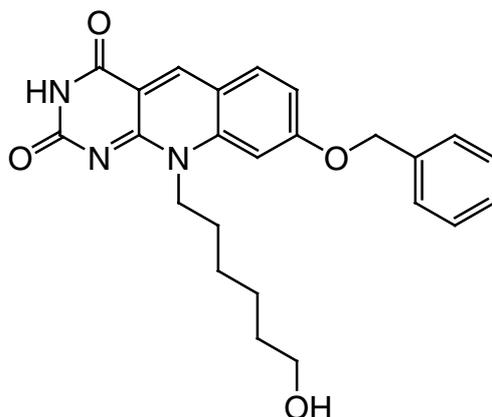
41.0, 42.7, 45.8, 55.1, 55.2, 60.1, 60.8, 70.8, 81.3, 86.4, 100.1, 112.2, 113.1 (4xC, DMT), 114.6, 116.4, 126.8, 127.0, 127.6, 127.7 (2xC, *Ph*-CH<sub>2</sub>-O), 127.8, 128.0 (2xC, *Ph*-CH<sub>2</sub>-O), 128.5, 128.7, 129.1, 129.9 (4xC, DMT), 133.4, 135.1, 135.9, 139.4, 141.7, 142.5, 144.7, 147.3, 156.3, 157.0, 158.5, 158.6, 162.1, 164.7. HR-MS (FAB+) ber. für C<sub>50</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: 822.3754, gef. 822.3759.

### 6-(6-Hydroxy-hexylamino)-1*H*-pyrimidin-2,4-dion **26**



Es wurden 6-Chloruracil **13** (5.00 g, 0.034 mol, 1 eq) und 6-Amino-1-hexanol (46.40 g, 0.396 mol, 11.6 eq) zum Sieden erhitzt und 1 h refluxiert. Anschließend wurde der überschüssige Alkohol im Membranpumpenvakuum (50 mbar) abdestilliert. Unter Rühren wurde Wasser zugegeben und die abgekühlte Reaktionslösung in den Kühlschrank gestellt. Nach 19 h wurden die Kristalle abgenutscht und aus Wasser umkristallisiert. Nach Trocknen am HV wurde **26** als brauner Feststoff (6.08 g, 0.027 mol, 79%) erhalten.

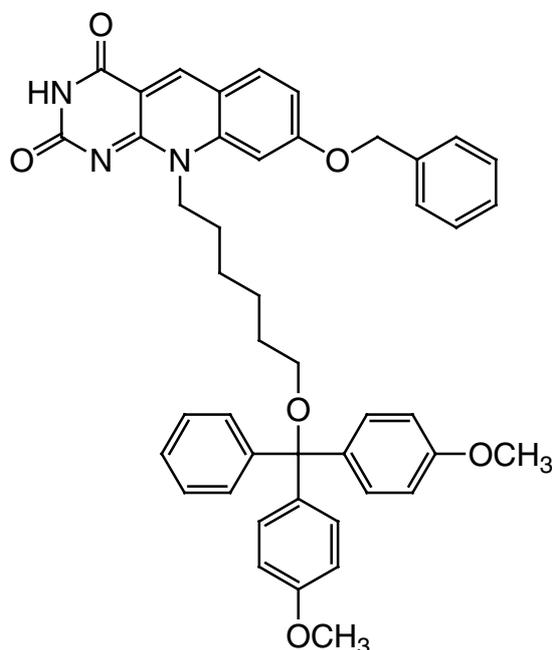
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 1.29-1.32 (m, 4 H, H-C(3', 4')), 1.42 (quint., 2 H, J = 6.7 Hz, H-C(5')), 1.47 (quint., 2 H, J = 6.9 Hz, H-C(2')), 2.99 (q, 2 H, J = 6.9 Hz, H-C(1')), 3.39 (q, 2 H, J = 6.5 Hz, H-C(6')), 6.06 (s (br), 1 H, NH), 9.81 (s, 1 H, NH), 10.23 (s, 1 H, NH). MS (ESI+): 250 (M+Na<sup>+</sup>).

8-Benzyloxy-10-(6-hydroxy-hexyl)-10H-pyrimido[4,5-*b*]chinolin-2,4-dion **27**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2,4-Dibenzyloxybenzaldehyd **16** (2.76 g, 8.64 mmol, 0.98 eq) und **26** (2.00 g, 8.80 mmol, 1 eq) in trockenem DMF (30 mL) gelöst und 5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der ausgefallene gelbe Niederschlag wurde mitsamt Lösungsmittel in PE-Röhrchen verteilt und zentrifugiert (4000 rpm, 20 min). Nach Verwerfen des Überstandes, Waschen des Präzipitats mit DMF und erneutem Zentrifugieren wurde der Rückstand aus DMF umkristallisiert. Nach Trocknen am HV wurde **27** (2.54 g, 6.06 mmol, 70%) in Form gelber Kristalle erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1.30-1.46 (m, 6 H,  $\text{H}_2\text{-C}(2', 3', 4')$ ), 1.58 (quint., 2 H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_2\text{-C}(5')$ ), 3.39 (q, 2 H,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{H}_2\text{-C}(6')$ ), 4.35 (t, 1 H,  $J = 5.4$  Hz, OH), 4.62 (s (br), 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}(1')$ ), 5.43 (s, 2 H,  $\text{H}_2\text{-C}_{\text{Bn}}$ ), 7.25 (s, 1 H, H-C(7)), 7.27 (s, 1 H, H-C(9)), 7.36-7.44 (m, 3 H,  $\text{H-C}_{\text{arom. Bn}}$ ), 7.52 (d, 2 H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H-C}_{\text{arom. Bn}}$ ), 8.11 (d, 1 H,  $J = 8.4$  Hz, H-C(6)), 8.88 (s, 1 H, H-C(5)), 10.95 (s, 1 H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 25.1, 26.0, 26.3, 32.4, 44.0, 60.5, 70.0, 100.0, 111.9, 114.6, 115.8, 127.6 (2xC,  $\text{Ph-CH}_2\text{-O}$ ), 128.1 (1xC,  $\text{Ph-CH}_2\text{-O}$ ), 128.5 (2xC,  $\text{Ph-CH}_2\text{-O}$ ), 133.6, 135.9, 140.9, 141.9, 156.5, 157.3, 162.2, 164.0. MS (FAB+): 420 ( $\text{M}^+$ ). HR-MS (FAB+) ber. für  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4$ : 420.1890, gef. 420.1898.

8-Benzyloxy-10-{6-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-hexyl}-10*H*-pyrimido[4,5-*b*]chinolin-2,4-dion **28**



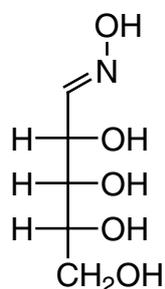
In einen ausgeheizten Kolben wurde unter Stickstoffatmosphäre trockenes Pyridin (25 mL) und Molsieb gegeben und 1 h leicht gerührt. Anschließend wurde das Desazaflavin **27** (600 mg, 1.430 mmol, 1 eq) hinzugefügt und die Suspension 17 h gerührt. Nach der Zugabe von Dimethoxytritylchlorid (824 mg, 2.432 mmol, 1.7 eq) wurde das Reaktionsgemisch 69 h (DC-Kontrolle) gerührt. Es wurde MeOH (4 mL) hinzugegeben und für weitere 15 min gerührt, wobei sich der gelbe Niederschlag auflöste. Das Gemisch wurde mit entsäuertem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) versetzt und mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3x 100 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel 60, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub> 150:1:0.2 bis 50:1:0.2) wurde **28** (847 mg, 1.173 mmol, 82%) als gelbes Öl isoliert.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.84-0.88 (m, 6 H, H<sub>2</sub>-C(2', 3', 4')), 1.62 (quint., 2 H, J = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-C(5')), 3.05 (t, 2 H, J = 6.6 Hz, H<sub>2</sub>-C(6')), 3.77 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 5.28 (s, 2 H, H<sub>2</sub>-C<sub>Bn</sub>), 6.82 (d, 4 H, J = 8.4 Hz, H-C<sub>arom.</sub> DMT), 6.83 (d, 1 H, J = 8.4 Hz, H-C(7)), 7.17-7.41 (m, 14 H, H-C<sub>arom.</sub> DMT, H-C<sub>arom.</sub> Bn), 7.81 (d, 1 H, J = 8.9 Hz, H-C(6)), 8.07 (s, 1 H, H-C(9)), 8.79 (s, 1 H, H-C(5)). <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 26.2, 26.9, 27.0, 29.7, 30.1,

45.5, 55.3 (2 C), 63.3, 71.0, 100.3, 113.2 (4 C), 115.0, 127.1 (2 C), 127.7 (2 C), 127.8 (2 C), 129.1 (4 C), 129.9 (2 C), 133.6, 135.1, 136.6, 139.5, 141.7, 142.7, 145.3, 147.3, 158.3, 158.6 (2 C), 164.9. MS (FAB+): 721.3 ( $M^+$ ). HR-MS (FAB+) ber. für  $C_{45}H_{43}O_6N_3$ : 721.3152, gef. 721.3151.

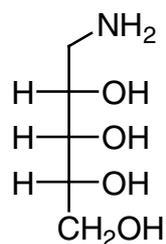
### 5.4 Synthese von **F<sub>0</sub>**

D-Ribose-Oxim **30**



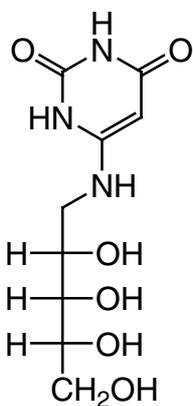
In einen ausgeheizten Kolben wurden unter Stickstoffatmosphäre Hydroxylaminhydrochlorid (17.40 g, 0.25 mol, 1.5 eq), Ethanol absolut (290 mL) und Triethylamin (35 mL, 0.25 mol, 1.5 eq) gegeben und das Gemisch auf 75 °C erwärmt. Nach dem Lösen des Hydroxylaminhydrochlorids wurde D-Ribose **29** (25.00 g, 0.17 mol, 1.0 eq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 20 min bei 75 °C gerührt. Das in Form von weißen Kristallen ausgefallene Oxim wurde abfiltriert und aus Ethanol absolut umkristallisiert. Nach Trocknen am HV wurde **30** (25.15 g, 90%, Lit.: 71%) als weißes Pulver erhalten.

Smp.: 141 °C (Lit.: 141 °C).  $R_f$  (Kieselgel, MeOH): 0.66. IR (KBr): 3409 *s*, 3283 *s*, 2899 *m*, 1682 *w*, 1460 *m*, 1435 *m*, 1389 *m*, 1304 *m*, 1229 *s*, 1087 *s*, 1053 *s*, 979 *s*, 930 *m*, 871 *m*, 748 *m*.

Ribitylamin **31**

Zu einer Suspension aus D-Ribose-Oxim **30** (10.00 g, 0.06 mol) in Eisessig (150 mL) wurde in 50 mL Eisessig suspendierter Pd/C(10%)-Katalysator (3.40 g) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre stark gerührt und anschließend durch Celite filtriert. Nach Waschen mit 100 mL Wasser wurde das Filtrat einrotiert und danach erneut 100 mL Wasser hinzugegeben und einrotiert. Daraufhin wurde das gelbliche Öl in 50 mL Wasser gelöst und mittels Ionenaustauscherchromatographie (Dowex 1-X8, Hydroxidform) gereinigt, wobei die Fraktionen ab dem Zeitpunkt gesammelt wurden, als das Eluent alkalisch wurde. Die Fraktionen wurden eingengt und am HV getrocknet. Das Amin **31** wurde als gelbes Öl (7.17 g, 78%) erhalten.

R<sub>f</sub> (Kieselgel, MeOH/NEt<sub>3</sub> 10:0.1): 0.07. IR (KBr): 3360 *s*, 2935 *m*, 1643 *m*, 1425 *m*, 1073 *m*.

4-Ribitylamino-2,6-dihydroxypyrimidin **32**

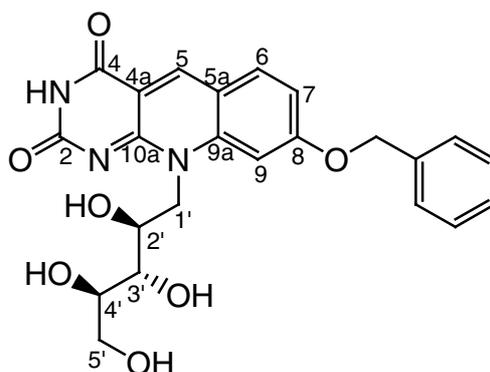
## 5. Experimenteller Teil

---

In einem Druckrohr wurden **31** (2.00 g, 9.26 mmol, 4.0 eq; bei 70% Amin in der Suspension) und 6-Chloruracil **13** (0.34 g, 2.32 mmol, 1.0 eq) in Wasser (10 mL) gelöst und während 3 h bei 128 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Wasser am HV entfernt. Es wurden 2.00 g **32** als Rohprodukt erhalten, welche in dieser Form in der nachfolgenden Stufe eingesetzt wurden.

R<sub>f</sub> (Kieselgel, MeOH/NEt<sub>3</sub> 10:0.1): 0.65. IR (KBr): 3359 *s*, 2934 *m*, 1610 *s*, 1456 *m*, 1332 *m*, 1074 *m*, 878 *m*.

### 8-Benzyloxy-10-*D*-ribityl-5-desazaflavin **33**

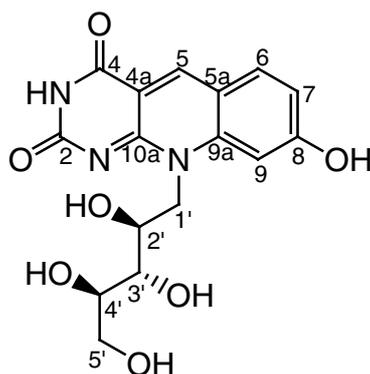


In einem ausgeheizten Kolben mit Rückflusskühler wurden 1.95 g (1.34 eq) des Rohprodukts von **32** (Ribitylaminouracilderivat/Amin-Gemisch) und 2,4-Dibenzyl-oxybenzaldehyd **16** (1.78 g, 5.59 mmol, 1.00 eq) in trockenem DMF (20 mL) 3 h 30 min refluxiert. Das Reaktionsgemisch wurde langsam unter Rühren zu eisgekühltem Wasser (3 x 400 mL) gegeben und der ausfallende gelbe Niederschlag anschließend abzentrifugiert (5800 rpm, 30 min). Das Präzipitat wurde 2x mit Methanol (100 mL) gewaschen und daraufhin am HV getrocknet. Es wurde das Desazariboflavin **33** (221 mg) in Form eines gelben Pulvers erhalten.

Smp.: 241-243 °C (Zers.). R<sub>f</sub> (Kieselgel, MeOH): 0.63. IR (KBr): 3373 *m*, 3031 *w*, 1644 *m*, 1596 *s*, 1525 *s*, 1491 *m*, 1407 *m*, 1252 *s*. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3.46-3.48 (m, 1 H, H<sub>a</sub>-C(5')), 3.63-3.66 (m, 3 H, H-C(3'), H-C(4'), H<sub>b</sub>-C(5')), 4.26-4.28 (m, 1 H, H-C(2')), 4.49 (t, 1 H, J = 5.75 Hz, HO-C(5')), 4.63-4.65 (m, 1 H, H<sub>a</sub>-C(1')N), 4.84 (d, 1 H, J =

5.59 Hz, HO-C(2')), 4.89, 5.21 (2 d, 2 H,  $J = 3.50$  Hz, HO-C(3', 4')), 5.05-5.08 (m, 1 H,  $H_b$ -C(1')N), 5.27 (s, 2 H,  $H_2$ -C<sub>Bn</sub>), 7.22 (dd, 1 H,  $^3J = 8.90$  Hz,  $^4J = 2.10$  Hz, H-C(7)), 7.36-7.44 (m, 3 H, CH<sub>arom.</sub>), 7.53 (d, 2 H,  $J = 7.10$  Hz, CH<sub>arom.</sub>), 7.67 (s, 1 H, H-C(9)), 8.10 (d, 1 H,  $^3J = 8.90$  Hz, H-C(6)), 8.93 (s, 1 H, H-C(5)), 11.01 (s, 1 H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 60 °C): 47.46 (CH<sub>2</sub>-N), 63.18 (C(5')-H<sub>2</sub>), 69.53 (C(2')-H<sub>2</sub>), 70.19 (C<sub>Bn</sub>-H<sub>2</sub>), 72.69, 73.47 (C(3', 4')-H), 101.13 (C(9)), 111.80 (C(5<sub>a</sub>)), 114.63 (C(4<sub>a</sub>)), 115.96 (C(7)), 127.37 (C<sub>Bn</sub>), 127.99 (C<sub>Bn,ortho</sub>, 2x), 128.30 (C<sub>Bn,meta</sub>, 2x), 133.13 (Ph), 135.76 (C(6)), 141.04 (C(9<sub>a</sub>)), 143.45 (C(5)), 156.10 (C(10<sub>a</sub>)), 158.31 (C(8)), 162.04 (C(2)), 163.78 (C(4)). MS (FD): 454 (M<sup>+</sup>).

### 8-Hydroxy-10-*D*-ribityl-5-desazaflavin 1



Unter Stickstoffatmosphäre wurden in einen ausgeheizten Stickstoffkolben **33** (70.3 mg, 0.155 mmol), Eisessig (12 mL) und in Eisessig (10 mL) suspendierter Pd/C(10%)-Katalysator (35 mg) gegeben. Nach Evakuieren der Stickstoffatmosphäre am Membranpumpen-Vakuum und Ersetzen durch Wasserstoffatmosphäre (3x Spülen mit H<sub>2</sub>) wurde das Reaktionsgemisch für 25 h unter H<sub>2</sub> bei RT stark gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Kieselgur abgetrennt und der Rückstand mit Methanol (50 mL) nachgespült. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand mit Trifluoressigsäure (0.1 mL) versetzt. Nach Zugabe von eisgekühltem Diethylether (4 mL) fiel ein hellgelber Niederschlag aus, welcher durch dreimaliges Zentrifugieren (4000 rpm, 4 °C, 10 min) in Eppendorf-Cups, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren mit je weiteren 4 mL kaltem Diethylether im Ultraschallbad gereinigt wurde. Es wurde **1** (47.2 mg,

## 5. Experimenteller Teil

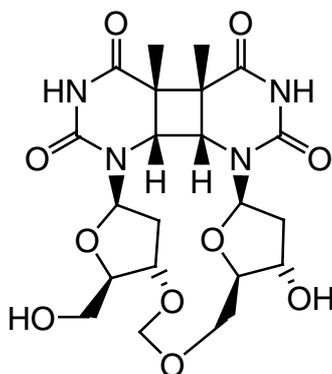
---

0.130 mmol, 84%) als hellgelbes Pulver erhalten. Im Fall einer Verunreinigung durch Eduktspuren wurde eine Reinigung mittels RP-MPLC durchgeführt (Puffer A: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser, Puffer B: 0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; Fluss: 10 mL/min; Gradient: Methode C).

$R_f$  (Kieselgel, MeCN/H<sub>2</sub>O 4:1): 0.36. IR (KBr): 3373 *m*, 3031 *w*, 1644 *m*, 1596 *s*, 1525 *s*, 1491 *m*, 1407 *m*, 1252 *s*. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TFA-*d*): 3.38-3.62 (m, 4 H, H<sub>2</sub>-C(5'), H-C(3'), H-C(4')), 4.18-4.24 (m, 1 H, H-C(2')), 4.61-4.63 (m, 1 H, HO-C(5')), 4.66-4.68 (m, 2 H, H<sub>2</sub>-C(1')N), 4.72-4.79 (m, 3 H, HO-C(2', 3', 4')), 6.41 (s, 1 H, OH-C<sub>arom.</sub>), 7.03 (dd, 1 H, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, <sup>4</sup>J = 2.2 Hz, H-C(7)), 7.38 (s, 1 H, H-C(9)), 8.01 (d, 1 H, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, H-C(6)), 8.87 (s, 1 H, H-C(5)), 11.01 (s, 1 H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 60 °C): 46.3 (CH<sub>2</sub>-N), 62.1 (C(5')-H<sub>2</sub>), 68.4 (C(2')-H<sub>2</sub>), 72.1, 72.9 (C(3', 4')-H), 100.2 (C(9)), 110.2 (C(5<sub>a</sub>)), 113.8 (C(4<sub>a</sub>)), 114.9 (C(7)), 135.6 (C(6)), 140.9 (C(9<sub>a</sub>)), 143.4 (C(5)), 156.0 (C(10<sub>a</sub>)), 158.1 (C(8)), 161.9 (C(2)), 163.6 (C(4)). MS (ESI+): 364.11 (M + 1). HR-MS (ESI+) ber. für C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>H: 364.1145, gef. 364.1150.

## 5.5 Synthese des Formacetal-CPD

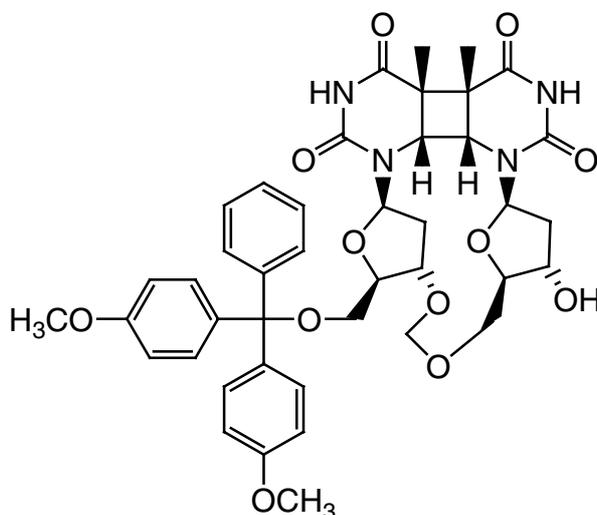
5A-(*R*),5B-(*S*),6A-(*R*),6B-(*S*)- Formacetalverknüpftes Cyclobutan-thymidin-dimer (*cis,syn*) **38**



**37** (600 mg, 1.03 mmol) wurde in gesättigter  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ -Lösung (130 mL) suspendiert und bei RT unter Argon 16 h gerührt. Während der Reaktion löste sich das Edukt/Produkt langsam auf. Das Produkt **38** erhielt man in quantitativer Ausbeute nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und Trocknen am HV.

Smp: 231 °C (Zers.).  $R_f$  (EE/MeOH 13.5:1): 0.03. IR (KBr): 3547 *m*, 3463 *m*, 3414 *m*, 3257 *m*, 3195 *m*, 3083 *w*, 2971 *w*, 2910 *w*, 2865 *w*, 1712 *s*, 1683 *s*, 1448 *m*, 1389 *m*, 1294 *m*, 1220 *m*, 1170 *m*, 1102 *m*, 1087 *m*, 1024 *m*, 990 *m*, 951 *m*, 884 *w*, 816 *w*, 785 *w*, 763 *w*, 651 *w*, 615 *w*, 540 *w*, 462 *w*.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1.30 (s,  $\text{H}_3\text{C-C}(5)$ ), 1.37 (s,  $\text{H}_3\text{C-C}(5)$ ), 1.77-1.81 (m,  $\text{HH-C}(B2')$ ), 2.08-2.14 (m,  $\text{HH-C}(B2')$ ), 2.19-2.24 (m,  $\text{HH-C}(A2')$ ), 2.68-2.73 (m,  $\text{HH-C}(A2')$ ), 3.41-3.44 (m, 1H), 3.50-3.56 (m, 2H), 3.60-3.66 (m, 2H), 3.84-3.86 (m, 1H), 4.13 (d,  $J_{\text{vic}}=7.2$  Hz, H-C(6)), 4.15-4.21 (m, 2H), 4.23 (d,  $J_{\text{vic}}=6.5$  Hz, H-C(6)), 4.70 (d,  $J_{\text{gem}}=7.2$  Hz, O-CHH-O), 4.72 (d,  $J_{\text{gem}}=7.2$  Hz, O-CHH-O), 4.86-4.88 (m, 1H), 5.18 (d,  $J=4.8$  Hz, OH), 5.84-5.87 (m, H-C( $B1'$ )), 5.89-5.91 (m, H-C( $A1'$ )), 10.38 (s, NH), 10.48 (s, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 16.95 ( $\text{CH}_3\text{-C}(5)$ ), 17.62 ( $\text{CH}_3\text{-C}(5)$ ), 34.67 (C( $2'$ )), 37.24 (C( $2'$ )), 46.12 (C(5)), 49.74 (C(5)), 54.90 (C(6)), 57.29 (C(6)), 60.25 (C( $5'$ )), 65.92 (C( $5'$ )), 68.17, 75.64, 82.54, 83.30, 84.14, 84.97, 94.11 (O- $\text{CH}_2$ -O), 153.07 (C(4)), 153.14 (C(4)), 170.03 (C(2)), 171.12 (C(2)). MS (ESI<sup>+</sup>): 519 ( $\text{MNa}^+$ ). MS (FAB<sup>+</sup>): 496.1 ( $\text{M}^+$ ), 497.1 ( $\text{MH}^+$ ), 519.1 ( $\text{MNa}^+$ ), 993.2 ( $\text{M}_2\text{H}^+$ ), 1015.1 ( $\text{M}_2\text{Na}^+$ ).

5A-(*R*),5B-(*S*),6A-(*R*),6B-(*S*)-5'-*O*-Dimethoxytrityl-geschütztes-formacetalverknüpftes cyclobutan-thymidin-dimer (*cis,syn*) **39**

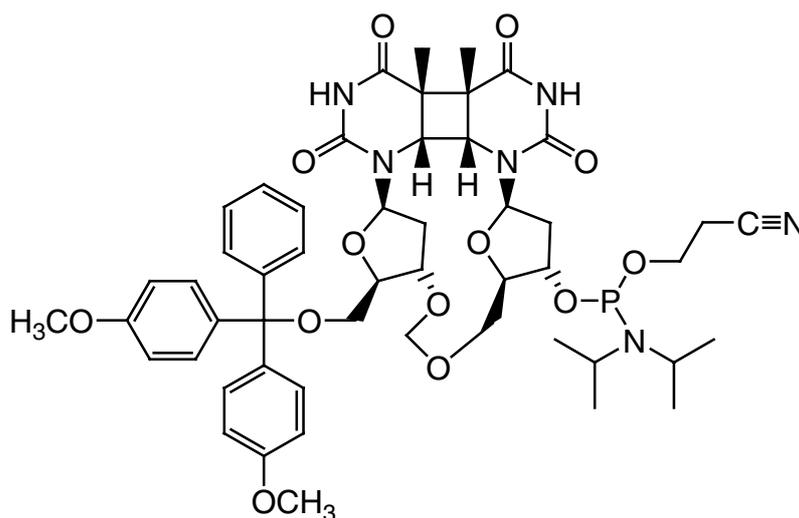


**38** (520 mg, 1.05 mmol) wurde aus Pyridin (5 mL) eingengt, in Pyridin (5 mL) gelöst und mit Hünig-Base (0.5 mL) und DMTCl (463 mg, 1.37 mmol, 1.3 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter Argon 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum und das restliche Pyridin azeotrop mit Toluol (3x 20 mL) entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel 60, 0-9% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt **39** als farbloses Pulver (647 mg, 0.81 mmol, 77%) erhalten.

Smp: 151 °C (Zers.).  $R_f$  (EE/MeOH 13.5:1): 0.28. IR (KBr): 3467 *w*, 3214 *m*, 3063 *w*, 2928 *w*, 1718 *s*, 1607 *m*, 1509 *m*, 1448 *m*, 1388 *m*, 1368 *m*, 1252 *s*, 1202 *m*, 1176 *m*, 1097 *m*, 1057 *m*, 1032 *s*, 959 *m*, 903 *w*, 829 *w*, 790 *w*, 754 *w*, 701 *w*, 583 *w*, 527 *w*, 457 *w*. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.94 (s, H<sub>3</sub>C-C(5)), 1.25 (s, H<sub>3</sub>C-C(5)), 1.80-1.84 (m, HH-C(B2')), 2.06-2.12 (m, HH-C(B2')), 2.33-2.39 (m, HH-C(A2')), 2.65-2.70 (m, HH-C(A2')), 3.01 (dd,  $J_{gem}=10.4$  Hz,  $J_{vic}=4.6$  Hz, HH-C(A5')), 3.20 (dd,  $J_{gem}=10.4$  Hz,  $J_{vic}=2.8$  Hz, HH-C(A5')), 3.57-3.59 (m, H-C(B4')), 3.66-3.69 (m, HH-C(B5')), 3.71-3.73 (m, H-C(4')), 3.74 (s, 2x OCH<sub>3</sub>), 3.80-3.88 (m, HH-C(B5')), 4.06 (d,  $J_{gem}=6.6$  Hz, H-C(6)), 4.12 (d,  $J_{gem}=6.6$  Hz, H-C(6)), 4.22-4.25 (m, H-C(B3')), 4.26-4.30 (m, H-C(A3')), 4.54 (d,  $J_{gem}=7.1$  Hz, O-CHH-O), 4.63 (d,  $J_{gem}=7.1$  Hz, O-CHH-O), 5.27 (d,  $J_{HO-B3}=4.8$  Hz, OH), 5.91 (dd,  $J_{B1'-B2'}=8.2$  Hz,  $J_{B1'-B2'}=6.3$  Hz, H-C(B1')), 5.98-6.01 (m, H-C(A1')), 6.87-6.89 (m, 4

$H_{\text{arom.}}$ ), 7.21-7.38 (m, 9  $H_{\text{arom.}}$ ), 10.54 (s, NH), 10.56 (s, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 16.92 ( $\text{CH}_3\text{-C(5)}$ ), 17.51 ( $\text{CH}_3\text{-C(5)}$ ), 34.75 ( $\text{C(2')}$ ), 36.92 ( $\text{C(2')}$ ), 54.95 (2  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 55.07 ( $\text{C(6)}$ ), 57.22 ( $\text{C(6)}$ ), 63.30 ( $\text{C5}'$ ), 65.09 ( $\text{C(5}'$ ), 57.87, 80.83, 82.89, 84.06, 84.72, 85.39, 93.75 ( $\text{O-CH}_2\text{-O}$ ), 113.03 (4  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 126.80 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 127.69 (2  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 127.76 (2  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 129.67 (2  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 129.72 (2  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 135.08 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 135.26 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 144.49 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 152.87 ( $\text{C(4)}$ ), 153.04 ( $\text{C(4)}$ ), 158.08 (2  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 169.78 ( $\text{C(2)}$ ), 170.64 ( $\text{C(2)}$ ). MS (FAB+): 798.4 ( $\text{M}^+$ ), 799.5 ( $\text{MH}^+$ ), 821.4 ( $\text{MNa}^+$ ).

5A-(*R*),5B-(*S*),6A-(*R*),6B-(*S*)-5'-*O*-Dimethoxytrityl-geschütztes-formacetalverknüpftes cyclobutan-thymidin-dimer-3'B-*O*-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit (*cis,syn*) **40**



**39** (601 mg, 0.75 mmol) wurde aus absolutem THF (3x 15 mL) eingeeengt und unter Argon in absolutem THF (12 mL) gelöst. Zur klaren, leicht gelblichen Lösung wurde daraufhin Hünig-Base (0.53 mL, 4.0 eq) und 2-Cyanoethoxy-(*N,N*-diisopropyl-amino)chlorophosphin (0.34 mL, 2.0 eq) gegeben. Nach 3 h Rühren bei RT wurde der entstandene farblose Niederschlag abfiltriert und eingeeengt. Mit Argon gesättigter Essigsäureethylester (50 mL) wurde der Rückstand aufgenommen und mit eisgekühlter 10%iger  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3x 10 mL) extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt in Toluol (5 mL) aufgenommen und in eisgekühltes Pentan (200 mL) getropft. Nach

## 5. Experimenteller Teil

---

säulenchromatographischer Reinigung des Niederschlags (Kieselgel 60, EE/MeOH 40:1) und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) gelöst und in eisgekühltes Pentan getropft. Das Produkt **40** wurde als farbloses Pulver erhalten (489 mg, 0.49 mmol, 65%).

$R_f$  (EE/MeOH 13.5:1): 0.58. IR (KBr): 3407 *w*, 3227 *m*, 3081 *w*, 2966 *m*, 2929 *m*, 2872 *m*, 2835 *w*, 1719 *s*, 1608 *m*, 1582 *w*, 1509 *s*, 1447 *s*, 1414 *m*, 1387 *m*, 1365 *m*, 1252 *s*, 1200 *s*, 1178 *s*, 1035 *s*, 978 *m*, 903 *m*, 886 *m*, 830 *m*, 790 *m*, 756 *m*, 727 *m*, 703 *m*, 636 *w*, 584 *m*, 524 *w*, 465 *w*.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 0.98 ('d',  $\text{H}_3\text{C-C(5)}$ ), 1.14-1.15 ('m', 2x  $\text{H}_3\text{C-CHN}$ ), 1.26 ('d',  $\text{H}_3\text{C-C(5)}$ ), 1.90-2.02 (m,  $\text{HH-C(B2')}$ ), 2.19-2.25 (m,  $\text{HH-C(B2')}$ ), 2.37-2.44 (m,  $\text{HH-C(A2')}$ ), 2.62-2.67 (m,  $\text{HH-C(A2')}$ ), 2.74-2.81 (m, 2 H), 2.98-3.06 (m,  $\text{HH-C(5')}$ ), 3.15-3.17 (m,  $\text{HH-C(5')}$ ), 3.74 (s, 2x  $\text{OCH}_3$ ), 3.55-3.81 (m, 6 H), 3.83-3.89 (m, 1 H), 4.07-4.11 (m, 2 H), 4.21-4.25 (m, 1 H), 4.46-4.48 (m, 1 H), 4.57-4.61 (m, 1 H), 4.63-4.66 (m, 1 H), 5.91 (dd,  $J=8.9$  Hz,  $J=5.8$  Hz,  $\text{H-C(1')}$ ), 5.96 (t,  $J=6.2$  Hz,  $\text{H-C(1')}$ ), 6.86-6.88 (m, 4  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.22-7.38 (m, 9  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 10.54 (s, NH), 10.57 (s, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 16.98 ( $\text{CH}_3\text{-C(5)}$ ), 17.64 ( $\text{CH}_3\text{-C(5)}$ ), 19.67, 19.72, 19.77, 21.62, 24.09, 24.13, 24.15, 24.19, 24.21, 24.27, 34.88 ( $\text{C(2')}$ ), 35.56 ( $\text{C(2')}$ ), 39.70, 39.87, 42.49, 42.59, 46.61, 46.71, 48.86, 49.03, 54.94 (2  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 55.28, 55.36, 57.09, 57.18, 58.08, 58.16, 58.22, 58.30, 63.62 ( $\text{C5'}$ ), 64.45 ( $\text{C(5')}$ ), 70.13, 70.27, 70.48, 70.62, 76.66, 80.87, 81.82, 82.05, 84.12, 84.15, 84.99, 85.03, 85.42, 93.77 ( $\text{O-CH}_2\text{-O}$ ), 113.05 (4  $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 126.73, 127.70, 129.62, 129.68, 135.19, 135.34, 144.57, 152.78 ( $\text{C(4)}$ ), 153.15 ( $\text{C(4)}$ ), 158.05, 169.96, 170.01, 170.38, 170.44. MS (FAB+): 798.4 ( $\text{M}^+$ ), 799.5 ( $\text{MH}^+$ ), 821.4 ( $\text{MNa}^+$ ).

## 5.6 Synthese der DNA-Stränge

Für die Kupplung von kommerziell erhältlichen Nukleotiden wurden die vom Gerätehersteller vorgeschlagenen Standardprotokolle verwendet. Die für Deblocking, Capping und Oxidation verwendeten Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

Deblocking: 2% ige Dichloressigsäure in Dichlormethan

Capping A: 0.53 M Phenoxyessigsäureanhydrid und 11.1% 2,6-Lutidin in MeCN

Capping B: 16% *N*-Methylimidazol in MeCN

Oxidation: Iod 0.01 M in 2,6-Lutidin/MeCN/H<sub>2</sub>O 0.6:6.5:3

### 5.6.1 Oligonukleotid-Synthese via Phosphoramidit-Chemie

Für die DNA-Synthesen wurden Säulen bestückt mit CPG-Material für einen Ansatz im 1  $\mu$ mol-Maßstab verwendet. Die Aktivatorlösung bestand aus kommerziell erhältlicher 0.45 molarer Tetrazol-Lösung in THF, die mit 0.15 M 5-(4-Nitrophenyl)-Tetrazol versetzt wurde. Die Kupplungszeiten zwischen den Phosphoramiditen der Standardbasen betragen jeweils 1 min 40 sec. Die Kupplungszeit des Thymidindimer-Phosphoramidits wurde auf 10 min heraufgesetzt. Die Kupplungszeit der nach dem Thymidindimer folgenden natürlichen Base betrug 5 min. Nach Abschluss der Synthese wurde an der festen Phase die am 5'-Ende des Oligonukleotids stehende Dimethoxytritylgruppe abgespalten (Trityl-OFF).

### 5.6.2 Oligonukleotid-Synthese via *H*-Phosphonat-Chemie

Als Aktivierungsreagenz für das Riboflavin-*H*-Phosphonat und das Desazaflavin-*H*-Phosphonat wurde Adamantylsäurechlorid (0.15 mol in Pyridin/Acetonitril 1:1) eingesetzt. Das *H*-Phosphonat wurde im Verhältnis 1:1.5-2.0 zum Aktivierungsreagenz eingesetzt. Die Kupplungszeit des *H*-Phosphonats betrug 10 min und die der darauffolgenden natürlichen Base 5 min.

### 5.6.3 Entschützung der synthetisierten Oligonukleotide

Die Pac-geschützten Oligonukleotide wurden mit 25% wässriger Ammoniumhydroxid-Lösung/Ethanol 3:1 (1 mL) bei 50 °C während 12 h entschützt und gleichzeitig vom Träger abgespalten.

### 5.6.4 Reinigung der Oligonukleotide

Die Ammoniaklösung wurde abpipettiert und Reste durch Zentrifugieren unter Vakuum bei RT in der *Speed-Vac* entfernt. Nach Zugabe von Wasser (1 mL) wurde das Rohprodukt mittels analytischer RP-HPLC bei Wellenlängen von 260 nm und 460 nm (Flavin) oder 400 nm (Desazaflavin) untersucht.

Anschließend wurde eine Reinigung mittels präparativer RP-HPLC durchgeführt. Hierbei wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert.

Für die analytische (a) und präparative (b) HPLC wurden folgende Säulen und Laufmittel eingesetzt:

(a)

CC 250/4 Lichrospher 100-5RP-18 von *Macherey&Nagel*,

CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 von *Macherey&Nagel*,

CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18 von *Macherey&Nagel*

Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat in H<sub>2</sub>O, pH 7.0.

Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat in H<sub>2</sub>O, 80% MeCN, pH 7.0.

Fluss: 1 mL/min

(b)

VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18 von *Macherey&Nagel*

Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat in H<sub>2</sub>O, pH 7.0.

Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat in H<sub>2</sub>O, 80% MeCN, pH 7.0.

Fluss: 5 mL/min

Nach der Reinigung mittels RP-HPLC wurden die zuvor in der *Speed-Vac* von Puffer befreiten Oligonukleotide zum Entsalzen noch zweimal mit Wasser (500  $\mu$ L) gewaschen. Die gereinigten Proben wurden nochmals mit analytischer RP-HPLC analysiert und daraufhin eine Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie bei 260 nm und 85 °C durchgeführt. Anschließend wurden die theoretisch berechneten Massen der einzelnen DNA-Stränge mit Hilfe der MALDI-Spektroskopie belegt. In Tabelle 7 sind die Reinigungsmethode und die theoretisch berechneten und gefundenen Massen der jeweiligen Stränge dargestellt.

Nr.	Sequenz	Reinigung Methode	Masse ber.	Masse gef.
<b>S13</b>	5'-CGC GAA TTT TGC GCDFI-3'	B	4735.9	4736.6
<b>S14</b>	5'-DFICG CGA ATT TTG CGC-3'	B	4735.9	4736.4
<b>S15</b>	5'-ATC GGC T=TC GCG CA-3'	B	4187.8	4188.1
<b>S18</b>	5'-ACA GCG GT=T GCA GGT A-3'	B	4893.9	4895.7

Tabelle 7. Synthetisierte Thymidindimer (T=T)- und Desazaflavin (DFI)-DNA-Stränge mit berechneten und gefundenen Massen (MALDI-TOF).

### 5.7 Co-Kristallisation der DNA-Photolyase aus *A. nidulans* mit CPD enthaltender DNA

Die bei  $-80\text{ °C}$  zu lagernde *A. nidulans*-DNA-Photolyaseprobe musste zunächst umgepuffert werden, da der Lagerungspuffer Glycerin enthielt, welches sich bei der Kristallisation störend auswirken könnte. Hierzu wurde eine PD10-Säule der Firma *Amersham Biosciences* benutzt, die zuvor mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH = 7.4) equilibriert wurde. 500  $\mu\text{L}$  der DNA-Photolyaselösung ( $c = 6.8\text{ mg/mL}$ ) wurden mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 2.5 mL gebracht, auf die Säule aufgetragen und der Durchfluss verworfen. Das Protein wurde mit 3.5 mL Puffer eluiert.

#### 5.7.1 Proteinkonzentrierung

Das Eluat musste anschließend konzentriert werden. Hierfür wurde ein Konzentrator der Firma *Viva Science* (*viva spin* 6-Säule) mit einem max. Volumen von 6 mL und einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Durch die Wahl dieser Porengröße konnte das gewünschte Protein zurückgehalten werden, niedermolekulare Substanzen, kleinere Proteine und Wasser aber ungehindert die Membran passieren. Die Proteinlösung wurde auf die Membran pipettiert und in einer *Eppendorf*-Kühlzentrifuge 5810R bei 2000 rpm und  $4\text{ °C}$  aufkonzentriert.

#### 5.7.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Im Verlauf der Konzentrierung wurde die Proteinkonzentration photometrisch bei 595 nm durch die Methode nach *Bradford* (siehe Methodenteil 5.1) verfolgt. Die Photolyaselösung sollte je nach Kristallisationsansatz eine Konzentration von 10-15 mg/mL erreichen.

### 5.7.3 Filtration

Die Probe wurde vor dem Einsatz in die Kristallisation mittels einer *Ultrafree MC*-Säule der Firma *Millipore* (Porengröße 0.22 µm) partikelfrei filtriert.

### 5.7.4 Bindungsansatz

Für die Co-Kristallisation der DNA-Photolyase mit einem doppelsträngigem DNA-Substrat, das ein CPD enthält, wurden das Protein und die DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1.1 gemischt. Tabelle 8 enthält Beispiele von Bindungsansätzen für jeweils ein 14mer-Doppelstrang (**S15/S17**) (0.087 mM) und ein 16mer-Doppelstrang (**S18/S20**) (0.075 mM).

	Photolyase	Oligonukleotid	Endkonzentration
14mer <b>S15/S17</b>	78 µL (25.5 nmol)	329 µL (28.6 nmol)	18 mg/mL
16mer <b>S18/S20</b>	118 µL (25.5 nmol)	381 µL (28.6 nmol)	14.6 mg/mL

Tabelle 8. Bindungsansätze von Photolyase und Oligonukleotid mit Protein-Endkonzentration.

Der Bindungsansatz wurde unter Rotlicht bei 6 °C durchgeführt und über Nacht inkubiert. Mittels eines *Vivaspin 500*-Konzentrators (Firma *Viva Science*) wurde die Probe auf die endgültige Proteinkonzentration (Tabelle 8) gebracht.

### 5.7.5 Kristallisation

Das Photolyase/DNA-Gemisch wurde nach der *Hanging-drop*-Methode (siehe Methodenteil 5.1) im Rotlicht kristallisiert. Die Kristallisationsansätze enthielten gleiche Volumina Bindungsansatz (1.0  $\mu\text{L}$ ) und Fällungsreagenz (1.0  $\mu\text{L}$ ) im Tropfen. Der Tropfen wurde durch Auf- und Abpipettieren homogen vermischt und darauf geachtet, dass luftblasenfrei gearbeitet wurde. Das Reservoirvolumen betrug stets 750  $\mu\text{L}$ .

### 5.7.6 Co-Kristallisation der DNA-Photolyase mit einem 16mer-Oligonukleotid

Zum Austesten von geeigneten Kristallisationsbedingungen wurde der *Crystallization Basic Kit for Proteins* der Firma *Sigma* benutzt. Tabelle 9 zeigt ein Kristallisationsprotokoll des Bindungsansatzes nach drei Wochen. Bedingungen, die zu Kristallen führen, können für eine weitere Optimierung geeignet sein.

Crystal Screen I Lösung Nr.	Photolyase 14.6 mg/mL	Crystal Screen I Lösung Nr.	Photolyase 14.6 mg/mL	Crystal Screen I Lösung Nr.	Photolyase 14.6 mg/mL
1	mf+g	33	mf	V15	–
2	–	34	mf	V16	g
3	–	35	wmf	V17	wf
4	–	36	–	V18	g
5	g	37	–	V19	f+g
6	–	38	mf	V20	–
7	–	39	–	V21	wg
8	–	40	mf	V22	–
9	f	41	–	V23	mf+Haut
10	–	42	g	V24	f
11	wmf	43	–	V25	mf
12	–	44	g	V26	mf
13	f	45	mf	V27	mf
14	mf	46	g	V28	–
15	vf	47	–	V29	wf
16	vmf	48	g	V30	mf
17	–	49	mf	V31	mf
18	op	50	mf	V32	–
19	–	V1	mf	V33	wp
20	op	V2	mf	V34	–
21	mf	V3	–	V35	–
22	mf+Haut	V4	–	V36	–
23	–	V5	–	V37	–
24	mf	V6	–	V38	–
25	–	V7	–	V39	–
26	–	V8	–	V40	–
27	–	V9	–	V41	wf
28	–	V10	mf	V42	–
29	–	V11	mf+f		
30	g	V12	mf		
31	–	V13	mf+o		
32	g	V14	vmf		

Reservoir: 750  $\mu$ L Fällungsreagenz, Tropfen: 1  $\mu$ L Proteinlösung + 1  $\mu$ L Fällungsreagenz

Legende:	–	klar	vmf	viel mittelfeines Präzipitat
	f	feines Präzipitat	wmf	wenig mittelfeines Präzipitat
	g	grobes Präzipitat	wf	wenig feines Präzipitat
	mf	mittelfeines Präzipitat	op	öliges Präzipitat

Tabelle 9. Kristallisationsprotokoll eines Crystal Screen I von DNA-Photolyase mit S18/S20 nach 3 Wochen, V = Verdünnung 1:1.



## 6 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatogramm
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutamat
ESI	Elektrosprayionisierung
eq	Äquivalent(e)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fd	Felddesorption
gef.	gefunden
h	Stunde(n)
HPLC	<i>(high pressure liquid chromatography)</i> Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HV	Hochvakuum
hv	Photoreaktion
I	Intensität
<i>i</i> Pr	Isopropyl
IR	Infrarot
K	Lysin
konz.	Konzentriert
L	Leucin
$\lambda$	Wellenlänge
M	Methionin
m	Multipllett; ( <i>medium</i> ) mittel, IR

## 6. Abkürzungsverzeichnis

---

MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorptionsionisation
min	Minuten
MPLC	<i>medium pressure liquid chromatographie</i>
MS	Massenspektrum
N	Asparagin
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	<i>(nuclear magnetic resonance)</i> Kernresonanz
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
Pac	Phenoxyacetyl
Ph	Phenyl
Q	Glutamin
R	Arginin
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RP	<i>(Reversed Phase)</i> Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s	Singulett; <i>(strong)</i> stark, IR
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
UV	Ultraviolett
W	Tryptophan
w	<i>(weak)</i> schwach, IR
Y	Tyrosin
Zers.	Zersetzung

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] J.-S. Taylor, *J. Chem. Educ.* **1990**, *67*, 835-841. DNA, Sunlight and Skin Cancer.
- [2] J. F. Turrens, *Biosci. Rep.* **1997**, *17*, 3-8. Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain.
- [3] H. Wiseman, B. Halliwell, *Biochem. J.* **1996**, *313*, 17-29. Damage to DNA by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Role in Inflammatory Disease and Progression to Cancer.
- [4] J.-S. Taylor, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 183-190. DNA, Sunlight and Skin Cancer.
- [5] L. C. Junqueira, J. Carneiro, *Histologie, Vol. 3*, Springer, **1991**.
- [6] B. A. Gilchrest, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1989**, *21*, 610-613. Skin Aging and Photoaging: An Overview.
- [7] M. Ichihashi, M. Ueda, A. Budiyanto, T. Bito, M. Oka, K. Tsuru, T. Horikawa, *Toxicology* **2003**, *189*, 21-39. UV-Induced Skin Damage.
- [8] V. A. Bohr, *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32*, 804-812. Repair of Oxidative DNA Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA, and Some Changes with Aging in Mammalian Cells.
- [9] T. Finkel, N. J. Holbrook, *Nature* **2000**, *408*, 239-247. Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Aging.
- [10] J.-S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76-82. Unraveling the Molecular Pathway from Sunlight to Skin Cancer.
- [11] M. Eller, M. Yaar, B. A. Gilchrest, *Nature* **1994**, *372*, 413-414. DNA Damage and Melanogenesis.
- [12] K. H. Kraemer, M.-M. Lee, A. M. 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.
- [13] R. B. Setlow, *Nature* **1978**, *271*, 713-717. Repair Deficient Human Disorders and Cancer.
- [14] 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.
- [15] A. A. Lamola, *Pure Appl. Chem.* **1973**, *34*, 281-303. Photochemistry and Structure in Nucleic Acids.
- [16] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237. Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors.
- [17] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974. Chemistry and Biology of DNA Repair.
- [18] A. Sancar, F. W. Smith, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6028-6032. Purification of *Escherichia coli* DNA Photolyase.
- [19] G. B. Sancar, F. W. Smith, M. C. Lorence, C. S. Rupert, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6033-6038. Sequences of the *Escherichia coli* Photolyase Gene and Protein.
- [20] M. S. Schuman Jorns, G. B. Sancar, A. Sancar, *Biochemistry* **1984**, *23*, 2673-2679. Identification of a Neutral Flavin Radical and Characterization of a Second Chromophore in *Escherichia coli* DNA Photolyase.
- [21] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2-9. Structure and Function of DNA Photolyase.

- [22] S.-T. Kim, K. Malhotra, H. Ryo, A. Sancar, T. Todo, *Mutation Res.* **1996**, *363*, 97-104. Purification and Characterization of *Drosophila melanogaster* Photolyase.
- [23] E. N. Worthington, H. Kavakli, G. Berrocal-Tito, B. E. Bondo, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39143-39154. Purification and Characterization of Three Members of the Photolyase/Cryptochrome Family Blue-Light Photoreceptors from *Vibrio Cholerae*.
- [24] H.-W. Park, S.-T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866-1872. Crystal Structure of DNA Photolyase from *Escherichia coli*.
- [25] T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. M. Eker, K. Miki, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 887-891. Crystal Structure of DNA Photolyase from *Anacystis nidulans*.
- [26] S. Özgür, A. Sancar, *Biochemistry* **2003**, *42*, 2926-2932. Purification and Properties of Human Blue-Light Photoreceptor Cryptochrome 2.
- [27] G. Payne, M. Wills, C. Walsh, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5706-5711. Reconstitution of *Escherichia coli* Photolyase with Flavins and Flavin Analogous.
- [28] C. Aubert, K. Brettel, P. Mathis, A. P. M. Eker, A. Boussac, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8659-8660. EPR Detection of the Transient Tyrosyl Radical in DNA Photolyase from *Anacystis nidulans*.
- [29] C. Aubert, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5423-5427. Intraprotein Electron Transfer between Tyrosine and Tryptophan in DNA Photolyase from *Anacystis nidulans*.
- [30] C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Nature* **2000**, *405*, 586-590. Intraprotein Radical Transfer During Photoreactivation of DNA Photolyase.
- [31] H. Wang, C. Saxena, D. Quan, A. Sancar, D. Zhong, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 1329-1333. Femtosecond Dynamics of Flavin Cofactor in DNA Photolyase: Radical Reduction, Local Solvation, and Charge Recombination.
- [32] H. Komori, R. Masui, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, T. Shibata, Y. Inoue, K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13560-13565. Crystal Structure of Thermostable DNA Photolyase: Pyrimidine-Dimer Recognition Mechanism.
- [33] D. L. Svoboda, C. A. Smith, J.-S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 10684-10700. Effect of Sequence, Adduct Type, and Opposing Lesions on the Binding and Repair of Ultraviolet Photodamage by DNA Photolyase and (a)Bc Excinuclease.
- [34] G. B. Sancar, F. W. Smith, A. Sancar, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1849-1855. Binding of *Escherichia coli* DNA Photolyase to UV-Irradiated DNA.
- [35] I. Husain, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1109-1120. Binding of *E. coli* DNA Photolyase to a Defined Substrate Containing a Single T<>T Dimer.
- [36] M. Baer, G. B. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 4777-4788. Photolyases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* Recognize Common Binding Determinants in DNA Containing Pyrimidine Dimers.
- [37] B. J. Vande Berg, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20276-20284. Evidence for Dinucleotide Flipping by DNA Photolyase.
- [38] Y. F. Li, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5698-5706. Active Site of *Escherichia coli* DNA Photolyase: Mutations at Trp277 Alter the Selectivity of the Enzyme without Affecting the Quantum Yield of Photorepair.

- [39] S.-T. Kim, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8623-8630. Effect of Base, Pentose and Phosphodiester Backbone Structures on Binding and Repair of Pyrimidine Dimers by *Escherichia coli* DNA Photolyase.
- [40] I. Husain, G. B. Sancar, S. R. Holbrook, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 13188-13197. Mechanism of Damage Recognition by *Escherichia coli* DNA Photolyase.
- [41] A. Kiener, I. Husain, A. Sancar, C. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13880-13887. Purification and Properties of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DNA Photolyase.
- [42] D. G. Vassylyev, T. Kashiwagi, Y. Mikami, M. Ariyoshi, S. Iwai, E. Ohtsuka, K. Morikawa, *Cell* **1995**, *83*, 773-782. Atomic Model of a Pyrimidine Dimer Excision Repair Enzyme Complexed with a DNA Substrate: Structural Basis for Damaged DNA Recognition.
- [43] S.-T. Kim, A. Sancar, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 895-904. Photochemistry, Photophysics, and Mechanism of Pyrimidine Dimer Repair by DNA Photolyases.
- [44] P. F. Heelis, R. F. Hartman, S. D. Rose, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1996**, *95*, 89-98. Energy and Electron Transfer Processes in Flavoprotein-Mediated DNA Repair.
- [45] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7-17. Transfer Mechanism of Electronic Excitation.
- [46] S.-T. Kim, A. Sancar, C. Essenmacher, G. T. Babcock, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4442-4443. Evidence from Photoinduced EPR for a Radical Intermediate During Photolysis of Cyclobutane Thymine Dimer by DNA Photolyase.
- [47] M. R. Witmer, E. Altmann, H. Young, T. P. Begley, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9264-9265. Mechanistic Studies on DNA Photolyase: 1. Secondary Deuterium Isotope Effects on the Cleavage of 2'-Deoxyuridine Dinucleotide Photodimers.
- [48] R. A. S. McMordie, T. P. Begley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1886-1887. Mechanistic Studies on DNA Photolyase. 5. Secondary Deuterium Isotope Effects on the Cleavage of the Uracil Photodimer Cation and Anion.
- [49] S. E. Rokita, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4589-4595. Flavin and 5-Deazaflavin Photosensitized Cleavage of Thymine Dimer: A Model of an in Vivo Light-Requiring DNA Repair.
- [50] M. Yasuda, Y. Nishinaka, T. Nakazono, T. Hamasaki, N. Nakamura, T. Shiragami, C. Pac, K. Shima, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 192-197. Photochemistry of Flavin in Micelles: Specific Effects of Anionic Surfactants on the Monomerization of Thymine Cyclobutane Dimers Photosensitized by Tetra-O-Acyl Riboflavin.
- [51] F. Müller, P. Hemmerich, A. Ehrenberg, G. Palmer, V. Massey, *Eur. J. Biochem.* **1970**, *14*, 185-196. The Chemical and Electronic Structure of the Neutral Flavin Radical as Revealed by Electron Spin Resonance Spectroscopy of Chemically and Isotopically Substituted Derivatives.
- [52] F. Müller, M. Brüstlein, P. Hemmerich, V. Massey, W. H. Walker, *Eur. J. Biochem.* **1972**, *25*, 573-580. Light-Absorption Studies of Neutral Flavin Radicals.
- [53] R. F. Anderson, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *723*, 78-82. The Bimolecular Decay Rates of the Flavosemiquinones of Riboflavin, FMN and FAD.

- [54] P. Hemmerich, V. Massey, H. Fenner, *FEBS Lett.* **1977**, *84*, 5-21. Flavin and 5-Deazaflavin: A Chemical Evaluation of Modified Flavoproteins with Respect to the Mechanisms of Redox Biocatalysis.
- [55] A. Ehrenberg, F. Müller, P. Hemmerich, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *2*, 286-293. Basicity, Visible Spectra, and Electron Spin Resonance of Flavosemiquinone Anions.
- [56] K. H. Dudley, A. Ehrenberg, P. Hemmerich, F. Müller, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 1354-1383. Spektren und Strukturen der am Flavin-Redoxsystem Beteiligten Partikeln.
- [57] P. S. Surdhar, D. A. Armstrong, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5514-5518. One-Electron Oxidation of Dihydroflavin.
- [58] Y. J. Zheng, R. L. Ornstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9402-9408. A Theoretical Study of the Structures of Flavin in Different Oxidation and Protonation States.
- [59] P. E. Werner, O. Rönquist, *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 997-1009. Studies on Flavin Derivates: The Crystal Structure of 5-Acetyl-9-bromo-1,3,7,8,10-pentamethyl-1,5-dihydroisoalloxazine.
- [60] X. Zeng, Z. Xi, L. S. Kappen, W. Tan, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12435-12444. Double-Strand Damage of DNA-RNA Bybrids by Neocarcinostatin Chromophore: Selective C-1' Chemistry on the RNA Strand.
- [61] J. H. Reibenspiess, F. Guo, C. J. Rizzo, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 903-906. X-Ray Crystal Structures of Conformationally Biased Flavin Models.
- [62] J. J. Hasford, C. J. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2251-2255. Linear Free Energy Substituent Effect on Flavin Redox Chemistry.
- [63] A. O. Cuello, C. M. McIntosh, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3517-3521. Model Systems for Flavoenzyme Activity. The Role of N(3)-H Hydrogen Bonding in Flavin Redox Processes.
- [64] A. J. W. G. Visser, S. Gishla, J. Lee, *Flavins and Flavoproteins* **1991**. Walter de Gruyter & Co, Berlin.
- [65] R. Santus, C. Hélène, J. Ovadia, *Photochem Photobiol.* **1972**, *16*, 65-67. Splitting of Thymine Dimer by Hydrated Electrons.
- [66] P. Hemmerich, W. Haas, *Reactivity of Flavins* **1975**. University of Preno Press, Nagoya.
- [67] D. E. O'Brien, L. T. Weinstock, C.-C. Cheng, *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, *7*, 99-105. Synthesis of 10-Deazariboflavin and Related 2,4-Dioxypyrimido (4,5-B) Quinolines.
- [68] L. D. Eirich, G. D. Vogels, R. S. Wolfe, *Biochemistry* **1978**, *17*, 4583-4593. Proposed Structure for Coenzyme F420 from Methanobacterium.
- [69] C. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 216-221. Naturally Occuring 5-Deazaflavin Coenzymes: Biological Redox Roles.
- [70] C. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 148-155. Flavin Coenzymes: At the Crossroads of Biological Redox Chemistry.
- [71] R. S. Wolfe, *Trends Biochem. Sci.* **1985**, *10*, 396-399. Unusual Coenzymes of Methanogenesis.
- [72] S. Yamazaki, L. Tsai, T. Stadtmann, F. Jacobson, C. Walsh, *J. Biol. Chem* **1980**, *255*, 9025.
- [73] M. Goldberg, I. Pecht, H. E. A. Kramer, R. Traber, P. Hemmerich, *Biochim. Biophys.* **1981**, *673*, 570-593. Structure and Properties of 5-Deazaflavin Radicals as Compared to Natural Flavosemiquinones.

- [74] V. Massey, P. Hemmerich, *Biochemistry* **1978**, *17*, 9-17. Photoreduction of Flavoproteins and Other Biological Compounds Catalyzed by Deazaflavins.
- [75] F. Jacobson, C. Walsh, *Biochemistry* **1984**, *23*, 979-988. Properties of 7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazaflavins Relevant to Redox Coenzyme Function in Methanogen Metabolism.
- [76] S. Gishla, S. Mayhew, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 6568-6570. Identification and Structure of a Novel Flavin Prosthetic Group Associated with Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase from *P. elsdenii*.
- [77] M. Sun, P.-S. Song, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4663-4669. Excited States and Reactivity of 5-Deazaflavin. Comparative Study with Flavin.
- [78] H. Yamaguchi, A. Koshiro, Y. Harima, K. Mori, F. Yoneda, *Spectrochimica Acta* **1981**, *37A*, 51-55. Magnetic Circular Dichroism and Fluorescence Spectra of 5-Deazaflavins.
- [79] T. Carell, R. Epple, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1245-1258. Repair of UV Light Induced DNA Lesions: A Comparative Study with Model Compounds.
- [80] B. J. V. Berg, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20276-20284. Evidence for Dinucleotide Flipping by DNA Photolyase.
- [81] K. S. Christine, A. W. MacFarlane, K. Yang, R. J. Stanley, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38339-38344. Cyclobutylpyrimidine Dimer Base Flipping by DNA Photolyase.
- [82] D. B. Sanders, O. Wiest, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5127-5134. A Model for the Enzyme-Substrate Complex of DNA Photolyase and Photodamaged DNA.
- [83] J. Antony, D. M. Medvedev, A. A. Stuchebrukhov, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1057-1065. Theoretical Study of Electron Transfer between the Photolyase Catalytic Cofactor FADH<sup>-</sup> and DNA Thymine Dimer.
- [84] T. Torizawa, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 32950.
- [85] T. Carell, R. Epple, V. Gramlich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 620-623. Synthesis of Flavin-Containing Model Compounds for DNA Photolyase Mediated DNA Repair.
- [86] R. Epple, E.-U. Wallenborn, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7440-7451. Investigation of Flavin-Containing DNA-Repair Model Compounds.
- [87] R. Epple, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 938-941. Flavin and Deazaflavin Containing Model Compounds Mimic the Energy Transfer Step in Type II DNA Photolyases.
- [88] R. Epple, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7318-7329. Efficient Light-Dependent DNA Repair Requires a Large Cofactor Separation.
- [89] A. Schwögler, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3918-3920. Self Repairing DNA Based on a Reductive Electron Transfer in the DNA Double Helix.
- [90] H. Ikeda, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10836-10837. 8-Methoxydeoxyguanosine as an Effective Precursor of 2-Aminoimidazolone, a Major Guanine Oxidation Product in One-Electron Oxidation of DNA.
- [91] K. Kino, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7373-7374. Product Analysis of GG-Specific Photooxidation of DNA Via Electron Transfer: 2-Aminoimidazolone as a Major Guanine Oxidation Product.
- [92] E. C. Breinlinger, C. J. Keenan, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8606-8609. Modulation of Flavin Recognition and Redox Properties through Donor Atom- $\Pi$  Interactions.

- [93] A. Niemz, V. M. Rotello, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 44-52. From Enzyme to Molecular Device. Exploring the Interdependence of Redox and Molecular Recognition.
- [94] A. Schwögler, T. Carell, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1415-1418. Towards Catalytically Active Oligonucleotides: Synthesis and Properties of a Flavin Nucleotide and Its Incorporation into DNA.
- [95] C. Frier, J.-L. Décout, M. Fontecave, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3520-3528. Methods for Preparing New Flavin Derivatives: Synthesis of Flavin-Thymine Nucleotides and Flavin-Oligonucleotide Adducts.
- [96] B. C. Froehler, *Methods in Molecular Biology* **1993**, *20*, 63-80. Oligodeoxynucleotide Synthesis.
- [97] B. Giese, S. Wessely, *Chem. Commun.* **2001**, 2108-2109. The Significance of Proton Migration During Hole Hopping through DNA.
- [98] 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.
- [99] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553. Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies.
- [100] C. Lu, W. Lin, W. Wang, Z. Han, S. Yao, N. Lin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 329-334. Riboflavin Photosensitized Oxidation of 2'-deoxyguanosine-5'-Monophosphate in Aqueous Solution: A Transient Intermediate Study.
- [101] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318-320. Direct Observation of Hole Transfer through DNA by Hopping between Adenine Bases and by Tunneling.
- [102] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 12759-12765. Charge Transfer and Transport in DNA.
- [103] O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4112-4115. Funktionalisierte DNA: Ein Neues Replizierbares Biopolymer.
- [104] P. Burgstaller, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1137-1138. Flavin-Dependent Photocleavage of RNA at G Center Dot U Base Pairs.
- [105] K. Sakthivel, C. F. Barbas III, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2998-3002. Erweiterung der Bindungs- und Katalyse-Eigenschaften Von DNA: Hochfunktionalisierte dUTP-Derivate Als Substrate Für Thermostabile DNA-Polymerasen.
- [106] C. Dueymes, J. L. Décout, P. Peltié, M. Fontecave, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 486-489. Fluorescent Deazaflavin-Oligonucleotide Probes for Selective Detection of DNA.
- [107] Y. Nakamura, T. Akiyama, Y. Yoneda, K. Tanaka, F. Yoneda, *Chem. Pharm. Bull* **1993**, *41*, 778-780. Redox Potential of Oligonucleotide Linked to 5-Deazaflavin Coenzyme Model. Detection of Hybrid Formation by Cyclic Voltammometry.
- [108] C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3281-3289. Excess Electron Transfer in Flavin-Capped DNA-Hairpins.
- [109] C. Behrens, T. Carell, *Chem. Comm.* **2003**, 1632-1633. Excess Electron Transfer in Flavin-Capped, Thymine Dimer-Containing DNA Hairpins.
- [110] V. M. Rotello, *Curr. Op. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 747-751. Model Systems for Redox Cofactor Activity.

- [111] K. Sakthivel, C. F. Barbas III, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2872-2875. Expanding the Potential of DNA for Binding and Catalysis: Highly Functionalized dUTP-Derivatives That Are Substrates for Thermostable DNA Polymerases.
- [112] B. N. Trawick, A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 939-960. Inorganic Mimics of Ribonucleases and Ribozymes: From Random Cleavage to Sequence-Specific Chemistry to Catalytic Antisense Drugs.
- [113] T. Carell, H. Schmid, M. Reinhard, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8741-8747. Efficient Syntheses of a Flavin- and an 8-Hydroxy-5-Deazaflavin Amino Acid and Their Incorporation into Oligopeptides.
- [114] Y. Eikyu, Y. Nakamura, T. Akiyama, F. Yoneda, K. Tanaka, K. Fuji, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 291-293. Hybridization of Oligodeoxynucleotide with Redox Coenzyme Model; Synthesis and Properties of Thymidine Decamers Covalently Linked to 5-Deazaflavin.
- [115] R. Eppele, *Dissertation ETH Zürich* **1999**.
- [116] C. Behrens, *Dissertation Universität Marburg* **2003**.
- [117] H. C. Brown, S. Narasimhan, Y. M. Choi, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4702-4708. Selective Reductions. 30. Effect of Cation and Solvent on the Reactivity of Saline Borohydrides for Reduction of Carboxylic Esters. Improved Procedures for the Conversion of Esters to Alcohols by Metal Borohydrides.
- [118] H. C. Brown, S. Krishnamurthy, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 567-607. Forty Years of Hydride Reductions.
- [119] Y. Nakamura, T. Akiyama, K. Bessho, F. Yoneda, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1315-1317. Convenient Syntheses of Oligonucleotides Linked to 5-Deazaflavin Coenzyme Models at 3'-End. Incorporation of 5-Deazaflavin to Controlled Pore Glass (CPG) Support.
- [120] M. Takao, A. Oikawa, A. P. M. Eker, A. Yasui, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 633-637. Expression of an *Anacystis nidulans* Photolyase Gene in *Escherichia coli*; Functional Complementation and Modified Action Spectrum of Photoreactivation.
- [121] R. Kuhn, F. Weygand, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, *68*, 1282-1288.
- [122] G. F. Maley, G. W. E. Plaut, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 641. The Isolation, Synthesis and Methabolic Properties of 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine.
- [123] I. Ishikawa, T. Itoh, R. G. Melik-Ohanjanian, H. Takayanagi, Y. Mizuno, H. Ogura, N. Kawahara, *Heterocycles* **1990**, *31*, 1641-1646.
- [124] T. Kimachi, K. Tanaka, F. Yoneda, *J. Heter. Chem.* **1991**, *28*, 439-443. Synthesis of a Proposed Isomer of F<sub>420</sub> Having a  $\alpha$ -Glutamyl Bonding.
- [125] J. Butenandt, R. Eppele, E.-U. Wallenborn, A. P. M. Eker, V. Gramlich, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 62-72. A Comparative Repair Study of Thymine- and Uracil-Photodimers with Model Compounds and a Photolyase Repair Enzymes.
- [126] J. Butenandt, A. P. M. Eker, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 642-653. Synthesis, Crystal-Structure and Enzymatic Evaluation of a DNA-Photolesion Isostere.
- [127] K. Miki, T. Tamada, H. Nishida, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. M. Eker, *J. Mol. Biol.* **1993**, *233*, 167-169. Crystallisation and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of Photolyase (Photoreactivating Enzyme) from the Cyanobacterium *Anacystis nidulans*.

- [128] M. S. Jorns, A. Sancar, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1856-1861. Identification of Oligothymidylat as New Simple Substrates for *Escherichia coli* DNA Photolyase and Their Use in a Rapid Spectrophotometric Enzyme Assay.
- [129] H. J. Park, K. Zhang, Y. Ren, S. Nadji, N. Sinha, J.-S. Taylor, C. H. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15965-15970. Crystal Structure of a DNA Decamer Containing a *cis-syn* Thymine Dimer.
- [130] I. Husain, J. Griffith, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 2558-2562. Thymine Dimers Bend DNA.
- [131] R. J. Roberts, X. Cheng, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 181-198. Base Flipping.
- [132] L. H. Pearl, *Mutat. Res.* **2000**, *460*, 165-181. Structure and Function in the Uracil-DNA Glycosylase Superfamily.
- [133] T. Hollis, A. Lau, T. Ellenberger, *Mutat. Res.* **2000**, *460*, 201-210. Structural Studies of Human Alkyladenine Glycosylase and *E. coli* 3-Methyladenine Glycosylase.
- [134] S. J. T. van Noort, F. Orsini, A. P. M. Eker, C. Wyman, B. de Grooth, J. Greve, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3875-3880. DNA Bending by Photolyase in Specific and Non-Specific Complexes Studied by Atomic Force Microscopy.
- [135] T. Langenbacher, X. Zhao, G. Bieser, P. F. Heelis, A. Sancar, M. E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10532-10536. Substrate and Temperature Dependence of DNA Photolyase Repair Activity Examined by Ultrafast Spectroscopy.
- [136] A. Pezeshk, I. D. Podmore, P. F. Heelis, M. C. R. Symons, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19714-19718. Electron Addition to Thymine Dimers and Related Compounds: A Mimic of Natural Repair.
- [137] H. Ling, F. Boudsocq, B. S. Plosky, R. Woodgate, W. Yang, *Nature* **2003**, *424*, 1083-1087. Replication of a *cis-syn* Thymine Dimer at Atomic Resolution.
- [138] Y. Li, S. Dutta, S. Doublé, H. Moh'd Bdour, J.-S. Taylor, T. Ellenberger, *Nat. Struct. Biol.* **2004**, *11*, 784-790. Nucleotide Insertion Opposite a *cis-syn* Thymine Dimer by a Replicative DNA Polymerase from Bacteriophage T7.
- [139] R. Kort, H. Komori, S. Adachi, K. Miki, A. P. M. Eker, *Acta Crystallogr.* **2004**, *D 60*, 1205. DNA Apophotolyase from *Anacystis nidulans*: 1.8 Å Structure, 8-HDF Reconstitution and X-Ray-Induced FAD Reduction.
- [140] S. Weber, K. Möbius, G. Richter, C. W. M. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3790-3798. The Electronic Structure of the Flavin Cofactor in DNA Photolyase.
- [141] J. Hahn, M.-E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2001-2007. Binding of Pyrimidine Model Dimers to the Photolyase Enzyme: A Molecular Dynamics Study.





# Lebenslauf

Alexandra Mees

geboren am 20.05.1972 in Siegen

## Schule und Ausbildung

---

- |             |   |
|-------------|---|
| 1991        | Abitur, Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Betzdorf   |
| 1992 – 1994 | Ausbildung zur Medizinisch-Technischen-Laboratoriums-Assistentin an der Justus-Liebig-Universität Giessen |

## Studium und Promotion

---

- |                     |  |
|---------------------|--|
| SS 94               | Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg   |
| WS 94/95 – WS 99/00 | Chemie an der Philipps-Universität Marburg   |
| 10.1997 – 03.1998   | Studienaufenthalt an der Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale in Paris. Forschungsprojekt in Org. Chemie bei Prof. Dr. G. Cahiez, ERASMUS-Stipendium   |
| 04.2000 – 12.2000   | Diplomarbeit an der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. Thomas Carell im Fach Org. Chemie mit dem Thema: <Synthese von Desazaflavin-Nukleotiden und von Riboflavin und Thymidindimer enthaltender DNA>. |
| 01.2001 – 12.2003   | Doktorarbeit an der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. Thomas Carell   |
| 01.2004 – 07.2005   | Fortsetzung der Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. Dr. Thomas Carell   |

München, den 03.06.2005

Alexandra Mees

## Publikationen und Präsentationen

---

A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. M. Eker, T. Carell, L.-O. Essen, <Crystal Structure of a Photolyase Bound to a CPD-like DNA Lesion after *in situ* Repair>, *Science* **2004**, 306, 1789-1793.

A. Mees, C. Behrens, A. Schwögler, M. Ober, T. Carell, <Redoxactive Oligonucleotides: Synthesis and Properties of Flavocoenzyme-DNA>, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2670-2677.

M. Cichon, C. Haas, F. Grolle, A. Mees, T. Carell, <Efficient Interstrand Excess Electron Transfer in PNA:DNA Hybrids>, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13984-13985.

Posterpräsentation, A. Mees, T. Carell, <Light-induced Repair and Structure Recognition of Thymidine Dimer by DNA Photolyase>, SFB-Symposium, München, Germany, **2004**.

Posterpräsentation, A. Mees, T. Carell, <Light-induced Repair and Structure Recognition of Thymidine Dimer by DNA Photolyase>, Conformational Control of Biomolecular Functions, VW-Tagung, Schloss Velen, Germany, **2003**.

Posterpräsentation, A. Mees, T. Carell, <Co-Crystallisation of DNA-Photolyase with Thymidine Dimer containing DNA>, Electron Transfer Processes in Chemical Biology, SAJEC 2002, Strassbourg, France, **2002**.

Posterpräsentation, A. Mees, M. Cichon, T. Carell, <Cofactor Containing Model Compounds for DNA-Repair Enzymes>, GDCh-Jahrestagung, Würzburg, Germany, **2001**.



