

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

# Synthese carbocyclischer Analoga oxidativ erzeugter DNA-Schäden

vorgelegt von  
Heiko Carl Müller  
aus  
Groß-Gerau

2008

## Erklärung

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

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 25.03.2008

Heiko Müller

Dissertation eingereicht am 06.05.2008

1. Gutachter: Prof. Thomas Carell

2. Gutachter: Prof. Hendrik Zipse

Mündliche Prüfung am 03.06.2008

*„Es gibt eine Theorie, die besagt, wenn jemals irgendwer genau herausfindet,  
wozu das Universum da ist und warum es da ist, dann verschwindet es auf der Stelle  
und wird durch etwas noch Bizzarreres und Unbegreiflicheres ersetzt.*

*Und es gibt eine andere Theorie, nach der das bereits geschehen ist.“*

*Douglas Adams*

## Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für die sehr interessante und aktuelle Themenstellung und für das mir entgegen gebrachte Vertrauen danken. Seine vielseitige Unterstützung sowohl in finanzieller als auch in wissenschaftlicher Hinsicht aber auch seine stete Diskussionsbereitschaft hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die Möglichkeit, immer wieder an spannenden Konferenzen teilnehmen zu können hat mein Engagement und meinen Optimismus ganz wesentlich geprägt.

Bei Herrn *Prof. Dr. Hendrik Zipse* möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Den Mitarbeitern der analytischen Serviceabteilungen danke ich für ihre Hilfe, insbesondere *Dr. Werner Spahl* für seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen. Frau *Sabine Voß* und Frau *Slava Gärtner* danke ich in besonderem Maße für ihre große Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Herausforderungen des Laboralltags bzw. bei ihrer Hilfe mit allen administrativen Problemen. Frau *Claudia Gräf* danke ich für die Übernahme des Umlaufs.

Besonderer Dank gilt meinen fleißigen Praktikanten, die bei mir ihre Praktikumsarbeiten anfertigten. Ich danke:

*Andreas Glas*, der mein erster Praktikant war und jetzt bei uns im AK gelandet ist; *Stefan Sproll*, der mich stets mit einem sehr höflichen „Du, Heiko, ...?“ anredete; *Georg Naßl*, auf dessen F-Bericht ich noch immer warte, der aber, wie ich hörte, mittlerweile jenseits der Chemie glücklich geworden ist; *Mathias Hopfinger*, der das Glück aber auch die Fähigkeiten hatte, mich im entscheidenden Moment mit den richtigen Experimenten zu unterstützen.

Allen meinen aktuellen und ehemaligen Laborkollegen danke ich für die stets sehr tolle Atmosphäre, für zahlreiche Festivitäten, Geselligkeit und stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, *Tobias Brückl*, *Stephanie Schorr*, *Ralf Strasser* und *Thomas Reißner* für das gewissenhafte Korrekturlesen meines Manuskripts, meiner Lieblings Laborkollegin *Eva-Maria Jahn* danke ich für eine tolle Zeit im Labor, *Dr. Guido „Tschüido“ Clever* für seine Humorresonanz, *Stromberg*, *Lammbock* und die freundliche Aufnahme im JCF, meinem besten Boxnachbar *Dr. Aaron Alt* für eine gemütliche Zeit und viel Spaß diesseits und jenseits der Chemie, allen anderen Kollegen aus F4.017, *Dr. Florian „Büschi“ Büsch*, *Dr. Sascha „Paule“ Breeger*, *Dr. Martin „Ed“ von Meltzer*, *Dr. Antonio Manetto*, *Dr. Aline Gégout*. Bei *Dimitris Stathis* bedanke ich mich für die freundliche Übernahme meines Themas und bei den Altvorderen *Dr. Friederike Grolle* (die mir die DNA-Synthese beibrachte) und

*Dr. Mathias Ober* (dessen Thema ich übernommen habe) sowie bei vielen weiteren früheren und aktuellen Laborkollegen für die freundliche Aufnahme und die schöne Zeit im AK Carell. Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern *Claus* und *Christa Müller*, ohne deren immerwährende Unterstützung diese Zeilen niemals geschrieben worden wären und meinen Geschwistern *Eva*, *Mirko* und *Anna Müller*, für viele schöne gemeinsame Stunden, oftmals auch überraschend.

Ganz besonders aber möchte ich mich bei meiner Frau *Nina* bedanken, für ihren Rückhalt und ihr Vertrauen und dafür, dass sie mir immer wieder zeigt, was wirklich wichtig ist.

**Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert oder auf Kongressen präsentiert worden:**

### **Veröffentlichungen in rezensierten Zeitschriften**

F. Coste, M. Ober, Y.-V. L. Bihan, M. A. Izquierdo, N. Hervouet, H. Mueller, T. Carell, B. Castaing, *EMBO J.* **2008**, *eingereicht*; Wild type Fpg (MutM) recognizes bulky N<sup>7</sup>-substituted-FapydG lesion using a novel and unproductive binding mode

H. Müller, M. Hopfinger, T. Carell, *ChemBioChem.* **2008**, *online*;  
Synthesis of a Stabilized Version of the Imidazolone DNA Lesion

H. Müller and T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1438 – 45;  
A Carbocyclic Analog of the Oxidative DNA Lesion Spiroiminodihydantoin

M. Ober, H. Müller, C. Pieck, J. Gierlich and T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*,  
18143 – 18149; Base Pairing and Replicative Processing of the Formamidopyrimidine-dG  
DNA Lesion

### **Vorträge**

Juni 2007 „Carbocyclic DNA Lesion Analogs“, ClustoxDNA meeting, Plovdiv,  
Bulgarien

Oktober 2005 “DNA repair on an atomic level”, Treffen des Sonderforschungsbereiches 646,  
*Networks in Genome Expression and Maintenance*, München

### **Posterpräsentationen**

Oktober 2007 “Carbocyclic Analogs of oxidatively generated DNA lesions”, 2. Treffen des  
Sonderforschungsbereiches 646 *Networks in Genome Expression and  
Maintenance*, München

August 2006 ”Carbocyclic modifications of oxidative DNA lesions”, 1<sup>st</sup> European  
Chemistry Congress, Budapest, Ungarn

April 2004 ”Carbocyclic Deoxyguanosine as a synthetic precursor for carbocyclic  
imidazolone DNA lesion”, 6<sup>th</sup> International Meeting on Recognition Studies in  
Nucleic Acids (NACON VI)”, Sheffield, UK

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
3.1	Struktur der DNA.....	10
3.2	Schädigung von DNA .....	11
3.3	Oxidativ erzeugte Schädigungen der Nukleobasen.....	12
3.3.1	Oxidationsreaktionen am Guanin.....	13
3.3.1.1	Einelektronenoxidation von Guanin.....	15
3.3.1.2	Zweielektronenoxidation von Guanin .....	17
3.3.1.3	Singulett-Sauerstoff vermittelte Oxidationen am Guanin.....	18
3.3.1.4	Reaktion von Guanin mit Hydroxylradikalen.....	20
3.3.2	Oxidationsreaktionen am 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (dOG).....	23
3.3.2.1	Einelektronenoxidation von 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (dOG).....	23
3.3.2.2	Die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (dOG).....	25
3.3.3	Oxidationsreaktionen an anderen Basen .....	26
3.3.3.1	Oxidationsreaktionen am Adenin .....	26
3.3.3.2	Oxidationen am Cytosin.....	27
3.3.3.3	Oxidationen am Thymin.....	29
3.4	Replikation und Mutagenität oxidativer geschädigter Guaninbasen.....	31
3.4.1	In vitro Eigenschaften oxidativ erzeugter dG-Schäden.....	31
3.4.2	In vivo Eigenschaften oxidativ erzeugter Guaninschäden.....	33
3.5	Reparatur oxidativ erzeugter DNA-Schäden .....	34
3.5.1	DNA-Glycosylasen .....	36
3.5.2	Formamidopyrimidin DNA-Glycosylase (MutM/FPG).....	36
3.6	Carbocyclische Analoga oxidativ erzeugter DNA-Schäden .....	39
3.7	Aufgabenstellung .....	40

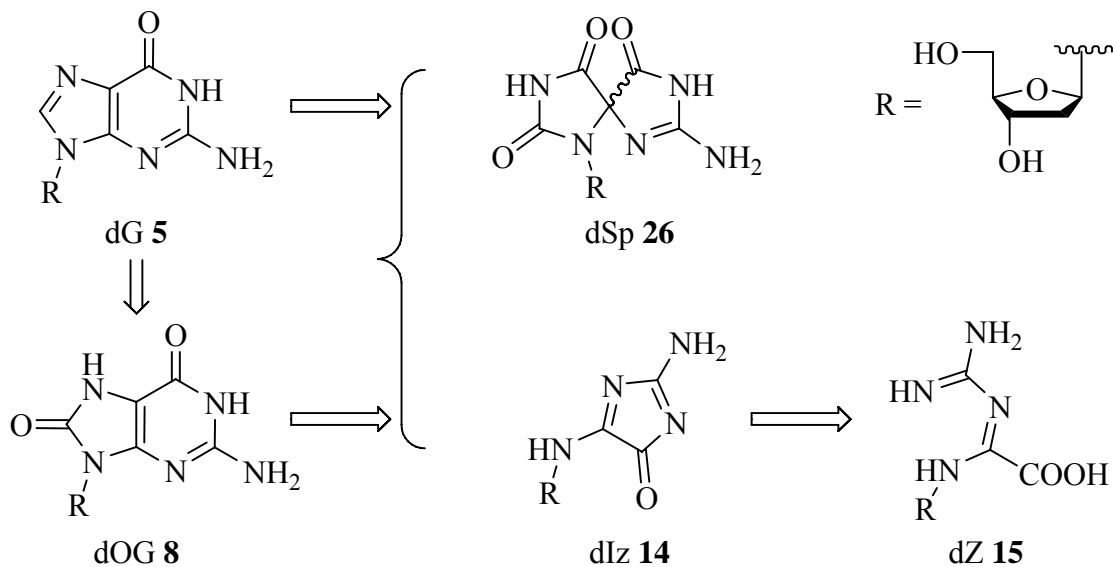
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>42</b>
4.1	Synthese der carbocyclischen Nucleoside	42
4.1.1	Carbocyclisches 2'-Desoxyguanosin	42
4.1.2	Carbocyclisches 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin	49
4.1.3	Carbocyclisches 8-Methoxy-2'-desoxyguanosin	51
4.1.4	Zusammenfassung und Diskussion	54
4.2	Oligonucleotidsynthese und Einbau der Modifikationen in DNA	55
4.2.1	Enzymatischer Totalverdau	58
4.3	Die carbocyclische Modifikation als Modell der natürlichen Ribose	60
4.3.1	Theorie des DNA Schmelzvorgangs	60
4.3.2	Ergebnisse der Schmelzpunktstudien	62
4.4	Oxidation der carbocyclisch modifizierten Nucleoside und ODN	67
4.4.1	Carbocyclische Analoga des Imidazol DNA-Schaden	67
4.4.1.1	Überlegungen zur Synthese von Imidazol	67
4.4.1.2	Synthese von cdIz durch Oxidation von cdG	68
4.4.1.3	Synthese von cdIz im Oligonucleotid	72
4.4.1.4	Enzymatischer Totalverdau	78
4.4.1.5	Hydrolyse von cdIz	80
4.4.1.6	Zusammenfassung und Diskussion	82
4.4.2	Spiroiminodihydantoin	83
4.4.2.1	Die Einelektronenoxidation von cdOG	83
4.4.2.2	Die Einelektronenoxidation von cdOG im ODN	87
4.4.2.3	Enzymatischer Totalverdau	91
4.4.2.4	Zusammenfassung und Diskussion	92
4.5	Kristallisationsexperimente	94
4.5.1	Einleitung	94
4.5.2	Beschreibung der Kristallstruktur von wt-L/FPG gebunden an cBnFaPydG-DNA	95
4.6	Zusammenfassung und Ausblick	98
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>101</b>
5.1	Material und Methoden	101
5.2	DNA Synthese und Aufreinigung	103
5.3	Schmelzkurven	104



<b>5.4</b>	<b>Enzymatischer Verdau der Oligonukleotide .....</b>	<b>105</b>
<b>5.5</b>	<b>Hydrolyse von cdIz .....</b>	<b>106</b>
<b>5.6</b>	<b>Synthese der Verbindungen.....</b>	<b>107</b>
<b>5.7</b>	<b>Oxidation der Oligonukleotide .....</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>143</b>

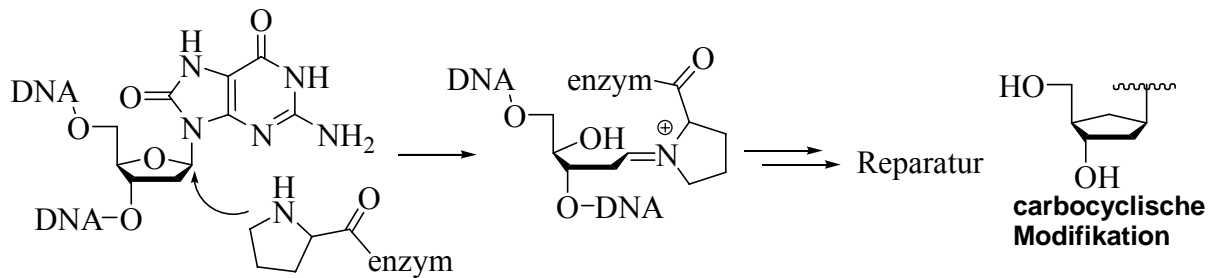
## 1 Zusammenfassung

Die DNA einer Zelle ist der anhaltenden Schädigung durch zahlreiche endogene und exogene Faktoren ausgesetzt. Hierdurch entsteht die enorme Anzahl von geschätzten 30 000 DNA Schäden pro Zelle und Tag. Viele dieser Schäden sind stark mutagen und wesentlich an der Entstehung von Krebs und Alterung beteiligt. Guanin hat unter allen DNA Basen das niedrigste Oxidationspotential und ist daher bevorzugt oxidativen Angriffen ausgesetzt. Dabei entsteht eine Reihe von primären und sekundären Oxidationsprodukten, von denen einige beispielhaft in *Schema I* dargestellt sind.



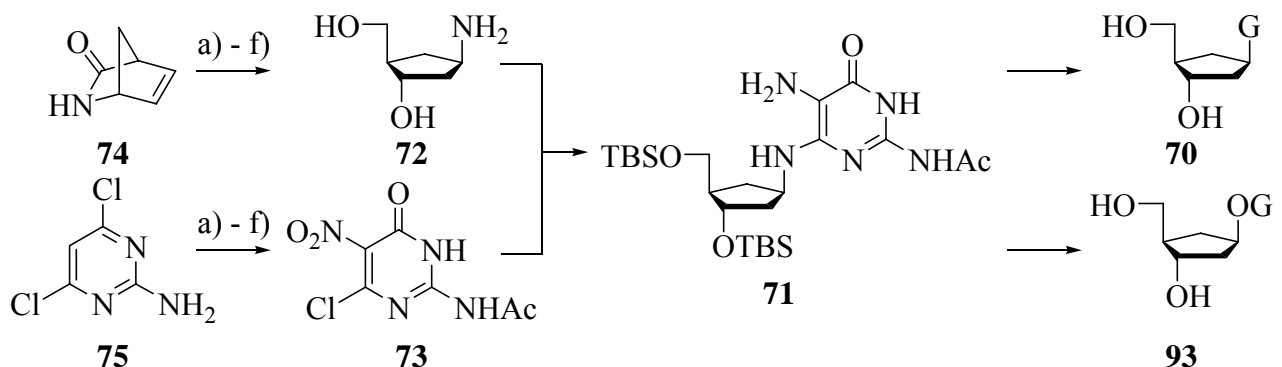
*Schema I: Einige der in dieser Arbeit beschriebenen oxidativ erzeugten DNA-Schäden.*

Die meisten der oxidativ erzeugten DNA-Schäden werden durch Basenexcisionsreparatur (BER) entfernt. Hierbei wird die geschädigte Base durch nucleophilen Angriff des *N*-Terminus einer DNA-Glycosylase etwa MutM/FPG abgespalten (*Schema II*). Der Prozess der Schadenserkenkung ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. MutM/FPG akzeptiert eine Reihe strukturell sehr unterschiedlicher Schäden wie etwa dOG 8, dSp 26 und dZ 15.



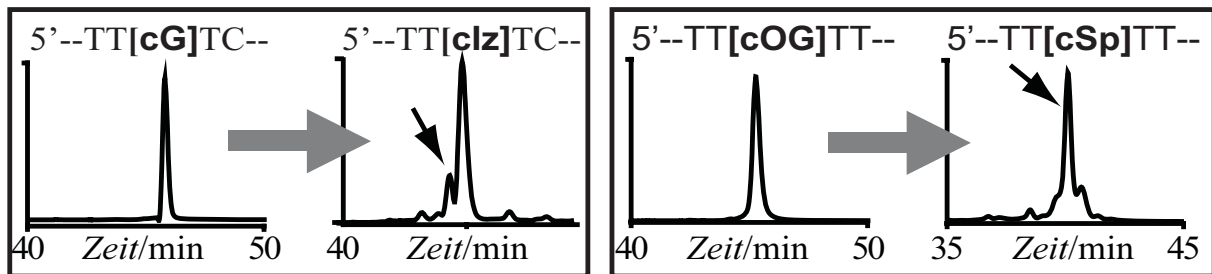
Schema II: Die Bildung der intermediären Schiff'schen Base ist im Falle eines carbocyclischen Analogons nicht möglich.

Wird die 2'-Desoxyribose durch eine Cyclopentyleinheit ersetzt, führt dies aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Ausbildung der intermediären Schiff'schen Base zu enzymatisch nicht spaltbaren carbocyclischen Schadensanaloga (**Schema II**). Inkorporiert in ein Oligonukleotid (ODN) sind derartige Analoga interessante Substrate für Kristallisationsexperimente im Komplex mit Wildtyp Glycosylasen wie z.B. MutM/FPG. Auf eine Mutation der aktiven Tasche zur Stabilisierung des Enzym-Substrat Komplexes, wie es in bisherigen Arbeiten üblich war, kann somit verzichtet werden. Dies führt zu verlässlicheren Aussagen über die Enzym-Substrat-Wechselwirkung in der aktiven Tasche des Enzyms. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang die Darstellung carbocyclischer Analoga einiger oxidativer DNA Schäden. Ausgehend von (1*R*)-(-)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on **74** und 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin **75** erfolgte die Darstellung von Intermediat **71** in einer 12-stufigen, konvergenten Synthese. Umsetzung von **71** mit Diethoxymethylacetat lieferte carbocyclisches Guanosin (cdG, **70**), Umsetzung mit Carbonyldiimidazol lieferte carbocyclisches 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (cdOG, **93**) in mittlerer Ausbeute (**Schema III**).



Schema III: Intermediat **71** ist eine Schlüsselverbindung zur Synthese carbocyclischer Analoga verschiedener 2'-Desoxyguanosinderivate.

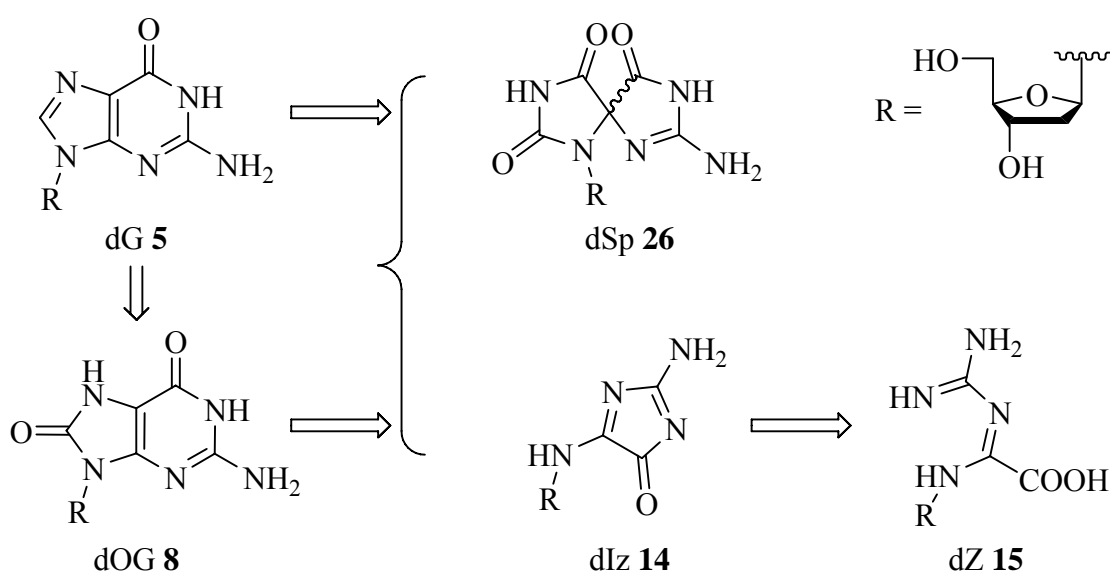
Beide Nucleoside konnten in ihre Phosphoramidite überführt und in mehrere Oligonucleotide eingebaut werden. Durch Schmelzpunktmessungen konnte gezeigt werden, dass cdG und dG die gleichen Basenpaarungseigenschaften besitzen. Typ-I Photooxidation von cdG in Einzelstrang-DNA lieferte cdIz in guten Ausbeuten und hoher Selektivität. Bei der Einelektronenoxidation von cdOG in DNA mit  $\text{Na}_2\text{IrCl}_6$  entstand selektiv und mit sehr hoher Ausbeute carbocyclisches Spiroiminodihydantoin cdSp (*Schema IV*).



Schema IV: Oxidation von cdG und cdOG im Oligonucleotid. Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgte mittels MALDI-TOF und LC-MS/MS nach enzymatischem Totalverdau.

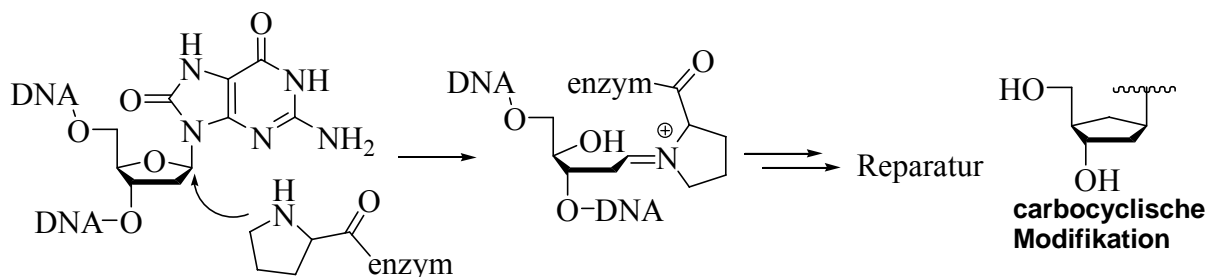
## 2 Summary

Various endogenous and exogenous factors constantly damage the DNA of a cell. Approximately 30 000 DNA lesions are generated per cell and day and many of them are highly mutagenic and responsible for aging and the development of cancer and other diseases. Among all four canonical bases, Guanine has the lowest oxidation potential and is therefore the preferred target for oxidative attack. This results in the formation of a number of primary and secondary oxidation products, of which a small assortment is depicted in *Scheme I*.



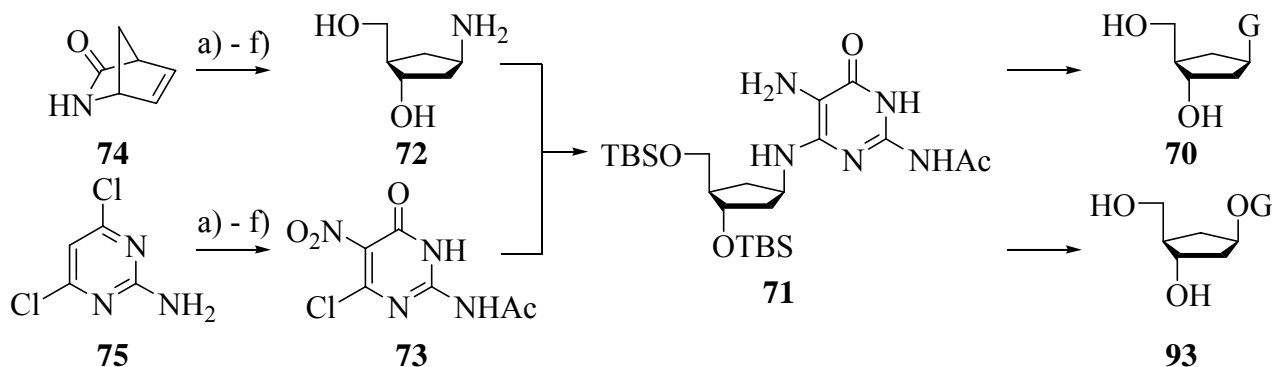
*Scheme I: A depiction of some of the oxidatively generated DNA lesions which are part of this work.*

Most of the oxidatively generated DNA lesions are being repaired via the base excision repair pathway (BER). The nucleophilic attack e.g. of the *N*-terminus of a DNA-glycosylase like MutM/FPG cleaves off the damaged nucleobase (*Scheme II*). However, this process is not yet fully understood. MutM/FPG binds and repairs a number of structurally very different lesions like dOG **8**, dSp **26** and dZ **15**.



*Scheme II: The formation of the intermediate Schiff's base is not possible with the carbocyclic analog of a DNA lesion.*

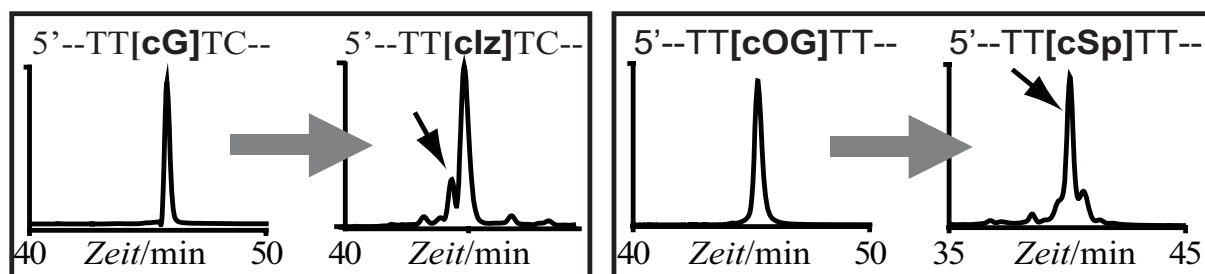
Replacing of the 2'-deoxyribose by a cyclopentane unit leads to an enzymatically uncleavable lesion analog due to the lack of the glycosidic bond (**Scheme II**). Incorporated into DNA, such a lesion analog is a very suitable substrate for cocrystallization studies in complex with wildtype glycosylases. In contrast to present studies, a mutation of the crucial active site pocket is no longer necessary to trap the enzyme-substrate complex. As a result of this work, the synthesis of carbocyclic analogs of several oxidatively generated DNA lesions has been accomplished. Starting with (1*R*)-(-)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one **74** and 2-Amino-dichloropyrimidine **75**, compound **71** has been synthesized as a key intermediate for the preparation of the carbocyclic nucleosides guanosine **70** and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine **93** (**Scheme III**).



*Scheme III: Compound **71** is a key intermediate for the synthesis of carbocyclic analogs of several 2'-deoxyguanosine derivatives.*

After conversion into their corresponding phosphoramidites, both analogs have been incorporated into several oligonucleotides using solid phase DNA synthesis. Melting-point experiments revealed the same base-pairing properties of the carbocyclic guanosine compared to the native guanosine. Type-I photooxidation experiments of cdG in single-stranded ODN gave carbocyclic Imidazolone inside the ODN with high selectivity and good yields. One

electron oxidation of cdOG in a 14-mer ODN gave full conversion of the starting material and selective formation of cdSp (*Scheme IV*).



*Scheme IV: Oxidation of cdG and cdOG containing ODN. Analysis of the reaction products was performed using MALDI-TOF and enzymatic total digest followed by LC-MS/MS.*

### 3 Einleitung

#### 3.1 Struktur der DNA

Motiviert durch die vielen Pneumonieopfer in der Zeit während und nach dem ersten Weltkrieg suchte der britische Militärmediziner *Frederick Griffith* in den 1920er Jahren nach einem Impfstoff gegen das Bakterium *Streptococcus pneumoniae*. Er fand heraus, dass sich die pathogenen Eigenschaften eines durch Hitze abgetöteten Stammes von *S. pneumoniae* auf einen anderen eigentlich harmlosen Stamm übertragen, wenn diese gemeinsam einem Versuchstier verabreicht werden.<sup>[1]</sup> Seine Untersuchungen wurden von *Oswald Avery* aufgegriffen, der etwa 20 Jahre später zeigen konnte, dass Nukleinsäuren die pathogenen Eigenschaften von *S. pneumoniae* transportieren.<sup>[2]</sup>

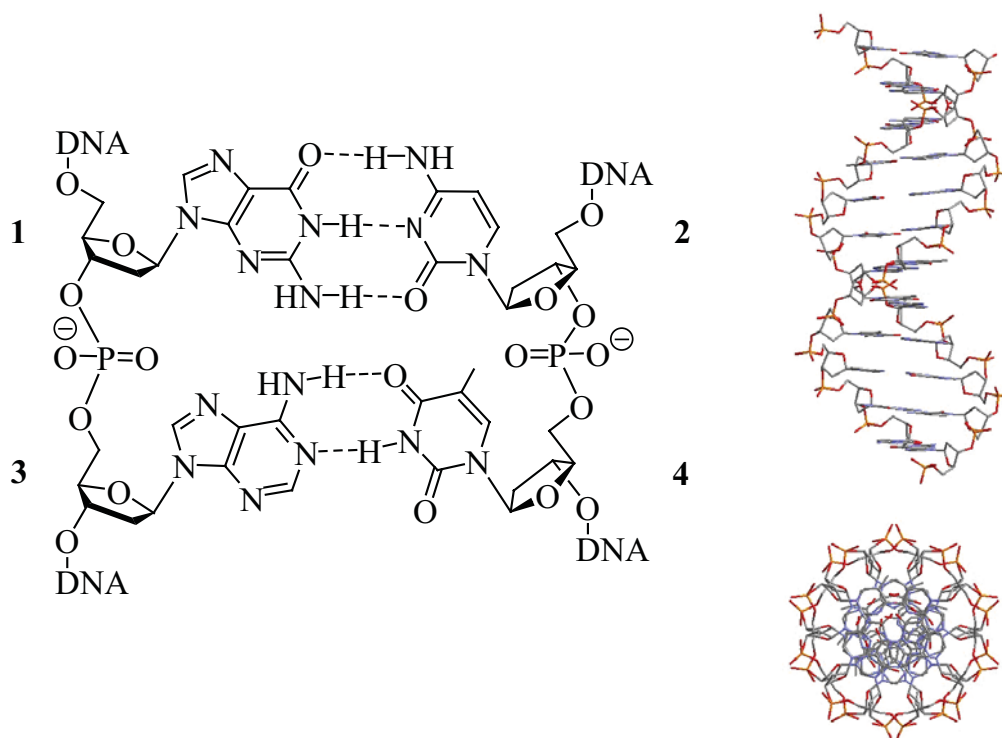


Abbildung 1: Die Purinbasen Guanin **1** und Adenin **3** paaren mit den Pyrimidinbasen Cytosin **2** bzw. Thymin **4** (links). Die gebildete Doppelhelix aus zwei antiparallelen Strängen wird durch Wasserstoffbrücken und  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen der nach innen gerichteten Basen zusammengehalten. 2-Desoxyribose und Phosphodiestergruppen bilden das nach außen gerichtete Rückgrat. Unter physiologischen Bedingungen liegt die DNA Doppelhelix in der B-Form vor (rechts).



Heute wissen wir, dass die Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) Träger der Erbinformation aller Lebewesen ist, abgesehen von einigen Viren, die zu diesem Zweck Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) verwenden. Seit es *J. D. Watson* und *F. Crick* gelang, basierend auf den Arbeiten von *E. Chargaff*, die Röntgendiffraktogramme von *R. Franklin* zu lösen, ist die doppelhelikale Struktur der DNA bekannt.<sup>[3], [4]</sup> In einem DNA-Molekül sind die vier Nukleobasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T), verbunden über ein Rückgrat aus 2-Desoxyribose und Phosphodiestergruppen, zu einer linearen Kette aufgereiht und über spezifische Wasserstoffbrückenbindungen mit einem zweiten DNA-Strang verbunden. Dabei paart stets A mit T und G mit C, wobei die Abfolge der Nukleobasen die Erbinformation kodiert. Unter physiologischen Bedingungen dominiert die rechtsgängige B-Form der DNA-Doppelhelix (**Abbildung 1**).

### 3.2 Schädigung von DNA

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass  $\gamma$ -Strahlen Mutationen verursachen.<sup>[5]</sup> Allerdings wurde erst nach 1945 der Einfluss von ionisierender Strahlung auf die DNA untersucht.<sup>[6-8]</sup> In dieselbe Zeit fielen auch Untersuchungen zu den mutagenen Eigenschaften von alkylierenden Substanzen, anfänglich waren das vor allem die als Kampfmittel bekannten Senfgase.<sup>[6, 8-10]</sup> Die Schädigung von DNA ist jedoch kein außergewöhnliches Phänomen, das lediglich durch stark toxische Substanzen oder energiereiche Strahlung ausgelöst wird. Geschätzte  $10^4 - 10^6$  Schäden entstehen pro Tag im Genom einer gewöhnlichen menschlichen Zelle.<sup>[11]</sup> Zahlreiche Einflüsse führen zu chemischen Veränderungen an der DNA. Dabei unterscheidet man zwischen Schäden an den Nukleobasen und Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA.<sup>[12]</sup> Veränderungen an der Struktur der DNA können dazu führen, dass sich entweder die Paarungseigenschaften der Basen ändern oder dass die Information der DNA nicht mehr ausgelesen werden kann. In beiden Fällen kommt es zum Verlust der genetischen Information. Ist ein einzelnes Nukleotid verändert, so spricht man von einer Punktmutation. Bestimmte Schäden verursachen sogenannte *frameshift* Mutationen. Dabei werden während der Replikation ein oder mehrere Nukleotide von der replizierenden Polymerase „übersehen“ oder auch zuviel eingebaut.<sup>[13]</sup> In der Folge verschieben sich alle nachfolgenden Gensequenzen um die entsprechende Anzahl Nukleotide (Leseraster Verschiebung). Wieder andere Schäden verhindern eine Replikation vollständig und führen somit zu einem Replikationsstopp, etwa indem sie zwei Nukleotide zu einem *crosslink* miteinander verbinden. Verschiedene karzinogene Substanzen, wie etwa polycyclische

Aromaten oder bestimmte Mycotoxine (z.B. Aflatoxin B<sub>1</sub>, eines der stärksten bekannten Karzinogene überhaupt) reagieren ebenfalls mit den Nukleobasen.<sup>[14]</sup> Die häufig sehr sperrigen Addukte (*bulky-adducts*) interkalieren mit ihren ausgedehnten  $\pi$ -Ebenen zwischen die Basenstapel und drehen die geschädigte Nukleobase aus ihrer natürlichen Position heraus. Ein derart verzerrter DNA Strang stellt häufig ebenfalls einen Replikationsstopp dar. Geradezu wünschenswert ist ein Stopp der Replikation in der Krebstherapie. Cisplatin, das immer noch eines der wichtigsten Tumortheraeutika darstellt, erzeugt ebenfalls ein *bulky-adduct*, indem es benachbarte Guaninbasen über einen Platinkomplex kovalent miteinander verbindet.<sup>[15, 16]</sup> DNA-Schädigungen entstehen aber auch ohne die Einwirkung schädlicher Substanzen. Spontane Hydrolyse kann zur Abspaltung insbesondere von Purinbasen und damit zur Bildung hochmutagener abasischer Stellen und weiter, über protonenkatalysierte  $\beta$ -Eliminierung, zu Einzelstrangbrüchen führen. Durch Hydrolyse des exozyklischen Amin des Cytosins kommt es zur Bildung von Uracil, was zu Veränderungen der DNA Sequenz und schließlich zu Punktmutationen führt.<sup>[17]</sup>

### 3.3 Oxidativ erzeugte Schädigungen der Nukleobasen

Eine Reihe ganz unterschiedlicher Prozesse führen zu oxidativer Schädigung von DNA. Das sind, unter anderen, ionisierende Strahlung, UV- oder Sonnenlicht, Photosensibilisatoren oder verschiedene Karzinogene.<sup>[18]</sup> Darüber hinaus entstehen viele schädigende Spezies als Folge des normalen Zellmetabolismus. Wasserstoffperoxid, Superoxidradikalanionen und Hydroxylradikale können als Nebenprodukte der Sauerstoffreduktion anfallen. Sie schädigen die DNA auf vielfältige Weise.<sup>[12]</sup> Oxidative DNA-Schädigung und die damit einhergehenden chemischen Veränderungen an den Nukleobasen sind nicht nur bei der Tumorgenese oder beim Alterungsprozess, sondern auch bei verschiedenen Entzündungsprozessen von Bedeutung.<sup>[19]</sup> Basenschädigungen, Protein-DNA-*crosslinks* und Oxidationen an den Desoxyriboseeinheiten, die zu Strangbrüchen führen, sind die hauptsächlichen Typen von oxidativen Schäden.<sup>[18], [20]</sup> Insgesamt sind bislang etwa 100 oxidativ erzeugte DNA Schäden bekannt.<sup>[18, 21, 22]</sup> Die Ausführungen konzentrieren sich in den folgenden Kapiteln auf die Basenschädigungen. Hierbei unterscheidet man zwischen primären (oder intermediären) und sekundären (oder finalen), oxidativ erzeugten Schäden.<sup>[23, 24]</sup>

### 3.3.1 Oxidationsreaktionen am Guanin

Mit einem Redoxpotential von 1.29 V gegenüber NHE ist Guanin unter allen natürlichen und ungeschädigten Nucleobasen am leichtesten oxidierbar (**Tabelle 1**).<sup>[25]</sup> Dennoch finden auch an den anderen Basen Oxidationsprozesse statt, auf die in den nachfolgenden Kapiteln ebenfalls kurz eingegangen werden wird.

*Tabelle 1: Redoxpotentiale der Ribo- und Desoxyribonucleoside bei pH 7.0 gegen die Normwasserstoffelektrode*

Spezies	$E^\circ$ [V] <sub>NHE</sub>
rG	1.29
rA	1.42
dC	1.6
T	1.7

Aufgrund der  $\pi$ -Basenstapelung in Doppelstrang-DNA ist das Redoxpotential von direkt benachbarten Guaninbasen weiter reduziert. Dabei hat das 5'-Guanin das niedrigste Redoxpotential und ist damit bevorzugter Angriffspunkt von oxidativer Schädigung in einem entsprechenden Sequenzkontext (**Tabelle 2**).<sup>[26, 27]</sup> Weiterhin ist gezeigt worden, dass die durch Oxidation erzeugte positive Ladung des Radikalkations über große Distanzen in einem DNA-Strang transportiert werden kann (*hole migration*).<sup>[28, 29]</sup> Dies legt die Vermutung nahe, dass die GC reichen Sequenzen außerhalb des kodierenden Bereichs in genomischer DNA als „Kationenfallen“ dienen könnten, die den wichtigen kodierenden Teil der DNA vor Oxidation schützen.<sup>[30]</sup>

*Tabelle 2: Absenkung des Redoxpotentials von Guanin durch  $\pi$ -Basenstapelung.*

$$E^\circ = 0.827 \times \text{Ionisierungspotential} - 5.2.$$

Sequenz	Ionisierungspotential [eV]	$E^\circ$ [V] <sub>NHE</sub>
<u>G</u>	7.75	1.21
<u>GG</u>	7.28	0.82
<u>GGG</u>	7.07	0.65
<u>GGGG</u>	6.98	0.57

Die oxidierenden Spezies lassen sich verschiedenen Klassen zuordnen.

Einelektronenoxidantien können sein: Typ-I Photosensibilisatoren (**Abbildung 2**),<sup>[31]</sup> verschiedene hochvalente Metallionen (z.B. Chromate, Permanganate, Iridate), Peroxynitrit und Carbonatradikalanionen, sowie eine Unmenge weiterer reaktiver Elektrophile wie z.B. Chlordioxid.<sup>[32]</sup> Echte Zweielektronenoxidationen sind deutlich seltener, sie sind vor allem synthetisch bedeutsam.

Eine der wichtigsten oxidierenden Spezies ist Singulett-Sauerstoff,<sup>[33]</sup> der photochemisch durch Belichten von Typ-II Photosensibilisatoren (**Abbildung 2**) oder chemisch durch den Zerfall bestimmter Substanzen, wie z.B. Naphthalenendoperoxid, erzeugt werden kann.

Hydroxylradikale sind eine weitere bedeutsame Spezies, die für die oxidative Schädigung von DNA-Basen verantwortlich gemacht werden kann.

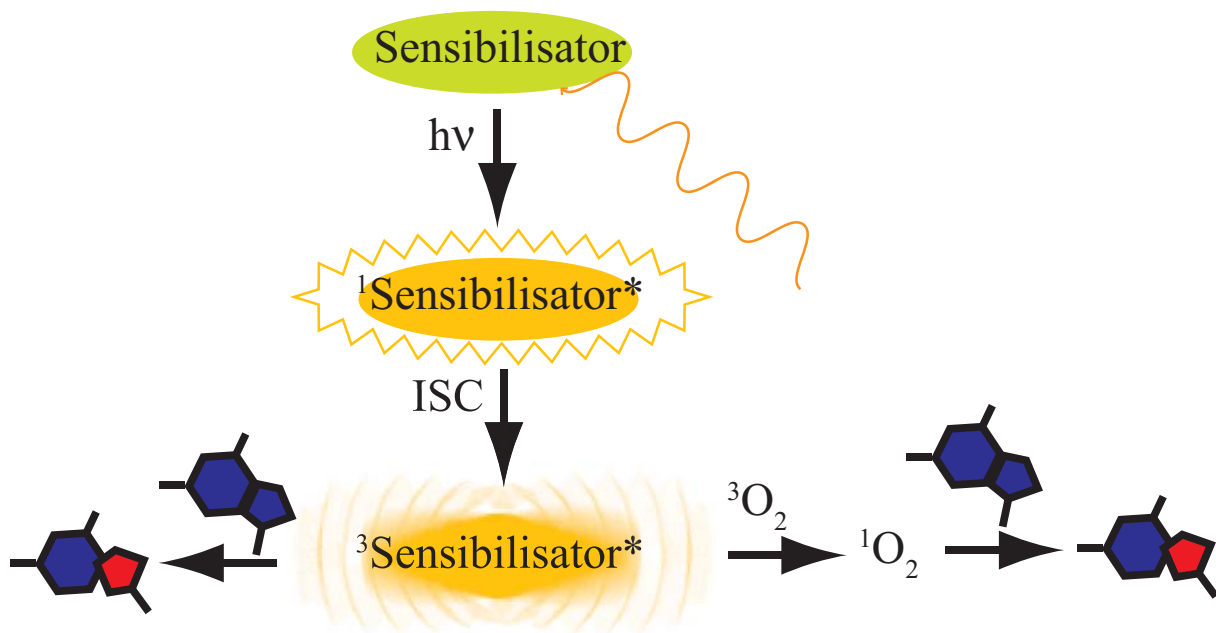
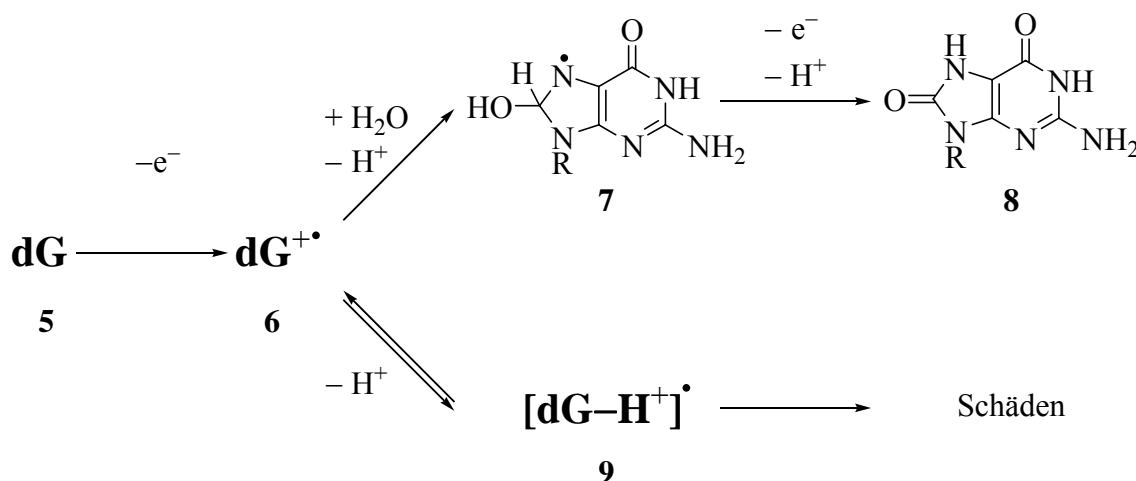


Abbildung 2: UV-Licht überführt den Sensibilisator in die angeregte Singulett-Form, die durch intersystem-crossing (ISC) in die aktivierte Triplet-Form übergeht. Diese kann ihre Energie entweder direkt auf eine Nucleobase übertragen (Typ-I Photooxidation, linker Reaktionsweg) oder zunächst Triplet-Sauerstoff in Singulett-Sauerstoff überführen, der dann die Nucleobase schädigt (Typ-II Photooxidation, rechter Reaktionsweg).<sup>[34]</sup>

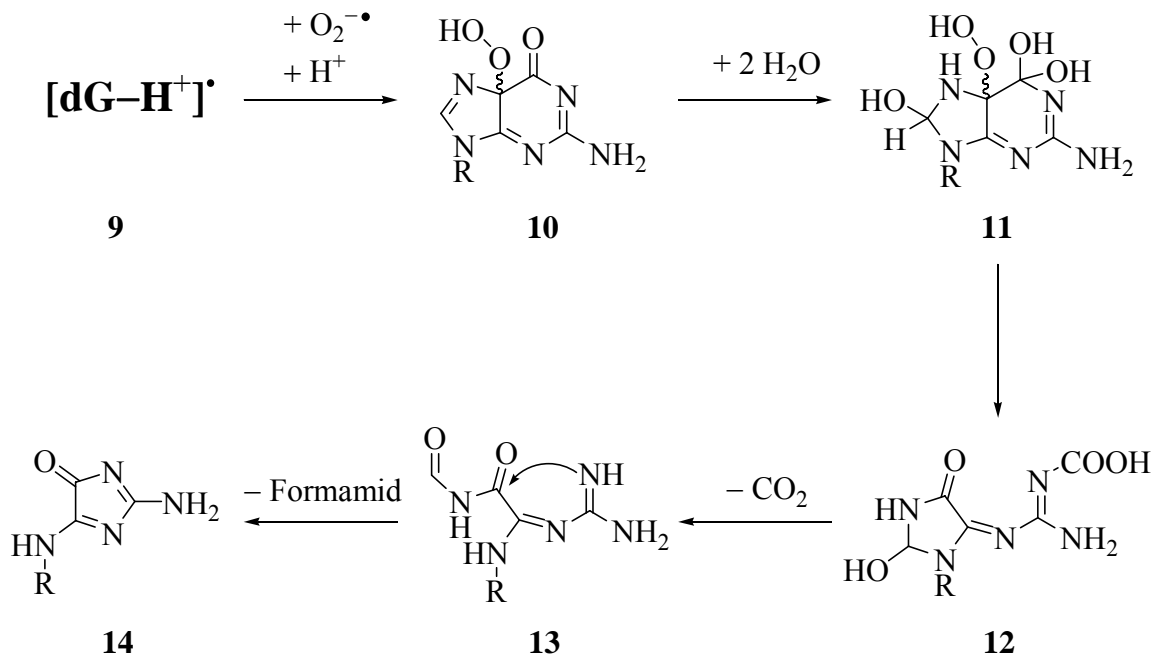
### 3.3.1.1 Einelektronenoxidation von Guanin

Die Reaktion von dG **5** mit einem Einelektronenoxidans führt zunächst zur Entstehung von dG<sup>+•</sup> **6**. Dieses hat in Form des Nucleosids einen pK<sub>a</sub>-Wert von 3.9 und kann somit unter physiologischen Bedingungen leicht zum neutralen [dG-H<sup>+</sup>]<sup>•</sup> **9** deprotoniert werden.<sup>[35, 36]</sup> Das Neutralradikal [dG-H<sup>+</sup>]<sup>•</sup> **9** reagiert mit anderen Radikalspezies in seiner Umgebung. Dies kann Triplett-Sauerstoff sein oder, kinetisch favorisiert, „echte“ Radikale wie das Superoxidradikalanion O<sub>2</sub><sup>-•</sup>. Da die meisten Einelektronenoxidantien entweder selbst Radikale sind oder solche im Reaktionsmedium generieren, ist die schnellere Radikal-Radikal Reaktion in der Regel dominant (*Schema 1*).<sup>[24]</sup> Aufgrund der Wasserstoffbrückenbindung ist in Doppelstrang DNA die Acidität des Protons an N1 herabgesetzt (pK<sub>a</sub> = 4.5) und das dG<sup>+•</sup> **6** kann mit Wasser als Nucleophil reagieren, was zur Bildung von 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (dOG, **8**) als finalem Schaden führt.<sup>[35, 36]</sup>



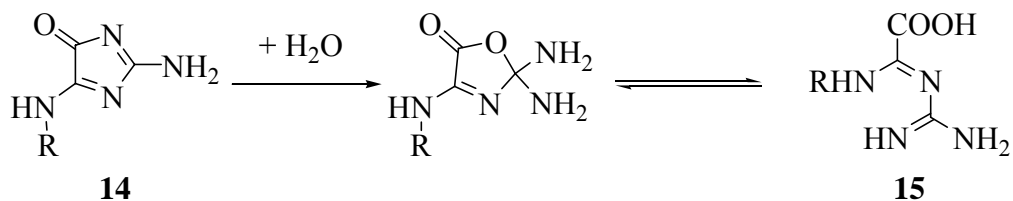
*Schema 1: Bei der Einelektronenoxidation von dG **5** bildet sich zunächst dG<sup>+•</sup> **6**, das entweder deprotoniert oder von Nucleophilen abgefangen wird. R = 2'-Desoxyribose*

Die Reaktion von [dG-H<sup>+</sup>]<sup>•</sup> **9** mit O<sub>2</sub><sup>-•</sup> und die nachfolgende Protonierung führt im Nucleosid und in Einzelstrang DNA zur Bildung von 5-Hydroperoxy-2'-desoxyguanosin (5-OOH-dG, **10**). Nach der Aufnahme von zwei Molekülen Wasser bildet sich Intermediat **11**, das schließlich unter Abgabe von CO<sub>2</sub> und Formamid zu 2'-Desoxyimidazolone (dIz, **14**) zerfällt (*Schema 2*).<sup>[37, 38]</sup>



Schema 2: dIz **14** entsteht durch die Reaktion von  $[dG-H^+]^{\bullet} **9** mit Superoxidradikalanionen. Das intermediär gebildete 5-OOH-dG **10** nimmt zunächst zwei Moleküle Wasser auf und zerfällt anschließend unter Abgabe von  $CO_2$  und Formamid.  $R = 2'$ -Desoxyribose$

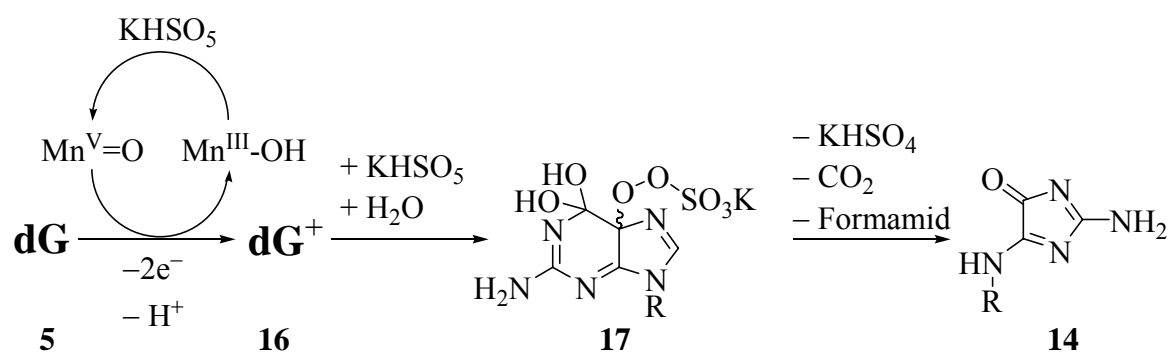
In Doppelstrang- und in Kalbsthymus-DNA liegt das Gleichgewicht  $dG^{++} \rightleftharpoons dG^{\bullet} + H^+$  stärker auf der linken Seite. Dort entsteht vor allem bei niedriger Schadensrate, vermehrt dOG **8** neben dIz **14**.<sup>[22, 39-42]</sup> dIz **14** ist nicht stabil und hydrolysiert zu Oxazolone (dZ, **15**) (Schema 3).



Schema 3: Die Hydrolyse von dIz **14** führt zur Bildung von dZ **15**.  $R = 2'$ -Desoxyribose

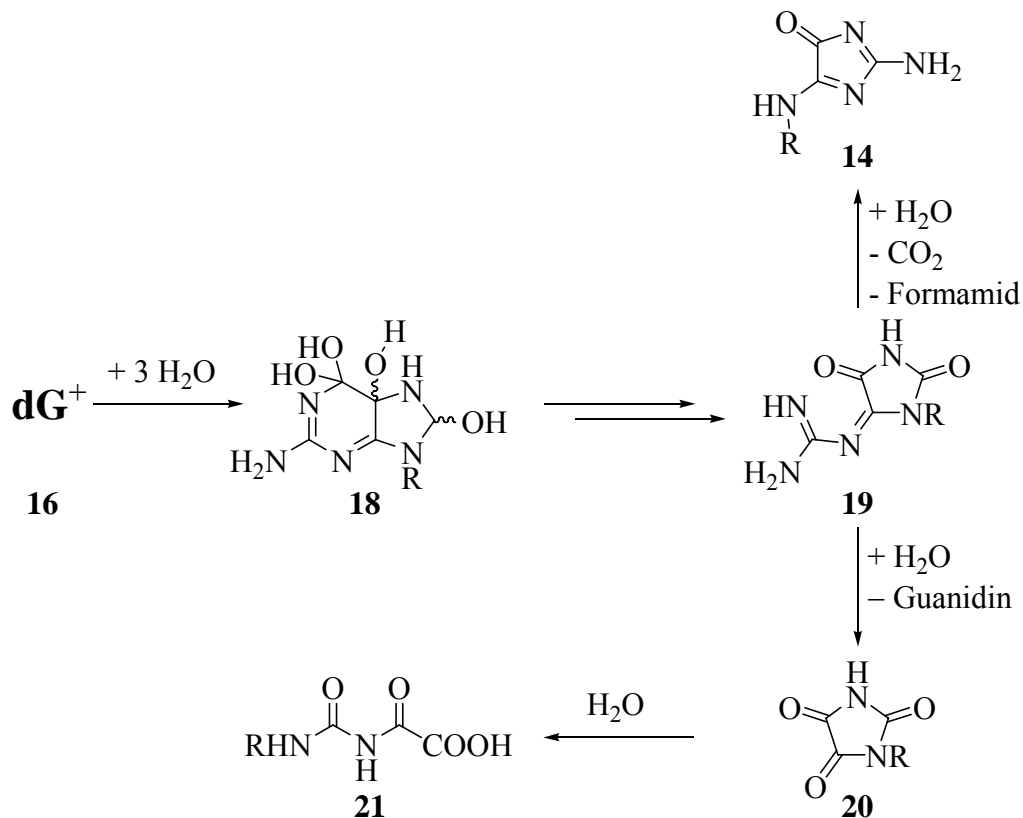
### 3.3.1.2 Zweielektronenoxidation von Guanin

Es gibt nicht viele Reagenzien, die mit dG **5** in einer „echten“ Zweielektronenoxidation reagieren. Ein synthetisch bedeutsames ist  $\text{KHSO}_5$  in Verbindung mit katalytischen Mengen von  $\text{Mn(III)-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21H,23H-porphinacetat-tetrakis-(methoacetat)}$  ( $\text{MnTMPyP}$ ).<sup>[43-45]</sup> Die aktive Spezies ist ein  $\text{Mn(V)=O}$ , das zwei Elektronen von dG **5** abstrahiert und direkt ein  $\text{G}^+$  **16** bildet. Dieses reagiert mit  $\text{HSO}_5^-$  unter Bildung eines Intermediats **17**. Ohne Beteiligung von weiteren Molekülen Sauerstoff oder Wasser bildet sich dIz **14** (*Schema 4*). Ein weiteres Reagenz, das zur Zweielektronenoxidation fähig ist, ist der Komplex  $\text{Pt(IV)Cl}_4(\text{dach})$ .<sup>[46]</sup>



*Schema 4: Bei der Zweielektronenoxidation von dG **5** wird direkt ein  $\text{G}^+$  **16** als Intermediat erzeugt, das in diesem Fall von  $\text{HSO}_5^-$  abgefangen wird.*

In Doppelstrang DNA wird  $\text{dG}^+$  **16** nicht von  $\text{KHSO}_5$ , sondern von zwei Molekülen Wasser abgefangen und bildet das Intermediat **18**. Dieses reagiert neben dIz **14** zu Dehydroguanidinohydantoin (dDGh, **19**) und Parabansäure (dPa, **20**). Letzteres ist nicht stabil, es hydrolysiert zu Oxalursäure (dOa, **21**) (*Schema 5*).<sup>[45]</sup>



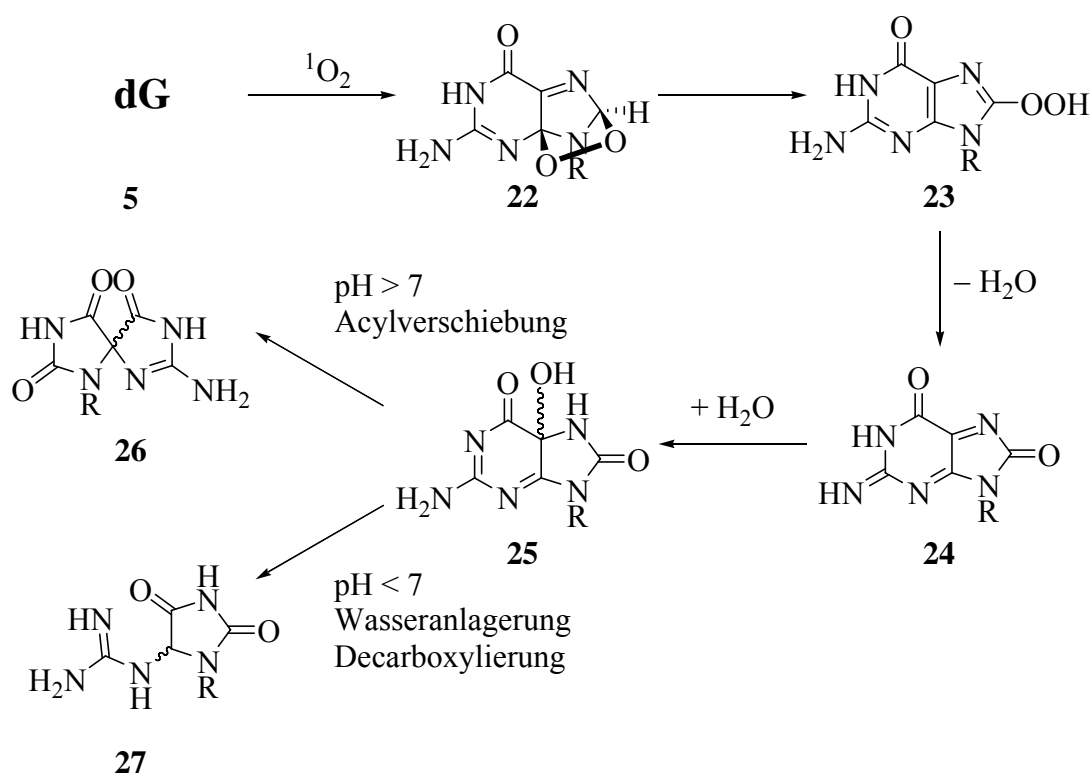
Schema 5: Intermediär gebildetes  $dDGh$  **19** kann entweder zu  $dG$  **14** oder zu  $dPa$  **20** und damit zu  $dOa$  **21** weiterreagieren.  $R = DNA$ .

### 3.3.1.3 Singulett-Sauerstoff vermittelte Oxidationen am Guanin

Singulett-Sauerstoff ( $^1\Delta_g$ ) ist neben Hydroxylradikalen die wichtigste reaktive Sauerstoffspezies, die für Oxidationsprozesse an der DNA verantwortlich ist.<sup>[33]</sup> In lebenden Zellen entsteht  $^1O_2$ , z.B. durch Typ-II Photosensibilisierung (**Abbildung 2**) an verschiedenen, natürlich vorkommenden Farbstoffen. Lipofuscin, ein körpereigenes Pigment, das auch für die sogenannten „Altersflecken“ verantwortlich ist, bildet bei Belichten mit UV-A Licht  $^1O_2$ .<sup>[47]</sup> Einen solchen Effekt macht man sich bei der photodynamischen Tumorthherapie zunutze, indem  $^1O_2$  durch Belichten von Phthalocyaninderivaten am Ort des Tumors erzeugt wird.<sup>[48]</sup> Aber auch die Nukleotide selbst erzeugen bei Belichten mit UV-B Licht  $^1O_2$ .<sup>[49, 50]</sup> Doch es geht auch ohne elektromagnetische Strahlung. Myeloperoxidase, ein Enzym, das die Oxidation von  $Cl^-$  zu  $ClO^-$  mit Hilfe von Wasserstoffperoxid katalysiert, generiert  $^1O_2$ .<sup>[51]</sup> Ein letztes Beispiel sind Lipidperoxide, die auf vielfältige Weise zur Entstehung von  $^1O_2$  führen können.<sup>[52, 53]</sup> Die Lebensdauer von  $^1O_2$  in Zellen ist wahrscheinlich deutlich größer als bislang angenommen. Das legt die Vermutung nahe, dass dessen Bedeutung für die oxidative



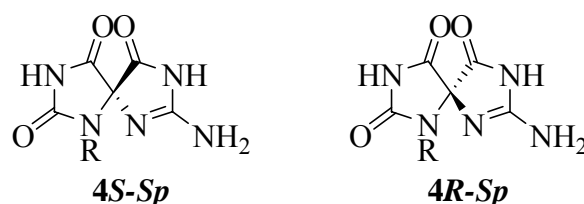
Schädigung von DNA erheblich ist.<sup>[54]</sup> Der Angriff von  $^1\text{O}_2$  an DNA findet größtenteils am Guanin oder an dessen Oxidationsprodukten statt.<sup>[55]</sup> Dabei entsteht in einer [2+4]-Cycloaddition zunächst ein cyclisches Endoperoxid **22**, das sich anschließend öffnet und 8-Hydroperoxy-2'-desoxyguanosin (8-OOH-dG, **23**) bildet (*Schema 6*).<sup>[56]</sup> Verbindung **23** reagiert weiter zum 5-Hydroxy-8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (5-OH-dOG, **25**), einem Schlüsselintermediat auf dem Weg zum Spiroiminodihydantoin (dSp, **26**) oder zum Guanidinohydantoin (dGh, **27**). Beide oxidativ erzeugten, sekundären DNA Schäden stellen jeweils die Endprodukte dieser Reaktionskaskade dar. Je nach pH-Wert des Reaktionsmediums überwiegt die Bildung von dSp **26** über den Mechanismus einer Acylverschiebung oder **25** lagert zunächst ein Molekül Wasser an und decarboxyliert anschließend zum dGh **27**. Letzteres entsteht bevorzugt bei  $\text{pH} \leq 7$ . Im Gegensatz dazu entsteht **26** unter leicht basischen Bedingungen ( $\text{pH} 8$ ) als Hauptprodukt.<sup>[57]</sup>



*Schema 6: Oxidation von dG 5 in Einzelstrang-DNA oder im Nucleosid. Das zentrale Intermediat 5-OH-dG 25 kann je nach pH-Wert des Reaktionsmediums zum dSp 26 oder zum dGh 27 reagieren. R = 2'-Desoxyguanosin*

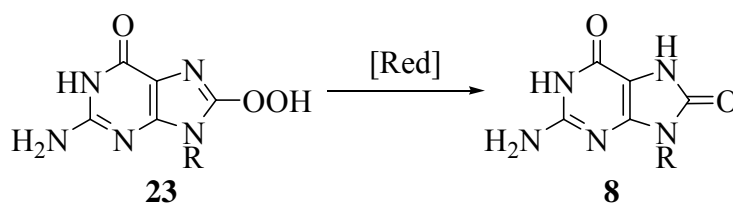
Die Struktur von dSp **26** wurde zunächst nicht richtig erkannt und man hielt diesen Schaden für ein (*R,S*)-4-Hydroxy-8-oxo-7,8-dihydroguanin.<sup>[58-60]</sup> Nachfolgende Untersuchungen konnten diesen Irrtum allerdings korrigieren.<sup>[61, 62]</sup> Die absolute Konfiguration der beiden

Diastereomere des dSp **26** konnte durch NMR Studien bestimmt werden und ist in *Abbildung 3* dargestellt.<sup>[63, 64]</sup>



*Abbildung 3: Die zwei Diastereomere von dSp 26. R = 2'-Desoxyguanosin*

Unter den hier geschilderten Reaktionsbedingungen ist dOG **8** lediglich ein Nebenprodukt,<sup>[58]</sup> das in nur sehr geringen Mengen, wahrscheinlich durch Reduktion des 8-OOH-dG **23** entsteht.<sup>[61]</sup> Diese These stützt sich auf Untersuchungen, bei denen dG **5** mit  $^1\text{O}_2$  in Gegenwart von Thiolen umgesetzt wurde. Dabei entsteht neben großen Mengen dOG **8** nur noch wenig dSp **26**. Dieser Reaktionsweg ist auch in Doppelstrang-DNA vorherrschend, denn sogar in Abwesenheit reduzierender Substanzen entsteht ausschließlich dOG **8** (*Schema 7*).<sup>[34, 55, 65]</sup>

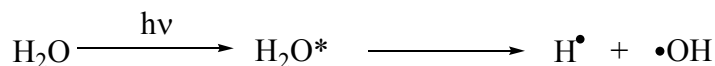
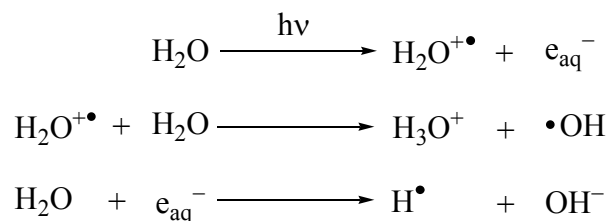


*Schema 7: In Doppelstrang-DNA dominiert die Reduktion von 23 zum dOG 8.*

*R = 2'-Desoxyguanosin*

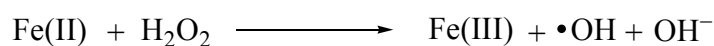
### 3.3.1.4 Reaktion von Guanin mit Hydroxylradikalen

Hydroxylradikale werden durch eine Reihe von Mechanismen gebildet.<sup>[66]</sup> Die Photolyse von Wasser durch  $\gamma$ -Strahlen liefert über zwei verschiedene Mechanismen mit hoher Quantenausbeute Hydroxylradikale (*Schema 8*). Ein einzelnes Photon eines  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlers kann ungefähr 36 000 Hydroxylradikale erzeugen.



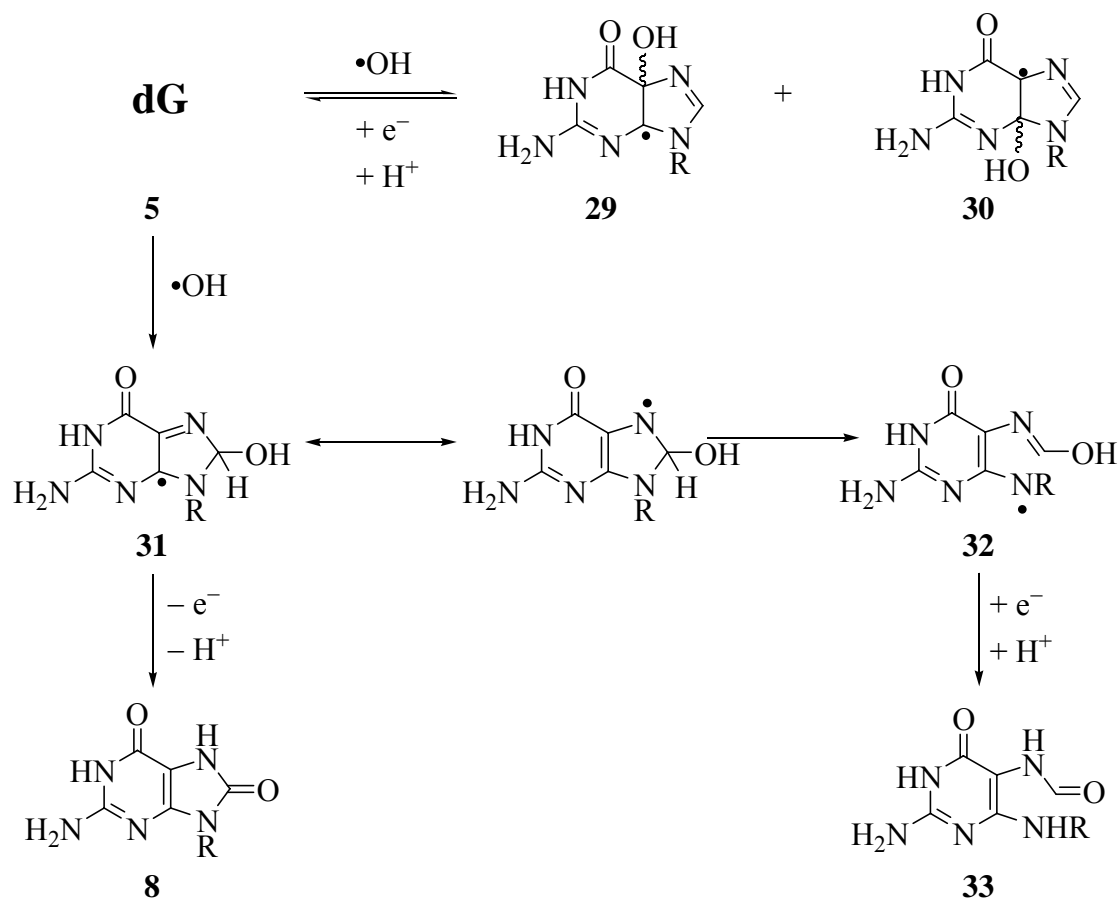
*Schema 8: Die Photolyse von Wasser mit  $\gamma$ -Strahlen liefert mit hoher Quantenausbeute Hydroxylradikale.*

Durch die Fenton-Reaktion kann Wasserstoffperoxid, das bei der Zellatmung als Nebenprodukt entsteht, in Hydroxylradikale überführt werden.<sup>[67]</sup> Große Mengen dieser gefährlichen Radikale entstehen beispielsweise beim Herzinfarkt oder Schlaganfall (**Schema 9**).<sup>[68, 69]</sup>



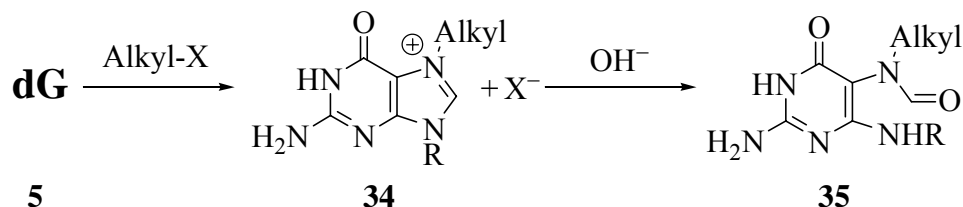
*Schema 9: Fenton-Chemie liefert Hydroxylradikale durch die Spaltung von Wasserstoffperoxid*

Guanin kann auf vielfältige Weise mit Hydroxylradikalen reagieren und wird hauptsächlich an den Positionen C4, C5 und C8 angegriffen.<sup>[22, 66, 70]</sup> Die so entstehenden Radikale **29** und **30** eliminieren Wasser und reagieren nach Elektronen- und Protonenaufnahme zurück zum Ausgangsprodukt. Das C8-OH-Radikal **31** kann entweder durch Einelektronenoxidation und Protonenverlust zum dOG **8**, oder unter Reduktion und Protonenaufnahme zum Formamidopyrimidin-2'-desoxyguanosin (FaPydG, **33**) reagieren (**Schema 10**).<sup>[66, 71]</sup>



Schema 10: Die Reaktion von dG 5 mit Hydroxylradikalen liefert je nach Reaktionsbedingungen dOG 8 oder FaPydG 33. R = 2'-Desoxyguanosin

FaPydG Derivate können noch über einen weiteren Reaktionsweg entstehen. Ein starkes Elektrophil wie beispielsweise Aflatoxin B1 (siehe Kapitel 3.2) kann Guanin an der N7 Position angreifen und in das Kation 34 überführen. Dieses wird dann unter Addition von formal  $\text{OH}^-$  in das entsprechende Alkyl-FaPydG Derivat 35 überführt (Schema 11).<sup>[14, 72, 73]</sup>



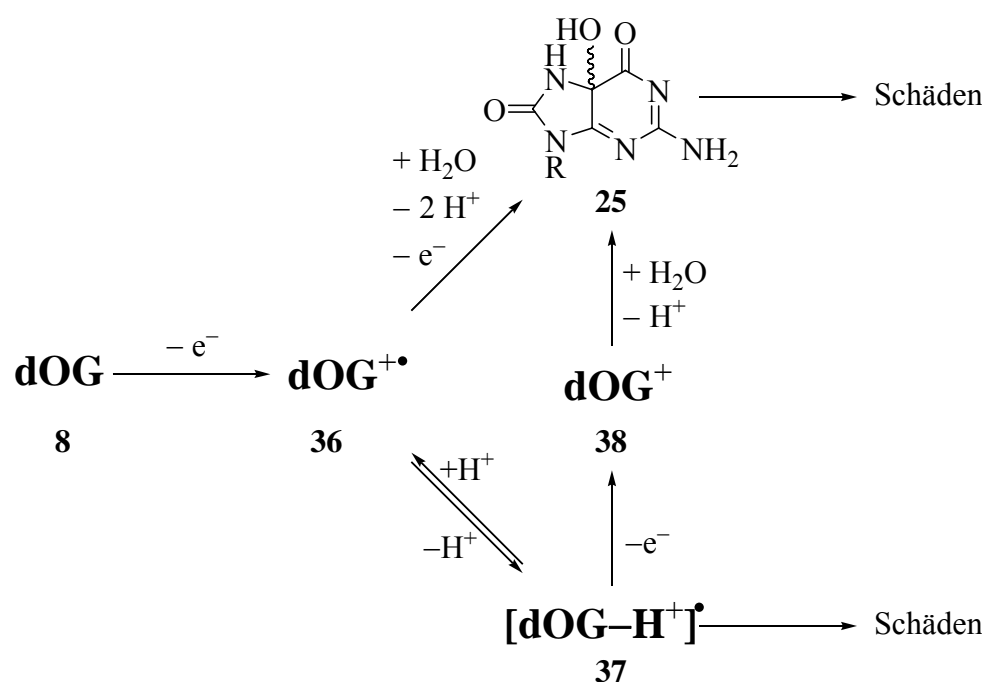
Schema 11: Alkylierende Elektrophile greifen Guanin am N7 an und können anschließend zum Alkyl-FaPydG Derivat 35 reagieren. R = DNA

### 3.3.2 Oxidationsreaktionen am 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (dOG)

Das Oxidationspotential von dOG **8** ist mit  $E^{\circ}_{\text{NHE}} = 0.74 \text{ V}$  deutlich niedriger als das von dG **5**.<sup>[74]</sup> Damit ist dOG **8** eine effektive „Kationenfalle“ und bevorzugtes Ziel oxidativer Angriffe, wobei aus dem primären DNA-Schaden dOG **8** weitere, sekundäre Schäden hervorgehen.

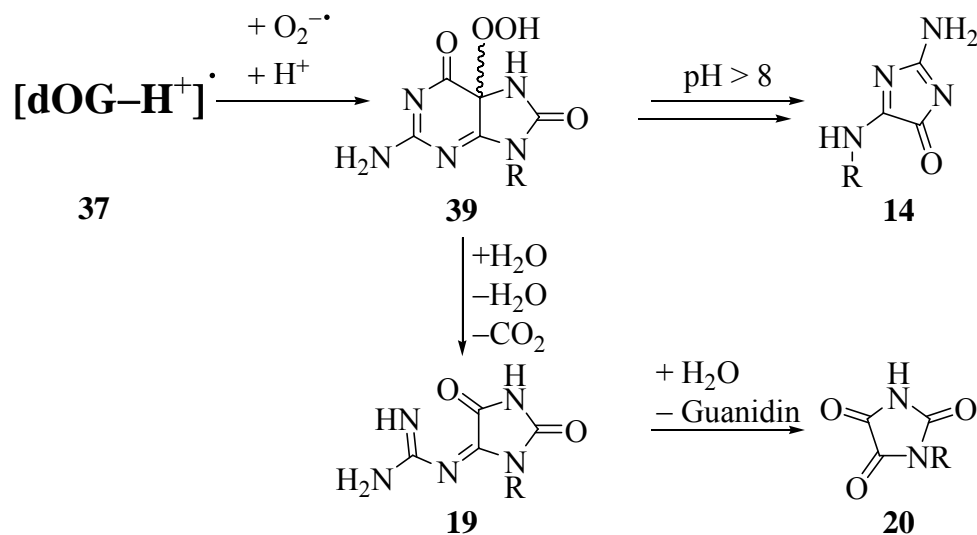
#### 3.3.2.1 Einelektronenoxidation von 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (dOG)

Analog zur Einelektronenoxidation von dG **5** führt die Abstraktion eines Elektrons von dOG **8** zum entsprechenden Radikalkation  $\text{OG}^{+\bullet}$  **36**, das im Gleichgewicht mit dem deprotonierten Radikal  $[\text{dOG}-\text{H}^{\bullet}]^+$  **37** steht. Der  $\text{pK}_a$ -Wert von  $\text{dOG}^{+\bullet}$  **36** beträgt 6.6. Die Reaktion von  $\text{OG}^{+\bullet}$  **36** mit einem Molekül Wasser führt zum bekannten Intermediat 5-OH-dOG **25**, das bereits in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben wurde und auch unter diesen Bedingungen entsteht. Das deprotonierte Radikal  $[\text{dOG}-\text{H}^{\bullet}]^+$  **37** kann entweder erneut ein Elektron verlieren und damit ebenfalls zu 5-OH-dOG **25** reagieren oder es wird von anderen Radikalen aus dem Reaktionsmedium abgefangen und zu weiteren DNA-Schäden abgebaut (*Schema 12*).<sup>[24]</sup>



*Schema 12: Die Einelektronenoxidation von dOG **8** verläuft ähnlich derjenigen von dG **5**. Das zunächst gebildete Kationradikal **36** wird entweder zum Neutralradikal **37** deprotoniert oder es reagiert mit Wasser zum bereits bekannten 5-OH-dOG **25**. R = 2'-Desoxyguanosin*

Welcher der beiden Pfade dominiert, hängt hauptsächlich vom verwendeten Eielektronenoxidans ab. Handelt es sich um eine Photooxidation, so dominiert der Weg über das Neutralradikal **37** (*Schema 13*). Wird dagegen z.B. ein „chemisches“ Reagenz, etwa Natriumhexachloroiridat(IV) verwendet, so verläuft die Oxidation hauptsächlich über das Intermediat **25**. Bei der Typ-I Photooxidation von dOG **8** entsteht hauptsächlich das neutrale Radikal  $[dOG-H^+]\cdot$  **37**.<sup>[75]</sup> Es wird von Superoxidradikalanionen  $O_2^{\cdot-}$  abgefangen und reagiert zu 5-Hydroperoxy-8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin 5-OOH-dOG **39**, das dem 5-OOH-dG **10** ähnelt und vermutlich nach einem ganz ähnlichen Mechanismus zum dIz **14** reagiert, wenn der pH-Wert des Reaktionsmediums über 8 liegt. Ist das nicht der Fall, dann bildet sich aus **39** unter Decarboxylierung hauptsächlich dDGh **19**, das seinerseits zu dPa **20** und dOa **21** abgebaut wird (*Schema 13*).<sup>[76]</sup> Superoxidradikalanionen werden unter den hier beschriebenen Bedingungen erzeugt, weil das angeregte Triplett-Riboflavin das vom Guanin abstrahierte Elektron anschließend auf ein Sauerstoffmolekül überträgt.<sup>[24]</sup>



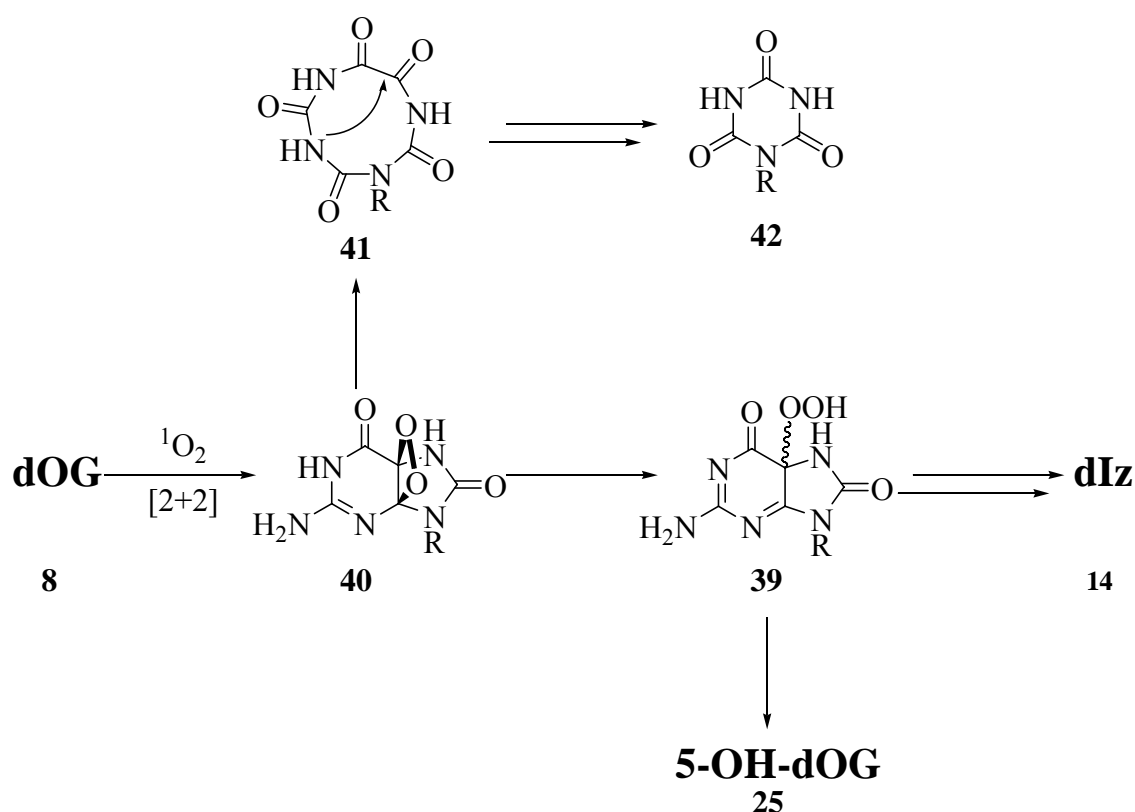
*Schema 13: Bei der Typ-I Photooxidation von dOG **8** entsteht aus dem intermediären Neutralradikal  $[dOG-H^+]\cdot$  **37** nach Addition von Superoxidradikalanionen ein 5-OOH-dOG **39**. Dieses kann je nach Reaktionsbedingungen entweder zum dIz **14** oder zum dDGh **19** und dessen weiteren Zerfallsprodukten reagieren. R = 2'-Desoxyguanosin*

Bei der Eielektronenoxidation von dOG **8** mit hochvalenten Metallionen wie Natriumhexachloroiridat(IV) dominiert der Reaktionsweg über das Intermediat 5-OH-dOG **25**. Wie bereits in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben, reagiert dieses entweder zu dSp **26** oder zu dGh **27**, je nach pH-Wert und Temperatur des Reaktionsmediums (*Schema 6*). Letzteres wird in Doppelstrang-DNA bevorzugt gebildet. Natriumhexachloroiridat(IV) ( $Na_2IrCl_6$ ) reagiert als

Einelektronenoxidans sehr spezifisch mit dOG **8**, da dessen Redoxpotential genau zwischen dem von dOG **8** und dG **5** liegt ( $\text{Ir}^{\text{IV}}\text{Cl}_6^{2-}/\text{Ir}^{\text{III}}\text{Cl}_6^{3-}$ :  $E^\circ_{\text{NHE}} = 0.86 \text{ V}$ ).<sup>[77-79]</sup>

### 3.3.2.2 Die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (dOG)

dOG **8** ist gegenüber Singulett-Sauerstoff um den Faktor 100 reaktiver als dG **5**.<sup>[58, 80]</sup> Im ersten Schritt der Reaktion bildet sich ein Dioxetan als Mischung zweier Diastereomere durch eine [2+2] Cycloaddition des  $^1\text{O}_2$  an die C4-C5 Doppelbindung.<sup>[81]</sup> Von hier an gibt es zwei Möglichkeiten für den Abbau dieses Intermediats: Entweder über eine 1,2-Bindungsspaltung des Dioxetans, die zu einem neungliedrigen cyclischen Intermediat führt und das nach intramolekularer Cyclisierung und nachfolgender Hydrolyse zur Cyanursäure (dCa, **43**) wird, oder über eine Öffnung des Dioxetans, das zum 5-OOH-dOG **39** und damit analog zu *Schema 13* zum dIz **14** zerfällt. Unter geeigneten Bedingungen kann das 5-OOH-dOG **39** sogar zum 5-OH-dOG **25** reduziert werden und so zu dSp **26** und dGh **27** reagieren (*Schema 14*).<sup>[82]</sup>



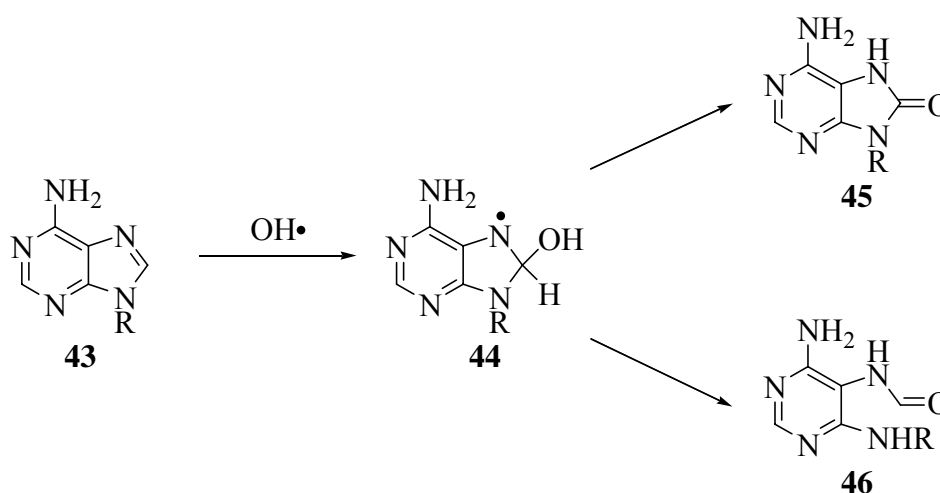
*Schema 14: Die Oxidation von dOG **8** mit  $^1\text{O}_2$  führt hauptsächlich zur Bildung von dCa **48** oder dIz **14**. Die Reduktion von **39** zu **25** ist ebenfalls möglich und führt zu dSp **26**, bzw. dGh **27** als Endprodukte.  $R = 2'$ -Desoxyguanosin*

In Einzelstrang-DNA entsteht ebenfalls intermediär das 5-OOH-dOG **39**. Dieses zerfällt jedoch unter Öffnung des Pyrimidinrings der Purinbase und Bildung von dDGh **19**, das anschließend zu dPa **20** und schließlich zu dOa **21** hydrolysiert (*Schema 13*).<sup>[83, 84]</sup> Setzt man zelluläre DNA der Einwirkung von  $^1\text{O}_2$  aus, so entsteht als Hauptprodukt dOG **8**. Unabhängig davon, ob das  $^1\text{O}_2$  chemisch durch thermische Zersetzung von Naphthalenendoperoxid<sup>[85]</sup> oder photochemisch durch Belichten in Gegenwart von Methyleneblau erzeugt wird, entstehen keine alkalilabilen Stellen und keine oder kaum DNA-Strangbrüche.<sup>[86, 87]</sup>

### 3.3.3 Oxidationsreaktionen an anderen Basen

#### 3.3.3.1 Oxidationsreaktionen am Adenin

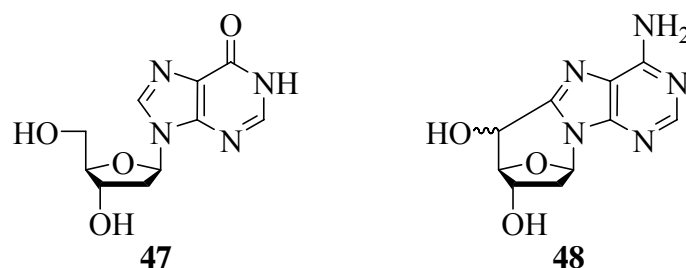
Die Anzahl der Schäden, die auf die Oxidation von Adenin zurückzuführen sind, ist deutlich geringer als beim Guanin, was auf das höhere Redoxpotential von Adenin zurückzuführen ist (siehe Kapitel 1.3).<sup>[18, 70]</sup> Über die Mechanismen der Schadensentstehung ist wenig bekannt. Man weiß, dass bei der Einwirkung von Hydroxylradikalen auf dA **43** in wässriger Lösung zunächst ein 8-Hydroxy-2'-desoxyadenosinradikal (8-OH-dA $\cdot$ , **44**) entsteht, das anschließend entweder zu 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyadenosin (dOA, **45**) oder 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin-2'-desoxyadenosin (FaPydA, **46**), den zwei häufigsten oxidativ erzeugten Adeninschäden, reagiert (*Schema 15*).<sup>[88]</sup>



*Schema 15: Die zwei Hauptprodukte bei der Oxidation von dA **43** mit Hydroxylradikalen sind dOA **45** und FaPydA **46**.*



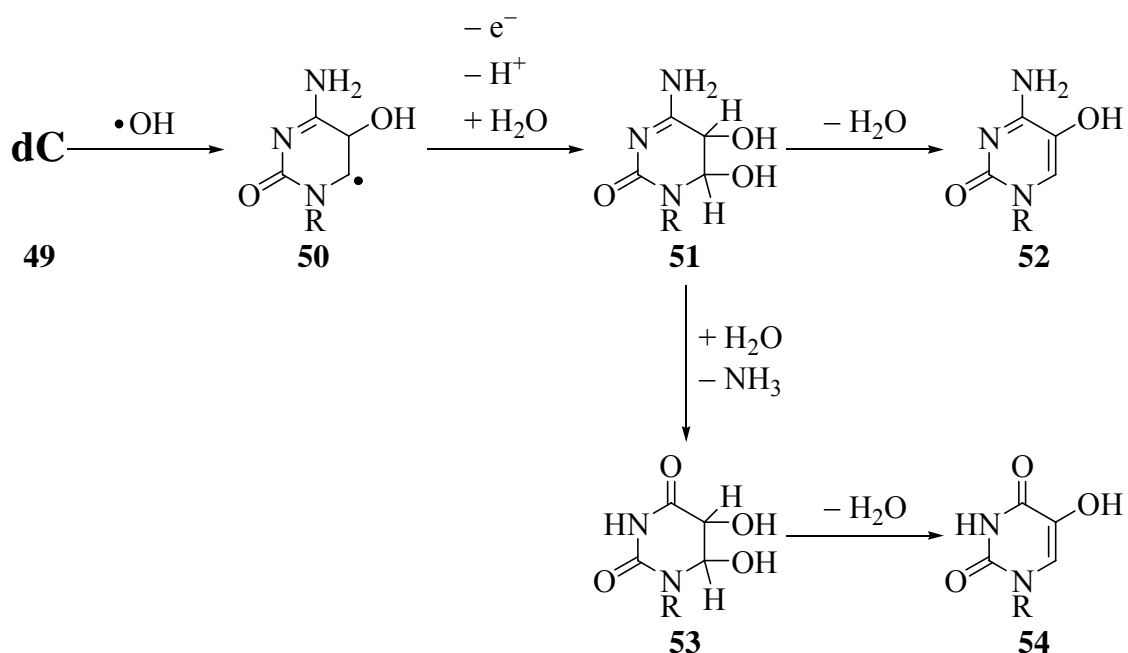
Unter ähnlichen Bedingungen, d.h. bei der Einwirkung von  $\gamma$ -Strahlen auf dA **43** oder 2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat in wässriger Lösung unter anaeroben Bedingungen, entsteht 5',8-Cyclo-2'-desoxyadenosin (dCA, **48**) bzw. dessen 5'-Monophosphat (*Abbildung 4*).<sup>[89]</sup> Obwohl 2-Hydroxy-2'-desoxyadenosin bei der Oxidation von dA **43** mit  $\gamma$ -Strahlen lediglich ein Nebenprodukt darstellt, wird es unter den Bedingungen der Fenton-Chemie ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}$ ) als Hauptprodukt gebildet (nicht abgebildet).<sup>[90, 91]</sup> Ein weiterer Schaden, der durch Typ-I Photooxidation von dA **43** entsteht ist das Desaminierungsprodukt 2'-Desoxyinosin (dI, **47**) (*Abbildung 4*).<sup>[88]</sup> Obwohl dOA **45** ein niedrigeres Oxidationspotential ( $E^\circ_{\text{NHE}} = 0.92 \text{ V}$ ) aufweist als dA **43**,<sup>[92]</sup> sind bislang keine Schäden bekannt, die auf eine Weiteroxidation von dOA **45** zurückzuführen wären.



*Abbildung 4: 2'-Desoxyinosin **47** und 5',8'-Cyclo-2'-desoxyadenosin **48**.*

### 3.3.3.2 Oxidationen am Cytosin

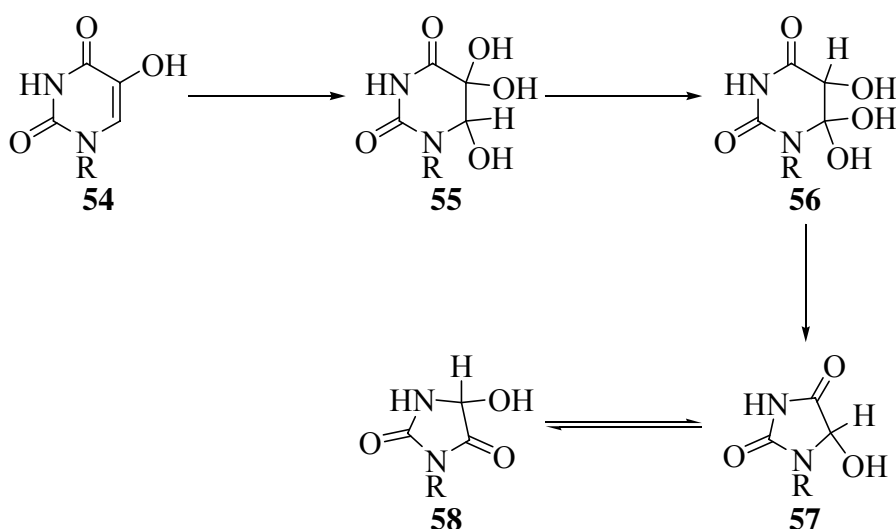
Auch die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymidin sind oxidativen Schädigungen ausgesetzt.<sup>[18, 70]</sup> Cytosin hat gegenüber Guanin ein deutlich höheres Redoxpotential (Kapitel 3.3.1).<sup>[93]</sup> Dennoch entstehen überraschend viele Schäden durch die Oxidation von Cytosin. Bei der Reaktion von 2'-Desoxycytosin mit  $\text{KMnO}_4$ , mit Typ-I Photosensibilisatoren oder mit Hydroxylradikalen, entstehen neben 5-Hydroxy-2'-desoxycytosin (5-OH-dC, **52**) und 5-Hydroxy-2'-desoxyuracil (5-OH-dU, **54**) eine Vielzahl weiterer Reaktionsprodukte (*Schema 16*).<sup>[94, 95]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass Hydroxylradikale an die C5-C6-Doppelbindung unter Bildung von **50** addieren.<sup>[96]</sup> Dieses reagiert anschließend zu Cytosinglycol **51**, das entweder direkt ein Molekül Wasser abspaltet und 5-OH-dC **52** bildet oder zunächst desaminiert und danach zum 5-OH-dU **54** dehydratisiert. Die Sättigung der C5-C6-Doppelbindung beschleunigt die Hydrolyse der C4-Carbonylgruppe, was den hohen Anteil an Uracilderivaten in der Reaktionsmischung erklärt (*Schema 16*).<sup>[66]</sup>



Schema 16: Bei der Addition von Hydroxylradikalen an die C5-C6-Doppelbindung von dC **49** bildet sich zunächst Cytosinglycol **51**, das anschließend entweder direkt zum 5-OH-dC **52** hydrolysiert oder zunächst desaminiert und danach hydrolysiert, wobei sich 5-OH-dU **54** als Endprodukt entsteht.

Bei der Behandlung von zellulärer DNA mit  $\gamma$ -Strahlen oder den Bedingungen der Fenton-Chemie ist die Menge an entstandenem 5-OH-dC **52** vergleichbar mit der Menge von entstandenem dOG **8**.<sup>[97]</sup> Weiterhin kann, nebst einer Vielzahl weiterer Schäden, die Bildung von 5-OH-dU **54** beobachtet werden, wenn Doppelstrang-DNA mit  $\text{OsO}_4$  umgesetzt wird.<sup>[98]</sup> Nur von geschätzten 25 % der durch Bestrahlung von zellulärer DNA mit  $\gamma$ -Strahlen aus dC **49** entstandenen Schäden ist die Struktur bekannt.<sup>[95]</sup>

Das Redoxpotential von 5-OH-dU **54** ist niedriger als das von dC **49** und der Schaden damit Ausgangsprodukt für weitere Oxidationsprodukte.<sup>[70]</sup> Die Reaktion von 5-OH-dU **54** mit Einelektronenoxidationen wie  $\text{NaIrBr}_6$  oder Typ-I Photosensibilisatoren erzeugt eine Reihe weiterer Schäden wie Isodialursäure (Idia, **55**), 5-Hydroxy-hydantoin **57** und Iso-4-hydroxy-hydantoin **58** (Schema 17), die sowohl in isolierter als auch in zellulärer DNA nachweisbar sind.<sup>[98-102]</sup>

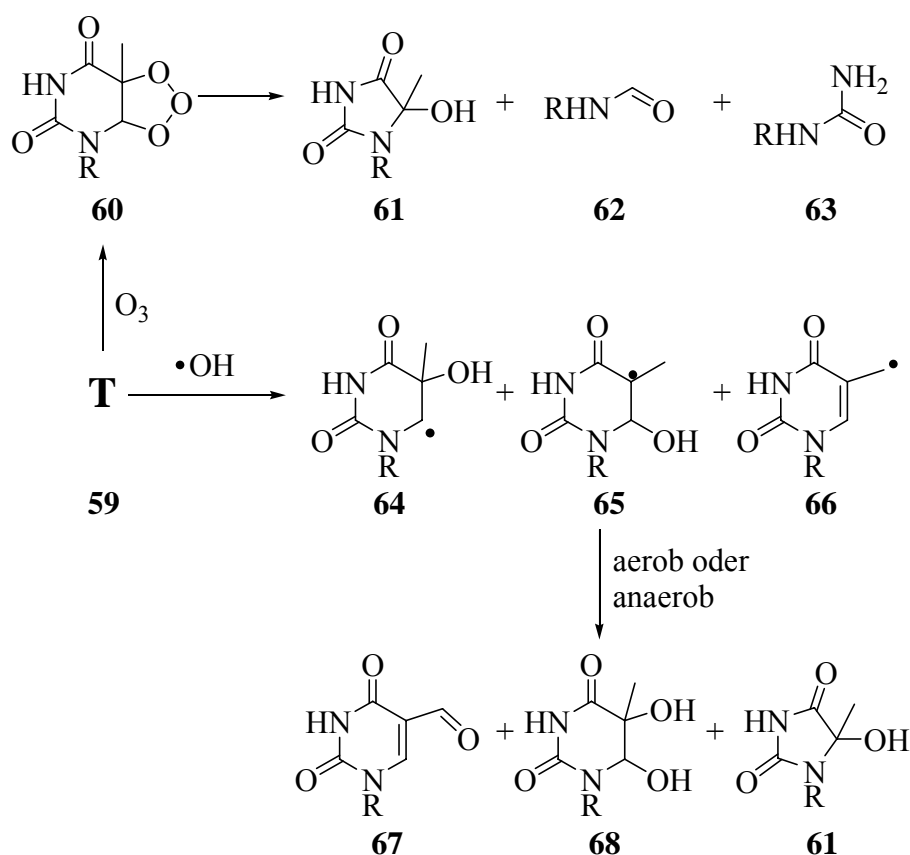


Schema 17: 5-OH-dU **54** hat ein niedrigeres Redoxpotential als dC **49** und wird daher leicht weiter oxidiert. Bei der Einelektronenoxidation von **54** entsteht intermediär Isodialursäure **55**, die schließlich zu 5-OH-Hyd **57** und Iso-4-OH-Hyd **58** reagiert.

### 3.3.3.3 Oxidationen am Thymin

Neben den bekannten Photoschäden geht eine Reihe von oxidativ erzeugten Schäden auf das Thymin zurück. Ähnlich dem Cytosin reagiert die C5-C6-Doppelbindung des Thymins **59** bereitwillig mit Ozon, verschiedenen Peroxyverbindungen, Hydroxylradikalen und Typ-I Photosensibilisatoren.<sup>[18, 66, 70]</sup>

Bei der Reaktion von T **59** mit Ozon entsteht zunächst ein Primärozonid **60**, der über eine Ringöffnung zu einer Vielzahl von Produkten weiterreagiert (Schema 18).<sup>[103]</sup>



Schema 18: Die Reaktion von T **59** mit Ozon führt über eine 1,3-dipolare Cycloaddition und Primärozonid **60** zu einer Vielzahl von Produkten, von denen einige hier abgebildet sind: 5-Hydroxy-5-methyl-hydantoin **61**, 2'-Desoxyriboseylformamid **62**, 2'-Desoxyriboseylharnstoff **63**. Bei der Reaktion von T **59** mit Hydroxylradikalen entstehen zunächst die Radikale **64**, **65** und **66**, die dann zu weiteren Schäden reagieren: 5-Formyl-uridin **67**, Thyminglycol **68** und **61**. Die Produktverteilung hängt dabei hauptsächlich von der Gegenwart oder Abwesenheit von Luftsauerstoff ab.

Hydroxylradikale reagieren mit Thymin ebenfalls unter Addition an die C5-C6-Doppelbindung.<sup>[104]</sup> Dabei entstehen zunächst die Radikale **64**, **65** und **66** (Schema 18), die anschließend zu einer Reihe von Schäden weiterreagieren. Die Entstehung der jeweiligen Produkte und vor allem deren Verteilung hängen von der Gegenwart oder der Abwesenheit von Luftsauerstoff ab.<sup>[66]</sup>

### 3.4 Replikation und Mutagenität oxidativer geschädigter Guaninbasen

#### 3.4.1 In vitro Eigenschaften oxidativ erzeugter dG-Schäden

Die meisten der oxidativ erzeugten DNA-Schäden paaren im Vergleich zum Guanin mit anderen Basen als dC. Dies führt zu Punktmutationen, sobald eine Polymerase gegenüber einer geschädigten Base ein Nukleotid einbaut. Die nachfolgenden Ausführungen konzentrieren sich auf die Basenpaarungseigenschaften der für diese Arbeit relevanten oxidativ erzeugten DNA Schäden.

Der wichtigste Schaden, das dOG **8**, kann zwei verschiedene Konformationen einnehmen, die als *syn*- oder *anti*-Konformation bezeichnet werden (**Abbildung 5**). Liegt dOG **8** in der *anti*-Konformation vor, so formt es, genau wie Guanin, mit Cytosin ein nicht-mutagenes *Watson-Crick* Basenpaar.<sup>[105]</sup> Tatsächlich aber ist die *syn*-Konformation, bei der die Base um 180 ° um die glykosidische Bindung verdreht ist, im freien dOG **8** das energetische Minimum.<sup>[105, 106]</sup> In der *syn*-Konformation präsentiert die Base das O6 und das N7H der gegenüberliegenden Base für Wasserstoffbrückenbildung. Dieser Paarungsmodus wird *Hoogsteen-Paarung* genannt.<sup>[107]</sup> Eine Kristallstruktur des OG:A Basenpaares in DNA ist bereits 1994 aufgenommen worden.<sup>[108]</sup>

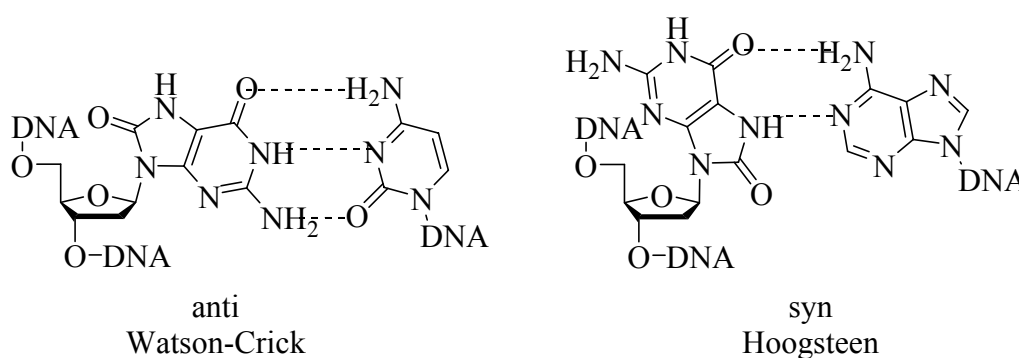


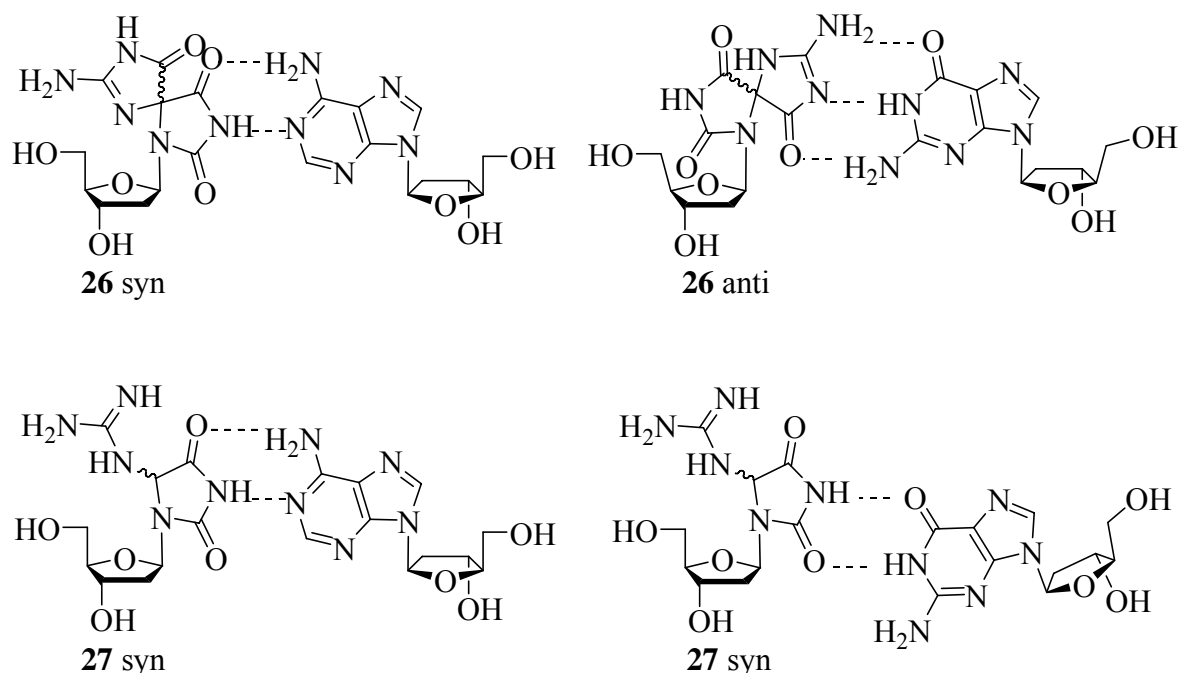
Abbildung 5: Vergleich der Watson-Crick Basenpaarung von *syn*-dOG gegenüber dA mit der Hoogsteen Basenpaarung von *anti*-dOG gegenüber dC.

Befindet sich dOG **8** während der DNA Replikation im Templatstrang, so steuert es die Insertion sowohl von dCTP als auch von dATP durch die jeweilige Polymerase.<sup>[109-111]</sup> T7-DNA-Polymerase baut bevorzugt dCTP gegenüber dOG ein, dATP wird nur wenig

effizient eingebaut.<sup>[112]</sup> *B. stearotherophilus* Polymerase I hingegen inseriert bevorzugt dATP gegenüber OG. Das OG:A-Basenpaar imitiert in der aktiven Tasche des Enzyms ein A:T-Basenpaar und das eigentlich gesunde OG:C-Basenpaar wird von dem Enzym als *mismatch* erkannt. Dies führt zu leicht erhöhtem Einbau von dATP gegenüber dCTP.<sup>[111]</sup>

Die zwei Diastereomere von dSp **26** sollten Rechnungen zufolge jeweils unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungen eingehen und in mehreren, energetisch sehr ähnlichen tautomeren Formen vorliegen.<sup>[113]</sup> Basierend auf vorherigen Beobachtungen haben *Kino* und *Sugiyama* eine Basenpaarung der Iminoform von dSp mit dG vorgeschlagen.<sup>[114]</sup> Auch eine Basenpaarung der *syn*-Konformation mit dA erscheint möglich (**Abbildung 6**).<sup>[115]</sup>

Auch dGh **27** kann mit dG ein durch Wasserstoffbrücken vermitteltes Basenpaar bilden, dabei liegt dGh **27** in der *syn*-Konformation vor und imitiert ein T, verhält sich somit wie ein T:dG-Wobble-Basenpaar.<sup>[115, 116]</sup> Allerdings erscheint auch ein Gh:A-Basenpaar mit dGh **27** ebenfalls in *syn* möglich (**Abbildung 6**).<sup>[115] [114]</sup>



**Abbildung 6:** dSp **26** und dGh **27** können, ähnlich wie dOG **8** sowohl in *syn*- als auch in *anti*-Konformation Basenpaarungen eingehen.

dSp **26** und dGh **27** hemmen die DNA Replikation sehr stark. Klenow-Fragment (Kf) und Klenow-Fragment  $\text{exo}^-$  bauen unter *standing-start*-Bedingungen in Gegenwart aller vier dNTPs dATP und dGTP gegenüber dGh **27** und dSp **26** ein, was zu G→T, bzw. G→C

Mutationen führt.<sup>[79, 117]</sup> Allerdings wird unter diesen Bedingungen der Primer nicht vollständig verlängert. Unter anderen Sequenzbedingungen wird nur dATP eingebaut und der Primer wird nicht weiter verlängert.<sup>[118]</sup>

Ab initio Rechnungen zeigen, dass dIz **14** Cytosin imitiert und dass die Basenpaarung von dIz **14** mit Guanin ähnlich stabil ist wie die von Cytosin mit Guanin.<sup>[119]</sup> Die Oxidation von Guanin zu dIz **14** kann demnach zu G→C Mutationen führen. Tatsächlich wird von DNA-Polymerase I gegenüber dIz **14** ein dG eingebaut, die Elongation des Primers verläuft aber insgesamt ineffizient.

Klenow-Fragment  $\text{exo}^-$  baut in Gegenwart aller vier Desoxynukleotide dATP gegenüber dZ **15** ein, jedoch ist nur eine kleine Menge des vollständig elongierten Primers zu beobachten. DNA-Polymerase  $\beta$  dagegen wird vollständig blockiert, wohingegen Taq-Polymerase neben dATP auch noch dCTP und dGTP einbaut, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß.<sup>[120]</sup>

Im Fall von dCa **43** wird von Klenow-Fragment  $\text{exo}^-$  dATP eingebaut und der Primer vollständig verlängert.<sup>[121]</sup> Gleiches geschieht auch, wenn sich dOa **21** im Templat befindet.<sup>[122]</sup>

### **3.4.2 *In vivo* Eigenschaften oxidativ erzeugter Guaninschäden**

Bei weitem nicht alle der eingangs beschriebenen oxidativ erzeugten Guaninschäden wurden bislang in lebenden Zellen gefunden. Messungen haben ergeben, dass etwa 0.3 bis 4 dOG Schäden pro  $10^6$  Nukleobasen in humanen Lymphozyten auftreten.<sup>[123, 124]</sup> Da dieser Schaden deutlich leichter zu oxidieren ist als Guanin erscheint es naheliegend, dass viele der in isolierter DNA gefundenen sekundären Schäden auch in lebenden Zellen gebildet werden. Ein Beispiel ist dSp **26**, das kürzlich in  $\text{Nei}^- E. coli$  gefunden werden konnte.<sup>[125]</sup> Ein weiteres Beispiel ist dZ **15**, das im Lebergewebe diabetischer Ratten nachgewiesen wurde.<sup>[126]</sup>

Die *in vivo bypass*-Effizienz und die Mutationsfrequenz verschiedener Schäden ist, im Vergleich zu Guanin, in **Tabelle 3** zusammengefasst.<sup>[127]</sup> Es fällt auf, dass, im Vergleich zu allen anderen Schäden, beide Diastereomere von dSp **26** eine sehr schlechte *bypass* Effizienz aufweisen. Weiterhin wird deutlich, dass die Mutationsrate von dOG **8**, dem quantitativ wichtigsten oxidativ erzeugten DNA-Schaden, deutlich kleiner ist, als bei den anderen hier aufgelisteten Schäden. Die gezeigten Daten gelten für SOS defiziente Zellen.

Tabelle 3: Die *in vivo* bypass-Effizienz der verschiedenen oxidativen Schäden (in %) in *E. coli* (SOS<sup>-</sup>). Guanin entspricht 100 %.<sup>[127]</sup>

Eigenschaft	dOG	dIz	dZ	dGh	(4S*)dSp	(4R*)dSp	dCa	dOa
Bypass	~88	60±5	57±13	75±5	9±3	9±4	65±8	51±3
G→T	7	1	86	1.4	27	41	97	99
G→C	<1	88	<1	98	72	57	<1	<1
G→A	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1

### 3.5 Reparatur oxidativ erzeugter DNA-Schäden

Oxidative Schäden werden in der Regel über den *base excision repair* (BER) Weg repariert.<sup>[128]</sup> DNA Glycosylasen erkennen und entfernen die jeweiligen Schäden aus der DNA, indem sie die *N*-glycosidische Bindung zwischen 2-Desoxyribose und geschädigter Nucleobase spalten. Bifunktionelle Glycosylasen erzeugen nachfolgend über eine  $\beta$ - und  $\delta$ -Eliminierung einen Einzelstrangbruch an der Stelle der geschädigten Base, der im Anschluss durch entsprechende DNA Polymerasen wieder geschlossen wird. Dabei unterscheidet man zwischen zwei Reparaturwegen, dem *short-patch* und dem *long-patch* Reparaturweg (**Abbildung 7**).<sup>[12]</sup> Eine DNA Glycosylase entfernt zunächst die geschädigte Base und hinterlässt, sofern es sich um eine monofunktionelle Glycosylase handelt, die Ribose. Die 5'-Phosphatbindung wird anschließend von APE1 hydrolysiert und der Einzelstrang damit gespalten. Im Falle des bedeutenderen *short-patch*-Reparaturweges wird die entstandene Lücke von Polymerase  $\beta$  mit einem Nucleotid aufgefüllt und dann die abasische Stelle durch dessen AP-Lyasefunktion entfernt. DNA Ligase III verschließt zuletzt den Strangbruch.



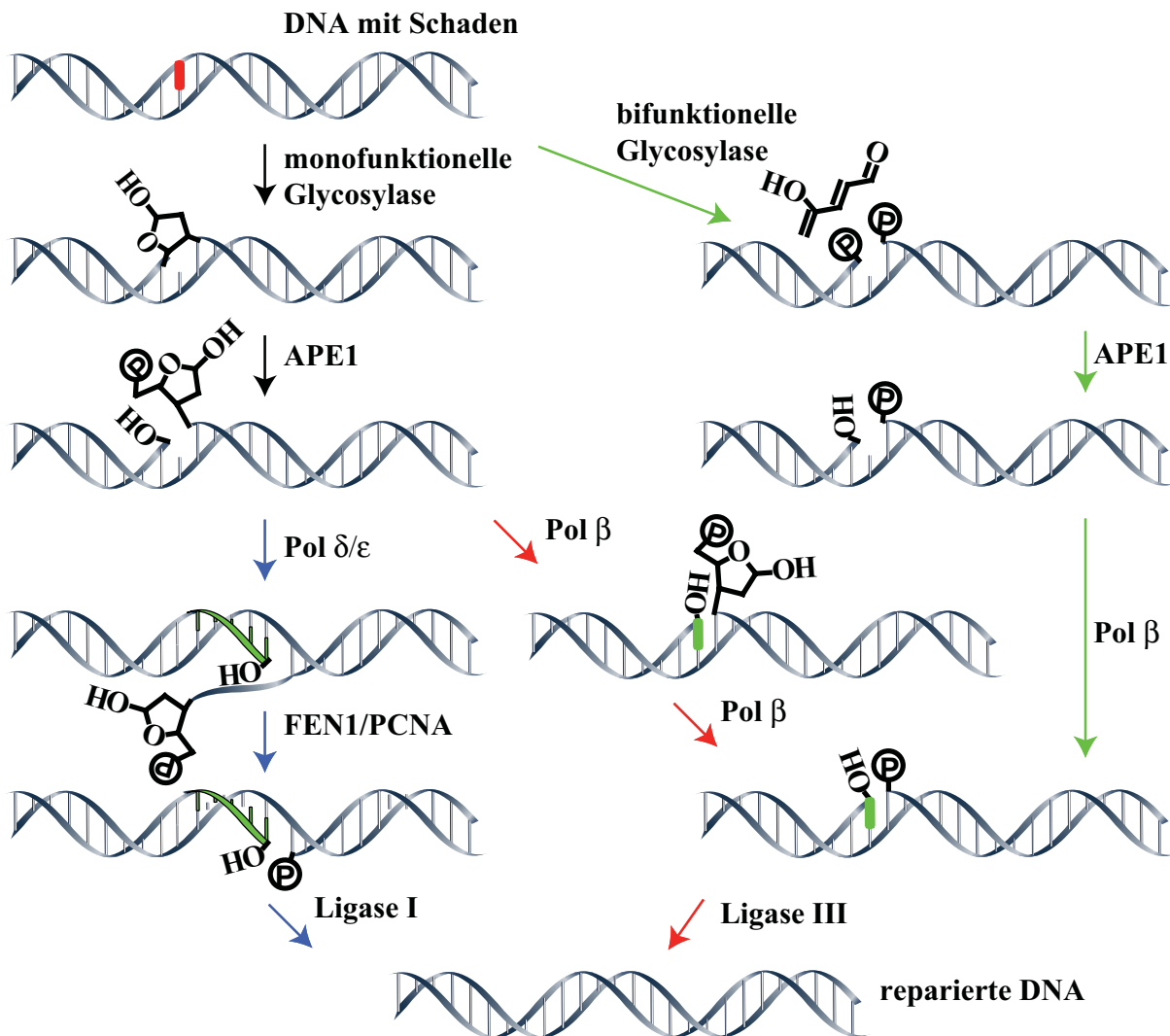


Abbildung 7: Eukaryotische long-patch (blaue Pfeile) und short-patch (rote Pfeile) BER, bifunktionelle Glycosylasen (grüne Pfeile).

Handelt es sich um eine bifunktionelle Glycosylase, so wird nach dem Entfernen der geschädigten Base zusätzlich über  $\beta$ - und  $\delta$ -Eliminierung die Ribose abgespalten. APE1, Polymerase- $\beta$  und DNA Ligase III vervollständigen die Reparatur. Im Unterschied dazu wird beim *long-patch* Reparaturweg ein neues Stück von zwei bis sechs Nucleotiden durch Polymerase  $\delta/\epsilon$  eingesetzt und der Überhang von der Endonuklease FEN1 abgetrennt. DNA Ligase I schließt zuletzt die Lücke.<sup>[12, 129]</sup>

Die Bedeutung der BER bei der Entstehung und Prävention von Lungenkrebs beim Menschen konnte kürzlich gezeigt werden. So ist die individuelle Aktivität der humanen Glycosylase OGG (siehe Kapitel 3.5.1) bei Patienten mit Tumoren der Epithelzellen im Hals- und Kopfbereich gegenüber der OGG Aktivität bei gesunden Menschen deutlich reduziert.<sup>[130]</sup>

### 3.5.1 DNA-Glycosylasen

Die verschiedenen DNA-Glycosylasen lassen sich drei verschiedenen Superfamilien zuordnen, der UDG-, der HhH- und der FPG/Nei-Superfamilie. Bei einer Superfamilie handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die nachweisbar von einem gemeinsamen „Vorfahren“ abstammen, unabhängig davon, wie groß die Sequenzübereinstimmung ist.<sup>[131, 132]</sup> Die Uracil-DNA-Glycosylasen (UDG) sind eine Superfamilie von monofunktionellen BER-Enzymen, die in Viren, Prokaryoten und Eukaryoten vorkommen.<sup>[133]</sup> Sie entfernen hauptsächlich Uracil und G:T Fehlpaarungen. In der Helix-hairpin-helix (HhH) Superfamilie sind sowohl monofunktionelle als auch bifunktionelle Glycosylasen zusammengefasst. Das bakterielle MutY,<sup>[134]</sup> das Adenin aus einer OG:A Fehlpaarung entfernt, und AlkA,<sup>[135]</sup> das 3-Methyladenin entfernt, sind Beispiele für monofunktionelle Glycosylasen. Die eukaryotischen OGG-Glycosylasen (8-Oxo-Guanin Glycosylase) sind bifunktionelle Vertreter dieser Superfamilie.<sup>[136, 137]</sup> Zu den Glycosylasen der FPG/Nei-Superfamilie zählen unter anderem das bakterielle MutM/FPG (siehe nächstes Kapitel) und die eukaryotischen NEIL (Nei like) Proteine.<sup>[138]</sup>

### 3.5.2 Formamidopyrimidin DNA-Glycosylase (MutM/FPG)

MutM/FPG bildet zusammen mit MutY (s.o.) und MutT (entfernt dOGTP) das als „GO“-System bekannte bakterielle Schutzsystem gegen genotoxische Effekte von OG.<sup>[139]</sup> FPG wurde zuerst aus *E. coli* isoliert und charakterisiert als Glycosylase, die *N*<sup>7</sup>-Me-FaPydG entfernt.<sup>[140]</sup> Zusätzlich zur Abspaltung der Schadensbase katalysiert FPG als bifunktionelle Glycosylase die Eliminierung der  $\beta$ - und  $\delta$ -Protonen der Ribose und damit die Spaltung der 3'- und 5'-Phosphodiesterbindungen der abasischen Stelle (AP-Lyasefunktion). Substrate von FPG sind neben den Formamidopyrimidin Derivaten der Purine (FaPydG, *N*<sup>7</sup>-Me-FaPydG und FaPydA) und dOG eine Reihe weiterer oxidativer Schäden (**Abbildung 8**).<sup>[141]</sup>

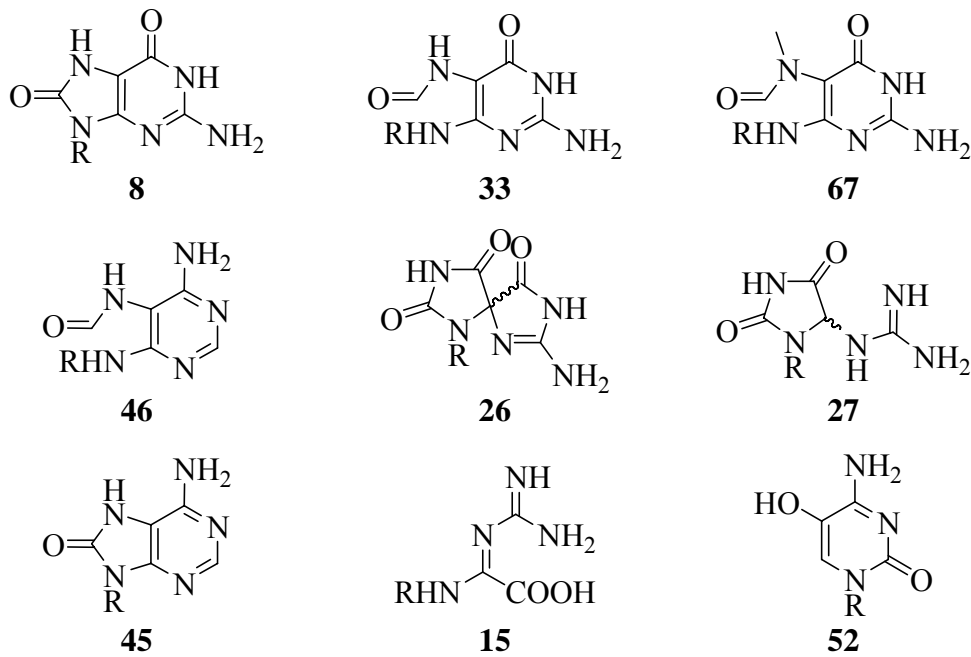
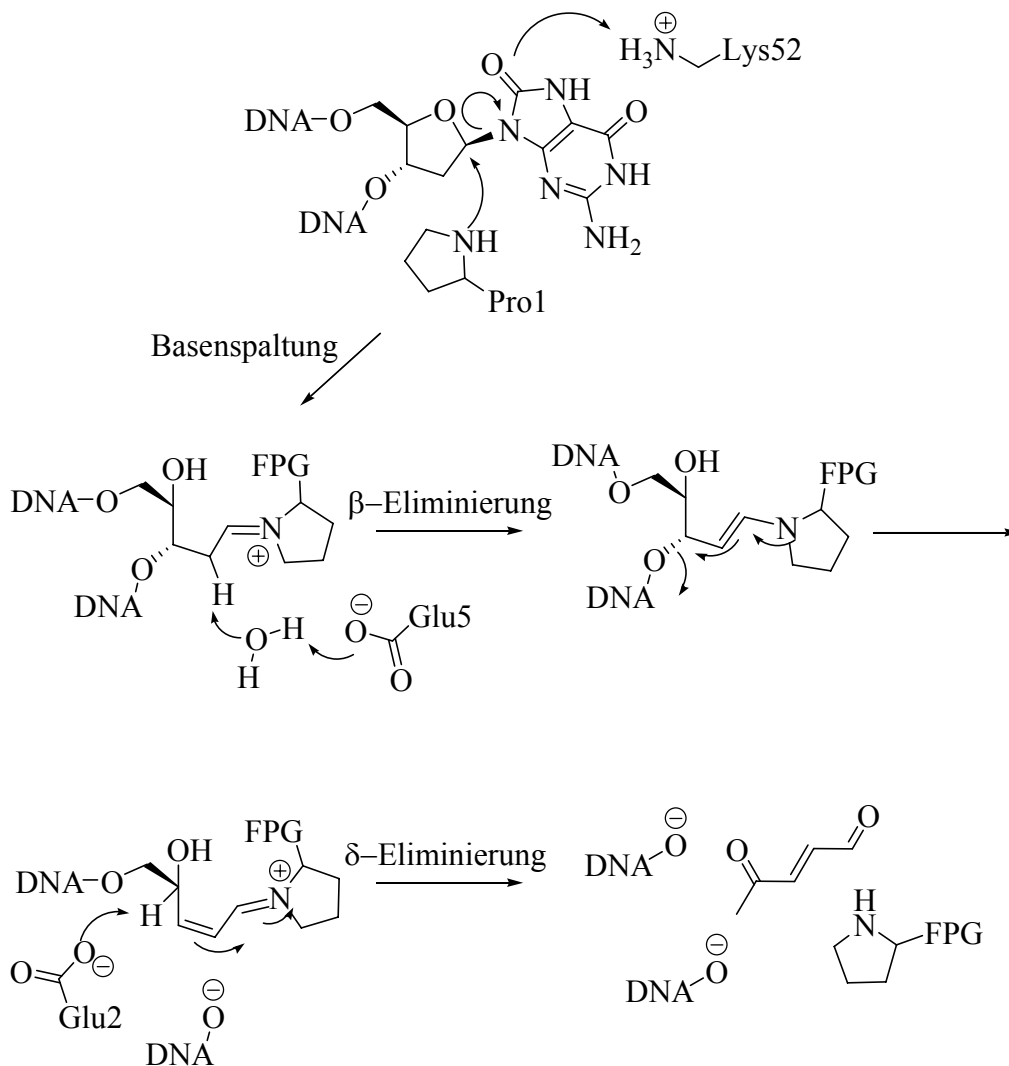


Abbildung 8: Oxidierte Purine, die als Substrate von FPG/MutM identifiziert wurden: dOG **8**, FaPydG **33**, N7-Me-FaPydG **67**, FaPydA **46**, dSp **26** und dGh **27**; dOA **45**, dZ **15** und 5-OH-dC **52** werden mit moderater Effizienz von FPG entfernt. R = DNA

Die Kristallstruktur des freien FPG aus *Thermus thermophilus* (TtFPG) zeigt, dass das 30 kDa schwere Protein aus zwei globulären Domänen besteht.<sup>[142]</sup> Zwei DNA Bindungsstellen wurden identifiziert: Ein Zinkfingermotiv, das sehr spezifisch ist für Glycosylasen dieser Superfamilie und ein *helix-2-turn-helix* (HTH) Motiv, das dem *helix-hairpin-helix* (HhH) Motiv vieler anderer Glycosylasen sehr ähnelt. Eine Reihe von Kristallstrukturen von FPG im Komplex mit geschädigter DNA zeigen, zusammen mit kinetischen Experimenten, den Mechanismus, nachdem FPG einen Schaden erkennt und entfernt.<sup>[143-151]</sup> Im ersten Schritt bindet das Enzym unspezifisch an die DNA Doppelhelix, bewegt sich entlang der Doppelhelix und sucht nach einem Schaden. Möglicherweise wird dabei ein Phenylalaninrest, gleich einer Sonde, zwischen die Basenpaare eingeführt und als Folge die Doppelhelix stark gekrümmt.<sup>[149]</sup> Da auf geschätzte  $10^6$  intakte Basen nur etwa ein dOG **8** kommt, muss die Schadenserkennung sehr zuverlässig und schnell vonstatten gehen. Dabei verbraucht das Enzym keinerlei biochemische Energie.<sup>[152, 153]</sup> Trifft FPG auf eine geschädigte Nukleobase, so wird diese anschließend aus der DNA herausgeklappt und in einer extrahelicalen Position innerhalb der aktiven Tasche des Enzyms stabilisiert. In dieser Position ist der C1'-Kohlenstoff der 2-Desoxyribose „entblößt“ und kann vom N-terminalen Prolin-1 nukleophil angegriffen werden (**Schema 19**). Die im Doppelstrang durch das nunmehr fehlende dOG entstandene Lücke wird durch die hydrophobe Seitenkette von Phenylalanin-

110 gefüllt. Die im Doppelstrang verbliebene Gegenbase Cytosin wechselwirkt mit Arginin-108. Aus der heraus geklappten 2'-Desoxyribose und dem sekundären Stickstoff des Prolin-1 bildet sich eine Schiff'sche Base. Diese konnte durch Reaktion dieses Intermediats mit Natriumborhydrid nachgewiesen werden (**Schema 19**).<sup>[154]</sup> Es folgt aufgrund der AP-Lyaseaktivität die Spaltung der 3'- und 5'-Phosphodiesterbindung durch  $\beta$ - und  $\delta$ -Eliminierung und somit zur Einzelstrangspaltung unter Verlust eines Moleküls 4-Oxo-2-pental.<sup>[155]</sup>



*Schema 19: Schematische Darstellung des Mechanismus von FPG zur Basenspaltung mit nachfolgender  $\beta$ - und  $\delta$ -Eliminierung, der zur Einzelstrangspaltung unter Freisetzung eines Moleküls 4-Oxo-2-pental führt. (rot: die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren von FPG).*

Aufgrund der großen Bedeutung von dOG **8** und dessen struktureller Ähnlichkeit mit dG, beide Moleküle unterscheiden sich lediglich um zwei Atome, den Carbonylsauerstoff an C8 und das Proton an N7, ist der Erkennungsmechanismus von *B. stearothermophilus* E3Q-FPG beim dOG besonders interessant (**Abbildung 9**).<sup>[145]</sup> Der Amidsauerstoff von Ser-220 bildet Wasserstoffbrücken mit dem Proton an N7. Ein besonders wichtiger Kontakt des FPG zum dOG entsteht über die  $\beta$ F- $\alpha$ 10 Schleife, die sich um das O6 krümmt und Wasserstoffbrücken über Sauerstoffatome des Proteinerückgrats vermittelt. Die Watson-Crick Seite des dOG wird von Thr-224 und Glu-78 erkannt. FPG geht keine wesentlichen Interaktionen mit dem  $\pi$ -System des Schadens ein. In der relativ offenen und flexiblen aktiven Tasche des Enzyms wird dOG in der *syn*-Konformation gebunden.<sup>[144]</sup> Dies ist bemerkenswert, denn das strukturell sehr ähnliche FaPydG **33** wird in *anti* Konformation gebunden.<sup>[147]</sup> Und auch das in Eukaryoten vorkommende, funktionelle Ortholog zum FPG, das OGG bindet dOG in *anti*-Konformation.<sup>[156]</sup>

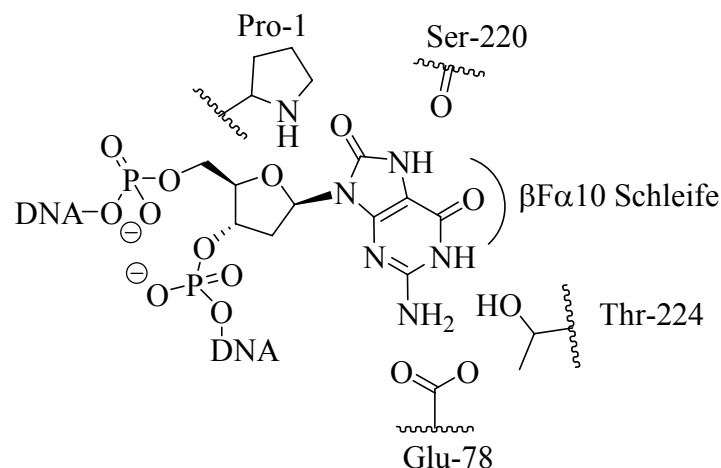
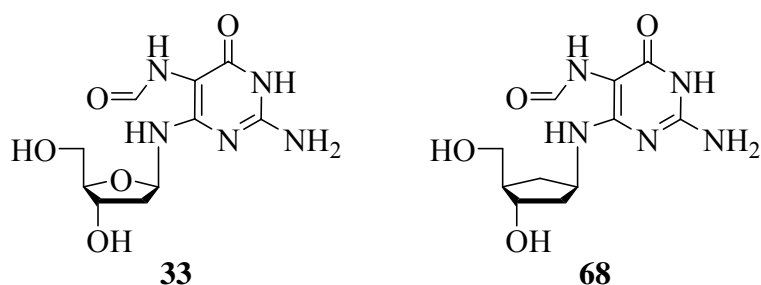


Abbildung 9: Wechselwirkungen von *syn*-OG in der aktiven Tasche von E3Q-BstFPG.

### 3.6 Carbocyclische Analoga oxidativ erzeugter DNA-Schäden

Für die in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Kristallstrukturen wurden inaktive Mutanten von FPG verwendet. Bei diesen war entweder das Prolin-1 entfernt worden ( $\Delta$ P1) oder das Glutamat-2 wurde gegen ein Glutamin ausgetauscht (E3Q).<sup>[143, 144, 157]</sup> Beide Mutationen sorgen dafür, dass der in die aktive Tasche insertierte Schaden während der Kristallisation vom FPG nicht entfernt wird. Eine Alternative stellt die Verwendung inerter Substrate dar, die dem natürlichen Schaden möglichst genau gleichen, die das Enzym folglich erkennen aber nicht reparieren kann. Ein carbocyclischen Analogon des Formaminopyrimidin-2'-desoxyguanosin

(cFaPydG, **68**) wurde genau zu einem solchen Zweck in der Arbeitsgruppe *Carell* entwickelt (*Abbildung 10*).<sup>[158, 159]</sup>



*Abbildung 10: Das natürliche FaPydG **33** und sein carbocyclisches Analogon **68**.*

Durch den fehlenden Ringsauerstoff ist die Bindung des C1'-Kohlenstoff zum N9-Stickstoff des Formamidopyrimidins keine glykosidische Bindung mehr. Die Ausbildung einer intermediären Schiff'schen Base mit dem Pro-1 von FPG ist folglich nicht mehr möglich, die geschädigte Nukleobase verbleibt unangetastet in der aktiven Tasche und der Enzym-DNA-Komplex kann problemlos kristallisiert werden. Mögliche strukturelle Veränderungen der aktiven Tasche des Enzyms, wie sie sich durch Proteinmutationen ergeben könnten, werden durch die Verwendung eines carbocyclischen Analogons vermieden.

### 3.7 Aufgabenstellung

Der Mechanismus der Schadenserkenkung von FPG ist trotz der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Erkenntnisse nicht vollständig verstanden. Zwar ist bekannt, dass FPG oxidativ erzeugte Schäden dSp **26** oder dZ **15** erkennt und entfernt. Es existiert jedoch keinerlei Vorstellung davon, wie die Schäden in der aktiven Tasche von FPG gebunden werden. Immerhin unterscheiden sich diese Schäden strukturell sehr deutlich von den meisten anderen oxidativ erzeugten DNA-Schäden. Dies gilt gleichermaßen für den hydrolytischen Vorläufer von dZ **15**, das dIz **14**.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Synthese für das carbocyclische Analogon des Imidazolone DNA-Schadens in einem Oligonukleotid (ODN) mit dem Ziel, dieses als Substrat für Kokristallstudien im Komplex mit Wild-Typ FPG zur Verfügung zu stellen. Viele DNA-Schäden und auch das cFaPydG **68** lassen sich als stabile Monomere herstellen und als Phosphoramidite in ein synthetisches ODN mit jeder gewünschten Sequenz einbauen. Dies ist jedoch im Falle von dIz **14** und seines carbocyclischen Analogons aufgrund deren geringer Stabilität wenig aussichtsreich, so dass hier ein anderer Weg beschritten

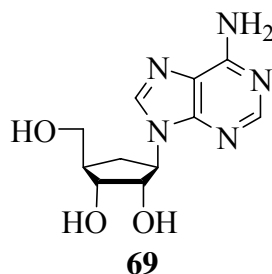
werden sollte. Basierend auf den Arbeiten von M. Ober zur Synthese des cFaPydG **68** sollte ein Phosphoramidit des carbocyclischen 2'-Desoxyguanosinanalogs synthetisiert und in ein ODN inkorporiert werden. Das carbocyclische 2'-Desoxyguanosin sollte dann, innerhalb des ODN, spezifisch zum carbocyclischen Imidazoloxon oxidiert werden. Ein Vergleich von unmodifizierten ODN mit einem ODN gleicher Sequenz, das aber das carbocyclische Analogon von dG enthält sollte zeigen, ob die carbocyclische Modifizierung die thermodynamischen Parameter der Basenpaarung beeinflusst.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Synthese der carbocyclischen Nucleoside

#### 4.1.1 Carbocyclisches 2'-Desoxyguanosin

Viele der gebräuchlichen Virostatika sind Nucleosidabkömmlinge, darunter sind auch diverse carbocyclisch modifizierte Nucleoside.<sup>[160]</sup> Ein prominenter Vertreter ist das Aristeromycin **69**, ein carbocyclisches Adenosin, das aus dem Schimmelpilz *Streptomyces citricolor* isoliert werden kann (*Abbildung 11*).<sup>[161, 162]</sup>

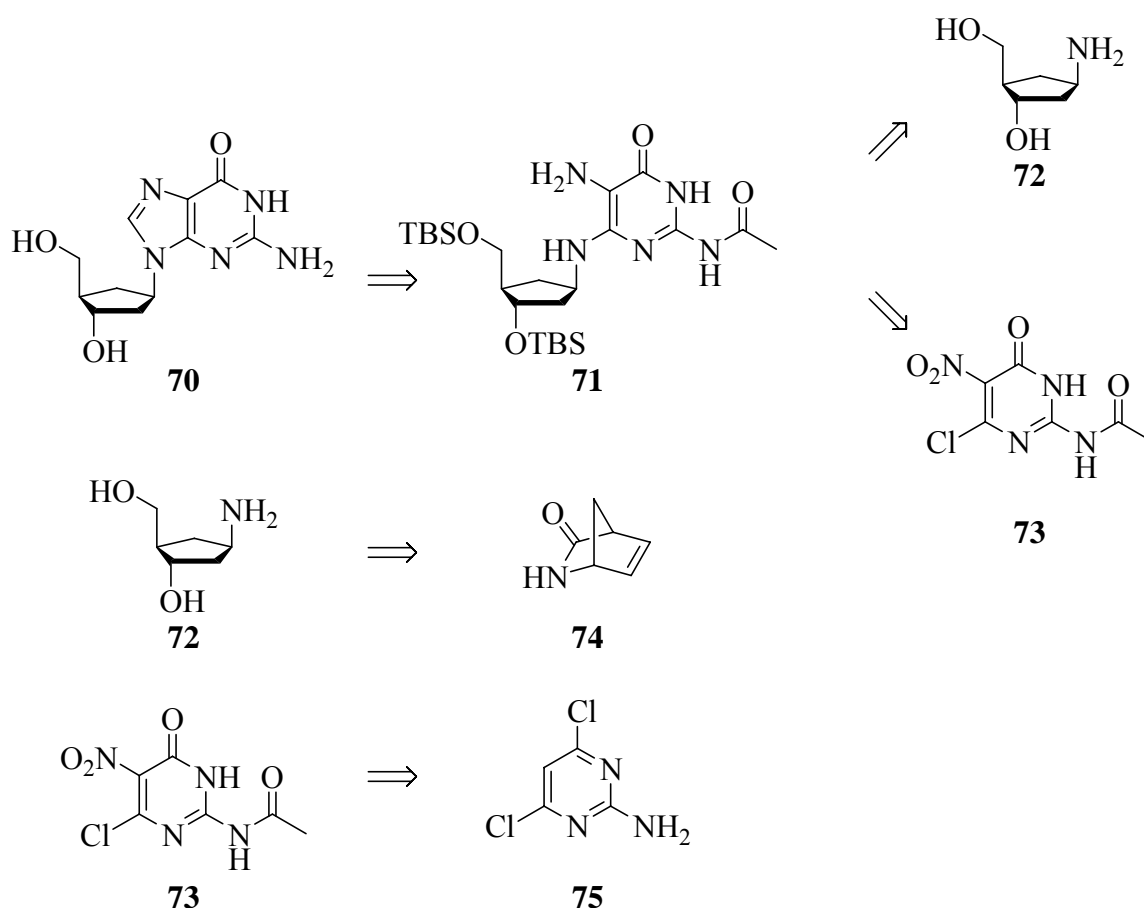


*Abbildung 11: Aristeromycin, ein carbocyclisches Adenosin aus Streptomyces citricolor.*

Wegen des kommerziellen Interesses an diesen Verbindungen existiert eine Reihe von Synthesen zur Darstellung carbocyclischer Nucleoside.<sup>[163]</sup> Viele dieser Synthesen sind lang und weisen schlechte Ausbeuten auf, insbesondere dann, wenn es sich um Guanosinderivate handelt.

Die retrosynthetische Analyse von carbocyclischem 2'-Desoxyguanosin (cdG, **70**) führt, in einer der Traube-Synthese entsprechenden Strategie,<sup>[164, 165]</sup> zunächst zu Intermediat **71**, das durch Kupplung von (+)-(1*S*,2*R*,4*R*)-4-Amino-2-hydroxymethyl-cyclopentanol **72** mit 2-Acetamino-4-chlor-5-nitro-pyrimidin-6-on **73** erhalten werden kann (*Schema 20*). Letzteres wird in einer dreistufigen Synthese mit einer Gesamtausbeute von 56 % aus 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin **75** gewonnen. Die Synthese geht auf Arbeiten von *Dominguez* und *Cullis* zurück und wurde von *M. Ober* in der Arbeitsgruppe *Carell* weiterentwickelt.<sup>[106, 158, 159, 166]</sup> Die Vorteile dieser Route sind die hohen Ausbeuten der einzelnen Stufen bei generell sehr zuverlässigen Reaktionen. Da von einem enantiomerenreinen Edukt **74** ausgegangen wird, entfallen mögliche Probleme bei der Trennung verschiedener Enantiomere.

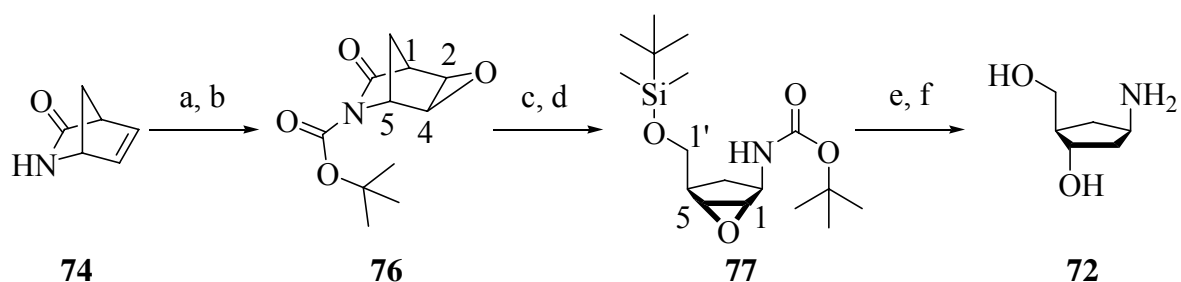




Schema 20: Retrosynthetische Analyse des carbocyclischen Guanosinanalogs **70**, basierend auf den Arbeiten von M. Ober.<sup>[159]</sup>

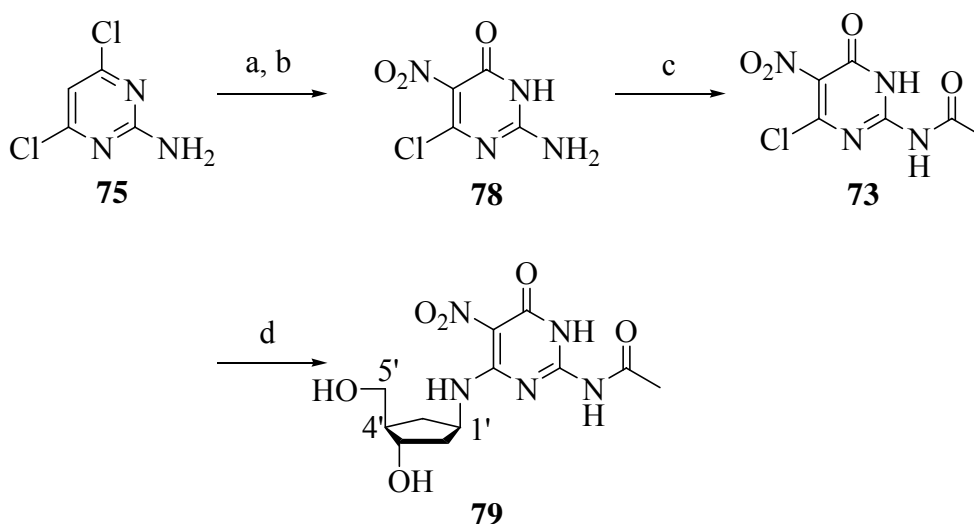
Den Auftakt zur sechsstufigen Synthese des Cyclopentylamins **72** bildete die Boc-Schützung von (1*R*)-(-)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on **74**, das als reines *R*-Enantiomer eingesetzt wurde (**Schema 21**) und ein vielseitiges Ausgangsmaterial zur Synthese carbocyclischer Nucleoside darstellt.<sup>[167]</sup> Die Umsetzung mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc<sub>2</sub>O) im 2.7-fachen Überschuss mit einem Äquivalent 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) erfolgte in wasserfreiem THF mit einer Ausbeute an Boc-geschütztem Lactam **107** von 94 %. Dieses wurde anschließend mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) zum Epoxid **76** umgesetzt. Eine vollständige Umsetzung wurde bei einer Reaktionszeit von 48 h beobachtet. Sowohl der nicht umgesetzte Überschuss an *m*CPBA, als auch das Nebenprodukt 3-Chlorbenzoesäure war nur durch eine aufwendige Extraktion vom Produkt zu trennen. Bei dieser Reaktion entstand ausschließlich das *exo*-Produkt der Epoxidierung, wie man anhand der kleinen Kopplungskonstanten zwischen C1H und C2H sowie zwischen C4H und C5H (ca. 1 Hz) nachweisen konnte. Die Stereoselektivität der Reaktion ist vermutlich auf die sterische Abschirmung der endo-Seite des Lactams **107** durch die Boc-Schutzgruppe zurückzuführen. Reduktion des Lactams mit Natriumborhydrid in Methanol führte nach anschließender

Umsetzung mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBSCl) unter Standardbedingungen zum geschützten Epoxid **77**. Die Einführung der sterisch anspruchsvollen TBS-Schutzgruppe an Position C1' erhöht in Verbindung **77** entscheidend die Regioselektivität bei der Öffnung des Epoxids **77** an C1 mit Red-Al<sup>®</sup>. Im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum waren nur geringe Verunreinigungen mit am C5 geöffneten Nebenprodukt zu erkennen, so dass das Rohprodukt keiner weiteren Aufreinigung unterzogen werden musste. Die Öffnung des Epoxids führte gleichzeitig zur Abspaltung der TBS-Gruppe. Im letzten Schritt musste deshalb nur noch die Boc-Gruppe entfernt werden. Die Boc-Entschützung erfolgte entgegen den Standardbedingungen nicht durch Behandlung mit Säure, sondern thermisch in siedendem Wasser. Nach 18 h konnte mittels Dünnschichtchromatographie kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Das freie Amin **72** war reaktiv genug, um im nächsten Schritt an das nur schwach elektrophile Nitropyrimidinon **73** nukleophil zu addieren. Da das Cyclopentylamin **72** zersetzlich und luftempfindlich war, wurde es stets unmittelbar weiter umgesetzt. Die sorgfältige Entgasung des Reaktionswassers schützte das Produkt **72** vor weiterer Zersetzung.



Schema 21: a) 2.0 eq  $\text{Boc}_2\text{O}$ , DMAP, THF, RT, 3 h, 99 %, b) 2.5 eq mCPBA, DCM, RT, 48 h, 71 %, c) 5 eq  $\text{NaBH}_4$ , Methanol, 0 °C, 30 min, 92 %, d) 2.2 eq TBSCl, Imidazol, DMF, RT, 3 h, 90 %, e) 2 eq Red-Al, Toluol, 0 °C, 3 h, 93 %, f) Wasser, 100 °C, 18 h, 99 %.

2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin **75** wurde zunächst in siedender einmolarer Natronlauge in das entsprechende 2-Amino-4-chlor-pyrimidin-6-on **110** und anschließend durch Behandeln mit Nitriersäure in das 2-Amino-4-chlor-5-nitro-pyrimidin-6-on **78** überführt (Schema 22).<sup>[168, 169]</sup> Beide Reaktionen verliefen mit hoher Ausbeute, so dass auf eine Aufreinigung verzichtet werden konnte. Der letzte Schritt, die Acetylierung des Amins **78**, wurde in Acetanhydrid unter Protonenkatalyse durchgeführt, um eine gleichzeitige Acetylierung des Sauerstoffs an C6 zu vermeiden.<sup>[170]</sup> Zudem erhöht die Acetylgruppe die Löslichkeit des Produkts **73** beträchtlich. Auch hier wurde wegen der großen Reinheit des Rohprodukts von einer weiteren Aufreinigung abgesehen.



Schema 22: a) 1 N NaOH, 100 °C, 45 min, 98 %, b) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>, 0 °C, 5 min, 90 %, c) Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (kat.), 90 °C, 30 min, 64 %, d) **72**, Diisopropylethylamin, DMF, RT, 90 min, 75 °C, 90 min, 86 %.

Die Kupplung von Heterocyclus **73** mit Cyclopentylamin **72** verlief in DMF in Gegenwart von Diisopropylethylamin (DIEA, Hünig-Base) bei erhöhter Temperatur. Das Kupplungsprodukt **79** wurde ausgefällt, indem die Reaktionslösung zu einer Mischung aus Petrolether und Dichlormethan getropft wurde. Auch an dieser Stelle konnte auf eine weitere Aufreinigung des Rohprodukts verzichtet werden. Die Gesamtausbeute über alle vier Stufen betrug 49 %. Im <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY Spektrum von **79** ist die <sup>3</sup>J-Kopplung zwischen dem Dublett des C1'NH und dem C1'-Proton (**Abbildung 12**) deutlich zu erkennen.

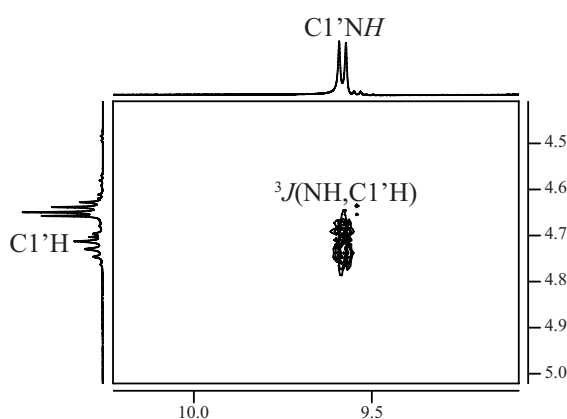
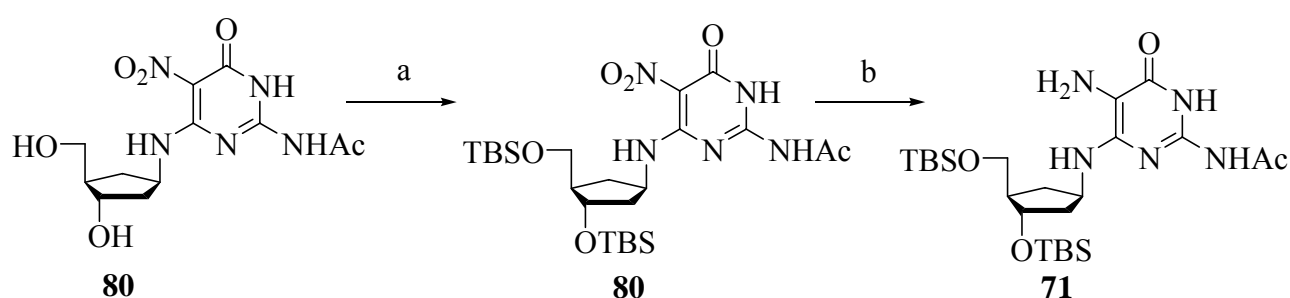


Abbildung 12: Im <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY Spektrum von **79** erkennt man die <sup>3</sup>J-Kopplung zwischen C1'NH- und dem C1'-Proton mit einer Kopplungskonstante von 8.0 Hz.

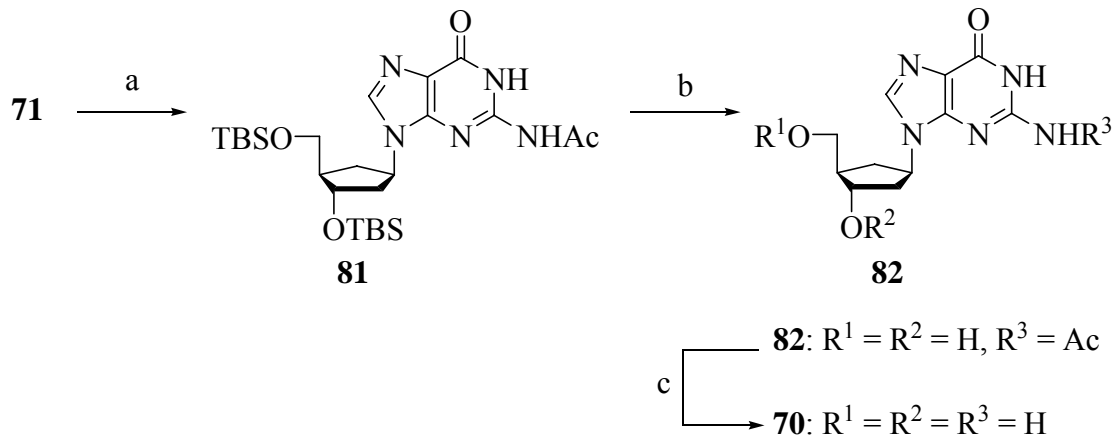
Für eine weitere Umsetzung wurden die freien Hydroxylgruppen am Cyclopentylring mit TBSCl unter Standardbedingungen und mit guten Ausbeuten geschützt. Ein weiterer Vorteil der geschützten Verbindung war dessen deutlich bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (*Schema 23*). Anschließend wurde die Nitrogruppe von **80** in Gegenwart von Palladium auf Aktivkohle mit Wasserstoff reduziert. Nach einer Reaktionszeit von 18 h war **80** mit fast quantitativer Ausbeute reduziert, so dass das Produkt **71** keiner weiteren Aufreinigung unterzogen werden musste. Da **71** luftempfindlich und zersetzlich ist, musste das verwendete Lösungsmittel Methanol sorgfältig entgast und **71** direkt weiter umgesetzt werden.



*Schema 23: a) 3 eq TBSCl, Imidazol, DMF, RT, 3 h, 79 %, b) Pd/Aktivkohle, H<sub>2</sub>, Methanol, RT, 18 h, 99 %.*

Der synthetisch einfache und ergiebige Zugang zu **71** macht dieses Diamin zu einer Schlüsselverbindung bei der Synthese von carbocyclischen Guanosin. Insbesondere am C8-Kohlenstoff modifizierte carbocyclische Guanosinderivate sind über **71** zugänglich. Zur Synthese des carbocyclischen Guanosins aus **71** bot sich die Verwendung einer Reihe von Reagenzien an, die sich als das passende retrosynthetische Synthone formal von Ameisensäure ableiten. Literaturbekannt ist beispielsweise die Verwendung von Orthoformiaten, Formamidinacetat oder Ameisensäure sowie die Überführung von **71** in die entsprechende Nitrosoverbindung und deren Umsetzung mit quartären Ammoniumsalzen.<sup>[171-176]</sup> Allerdings erschienen Reaktionen, die in sehr saurem Milieu oder bei sehr hohen Temperaturen ablaufen als wenig aussichtsreich. Bei der Umsetzung von **71** mit Trimethylorthoformiat und katalytischen Mengen Ameisensäure konnte nach 18 h das gewünschte Produkt massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Bessere Ausbeuten brachte jedoch die Umsetzung mit Diethoxymethylacetat (DEMA) bei erhöhter Temperatur.<sup>[177]</sup> Dazu wurde das sorgfältig getrocknete Amin **71** in DEMA gelöst und 18 h bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt (*Schema 24*). Die zunächst tiefgelbe Lösung färbte sich dabei nach und

nach rot. Anschließend wurde für weitere 75 min auf 100 °C erhitzt. Nach der Aufarbeitung erhielt man das gewünschte Produkt in moderaten Ausbeuten von etwa 40 %. Auf dem Dünnschichtchromatogramm zeigten sich neben dem gewünschten Produkt eine Anzahl fluoreszierender Nebenprodukte, die jedoch nicht näher charakterisiert werden konnten.



Schema 24: a) Diethoxymethylacetat, RT, 18 h, 100 °C, 75 min, 37 %, b) Pyridin×HF, Ethylacetat, RT, 18 h, 85 %, c) konz. Ammoniak/Ethanol 3:1, RT, 18 h, 99 %.

Es folgte die Abspaltung der TBS-Schutzgruppen, die unter sehr milden Bedingungen mit Pyridiniumfluorid in Ethylacetat mit hohen Ausbeuten ablief und die Entschützung der Aminofunktion mit einer Mischung aus wässriger Ammoniaklösung und Ethanol. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels blieb das vollständig entschützte carbocyclische Guanosin **70** im Reaktionsgefäß zurück.

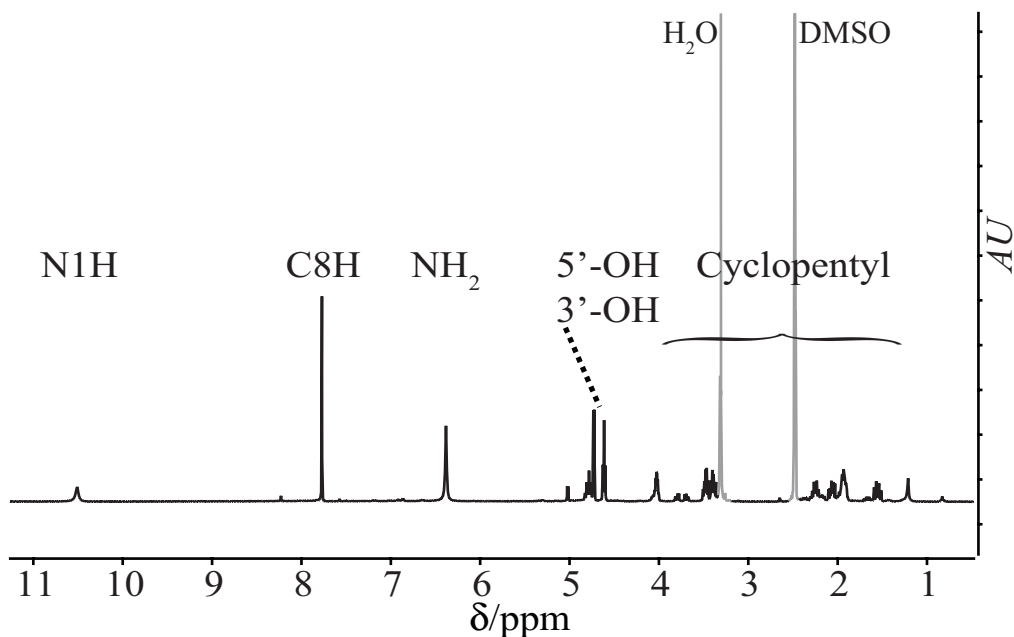
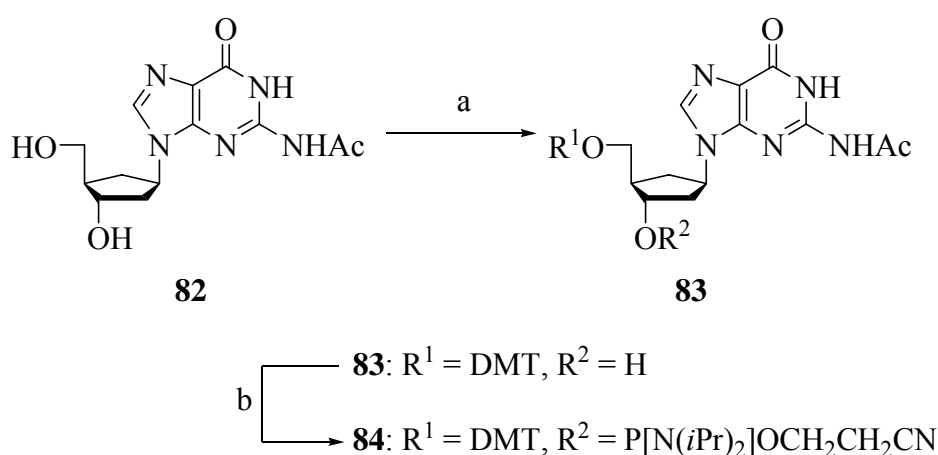


Abbildung 13: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von **70** in [D<sub>6</sub>]-DMSO bei 400 MHz.

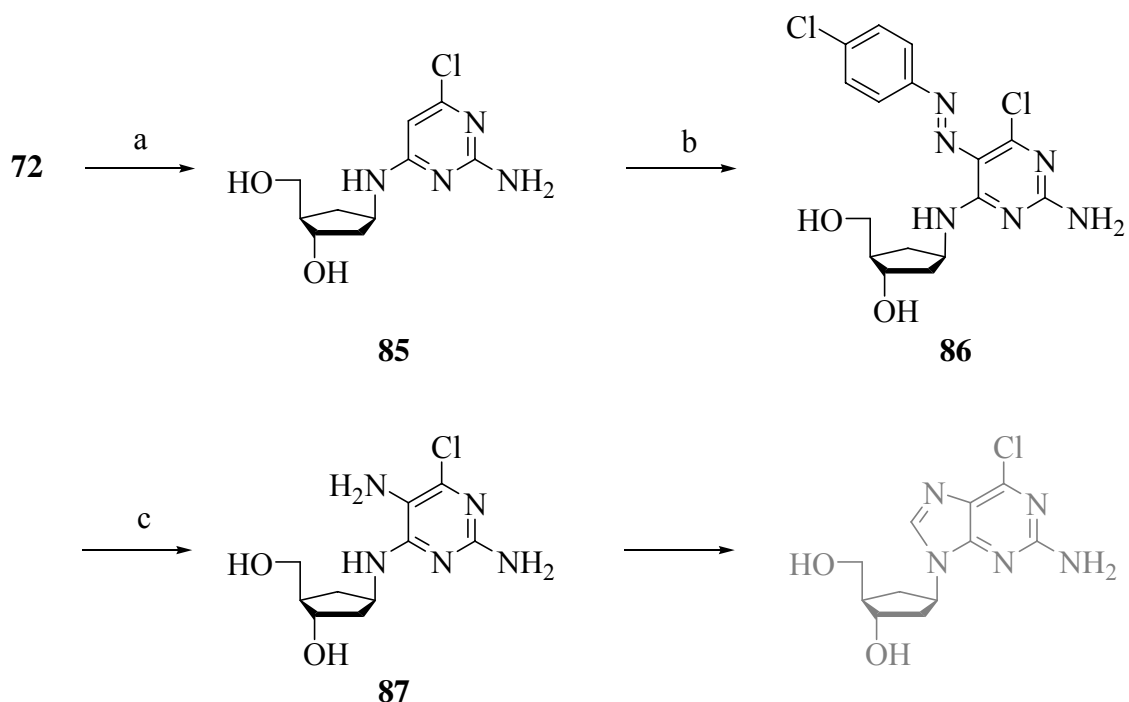
Im NMR-Spektrum erkennt man das Singulett des C8 Protons bei 7.8 ppm, das keine Kopplungen im  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY zeigt (**Abbildung 13**). Die Veretherung der 5'-Hydroxylgruppe von **82** erfolgte durch Umsetzung mit 1.1 eq Dimethoxytritylchlorid (DMTCl) in Pyridin (**Schema 25**). Das Reagenz war unter diesen Bedingungen ausreichend selektiv, so dass nur sehr wenig des am 3'- und 5'-OH geschützten Nebenprodukts auf dem DC zu beobachten war. Das Produkt **83** ist sehr säurelabil, deshalb wurde für die Säulenchromatographie stets ein basisches Laufmittel verwendet. Wenn  $\text{CDCl}_3$  für die NMR-Spektroskopie verwendet wurde, so wurde dieses zuvor über basisches Aluminiumoxid filtriert. Die Darstellung des Phosphoramiditbausteins **84** für die DNA Synthese (siehe unten) konnte durch Umsetzung mit 2-Cyanoethoxy-(*N,N*-diisopropylamino)-chlorophosphin in Dichlormethan oder THF erreicht werden. Da die C6-Carbonylgruppe des Purins unter basischen Bedingungen mit seiner Enolform im Gleichgewicht steht, bestand die Gefahr, dass es unter den hier geschilderten Bedingungen zur O6-Phosphitylierung kommen konnte. Dies konnte jedoch nach Auswertung des NMR-Spektrums des Reaktionsprodukts ausgeschlossen werden. Da das Produkt, vor allem wenn es sich in Lösung befindet, oxidations- und säureempfindlich ist, musste die Aufarbeitung rasch erfolgen. Das verwendete Kieselgel musste auch hier aus den genannten Gründen mit Pyridin desaktiviert werden.



*Schema 25: a) 1.1 eq Dimethoxytritylchlorid, Pyridin, 4 Å Molekularsieb, 0 °C, 2.5 h, 60 %, b) 1.5 eq Cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidit, Diisopropylethylamin, THF, RT, 2 h, 52 %.*

Der „Flaschenhals“ der geschilderten Synthese ist die Ringschlussreaktion mit DEMA, die durch den Aufbau des Imidazolrings das Puringerüst vervollständigt. Die niedrigen Ausbeuten dieser Reaktion sind, so wurde angenommen, auch eine Folge der geringen Nukleophilie der

freien Aminogruppen am Pyrimidinon-Heterozyklus. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde parallel eine alternative Synthesestrategie verfolgt (*Schema 26*).<sup>[178]</sup>



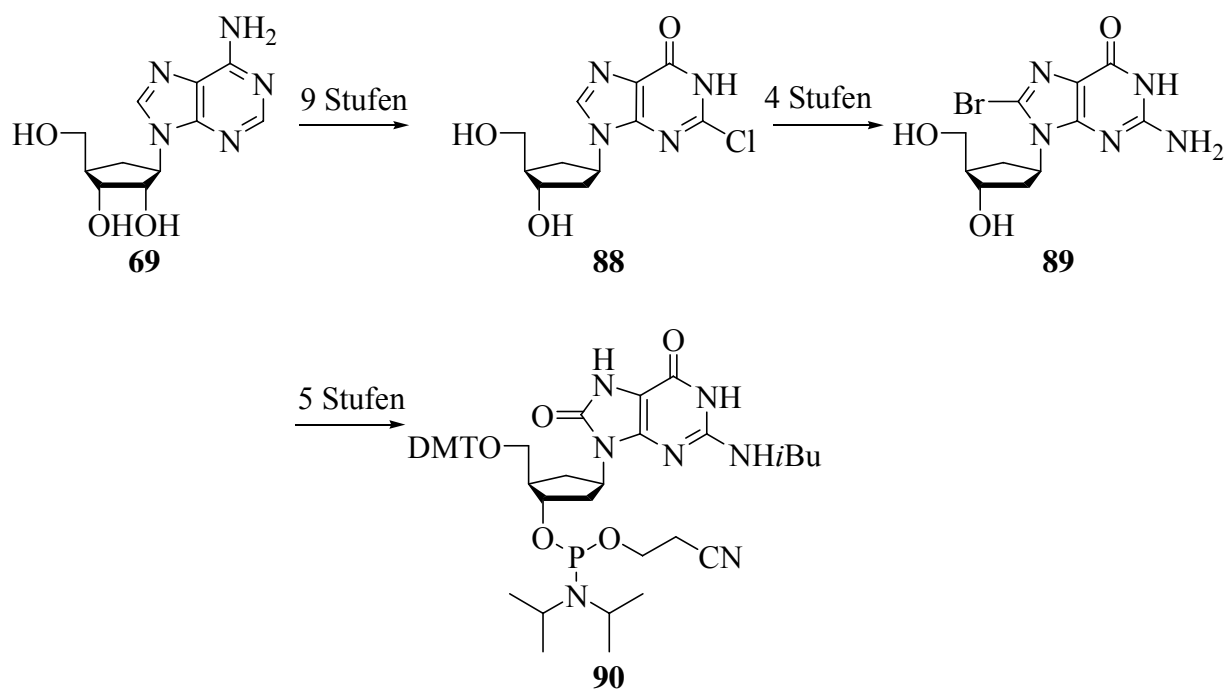
*Schema 26: a) 1.5 eq 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin, Triethylamin, Ethanol, 78 °C, 48 h, 97 %, b) 1.5 eq para-Chloranilin, konz. HCl, NaNO<sub>2</sub>, Wasser/Essigsäure 1:1, RT, 18 h, 40 %, c) Zn, Essigsäure, Wasser/Ethanol 1:1, Rückfluss, 3 h.*

Die Umsetzung von Cyclopentylamin **72** mit 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin **75** lieferte das Kupplungsprodukt **85**. Diese Reaktion war jedoch schlecht reproduzierbar. Die anschließende Azokupplung mit *para*-Chloranilin lieferte **86**, das sehr leicht mit Zinkspäne in Essigsäure zum Amin **87** reduziert werden konnte. Dieses ist stark luftempfindlich und konnte deshalb nicht weiter aufgearbeitet werden. Das Triamin **87** zeigte keine Umsetzung mit Trimethylorthoformiat oder DEMA, so dass diese Synthesestrategie nicht zum gewünschten Produkt führte.

#### 4.1.2 Carbocyclisches 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin

Die Synthese eines carbocyclischen Analogons von 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (cdOG, **93**), das enzymatisch nicht spaltbar ist, war bereits 1998 von *F. Johnson* veröffentlicht worden.<sup>[179]</sup> Darüber hinaus gelang ihm auch der Einbau dieses Bausteins in ein ODN. Der

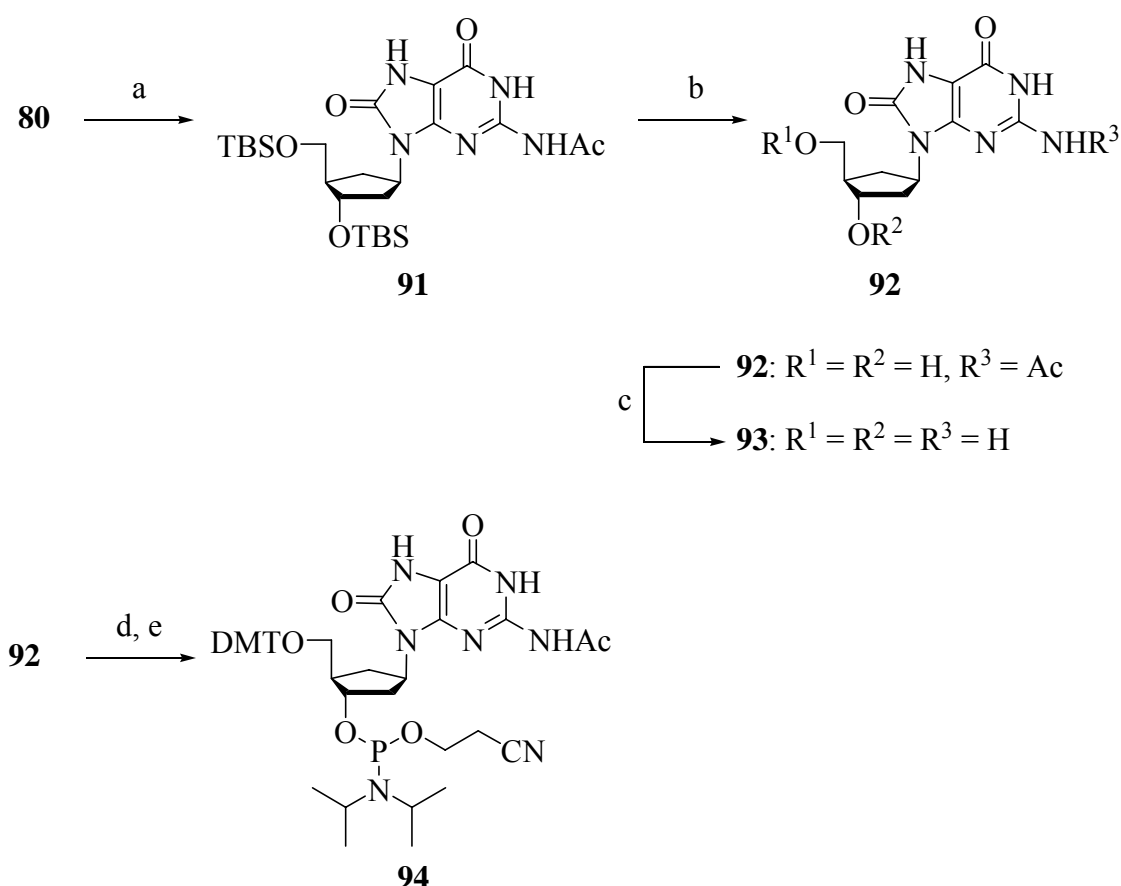
Nachteil dieser Synthese ist ihre Länge und die dadurch resultierende niedrige Gesamtausbeute. Sie ist in *Schema 27* kurz dargestellt.



*Schema 27: Die Darstellung von cdOG Phosphoramidit 90 nach F. Johnson, ausgehend von Aristeromycin 69.<sup>[179]</sup>*

Das bereits beschriebene Diamin-Intermediat **71**, so die Ausgangsüberlegung, sollte sich unter Verwendung eines passenden Reagenzes ebenfalls zum cdOG **93** umsetzen lassen. Erste Versuche mit Diphosgen und Chlorkohlensäureestern zeigten schnell, dass diese Reagenzien bei weitem zu reaktiv waren, da sie an mehreren Positionen mit dem Substrat reagierten. Mit Diethylcarbonat konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Mit Carbonyldiimidazol (CDI) hingegen ließ sich das Problem der mangelnden Regioselektivität umgehen und die Reaktion lieferte das gewünschte Produkt. Nach umfangreicher Optimierung der Reaktionsführung konnte die Ausbeute auf moderate 30 % angehoben werden, dennoch war es möglich, eine ausreichende Menge an Produkt zu isolieren (*Schema 28*). Die besten Ergebnisse konnten mit Chloroform als Lösungsmittel, niedriger Substratkonzentration und langsamer Zugabe von in Chloroform gelöstem CDI erzielt werden. Alle Versuche das Lösungsmittel zu wechseln, um eine höhere Reaktionstemperatur zu ermöglichen, brachten stets schlechtere Ausbeuten.





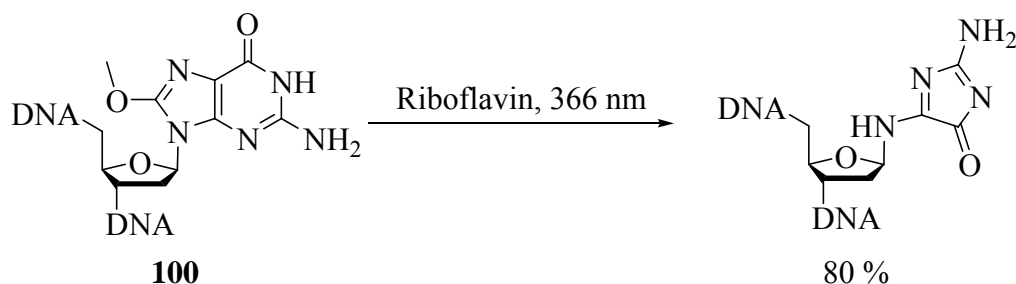
Schema 28: a) Pd/Aktivkohle, Wasserstoff, Methanol, RT, 18 h; 1,1'-Carbonyldiimidazol, Chloroform, RT, 20 h, 55 °C, 3 h, 29 %, b) Pyridin×HF, Pyridin, Ethylacetat, RT, 18 h, 95 %, c) Methylamin/Ammoniak 1:1, β-Mercaptoethanol, RT, 8 h, 99 %, d) 1.2 eq Dimethoxytritylchlorid, Pyridin, 4 Å Molekularsieb, 0 °C, 50 %, e) 1.2 eq Cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidit, Diisopropylethylamin, THF, 0 °C, 70 %.

Unter basischen Bedingungen ist cdOG **93** ebenso wie das natürliche dOG **8** luftempfindlich, weshalb die TBS Entschützung unter Schutzgas durchgeführt wurde. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppe zum vollständig entschützten Nucleosid **93** erfolgte aus dem gleichen Grund unter Zugabe von β-Mercaptoethanol als Antioxidationsmittel zur ammoniakalischen Entschützungslösung. Die Synthese des Phosphoramiditbausteins **94** folgte den in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Bedingungen (Schema 28).

#### 4.1.3 Carbocyclisches 8-Methoxy-2'-desoxyguanosin

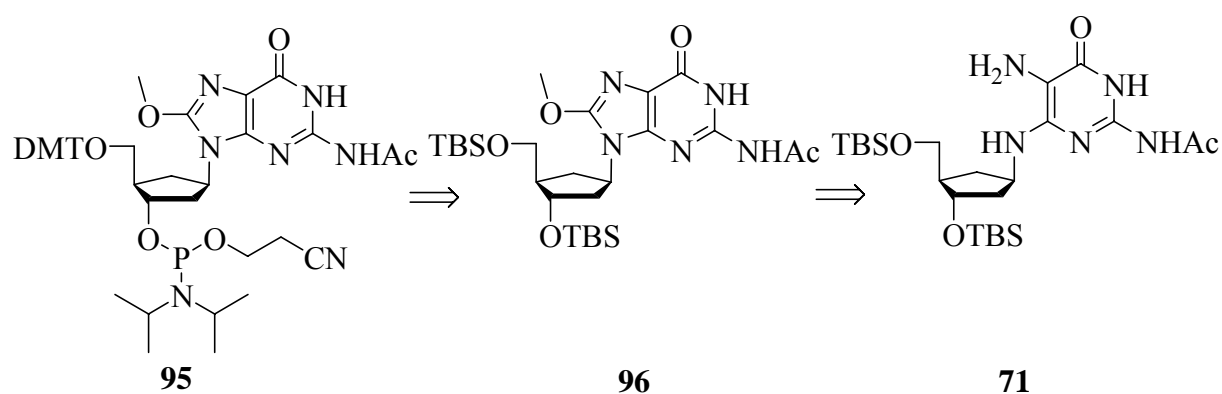
8-Methoxy-2'-desoxyguanosin **100** ist ein potentes Ausgangsmaterial zur selektiven Synthese des Imidazolons Schadens, insbesondere in DNA, da es die Anwesenheit zusätzlicher

Guaninbasen im DNA-Strang erlaubt. *Saito et al.* erzeugen dIz **14** durch Belichten von 8-Methoxy-2'-desoxyguanosin **100** in Einzelstrang-DNA mit UV-A Licht der Wellenlänge  $\lambda = 366$  nm in Gegenwart von Riboflavin mit einer Ausbeute von nahezu 80 % (*Schema 29*).<sup>[180]</sup> Diese Reaktion verläuft deutlich schneller, als die Oxidation von dG **5** zu dIz **14** unter den gleichen Bedingungen, so dass die selektive Darstellung von dIz **14** in Anwesenheit von dG **5** möglich ist.



*Schema 29: Die Typ-I Photooxidation von 100 liefert in DNA mit hoher Selektivität und mit hohen Ausbeuten Imidazolone.*

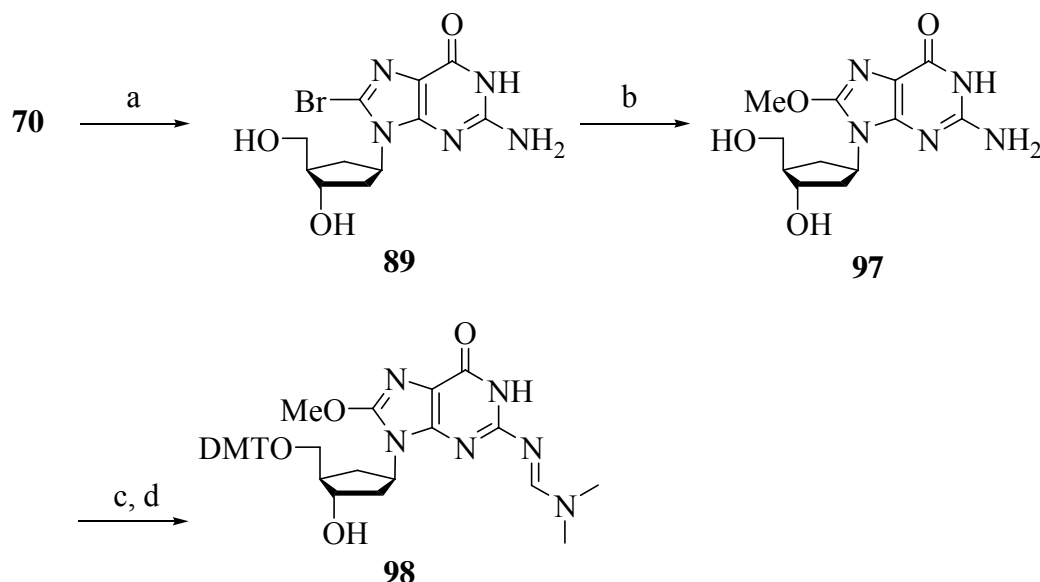
Aus diesem Grund war die Synthese eines carbocyclischen Analogons des 8-Methoxy-2'-desoxyguanosins-Phosphoramidits **95** von großem Interesse. Dazu bot sich die Verwendung des intermediären Diamins **71** als Ausgangsmaterial an. Folgt man der retrosynthetischen Analyse, so könnte die Umsetzung von **71** mit Kohlensäureorthoester zum gewünschten Produkt **96** führen (*Schema 30*).



*Schema 30: Retrosynthetische Analyse des carbocyclischen 8-Methoxy-dG Phosphoramidits 95. Das vielseitige Diamin-Intermediat 71 sollte sich, so die Überlegung, auch in das entsprechende 8-Methoxy-Derivat 96 überführen lassen.*

Dies gelang jedoch nicht. Die Reaktion von Tetramethylorthocarbonat mit **71** lieferte nicht das gewünschte Produkt **96**.<sup>[181, 182]</sup> Eine Erklärung ist möglicherweise die gegenüber Orthoformiaten (oder auch DEMA) geringere Reaktivität des Orthocarbonats.<sup>[183, 184]</sup>

Ein ganz anderer Ansatz zur Darstellung eines Phosphoramiditbausteins von 8-MeO-cG **95** orientiert sich an der gebräuchlichen Methode zur Darstellung von 8-MeO-dG **100** aus Guanosin **5** (*Schema 31*).<sup>[185]</sup> Dieses ist sehr einfach am C8-Kohlenstoff elektrophil bromierbar.<sup>[186, 187]</sup> Die anschließende nukleophile Substitution des Bromids durch Methanolat liefert das gewünschte 8-MeO-dG **100**. Diese Reaktionen wurden auf das carbocyclische Analogon **70** übertragen.<sup>[188]</sup>



*Schema 31: a) 1.3 eq N-Bromsuccinimid, Wasser/Acetonitril 1:1, RT, 1 h, 90 %, b) Natriummethanolat, Methanol, Rückfluss, 24 h, 15 %, c) N,N-Dimethylformacetal, Methanol, 50 °C, 4 h, RT, 12 Tage; 1.2 eq Dimethoxytritylchlorid, Pyridin, RT, 23 h, 45 %.*

Auch am carbocyclischen Guanosin **70** verlief die Bromierung mit *N*-Bromsuccinimid rasch und sauber, so dass keine weitere Aufreinigung des Produkts **89** nötig war. Die anschließende nukleophile Substitution erfolgte mit Natriummethanolat in methanolischer Lösung.<sup>[188]</sup> Die Suspension wurde für mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend mit verdünnter Salzsäure neutralisiert. Dabei zeigte sich ein nur unvollständiger Umsatz. Erschwerend kam hinzu, dass, bedingt durch die Neutralisation, **97** mit einem großen Überschuss an Natriumchlorid verunreinigt war. Die alternative Verwendung von Kationenaustauschern zur Neutralisation war aufgrund der eingesetzten geringen Substanzmenge problematisch.<sup>[185]</sup> Als die beste Methode stellte sich die Aufreinigung der

NaCl haltigen Suspension per Flashchromatographie an C-18 Kieselgel mit Wasser/Acetonitril als Laufmittel heraus. Neben der Trennung von Edukt **89** und Produkt **97** gelang die gleichzeitige Entfernung des erheblichen Salzüberschusses. Die Ausbeuten dieser Reaktion waren allerdings sehr niedrig, so dass für die nachfolgenden Reaktionen nur wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Das freie Nukleosid **97** wurde anschließend mit den zur DNA-Synthese nötigen Schutzgruppen versehen. Zunächst wurde die Aminofunktion mit dem selektiven *N,N*-Dimethylformacetal geschützt.<sup>[189, 190]</sup> Dazu war eine sehr lange Reaktionszeit von etwa 12 Tagen nötig. Das Produkt wurde anschließend, ohne weitere Aufarbeitung mit Dimethoxytritylchlorid umgesetzt und aufgereinigt. Aufgrund der geringen, zur Verfügung stehenden Substanzmenge, die sich vor allem aus der schlechten Umsetzung von **89** zu **97** erklärt, war es nicht möglich, ein entsprechendes Phosphoramidit darzustellen.

### 4.1.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die Vielseitigkeit des Intermediats **71** konnte im Rahmen dieser Arbeit dazu genutzt werden, die carbocyclischen Analoga mehrerer Guanosinderivate darzustellen. Neben dem carbocyclischen 2'-Desoxyguanosin **70** selbst, gelang die Darstellung des carbocyclischen 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosins **93**, des wichtigsten oxidativ erzeugten DNA-Schadens. Von beiden Substanzen konnte sowohl das freie Nukleosid als auch das Phosphoramidit, wie es zur Oligonukleotidsynthese nötig ist, in ausreichender Menge dargestellt werden. Der Schlüsselschritt beider Synthesen ist die Ringschlussreaktion zur Vervollständigung des Puringerüsts. Diese verläuft mit mittleren Ausbeuten von etwa 40 % für **81**, bzw. 30 % für **91**. Eine Verbesserung der Ausbeuten dieses Schritts über die genannten Werte hinaus gelang nicht. Trotzdem stand in beiden Fällen genug Substanz für die Oligonukleotidsynthese zur Verfügung (Kapitel 4.2). Die Synthese eines carbocyclischen Analogons des 8-MeO-dG Phosphoramidits, zur sequenzspezifischen Synthese des Imidazolone Schadens, gelang nicht. Zwei verschiedene Routen wurden zu diesem Zweck getestet. Da **71** keinerlei Umsetzung mit Tetramethylorthocarbonat zeigte, wurde eine alternative Route über die Bromierung von **70**, gefolgt von nukleophilem Austausch des Bromids gegen Methanolat getestet. Der elektrophile Angriff von NBS am Guanin verläuft sehr effizient mit hohen Ausbeuten und kurzen Reaktionszeiten. Die nachfolgende nukleophile Substitution am gleichen System ist erwartungsgemäß schwierig, zumal das 8-Br-dG **89** im stark basischen Reaktionsmedium deprotoniert vorliegen dürfte. Dennoch gelang die Darstellung und Aufreinigung einer kleinen Menge von carbocyclischem 8-Methoxy-2'-deoxyguanosin.

## 4.2 Oligonukleotidsynthese und Einbau der Modifikationen in DNA

Die in Kapitel 4.1 beschriebenen Phosphoramidite von cdG und cdOG (**84**, bzw. **94**) wurden in verschiedene Oligonukleotide (ODN) inkorporiert. Durch nachfolgende Oxidation der ODN sollen die carbocyclischen Modifikationen in weitere DNA-Schäden überführt werden. Mit einigen der cdG enthaltenden ODN sollte der Einfluss der carbocyclischen Modifikation auf die thermodynamischen Eigenschaften der Basenpaarung untersucht werden (Kapitel 4.3.2).

Die automatisierte DNA-Festphasensynthese stellt seit Mitte der 1980er Jahre ein etabliertes Verfahren zur Synthese von Oligonukleotiden dar. Die heute übliche Phosphoramiditchemie, die auf *Caruthers* zurückgeht, ist die effektivste und am weitesten entwickelte Methode.<sup>[191, 192]</sup> Die ODN wurden wahlweise auf einem *Expedite 8900 Synthesizer* (PerSeptive Biosystems) oder einem *ÄktaOligopilot 10* (Amersham Bioscience) unter Anwendung der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle dargestellt (**Abbildung 14**).



*Abbildung 14: Die beiden zur Synthese der DNA Stränge verwendeten Syntheseeinheiten, der Äkta Oligopilot 10 (links) und der Expedite 8900 (rechts).*

Mit der Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppe am letzten Nukleotid des wachsenden ODN beginnt der Syntheszyklus wie er für jedes neu angehängte Nukleotid durchlaufen wird. Der Erfolg einer ODN Synthese kann somit anhand der Absorption des 4,4'-Dimethoxytritylkations bei  $\lambda = 500 \text{ nm}$  verfolgt werden. Der *ÄktaOligopilot 10* bietet darüber hinaus die Möglichkeit zur Überwachung weiterer Syntheseparameter (**Abbildung 15**).

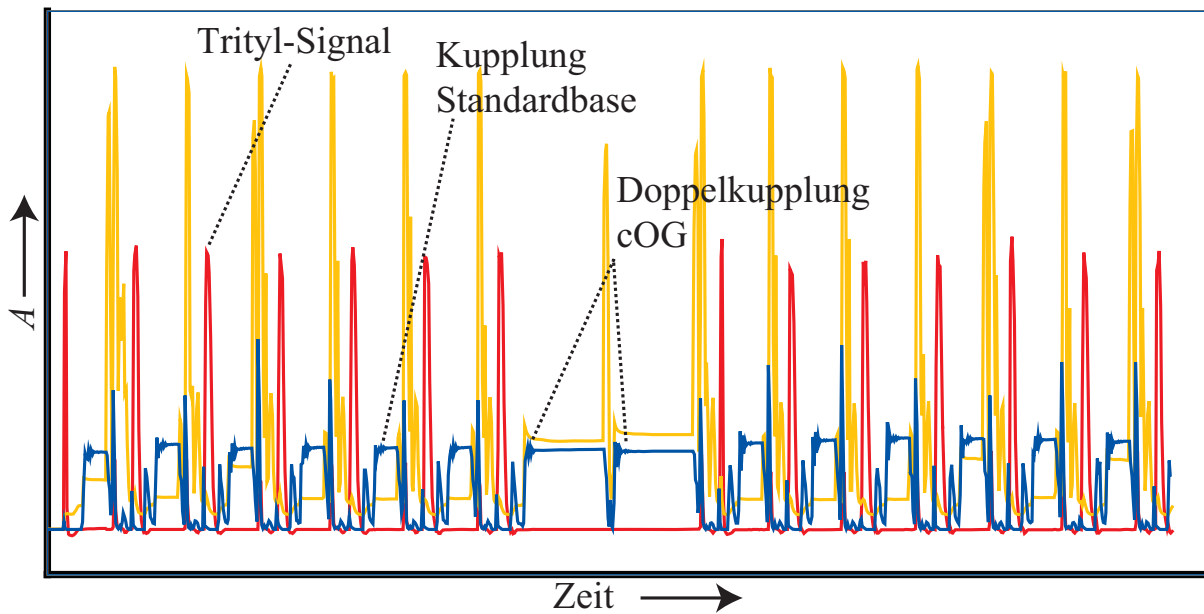


Abbildung 15: Syntheseprotokoll eines mit cdOG modifizierten 14-mer ODN wie es mit dem ÄktaOligopilot 10 darstellbar ist. Die roten Peaks zeigen die Abspaltung des Dimethoxytrityls zu Beginn jedes Synthesesyklus, die flachen Niveaus der blauen Kurve zeigen den Verlauf der Kupplungsreaktion der Phosphoramidite an. An Position 8 wurde cdOG Phosphoramidit **94** inkorporiert. Die Kupplungszeit für diesen Baustein betrug zweimal 10 min, was an den direkt aufeinanderfolgenden verlängerten Niveaus der blauen Kurve zu erkennen ist.

Eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten, bzw. verwendeten ODN mit den jeweiligen Modifikationen gibt **Tabelle 4**. Neben den Phosphoramiditen von cdG und cdOG, **84** und **94**, wurde noch kommerzielles Phosphoramidit des 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin eingebaut. Unmodifizierte Stränge wurden kommerziell bezogen. Die Synthesebedingungen für die hier verwendeten Modifikationen glichen denen der nichtmodifizierten Amidite, lediglich die Kupplungszeiten wurden für die carbocyclischen Modifikationen verlängert. Es zeigte sich, dass die übliche Kupplungszeit von 3 min, wie sie für unmodifizierte Phosphoramidite verwendet wird, zu unvollständigen Kupplungsausbeuten führte. Die Kupplungszeit für **84** und **94** wurde daher auf 10 min verlängert (*Expedite 8900*). Dies war für Synthesen auf dem *ÄktaOligopilot 10* nicht ausreichend, weshalb die Kupplungszeit hier zweimal je 10 min betrug („Doppelkupplung“) (**Abbildung 15**). Eine Verlängerung der Kupplungszeit über 10 min hinaus brachte keinerlei zusätzliche Verbesserung der Kupplungsausbeuten. Als Aktivator wurde Benzylthiotetrazol (BTT) verwendet. Dieses weist im Gegensatz zum früher gerne verwendeten Tetrazol oder

Dicyanoimidazol (DCI)<sup>[193]</sup> eine deutlich bessere Aktivität und Löslichkeit auf. Weiterhin ist dessen Darstellung gut reproduzierbar, kostengünstig und verläuft mit guten Ausbeuten.

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (ODN).

Name	Sequenz In Klammern: Anzahl Nukleotide	Modifikation X, bzw. Y	M <sup>[a]</sup> m/z	Kap.
<b>ODN1a</b>	5'-d(GCGAT <b>X</b> TAGCG) (11)	cG	3395.2 (3395.8)	4.3.2
<b>ODN1b</b>	3'-d(CGCTAYATCGC)	dA,dC,dG,T		
<b>ODN2a</b>	5'-d(TGCAGT <b>X</b> ACAGC) (12)	cG	3668.4 (3669.2)	4.3.2
<b>ODN2b</b>	3'-d(ACGTCA <b>Y</b> TGTCG)	dA,dC,dG,T		
<b>ODN3a</b>	5'-d(GCGATGTAGCG) (11)	–	3397.3	4.3.2
<b>ODN3b</b>	3'-d(CGCTAYATCGC)	dA, dC, dG, T		
<b>ODN4a</b>	5'-d(TGCAGTGACAGC) (12)	–	3670.5	4.3.2
<b>ODN4b</b>	3'-d(ACGTCA <b>Y</b> TGTCG)	dA, dC, dG, T		
<b>ODN5</b>	5'-d(TTT <b>X</b> TCATTCTTTTCTTTC) (19)	cdG	5689.7 (5688.5)	4.4.1.3
<b>ODN6</b>	5'-d(TT <b>XX</b> TA) (6)	cdG	1818.1 (1818.5)	4.4.1.3
<b>ODN7</b>	5'-d(CTCTTT <b>X</b> TTTCTCG) (14)	cdG	4184.7 (4182.7)	4.4.1.3
<b>ODN8</b>	5'-d(CTCTTT <b>X</b> TTTCTCG) (14)	cdOG	4200.7 (4200.8)	4.4.2.2
<b>ODN9</b>	5'-d(GCGAT <b>X</b> TAGCG) (11)	cdOG	3411.2 (3408.3)	4.4.2.2
<b>ODN10</b>	5'-d(CTCTTT <b>X</b> TTTCTCG) (14)	dOG	4202.7 (4202.6)	4.4.2.2
<b>ODN11</b>	5'- <b>Fl</b> -d(CGAGAAACAAAGAG) (14) <sup>[b]</sup>	–	4876.9	4.5.2
<b>ODN12</b>	5'-d(CTCTTT <b>X</b> TTTCTCG) (14)	cBnFaPydG	4292.8 (4292.1)	4.5.2

a) Molekulargewicht, in Klammern die experimentellen Werte der synthetisierten ODN, b) Fl = 6-Carboxyfluoreszeinmodifikation

Zum Entschützen und Abspalten der synthetisierten ODN wurde das feste Trägermaterial (hier: *controlled-pore-glass*, CPG) für mehrere Stunden mit konzentrierter Ammoniaklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine zuverlässige Abspaltung, insbesondere der stabilen Benzoylschutzgruppen (z.B. am Adenosin Phosphoramidit) zu gewährleisten, wurde die Entschützung mit einer 1:1 Mischung aus 40 %iger wässriger Methylaminlösung und konzentrierter Ammoniaklösung durchgeführt. Sowohl dOG als auch cdOG ist in basischer Umgebung an Luft oxidationsempfindlich. Deshalb enthielt die Entschützungslösung in diesen Fällen stets 0.5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol als Antioxidationsmittel. Nach etwa 18 – 20 h Inkubationszeit bei 30 °C war die Entschützungreaktion vollständig beendet.

Die Entschützungs Mischung mit den gelösten ODN wurde zunächst in einer Zentrifuge unter Vakuum eingeeengt und erneut in Wasser gelöst. Mittels analytischer HPL-Chromatographie und MALDI-TOF Spektrometrie wurden die synthetisierten ODN analysiert und die Qualität der Synthese bestimmt. Die anschließende Aufreinigung der ODN erfolgte in der Regel durch Ionenpaarchromatographie mit Triethylammoniumacetat haltigen Pufferlösungen an C-18 *reversed-phase* Säulen von Macherey-Nagel. Die Identifikation der aufgefangenen Produkte erfolgte durch MALDI-TOF Spektrometrie, die Prüfung auf Reinheit durch analytische *rp*-HPLC. Die auf diese Weise gereinigten ODN wurden an C-18 Sep-Pak<sup>®</sup> Kartuschen entsalzt und von Resten des HPLC Puffers befreit. Die Konzentration wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt.

### 4.2.1 Enzymatischer Totalverdau

Um sicherzustellen, dass die inkorporierten Modifikationen cdG und cdOG unter den Bedingungen der DNA Synthese und Aufreinigung stabil sind, wurde eine Analyse des enzymatischen Totalverdaus von **ODN5** und **ODN8** durchgeführt.<sup>[194]</sup> Hierzu wurde das jeweilige ODN mit einer Mischung von Nuklease P1 (*Penicillium citrinum*), Phosphodiesterase-II (*calf-spleen*), alkaline Phosphatase (*calf-intestine*) und Phosphodiesterase-I (*Crotalus adamanteus*) inkubiert und auf diese Weise in die einzelnen Nukleoside zerlegt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit Hilfe von HPLC-MS Messungen analysiert (**Abbildung 16** und **Abbildung 17**).

Das UV-Chromatogramm der Reaktionsmischung des Verdaus von **ODN5** zeigt drei Signale, die jeweils einem der drei in diesem ODN vorhandenen Nukleoside zugeordnet werden konnten. Das ESI-Spektrum der bei einer Retentionszeit von 18.5 min eluierten Substanz zeigte ein Signal bei  $m/z = 264.1102$ . Dies entspricht sehr genau dem Molekulargewicht von cdG **70** (berechnet für  $[M-H^+]^-$ :  $m/z = 264.1102$ ). Die Nukleoside neigen zur Bildung von Ameisensäureaddukten. Die Übereinstimmung des für das  $[M+FA-H^+]^-$ -Ion von cdG gefundenen Wertes von  $m/z = 310.1155$  mit dem berechneten Wert von  $m/z = 310.1157$  ist sehr gut. Die anderen Nukleoside eluieren bei 22 min (2'-Desoxyadenosin) und 19 min (Thymidin). Das zeigt der Vergleich der gefundenen Signale der Ameisensäureaddukte mit dem berechneten Wert für die  $[M+FA-H^+]^-$ -Ionen (**Abbildung 16**).



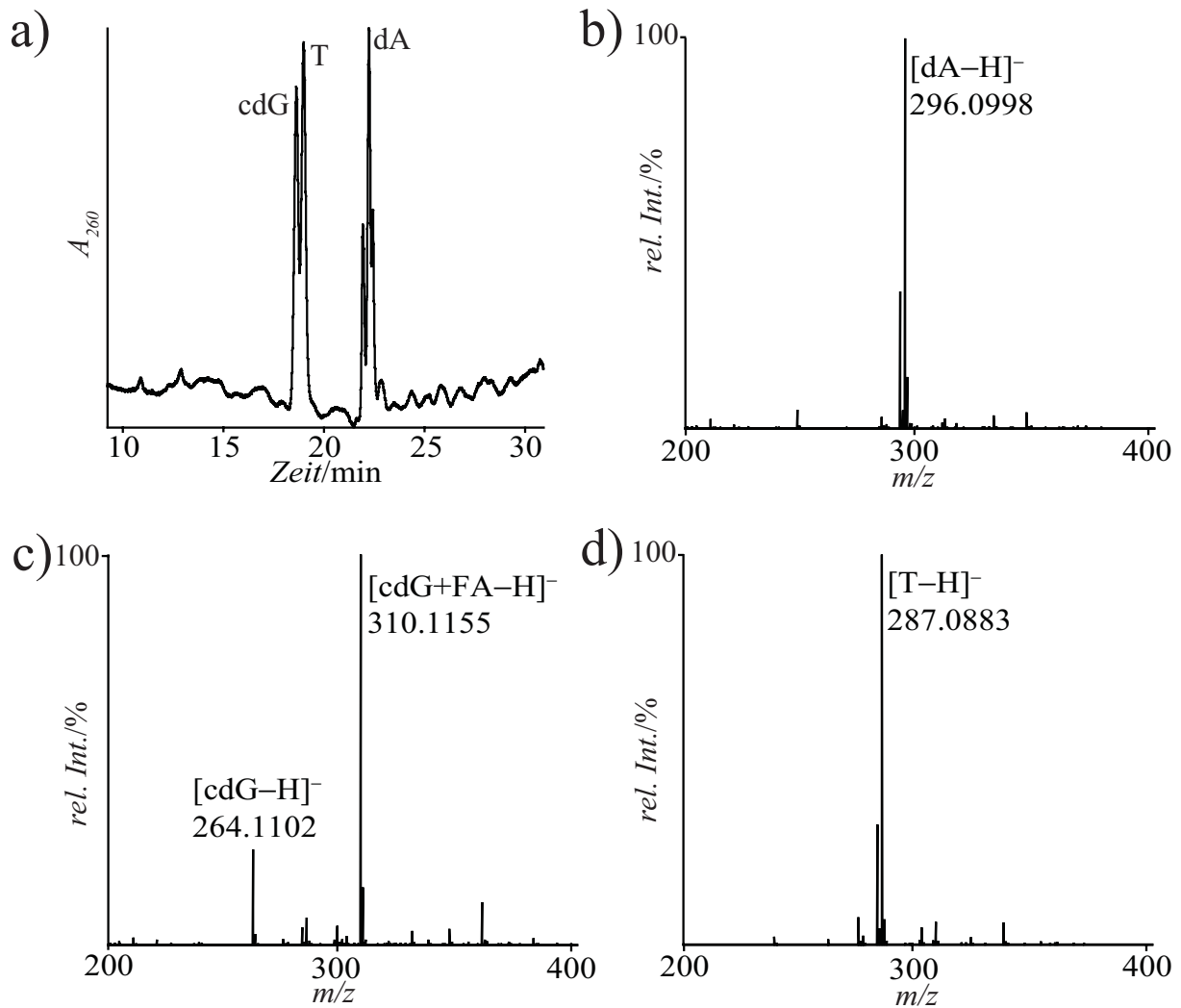


Abbildung 16: Enzymatischer Totalverdau von **ODN5**. Zu sehen sind a) die UV Signale der einzelnen Nucleoside bei 260 nm, HPLC der Reaktionsmischung auf Interchrom Uptisphere 150×2.1, Puffersystem **P3**, Gradient von 0 – 3 % B in 12 min und 12 – 20 % in 30 min bei einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , b) ESI-MS Spektrum des Signals bei 18.5 min Retentionszeit zeigt das Signal von cdG und dessen Ameisensäureaddut (berechnet für  $[M-H^+]^-$ :  $m/z = 264.1102$  und  $[M+FA-H^+]^-$ :  $m/z = 310.1157$ ), c) ESI-MS Spektrum der Substanz bei 19 min Retentionszeit zeigt das Signal von Thymidin (berechnet für  $[M+FA-H^+]^-$ :  $m/z = 87.0885$ ), d) ESI-MS Spektrum der Substanz bei 22 min Retentionszeit zeigt das Signal von 2'-Desoxyadenosin (berechnet für  $[M+FA-H^+]^-$ :  $m/z = 296.1000$ ). (FA = Ameisensäure).

Die gleichen Bedingungen wurden auch zum Totalverdau von **ODN8** herangezogen. Anders als zuvor, wurde hier jedoch Puffersystem **P2** verwendet, so dass sich hier die entsprechenden Essigsäureaddukte der Nucleoside im ESI-Spektrum zeigten. Das cdOG Nucleosid eluierte, ähnlich dem cG, fast zeitgleich mit T und ist daher im UV Spektrum nicht separat zu identifizieren (**Abbildung 17**). Das ESI-MS Spektrum zeigt deshalb, neben dem Signal des

$[M-H^+]^-$ -Ions von T bei  $m/z = 241.0829$  (berechnet:  $m/z = 241.0830$ ) auch das des  $[M-H^+]^-$ -Ions von cdG bei  $m/z = 280.1050$  an. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem für das  $[M-H^+]^-$ -Ions von cdG berechneten Wert von  $m/z = 280.1051$  überein. Zwar erkennt man im Spektrum auch das Essigsäureaddukt von Thymidin bei  $m/z = 301.1039$  (berechnet:  $m/z = 301.1041$ ), nicht aber das von cdOG. Die Neigung der Nucleoside zur Adduktbildung ist im Fall von Essigsäure deutlich geringer. Der Übersichtlichkeit halber sind die ESI-MS Spektren der unmodifizierten Nucleoside dC und dG nicht erneut dargestellt.

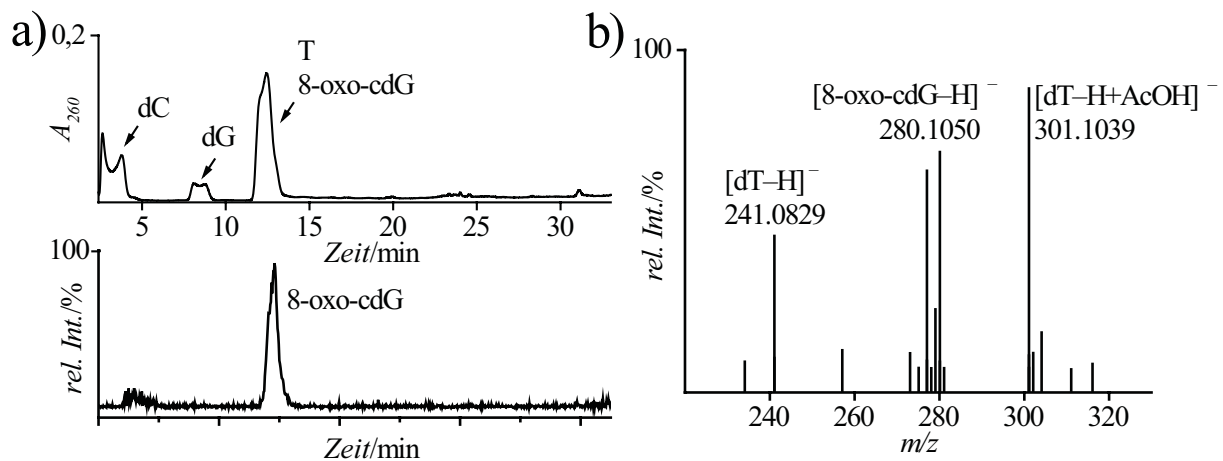


Abbildung 17: Enzymatischer Totalverdau von **ODN8**. a) HPLC der Reaktionsmischung auf Interchrom Uptisphere 150×2.1, Puffersystem **P2**, mit einem Gradienten von 100 % Puffer A 10 min, 0 – 10 % Puffer B in weiteren 18 min bei einem Fluss von 150  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Bei 260 nm (oben) erkennt man drei Hauptsignale. Die Ionenzahl im Massenbereich zwischen  $\Delta m/z = 279.5 - 280.5$  (unten) zeigt das Signal von cdOG, b) das ESI-MS Spektrum der bei einer Retentionszeit von 17 min eluierten Substanz. Das  $[M-H^+]^-$ -Ion von cdOG bei  $m/z = 280.1050$  entspricht sehr gut dem berechneten Wert für dieses Ion von  $m/z = 280.1051$  überein. Daneben sind die Signale der  $[M-H^+]^-$ - und  $[M+AcOH-H^+]^-$ -Ionen von T zu erkennen.

### 4.3 Die carbocyclische Modifikation als Modell der natürlichen Ribose

#### 4.3.1 Theorie des DNA Schmelzvorgangs

DNA-Doppelstränge lassen sich voneinander trennen, indem sie erhitzt werden. Dabei wird die Energie der apolaren Wechselwirkung durch den Einfluss des entropischen Faktors überwunden und die beiden Einzelstränge trennen sich. Diesen Prozess nennt man

„Schmelzen“ der DNA. Der Schmelzpunkt eines DNA Doppelstranges ist derjenige Punkt, an dem 50 % der Doppelstränge getrennt als Einzelstränge vorliegen. Das „Schmelzen“ der DNA lässt sich sehr einfach per UV-Spektroskopie verfolgen, da die Aufhebung der Basenstapelung beim Schmelzen mit einer sigmoidalen Zunahme der Absorption  $A_{260}$  einhergeht. Der charakteristische Kurvenverlauf kann mit einem kooperativen Schmelzprozess des DNA-Doppelstranges erklärt werden: Eine lokale Störung der Basenstapelung erleichtert den verbliebenen Schmelzprozess. Für die Gleichgewichtskonstante  $K_t$  des Schmelzprozesses gilt:

$$K_t = \frac{[Doppelstrang]}{[Einzelstrang1][Einzelstrang2]} \quad \text{Gl. 2.1}$$

Am Schmelzpunkt sind die Konzentrationen von *Einzelstrang1* und *Einzelstrang2* gleich und der Anteil an dimerisierter DNA ist gerade die Hälfte der Gesamt DNA. Gleichung Gl. 2.1 kann man vereinfachen kann zu:

$$K_t = \frac{\alpha(C_T/2)}{[(1-\alpha)C_T/2]^2} = \frac{\alpha}{(1-\alpha)^2(C_T/2)} \quad \text{Gl. 2.2}$$

Dabei ist  $\alpha$  ein Faktor für den Anteil an dimerisierter DNA, der im Schmelzpunkt eben  $\frac{1}{2}$  ist.  $C_T$  ist die Summe der Konzentrationen der Einzelstränge. Deshalb gilt vereinfacht:

$$K_{Tm} = \frac{4}{C_T} \quad \text{Gl. 2.3}$$

Für jedes System im Gleichgewicht gilt:

$$-RT \ln K_T = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Gl. 2.4}$$

Und somit durch Einsetzen von Gl. 2.2 in Gl. 2.4

$$RT_m \ln(C_T/4) = \Delta H^\circ - T_m\Delta S^\circ \quad \text{Gl. 2.5}$$

Nach Umformen und Teilen durch  $T_m\Delta H^\circ$  ergibt sich:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^\circ} \ln C_T + \frac{\Delta S^\circ - R \ln 4}{\Delta H^\circ} \quad \text{Gl. 2.6}$$

Dieser Ausdruck entspricht einer Geradengleichung und wird Van't-Hoff-Gleichung genannt. Durch Auftragen von  $1/T_m$  gegen  $\ln C_T$  aus Messungen des Schmelzpunktes eines DNA-Doppelstranges bei verschiedenen Konzentrationen erhält man eine Gerade, aus deren Steigung man die Dimerisierungsenthalpie und aus deren Achsenabschnitt man die Dimerisierungsentropie berechnen kann. Mit Gl. 2.7 ergibt sich daraus die freie Dimerisierungsenthalpie.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Gl. 2.7}$$

Dieser Zusammenhang gilt nur für relativ kurze, nicht selbstkomplementäre Doppelstränge und auch nicht für den Schmelzprozess von DNA-*hairpins*. Anhand der gewonnen Parameter lassen sich die thermodynamischen Eigenschaften von DNA-Doppelsträngen untereinander vergleichen. Beim Vergleich von Strängen gleicher Länge und Sequenz erhält man die thermodynamischen Parameter zur Basenpaarung einzelner Nukleotide.

### 4.3.2 Ergebnisse der Schmelzpunktstudien

DNA Schäden beeinflussen die Stabilität der Basenpaarung und damit das Schmelzverhalten von DNA-Strängen. So verursacht die nichtmutagene Paarung eines einzelnen dOG:dC-Basenpaares bereits eine deutliche Duplexdestabilisierung. Andererseits ist die dIz:dG Fehlpaarung in etwa genauso stabil wie das ungeschädigte dC:dG Basenpaar (Kapitel 3.4.1). Um den Einfluss der carbocyclischen Modifikation auf die Duplexstabilität zu testen, wurden die thermodynamischen Parameter von cG-Basenpaaren durch Schmelztemperaturmessungen zweier ODN bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Diese Messungen wurden dann mit unmodifizierten ODN der gleichen Sequenz wiederholt und die Daten von dG mit denen von cdG miteinander verglichen (**Abbildung 18**). Dies erlaubt eine Quantifizierung des Effekts, den der Ersatz der 2'-Desoxyribose durch eine Cyclopentaneinheit auf die thermodynamische Stabilität der G:C Basenpaarung hat.

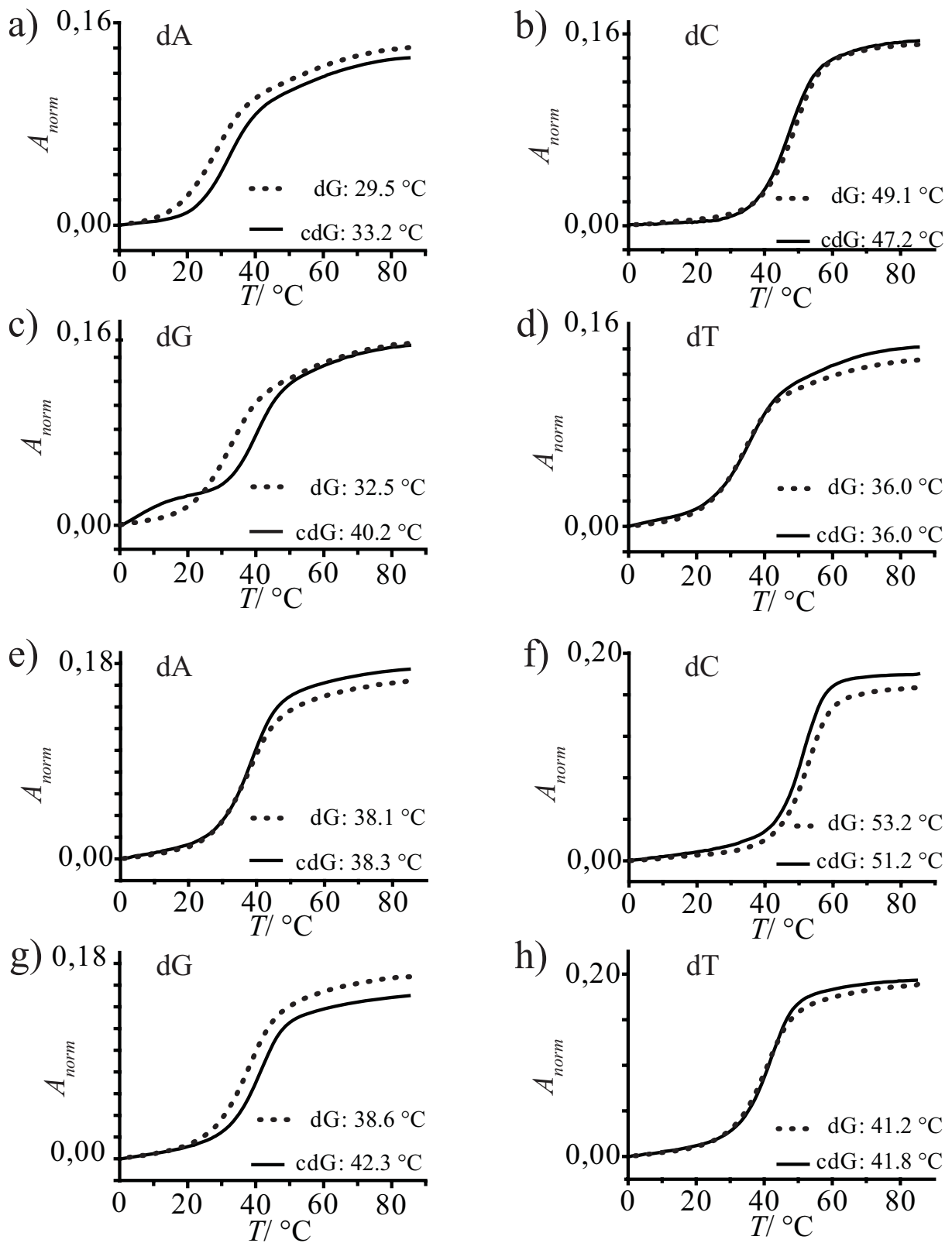


Abbildung 18: Vergleich der Schmelzkurven von ODN1a/ODN1b (cdG, durchgezogene Linie) mit ODN3a/ODN3b (dG, gepunktete Linie, a-d) und von ODN2a/ODN2b (cdG, durchgezogene Linie) mit ODN4a/ODN4b (dG, gepunktete Linie, e-h), bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  ODN.

Da auch die Sequenz des ODN einen gewissen Einfluss auf das Schmelzverhalten hat, wurde die Messung mit zwei verschiedenen ODN, mit einer Länge von 11 bzw. 12 Nukleotiden durchgeführt. Die verwendeten ODN wurden jeweils mit komplementären Sequenzen hybridisiert, die gegenüber cdG, bzw. dG die Nukleotide dA, dC, dG und T enthielten. **Abbildung 18** zeigt die UV-Schmelzkurven der unmodifizierten Doppelstränge **ODN3a/ODN3b** und **ODN4a/ODN4b** (gestrichelte Linie) zusammen mit denen der mit cdG modifizierten Doppelstränge **ODN1a/ODN1b** und **ODN2a/ODN2b** (durchgezogene Linie), bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ODN. Man erkennt die gute Übereinstimmung der Schmelzkurven der unmodifizierten mit denen der carbocyclisch modifizierten ODN. Das carbocyclische Analogon cdG zeigt dieselben Paarungseigenschaften mit ähnlichen Schmelzpunkten wie sein natürliches Pendant: Die Schmelzpunkte der Doppelstränge mit dA, dG und T als Fehlpaarungen liegen deutlich unter denen der Doppelstränge, bei denen dC die Gegenbase von cdG ist. Dabei fällt auf, dass Doppelstränge mit dem natürlichen dG:dC Watson-Crick-Basenpaar einen höheren Schmelzpunkt haben als solche, die das carbocyclisch modifizierte cdG:dC-Basenpaar enthalten. Hingegen erscheint der Schmelzpunkt von ODN mit einer cdG:dG-Fehlpaarung etwas höher zu sein, als der Schmelzpunkt von ODN mit dem natürlichen dG:dG Fehlpaar. ODN mit dA- oder T-Fehlpaarungen hatten im Rahmen der Messungengenauigkeit den gleichen Schmelzpunkt. Das mit cdG modifizierte **ODN1a/ODN1b** (**Abbildung 18c**, gestrichelte Linie) zeigt beim cdG:dG Fehlpaar ein biphasisches Schmelzverhalten, denn ein zweiter Schmelzpunkt ist im Bereich von 10 °C zu erkennen.

Um die dargestellten Beobachtungen auf eine quantitative Basis stellen zu können, wurden von allen ODN die UV-Schmelzkurven bei verschiedenen Konzentrationen (0.3 – 27  $\mu\text{M}$ ) gemessen und die thermodynamischen Parameter  $\Delta G^{\circ}_{298\text{K}}$ ,  $\Delta H^{\circ}$  und  $\Delta S^{\circ}$  durch lineare Regression mithilfe der Gleichung Gl. 2.7 aus den Van't-Hoff-Diagrammen gewonnen (**Abbildung 19**).

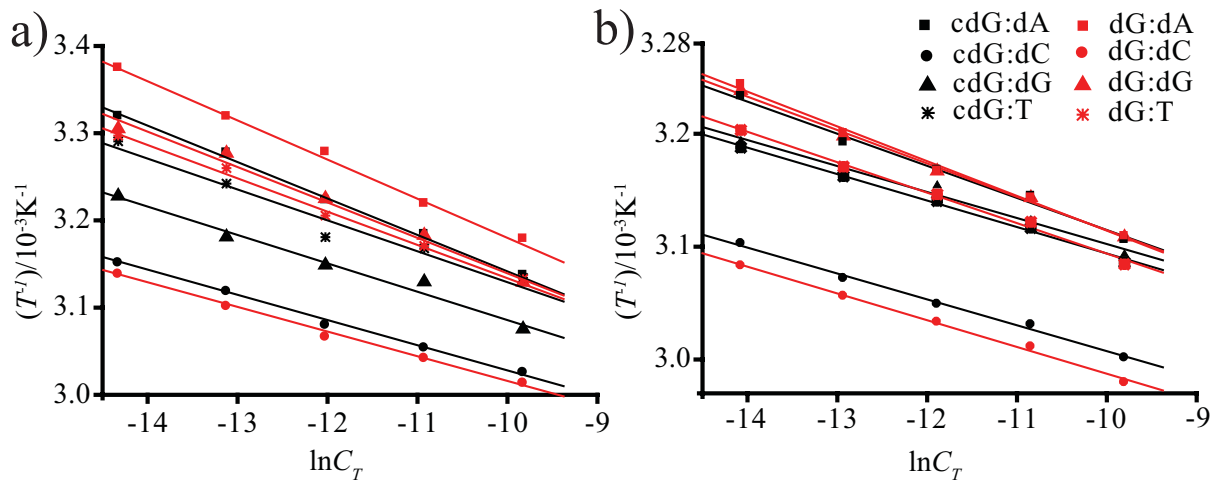


Abbildung 19: Van't-Hoff-Diagramme der Schmelzpunktmessungen von a) **ODN1a/ODN1b** (cdG, schwarz) und **ODN3a/ODN3b** (dG, rot) sowie von b) **ODN2a/ODN2b** (cdG, schwarz) und **ODN4a/ODN4b** (dG, rot). Aus der Steigung kann die Dissoziationsenthalpie und am Achsenabschnitt die Schmelzentropie berechnet werden.

Wie bereits erwähnt, lässt sich aus der Steigung der Geraden die Dissoziationsenthalpie und aus dem Achsenabschnitt die Schmelzentropie bestimmen. Die Kurven sind wenig anschaulich, da sich die Steigung einzelner Geraden nur schwer mit dem bloßen Auge vergleichen lässt. Man erkennt aber, dass die Schmelzentropie von cdG-Fehlpaarungen generell größer ist, als die von dG-Fehlpaarungen. Umgekehrt hat das natürliche dG:dC Watson-Crick-Basenpaar die größere Schmelzentropie als das carbocyclisch modifizierte cdG:dC Basenpaar. Die gewonnenen Werte für die Dissoziationsenthalpie  $\Delta H^\circ$ , die Schmelzentropie  $\Delta S^\circ$  und die freie Dissoziationsenthalpie  $\Delta G^\circ$  sind in **Tabelle 5** eingetragen. Die Beträge der freien Dissoziationsenthalpie sind in **Abbildung 20** grafisch dargestellt.

Tabelle 5: Die thermodynamischen Werte der Basenpaarung von dG und cdG im Vergleich

ODN	Basenpaar	$T_m^{[a]}$ [°C]	$\Delta G^\circ_{298K}$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H^\circ$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S^\circ$ [cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]
<b>ODN1a/ODN1b</b>	cdG:dA	33.2	-9.8 ± 4.3	-49 ± 2.2	-130 ± 7.0
<b>ODN1a/ODN1b</b>	cdG:dC	47.2	-13.5 ± 5.1	-70 ± 2.6	-191 ± 8.1
<b>ODN1a/ODN1b</b>	cdG:dG	40.2	-11.7 ± 5.1	-62 ± 2.5	-170 ± 8.7
<b>ODN1a/ODN1b</b>	cdG:T	36.0	-10.5 ± 5.5	-57 ± 2.6	-157 ± 9.6
<b>ODN3a/ODN3b</b>	dG:dA	29.5	-9.0 ± 2.3	-46 ± 1.1	-122 ± 3.8
<b>ODN3a/ODN3b</b>	dG:dC	49.1	-14.2 ± 2.9	-74 ± 1.5	-199 ± 4.7
<b>ODN3a/ODN3b</b>	dG:dG	32.5	-9.9 ± 1.3	-51 ± 0.7	-137 ± 2.2
<b>ODN3a/ODN3b</b>	dG:T	36.0	-10.3 ± 3.5	-54 ± 1.8	-146 ± 5.7
<b>ODN2a/ODN2b</b>	cdG:dA	38.3	-11.5 ± 5.0	-70 ± 1.3	-196 ± 12.6
<b>ODN2a/ODN2b</b>	cdG:dC	51.2	-15.6 ± 5.2	-87 ± 1.7	-238 ± 11.5
<b>ODN2a/ODN2b</b>	cdG:dG	42.3	-13.0 ± 4.9	-86 ± 1.7	-245 ± 10.8
<b>ODN2a/ODN2b</b>	cdG:T	41.8	-12.9 ± 6.7	-82 ± 2.4	-232 ± 14.6
<b>ODN4a/ODN4b</b>	dG:dA	38.1	-11.5 ± 2.5	-68 ± 1.3	-189 ± 4.1
<b>ODN4a/ODN4b</b>	dG:dC	53.2	-16.0 ± 4.3	-85 ± 2.3	-231 ± 6.9
<b>ODN4a/ODN4b</b>	dG:dG	38.6	-11.5 ± 3.0	-68 ± 1.5	-190 ± 4.9
<b>ODN4a/ODN4b</b>	dG:T	41.2	-12.4 ± 1.7	-73 ± 0.9	-204 ± 2.7

a) bei 1  $\mu$ M DNA Konzentration

Die bereits aus den Schmelzkurven in **Abbildung 18** gewonnenen Erkenntnisse bestätigen sich beim Betrachten von **Tabelle 5** und **Abbildung 20**. Das natürliche dG:dC-Watson-Crick-Basenpaar ist gegenüber dem carbocyclischen cdG:dC Basenpaar leicht stabilisiert. Hingegen ist das natürliche dG:dG-Fehlpaar im Vergleich mit dem carbocyclischen cdG:dG-Fehlpaar sogar noch etwas stärker destabilisiert. Dieser Trend scheint sich, wenn auch in geringerem Ausmaß, bei den anderen Fehlpaarungen fortzusetzen. Das heißt, beim natürlichen dG ist der Unterschied zwischen Fehlpaarung und korrekter Watson-Crick-Paarung deutlicher als beim carbocyclischen cdG.

Abschließend kann man sagen, dass die carbocyclische Modifikation, zumindest im Fall von Guanosin, keinen deutlichen Einfluss auf die Stabilität der Basenpaarung hat. Die carbocyclische Modifikation ist somit ein sehr gutes Modell für ein natürliches Nukleosid.



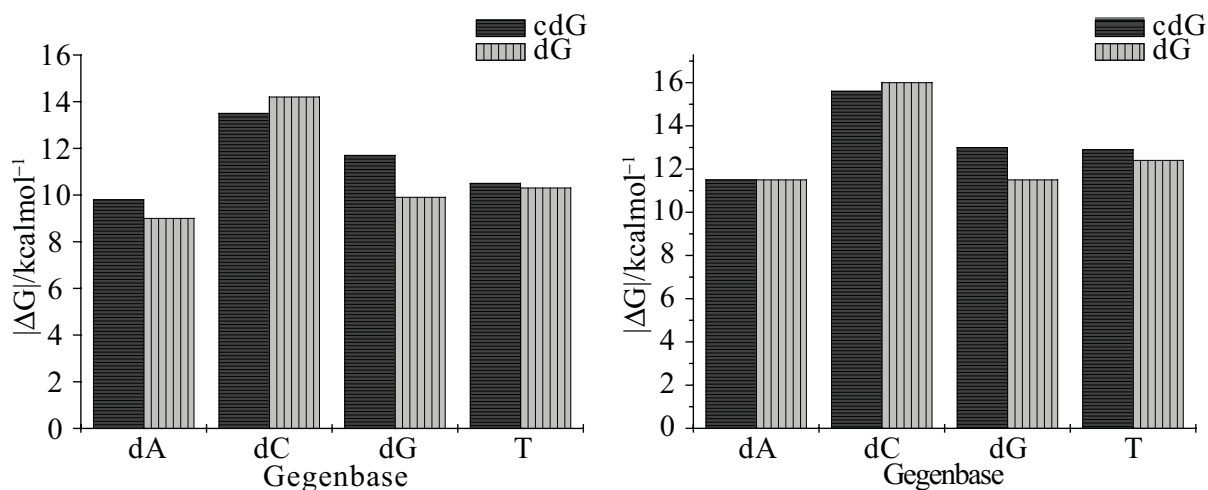


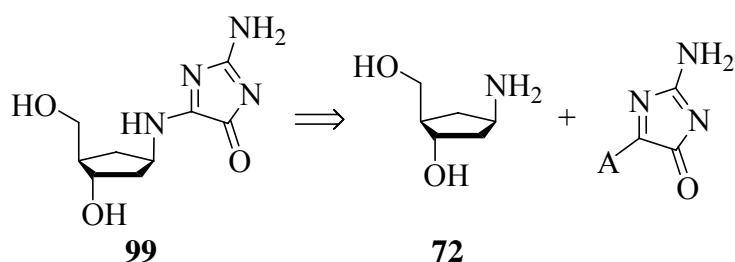
Abbildung 20: Die Beträge der freien Dissoziationsenthalpie des Schmelzvorgangs von cdG und dG mit den jeweiligen Gegenbasen im Vergleich. a) ODN1a/ODN1b (cdG) und ODN3a/ODN3b (dG), b) ODN2a/ODN2b (cdG) und ODN4a/ODN4b (dG).

#### 4.4 Oxidation der carbocyclisch modifizierten Nukleoside und ODN

##### 4.4.1 Carbocyclische Analoga des Imidazol DNA-Schaden

###### 4.4.1.1 Überlegungen zur Synthese von Imidazol

Eine Reihe 4,5-disubstituierter 2-Aminoimidazole sind synthetisch zugänglich.<sup>[195-198]</sup> Zur Synthese eines carbocyclischen Analogons des Imidazol DNA-Schadens (cdIz, **99**) müsste es gelingen, das substituierte 2-Aminoimidazol mit dem Cyclopentylamin **72** zu verbinden (*Schema 32*). Das Produkt **99** müsste nach der Schützung mit DMTCl am 5'-OH zum entsprechenden Phosphoramidit umgesetzt werden. Bei den 2-Aminoimidazolen handelt es sich zumeist um relativ schlecht lösliche Verbindungen, deren Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie voraussichtlich wenig aussagekräftig sein würde. Eine aufwendige Schutzgruppenstrategie zur Synthese des Phosphoramiditbausteins und für die DNA-Synthese wäre unumgänglich.



Schema 32: Retrosynthetische Analyse von cdIz **99**. A = Abgangsgruppe.

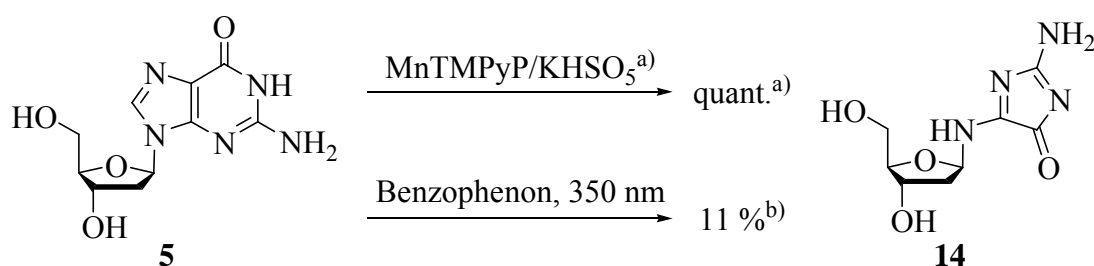
Gegen eine Direktsynthese von **99** und dessen Umwandlung in ein entsprechendes Phosphoramidit spricht vor allem die zu erwartende hohe Hydrolyseempfindlichkeit, insbesondere im basischen Milieu, wie sie von dIz **14** bekannt ist. Diese Tatsache schließt eine DNA-Synthese mit einem cdIz-Phosphoramidit unter normalen Bedingungen praktisch aus, da sämtliche Schutzgruppen der kommerziell erhältlichen Phosphoramidite basisch abgespalten werden. Zwar gibt es Phosphoramidite, die ohne basenlabile Schutzgruppen auskommen, diese sind jedoch nicht kommerziell erhältlich und lassen sich nur mit hohem Aufwand für alle vier Nucleoside synthetisieren.<sup>[199]</sup>

Die Synthese eines carbocyclischen Imidazolons durch selektive Oxidation von cdG in einem ODN mag zunächst wenig effizient erscheinen (siehe Kapitel 3.7). Nach der aufwendigen Synthese eines cG-Phosphoramidits **84** und dessen Einbau in ein ODN wird ein Großteil anschließend durch Oxidation zerstört, um einen kleinen Teil in das gewünschte Substrat umzuwandeln. Mit dieser Strategie umgeht man aber das Problem der Basenlabilität von cdIz **99**, da es in einem bereits fertig gestellten ODN erzeugt werden würde. Weiterhin ist die Oxidation von dG **5** zu dIz **14** eine gut untersuchte Reaktion (siehe Kapitel 3.3), so dass man auf eine große Zahl von veröffentlichten Synthesewegen zurückgreifen kann. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Synthese von cdIz an definierter Position in einem ODN durch Oxidation eines entsprechenden Vorläufermoleküls wesentlich aussichtsreicher erschien, und als Strategie im Rahmen dieser Arbeit vorrangig verfolgt wurde.

#### 4.4.1.2 Synthese von cdIz durch Oxidation von cdG

Wegen der im Vergleich zur Synthese von cdOG **93** deutlich besseren Ausbeute bei der Synthese von cdG **70**, sollte cdIz **99** durch die Oxidation von cdG **70** dargestellt werden. Zwei Strategien, bei denen die Oxidation von dG **5** zu dIz **14** besonders effizient verläuft, wurden als aussichtsreich zur Synthese von cdIz **99** identifiziert (*Schema 33*).

Meunier *et al.* beschreiben die Oxidation von dG **5** mit  $\text{KHSO}_5$  und  $\text{Mn(III)-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21H,23H-porphinacetat-tetrakis-(methoacetat)}$  ( $\text{MnTMPyP}$ , **112**).<sup>[43]</sup> Die Reaktion verläuft nach dem Mechanismus einer Zweielektronenoxidation unter Bildung von  $\text{G}^+$  **16** und anschließender Addition von  $\text{HSO}_5^-$  (Mechanismus siehe **Kapitel 3.3.1.2**). Dabei bildet sich nahezu quantitativ dIz **14**, ohne Bildung von dOG **8** als Nebenprodukt oder Intermediat. Die Oxidation von dG **5** zu dIz **14** ist auch mit UV-A Licht der Wellenlänge  $\lambda = 350 \text{ nm}$  und in Gegenwart von Benzophenon oder Riboflavin als Typ-I Photosensibilisator möglich.<sup>[38, 40]</sup> Dabei bildet sich dIz **14** mit einer Ausbeute von etwa 11 % als das Hauptprodukt der Reaktion. Das zunächst gebildete  $\text{dG}^{+\bullet}$  **6**, bzw.  $[\text{dG-H}^+]^{\bullet}$  **9** wird von Superoxidradikalanionen abgefangen, die von Benzophenon (oder Riboflavin) und Luftsauerstoff gebildet werden (Mechanismus siehe Kapitel 3.3.1.1).



Schema 33: Verschiedene Möglichkeiten zur Synthese von dIz **14** aus Guanosin(-derivaten).  
a)<sup>[43]</sup> b)<sup>[38]</sup>.

Die Oxidation von dG **5** zu dIz **14** mit  $\text{KHSO}_5$  in Gegenwart von katalytischen Mengen  $\text{MnTMPyP}$  **112** verläuft sehr rasch.<sup>[43]</sup> Bereits nach einer Minute Reaktionszeit ist das Edukt komplett umgesetzt. Interessanterweise ließ sich diese Oxidation problemlos auf das carbocyclische Substrat cdG **70** übertragen und lieferte genauso zuverlässig cdIz **99** (**Abbildung 21**). Nach einer Minute Reaktionszeit in neutralem Triethylammoniumacetat Puffer wurde die Reaktion durch Zusatz von HEPES Puffer gestoppt und die Reaktionsmischung mittels *reversed-phase* HPLC getrennt. Die vollständige Umsetzung war einfach zu verfolgen, da die Retentionszeit des Produkts **99** deutlich kürzer war als die des Edukts **70**.

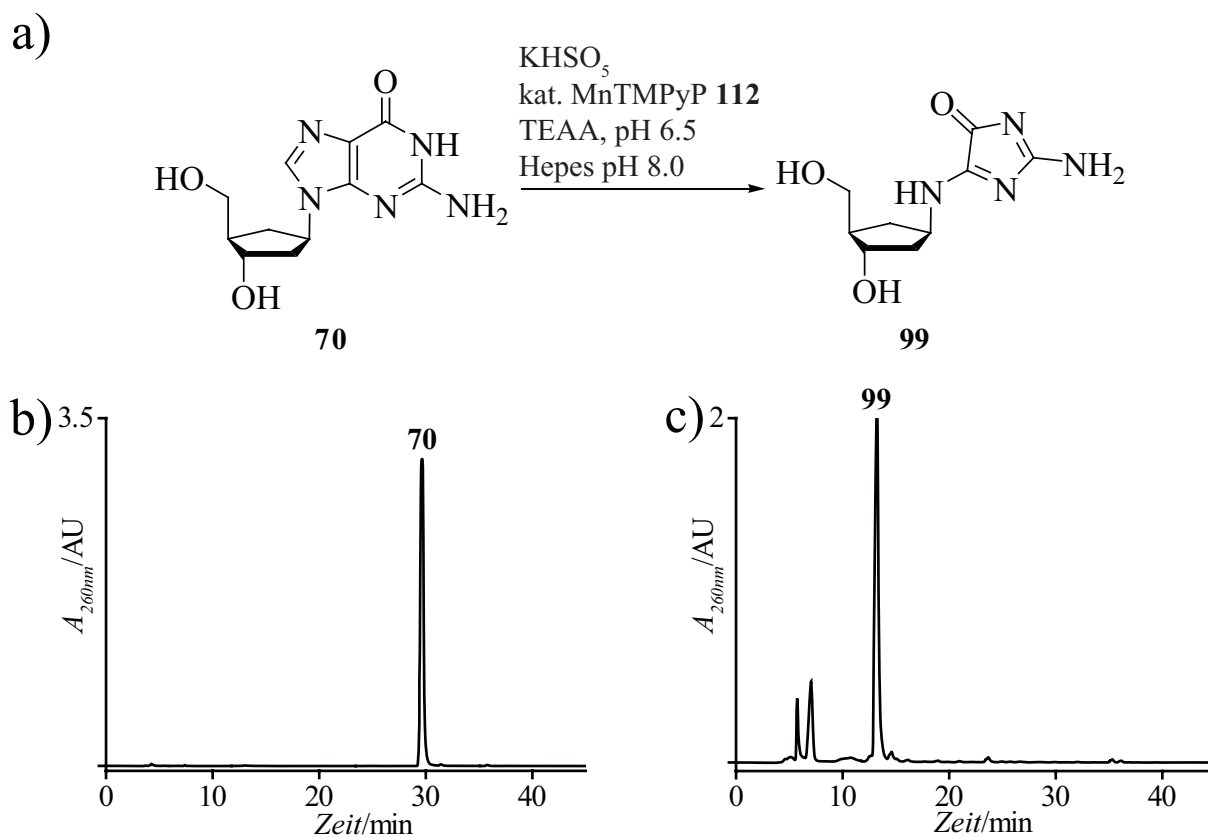
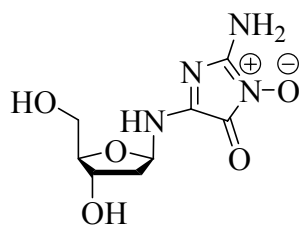


Abbildung 21: a) Oxidation von **70** zu **99** mit  $\text{KHSO}_5$  und MnTMPyP, b) **70** vor der Reaktion und c) Produkt **99** nach 1 min Reaktionszeit bei RT. Reversed-phase HPLC mit Puffersystem **P1** und Gradient von 0 – 15 % B in 45 min, auf einer Macherey-Nagel Nucleodur 120×3 Säule.

Bereits geringe Zusätze des Katalysators MnTMPyP **112** von etwa 4 mol% gewährleisteten eine vollständige Umsetzung. Das verwendete tiefrotbraune MnTMPyP **112** war als Chlorid kommerziell erhältlich und wurde an stark basischem Anionentauscher (DOWEX 1×8) in das Acetat überführt und mit 0.1 M Silbernitratlösung auf Chloridfreiheit überprüft. Das Oxidationsmittel Kaliummonopersulfat ( $\text{KHSO}_5$ ) wurde als stabiles Tripel-Salz  $\text{K}_5(\text{HSO}_5)_2(\text{HSO}_4)(\text{SO}_4)$  bezogen und in dieser Form eingesetzt. Die durch den Katalysator leicht gelb gefärbte Reaktionslösung wurde einige Sekunden nach Zugabe des Oxidationsmittels entfärbt. Die Reaktion musste nach vollständiger Umsetzung durch Zugabe von Hepes Puffer gestoppt werden, um ein Überoxidieren von cdIz zum carbocyclischen Imidazolone-*N*-oxid **101** zu verhindern, wie es für das natürliche Imidazolone beobachtet wurde (Abbildung 22).<sup>[43]</sup>



101

Abbildung 22: Imidazolone-N-oxid

Die bei einer Retentionszeit von 13 min eluierte Substanz wurde aufgefangen und mit HR-ESI Spektrometrie analysiert (**Abbildung 23a**). Das Spektrum zeigte neben dem Signal des  $[M-H^+]^-$ -Ions bei  $m/z = 225.0995$ , das Ameisensäureaddukt von cdIz **99**  $[M+FA-H^+]^-$  bei  $m/z = 271.1049$ . Die Werte beider Signale stimmen sehr gut mit den für diese Ionen berechneten Molekulargewichten von  $m/z = 225.0993$  für das  $[M-H^+]^-$ -Ion bzw.  $m/z = 271.1048$  für das  $[M+FA-H^+]^-$ -Ion überein. Das MS/MS Spektrum des Signals bei  $m/z = 225.0995$  zeigte neben dem Signal der Nucleobase  $[Base-H^+]^-$  bei  $m/z = 110.9$  noch zwei weitere Signale: Eines bei  $m/z = 155.0$  und eines bei  $m/z = 182.0$ . Beide sind das Resultat von entsprechenden Fragmentierungsreaktionen (**Abbildung 23b**).

Beim Vergleich des UV/VIS-Spektren von cdIz **99** mit dem des natürlichen Schadens **14** erkennt man bei beiden Spektren die gleichen Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 255$  und  $325$  nm. Die zur Aufnahme eines NMR-Spektrums von **99** benötigten größeren Substanzmengen wurden durch lineares Vergrößern der Reaktionsmengen bereitgestellt. Trotz des um den Faktor 1:160 vergrößerten Reaktionsvolumens verlief die Reaktion genauso problemlos und mit denselben Ausbeuten wie zuvor. Die Aufreinigung von **99** erfolgte wiederum durch *reversed-phase* HPLC mit Puffersystem **P1** und einem Gradient von 0 – 15 % Puffer B in 45 min, auf einer Macherey-Nagel *Nucleodur* 250×10 Säule. Die aufgefangenen Fraktionen wurden lyophilisiert und das NMR-Spektrum in  $[D_6]$ -DMSO aufgenommen (siehe Kapitel 5.6).

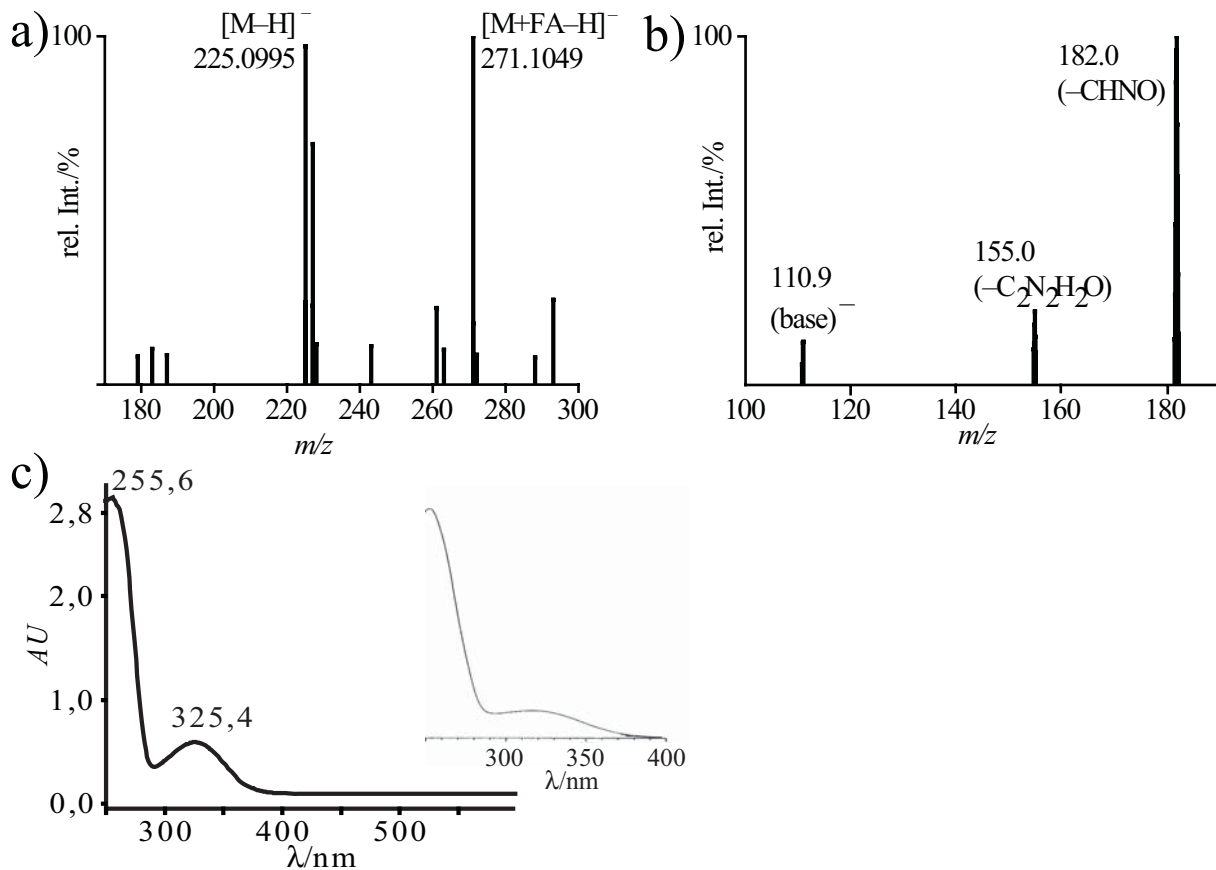


Abbildung 23: a) Negativ-Modus ESI-MS Spektrum von **99** zeigt die Signale des  $[M-H]^-$ -Ions und des Ameisensäureaddukts  $[M+FA-H]^-$  bei  $m/z = 225.0995$  (berechnet:  $m/z = 225.0993$ ) bzw.  $m/z = 271.1049$  (berechnet:  $m/z = 271.1048$ ), b) Die MS/MS-Fragmentierung des Signals bei  $m/z = 225.0995$  mit 35 eV und c) UV/VIS-Spektrum von **99** im Vergleich mit dem UV/VIS-Spektrum von dIz **14** (Einsatz).

#### 4.4.1.3 Synthese von cdIz im Oligonukleotid

Die Effizienz und Selektivität der Oxidation von cdG **70** zu cdIz **99** mit MnTMPyP/KHSO<sub>5</sub> ließ sich nicht auf ein ODN als Substrat übertragen. Guanin in Einzelstrang DNA wird von KHSO<sub>5</sub> in Gegenwart von MnTMPyP **112** zu einer Reihe von DNA Schäden oxidiert,<sup>[45]</sup> darunter Dehydroguanidinohydantoin **19**, Parabansäure **20**, Oxalursäure **21** und Imidazoln **14**. Gleichzeitig katalysiert MnTMPyP **112**, vergleichbar einer „chemischen Nuklease“, die vielfache und unselektive Spaltung des DNA Stranges. Entsprechende Versuche, die erfolgreichen Ergebnisse von Kapitel 4.4.1.2 auf die Einzelstrangoxidation zu übertragen, schlugen fehl. Als Alternative stand die Typ-I Photooxidation mit UV-A Licht in Gegenwart von Riboflavin zur Verfügung. Es ist unter diesen Bedingungen jedoch nicht möglich,

selektiv nur ein bestimmtes dG oder cdG im ODN zu oxidieren. Folglich musste die Sequenz des zu belichtenden ODN so gewählt werden, dass außer dem zu oxidierenden cdG keine weiteren Guanine und keine anderen leicht oxidierbaren Basen wie z.B. dOG vorhanden waren. Eine weitere Einschränkung stellte die zu erwartende, im Vergleich zur Nukleosidoxidation deutlich schlechtere Ausbeute an cdIz dar. Deshalb sollte das verwendete ODN möglichst kurz sein, denn die Aufreinigung des Produkt-ODN wird mit zunehmender Sequenzlänge immer schwieriger.

Die zur Photooxidation verwendete Belichtungsapparatur ist in **Abbildung 24** dargestellt. Als Leuchtmittel diente eine 1000 W Hg-Kurzbogenlampe, deren Ausgangsleistung auf 500 W reguliert wurde. Die Belichtungswellenlänge wurde durch einen wassergekühlten Filter eingestellt, der über die in **Abbildung 24b** dargestellte Absorptionscharakteristik verfügte. Die 200  $\mu\text{L}$  Probenküvette verfügte über eine Schichtdicke von 1 mm, war aus Quarzglas und befand sich unmittelbar hinter dem Filter.

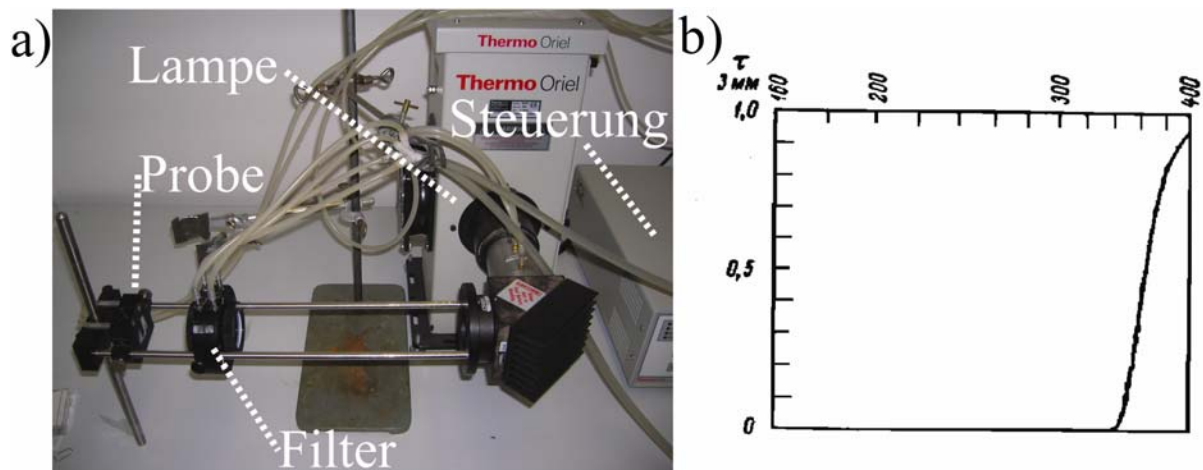


Abbildung 24: a) Foto der Belichtungsapparatur mit gekühltem Filter und Probenhalterung, b) Absorption des verwendeten 365 nm cut-off Filters.

Entsprechend der von *Gasparutto et al.* veröffentlichten Vorgehensweise, wurde eine Mischung aus ODN und gesättigter Riboflavinlösung für mehrere Minuten belichtet.<sup>[200]</sup> Abweichend davon wurde der Reaktionsmischung Natriumcacodylatpuffer (pH 7.0) zugesetzt,<sup>[40]</sup> um die Reaktionsbedingungen reproduzierbar zu gestalten. Die dafür verwendeten ODN sind in **Tabelle 6** aufgelistet. Neben der Wahl der Belichtungsapparatur war die Belichtungszeit ein entscheidender, die Ausbeute und Selektivität der Reaktion bestimmender Faktor. Durch Variation der Belichtungszeiten wurde versucht, ein optimales

Verhältnis zwischen der Ausbeute an gewünschtem Produkt und der Entstehung von unerwünschten Nebenprodukten zu finden. Die Probe wurde direkt am Filter positioniert und mit einer Blende aus schwarzem Papier vor Streulicht geschützt, was die Reproduzierbarkeit der Versuche verbesserte.

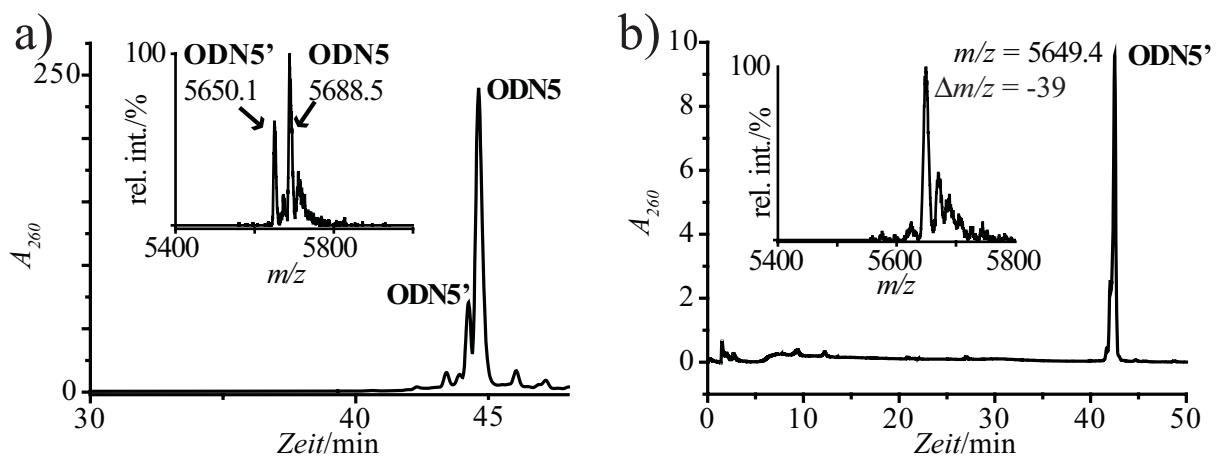
*Tabelle 6: Die für die Photooxidationsexperimente verwendeten ODN und deren Produkte. Nur isolierte und vollständig charakterisierte ODN sind mit einem eigenen Namen versehen.*

Name	Sequenz	M [m/z]
<b>ODN5</b>	5'-d(TTT <b>c</b> GTCATTCTTTTCTTTC)	5689.7
<b>ODN5'</b>	5'-d(TTT <b>cIz</b> TCATTCTTTTCTTTC)	5650.7 (- 39)
<b>ODN6</b>	5'-d(TT <b>cGc</b> GTA)	1818.1
<b>ODN6', ODN6''</b>	5'-d(TT <b>cIz</b> cGTA/5'-TT <b>cGcIz</b> TA)	1779.1 (- 39)
<b>ODN7</b>	5'-d(CTCTTT <b>c</b> GTTTCTCG)	4184.7

Die ODN-Konzentration der belichteten Lösungen betrug 0.55 mM. Bei einem Endvolumen der belichteten Probe von 2.64 µL konnte diese bequem zwischen die Quarzglaswände der Küvette platziert werden. Die Probe wurde samt Küvette vor und unmittelbar nach der Belichtung auf 0 °C gekühlt. Eine effektive Kühlung während der Belichtung war aufgrund der Geometrie der Küvette und des Versuchaufbaus nicht möglich. Die fertig belichtete Probe wurde zunächst für 20 min gegenüber Wasser dialysiert und anschließend mittels MALDI-TOF Spektrometrie untersucht. Dies erlaubte eine schnelle und effektive Umsatzkontrolle der Belichtung. Die gemessenen Werte wurden mit HR-ESI Spektrometrie überprüft. Die Auftrennung der Produktgemische mittels *reversed-phase* HPLC war nur unzureichend möglich. Bessere Trennleistungen zeigte die Anionentauschersäule *DNA Pac PA-100* der Firma Dionex. Die stationäre Phase dieser Säule besteht aus nichtporösen, 13 µm durchmessenden Kügelchen eines Trägerpolymers, auf dessen Oberfläche 100 nm große Latexpartikel haften, die ihrerseits mit quartären Alkylammoniumgruppen funktionalisiert sind, was zu einer enorm vergrößerten Oberfläche und damit zu einer deutlich verbesserten Wechselwirkung mit der Probensubstanz führt. Die eluierten Reaktionsprodukte wurden vor der anschließenden Identifikation mittels MALDI-TOF Spektrometrie gründlich entsalzt. Dazu wurde die Probe dreimal für je 20 min gegen Wasser dialysiert und anschließend im Vakuum eingengt.



Die Sequenz von **ODN5** enthält nur ein einziges cG-Nukleotid und keine weiteren natürlichen Guanine. Die Zusammensetzung der Reaktionsprodukte sollte deshalb die geringstmögliche Komplexität aufweisen. Nach einer Belichtungszeit von 5 min zeugte ein zusätzliches Signal bei  $m/z = 5650.1$  im MALDI-TOF Spektrum mit einer Differenz zum Eduktsignal von  $\Delta m/z = -39$ . Dies entspricht exakt der Differenz, die bei der Entstehung eines cdIz Schadens zu erwarten gewesen wäre (**Abbildung 25**). Das neu entstandene Produkt (**ODN5'**), dessen Molekulargewicht bei  $m/z = 5650.7$  liegt, konnte mittels Anionentauscher HPLC vom Edukt abgetrennt werden. Die Ausbeute liegt bei etwa 18 %, bezogen auf das eingesetzte **ODN5**. Die mittels MALDI-TOF Spektrometrie gewonnenen Daten konnten durch HR-ESI Spektrometrie bestätigt werden.



**Abbildung 25:** HPL-Chromatogramme mit zugehörigen MALDI-TOF Spektren von **ODN5** und **ODN5'**. Reaktionsmischung direkt nach der Photooxidation (a) und gereinigtes Produkt **ODN5'** (b). Anionentauscher HPLC auf Dionex DNA Pac-PA 100 4×250, Puffersystem **P4** und einem Gradient von 25 – 50 % Puffer B in 45 min.

Bei längerer Belichtung von **ODN5** zeigte das HR-ESI Spektrum, dass zwei Hauptprodukte entstanden waren. Neben dem Signal des  $[M-5H]^{5-}$ -Ions des bereits bekannten **ODN5'** bei  $m/z = 1128.6403$  ( $\Delta m/z = -39$ ) zeigte sich ein weiteres Signal bei  $m/z = 1137.2384$  ( $\Delta m/z = +4$ ). Das Signal des Edukt-ODN (**ODN5**) war dagegen nicht mehr auszumachen (**Abbildung 26**). Auch das HPL-Chromatogramm zeigte zwei etwa gleich große Peaks, die denen des ESI-Spektrums zugeordnet werden konnten. Bei dem hier neu entstandenen ODN-Produkt mit der Massendifferenz von  $\Delta m/z = +4$  handelt es sich vermutlich um ein carbocyclisches Dehydroguanidinohydantoin (cdDGh, **104**). Dies ist bemerkenswert, denn die Entstehung dieses Schadens wurde unter den hier beschriebenen Bedingungen noch nie

beobachtet. dDGh **19** ist bekanntermaßen instabil, was vermutlich auch für das hier erzeugte cdDGh **104** gilt und möglicherweise der Grund dafür ist, dass dieser Schaden mittels enzymatischem Totalverdau nicht näher charakterisiert werden konnte.

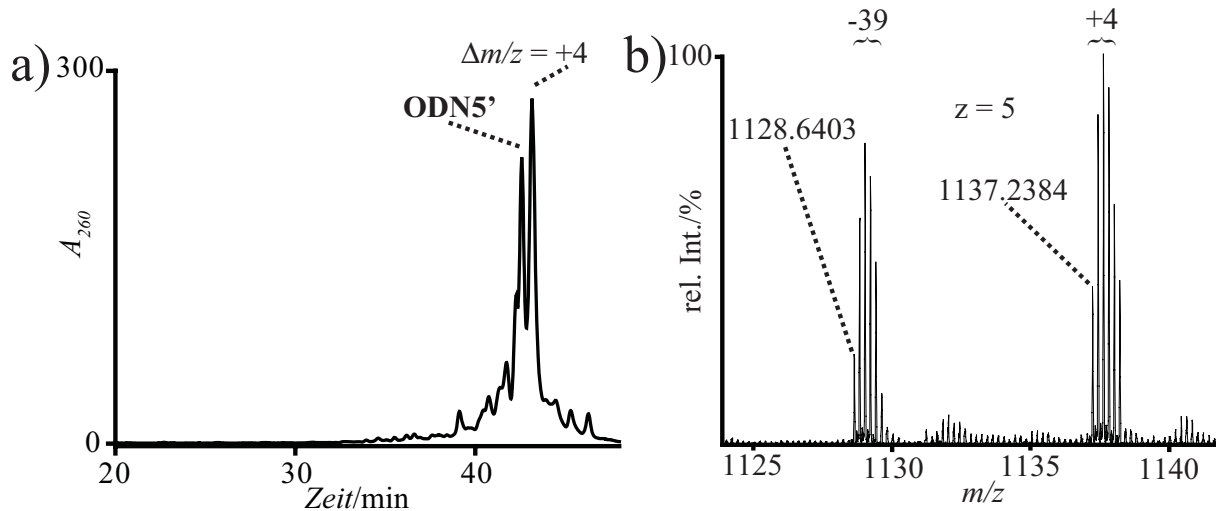


Abbildung 26: a) HPLC und b) HR-ESI von **ODN5** nach 20 min Belichtungszeit. Es sind die Signale der  $[M-5H^+]^{5-}$ -Ionen von zwei Hauptprodukten mit einer Massendifferenz von  $\Delta m/z = -39$ , bzw.  $\Delta m/z = +4$  zu erkennen, das Edukt-ODN ist nicht mehr auszumachen. HPLC auf Dionex DNA Pac-PA 100 4×250, Puffersystem **P4** und einem Gradient von 25 – 50 % Puffer B in 45 min.

Die Redoxpotentiale zweier benachbarter Guanine sind gegenüber einem einzelnen Guanin weiter reduziert, was auch für carbocyclisches Guanin gelten sollte. Aus dieser Tatsache leiten sich zwei Fragen ab. Erstens: Entsteht bei der Photooxidation eines ODN mit zwei benachbarten cdG das Produkt cdIz mit höheren Ausbeuten? Zweitens: Wird ein cdG bevorzugt oxidiert? Bei der Belichtung von **ODN6**, das zwei benachbarten cdG enthält, zeigte das HPL-Chromatogramm die Entstehung zweier Hauptprodukte.<sup>[40]</sup> Beide neu entstandenen ODN (**ODN6'** und **ODN6''**) haben ein Molekulargewicht von  $m/z = 1780.6$  und damit eine Differenz von  $\Delta m/z = -39$  zu **ODN6** (Abbildung 27). Dies zeigte auch bei diesem ODN die Entstehung von cdIz als Produkt der Photooxidation an. Die Abtrennung der Produkte vom Edukt war möglich und ergab eine Produktausbeute von 16 % bzw. 8 %. Es gelang jedoch nicht eindeutig nachzuweisen, welches der beiden cdG in **ODN6'**, bzw. **ODN6''** zum cdIz oxidiert wurde. Ein zeitabhängiger Exonuklease Verdau mit anschließender Charakterisierung der entstandenen Fragmente mittels MALDI-TOF brachte, vermutlich aufgrund einer unvollständigen Trennung der beiden Produkte **ODN6'** und **ODN6''** keine eindeutigen Ergebnisse.<sup>[201, 202]</sup>

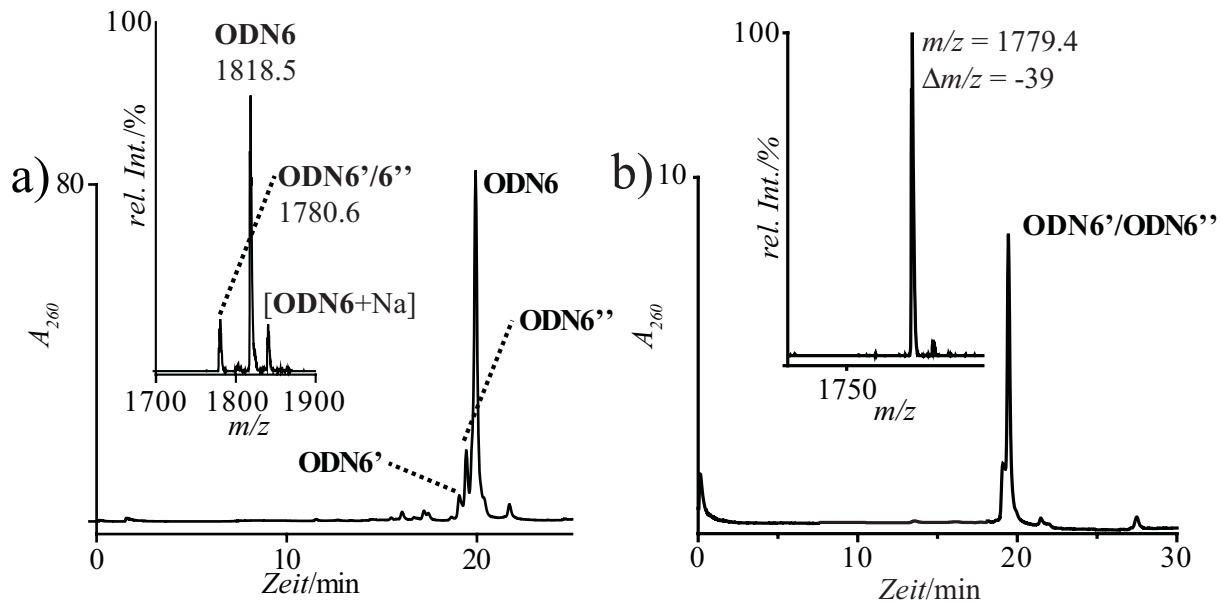


Abbildung 27: a) HPLC des photooxidierten **ODN6**, MALDI-TOF Spektrum der rohen Reaktionsmischung (Einsatz), b) HPLC des gereinigten **ODN6'/ODN6''** mit dem zugehörigen MALDI-TOF Spektrum (Einsatz). HPLC auf Dionex DNA Pac-PA 100 4×250, Puffersystem **P4** und einem Gradient von 0 – 50 % Puffer B in 45 min.

Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob sich ein cdG in Gegenwart eines dG selektiv oxidieren lässt. Bei der Photooxidation von **ODN7**, das neben cdG noch ein weiteres dG am 3'-Ende enthielt, war eine wesentlich komplexere Produktverteilung zu beobachten (**Abbildung 28**). Das HR-ESI Spektrum zeigte nach einer Belichtungszeit von 10 min neben dem Signal des  $[M-3H^+]^{3-}$ -Ions von **ODN7** bei  $m/z = 1393.2399$  noch drei weitere Signale mit einer Differenz zum Eduktsignal von  $\Delta m/z = -39, +51$  und  $+106$ . Eine Trennung der Produkte per HPLC mit einer Bestimmung der Ausbeuten erfolgte hier allerdings nicht. Eine selektive Oxidation von einem der beiden Guanine war nicht möglich, auch nicht bei kürzeren Belichtungszeiten. Abweichend von dem hier gezeigten Ergebnis wäre die zumindest anteilige Entstehung eines ODN mit zwei Imidazolonen, einem natürlichen und einem carbocyclischen, zu erwarten gewesen. Stattdessen sind neben einem Produkt mit einem einzigen dIz nur Oxidationsprodukte mit höheren Molekulargewichten als das des Edukt-ODN entstanden. Die meisten der bekannten oxidativ erzeugten DNA-Schäden weisen jedoch Molekulargewichte auf, die kleiner sind als das von Guanin. Die hier entstandenen Schäden konnten nicht näher charakterisiert werden.

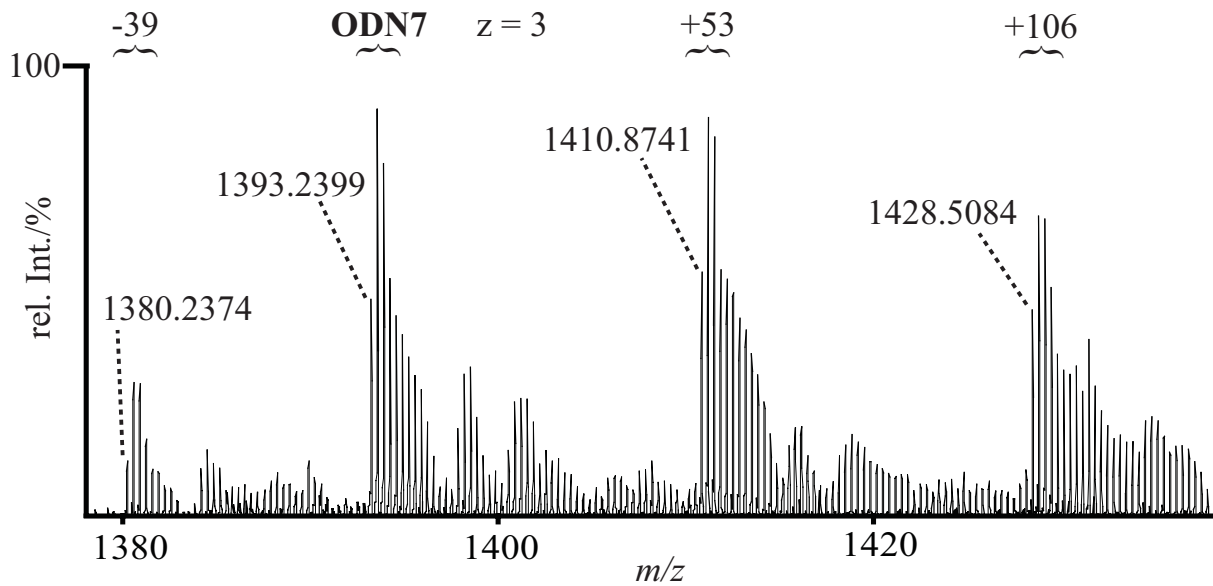


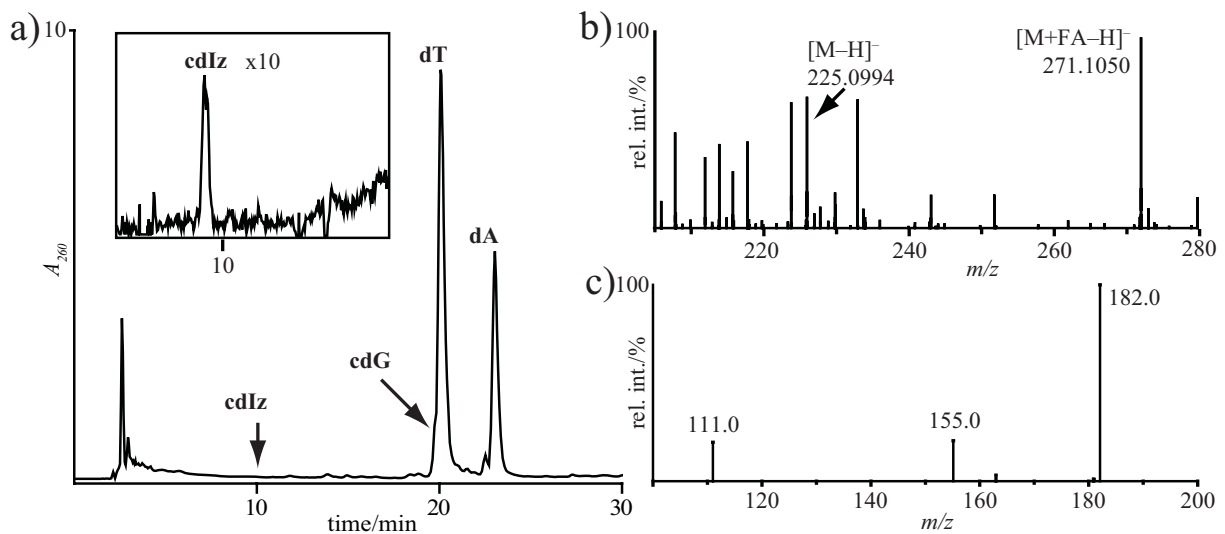
Abbildung 28: HR-ESI von **ODN7** für  $[M-3H^+]^{3-}$  nach 10 min Photooxidation. Die Werte über dem Spektrum geben die Differenz der Molekulargewichte  $\Delta m/z$  zum Molekulargewicht von **ODN7** an.

#### 4.4.1.4 Enzymatischer Totalverdau

Um die Existenz von cdIz im belichteten ODN zu beweisen, wurde **ODN6'/ODN6''** mit einer Mischung aus Nuklease *P1* (*Penicillium citrinum*), *Antarctic Shrimp* Phosphatase und Phosphodiesterase-II (*calf-spleen*) enzymatisch abgebaut und in die einzelnen Nucleoside zerlegt. Dieses Nucleosidgemisch wurde dann durch HPLC-MS Experimente charakterisiert. Die Fragmentierung des cdIz-Signals und der Vergleich des Fragmentierungsmusters mit dem von Verbindung **99** (Kapitel 4.4.1.2) ermöglichte eine verlässliche Charakterisierung des durch Belichten von **ODN6** entstandenen cdIz. Der Totalverdau des kurzen 6-mers **ODN6** bot sich an, da dieses nur einen verhältnismäßig kleinen Überschuss an ungeschädigten Nucleosiden hatte und dies die Detektion von cdIz während des HPLC-MS Experiments erleichterte. Weiterhin musste eine niedrige Inkubationstemperatur und -zeit gewählt werden, da der Imidazolone-Heterozyklus bei erhöhter Temperatur oder im basischen Milieu hydrolyseempfindlich ist. Unter den hier gewählten milden Bedingungen wäre bei Verwendung eines langen ODN mit einem unvollständigen Abbau zu rechnen gewesen.

Die belichtete Menge an **ODN6** wurde um den Faktor 1:5 linear vergrößert und die belichtete Reaktionsmischung für 20 min gegen Wasser dialysiert. Die entsalzte Lösung wurde mit

Ammoniumacetatpuffer (pH 5.7) versetzt, für 2 h bei 30 °C mit der Enzymmischung inkubiert und anschließend direkt per HPLC-MS analysiert. (*Abbildung 29*).



*Abbildung 29: Enzymatischer Totalverdau des belichteten ODN6. a) UV Signale der einzelnen Nucleoside, das cdIz Signal ist 10-fach vergrößert dargestellt, b) HR-ESI Spektrum von cdIz bei einer Retentionszeit von 9 min, c) MS/MS Spektrum des  $[M-H]^+$  Signals bei  $m/z = 225.0994$  bei einer Fragmentierungsenergie von 35 eV.*

Das HPL-Chromatogramm zeigt die zwei Peaks von T und dA. Die kleine Schulter vor dem großen T Signal stammt von nicht oxidiertem cG. Das UV-Signal von cdIz ist lediglich in der Vergrößerung sichtbar, denn ein Teil des ohnehin nur zu einem kleinen Prozentsatz entstandenen cdIz war trotz der Vorsichtsmaßnahmen vermutlich bereits hydrolysiert. Weiterhin ist der Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{260}$  von cdIz bei der Detektionswellenlänge von  $\lambda = 260$  nm im Vergleich zu den Absorptionskoeffizienten der ungeschädigten Nucleoside eher klein.<sup>[43]</sup> Dennoch konnte das beim Totalverdau freigesetzte cdIz anhand seines Signals bei  $m/z = 225.0994$  eindeutig nachgewiesen werden (berechnet für  $[M-H]^+$  von cdIz:  $m/z = 225.0993$ ). Darüber hinaus war das Fragmentierungsmuster dieses Signals bei einer Ionisierungsenergie von 35 eV identisch mit dem der Fragmentierung von **99** in Kapitel 4.4.1.2.

## 4.4.1.5 Hydrolyse von cdIz

Die carbocyclische Modifikation schützt das Schadensanalogon **99** nicht vor Hydrolyse. Eine Bestimmung der hydrolytischen Halbwertszeit von **99** sollte allerdings zeigen, ob die carbocyclische Modifikation einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse hat. Dazu wurde eine Lösung von **99** in Phosphatpuffer bei pH 7.0 und 37 °C inkubiert. Nach jeweils 1, 2, 5, 7, und 8 h wurde eine Probe entnommen und mittels HPLC analysiert.

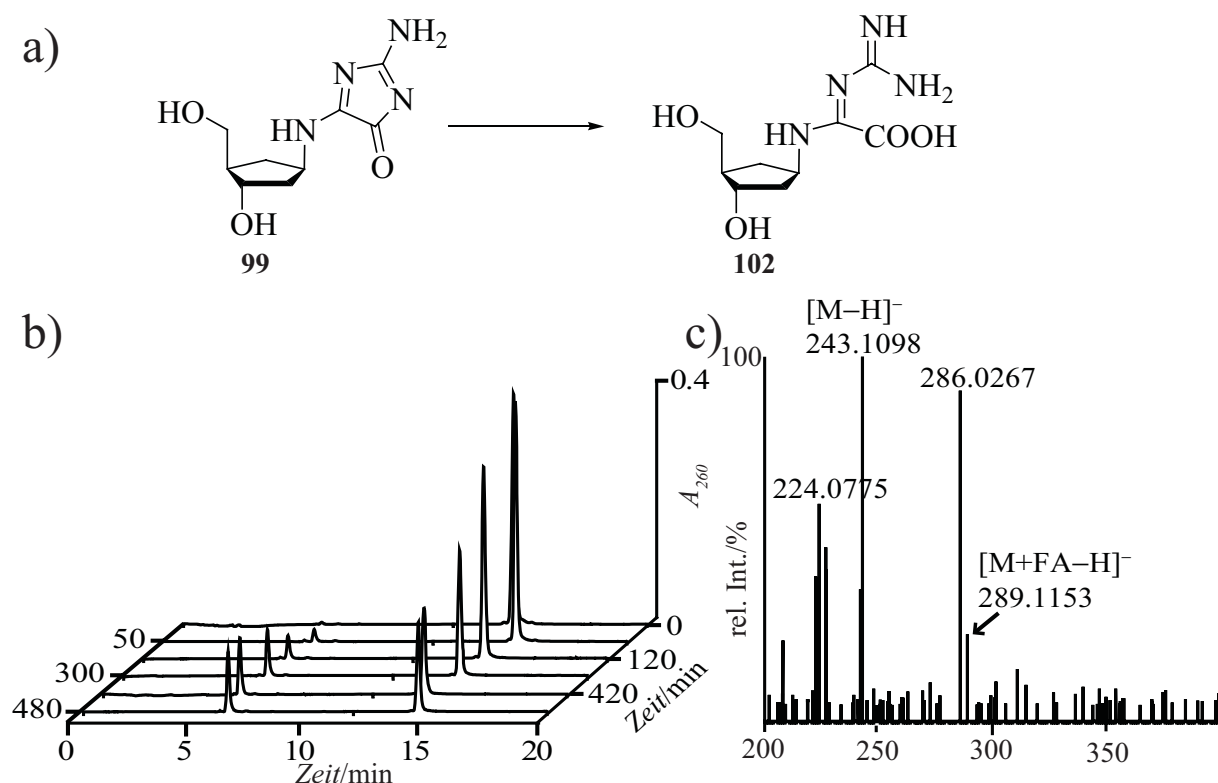


Abbildung 30: a) Inkubation von **99** in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.0, bei 37 °C, b) HPL-Chromatogramme nach verschiedenen Inkubationszeiten, c) HR-ESI Massenspektrum der bei 7 min eluierten Substanz zeigt das Molekulargewicht von carbozyklischem Oxazolone (cdZ, **102**).

Die Integrale der Peaks bei 13 min Retentionszeit wurden bestimmt und anschließend, wie in **Abbildung 30** dargestellt, gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die beobachtete Abnahme der Peakfläche wurde mit einer Exponentialfunktion ersten Grades genähert, anhand derer sich die Halbwertszeit von **99** unter den geschilderten Bedingungen zu  $t_{1/2} = 304.1 \text{ min} \pm 5.3 \text{ min}$  berechnen ließ (**Abbildung 31**). Bei der Hydrolyse entsteht nur ein neues UV aktives Produkt, das mit einer Retentionszeit von 7 min unter den hier geschilderten

Bedingungen deutlich früher eluiert als **99**. Das Massenspektrum dieses Peak zeigt ein Signal bei  $m/z = 243.1098$ . Dieses entspricht dem Molekulargewicht, wie es für das  $[M-H]^+$ -Ion des carbozyklische Oxazolone **102** zu erwarten wäre (berechnet für  $[M-H]^+$ :  $m/z = 243.1099$ ).

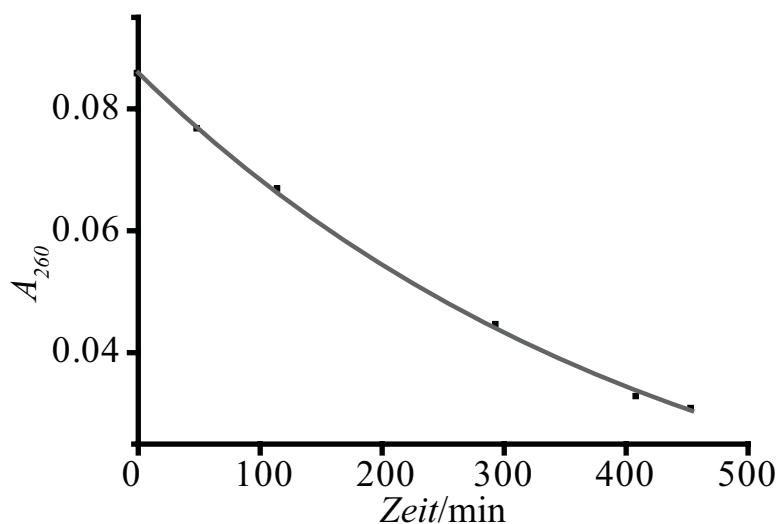


Abbildung 31: Hydrolyse von **99** bei 37 °C in Phosphatpuffer bei pH 7.0. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  dieser Reaktion beträgt etwa 5 h.

Vergleicht man diesen Wert mit dem literaturbekannten Wert für die Halbwertszeit für dIz **14** von 147 min,<sup>[38]</sup> so zeigt sich eine Abweichung um den Faktor 2. Wie erwartet schützt die carbozyklische Modifikation den Imidazolone Heterozyklus also nicht vor Hydrolyse. Allerdings wird dieser unter den hier beschriebenen Bedingungen auch nicht destabilisiert. Die Stabilität von dIz ist im Einzel- und vor allem im Doppelstrang deutlich größer als im Nukleosid.<sup>[180]</sup> Diese Charakteristik ist auch für das carbozyklische Analogon zu erwarten und stellt eine gute Nachricht für zukünftige Kristallisationsexperimente mit cdIz enthaltender Doppelstrang-DNA dar.

Tabelle 7: Stabilität von dIz im Nukleosid und im ODN.

	$t_{1/2}$
Nukleosid (natürlich) <sup>[a]</sup>	2.5 h
Nukleosid (carbozyklisch) <sup>[b]</sup>	5 h
Einzelstrang DNA <sup>[a]</sup>	16.8 h
Doppelstrang DNA <sup>[a]</sup>	20.4 h

a)<sup>[180]</sup>, b) gemessen

#### 4.4.1.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die beschriebenen Experimente zeigen, dass die Synthese von cdIz durch die Oxidation von cdG sowohl im Nukleosid als auch im ODN möglich ist. Die Zweielektronenoxidation von cdG **70** mit  $\text{KHSO}_5$  unter MnTMPyP **112** Katalyse erwies sich als robuste Reaktion, die in sehr kurzer Zeit eine nahezu vollständige Umsetzung zum carbozyklischen Imidazoln Nukleosid **99** gewährleistete. Das Produkt **99** war über *reversed-phase* HPL-Chromatographie leicht aufzureinigen und wurde mit verschiedenen spektroskopischen Messungen charakterisiert. Die genaue massenspektrometrische Charakterisierung von **99** diente auch dazu, Vergleichsdaten zur Auswertung des enzymatischen Totalverdaus der oxidierten ODN zu erhalten. Bei der Hydrolyse von **99** in neutralem Phosphatpuffer bei 37 °C entstand nur ein einziges neues Produkt, dessen Molekulargewicht dem von carbocyclischem Oxazoln **102** entspricht. Ein anomerisiertes oder deglycosyliertes cdIz konnte nicht beobachtet werden. Die Bestimmung der Halbwertszeit der Hydrolyse von **99** unter neutralen Pufferbedingungen ergab einen ähnlichen Wert wie er für das natürliche dIz **14** literaturbekannt ist.

Die Oxidation von cdG im ODN mit MnTMPyP/ $\text{KHSO}_5$  war nicht möglich. Stattdessen gelang die Photooxidation eines einzelnen cdG in **ODN5** mit UV-A Licht in Gegenwart von Riboflavin. Die erzielten Ausbeuten waren zwar kleiner als bei der Nukleosidoxidation aber ausreichend, um größere Mengen von cdIz enthaltender DNA, wie sie etwa für Kristallisationsexperimente gebraucht werden würden, darzustellen.<sup>1</sup> Bei kurzen Belichtungszeiten von etwa 5 min war die Ausbeute der Photooxidation mit 15 – 20 % zwar nur moderat, die Reaktion war dafür aber sehr selektiv und erzeugte neben dem gewünschten cdIz keine weiteren oxidative Schäden. Die Ausbeute konnte mit längeren Belichtungen von 10 – 20 min deutlich angehoben werden. Allerdings entstand noch ein weiteres Produkt, dessen Molekulargewicht eine Differenz zum Edukt von  $\Delta m/z = +4$  aufwies. Der einzige bekannte Schaden, der gegenüber Guanin eine Massendifferenz von  $\Delta m/z = +4$  aufweist, ist das dDGh **19**. Dessen carbocyclisches Analogon **104** sollte aber unter den hier eingesetzten Bedingungen gar nicht entstehen, da es bei der Singulett Sauerstoffoxidation von dOG beobachtet wurde und dieser bei der Belichtung von Riboflavin mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 366$  nm nur in untergeordneter Menge entsteht. dDGh **19** ist kein stabiles Molekül. Es hydrolysiert leicht zur Oxalursäure **21**. Da bei kurzer Belichtung von **ODN5** zunächst cdIz und dann das um  $\Delta m/z = +4$  schwerere Produkt entstand, konnte angenommen werden, dass es sich nicht um ein Intermediat von cdIz handelt. Obwohl das Produkt mittels

<sup>1</sup> Unveröffentlichte Daten von D. Stathis, Arbeitsgruppe T. Carell.



HPLC sauber abtrennbar war, ergab der enzymatische Totalverdau dieses oxidierten ODN keinen näheren Hinweis auf die Natur des entstandenen DNA-Schadens. Noch deutlich komplizierter wurde die Zusammensetzung des Produktgemisches, wenn das belichtete ODN neben dem cdG noch ein weiteres dG enthielt. Es wäre zu erwarten gewesen, dass unselektiv eines oder beide Guanine zum Imidazoloxid oxidiert werden. In diesem Fall würde das HR-ESI Spektrum mehrere Signale mit einer Differenz zum Edukt von  $\Delta m/z = -39$ , bzw.  $\Delta m/z = 2 \times -39$  zeigen. Interessanterweise war das nicht der Fall und das ESI-Spektrum zeigte neben dem Eduktsignal und einem kleinen Signal mit  $\Delta m/z = -39$  noch zwei weitere Signale mit einer Massendifferenz von  $\Delta m/z = +53$ , bzw.  $+106$ . Da carbocyclische Schadensanaloga unter Maxam-Gilbert-Bedingungen stabil sind, steht zur Analyse der Monomere der belichteten ODN nur die Methode des enzymatischen Totalverdaus zur Verfügung.<sup>[203]</sup> Eine nähere Identifizierung der Produkte gelang damit jedoch nicht.

### 4.4.2 Spiroiminodihydantoin

#### 4.4.2.1 Die Einelektronenoxidation von cdOG

Die Einelektronenoxidation von dOG **8** zum dSp **26** ließ sich mit bemerkenswerter Zuverlässigkeit auf cdOG **93** als Substrat übertragen.<sup>[77]</sup> Das entschützte cdOG Nucleosid **93** konnte durch einstündige Inkubation mit  $\text{Na}_2\text{IrCl}_6$  in Phosphatpuffer bei pH 8.0 und  $60\text{ }^\circ\text{C}$  zum cdSp Nucleosid **103** oxidiert werden (**Abbildung 32**).<sup>[204]</sup> Bei nahezu quantitativer Umsetzung konnte das Reaktionsprodukt mittels *reversed-phase* HPLC gereinigt und anschließend mit HR-ESI Spektrometrie charakterisiert werden. Unter den hier geschilderten Bedingungen der Oxidation von **93** mit  $\text{Na}_2\text{IrCl}_6$  bildete sich **103** nahezu quantitativ. Der Erfolg der Oxidation lies sich problemlos mittels HPLC verfolgen, da Edukt und Produkt an C-18 Kieselgel deutlich unterschiedlich eluieren. Die sehr niedrige Retentionszeit von **103** (ca. 6 min) ist ein vom natürlichen dSp **26** bekanntes Problem. Sie ließ sich auch durch die Wahl anderer Laufmittel oder kürzerkettiger stationärer Phasen (mit Oktyl- oder mit Phenylgruppen funktionalisiertes Kieselgel) nicht steigern. Dies wäre jedoch wünschenswert gewesen, denn gleichzeitig mit dem praktisch „durchgerutschten“ **103** eluierte sowohl Oxidationsmittel als auch Phosphatpuffer.

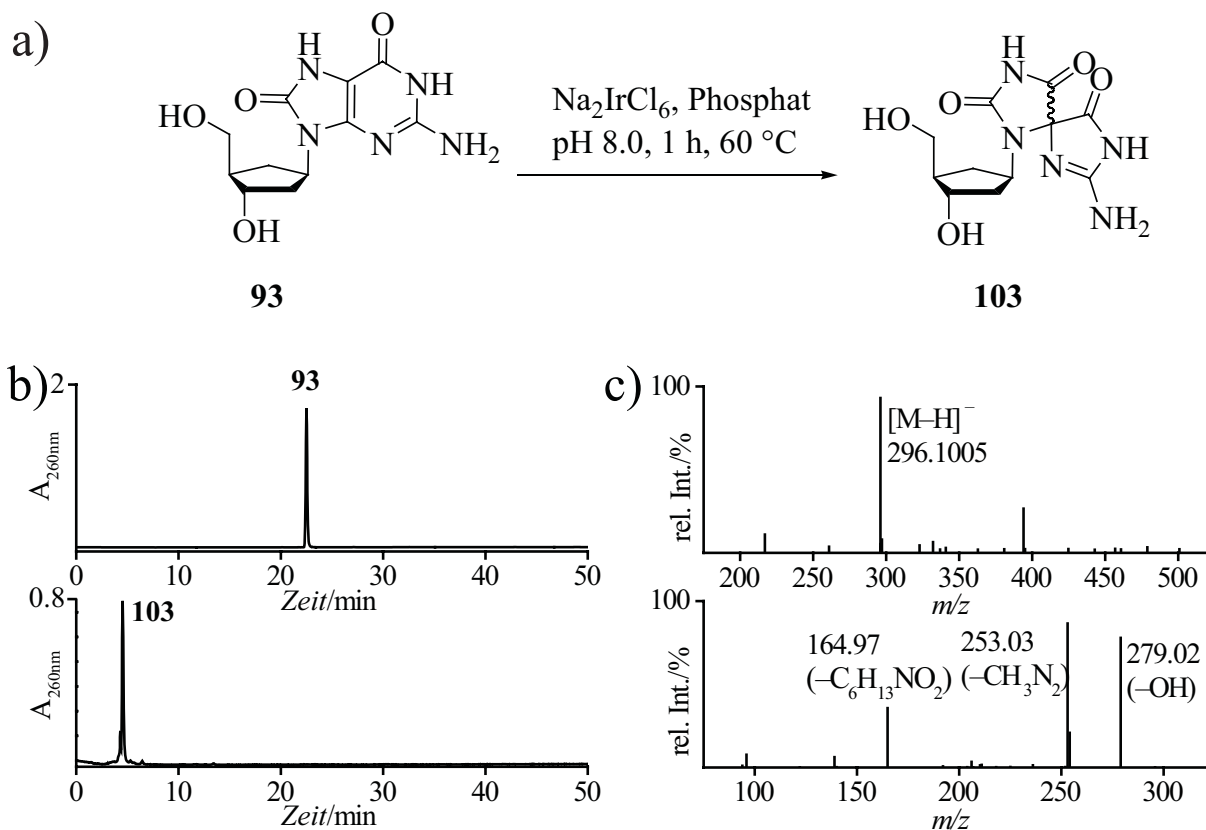
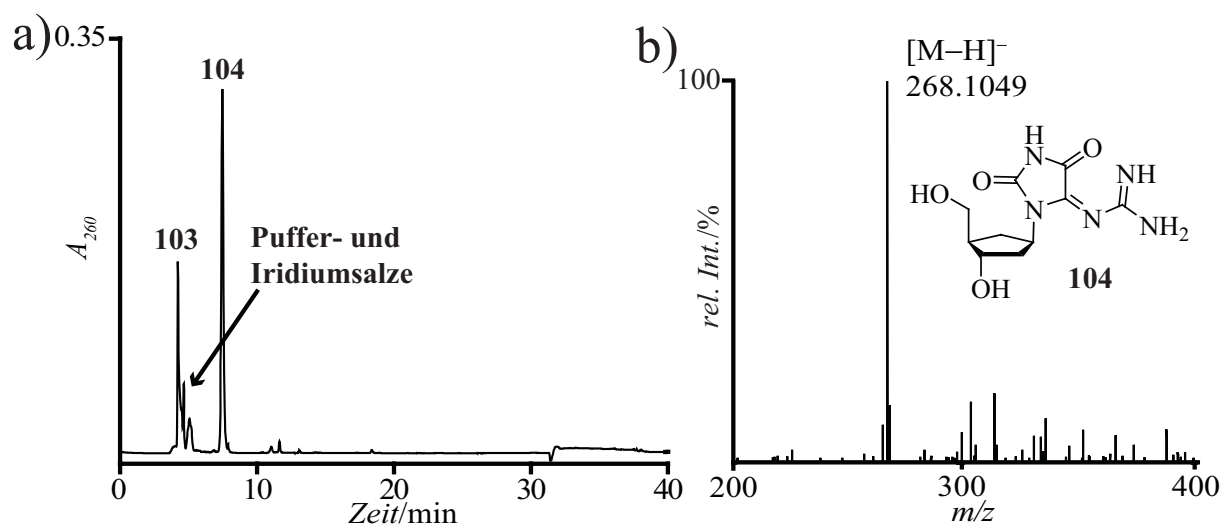


Abbildung 32: a) Oxidation von **93** mit  $\text{Na}_2\text{IrCl}_6$  erzeugt im basischen Milieu mit hohen Ausbeuten **103**, b) Die Umsetzung ist im HPL-Chromatogramm gut zu verfolgen, da sich Edukt (oben) und Produkt (unten) im Retentionsverhalten deutlich voneinander unterscheiden, HPLC auf Macherey-Nagel Nucleodur 120-3, Puffersystem **P2**, Gradient von 0 – 25 % B in 45 min, 0.5 mL/min, c) Das ESI-MS (oben) und –MS/MS Spektrum (unten) von **103** zeigt das Signal des  $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ions von **103** bei  $m/z = 296.1005$  und dessen Fragmentierung bei 35 eV.

Beide Probleme führten zu Schwierigkeiten bei der Detektion von **103** im ESI Spektrometer. Die hochgeladenen Phosphationen störten die Ionisierung der ungeladenen organischen Moleküle und schränken die Empfindlichkeit des Spektrometers deutlich ein. Die Verwendung flüchtiger und damit ESI verträglicher Puffersysteme wie Ammoniumformiat oder Triethylammoniumacetat zur Oxidation von **93** führte zur Bildung von deutlich mehr Nebenprodukten. Dennoch war der zweifelsfreie Nachweis von **103** anhand des Signals des  $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ions bei  $m/z = 296.1005$  möglich. Der Vergleich mit dem für dieses Signal berechneten Wert von  $m/z = 296.1000$  zeigt große Übereinstimmung (Abbildung 32c, oben). Die Fragmentierung des  $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ions konnte im MS/MS Spektrum bei einer Ionisierungsenergie von 35 eV beobachtet werden (Abbildung 32c, unten). Das Spektrum zeigt deutlich die Abspaltung verschiedener Molekülfragmente und lieferte damit, neben dem

HR-ESI Spektrum einen Beweis für die Entstehung dieses DNA Schadensanalogon. Das Produkt **103** entstand hier wahrscheinlich als Gemisch zweier Diastereomere, wie es auch für das dSp **26** beschrieben wurde.<sup>[64]</sup> Aufgrund der hier verwendeten Chromatographiebedingungen und der daraus resultierenden niedrigen Retentionszeit von **103** konnten beide Diastereomere nicht getrennt werden. Dies stellte jedoch weiter kein Problem dar, denn **103** wurde dargestellt, um als Referenzverbindung zur Charakterisierung von cdSp beim enzymatischen Totalverdau oxidierter ODN zu dienen.

Wie zuvor beschrieben, ist die Produktverteilung bei der Einelektronenoxidation von dOG stark abhängig von dem pH-Wert und der Temperatur des Reaktionsmediums (Kapitel 3.3.2.1). Auch die Oxidation von **93** war stark abhängig von pH-Wert und Temperatur der Reaktionslösung. In ersten Versuchen bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert entstand neben **103** ein neues Produkt **104** mit einer etwas größeren Retentionszeit von ca. 8 min. (*Abbildung 33*).



*Abbildung 33: a) HPLC auf Macherey-Nagel Nucleodur 120-3, Puffersystem P2, Gradient von 0 – 14 % B in 25 min, bei 0.5 mL/min, b) HR-ESI Spektrum der bei 8 min eluierten Substanz zeigt das Signal des  $[M-H^+]^-$ -Ions von **104** bei  $m/z = 268.1049$  (berechnet:  $m/z = 268.1051$ ).*

Laut Literatur wäre für diese Reaktion ein carbocyclisches Guanidinohydantoin (cdGh) als Reaktionsprodukt zu erwarten gewesen.<sup>[77]</sup> Dieses lies sich aber zunächst nicht nachweisen, stattdessen wurde das Signal des  $[M-H^+]^-$ -Ions eines carbocyclischen Dehydroguanidinohydantoin cdDGh **104** gefunden (*Abbildung 33b*). Das zeigte der Vergleich

mit dem für dieses Ion berechneten Wert von  $m/z = 268.1051$ . **104** entstand wahrscheinlich, analog zum natürlichen dDGh **19** durch Überoxidation von carbocyclischem Guanidinohydantoin (**cdGh**, **105**) mit vier Äquivalenten  $\text{Na}_2\text{IrCl}_6$ .<sup>[77]</sup> Neben **104** war bei etwas kürzerer Retentionszeit auch das Signal des  $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ions von **103** im Massenspektrum nachweisbar.

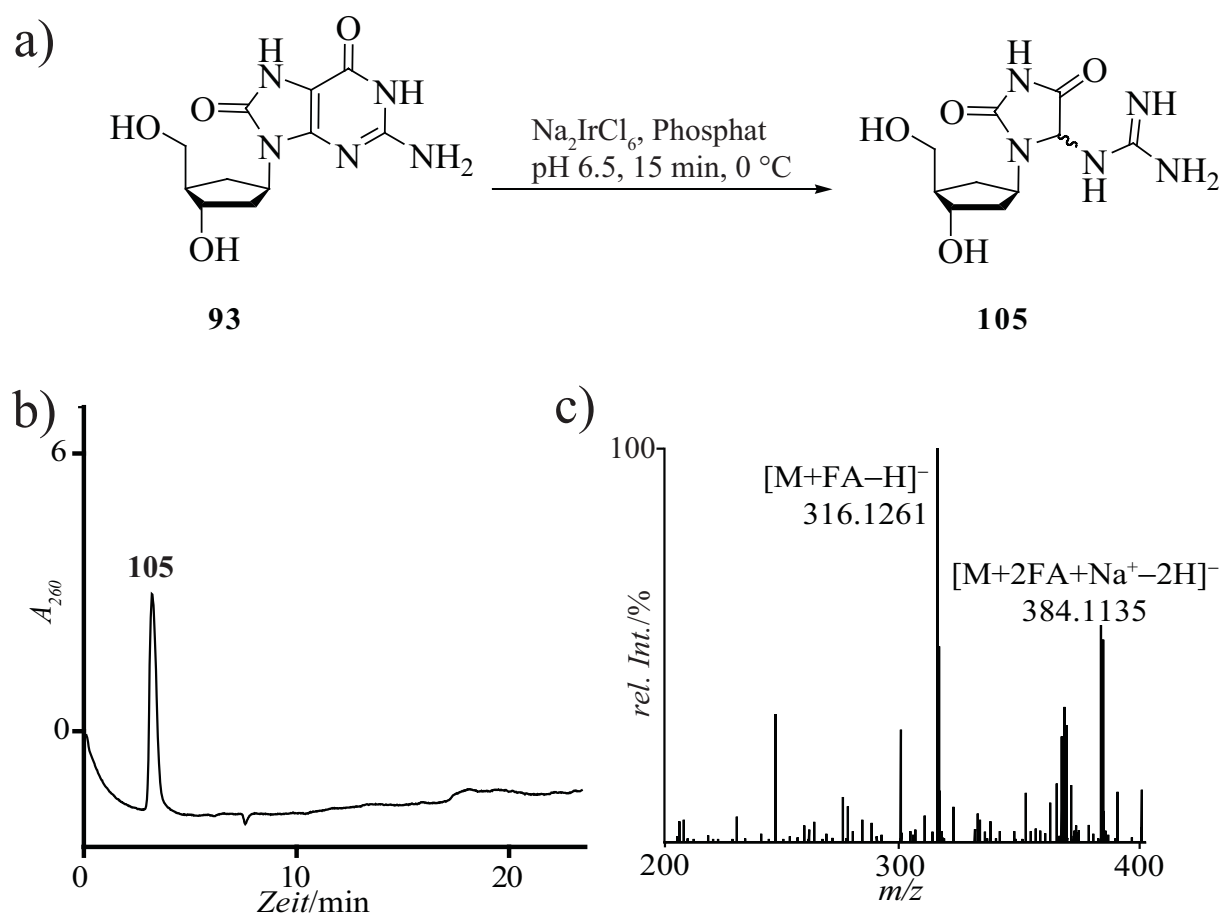


Abbildung 34: a) Schema der Oxidation von **93** zu **105**, b) HPLC von **105** auf Macherey-Nagel Nucleodur 120-3, Puffersystem **P2**, Gradient von 0 – 14 % B in 40 min, c) HR-ESI Spektrum von **105** zeigt das Signal des Ameisensäureaddukts  $[\text{M}+\text{FA}-\text{H}]^-$  bei  $m/z = 316.1261$  (berechnet:  $m/z = 316.1263$ ).

Nachfolgend wurde versucht, cdGh **105** selektiv darzustellen. Entgegen der eingangs beschriebenen selektiven Darstellung von **93**, sollte sich **105** bei niedriger Temperatur und leicht saurem pH-Wert durch Oxidation von cdOG **93** mit  $\text{Na}_2\text{IrCl}_6$  darstellen lassen. Dazu wurden der pH-Wert und die Reaktionstemperatur variiert und die besten Ergebnisse schließlich bei einer Reaktionstemperatur von 0 °C und einem pH-Wert des Reaktionsmediums von 6.5 erzielt. Mit einer relativ kurzen Reaktionszeit von nur 15 min und

bei gleichzeitiger Verwendung einer geringeren Iridatkonzentration im Reaktionsmedium sollte ein Überoxidieren des cdGh **105** zum cdDGh **104** verhindert werden. Zusätzlich wurde die Oxidation nach Ablauf der 15 min Reaktionszeit mit  $\beta$ -Mercaptoethanol gestoppt. Tatsächlich konnte auf diese Weise das erwartete Produkt cdGh **105** in Form des  $[M-H^+]$ -Ions nachgewiesen werden (*Abbildung 34*). Trotz dieser milden Reaktionsbedingungen war die Umsetzung vollständig und kein Edukt konnte mehr nachgewiesen werden. Zur besseren Übersichtlichkeit sind in *Tabelle 8* die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

*Tabelle 8: Zusammenstellung der verschiedenen Reaktionsprodukte bei der Oxidation von cOG **93** mit  $Na_2IrCl_6$ .*

Produkt	T [°C]	t [min]	pH-Wert	$Na_2IrCl_6$ [eq]
cdSp <b>103</b>	60	60	8.0	3
cdGh <b>105</b>	0	15	6.5	3
cdDGh <b>104</b> , cdSp <b>103</b>	RT	60	7.0	4

#### 4.4.2.2 Die Einelektronenoxidation von cdOG im ODN

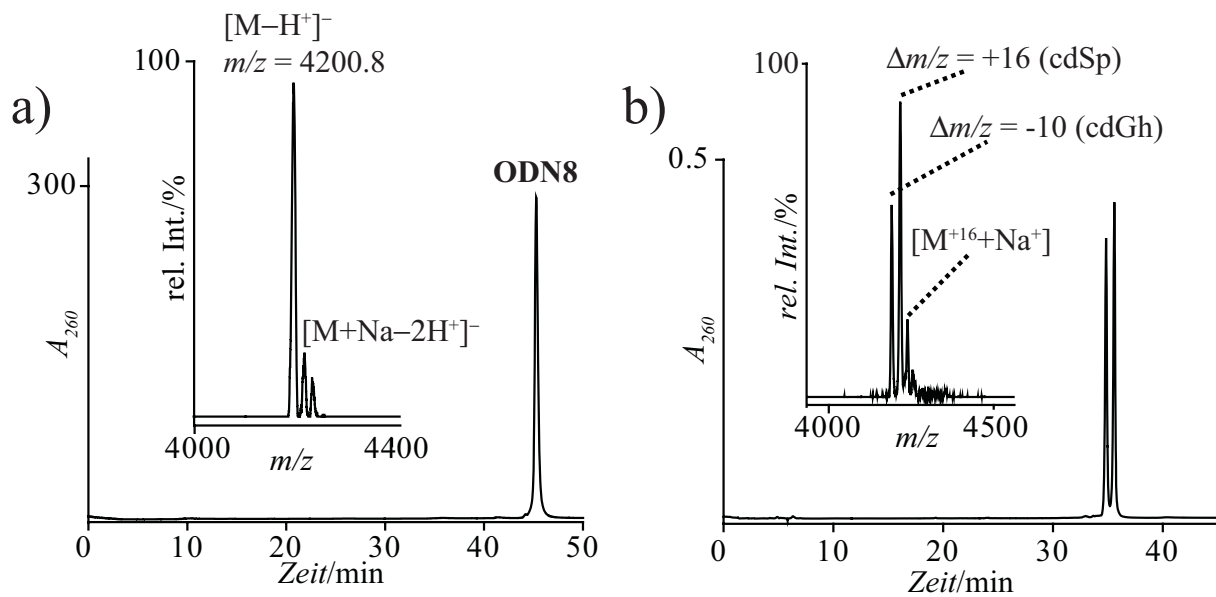
Im Gegensatz zur bekannten Oxidation des natürlichen dOG mit  $Na_2IrCl_6$ , bei dem die Reaktion bereits bei 50 °C und bei pH-Werten über 7.0 selektiv und mit hohen Ausbeuten dSp liefert,<sup>[117]</sup> mussten die Reaktionsbedingungen zur Oxidation von cdOG in **ODN8** optimiert werden.

*Tabelle 9: Übersicht über die in diesem Kapitel zur Einelektronenoxidation verwendeten ODN.*

ODN	Sequenz	Molekulargewicht <sup>[a]</sup>
<b>ODN8</b>	5'-d(CTCTTT <b>cOG</b> TTTCTCG)	4201.7 (4200.8)
<b>ODN8'</b> <sup>[b]</sup>	5'-d(CTCTTT <b>cSp</b> TTTCTCG)	4217.7 (4216.4)
<b>ODN9</b>	5'-d(GCGAT <b>cOG</b> TAGCG)	3411.2 (3408.3)
<b>ODN9'</b> <sup>[b]</sup>	5'-d(GCGAT <b>cSp</b> TAGCG)	3427.3 (3422.9)
<b>ODN10</b>	5'-d(CTCTTT <b>OG</b> TTTCTCG)	4202.7 (4202.6)
<b>ODN10'</b> <sup>[b]</sup>	5'-d(CTCTTT <b>Sp</b> TTTCTCG)	4218.7 (4218.3)

*a) in Klammern die mit MALDI-TOF gemessenen Werte, b) Diastereomerenmischung*

Unter den literaturbekannten Reaktionsbedingungen bildete sich stets ein Gemisch aus zwei verschiedenen Produkten, deren Molekulargewichte eine Differenz zum Molekulargewicht des Edukts, **ODN8**, von  $\Delta m/z = +16$  und  $\Delta m/z = -10$  hatten (**Abbildung 35**). Dies deutet darauf hin, dass ein Gemisch aus den zwei carbocyclischen Schadensanaloga cdSp ( $\Delta m/z = +16$ ) und cdGh ( $\Delta m/z = -10$ ) entstanden ist. Und obwohl beide Produkte per HPLC trennbar sind, sollten die Synthesebedingungen weiter optimiert werden, so dass nur noch cdSp entsteht.



*Abbildung 35: a) HPLC des unbehandelten **ODN8** mit dem zugehörigen MALDI-TOF Spektrum (Einsatz), b) HPLC des bei pH 7.0 und 50 °C oxidierten **ODN8** mit dem MALDI-TOF Spektrum der Reaktionsmischung. HPLC auf Macherey-Nagel Nucleodur 120-3, Puffersystem **P1**, 0 – 30 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min.*

Bei pH 8.0 und einer Reaktionstemperatur von 60 °C ließ sich nach einer Stunde Inkubationszeit nur noch **ODN8'** (mit cdSp) als Reaktionsprodukt nachweisen (**Abbildung 36**). Das Edukt **ODN8** wurde vollständig umgesetzt.

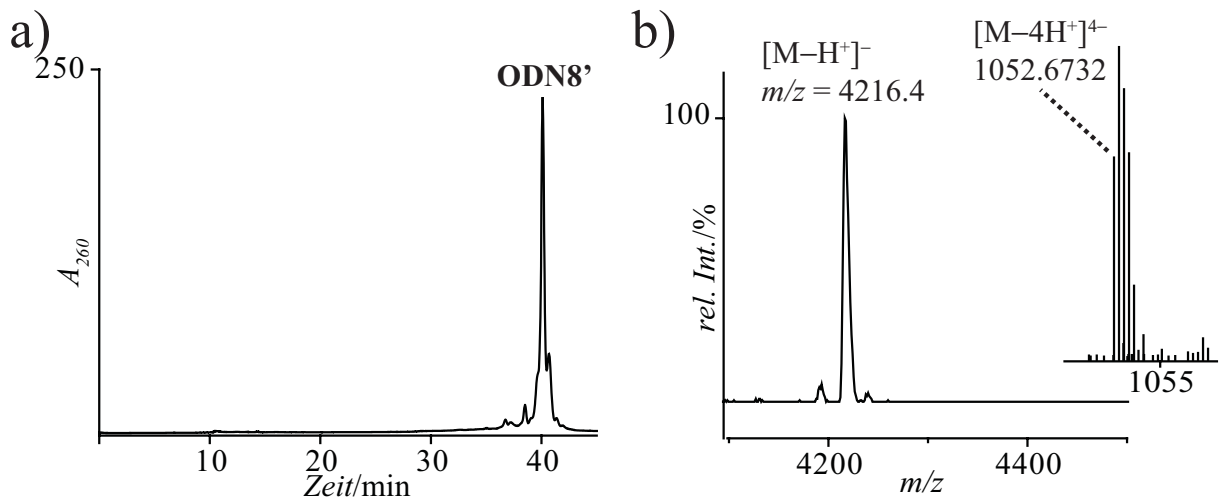


Abbildung 36: a) HPL-Chromatogramm des (rohen) Oxidationsprodukts **ODN8'**, HPLC auf Macherey-Nagel Nucleodur 120-3, Puffersystem **P1**, Gradient von 5 – 22 % B in 50 min, 0.5 mL/min, b) MALDI-TOF und HR-ESI Spektrum (Einsatz) von **ODN8'** zeigt nur ein Produkt.

Eine Voraussetzung für zukünftige Kristallisationsexperimente wäre die Trennung der zwei cdSp Diastereomere in **ODN8'** wie es für das natürliche dSp im ODN beschrieben worden ist.<sup>[117]</sup> Unter Verwendung einer *Pac-PA100* Anionentauschersäule (Dionex) und eines Eluenten aus neutralem Ammoniumacetat (1 M) gelang die Trennung der Diastereomere des natürlichen dSp, nicht aber des carbocyclischen Analogons cdSp. Umfangreiche Experimente zur Optimierung der Gradienten und Puffersysteme brachten leider nicht den erhofften Erfolg, man erkennt lediglich, dass zwei Peaks vorhanden sind (**Abbildung 37c**). Die verwendete Anionentauschersäule *Pac-PA100* hat im Vergleich zu den *reversed-phase* Säulen von Macherey-Nagel eine bessere Trennleistung, so dass einige Verunreinigungen des Oxidationsprodukts besser zu erkennen sind (**Abbildung 37a**). Bei der Oxidation von **ODN10**, das ein natürliches cdOG enthält, entsteht unter denselben Bedingungen wie sie zur Oxidation von **ODN8** verwendet wurden, ebenfalls selektiv und mit vollständiger Umsetzung dSp (**ODN10'**). Auch hier sollte ein Gemisch zweier Diastereomere entstehen. Unter Anwendung der literaturbeschriebenen HPLC-Bedingungen ließen sich die zwei ODN mit den jeweiligen dSp Diastereomeren vollständig trennen (**Abbildung 37b**).<sup>[117]</sup> Das MALDI-TOF Spektrum zeigt an, dass beide Produkte dasselbe Molekulargewicht haben.

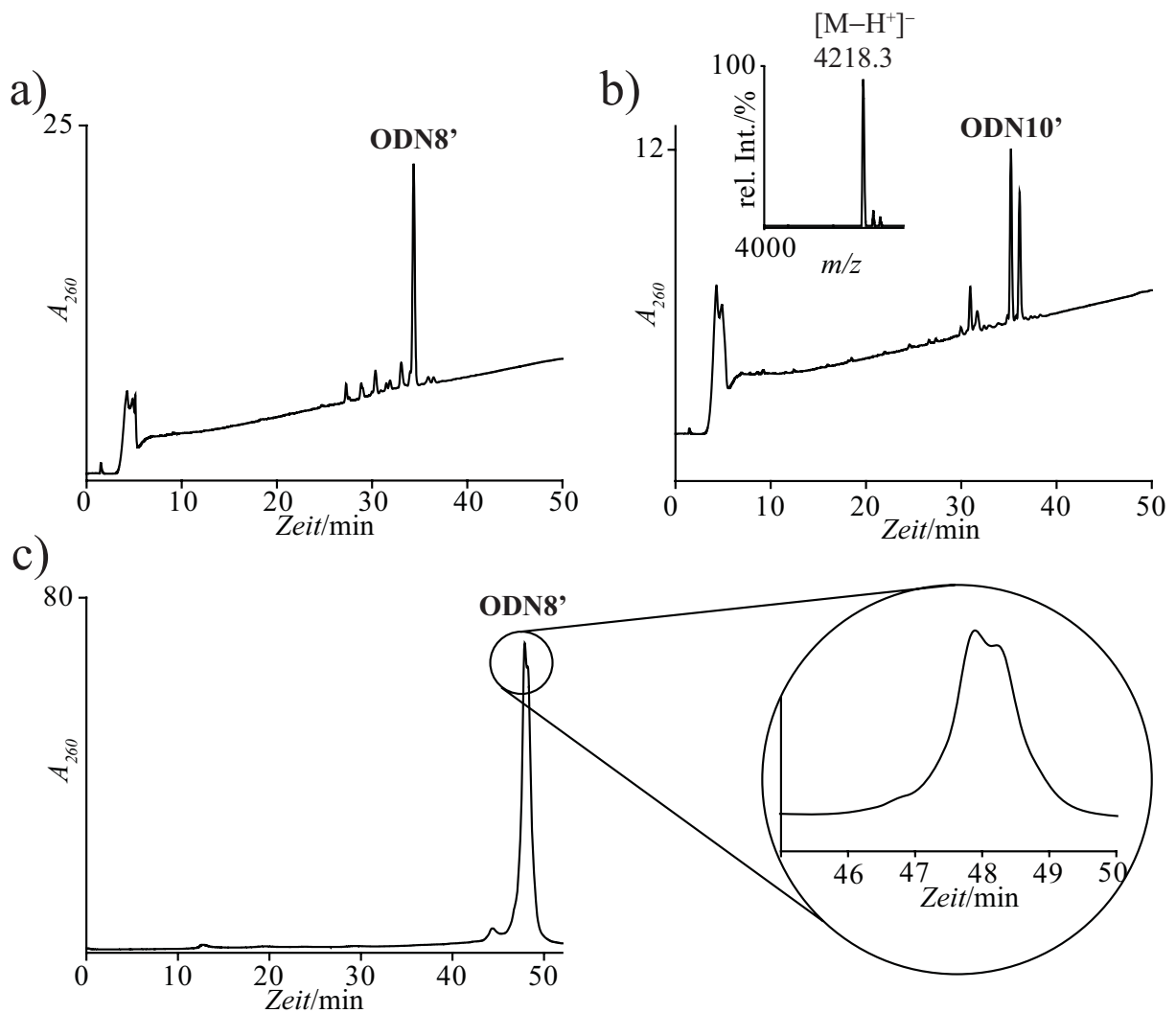


Abbildung 37: HPLC von **ODN8'** (a) und **ODN10'** (b) auf Dionex Pac PA100, mit einem Puffersystem bestehend aus 10 % Acetonitril in doppelt destilliertem Wasser (Puffer A) und 10 % Acetonitril in 1.5 M Ammoniumacetatlösung, pH 7.7, mit einem Gradient von 0 – 95 % B in 50 min, 1.0 mL/min, b) Zu erkennen ist der Doppelpeak von **ODN10'** mit den jeweiligen Diastereomeren von dSp. Das MALDI-TOF Spektrum (Einsatz) zeigt ein Produkt mit nur einer Masse an, c) HPLC auf Macherey-Nagel Nucleodur, Puffersystem **P1** (aber pH 8.0), Gradient von 5 – 22 % B in 50 min, 0.5 mL/min, Säule bei konstant 18 °C, man erkennt, dass ein Produktgemisch mit zwei, etwa gleich hohen Peaks vorliegt.

Um die Möglichkeit einer Sequenzabhängigkeit der Trennbarkeit der zwei Diastereomere im ODN auszuschließen, wurde das cdOG in **ODN9** zum cdSp oxidiert. Die gleichen Oxidationsbedingungen sorgten auch an diesem ODN für eine vollständige Umsetzung des Edukts bei gleichzeitiger selektiver Entstehung von cdSp (**ODN9'**). Die literaturbekannten Bedingungen zur Trennung der Diastereomere in **ODN10'** führten auch hier zu keinem Ergebnis (**Abbildung 38**). Weitere Experimente brachten keinen Trennerfolg.



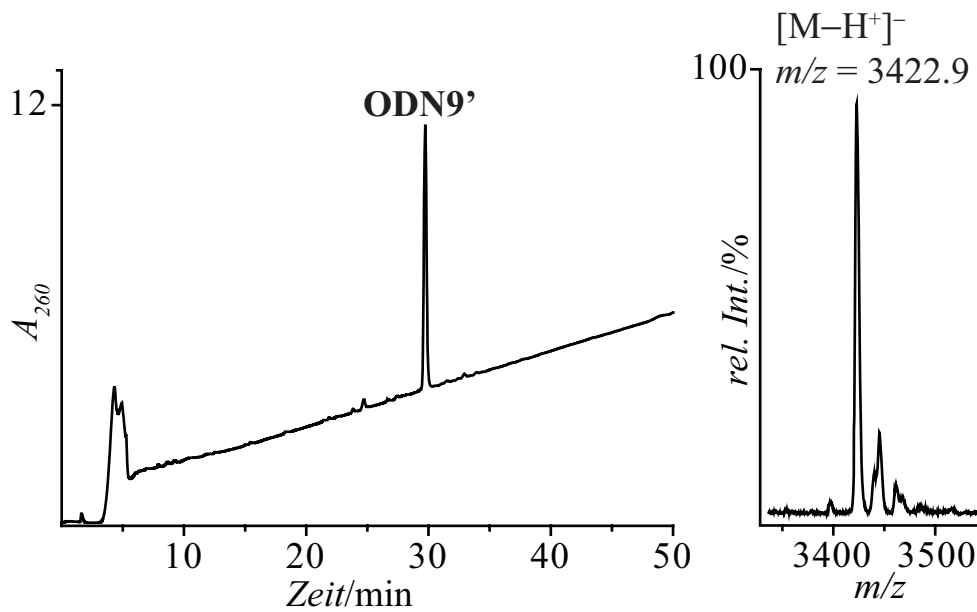
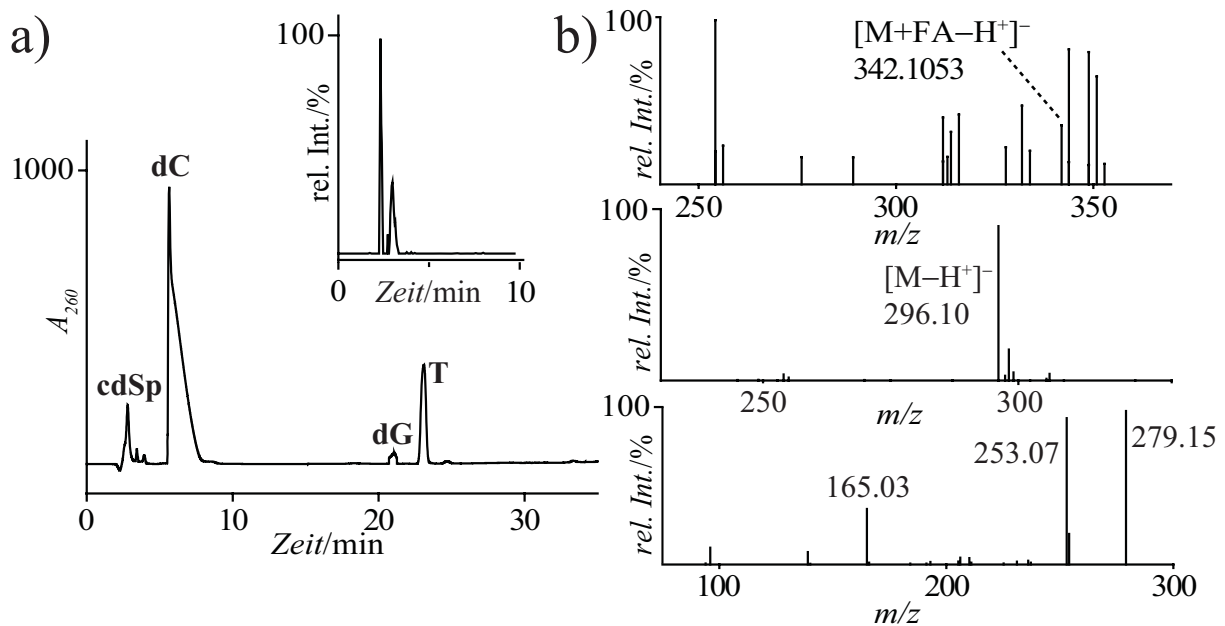


Abbildung 38: Das HPL-Chromatogramm von **ODN9'** zeigt nur einen einzigen Peak. Das zugehörige MALDI-TOF Spektrum zeigt, dass nur eine Verbindung entstanden ist. HPLC auf Dionex Pac PA100, mit einem Puffersystem bestehend aus 10 % Acetonitril in doppelt destilliertem Wasser (Puffer A) und 10 % Acetonitril in 1.5 M Ammoniumacetatlösung, pH 7.7, mit einem Gradient von 0 – 95 % B in 50 min, 1.0 mL/min.

#### 4.4.2.3 Enzymatischer Totalverdau

Auch **ODN8'** wurde enzymatisch in die einzelnen Nukleoside abgebaut und anschließend mit HPLC-MS/MS untersucht. Die dazu verwendete Enzymmischung entsprach derjenigen, die beim Verdau von **ODN5**, bzw. von **ODN8** verwendet wurde. Die niedrige Retentionszeit von cdSp **103** sorgte auch bei diesem Experiment für eine niedrige Signalintensität im ESI-Spektrum. Die gleichzeitig eluierten (geladenen) Puffersalze verhinderten eine effektive Ionisierung des (ungeladenen) Nukleosids im Spektrometer. Die Sensitivität des Spektrometers gegenüber dem cdSp Nukleosid konnte aber durch die Verwendung von Ammoniumformiat anstelle von Triethylammoniumacetat gesteigert werden, so dass der Nachweis des Schadens in der Verdaumischung gelang. Es zeigte sich, dass auch das cdSp eine starke Neigung zur Bildung von Ameisensäureaddukten hat und dass das  $[M+FA-H^+]$ -Ion deshalb ein deutlich stärkeres Signal verursachte (**Abbildung 39**). Die Fragmentierung des  $[M+FA-H^+]$ -Ions erzeugte das freie  $[M-H^+]$ -Ion, das seinerseits die gleiche Fragmentierung zeigte wie sie auch für **103** beobachtet wurde (Kapitel 4.4.2.1). Die

Entstehung des cdSp Schadens im Oligonukleotid konnte somit zweifelsfrei nachgewiesen werden (**Abbildung 39**).



**Abbildung 39:** Enzymatischer Totalverdau von **ODN8'**, a) UV-Signale der Nukleoside und die Ionenzahl innerhalb des Massenbereichs von 341.5 – 342.5 (Einsatz), HPLC auf Interchrom Uptisphere (150×2.1), Puffersystem **P3** und einem Gradienten von 0 – 3 % B in 12 min und 12 – 20 % in 30 min bei einem Fluss von 200  $\mu$ L/min b) MS Spektrum der bei 3 min eluierten Substanz zeigt das Signal des  $[M+FA-H^+]^-$ -Ions von cdSp. Dessen Fragmentierung im MS/MS- und MS/MS/MS-Spektrum zeigt das gleiche Muster wie die Fragmentierung von **103**.

#### 4.4.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die Einelektronenoxidation von dOG **8** mit  $\text{Na}_2\text{IrCl}_6$  in leicht basischem Phosphatpuffer ließ sich problemlos auf das carbocyclische Analogon cdOG **93** übertragen. Sowohl im Nukleosid, als auch im ODN ließ sich durch Oxidation von cdOG sehr selektiv und mit hohen Ausbeuten cdSp **103** erzeugen. Um die nötige Selektivität zu erreichen, mussten die literaturbekannten Oxidationsbedingungen etwas angepasst werden. Erst bei pH-Wert von 8.0 und einer Temperatur von 60 °C bildete sich ausschließlich **103**. Das Produkt **103** ist stabil und kann sehr leicht über *reversed-phase* HPLC aufgereinigt werden. Die Abtrennung der Puffersalze war aufgrund der niedrigen Retentionszeit von **103** schwierig. Dieses, von dSp **26** bekannte Problem erschwerte zunächst die massenspektrometrische Charakterisierung. Mit optimiertem Puffersystem und veränderten Detektoreinstellungen gelang die Identifizierung und

Charakterisierung von **103** per HR-MS und -MS/MS Messungen. Die Aufnahme eines NMR-Spektrums war aufgrund der sehr geringen Substanzmenge nicht möglich. Eine Trennung der Diastereomere von **103** wurde nicht versucht, da diese Substanz hauptsächlich als analytischer Standard für die Massenspektrometrie gedacht war. Die geringe Retention dieser Substanz unter HPLC Bedingungen ließ entsprechende Versuche wenig aussichtsreich erscheinen, wenngleich die Trennung der zwei Diastereomere von dSp **26** unter Verwendung hochpolarer Graphitsäulen beschrieben worden ist.<sup>[64]</sup>

Bei der Oxidation von cdOG **93** mit Na<sub>2</sub>IrCl<sub>6</sub> bei niedriger Temperatur (0 °C), kurzer Reaktionszeit (15 min) und bei pH-Werten von 6.5 in Phosphat-Puffer entstand hochselektiv cdGh **105**. Bei Raumtemperatur wurde **105** nach längerer Reaktionszeit (1 h) und bei etwas höheren Na<sub>2</sub>IrCl<sub>6</sub> Konzentrationen zum cdDGh **104** aufoxidiert.

Auch die Oxidation von **ODN8** mit Na<sub>2</sub>IrCl<sub>6</sub> in basischem Phosphatpuffer bei 60 °C Reaktionstemperatur führte bei vollständigem Umsatz des Edukts zur selektiven Bildung von cdSp (**ODN8'**). Aufgrund des günstigen Redoxpotentials von Natriumhexachloroiridat(IV) gelang ebenso wie bei dOG **8** die selektive Oxidation von cdOG **93** bei gleichzeitiger Anwesenheit von Guanin im ODN. Die Abtrennung der Puffersalze bereitete aufgrund der grundsätzlich hohen Retentionszeit des ODN in diesem Fall keine Probleme. Da praktisch alles cdOG umgesetzt wurde und auch keine weiteren Produkte entstanden (MALDI-TOF), war eine Abtrennung von **ODN8'** von möglichen Nebenprodukten nicht nötig. Die zweifelsfreie Identifikation des cdSp lieferte der enzymatische Totalverdau der oxidierten ODN mit anschließender HPLC-MS und -MS/MS Untersuchung. Das identifizierte Nukleosid cdSp zeigte dabei die gleiche Fragmentierung wie **103**. Die geringe Retentionszeit von cdSp, die zur Koeluierung mit Puffersalzen führte, setzte auch bei diesen Messungen die Empfindlichkeit des FTICR Spektrometers erheblich herab, so dass die Intensität der identifizierten Signale recht schwach war.

Auch bei der Oxidation von **ODN8** entstand cdSp in Form eines Diastereomeregemisches. Die Trennung dieser Diastereomere im ODN ist für das natürliche dSp beschrieben und sollte auf das carbocyclische Analogon übertragen werden. Dies wäre für eine spätere Verwendung der ODN als Substrat für Reparaturenzyme im Zuge von Kristallisationsexperimenten ein entscheidendes Kriterium. Leider gelang diese Trennung für das carbocyclische Analogon des dSp Schadens nur unvollständig bzw. gar nicht. Dieses Ergebnis stellt eine bemerkenswerte Abweichung des Verhaltens des carbocyclischen Analogons von seinem natürlichen Vorbild dar, die in dieser Form nicht vorhersehbar war. Offensichtlich sorgt der Ribosesauerstoff für

eine konformelle Fixierung des schadentragenden ODN, die dazu führt, dass beide Diastereomere des natürlichen dSp im ODN durch HPL-Chromatographie trennbar sind.

### 4.5 Kristallisationsexperimente

#### 4.5.1 Einleitung

N7-Me-FaPydG **67** ist das einzige N7-Alkyl-Addukt, das von FPG bereitwillig als Substrat akzeptiert und effizient repariert wird. Größere Alkyl-Substituenten am N7 von FaPydG wie Aflatoxin-B1 oder Phosphoramid-Addukte verhindern, dass die geschädigte Base von FPG entfernt wird.<sup>[205]</sup> Neuere Daten zeigen jedoch, dass die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes auch durch großen N7-Alkyl-FaPydG Schäden nicht gestört ist. Die Katalyse der Schadensreparatur wird jedoch sehr wohl durch sperrige Substituenten gehemmt.<sup>2</sup> Offensichtlich führt ein großer Alkylsubstituent am N7 eines FaPydG-Schadens zur Bildung eines unproduktiven Enzym-Substrat-Komplexes.

In Zusammenarbeit mit *F. Coste* und *B. Castaing*<sup>3</sup> wurden zwei Kristallstrukturen von Wildtyp *Lactococcus lactis* FPG (wt-LIFPG) im Komplex mit einem 14-mer ODN (**ODN12**, **Tabelle 4**) erhalten.<sup>[206]</sup> In der ersten Struktur enthält das ODN ein cFaPydG Analogon **68** und in der zweiten Struktur ein carbocyclisches Analogon des N7-Benzyl-Formamidopyrimidin-G Schadens (cBnFaPydG, **106**) (**Abbildung 40**).<sup>[106, 159, 207]</sup> Das Benzyl substituierte cFaPydG stellt eine Modellverbindung für *bulky-adducts* dar. Die carbocyclische Modifikation schützt die Schäden vor Reparatur durch das (aktive) Wildtyp Enzym LIFPG.<sup>[207]</sup> Eine Beeinträchtigung der Bindung des Schadens in der aktiven Tasche durch eine inaktivierende Mutation, wie z.B. bei den Varianten E3Q *Bst*FPG oder  $\Delta$ P1 LIFPG,<sup>[145, 147]</sup> konnte somit ausgeschlossen werden.

---

<sup>2</sup> Nicht veröffentlichte Ergebnisse von *B. Castaing*.

<sup>3</sup> Centre de Biophysique Moleculaire, UPR4301, CNRS, Orleans, Frankreich

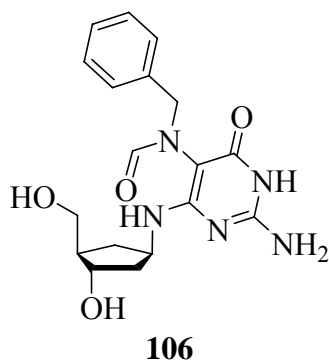


Abbildung 40: Carbocyclisches N7-Bn-FaPydG **106**, eine Modellverbindung für bulky-adducts.

#### 4.5.2 Beschreibung der Kristallstruktur von wt-LIFPG gebunden an cBnFaPydG-DNA

Abbildung 41 zeigt die Struktur von wt-LIFPG im Komplex mit **ODN12**. In der zweiten Struktur (nicht abgebildet) enthält das ODN ein cFaPydG **68** mit ansonsten gleicher Sequenz. Beide Kristallstrukturen wurden unter den gleichen experimentellen Bedingungen erhalten und kristallisierten in der gleichen Raumgruppe ( $P4_12_12$ ) mit ähnlichen Zelldimensionen und einer Auflösung von 1.95 Å (cFaPydG), bzw. 1.90 Å (cBnFaPydG). Dies zeigt, dass die Substitution durch die Benzylgruppe am N7 keine strukturellen Veränderungen am Enzym-DNA Komplex hervorruft. Beide Schäden sind in der aktiven Tasche des Enzyms und beide werden in der *anti*-Konformation gebunden. Allerdings sind die Pyrimidin-Heterocyclen der beiden cFaPy-Basen beim Übereinanderlegen nicht koplanar. Tatsächlich liegen die Formamidgruppen der beiden cFaPydG-Basen als zwei verschiedene Rotamere mit einer Differenz von 180° vor.

Die beiden Ketogruppen an C6 und C8 stoßen sich in der Konformation, in der das cBnFaPydG **106** von wt-LIFPG gebunden wird, gegenseitig ab. Das Enzym muss diese Konformation deshalb wahrscheinlich aktiv einstellen, um die sterischen Probleme der Bn-Gruppe zu überwinden und das Substrat binden zu können.

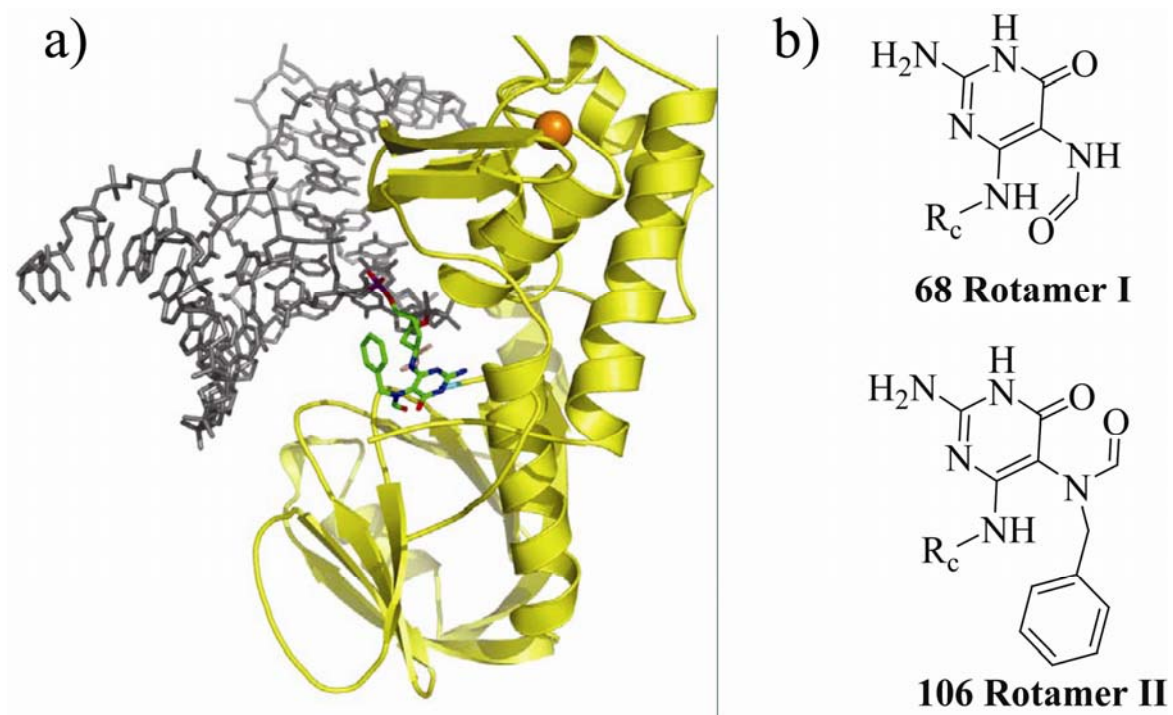
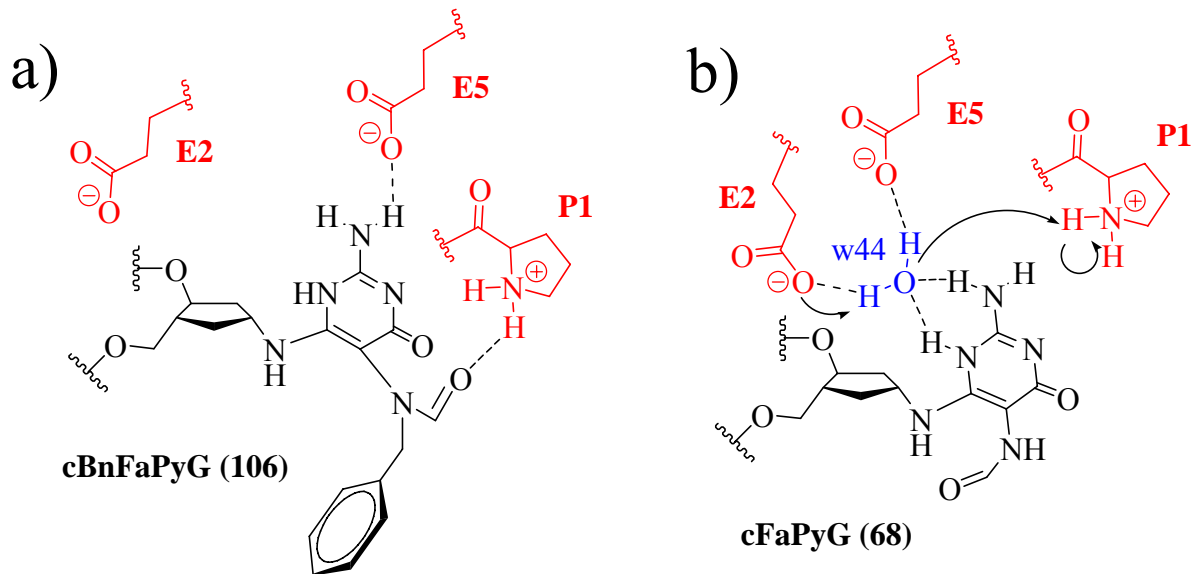


Abbildung 41: a) Kristallstruktur von wt-LIFPG im Komplex mit 14-mer ODN12 (grau). Man erkennt die geschädigte Nukleobase (grün) in der aktiven Tasche des Enzyms (gelb) und das Zn-Atom des Zinkfinger Motivs (orange), b) die beiden Schäden cFaPydG **68** und cBnFaPydG **106** liegen in der aktiven Tasche von wt-LIFPG in zwei unterschiedlichen Rotameren vor. Der Formylsauerstoff des cBnFaPydG **106** ist gegenüber dem des cFaPydG **68** um 180 Grad gedreht und kann in dieser Position eine Wechselwirkung mit dem P1 des Enzyms eingehen. Zusätzlich verhindert der Bn-Rest die „geschlossene“ Konformation des flexiblen Teils der  $\alpha F$ - $\beta 9$ -Schleife und somit die katalytische Aktivität des Enzyms.

Die unterschiedliche Konformation der beiden cFaPydG Substrate in der aktiven Tasche des Enzyms bedingt große Unterschiede in den Enzym-Substrat Kontakten beider Schäden. Das cFaPydG **68** wird an den Stellen, die diesen Schaden vom Guanin unterscheiden, erkannt: Das N7-Proton wird durch die Seitenkette von T221, der C8-Sauerstoff wird durch die Hydroxylgruppe von Y238 und das N9-Proton wird durch die Seitenkette von E76 erkannt. Der N7-Stickstoff von cBnFaPydG **106** geht dagegen mit keiner Aminosäure in der aktiven Tasche des Enzyms einen direkten Kontakt ein. Elf Aminosäuren sind in die Erkennung von cFaPydG **68** involviert, aber nur sieben in die Erkennung von cBnFaPydG **106**. Das N-terminale Prolin ist in beiden Strukturen 3.6 – 3.7 Å vom C1' entfernt. Durch die spezielle Konformation des cBnFaPydG **106** kommt es zur Wechselwirkung des Formylsauerstoffs mit dem P1 des Enzyms. Eine derartige Wechselwirkung wurde im Falle des cFaPydG **68** nicht beobachtet. Diese Interaktion ist relativ stark und stabilisiert den protonierten Zustand am P1.

Das aber reduziert dessen Nucleophilie und stört in der Folge den Angriff von P1 am C1' des geschädigten Nucleotids. Die katalytische Aktivierung des protonierten P1 erfolgt in der Struktur von wt-*L/FPG* mit cFaPydG **68** über ein Wassermolekül (w44), das durch das Carboxylat von E2 aktiviert wird. Dies erklärt, warum das E3Q-*BstFPG* katalytisch inaktiv ist und zeigt auch, dass eine Mutation der aktiven Tasche zu falschen Schlüssen führen kann (*Abbildung 42*).



*Abbildung 42: a) Man erkennt die Wechselwirkung des Formylsauerstoff mit dem protonierten Stickstoff des P1, die dessen Nucleophilie herabsetzt, b) diese Wechselwirkung fehlt im Falle des cFaPydG. Das zentrale Wassermolekül w44 wird stattdessen von E2 aktiviert und deprotoniert so den Stickstoff von P1. Dieser ist in der Folge nucleophil genug für einen Angriff am C1' des Schadens.*

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen der hier beschriebenen wt-*L/FPG* Struktur und der literaturbekannten  $\Delta$ P1-*L/FPG* Struktur ergibt sich bei der Betrachtung des flexiblen Teils der  $\alpha$ F- $\beta$ 9-Schleife. Während dieser hier eine präzise Konformation einnimmt, war er in der vorherigen Struktur gar nicht zu erkennen. Der flexible Teil der  $\alpha$ F- $\beta$ 9-Schleife nimmt offensichtlich zwei verschiedene Konformationen ein, die als „offen“ und „geschlossen“ bezeichnet werden können. Gleichzeitig scheint P1 unerlässlich zur Einstellung der „geschlossenen“ Konformation zu sein, da diese in der Struktur von  $\Delta$ P1-*L/FPG* nicht beobachtet wurde. Tatsächlich weisen die bekannten Strukturen von E3Q-*BstFPG* und wt-*TfFPG*, die ja über ein unverändertes P1 verfügen, die „geschlossene“ Konformation des flexiblen Teils der  $\alpha$ F- $\beta$ 9-Schleife auf.<sup>[142, 145]</sup> Das dynamische Verhalten des flexiblen Teils

der  $\alpha$ F- $\beta$ 9-Schleife bestimmt ganz offensichtlich die katalytische Aktivität von wt-*L*/FPG und scheint für die Unterscheidung zwischen Substrat und *Nicht*-Substrat nötig zu sein. Die sperrige Bn-Gruppe des cBnFaPydG Schadens zeigt aus der aktiven Tasche von wt-*L*/FPG heraus und verhindert so, dass der flexible Teil der  $\alpha$ F- $\beta$ 9-Schleife die „geschlossene“ Konformation einnimmt.

### 4.6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese carbocyclischer Analoga von einer Reihe von oxidativ erzeugten DNA-Schäden vorgestellt. Es gelang die Darstellung der Phosphoramidite von carbocyclischem 2'-Desoxyguanosin **84** und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin **94** und deren Einbau in verschiedene ODN. Darüber hinaus wurden beide Analoga cdG und cdOG in Form ihrer Nukleoside **70** und **93** erhalten. Durch Oxidation dieser beiden Vorläufermoleküle konnten die carbocyclischen Analoga von Imidazolone und Spiroiminodihydantoin sowohl im Oligonukleotid als auch in Form des Nukleosids **99** und **103** erhalten werden. Andere carbocyclische Analoga oxidativ erzeugter Schäden wie cdZ **102**, cdGh **105** und cdDGh **104** konnten lediglich in Form ihrer Nukleoside nachgewiesen werden. Zwar gelang auch der Nachweis von cdGh **105** und cdDGh **104** im ODN, diese wurden jedoch nicht isoliert und die Schadensanaloga konnten somit auch nicht im Reaktionsmix eines enzymatischen Totalverdau nachgewiesen werden. Dies gelang neben cdG und cdOG lediglich für cdIz und cdSp. Neben dem Nachweis, dass die carbocyclische Modifikation die Basenpaarungseigenschaften von cdG gegenüber dG nicht verändert, konnte gezeigt werden, dass im Falle des cdIz **99** die Halbwertszeit für dessen Hydrolyse im Vergleich zum dIz **14** unverändert bleibt. Die carbocyclischen Analoga stellen mithin sehr gute Modellverbindungen dar, wie sie für Kristallisationsexperimente zusammen mit aktiven Wildtyp DNA-Glykosylasen (z.B. FPG) benötigt werden. Dies konnte für zwei Kristallstrukturen genutzt werden, in denen wt-*L*/FPG im Komplex mit DNA kristallisiert wurde, die einmal cFaPydG **68** und ein anderes Mal cBnFaPydG **106** enthielt. Der Vergleich beider Strukturen zeigte, warum große Alkyl-FaPydG Addukte von FPG zwar gebunden, nicht aber repariert werden. Weiterhin verdeutlichte der Vergleich dieser beiden Strukturen von Wildtyp FPG mit Strukturen, in denen inaktive Mutanten von FPG verwendet wurden, dass die Veränderung von Aminosäuren in der aktiven Tasche von FPG große Auswirkungen auf die Konformation und Struktur des gebundenen Schadens haben kann.



Die vorgestellten Ergebnisse ermöglichen in Zukunft die Synthese weiterer ODN, die carbocyclische Analoga oxidativ erzeugter DNA-Schäden enthalten. In größeren Mengen dargestellt, sind diese stabilisierten Modellverbindungen interessante Substrate für weitere Kristallisationsexperimente zusammen mit aktiven DNA-Glycosylasen wie wt-L/FPG. Eine ganze Reihe von Fragen bleiben aber noch offen:

Bei der Hydrolyse von cdIz **99** in neutralem Phosphatpuffer entsteht als einziges Produkt cdZ **102**. Auch nach längerer Inkubationszeit konnten keine weiteren Produkte nachgewiesen werden. Dieses Verhalten sollte gleichermaßen auch für cdIz im ODN gelten. Die Bildung von dZ **15** aus dIz **14** durch Inkubation in neutralem Phosphatpuffer wurde für die natürlichen Nukleoside nachgewiesen. Nach der Inkubation von **ODN5'** konnte im MALDI-TOF Spektrum jedoch nur ein sehr schwaches Signal eines cdZ enthaltenden ODN nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin kein bekannter Schaden im Produktgemisch identifiziert werden. Diese ersten Hinweise legen den Verdacht nahe, dass das Verhalten des carbocyclischen Analogons hier möglicherweise erneut von dem seines natürlichen Vorbilds abweicht. Was entsteht also bei der Hydrolyse von cdIz im ODN und nach welchem Mechanismus entsteht es? Ist cdZ im ODN seinerseits stabil gegenüber Hydrolyse?

Bei längerer Belichtung von cdG in **ODN5** mit UV-A Licht in Gegenwart von Riboflavin wurde die Bildung von cdDGh unter den Bedingungen der hier gewählten Typ-I Photooxidation beobachtet. Da die Entstehung von dDGh bei der Einwirkung von Singulett-Sauerstoff auf dOG beschrieben wurde, sollte sich cdDGh hier eigentlich nicht bilden. Es bleibt also die Frage nach dem Mechanismus, nach dem es entsteht und damit auch die Frage, ob der Mechanismus der cdIz Bildung aus cdG richtig verstanden wurde. Dies wird durch ein weiteres Experiment unterstrichen: Bei der Belichtung von **ODN7** wäre die Bildung von einem oder mehreren Iz-Schäden oder auch die Bildung von einem oder mehreren der bereits beschriebenen sonstigen Schäden wie cdDGh oder OG zu erwarten gewesen. Die entstandenen Schäden hatten jedoch deutlich größere Molekulargewichte als das Ausgangsprodukt. Die Natur dieser neu entstandenen Schäden und der Mechanismus deren Bildung liegen bislang im Dunkeln.

Das bei der Synthese von **ODN8'** entstandene Gemisch zweier Diastereomere von cdSp konnte nicht getrennt werden. Möglicherweise funktioniert aber die Trennung der Diastereomere des Nukleosids **103**. Dies ist für dSp **26** beschrieben worden.<sup>[64]</sup> Sollte die

Darstellung größerer Mengen von diastereomerenreinem **103** gelingen, entweder über die Einelektronenoxidation von **93** oder über Typ-II Photooxidation von **70**, dann könnte dieses zur Synthese eines entsprechenden Phosphoramiditbausteins genutzt werden. Die Synthese eines natürlichen Sp-Phosphoramidits und dessen Einbau in ein ODN ist literaturbekannt und könnte auf ein carbocyclisches Analogon übertragen werden.<sup>[208]</sup> Interessant wäre gleichermaßen die Darstellung eines ODN mit einem cdGh-Schadensanalogon, ebenfalls nach Diastereomeren getrennt. Insbesondere das cdSp unterscheidet sich strukturell sehr deutlich von allen anderen oxidativ erzeugten DNA-Schäden und doch wird es von FPG als Substrat akzeptiert. Eine Kristallstruktur von Wildtyp FPG im Komplex mit cdSp enthaltender DNA gibt möglicherweise einen interessanten Einblick in die Bindung und Konformation dieses Schadens in der aktiven Tasche der Glycosylase.

Weiterhin wäre die Frage interessant, welche Schadensanaloga bei der Einwirkung von Singulett-Sauerstoff auf cdG **70** und cdOG **93** entstehen. Sind es die gleichen Schäden wie bei der Oxidation von dG **5** und dOG **8** oder weicht das Verhalten der carbocyclischen Analoga hier erneut vom dem der natürlichen Nucleoside ab? Kann man sich dieses abweichende Verhalten vielleicht sogar zunutze machen?

Eine weitere bislang nicht abschließend geklärte Frage ist, in welcher Konformation dOG **8** von Wildtyp FPG erkannt wird. E3Q *Bst*FPG bindet dOG **8** in der *syn*-Konformation in der aktiven Tasche. Aber welche Auswirkungen hat ein unverändertes Glutamat-2 auf die Konformation von dOG? Erste Kristallisationsexperimente von wt *L*/FPG im Komplex mit **ODN8** zeigen, dass das cdOG auch im nicht mutierten Enzym in der *syn*-Konformation vorliegt.<sup>4</sup> Aber welche Wechselwirkungen sorgen im Gegensatz zum cFaPydG für diese Konformation. Weitere Kokristallexperimente sind nötig, um diese Frage abschließend zu klären.

---

<sup>4</sup> In Zusammenarbeit mit R. Strasser, Arbeitsgruppe T. Carell. Nicht veröffentlichte Ergebnisse.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material und Methoden

**Allgemein:** Alle sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden in ofengetrockneten Glasgeräten unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Molekularsieb wurde vor der Verwendung mit Wasser staubfrei gewaschen, im Trockenschrank für 12 h vorgetrocknet und für weitere 12 h im Sandbad bei 300 °C unter Hochvakuum ausgeheizt. Alle Reagenzien wurden in den kommerziell erhältlichen Qualitäten *puriss*, *p.a.* oder *purum* bezogen und eingesetzt. DNA wurde bei Metabion bezogen. Dünnschichtchromatogramme wurden auf Aluminium-Fertigplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, bzw. RP-18F<sub>254s</sub>) angefertigt und entweder direkt unter UV Licht ausgewertet oder mit Ninhydrin oder Anisaldehyd entwickelt. Kieselgel für die Flashchromatographie war ebenfalls von Merck (Kieselgel 60) oder Aldrich (RP-18, Kieselgel 60). Das Abdestillieren von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde am Membranpumpenvakuum mit einem Rotationsverdampfer *VV2000* von Heidolph durchgeführt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Wässrige Lösungen wurden in Trockeneis eingefroren und mit einer Lyophylle (*Alpha 2-4*) von Christ oder einer Savant *Speed Vac* im Ölpumpenvakuum eingeengt.

**Lösungsmittel:** Sofern die Verwendung trockener Lösungsmittel erforderlich war, wurden diese in „absoluter“ Qualität, mit Septum über Molekularsieb von Fluka oder Acros bezogen. Entgasen der Reaktionslösungsmittel erfolgte durch mehrfach wiederholtes Einfrieren des Lösungsmittels in flüssigem Stickstoff, Auftauen unter Vakuum und Rückbefüllen mit Stickstoffschutzgas. Lösungsmittel für HPLC und Massenspektrometrie wurden in HPLC Qualität von Merck oder Fischer bezogen. Alle übrigen Lösungsmittel wurden in technischer Qualität eingesetzt und vor der Verwendung am Rotationsverdampfer destilliert. Doppelt destilliertes Wasser wurde mit einer *Milli-Q Plus* Anlage hergestellt.

**Analytik:** Kernresonanzspektren wurden auf Geräten von Bruker (*DRX200*, *AMX 300*, *ARX 300*, *AMX 400*, *AMX 600*) und Varian (*Oxford 200*, *XL 400*) aufgenommen. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur, die Messfrequenz und das Lösungsmittel sind in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung  $\delta$  für die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C Spektren ist in ppm relativ zu Tetramethylsilan ( $\delta = 0$ ) und für die <sup>31</sup>P Spektren relativ zu Phosphorsäure (85 % in Wasser,  $\delta = 0$ ) angegeben. Kopplungskonstanten *J* sind in Hz angegeben. Infrarotspektren wurden auf einem Perkin-Elmer *Spectrum BX* mit *DuraSampl IR II* ATR Einheit von Smiths (ATR = *attenuated total reflection*) oder auf einem Bruker *IFS 88* oder *IFS 25* aufgenommen.

Massenspektren wurden auf den Geräten Finnigan *MAT 95 Q* (EI, FAB) und Finnigan *LTQ-FT* (ESI) oder auf einem Bruker *Autoflex II* (MALDI-TOF) gemessen. Zur Messung von MALDI-TOF Spektren wurde eine Matrix bestehend aus 3-Hydroxypicolinsäure (50 mg), Ammoniumhydrogencitrat (10 mg) und 15-Krone-5 (10  $\mu$ L), gelöst in einer 1:1 Mischung aus Wasser und Acetonitril (1 mL) verwendet. UV/VIS Spektren wurden, sofern nicht anders angegeben, mit einem *Varian Cary 100 Bio* mit *Cary Temperature Controller* und *Sample Transport Accessory* mit *Multi Cell Block* gemessen. Dieses Gerät wurde auch zur Bestimmung der DNA-Schmelzkurven verwendet. Zur Bestimmung der Konzentration von DNA Proben wurde ein *NanoDrop ND 1000* Photometer von peQLab verwendet. Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroheiztisch auf einem Leica *Galen* Mikroskop gemessen.

**HPLC:** Die Experimente wurden auf Anlagen der Hersteller Merck-Hitachi und Waters durchgeführt (beide sowohl analytisch als auch präparativ). Merck-Hitachi: *L-7400* UV- und *L-7420* UV/VIS Detektor, *L-7100* und *L-7150* Pumpe, *D-7200* Autosampler, *L-7000* Interfacemodul und *L-7612* bzw. *ERC-3415* Entgaser. Waters: *2487 Dual  $\lambda$  Absorbance* Detector, *1525* Binary HPLC Pump, *2695* Separations Module und *2996*, bzw. *996* Photodiode Array Detector. Soweit nicht anders vermerkt, wurden folgende Puffersysteme verwendet:

Puffersystem **P1**: 0.1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) in doppelt destilliertem Wasser, pH 7.0 (Puffer A) und 0.1 M TEAA in 80/20 Acetonitril/Wasser, pH 7.0 (Puffer B).

Puffersystem **P2**: 2 mM TEAA in doppelt destilliertem Wasser, pH 7.0 (Puffer A) und 2 mM TEAA in 80/20 Acetonitril/Wasser, pH 7.0 (Puffer B).

Puffersystem **P3**: 2 mM Ammoniumformiat in doppelt destilliertem Wasser, pH 5.5 (Puffer A) und 2 mM Ammoniumformiat in 80/20 Acetonitril/Wasser, pH 5.5 (Puffer B).

Puffersystem **P4**: 20 mM TRIS/HCl in doppelt destilliertem Wasser, pH 7.0 (Puffer A) und 20 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7.0 in destilliertem Wasser (Puffer B).

## 5.2 DNA Synthese und Aufreinigung

Zur Synthese der ODN wurde wahlweise ein Applied Biosystems *Expedite 8900* oder ein Ämersham *Oligopilot 10* verwendet. Synthesemaßstab war 1 µmol. Die Phosphoramidite der Standardbasen wurden bei Glen Research (Pac-dA, dmf-dG, Ac-dC, T) oder bei Samchully Pharm (ibu-dG, Bz-dA, Bz-dC, T) bezogen. 8-Oxo-dG Phosphoramidit war von Glen Research, ebenso das *CPG-500* Trägermaterial. CPG-Kartuschen waren von Applied Biosystems. Das verwendete Acetonitril hatte einen Wassergehalt von 10 ppm und war von Roth in der Qualität „Zur DNA Synthese“. Benzylthiotetrazol (BTT) wurde als Kupplungsreagenz verwendet und nach in Kapitel 0 beschriebener Prozedur dargestellt. Alle weiteren Reagenzien wurden in den unter Kapitel 5.1 beschriebenen üblichen Qualitäten bezogen und in den folgende Konzentrationen eingesetzt.

- Phosphoramidite: 0.1 M in 10 ppm Acetonitril über Molekularsieb
- Aktivator: 0.25 M BTT in 10 ppm Acetonitril über Molekularsieb
- Capping A: Acetanhydrid (20 %), 2,6-Lutidin (30 %) in 10 ppm Acetonitril (50 %)
- Capping B: *N*-Methylimidazol (20 %) in 10 ppm Acetonitril
- Deprotection: 3 % Dichloressigsäure in Toluol (destilliert)
- Oxidation: 0.025 M Iod in einer Mischung aus 2,6-Lutidin (5 %) Acetonitril/Wasser 65/30.

Die Kupplungsbedingungen für die Standardphosphoramidite entsprachen den vom Hersteller empfohlenen Standardwerten. Abweichend davon wurden Änderungen für modifizierte Phosphoramidite vorgenommen:

cdG (**84**): 10 min (*Expedite 8900*), bzw. 2×10 min (*Oligopilot10*)

cdOG (**94**): 10 min (*Expedite 8900*), bzw. 2×10 min (*Oligopilot10*)

dOG: 10 min (*Expedite 8900*, *Oligopilot10*)

Die Abspaltung der DNA vom CPG-Träger und die Entfernung der Schutzgruppen geschah im Falle der Amidite von Glen Research durch Inkubieren mit einer Mischung aus konzentriertem Ammoniak und Ethanol (3:1) für 18 h bei Raumtemperatur. Im Fall der Amidite von Samchully Pharm wurde die Entschützung durch Inkubieren mit einer Mischung aus konzentriertem Ammoniak und 40 %iger wässriger Methylaminlösung für 18 h bei

Raumtemperatur (oder 30 °C) durchgeführt. Enthielt die DNA 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin oder carbocyclisches 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin, so wurde die Entschützungs Mischung mit 0.5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol versehen. Die Lösungsmittel wurden anschließend mit einer Savant *Speed Vac* unter Ölpumpenvakuum entfernt und das entstandene Pellet in doppelt destilliertem Wasser gelöst. Die Reinigung durch HPL-Chromatographie erfolgte unter Verwendung von Puffersystem **P1** und Säulen der Firma Macherey-Nagel: *Nucleosil 100-7 C18* (250×10 mm) mit einem Gradient von 0 – 30 % Puffer-B in 45 min bei einem Fluss von 5 mL/min. Die Fraktionen wurden durch analytische HPLC (Säule: Macherey-Nagel *Nucleodur 100-3 C18*, Puffer **P1**, Gradient von 0 – 30 % Puffer-B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) auf Reinheit geprüft und mit MALDI-TOF Spektrometrie analysiert. Gereinigte DNA wurde anschließend über Waters *Sep-Pak C18* Kartuschen entsalzt, die zu diesem Zweck zunächst mit 5 mL Acetonitril aktiviert und mit 10 mL doppelt destilliertem Wasser äquilibriert wurden. Nach dem Auftragen der Probe wurde mit 5 mL doppelt destilliertem Wasser gespült und mit 5 mL 60 %igem Acetonitril eluiert. Nach erneutem Lyophilisieren und Lösen in doppelt destilliertem Wasser wurde die Konzentration bestimmt. Dies basierte auf der Annahme, dass die Extinktionskoeffizienten von dG und cdG und von dOG und cdOG in etwa identisch sind. Die Werte aller anderen Extinktionskoeffizienten wurden der Literatur entnommen.<sup>[209, 210]</sup>

### 5.3 Schmelzkurven

Es wurden Messungen mit DNA Konzentrationen von 0.3  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 3.0  $\mu$ M, 9  $\mu$ M und 27  $\mu$ M in einem Puffer bestehend aus 150 mM NaCl und 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 durchgeführt. Die für die Messungen verwendeten Quarzküvetten waren von Helma und hatten eine Schichtdicke von 1 mm (27  $\mu$ M), 2 mm (9  $\mu$ M) und 10 mm (0.3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M). Die Probenlösung in der Küvette wurde mit einer etwa 5 mm dicken Schicht aus Dimethylpolysiloxan überschichtet, um ein Verdampfen oder Einkondensieren von Wasser während der Messungen zu verhindern. Kontinuierliches Spülen des Probenraums mit einem leichten Stickstoffstrom verhinderte ein Beschlagen der Küvetten während der Messungen. Die Temperatur im Probenraum wurde mittels einer Referenzküvette ermittelt. Der verwendete Temperaturgradient betrug 0.4 K/min zwischen einer Temperatur von 0 °C und 85 °C. Jede Messung wurde fünfmal wiederholt und man erhielt die Schmelzpunkte ( $T_m$ ) aus dem Nulldurchgang der zweiten Ableitung der gemittelten, korrigierten Schmelzkurven.

Ermitteln der thermodynamischen Daten aus den Schmelzkurven erfolgte nach publizierten Methoden mit Microcal *Origin*.<sup>[211]</sup>

#### **5.4 Enzymatischer Verdau der Oligonukleotide**

**ODN5** (cdG): Zu einer Lösung von **ODN5** (100  $\mu$ L, 20  $\mu$ M) wurden Puffer A (10  $\mu$ L, 300 mM Ammoniumacetat, pH 5.7, 100 mM Calciumchlorid, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>) gegeben, gefolgt von der Zugabe von *Penicillium citrinum* Nuklease P1 (22 *units*) und *calf spleen* Phosphodiesterase (0.05 *units*). Die Lösung wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von der Zugabe von Puffer B (12  $\mu$ L, 500 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). Auf die anschließende Zugabe von *calf intestine* Phosphatase (10 *units*) und *Crotalus adamanteus* Phosphodiesterase I (9 *units*) folgte erneutes Inkubieren für weitere 3 h bei 37 °C. Abschließend wurde die Mischung mit 0.1 N HCl auf etwa pH 7.0 gebracht, für 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert und per HPLC-MS aufgetrennt und analysiert. Das hierzu verwendete Gerät war ein *LT-FT ICR* Massenspektrometer von *Thermo Finnigan*, betrieben im Negativmodus mit einer *ion-spray* Spannung von 4 kV, einer Kapillartemperatur von 200 °C, einem *ion source gas* Fluss von 40. Die MS/MS Kollisionsenergie war 35 eV. Zur chromatographischen Auftrennung der Probe wurde eine Interchrom *Uptisphere 3* (150×2.1 mm) Säule mit Puffersystem **P2** und einem Gradienten von 0 – 3 % B in 12 min und 12 – 20 % in 30 min bei einem Fluss von 200  $\mu$ L/min verwendet.

**ODN8** (cdOG): Der Verdau erfolgte unter Verwendung des gleichen Protokolls wie beim Verdau von **ODN5**. Abweichend davon wurde die Probe vor der Analyse durch HPLC-MS kurzzeitig (15 min) auf 90 °C erhitzt und mit 12000 U/min für 15 min zentrifugiert. Eine Probe von 20  $\mu$ L wurde per HPLC-MS analysiert. Das Spektrometer wurde im Negativmodus mit einer *ion-spray* Spannung von 4 kV, einer Kapillartemperatur von 200 °C, einem *ion source gas* Fluss von 40 betrieben. Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung einer Interchrom *Uptisphere* 150×2.1 mm Säule mit einem Fluss von 150  $\mu$ L/min und Puffersystem **P2** mit einem Gradienten von 100 % Puffer A 10 min, 0 – 10 % Puffer B in weiteren 18 min. Die Ionisierungsenergie für MS/MS und MS/MS/MS Experimente betrug 35 eV.

**ODN8'** (cdSp): Der enzymatische Verdau erfolgte unter Verwendung des gleichen Protokolls und der gleichen HPLC-MS Einstellungen wie bei **ODN8**. Abweichend davon wurde Puffersystem **P3** verwendet.

**ODN5'/5''** (cdIz): Zu einer Lösung von **ODN5'/ODN5''** (13  $\mu$ L, 11  $\mu$ M) wurde Ammoniumacetatpuffer (5  $\mu$ L, 300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>,

pH 5.7), *Penicillium citrinum* Nuklease P1 (3 units), *Antarctic Shrimp* Phosphatase (1 unit), und *Calf Spleen* Phosphodiesterase II (0.05 units) gegeben. Man inkubierte für 2 h bei 30 °C und analysierte anschließend 20 µL der Mischung per HPLC-MS unter Verwendung von Puffersystem **P3** und einem Gradienten von 0 – 3 % B in 12 min, 3 – 40 % B in 48 min auf einer Interchrom *Uptisphere* 150×2.1 bei einem Fluss von 150 µL/min. Das ESI-Spektrometer wurde im Negativmodus mit einer *ion spray* Spannung von 2.5 kV, einem *ion source gas* Fluss von 50 und einer Kapillartemperatur von 200 °C betrieben. Die Ionisierungsenergie für MS/MS und MS/MS/MS Experimente betrug 35 eV.

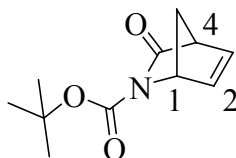
### 5.5 Hydrolyse von **cdIz**

**cdIz 99** wurde wie in Kapitel 5.6 beschrieben dargestellt, gereinigt und anschließend lyophilisiert. Das trockene **99** wurde in Phosphatpuffer (500 µL, 10 mM, pH 7.0) gelöst und bei 37 °C inkubiert. Nach 50, 120, 300, 420 und 480 min wurde eine Probe von 50 µL aus der Reaktionsmischung entnommen und per HPLC analysiert (Puffersystem **P1**, Gradient von 0 - 15 % Puffer B in 45 min auf einer Macherey-Nagel *Nucleodur 100-3* Säule, Fluss 0.5 mL/min). Die Fläche des Signals des bei 13 min eluierten **99** wurde bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Halbwertszeit der Hydrolyse wurde durch Nähern einer Exponentialfunktion ersten Grades mit Micrical Origin bestimmt. Bei der Inkubation von **99** entstand eine neue Verbindung, die unter den oben beschriebenen HPLC-Bedingungen bei 7 min eluierte. Die Substanz wurde aufgefangen und mittels HR-ESI Spektrometrie analysiert. Die Verbindung zeigte die Masse von carbocyclischem Oxazolone (**cdZ**, **102**) bei  $m/z = 243.1098$ . (berechnet für das  $[M-H^+]^-$ -Ion:  $m/z = 243.1099$ ).



## 5.6 Synthese der Verbindungen

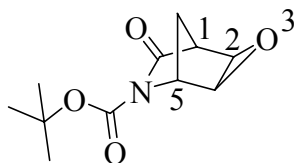
### *tert*-Butyl (1*R*,4*S*)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxylat (**107**)



(1*R*)-(-)-2-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on **74** (2.0 g, 18.3 mmol), Boc<sub>2</sub>O (8.0 g, 36.7 mmol, 2 eq) und DMAP (2.2 g, 18.3 mmol, 1 eq) wurden in trockenem THF gelöst und bei Raumtemperatur gerührt, bis das DC vollständigen Umsatz zeigte. Nach etwa 3 h wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das tieforange Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Toluol/Ethylacetat, 4:1) gereinigt und man erhielt das Produkt **107** in Form eines weißen Pulvers mit einer Ausbeute von 3.8 g (18.2 mmol, 99 %).

$R_f = 0.43$  (Toluol/Ethylacetat 2:1); Smp.: 85.0 – 86.5 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.49$  (s, 9 H, *t*Bu), 2.13 (d, <sup>2</sup> $J$ (C7H<sub>a</sub>,C7H<sub>b</sub>) = 8.5 Hz, 1 H, C7H<sub>a</sub>), 2.33 (d, <sup>2</sup> $J$ (C7H<sub>b</sub>,C7H<sub>a</sub>) = 8.5 Hz, 1 H, C7H<sub>b</sub>), 3.35 – 3.40 (m, 1 H, C4H), 4.92 – 4.97 (m, 1 H, C1H), 6.62 – 6.68 (m, 1 H, C5H), 6.86 – 6.92 (m, 1 H, C6H); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 27.9$  (3×CH<sub>3</sub>), 54.3 (C4), 54.8 (C7), 62.5 (C1), 82.4 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 138.1 (C5), 139.9 (C6), 150.3 (R<sub>2</sub>NCOO), 176.2 (C3); FTIR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3396$  vw, 3083 vw, 3071 w, 3028 vw, 2998 w, 2976 m, 2934 w, 1752 vs, 1707 vs, 1664 vw, 1637 vw, 1561 w, 1474 w, 1458 m, 1393 m, 1366 s, 1332 vs, 1310 vs, 1258 m, 1222 w, 1194 s, 1167 vs, 1154 vs, 1135 m, 1122 s, 1086 w, 1017 w, 995 m, 963 vw, 936 w, 904 w, 887 w, 857 s, 834 vw, 778 s, 764 s, 705 m, 656 vw, 613 vw, 498 vw, 461 vw, 445 vw cm<sup>-1</sup>; MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%): 441 (14) [M<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>, 232 (100) [M+Na]<sup>+</sup>, 176 (66) [M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>+Na]<sup>+</sup>, 132 (18) [M-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>; HRMS (ESI<sup>+</sup>, M+Na<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup>: 232.0958, gefunden 232.0950.

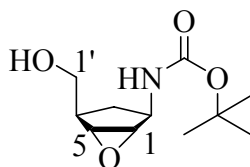
***tert*-Butyl (1*S*,2*R*,4*S*,5*R*)-7-oxo-3-oxa-6-azatricyclo[3.2.1.0<sup>2,4</sup>]octan-6-carboxylat (76)**



**107** (1.0 g, 4.8 mmol) wurde in Dichlormethan (40 mL) gelöst und mit MCPBA (2.9 g, 12.0 mmol, 2.5 eq) versetzt. Nach 48 h Rühren bei Raumtemperatur wurde gründlich je zweimal mit gesättigter Natriumcarbonat-, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und mittels Säulenchromatographie (Toluol/Ethylacetat, 2:1) aufgereinigt. Man erhielt **76** in Form eines weißen Pulvers (760 mg, 3.4 mmol, 71 %).

$R_f = 0.44$  (Toluol/Ethylacetat 2:1); Smp.: 120 – 122 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.50$  (s, 9 H, *t*Bu), 1.62 (d,  $^2J(\text{C8H}_a, \text{C8H}_b) = 10.5$  Hz, 1 H,  $\text{C8H}_a$ ), 1.79 (d,  $^2J(\text{C8H}_b, \text{C8H}_a) = 10.5$  Hz, 1 H,  $\text{C8H}_b$ ), 3.03 – 3.05 (m, 1 H,  $\text{C1H}$ ), 3.59 (dd,  $^3J(\text{C2H}, \text{C4H}) = 2.9$  Hz,  $^3J(\text{C2H}, \text{C1H}) = 1.2$  Hz, 1 H,  $\text{C2H}$ ), 3.75 (dd,  $^3J(\text{C4H}, \text{C2H}) = 2.9$  Hz,  $^3J(\text{C4H}, \text{C5H}) = 1.2$  Hz, 1 H,  $\text{C4H}$ ), 4.59 – 4.61 (m, 1 H,  $\text{C5H}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 27.00$  (C8), 27.97 (3 ·  $\text{CH}_3$ ), 48.27 (C1), 49.89 (C2), 53.03 (C4), 58.86 (C5), 83.24 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 149.65 ( $\text{R}_2\text{NCOO}$ ), 173.28 (C7); FTIR (KBr):  $\tilde{\nu} = 2989$  *m*, 2937 *w*, 1771 *s*, 1706 *s*, 1369 *m*, 1336 *s*, 1305 *s*, 1257 *m*, 1214 *m*, 1152 *s*, 1119 *s*, 1008 *s*, 934 *m*, 856 *m*, 774 *m*  $\text{cm}^{-1}$ ; MS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  (%) = 248 (78) [ $M+\text{Na}$ ] $^+$ , 152 (100) [ $M-\text{C}_4\text{H}_8+\text{Na}$ ] $^+$ , 148 (28) [ $M-\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2+\text{Na}$ ] $^+$ ; HRMS ( $\text{ESI}^+$ ,  $M+\text{Na}^+$ ): berechnet für [ $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4+\text{Na}$ ] $^+$ : 248.0899, gefunden 248.0899.

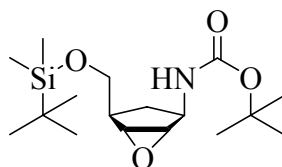
***tert*-Butyl-*N*-[(1*S*,2*R*,4*R*,5*S*)-4-(hydroxymethyl)-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-yl]-carbamat  
(108)**



Epoxid **76** (700 mg, 3.1 mmol) wurde in trockenem Methanol (35 mL) gelöst und mit Natriumborhydrid (588 mg, 15.5 mmol, 5 eq) über einen Zeitraum von 5 min bei 0 °C versetzt. Auf 30 min Rühren bei 0 °C folgte Neutralisation der Reaktionslösung mit Essigsäure (10 % in Methanol). Die Neutralisation wurde mit pH Papier sorgfältig verfolgt und das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Zugabe von gesättigter Ammoniumchloridlösung (50 mL) wurde viermal mit Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und zuletzt über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde erneut am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **108** hatte keine erkennbare Verunreinigung und wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet (653 mg, 2.9 mmol, 92 %).

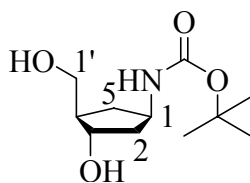
$R_f = 0.29$  (Toluol/Ethylacetat 1:1); Smp.: 124 – 126 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.44 - 1.62$  (m, 1 H, C3H<sub>b</sub>), 1.45 (s, 9 H, *t*Bu), 1.75 – 1.92 (br s, 1 H, OH), 2.06 – 2.19 (m, 1 H, C3H<sub>a</sub>), 2.41 (ddd,  $^3J(\text{C4H}, \text{C1}'\text{H}_a) = 3.7$  Hz,  $^3J(\text{C4H}, \text{C1}'\text{H}_b) = 2.3$  Hz,  $^3J(\text{C4H}, \text{C3H}) = 9.3$  Hz, 1 H, C4H), 3.42 (s, 2 H, C1H, C5H), 3.68 (dd,  $^2J(\text{C1}'\text{H}_a, \text{C1}'\text{H}_b) = 10.1$  Hz,  $^3J(\text{C1}'\text{H}_a, \text{C4H}) = 3.7$  Hz, 1 H, C1'H<sub>a</sub>), 3.92 (dd,  $^2J(\text{C1}'\text{H}_b, \text{C1}'\text{H}_a) = 10.1$  Hz,  $^3J(\text{C1}'\text{H}_b, \text{C4H}) = 2.3$  Hz, 1 H, C1'H<sub>b</sub>), 4.18 – 4.36 (m, 1 H, C2H), 5.84 (br d,  $^3J(\text{NH}, \text{C2H}) = 6.3$  Hz, 1 H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 28.3$  (3 × CH<sub>3</sub>), 32.6 (C3), 40.3 (C4), 49.7 (C2), 59.2, 59.8 (C1, C5), 62.7 (C1'), 79.2 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); FTIR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3418$  s, 3337 m, 2978 w, 2951 w, 2912 w, 2896 w, 1692 vs, 1532 s, 1474 w, 1454 w, 1395 w, 1368 m, 1353 w, 1334 w, 1315 w, 1284 w, 1258 w, 1232 w, 1210 w, 1174 s, 1122 vw, 1093 vw, 1081 vw, 1053 w, 1033 w, 1013 m, 976 vw, 961 vw, 921 vw, 910 vw, 859 vw, 841 m, 789 vw, 738 vw, 680 w, 67 vw, 575 vw, 451 vw  $\text{cm}^{-1}$ ; 155.59 (NHCOO); MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 252 (100) [ $M+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 196 (10) [ $M-\text{C}_4\text{H}_8+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 152 (22) [ $M-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>; HRMS (ESI<sup>+</sup>,  $M+\text{Na}$ ): berechnet für [ $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>: 252.1218, gefunden 252.1204.

***tert*-Butyl *N*-[(1*S*,2*R*,4*R*,5*R*)-4-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-yl] carbamate (**77**)**



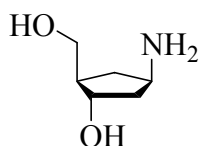
Der Alkohol **108** (400 mg, 1.8 mmol), Imidazol (261 mg, 3.8 mmol, 2.2 eq) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (579 mg, 3.8 mmol, 2.2 eq) wurden in DMF (8 mL) gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (80 mL) verdünnt und nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung ( $2 \times 40$  mL) und gesättigter Kochsalzlösung ( $4 \times 40$  mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und per Säulenchromatographie (Toluol/Ethylacetat 8:1) gereinigt. Man erhielt das gereinigte Produkt **77** in Form eines farblosen Öls (537 mg, 1.6 mmol, 90 %)

$R_f = 0.42$  (Toluol/Ethylacetat 6:1); Smp.: 32 – 33 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.13$  (s, 6 H,  $2 \times \text{Si-CH}_3$ ), 0.92 (s, 9 H, Si-*t*Bu), 1.37 (d,  $^2J(\text{C3H}_b, \text{C3H}_a) = 14.3$  Hz, 1 H, C3H<sub>b</sub>), 1.43 (s, 9 H, *t*Bu), 2.02 – 2.17 (m, 1 H, C3H<sub>a</sub>), 2.32 – 2.40 (m, 1 H, C4H), 3.34 (d,  $^3J(\text{C5H}, \text{C1H}) = 2.2$  Hz, 1 H, C5H), 3.38 (d,  $^3J(\text{C1H}, \text{C5H}) = 2.2$  Hz, 1 H, C1H), 3.64 (dd,  $^2J(\text{C1}'\text{H}_a, \text{C1}'\text{H}_b) = 10.4$  Hz,  $^3J(\text{C1}'\text{H}_a, \text{C4H}) = 2.8$  Hz, 1 H, C1'<sub>a</sub>), 3.87 (dd,  $^2J(\text{C1}'\text{H}_b, \text{C1}'\text{H}_a) = 10.4$  Hz,  $^3J(\text{C1}'\text{H}_b, \text{C4H}) = 2.3$  Hz, 1 H, C1'<sub>b</sub>), 4.20 – 4.31 (m, 1 H, C2H), 5.70 (br d,  $^3J(\text{NH}, \text{C2H}) = 9.6$  Hz, 1 H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -5.5$  ( $3 \times \text{Si-CH}_3$ ), -5.4 ( $3 \times \text{Si-CH}_3$ ), 18.7 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.1 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.4 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 33.3 (C3), 40.8 (C4), 49.6 (C2), 59.4, 59.8 (C1, C5), 64.7 (C1'), 79.1 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.2 (NHCOO); FTIR (Film):  $\tilde{\nu} = 3393$  w, 2955 s, 2930 s, 2858 m, 1715 vs, 1504 s, 1471 m, 1391 m, 1366 s, 1324 m, 1256 s, 1216 w, 1172 vs, 1126 m, 1094 m, 1048 m, 1016 s, 986 w, 929 vw, 863 m, 839 vs, 797 m, 781 s, 701 vw, 664 vw, 552 vw, 450 vw  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 366 (100) [ $M+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 310 (14) [ $M-\text{C}_4\text{H}_8+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 266 (12) [ $M-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>; HRMS (ESI<sup>+</sup>,  $M+\text{Na}$ ): berechnet für [ $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{Si}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>: 366.2077, gefunden 366.2060.

**tert-Butyl-N-[(1R,3S,4R)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]carbamat (109)**

Epoxid **77** (528 mg, 1.5 mmol) wurde in trockenem Toluol (11 mL) unter Argonatmosphäre gelöst und mit Red-Al® (65 % Lösung in Toluol, 0.9 mL, 3.1 mmol, 2.0 eq) tropfenweise über eine Spritze bei 0 °C versetzt. Man rührte für 3 h bei Raumtemperatur, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Gesättigte wässrige Ammoniumchloridlösung (20 mL) wurde hinzugegeben und für weitere 30 min gerührt. Zu der Mischung wurde Ethylacetat (40 mL) hinzugefügt und die organische Phase wurde mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (4 × 40 mL), über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Man erhielt **109** in Form farbloser Kristalle (333 mg, 1.4 mmol, 93 %), die ohne weitere Aufreinigung verwendet wurden.

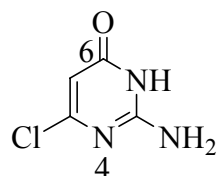
$R_f$  = 0.21 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10 :1), Smp.: 126 – 127 °C; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.05 - 1.19 (m, 1 H, C5H<sub>b</sub>), 1.43 (s, 9 H, *t*Bu), 1.78 – 2.10 (m, 4 H, C2H<sub>b</sub>, C2H<sub>a</sub>, C4H, OH), 2.17 (br s, 1 H, OH), 2.22 – 2.36 (m, 1 H, C5H<sub>a</sub>), 3.54 – 3.66 (m, 1 H, C1'H<sub>a</sub>), 3.67 – 3.87 (m, 1 H, C1'H<sub>b</sub>), 4.03 – 4.24 (m, 2 H, C1H, C3H), 4.45 – 4.73 (br, 1 H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 28.4 (3 × CH<sub>3</sub>), 34.9 (C5), 41.1 (C2), 48.9 (C4), 49.8 (C1), 64.1 (C1'), 73.7 (C3), 81.7 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); FTIR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3375 *m*, 2981 *m*, 2966 *m*, 2929 *w*, 1687 *vs*, 1529 *vs*, 1485 *w*, 1444 *w*, 1391 *w*, 1365 *w*, 1335 *w*, 1281 *s*, 1252 *m*, 1231 *m*, 1180 *vs*, 1111 *w*, 1090 *w*, 1053 *m*, 1016 *s*, 977 *vw*, 921 *vw*, 883 *vw*, 864 *vw*, 828 *vw*, 779 *w*, 768 *vw*, 745 *vw*, 623 *m*, 495 *vw*, 462 *vw*, 432 *vw* cm<sup>-1</sup>; NHCOO nicht nachgewiesen; MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 254 (100) [M+Na]<sup>+</sup>, 154 (42) [M-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>; HRMS (ESI<sup>+</sup>, M+Na<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>+Na]<sup>+</sup>: 254.1368, gefunden 254.1351.

**(1*S*,2*R*,4*R*)-4-Amino-2-(hydroxymethyl)cyclopentanol (72)**

Carbamat **109** (1.6 g, 6.9 mmol) wurde in destilliertem Wasser (30 mL) suspendiert und sorgfältig entgast. Die Mischung wurde unter Rückfluss und Argonatmosphäre für 18 h erhitzt und anschließend an der Lyophylle vom Lösungsmittel befreit. Um die Substanz vollständig zu trocknen, wurden letzte Wasserreste anschließend durch azeotrope Destillation mit Toluol am Hochvakuum entfernt. Man erhielt **72** ohne weitere Aufarbeitung in Form eines farblosen bis bräunlichen Öls in nahezu quantitativer Ausbeute (908 mg, 6.9 mmol, 99 %).

Smp.: 83 – 85 °C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0.93 (dt, <sup>2</sup>J(C3H<sub>b</sub>,C3H<sub>a</sub>) = 12.7 Hz, <sup>3</sup>J(C3H<sub>b</sub>,C2H,C4H) = 7.4 Hz, 1 H, C3H<sub>b</sub>), 1.44 (dt, <sup>2</sup>J(C5H<sub>b</sub>,C5H<sub>a</sub>) = 12.8 Hz, <sup>3</sup>J(C5H<sub>b</sub>,C1H,C4H) = 6.5 Hz, 1 H, C5H<sub>b</sub>), 1.61 (ddd, <sup>2</sup>J(C5H<sub>a</sub>,C5H<sub>b</sub>) = 12.8 Hz, <sup>3</sup>J(C5H<sub>a</sub>,C1H) = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J(C5H<sub>a</sub>,C4H) = 6.9 Hz, 1 H, C5H<sub>a</sub>), 1.73 – 1.82 (m, 1 H, C2H), 1.97 (dt, <sup>2</sup>J(C3H<sub>a</sub>,C3H<sub>b</sub>) = 12.7 Hz, <sup>3</sup>J(C3H<sub>a</sub>,C2H,C4H) = 7.5 Hz, 1 H, C3H<sub>a</sub>), 3.27 – 3.34 (m, 2 H, C4H, C1'H<sub>a</sub>), 3.39 (dd, <sup>2</sup>J(C1'H<sub>b</sub>,C1'H<sub>a</sub>) = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J(C1'H<sub>b</sub>,C2H) = 5.5 Hz, 1 H, C1'H<sup>b</sup>), 3.88 (dt, <sup>3</sup>J(C1H,C5H<sub>b</sub>) = 6.5, <sup>3</sup>J(C1H,C2H,C5H<sup>a</sup>) = 4.7, 1 H, C1H), 4.36 (br, 2 H, NH<sub>2</sub>) (br s, 2 H, 2 × OH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 38.3 (C3), 45.1 (C5), 49.9 (C2), 50.3 (C4), 63.4 (C1'), 72.7 (C1); FTIR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3408 vs, 3258 s, 2957 s, 2928 s, 2860 s, 1603 m, 1444 w, 1365 m, 1215 w, 1177 w, 1092 m, 1070 m, 1027 m, 881 w, 839 w, 642 w, 531 w, 464 w cm<sup>-1</sup>; MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) = 170 (4) [M+K]<sup>+</sup>, 133 (8) [M<sub>13C</sub>+H]<sup>+</sup>, 132 (100) [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (FAB<sup>+</sup>, M+H<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>: 132.1025, gefunden 132.1027.

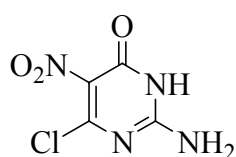
**2-Amino-4-chlor-1H-pyrimidin-6-on (110)**



2-Amino-4,6-dichloropyrimidin **75** (10.7 g, 65.2 mmol) wurde in 1 molarer Natronlauge (150 mL) suspendiert und für 45 min unter Rückfluss erhitzt. Dabei ging der Feststoff vollständig in Lösung. Anschließend ließ man erkalten und versetzte mit 50 mL Eisessig. Das Produkt **110** fiel dabei aus und konnte durch Filtration als hellgelber Feststoff erhalten werden (9.3 g, 98 %).

Smp.: > 250 °C (Zersetzung);  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 5.56 (s, 1H, CH), 7.04 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 11.09 (br s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 99.08 (C5), 155.95 (C2), 159.88 (C4), 162.69 (C6); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3457 m, 3151 m, 2924 w, 2755 vw, 1657 vs, 1588 m, 1562 m, 1482 m, 1374 m, 1226 vw, 1161 w, 1022 vw, 980 m, 903 vw, 805 w, 758 vw, 693 vw, 625 vw, 573 vw, 426 vw; MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  (%) = 145.0 (100) [ $\text{M}$ ] $^+$ ; HRMS ( $\text{EI}^+$ ,  $\text{M}^+$ ): berechnet für  $[\text{C}_4\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}]^+$ : 145.0042, gefunden 145.0071.

**2-Amino-4-chlor-5-nitro-1H-pyrimidin-6-on (78)**

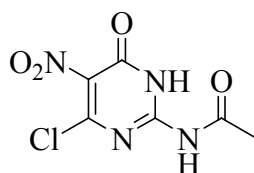


**110** (9.3 g, 63.6 mmol) wurde bei 0 °C in konz. Schwefelsäure (20 mL) mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst und unter Eiskühlung mit rauchender Salpetersäure (18 mL) versetzt. Nach 5 min wurde die Reaktionslösung langsam auf Eis gegeben, wobei das Tauwasser mittels einer Fritte permanent entfernt wurde. Auf diese Weise erhielt man einen Niederschlag, der anschließend für mehrere Tage am HV getrocknet wurde. **78** konnte so in Form eines gelben Pulvers (11.0 g, 90 %) erhalten werden.

Smp.: > 250 °C (Zersetzung);  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 7.16 (br s, 1H,  $\text{NH}_a$ ), 8.58 (br s, 1H,  $\text{NH}_b$ ), 12.15 (br s, 1H, N1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  =

126.5 (C5), 153.55, 154.78, 155.37; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3593 *m*, 3509 *m*, 3318 *s*, 3199 *s*, 3058 *s*, 2803 *w*, 1672 *vs*, 1584 *s*, 1535 *s*, 1483 *vs*, 1373 *m*, 1315 *vs*, 1235 *s*, 1131 *w*, 1043 *m*, 928 *w*, 847 *m*, 782 *w*, 749 *w*, 712 *vw*, 661 *w*, 621 *w*, 589 *w*, 537 *w*, 477 *vw*, 446 *vw*; MS (EI<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 190.0 (100) [M]<sup>+</sup>; HRMS (EI<sup>+</sup>, M<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>: 189.9893, gefunden 189.9903.

### 2-Acetylamino-4-chlor-5-nitro-1*H*-pyrimidin-6-on (73)

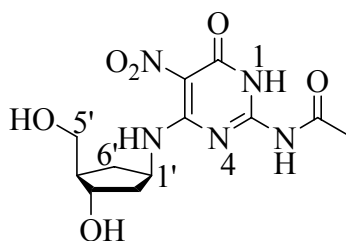


**78** (4.0 g, 21 mmol) wurde in Acetanhydrid (40 mL) suspendiert, mit drei Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt und auf 90 °C erhitzt. Dabei ging der Feststoff vollständig in Lösung. Nach 30 min ließ man die nunmehr braune Lösung erkalten, wobei sich gelbe Kristalle ausschieden. Man ließ über Nacht stehen und filtrierte den Niederschlag anschließend ab. Zusätzlich wurde das Filtrat auf etwa 1/3 seines ursprünglichen Volumens eingengt, wobei erneut gelber Feststoff ausfiel. Dieser wurde ebenfalls abfiltriert. Auf diese Weise erhielt man **73** in Form leicht gelber Kristalle (3.1 g, 64 %).

Smp.: 237 – 240 °C; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 12.44 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 23.9 (C8), 124.2, 150.3, 152.2, 154.3, 174.1 (C7); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3425 *w*, 3221 *s*, 3167 *s*, 2938 *w*, 2214 *vw*, 1682 *vs*, 1603 *vs*, 1561 *vs*, 1366 *s*, 1320 *s*, 1237 *m*, 1201 *vs*, 1109 *vw*, 1054 *w*, 1002 *w*, 972 *w*, 918 *w*, 840 *m*, 787 *m*, 737 *vw*, 618 *vw*, 594 *w*, 424 *w*; MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 233.2 (81.70) [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (FAB<sup>+</sup>, M+H<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>: 233.0077, gefunden 233.0088.



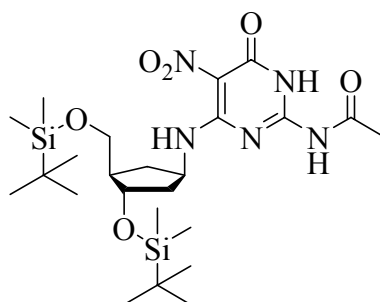
***N*-4-[[*(1'R,3'S,4'R)*-3'-Hydroxy-4'-hydroxymethyl)cyclopentyl]amino]-5-nitro-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyrimidinyl)acetamid (**79**)**



Amin **72** (908 mg, 6.9 mmol) wurde in trockenem DMF (5 mL) unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum entfernt und das Edukt erneut in trockenem DMF (15 mL) gelöst und mit Diisopropylethylamin (1.2 mL, 6.9 mmol, 1 eq) versetzt. In einem zweiten Kolben wurde **73** in trockenem DMF (10 mL) gelöst und langsam, bei 0 °C zur Aminlösung hinzugegeben. Danach wurde die Reaktionsmischung für 90 min zunächst bei Raumtemperatur und anschließend für weitere 90 min bei 75 °C gerührt. Man ließ über einen Zeitraum von 30 min erkalten und tropfte die Lösung langsam in ein Gemisch aus Dichlormethan und Hexan (1:1, 1 L), gefolgt von weiterem einstündigem Rühren bei Raumtemperatur. Die Suspension wurde abfiltriert und der hellgelbe Feststoff am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt **79** (2.0 g, 6.0 mmol) mit einer Ausbeute von 86 %. Eine weitere Aufreinigung war aufgrund der bereits gegebenen Reinheit nicht nötig.

$R_f = 0.40$  (*n*Butanol/Wasser 9:4); Smp.: 192 – 203 °C (Zersetzung);  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1.24 - 1.34$  (m, 1 H, C6'H<sub>b</sub>), 1.78 – 1.88 (m, 3 H, C2'H<sub>a</sub>, C2'H<sub>b</sub>, C4'H), 2.18 (s, 3 H, Ac), 2.15 – 2.29 (m, 1 H, C6'H<sub>a</sub>), 3.32 (s, 1 H, OH), 3.30 – 3.48 (m, 2 H, C5'H<sub>a</sub>, C5'H<sub>b</sub>), 3.91 – 4.02 (m, 1 H, C3'H), 4.58 – 4.82 (m, 2 H, C1'H, OH), 9.59 (d,  $^3J(\text{N7H}, \text{C1'H}) = 8.0$  Hz, 1 H, C1'NH), 10.6 – 12.2 (br, 2 H, N1H, NHAc);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 24.2$  (Ac), 34.3 (C6'), 41.4 (C2'), 49.1 (C4'), 50.6 (C1'), 62.6 (C5'), 72.1 (C3'), 112.3 (C-NO<sub>2</sub>), 150.7 (C<sub>Het</sub>), 154.5 (C<sub>Het</sub>), 157.9 (C<sub>Het</sub>), 174.4 (COCH<sub>3</sub>); FTIR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3410$  *s*, 2934 *w*, 1685 *vs*, 1624 *vs*, 1596 *vs*, 1538 *s*, 1476 *m*, 1424 *m*, 1372 *m*, 1334 *m*, 1228 *vs*, 1152 *w*, 1039 *w*, 787 *w*, 744 *w*, 698 *vw*, 635 *vw*, 545 *vw*  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 350 (80) [ $M+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 328 (100) [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>; HRMS (ESI<sup>+</sup>,  $M+\text{Na}$ ): berechnet für [ $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_6+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>: 350.1077, gefunden 350.1087.

***N*-[4-[[[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-[*tert*-Butyldimethylsilyl]oxy]-4'-[[(*tert*-butyldimethylsilyl)-oxy]methyl]-cyclopentyl)amino]-5-nitro-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyrimidinyl]acetamid (**80**)**

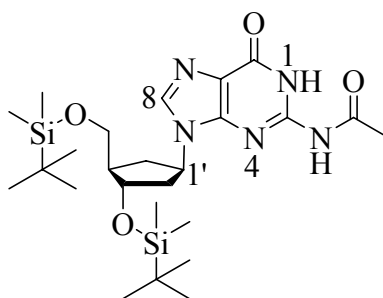


Kupplungsprodukt **79** (1.6 g, 4.7 mmol) und Imidazol (996 mg, 14.2 mmol, 3 eq) wurden in trockenem DMF (25 mL) gelöst und mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (2.14 g, 14.2 mmol, 3 eq) versetzt. Nach dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur war die Umsetzung vollständig (DC Kontrolle) und die Reaktionsmischung konnte in Ethylacetat (250 mL) aufgenommen werden. Die organische Phase wurde mit 1 molarer Natriumhydrogencarbonatlösung (2 × 150 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (5 × 200 mL) gewaschen und anschließend über Säulenchromatographie (Chloroform/Methanol 50:1) gereinigt. Man erhielt **80** in Form eines leicht gelben Films (2.1 g, 3.8 mmol, 79 %).

$R_f$  = 0.22 (Chloroform/Methanol 20:1); Smp.: 220 – 224 °C (Zersetzung);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.03 (s, 6 H, 2 × Si-CH<sub>3</sub>), 0.04 (s, 6 H, 2 × Si-CH<sub>3</sub>), 0.06 (s, 9 H, Si-*t*Bu), 1.31 (dt,  $^2J(\text{C6}'\text{H}_b, \text{C6}'\text{H}_a) = 13.0$  Hz,  $^3J(\text{C6}'\text{H}_b, \text{C1}'\text{H}, \text{C4}'\text{H}) = 8.5$  Hz, 1 H, C6'<sub>b</sub>), 1.75 (ddd,  $^2J(\text{C2}'\text{H}_b, \text{C2}'\text{H}_a) = 13.8$  Hz,  $^3J(\text{C2}'\text{H}_b, \text{C1}'\text{H}) = 8.5$  Hz,  $^3J(\text{C2}'\text{H}_b, \text{C3}'\text{H}) = 5.34$  Hz, 1 H, C2'<sub>b</sub>), 1.90 – 2.03 (m, 2 H, C2'<sub>a</sub>, C4'<sub>H</sub>), 2.25 – 2.35 (m, 1 H, C6'<sub>a</sub>), 2.29 (s, 3 H, Ac), 3.52 (dd,  $^2J(\text{C5}'\text{H}_a, \text{C5}'\text{H}_b) = 10.1$  Hz,  $^3J(\text{C5}'\text{H}_a, \text{C4}'\text{H}) = 4.79$  Hz, 1 H, C5'<sub>a</sub>), 3.60 (dd,  $^2J(\text{C5}'\text{H}_b, \text{C5}'\text{H}_a) = 10.1$  Hz,  $^3J(\text{C5}'\text{H}_b, \text{C4}'\text{H}) = 4.79$  Hz, 1 H, C5'<sub>b</sub>), 4.15 (q,  $^3J(\text{C3}'\text{H}, \text{C2}'\text{H}_a, \text{C2}'\text{H}_b, \text{C4}'\text{H}) = 5.3$  Hz, 1 H, C3'<sub>H</sub>), 4.60 (m, 1 H, C1'<sub>H</sub>), 9.44 (br, 1 H, NH), 9.65 (d,  $^3J(\text{C1}'\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 7.2$ , 1 H, C1'<sub>NH</sub>), 11.43 (br, 1 H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = - 5.5 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.8 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.7 (Si-CH<sub>3</sub>), 18.0 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.3 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.6 (Ac), 25.8 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.9 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.0 (C6'), 42.2 (C2'), 49.8 (C4'), 50.8 (C1'), 63.0 (C5'), 72.9 (C3'), 113.0 (C-NO<sub>2</sub>), 149.9 (C<sub>Het</sub>), 155.1 (C<sub>Het</sub>), 158.3 (C<sub>Het</sub>), 172.8 (COCH<sub>3</sub>); FTIR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3257 w, 2955 s, 2930 s, 2895 w, 2857 m, 1669 vs, 1622 vs, 1588 vs, 1536 s, 1472 m, 1430 m, 1373 m, 1335 m, 1253 s, 1225 vs, 1121 m, 1081 m, 1005 w, 938 vw, 876 m, 837 vs, 813 w, 788 s, 776 s, 721 vw, 701 w, 669 w, 632 w, 547 vw, 438 vw cm<sup>-1</sup>; MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 594 (21) [ $M+K$ ]<sup>+</sup>,

579 (33)  $[M_{13C}+Na]^+$ , 578 (100)  $[M+Na]^+$ , 557 (8)  $[M_{13C}+H]^+$ , 556 (26)  $[M+H]^+$ ; HRMS (ESI<sup>+</sup>,  $M+Na^+$ ): berechnet für  $[C_{24}H_{45}N_5O_6Si_2+Na]^+$ : 578.2806, gefunden 578.2798.

***N*-[9-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl]cyclopentyl]-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-yl]-acetamide (**81**)**

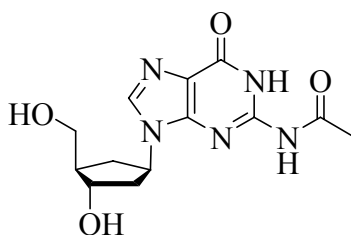


Verbindung **80** (206 mg, 380  $\mu$ mol) wurde zusammen mit Palladium auf aktivierter Kohle (150 mg) in trockenem Methanol suspendiert, die Mischung anschließend sorgfältig entgast und zuletzt die Stickstoffatmosphäre gegen Wasserstoff austauscht. Starkes Rühren über einen Zeitraum von 18 h garantierte eine gute Durchmischung der Suspension mit der Gasphase. Unter Ausschluss von Sauerstoff wurde der Palladiumkatalysator über einen Spritzenfilter (0.2  $\mu$ m Nylon, *Whatman Puradisk<sup>TM</sup>*) abfiltriert und die nunmehr klare Lösung am Hochvakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in Diethoxymethylacetat (2 mL) aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für weitere 75 min auf 100 °C erhitzt und zuletzt, nach dem Erkalten in Ethylacetat (20 mL) aufgenommen und mit gesättigter Kochsalzlösung (20 mL) gewaschen. Die organische Phase trocknete man über Magnesiumsulfat und reinigte über Säulenchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 40:1) auf. Man erhielt **81** in Form eines hellgelben Feststoffes (75 mg, 0.14 mmol, 37 %).

$R_f$  = 0.30 (Chloroform/Methanol 10:1); Smp.: 110-120 °C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.06 (s, 6 H, 2  $\times$  SiCH<sub>3</sub>), 0.07 (s, 6 H, 2  $\times$  SiCH<sub>3</sub>), 0.85 (s, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.90 (s, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.75 – 1.83 (m, 1 H, C6'H<sub>b</sub>), 2.10 – 2.24 (m, 3 H, C2'H<sub>a</sub>, C2'H<sub>b</sub>, C4'H), 2.28 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.36 – 2.44 (m, 1 H, C6'H<sub>a</sub>), 3.59 – 3.63 (m, 1 H, C5'H<sub>a</sub>), 3.67 – 3.73 (m, 1 H, C5'H<sub>b</sub>), 4.31 – 4.34 (m, 1 H, C3'H), 4.85 – 4.94 (m, 1 H, C1'H), 7.74 (br s, 1 H, C8H), 7.99 (s, 1 H, NHAc), 11.28 (br s, 1 H, N1H); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = -5.4, -4.5 (4  $\times$  SiCH<sub>3</sub>), 22.60 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.59 (COCH<sub>3</sub>), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 33.39 (C6'), 41.55 (C2'), 49.83 (C4'), 53.39 (C1'), 63.05 (C5'), 72.95 (C3'), 121.89 (C5), 137.26 (C8),

148.00 (C4), 170.75 (COCH<sub>3</sub>); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3433 *w*, 3196 *w*, 2954 *m*, 2930 *m*, 2895 *w*, 2857 *m*, 1684 *vs*, 1612 *s*, 1556 *s*, 1472. *m*, 1398 *m*, 1255 *vs*, 1118 *s*, 1005 *m*, 939 *w*, 837 *vs*, 813 *m*, 778 *vs*, 668 *w*, 531 *vw* *cm*<sup>-1</sup>; MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 536.7 (74.65) [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (FAB<sup>+</sup>, M+H<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>: 536.3088, gefunden 536.3078.

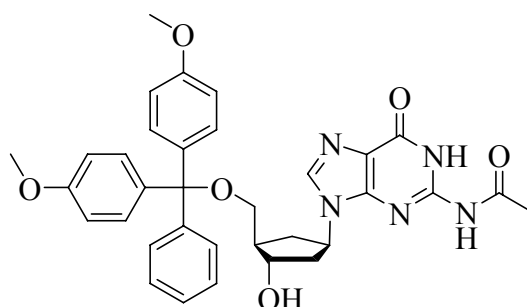
***N*-9-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-Hydroxy-4'-hydroxymethyl-cyclopentyl)-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-yl]-acetamide (82)**



Verbindung **81** (75 mg, 0.14 mmol) wurde in einem PE-Zentrifugenröhrchen in trockenem Ethylacetat (4 mL) gelöst und mit Pyridin/HF Komplex (70 % HF/30 % Pyridin, 0.15 mL) versetzt. Man ließ über Nacht rühren und zentrifugierte anschließend den Niederschlag ab, entfernte das Lösungsmittel, schlemmte erneut mit Ethylacetat (2 mL) auf und versetzte mit Methoxytrimethylsilan (0.5 mL, 5 mmol). Nach einstündigem Rühren wurde der Niederschlag erneut abzentrifugiert, das Lösungsmittel wiederum entfernt und das Produkt am Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt **82** ohne weitere Aufreinigung in Form eines beigen Feststoffes (37 mg, 0.12 mmol, 85 %).

Smp.: > 235 °C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.57 – 1.64 (m, 1H, C6'H<sub>a</sub>), 1.93 – 2.02 (m, 2H, C2'H<sub>a</sub>, C4'H), 2.09 – 2.14 (m, 1H, C2'H<sub>b</sub>), 2.15 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.28 – 2.35 (m, 1H, C6'H<sub>b</sub>), 3.38 – 3.44 (m, 1H, C5'H<sub>a</sub>), 3.47 – 3.52 (m, 1H, C5'H<sub>b</sub>), 4.04 – 4.08 (m, 1H, C3'H), 4.65 (dd, 1H, <sup>3</sup>J(C5'OH,C5'H<sub>a</sub>) = 5.2 Hz, <sup>3</sup>J(C5'OH,C5'H<sub>b</sub>) = 5.2 Hz, C5'OH), 4.78 (d, 1H, <sup>3</sup>J(C3'OH,C3'H) = 3.6 Hz, C3'OH), 4.84 – 4.92 (m, 1H, C1'H), 8.09 (s, 1H, C8H), 11.63 – 11.95 (m, 2H, N1H, NHCO); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 24.25 (COCH<sub>3</sub>), 34.62 (C6'), 41.14 (C2'), 49.77, 53.24 (C1', C4'), 63.22 (C5'), 71.92 (C3'), 138.20 (C8), 120.71, 147.90, 149.03, 155.40 (C2, C3, C4, C5), 173.86 (NHCO); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3413 *s*, 2930 *w*, 1678 *vs*, 1611 *vs*, 1557 *m*, 1476 *w*, 1396 *m*, 1253 *m*, 1151 *w*, 1043 *w*, 784 *w*, 738 *w*, 568 *w* *cm*<sup>-1</sup>; MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 308.1 (20.45) [M+H]<sup>+</sup>; HRMS (FAB<sup>+</sup>, M+H<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>: 308.1359, gefunden 308.1368.

***N*-[9-((1'*R*,3*R*,4'*S*)-3'-[[*(*Dimethoxytrityl*)*oxy]methyl]-4'-hydroxycyclopentyl)-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-yl]acetamide (**83**)**

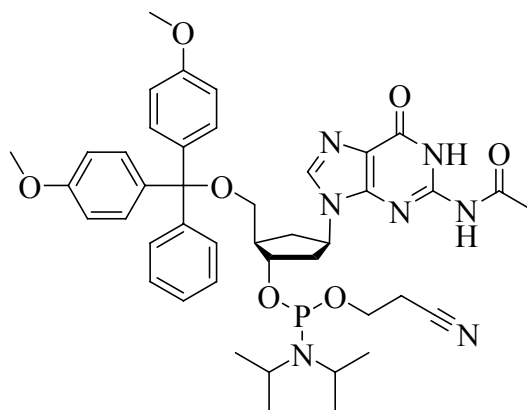


**82** (30 mg, 0.1 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Pyridin (5 mL) gelöst und mit einigen Körnchen aktiviertem Molekularsieb (4 Å) versetzt. Man ließ bei Raumtemperatur für 18 h rühren und versetzte anschließend langsam, unter Eiskühlung, mit einer Lösung aus Dimethoxytritylchlorid (35 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) in trockenem Pyridin (2 mL). Nach 2.5 h kontrollierte man per DC auf vollständige Umsetzung. Anschließend wurde Methanol (1 mL) hinzugefügt und das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 aufgereinigt (Chloroform/Methanol/Pyridin 20:1:0.2). Man erhielt **83** in Form eines weißen Feststoffes (37 mg, 0.06 mmol, 60 %).

$R_f = 0.3$  (Chloroform/Methanol 10:1); Smp.: 95 – 97 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ ):  $\delta = 1.75 - 1.83$  (m, 1H, C6'H<sub>a</sub>), 2.15 – 2.35 (m, 3H, C2'H<sub>a</sub>, C2'H<sub>b</sub>, C4'H), 2.30 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.50 – 2.57 (m, 1H, C6'H<sub>b</sub>), 3.16 – 3.20 (m, 1H, C5'H<sub>a</sub>), 3.27 – 3.31 (m, 1H, C5'H<sub>b</sub>), 3.77, 3.78 (2 × s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 4.13 (d, 1H,  $^3J(\text{C3}'\text{OH}, \text{C3}'\text{H}) = 4.0$  Hz, C3'OH), 4.28 – 4.34 (m, 1H, C3'H), 4.92 – 5.01 (m, 1H, C1'H), 6.86 – 6.88 (m, 4H, *meta* H von *para* CH<sub>3</sub>OPh), 7.19 – 7.23 (m, 1H, CH<sub>DMT</sub>), 7.28 – 7.34 (m, 2H, CH<sub>DMT</sub>), 7.32 – 7.34 (m, 4H, CH<sub>DMT</sub>), 7.45 – 7.47 (m, 2H, CH<sub>DMT</sub>), 7.84 (s, 1H, C8H), 10.58 (s, 1H, CONH), 11.96 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ ):  $\delta = 24.64$  (COCH<sub>3</sub>), 36.52 (C6'), 42.15 (C2'), 49.34, 54.37 (C1', C4'), 56.01 (2 × OCH<sub>3</sub>), 66.32 (C5'), 74.11 (C3'), 87.24 (OC<sub>tert</sub>), 114.37 (2 × CH<sub>3</sub>OCCH<sub>arom</sub>), 127.98 (C8), 122.58, 137.64, 137.67, 146.92, 150.03 (C2, C4, C5, C6, C<sub>DMT</sub>), 129.05, 129.51, 131.44, 131.45, 138.29 (C<sub>DMT</sub>), 160.07 (C<sub>DMT</sub>), 174.34 (NHCO); IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3393$  m, 3202 s, 3058 m, 2933 s, 2836 m, 2045 vw, 1908 vw, 1681 vs, 1609 vs, 1555 vs, 1508 vs, 1476 s, 1445 s, 1397 vs, 1300 s, 1251 vs, 1176 vs, 1152 s, 1115 m, 1068 s, 1033 vs, 914 w, 829 vs, 789 s, 755 s, 737 m, 726 s, 703 s, 646 m, 623 w, 584 s, 531 m, 477 w

$\text{cm}^{-1}$ ; MS (FAB<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 632.9 (14.47)  $[M+\text{Na}]^+$ , 610.9 (13.76)  $[M+\text{H}]^+$ , 303.4 (71.87)  $[\text{DMT}]^+$ ; HRMS (FAB<sup>+</sup>,  $M+\text{H}^+$ ): berechnet für  $[\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_6+\text{H}]^+$ :610.2660, gefunden 610.2666.

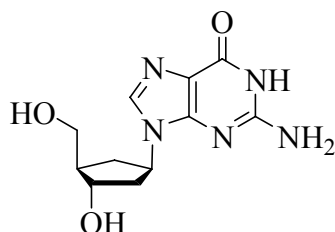
**(1'S,2'R,4'R)-4'-(2-acetylamino-6-oxo-1,6-dihydro-purin-9-yl)-2'-[[dimethoxytrityl]oxy]-methyl]cyclopentyl-O-(N,N-diisopropyl)-(2-cyanoethyl)phosphoramidite (**84**)**



In einem gründlich ausgeheizten Schlenkkolben löste man unter Stickstoffatmosphäre **83** (75 mg, 0.125 mmol) in 1 mL trockenem THF und entfernte das Lösungsmittel sogleich wieder am Ölpumpenvakuum, um die Substanz vollständig zu trocknen. Anschließend löste man in 2 mL trockenem THF, versetzte mit trockenem Diisopropylethylamin (0.2 mL) und mit Cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidit (CEDCl, 42  $\mu\text{L}$ , 1.5 eq) und ließ 2 h bei Raumtemperatur rühren, wobei sich die Lösung nach wenigen Minuten trübte. Kontrolle des Reaktionsverlaufs erfolgte mittels DC. Sobald alles Edukt reagiert hatte, entfernte man das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum und reinigte das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an deaktiviertem Kieselgel **60** (Chloroform/Methanol/Pyridin 30:1:0.3), wobei man darauf achtete, dass das Reaktionsprodukt so wenig wie möglich dem Luftsauerstoff ausgesetzt wird. Das zur Chromatographie verwendete Kieselgel wurde zuvor in der mobilen Phase aufgeschlämmt, *in vacuo* getrocknet und im Trockenschrank für 2 h aufbewahrt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden in einem Schlenkkolben unter Stickstoffatmosphäre gesammelt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und die Substanz **84** am Ölpumpenvakuum getrocknet (52.6 mg, 0.065 mmol, 52 %).

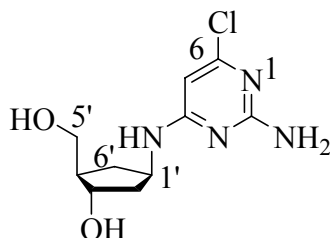
$R_f$  = 0.35, bzw. 0.2 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10:1) (Diastereomergemisch); Smp.: nicht gemessen; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.10-1.16 (m, 3H, [isomer 1 + 2]  $\text{CH}_3\text{CHN}(\text{NPR}_2)\text{CH}_3$ ), 1.17-1.20 (m, 3H, [isomer 1 + 2]  $\text{CH}_3\text{CHN}(\text{NPR}_2)\text{CH}_3$ ), 1.83-1.92 (m, 1H, [isomer 1 + 2]

C6'H<sub>a</sub>), 2.28 (s, 3H, [isomer 1] NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), 2.29 (s, 3H, [isomer 2] NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), 2.41-2.49, 2.55-2.62 (2×m, 3H, [isomer 1 + 2] C2'H<sub>a</sub>, C2'H<sub>b</sub>, C6'H<sub>b</sub>), 2.67-2.70 (m, 2H, [isomer 1] CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.74-2.77 (m, 2H, [isomer 2] CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.16-3.25 (m, 1H, [isomer 1] C5'H<sub>a</sub>), 3.33-3.39 (m, 1H, [isomer 2] C5'H<sub>b</sub>), 3.59-3.65 (m, 2H, [isomer 1 + 2] 2×(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHNPR<sub>2</sub>), 3.70-3.90 (m, 2H, [isomer 1 + 2] CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 3.77, 3.78 (2×s, 2×3H, [isomer 1] CH<sub>3</sub>OPh), 3.78, 3.782 (2×s, 2×3H, [isomer 2] CH<sub>3</sub>OPh), 4.40-4.47 (m, 0.5H, [isomer 1] C3'H), 4.47-4.53 (m, 0.5H, [isomer 2] C3'H), 4.92-5.03 (m, 1H, [isomer 1 + 2] C1'H), 6.86-6.90 (m, 4H, [isomer 1 + 2] *meta*-H von CH<sub>3</sub>OPh), 7.20-7.24 (m, 1H, [isomer 1 + 2] *para*-H von Ph), 7.28-7.38 (m, 6H, [isomer 1 + 2] 6×H<sub>DMT</sub>), 7.46-7.51 (m, 2H, [isomer 1 + 2] 2×H<sub>DMT</sub>), 7.86 (s, 0.5H, [isomer 1] C8H), 7.87 (s, 0.5H, [isomer 2] C8H), 11-12 (br s, 2H, [isomer 1 + 2] NH, NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, acetone-d<sub>6</sub>): δ = 19.90, 19.98 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 22.21, 22.30 (NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), 23.95, 24.02, (CH<sub>3</sub>CH(NPR<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 24.08, 24.16 (CH<sub>3</sub>CH(NPR<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 34.96, 35.04 (C6'), 39.31, 39.35, 39.40, 39.43 (C2'), 42.87, 42.94, 42.99, 43.03 (2×(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHNP), 47.36, 47.42, 47.48, 47.52 (C4'), 53.09 (C1'), 58.23, 58.42, 58.46, 58.56 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 64.25, 64.33 (C5'), 74.53, 74.69, 75.35, 75.52 (C3'), 85.98 (OCPh(PhOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 113.02 (*meta*-C von CH<sub>3</sub>OPh), 118.15, 118.24 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 121.31 (C8), 126.61, 126.63 (*para*-C von Ph), 127.70 (2×C<sub>DMT</sub>), 128.10, 128.17 (2×C<sub>DMT</sub>), 130.07, 130.09, 130.11, 130.14 (4×C<sub>DMT</sub>), 136.90, 136.96 (2×*ipso*-C von CH<sub>3</sub>Ph), 145.49 (C<sub>DMT</sub>), 147.58, 147.59 (C<sub>Het</sub>), 148.64, 148.71 (C<sub>Het</sub>), 149.77 (C<sub>Het</sub>), 154.99 (C<sub>Het</sub>), 158.72 (*para*-C von CH<sub>3</sub>OPh), 172.95 (NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>); <sup>31</sup>P-NMR (200 MHz, [D<sub>6</sub>]acetone): δ = 148.21, 148.79 (C3'OP); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3433 s, 2966 s, 2932 s, 2252 vw, 1685 vs, 1609 vs, 1554 m, 1509 vs, 1465 m, 1444 w, 1397 m, 1365 w, 1301 w, 1251 vs, 1200 w, 1178 s, 1155 w, 1127 w, 1032 s, 977 m, 932 vw, 898 vw, 830 m, 789 w, 755 w, 726 w, 705 w, 643 vw, 584 w, 563 vw, 525 w cm<sup>-1</sup>; MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) = 810.1 (43.51) [M+H]<sup>+</sup>, 303.2 (100.00) [DMT]<sup>+</sup>; HRMS (FAB<sup>+</sup>, M+H<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>43</sub>H<sub>52</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>P+H]<sup>+</sup>: 809.3665, gefunden 810.3713.

**2-Amino-9-(3-hydroxy-4-hydroxymethyl-cyclopentyl)-1,9-dihydro-purin-6-on (70)**

**84** (42 mg, 0.14 mmol) wurde in einem PE-Reagenzglas in einer Mischung konzentrierter Ammoniaklösung und Ethanol (3:1, 4 mL) gelöst und 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch an einer Savant *Speedvac*<sup>®</sup> vorgetrocknet und weitere 18 h an der Lyophylle im Ölpumpenvakuum vollständig von restlichem Wasser befreit. Man erhielt **70** in Form eines hellgelben Pulvers (36 mg, 0.14 mmol, 99 %).

Smp.: 229 – 230 °C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1.53 – 1.61 (m, 1H, C6'H<sub>a</sub>), 1.90 – 1.92 (m, 2H, C2'H<sub>a</sub>, C4'H), 2.04 – 2.12 (m, 1H, C2'H<sub>b</sub>), 2.23 – 2.30 (m, 1H, C6'H<sub>b</sub>), 3.38 – 3.43 (m, 1H, C5'H<sub>a</sub>), 3.47 – 3.51 (m, 1H, C5'H<sub>b</sub>), 4.02 – 4.06 (m, 1H, C3'H), 4.60 (dd, 1H, 5'-OH), 4.73 (d, 1H, 3'-OH), 4.75 – 4.84 (m, 1H, C1'H), 6.39 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.77 (s, 1H, C8H); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, [D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 34.75 (C6'), 41.36 (C2'), 50.00 (C4'), 52.75 (C1'), 63.48 (C5'), 72.20 (C3'), 136.04 (C8), 117.44, 151.78, 154.01, 157.55 (C2, C4, C5, C6); IR:  $\tilde{\nu}$  = 3305 s, 3163 vs, 2920 m, 1653 vs, 1605 vs, 1572 s, 1533 s, 1478 m, 1405 s, 1378 s, 1170 w, 1042 w, 916 vw, 776 w, 719 w, 696 w, 670 w cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI<sup>+</sup>; [M+H]<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> 266.1248, gefunden 266.1241.

**N-4-[[1'(R),3'(S),4'(R))-3'-Hydroxy-4'-hydroxymethyl)cyclopentyl]amino]-6-chloropyrimidin-4-ylamino (85)**

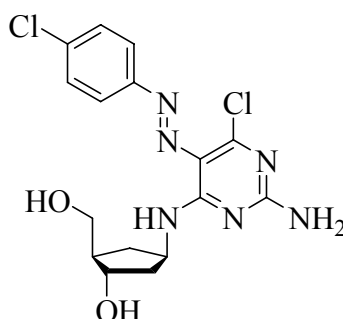
Amin **72** (230 mg, 1 mmol) wurde in gründlich entgastem Wasser (8 mL) suspendiert und unter Schutzgas für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Das Wasser wurde am Hochvakuum entfernt und der zurückbleibende weiße Feststoff durch azeotrope Destillation mit Ethanol (1 mL) von



verbleibenden Wasserresten befreit. Der nunmehr ölige Rückstand wurde erneut in trockenem Ethanol aufgenommen (13 mL), mit Triethylamin (0.7 mL) und 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin **75** (244 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) versetzt und die Suspension unter Stickstoffatmosphäre für 48 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei gingen alle Feststoffe in Lösung. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion abgebrochen und das Rohprodukt per Säulenchromatographie an Kieselgel 60 gereinigt (Chloroform/Methanol 3:1). Man erhielt das Produkt **85** in Form eines hellgelben Feststoffs (255 mg, 0.9 mmol, 97 %).

$R_f = 0.39$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 3:1); <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.18 - 1.26$  (m, 1H, C6'H<sub>b</sub>), 1.68 - 1.81 (m, 1H, C2'H<sub>b</sub>), 1.92 - 2.18 (m, 2H, C4'H, C2'H<sub>a</sub>), 2.27 - 2.43 (m, 1H, C6'H<sub>a</sub>), 3.48 - 3.66 (m, 3H, C5'H<sub>a</sub>, C5'H<sub>b</sub>, C1'H), 4.05 (m, 1H, C3'H), 5.79 (s, 1H, C5H); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 34.22$  (C6'), 40.87 (C2'), 49.09 (C4'), 63.44 (C5'), 72.85 (C3'), 112.00, 162.95, 164.01 (C2, C5, C6), C1', C4, nicht detektiert; MS (FAB<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 259.2 (21.2) [M+H]<sup>+</sup>.

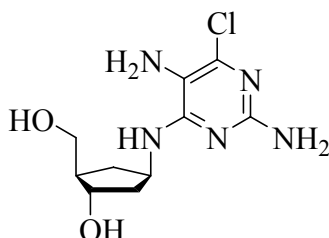
**N-4-[[[(1'R,3'S,4'R)-3'-Hydroxy-4'-hydroxymethyl)cyclopentyl]amino]-6-chloro-5-(4-chloro-phenylazo)-pyrimidin-4-ylamino (86)**



Zu einer Lösung aus *para*-Chloranilin (191 mg, 1.5 mmol) in Wasser (1.8 mL) und konz. Salzsäure (0.9 mL) wurde langsam eine Lösung aus Natriumnitrit (120 mg, 1.7 mmol) bei 0 °C zugetropft. Die so entstandene Lösung wurde ihrerseits langsam, unter Eiskühlung zu einer Lösung aus Kupplungsprodukt **85** (250 mg, 0.97 mmol) in Wasser/Eisessig (13 mL, 1:1) und Natriumacetat getropft. Man ließ weitere 5 min unter Eiskühlung rühren, entfernte sodann die Kühlung und ließ 18 h bei RT rühren. Der nach dieser Zeit ausgefallene tiefgelbe Niederschlag wurde abfiltriert und mit Eiswasser gewaschen, bis das Filtrat einen pH Wert nahe 7 hatte. Das so erhaltene Produkt **86** (155 mg, 40 %) konnte nach dem Trocknen ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter verwendet werden.

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.40 (m, 1H, C6'H<sub>a</sub>), 1.84 (m, 1H, C2'H<sub>a</sub>), 2.05 (m, 2H, C2'H<sub>b</sub>, C4'H), 2.45 (m, 1H, C6'H<sub>b</sub>), 3.62 (m, 2H, C5'H<sub>a</sub>, C5'H<sub>b</sub>), 4.13 (m, 1H, C3'H), 4.69 (m, 1H, C1'H), 7.45 (d, 2H,  $^3J(\text{C}_{\text{meta}}\text{H}, \text{C}_{\text{ortho}}\text{H}) = 8.0$  Hz,  $2 \times \text{C}_{\text{meta}}\text{H}$ ), 7.73 (d, 2H,  $^3J(\text{C}_{\text{ortho}}\text{H}, \text{C}_{\text{meta}}\text{H}) = 8.0$  Hz,  $\text{C}_{\text{ortho}}\text{H}$ ), 10.41 (d, 1H,  $^3J(\text{NH}, \text{C1}'\text{H}) = 7.5$  Hz, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 34.22 (C6'), 41.46 (C2'), 49.09 (C4'), 49.26 (C1'), 62.99 (C5'), 72.93 (C3'), 118.91, 154.66, 161.43, 165.31 ( $4 \times \text{C}_{\text{het}}$ ), 122.70 ( $2 \times \text{C}_{\text{arom}}$ ), 128.97 ( $2 \times \text{C}_{\text{arom}}$ ), 134.54, 151.18 ( $2 \times \text{C}_{\text{arom}}$ ); MS (FAB<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 397.4 (11.0) [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, HRMS (FAB<sup>+</sup>,  $M+\text{H}^+$ ): berechnet für  $[\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_2+\text{H}]^+$ : 397.0941, gefunden 397.0959.

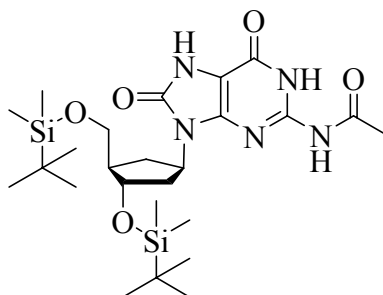
***N*-4-[[*(1'R,3'S,4'R)*-3'-Hydroxy-4'-hydroxymethyl)cyclopentyl]amino]-5-amino-6-chloro-pyrimidin-4-ylamino (**87**)**



Azoverbindung **86** (100 mg, 0.25 mmol) wurde in einer Mischung aus Ethanol (2.5 mL), Wasser (2.5 mL) und Eisessig (0.1 mL) suspendiert und mit Zinkspäne (100 mg) versetzt. Die Suspension wurde unter Stickstoffatmosphäre für 3 h unter Rückfluss erhitzt und im noch warmen Zustand unter Schutzgas durch einen Spritzenfilter vom restlichen Zink befreit und am Hochvakuum getrocknet. Zurück bleibt ein klarer, glasartiger Feststoff **87**.

MS (FAB<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 274.3 (12.6) [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

***N*-[9-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4'-[[*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-methyl]cyclopentyl]-6,8-dioxo-6,7,8,9-tetrahydro-1*H*-purin-2-yl]-acetamide (**91**)**

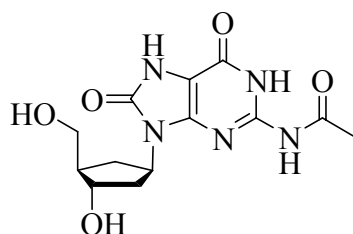


Zu einer Lösung von **80** (200 mg, 0.36 mmol) in Methanol (10 mL) wurde Palladium auf Kohle (50 mg) hinzugefügt und die Mischung wurde gründlich entgast. Zuletzt wurde die Stickstoffatmosphäre gegen Wasserstoff ausgetauscht und die Suspension für 18 h bei Raumtemperatur stark gerührt. Man filtrierte anschließend durch einen 0.2 µm Spritzenfilter (*Whatman Puradisk<sup>TM</sup>*) und entfernte das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum. Das braune Produkt wurde in reichlich trockenem Chloroform aufgenommen (20 mL) und sehr langsam, tropfenweise mit einer Lösung aus 1,1'-Carbonyldiimidazol (61.2 mg, 0.38 mmol, 1.05 eq) in Chloroform (10 mL) bei Raumtemperatur versetzt. Man rührte 20 h bei Raumtemperatur und weitere 3 h bei 55 °C. Nach dem Abkühlen wurde weiteres Chloroform (40 mL) hinzugefügt und die Lösung mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an deaktiviertem Kieselgel 60 (Chloroform/Methanol 40:1) aufgereinigt. Das Kieselgel wurde vor der Benutzung deaktiviert, indem es mit einer 5 %igen Lösung von Pyridin in Chloroform aufgeschlämmt, anschließend einrotiert und über Nacht im Trockenschrank bei 70 °C ausgeheizt wurde. Man erhielt das Produkt **91** in Form eines gelben Schaums (58 mg, 0.11 mmol, 29 %).

$R_f = 0.35$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1); Smp.: 143 – 145 °C; <sup>1</sup>H-NMR (200MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.03, 0.04, 0.05$  (3×s, 12 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.86, 0.89 (2×s, 18 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.83 (m, 1 H, C2'H<sub>a</sub>), 1.97 (m, 1 H, C6'H<sub>a</sub>), 2.01 (m, 1 H, C4'H), 2.07 (m, 1 H, C6'H<sub>b</sub>), 2.29 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.51 (m, 1 H, C2'H<sub>b</sub>), 3.64 (dd, 1 H, <sup>2</sup>J(C5'H<sub>a</sub>,C5'H<sub>b</sub>) = 10.2 Hz, <sup>3</sup>J(C5'H<sub>a</sub>,C4') = 5.0 Hz, C5'H<sub>a</sub>), 3.69 (dd, 1 H, <sup>2</sup>J(C5'H<sub>b</sub>,C5'H<sub>a</sub>) = 10.1 Hz, <sup>3</sup>J(C5'H<sub>b</sub>,C4'H) = 5.2 Hz, C5'H<sub>b</sub>), 4.35 (m, 1 H, C3'), 4.89 (m, 1 H, C1'H), 8.78, 9.97 (2×s, 2×1H, N7H, C2NH), 11.99 (s, 1 H, N1H); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = -5.65, -5.35, -4.72, -4.53$  (4× SiCH<sub>3</sub>), 18.03,

18.34 (2 × SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.31 (NHCOCH<sub>3</sub>), 25.86, 25.99 (2 × SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.64 (C6'), 37.75 (C2'), 50.20, 50.35 (C1', C4'), 63.50 (C5'), 72.98 (C3'), 103.97 (C5), 145.71, 145.95, 149.60, 152.26 (4 × C<sub>Het</sub>), 171.30 (NHCOCH<sub>3</sub>); IR:  $\tilde{\nu}$  = 3230 *vw*, 2929 *vs*, 2954 *vs*, 2895 *s*, 2802 *m*, 2768 *m*, 1961 *m*, 1736 *s*, 1710 *s*, 1650 *vs*, 1606 *w*, 1560 *vs*, 1502 *m*, 1437 *s*, 1359 *w*, 1343 *w*, 1311 *w*, 1247 *s*, 1089 *m*, 1004 *w*, 940 *w*, 832 *s*, 771 *s*, 704 *w*, 662 *w* *cm*<sup>-1</sup>; MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 552.7 (7.0) [M+H]<sup>+</sup>, 574.7 (9.6) [M+Na]<sup>+</sup>; HRMS (FAB<sup>+</sup>, M+Na<sup>+</sup>): berechnet für [C<sub>25</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>: 574.2851, gefunden 574.2795.

***N*-[9-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-hydroxy-4'-hydroxymethyl]cyclopentyl]-6,8-dioxo-6,7,8,9-tetrahydro-1*H*-purin-2-yl]-acetamide (**92**)**

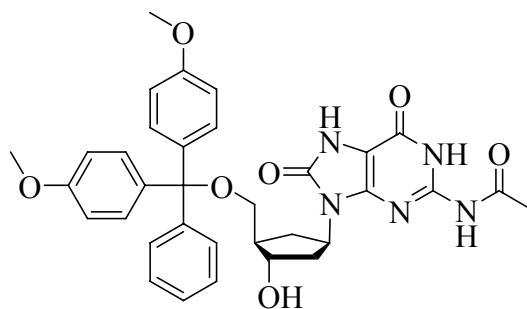


Eine Lösung von **91** (52 mg, 0.09 mmol) in trockenem Ethylacetat (5 mL) wurde mit Pyridin×HF (50 µL) und Pyridin (50 µL) versetzt und unter Argonatmosphäre für 18 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde in der Zentrifuge von der Lösung getrennt, erneut in trockenem Ethylacetat (2 mL) aufgeschlämmt und mit Methoxytrimethylsilan (200 µL) versetzt. Man ließ für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur rühren, trennte den Feststoff mit einer Zentrifuge von der Lösung ab und trocknete den Rückstand im Ölpumpenvakuum. Man erhielt **92** in Form eines weißen bis hellgelben Feststoffs (29 mg, 0.09 mmol, 95 %).

Smp.: > 230 °C; <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1.63 – 1.69 (m, 1 H, C2'H<sub>a</sub>), 1.77 – 1.85 (m, 1 H, C4'H), 1.87 – 1.97 (m, 2 H, C6'H<sub>a</sub>, C6'H<sub>b</sub>), 2.13 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.40 – 2.45 (m, 1 H, C2'H<sub>b</sub>), 3.31 – 3.53 (m, 1 H, C5'H<sub>a</sub>), 3.48 – 3.53 (m, 1 H, C5'H<sub>b</sub>), 4.02 – 4.06 (m, 1H, C3'H), 4.49 (t, 1 H, C5'OH), 4.60 (d, 1 H, C3'OH), 4.83 (m, 1 H, C1'H), 11.04, 11.52, 11.98 (3 × s, 3 × 1 H, 3 × NH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 24.42 (COCH<sub>3</sub>), 31.58 (C5'), 37.58 (C2'), 50.23, 50.62 (C1', C4'), 63.98 (C6'), 72.26 (C3'), 103.57, 146.01, 147.50, 149.54, 152.47 (C2, C4, C5, C6, C8), 173.99 (COCH<sub>3</sub>); IR:  $\tilde{\nu}$  = 3332 *w*, 3071 *m*, 2966 *w*, 2880 *w*, 2756 *w*, 2666 *w*, 1975 *m*, 1714 *s*, 1651 *vs*, 1609 *w*, 1572 *m*, 1433 *m*, 1345 *m*,

1233 *s*, 1162 *w*, 1108 *m*, 1034 *s*, 1015 *s*, 933 *m*, 882 *m*, 844 *m*, 796 *s*, 757 *s*, 742 *s*, 698 *s*  $cm^{-1}$ ;  
 HRMS (ESI<sup>+</sup>); [M+H]<sup>+</sup>: berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>+H]<sup>+</sup>: 324.1302, gefunden 324.1302.

***N*-[9-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxymethyl]-4'-hydroxymethyl]cyclopentyl]-6,8-dioxo-6,7,8,9-tetrahydro-1*H*-purin-2-yl]-acetamide  
 (111)**

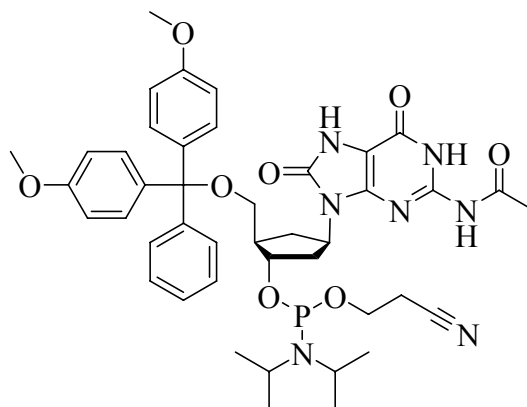


Um Wasserreste durch azeotrope Destillation zu entfernen, wurde **92** (71 mg, 0.22 mmol) in trockenem Pyridin (2 mL) gelöst und am Ölpumpenvakuum sogleich wieder eingengt. Anschließend löste man erneut in trockenem Pyridin (4 mL) und versetzte mit aktiviertem Molekularsieb (4 Å). Man ließ für 30 min bei Raumtemperatur rühren und kühlte anschließend auf 0 °C vor der Zugabe einer Lösung von Dimethoxytritylchlorid (89.2 mg, 0.26 mmol, 1.2 eq) in trockenem Pyridin (1 mL). Sobald die DC Kontrolle vollständigen Umsatz anzeigte, wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol (4 mL) gestoppt und das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum entfernt. Es folgte die Aufreinigung durch Säulenchromatographie an deaktiviertem Kieselgel 60 (Chloroform/Methanol 30:1, 0.5 % Pyridin). Das Kieselgel wurde wie in Kapitel 0 beschrieben deaktiviert. Man erhielt **111** in Form eines hellgelben Feststoffs (69 mg, 0.11 mmol, 50 %).

$R_f = 0.27$  (Chloroform/Methanol 10:1); Smp.: 164 – 166 °C; <sup>1</sup>H-NMR (200MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.78 - 1.92$  (m, 1H, <sup>2</sup>*J*(C6'*H*<sub>a</sub>,C6'*H*<sub>b</sub>) = 13.8 Hz, C6'*H*<sub>a</sub>), 2.16 – 2.19 (m, 3H, C2'*H*<sub>a</sub>, C2'*H*<sub>b</sub>, C4'*H*), 2.25 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2.51 – 2.65 (m, 1H, <sup>2</sup>*J*(C6'*H*<sub>b</sub>,C6'*H*<sub>a</sub>)= 13.4 Hz, C6'*H*<sub>b</sub>), 3.08 – 3.16 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*(C5'*H*<sub>a</sub>,C5'*H*<sub>b</sub>)= 8.8 Hz, <sup>3</sup>*J*(C5'*H*<sub>a</sub>,C4'*H*)= 6.6 Hz, C5'*H*<sub>a</sub>), 3.30 – 3.37 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*(C5'*H*<sub>b</sub>,C5'*H*<sub>a</sub>)= 8.8 Hz, <sup>3</sup>*J*(C5'*H*<sub>b</sub>,C4'*H*)= 5.0 Hz, C5'*H*<sub>b</sub>), 3.77, 3.78 (2×s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>), 4.22 – 4.31 (m, 1H, C3'*H*), 4.82 – 5.00 (m, 1H, C1'*H*), 6.87 (2×d, 4H, <sup>3</sup>*J*(*mH* von *pMeOPh*, *oH* von *pMeOPh*)= 9.0 Hz, *mH* von *pMeOPh*), 7.20 – 7.51 (m, 9H, Ph<sub>DMT</sub>H), 3×NH, 3'OH, nicht gefunden; <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 23.17$  (NHCOCH<sub>3</sub>), 32.27, 37.46 (C2', C6'), 48.07, 49.70 (C1', C4'), 54.60 (2×C<sub>DMT</sub>OCH<sub>3</sub>),

65.21 (C5'), 72.91 (C3'), 85.72 (OCPh(*p*MeOPh)<sub>2</sub>), 103.11 (C5), 112.94 (4×*m*C von *p*MeOPh), 126.50 (*p*C von Ph<sub>DMT</sub>), 127.61, 128.18, 130.07, 130.09 (8×CH<sub>DMT</sub>), 136.41 (2×*ipso*C von *p*MeOPh), 145.52 (*ipso*C von Ph<sub>DMT</sub>), 145.68, 147.07, 148.98 (3×C<sub>Het</sub>), 151.81 (C8), 158.64 (2×C<sub>DMT</sub>OMe), 172.84 (NHCOCH<sub>3</sub>); IR:  $\tilde{\nu}$  = 3200 *s*, 2931 *vs*, 1690 *vs*, 1606 *s*, 1573 *s*, 1507 *vs*, 1439 *m*, 1246 *s*, 1174 *m*, 1031 *m* cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI<sup>-</sup>); [M-H]<sup>-</sup>: berechnet für [C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>-H]<sup>-</sup>: 624.2464, gefunden 624.2474.

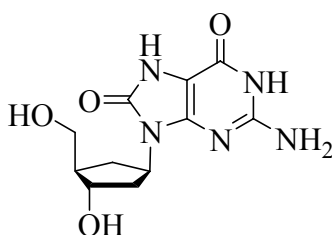
***N*-(1'*S*,2'*R*,4'*R*)-4'-(2-acetylamino-6,8-dioxo-6,7,8,9-tetrahydro-purin-9-yl)-2'-[[[(dimethoxy-trityl)oxy]-methyl]cyclopentyl-*O*-(*N,N*-diisopropyl)-(2-cyanoethyl)-phosphoramidite (94)**



**111** (69 mg, 0.11 mmol) wurde in trockenem THF gelöst, im Ölpumpenvakuum sogleich wieder bis zur Trockene eingengt und erneut in trockenem THF (6 mL) gelöst. Unter Argonatmosphäre und Eiskühlung wurde die Lösung mit Diisopropylethylamin (110  $\mu$ L) und danach langsam durch ein Septum mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (36  $\mu$ L, 0.13 mmol, 1.2 eq) versetzt. Man ließ bei 0 °C Rühren bis die DC Kontrolle kein Edukt mehr anzeigte. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an deaktiviertem Kieselgel 60 aufgereinigt (Chloroform/Methanol 40:1, 0.5 % Pyridin). Man erhielt **94** in Form eines weißen Schaums (64 mg, 0.07 mmol, 70 %).

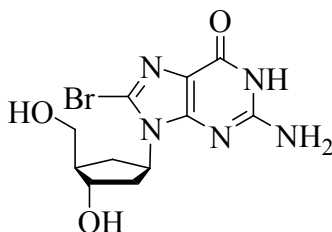
$R_f$  = 0.45 (Chloroform/Methanol 10:1); <sup>31</sup>P-NMR (200 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 147.99, 148.39; HRMS (ESI<sup>-</sup>); [M-H]<sup>-</sup>: berechnet für [C<sub>43</sub>H<sub>52</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>P-H]<sup>-</sup>: 824.3542, gefunden 824.3556.

**9-[(1'R,3'S,4'R)-3'-hydroxy-4'-hydroxymethyl]cyclopentyl]-6,8-dioxo-6,7,8,9-tetrahydro-1H-purin-2-yl (93)**



In einer Mischung aus Methylamin (1 mL, 40 % in Wasser), konzentrierter Ammoniaklösung (1 mL) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (200  $\mu$ L) löste man **92** (29 mg, 0.09 mmol) und rührte für 8 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels *Speed Vac* entfernt. Man erhielt **93** in Form eines weißen bis gelben Feststoffes (25 mg, 0.09 mmol, 99 %). Um eine möglichst große Reinheit zu gewährleisten (NMR Spektroskopie) wurde das Rohprodukt in Wasser/Acetonitril 20:1 aufgenommen und über *RP-18* Kieselgel (Wasser/Acetonitril 20:1) aufgereinigt.

$R_f$  = 0.64 (water/MeCN 4:1, *RP-18*); m.p.: >230 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (200MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.59 – 1.65 (m, 1H, C2'H<sub>a</sub>), 1.81 – 1.93 (m, 3H, C4'H, C6'H<sub>a</sub>, C6'H<sub>b</sub>), 2.38 – 2.44 (m, 1H, C2'H<sub>b</sub>), 3.32 – 3.36 (m, 1H, C5'H<sub>a</sub>), 3.49 – 3.53 (m, 1H, C5'H<sub>b</sub>), 4.02 – 4.04 (m, 1H, C3'H), 4.70 – 4.79 (m, 1H, C1'H), 6.36 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 10.50 (br s, 1 H, NH), 3'OH, NH, not detected;  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 31.46 (C5'), 37.68 (C2'), 50.11, 50.31 (C1', C4'), 64.05 (C6'), 72.44 (C3'), 98.83, 148.51, 151.68, 152.62, 153.72 (C2, C4, C5, C6, C8); IR:  $\tilde{\nu}$  = 3327 s, 3221 s, 2882 m, 2743 w, 2359 w, 1719 s, 1693 vs, 1645 vs, 1597 s, 1523 w, 1438 m, 1346 m, 1216 w, 1048 s, 947 m, 846 m, 796 m, 756 m, 689 m  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI<sup>+</sup>); [M+H]<sup>+</sup>: berechnet für [C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>: 282.1197, gefunden 282.1191.

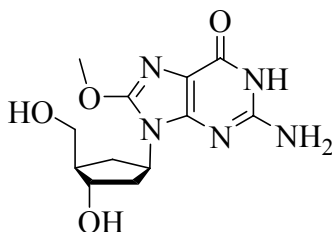
**9-[(1'R,3'S,4'R)-3'-hydroxy-4'-hydroxymethyl]cyclopentyl]-8-bromo-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl (89)**

Carbocyclisches Guanosin **70** (167 mg, 0.63 mmol) wurde in einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (14 mL, 1:1) gelöst und über einen Zeitraum von 15 min mit *N*-Bromsuccinimid (170 mg, 0.9 mmol, 1.3 eq) versetzt. Es entstand eine rote Lösung die 1 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde an der Lyophylle entfernt und der rotorange Feststoff **89** mit Aceton gewaschen (180 mg, 0.57 mmol, 90 %).

$R_f = 0.3$ ; Smp.: n.b.;  $^1\text{H-NMR}$ :(400 MHz, DMSO):  $\delta = 1.78$  (m, 1H, C6'H<sub>b</sub>), 1.93 – 2.07 (m, 3H, C2'H<sub>a</sub>, C4'H), 2.60 (m, 1H, C6'H<sub>a</sub>), 3.51 (m, 2H, C5'H<sub>a</sub>, C5'H<sub>b</sub>), 4.10 (m, 1H, C3'H), 4.58 (*br s*, 1H, OH), 4.64 (*br s*, 1H, OH), 4.94 (m, 1H, C1'H), 6.48 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 10.69 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$ :(100 MHz, DMSO):  $\delta = 32.22$  (C2'), 38.14 (C6'), 50.01 (C4'), 55.15 (C1'), 63.53 (C5'), 71.94 (C3'), 117.97 (C5), 120.96 (C8), 152.67 (C4), 153.56 (C2), 156.12 (C6); IR:  $\tilde{\nu} = 3302$  vs, 3127 vs, 2942 s, 2761 w, 2581 vw, 1807, vw, 1650 vs, 1606 s, 1566 vs, 1517 s, 1459 m, 1387 w, 1348 s, 1302 m, 1283 m, 1243 w, 1211 vw, 1182 w, 1157 w, 1059 m, 1040 m, 918 w, 897 vw, 824 w, 798 vw, 776 w, 701 w, 675 w, 663 w; MALDI:  $m/z$  (%) = 343.89 (84) [M+H]; HRMS: (ESI<sup>-</sup>); [M+Cl]<sup>-</sup>: berechnet für [C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>+Cl]<sup>-</sup>: 377.9974, gefunden 377.9997.



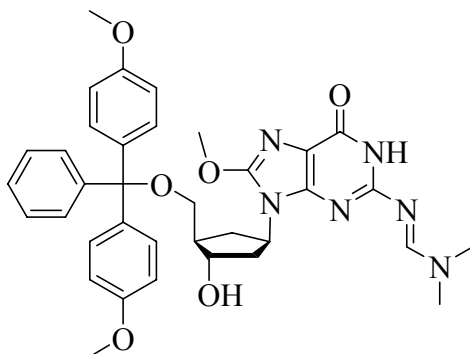
**9-[(1'R,3'S,4'R)-3'-hydroxy-4'-hydroxymethyl]cyclopentyl]-8-methoxy-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl (97)**



**89** (220 mg, 0.6 mmol) wurde unter Stickstoff in trockenem Methanol (6 mL) gelöst. Zu der rötlichen Lösung wurde Natriummethanolat (540 mg, 10 mmol), gelöst in trockenem Methanol (3 mL) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei 80 °C unter Rückfluss erhitzt und anschließend mit 2 N HCl neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie an *RP-18* Kieselgel (Wasser/Acetonitril 30:1) aufgereinigt. Man erhielt **97** mit niedriger Ausbeute (10 mg, 33 µmol, 15 %). Aufgefangenes Edukt: 65 mg (18.9 mmol).

$R_f = 0.58$  (Acetonitril/Wasser 4:1); Smp.: n.b.;  $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1.72$  (m, 2H, C6'H<sub>b</sub>, C2'H<sub>a</sub>), 1.90 (m, 1H, C4'H), 1.96 - 2.04 (m, 1H, C2'H<sub>b</sub>), 2.28 (m, 1H, C6'H<sub>a</sub>), 3.44 - 3.49 (m, 2H, C5'H<sub>a</sub>, C5'H<sub>b</sub>), 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.03 (*br s*, 1H, C3'H), 4.59 (*br s*, 1H, OH), 4.69 (*br s*, 1H, OH), 4.82 (m, 1H, C1'H), 6.44 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 10.73 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 32.09$  (C2'), 38.43 (C6'), 49.96 (C4'), 51.18 (C1'), 56.76 (CH<sub>3</sub>), 63.57 (C5'), 71.99 (C3'), 110.93 (C5), 150.73 (C8), 152.32 (C4), 153.45 (C2), 156.47 (C6); IR:  $\tilde{\nu} = 3318$  vs, 3140 s, 3024 w, 2961 m, 2930 m, 2883 m, 2856 m, 2751 w, 2704 w, 2660 w, 2566 w, 1684 m, 1649 s, 1586 vs, 1550 vs, 1498 w, 1466 m, 1449 m, 1387 m, 1377 m, 1345 s, 1276 m, 1211 w, 1181 w, 1040 s, 919 w, 883 w, 824 w, 798 vw, 773 w, 702 w, 677 w, 663 w  $\text{cm}^{-1}$ ; MALDI:  $m/z$  (%) = 296.2 (72)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRMS: (ESI<sup>-</sup>);  $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ : berechnet für  $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4+\text{Cl}]^-$ : 330.0975, gefunden 330.0991.

***N*-[9-[(1'*R*,3'*S*,4'*R*)-3'-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxymethyl]-4'-hydroxymethyl]cyclopentyl]-8-methoxy-6-oxo-6,9-dihydro-1*H*-purin-2-yl]-*N,N*-dimethyl-formamide (**98**)**

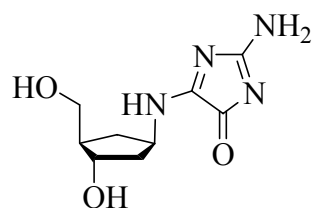


Man löste **97** (6 mg, 20  $\mu\text{mol}$ ) in trockenem Methanol und entfernte das Lösungsmittel sogleich wieder am Ölpumpenvakuum. Danach wurde das Edukt erneut in trockenem Methanol gelöst und mit *N,N*-Dimethylformacetal (200  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Man erhitze für 2 h auf 50 °C und ließ anschließend für 3 d bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre rühren. Nach dieser Zeit wurde die Mischung erneut für 4 h auf 50 °C erhitzt und in der Folge für weitere 9 d bei Raumtemperatur gerührt. Als das DC (Kieselgel 60, Chloroform/Methanol 5:1) vollständigen Umsatz zeigte, wurde die Reaktion abgebrochen und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung in trockenem Pyridin (1 mL) gelöst und mit Dimethoxytritylchlorid (8 mg, 24  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq), gelöst in Pyridin (300  $\mu\text{L}$ ), bei 0 °C versetzt. Nach 20 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur zeigte das DC keinen vollständigen Umsatz und es wurden erneut 2 mg Dimethoxytritylchlorid hinzugegeben. Nach weiteren 3 h bei Raumtemperatur zeigte das DC vollständigen Umsatz und, nach der Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Methanol, entfernte man das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum und reinigte das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Chloroform/Methanol 30:1, 0.5 % Pyridin). Man erhielt das Produkt **98** mit einer Ausbeute von ca. 6 mg (ca. 45 %).

$R_f = 0.44$ ; Smp.: n.b.;  $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.93 - 1.99$  (m, 2H, C2' $\text{H}_a$ , C6' $\text{H}_a$ ), 2.02 – 2.07 (m, 1H, C6' $\text{H}_b$ ), 2.09 – 2.16 (m, 1H, C4' $\text{H}$ ), 2.43 – 2.47 (m, 1H, C2' $\text{H}_b$ ), 2.91 (s, 3H,  $\text{NCH}_3\text{CH}_3$ ), 2.97 (s, 3H,  $\text{NCH}_3\text{CH}_3$ ), 3.09 – 3.12 (m, 1H, C5' $\text{H}_a$ ), 3.30 – 3.33 (s, 1H, C5' $\text{H}_b$ ), 3.73 (s, 6H,  $\text{OCH}_3_{\text{DMT}}$ ), 3.99 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.35 – 4.39 (m, 1H, C3' $\text{H}$ ), 4.93 – 4.99 (m, 1H, C1' $\text{H}$ ), 6.76 – 6.77 (d, 4H,  $\text{CH}_{\text{DMT}}$ ), 7.14 – 7.17 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{DMT}}$ ), 7.21 – 7.25 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{DMT}}$ ), 7.35 – 7.36 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{DMT}}$ ), 8.40 (s, 1H,  $\text{NCHN}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz,

CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 35.22 (C6'), 38.61 (NCH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 41.24 (C2'), 47.94, 50.44 (C1', C4'), 55.44 (2 × OCH<sub>3,DMT</sub>), 57.11 (OCH<sub>3</sub>), 65.62 (C5'), 75.43 (C3'), 86.54 (C<sub>tert,DMT</sub>), 113..38, 127.09, 128.11, 128.30, 130.22 (13 × C<sub>DMT</sub>), 157.63 (C<sub>Het</sub>), 158.77 (C<sub>DMT</sub>), 3 × C<sub>DMT</sub>, 4 × C<sub>HET</sub>, NCN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, nicht gefunden; IR: n.b.; MS (MALDI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 653.2 (69) [M+H]<sup>+</sup>, 303.4 (100) [DMT]<sup>+</sup>; HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+NEt<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>: berechnet für [C<sub>42</sub>H<sub>55</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>+H]<sup>+</sup>: 754.4287, gefunden 754.4299.

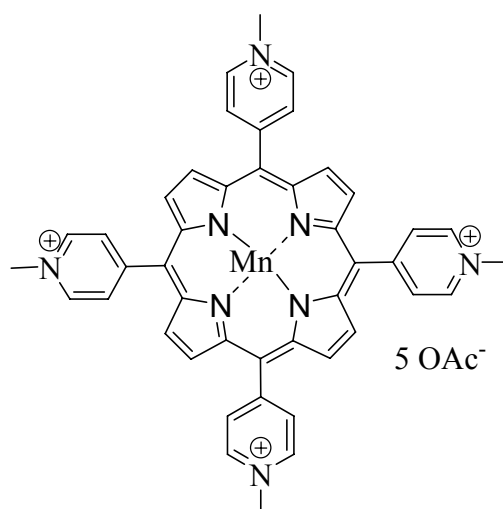
## 2-Amino-5-(3-hydroxy-4-hydroxymethyl-cyclopentylamino)-imidazol-4-on (**99**)



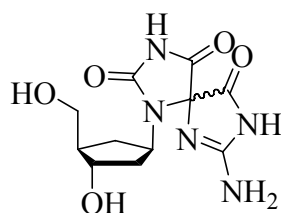
Zu einer Lösung von **70** (50  $\mu$ L, 5 mM) in Wasser wurde Triethylammoniumacetatpuffer (25  $\mu$ L, 100 mM, pH 6.5), Wasser (25  $\mu$ L) und eine Lösung von **112** (0.13  $\mu$ L, 7.7 mg/mL) hinzugefügt. Die Mischung wurde gründlich per Vortexer gemischt und mit einer Lösung aus Kaliummonopersulfat Triplesalz (25  $\mu$ L, 30.7 mg/mL) versetzt und ebenfalls gründlich per Vortexer vermischt. Man beobachtete wie die Lösung ihre leicht gelbe Färbung verlor. Nach exakt einer Minute wurde die Reaktion durch Zugabe von Hepes Puffer (50  $\mu$ L, 100 mM, pH 8.0) gestoppt und unmittelbar im Anschluss durch HPLC gereinigt. Dazu wurden 100  $\mu$ L der Lösung unter Verwendung von Puffersystem **P1** und einem Gradienten von 0 – 15 % Puffer B in 45 min auf einer Macherey-Nagel *Nucleodur 100-3* Säule getrennt und das Produkt **99** nach 13 min aufgefangen. Zur Aufnahme eines NMR Spektrums wurden die Reaktionsmengen im Maßstab Maßstab 1:160 vergrößert: **70** (8 mL, 5 mM), Triethylammoniumacetatpuffer (4 mL), Wasser (4 mL), **112** (1.04  $\mu$ L), Kaliummonopersulfat Tripel Salz (4 mL) und Hepes nach exakt 1 min (8 mL). Die Lösung wurde in mehrere Portionen mit maximal 5 mL aufgeteilt und diese per präparativer HPLC aufgetrennt. Pufferbedingungen und Gradient waren die gleichen wie bei den zuvor beschriebenen Versuchen im analytischen Maßstab, allerdings wurde eine Macherey-Nagel *Nucleodur 100-7 C18* (250×10 mm) semipräparative Säule verwendet. Die bei einer Retentionszeit von 13 min gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und an einer Lyophylle von der mobilen Phase befreit.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 1.32$  (ddd, 1 H,  $^2J(\text{C6}'\text{H}_a, \text{C6}'\text{H}_b) = 12.9$  Hz,  $\text{C6}'\text{H}_a$ ), 1.77 – 1.84 (m, 3 H,  $\text{C2}'\text{H}_a$ ,  $\text{C2}'\text{H}_b$ ,  $\text{C4}'\text{H}$ ), 2.11 (ddd, 1 H,  $^2J(\text{C6}'\text{H}_b, \text{C6}'\text{H}_a) = 12.9$  Hz,  $\text{C6}'\text{H}_b$ ), 3.27 – 3.30 (m, 1 H,  $\text{C5}'\text{H}_a$ ), 3.37 – 3.40 (m, 1 H,  $\text{C5}'\text{H}_b$ ), 3.88 – 3.91 (m, 1 H,  $\text{C3}'\text{H}$ ), 4.22 (m, 1 H,  $\text{C1}'\text{H}$ ), 6.80 (d, 1 H,  $\text{C1}'\text{NH}$ ) pm,  $\text{N2H}$ ,  $\text{C3NH}$ ,  $3'\text{-OH}$ ,  $5'\text{-OH}$  nicht gefunden.;  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 34.09$  ( $\text{C6}'$ ), 40.87 ( $\text{C2}'$ ), 49.99 ( $\text{C4}'$ ), 52.97 ( $\text{C1}'$ ), 63.58 ( $\text{C5}'$ ), 72.48 ( $\text{C3}'$ ), 166.91 ( $\text{C5}$ ), 177.30, 185.85 ( $\text{C1}$ ,  $\text{C3}$ ) ppm; HRMS (ESI $^-$ ;  $[\text{M-H}]^-$ ): berechnet für  $[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3\text{-H}]^-$ : 225.0993, gefunden 225.0995.

**Mn(III)-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21H,23H-porphinacetat-tetrakis-(methoacetat) (112)**



Mn(III)-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21H,23H-porphinchlorid-tetrakis (methochlorid) (45 mg, 0.05 mmol) wurden in Wasser (10 mL) gelöst. Die tiefrote bis braune Lösung ließ man dreimal durch mit Acetatanionen beladenen, stark basischen *Dowex 1×8* Anionentauscher laufen. Kleine Mengen der eluierten Lösung wurden mit destilliertem Wasser verdünnt und mit einigen Tropfen Silbernitratlösung (0.1 mol/L) auf Chloridfreiheit getestet. Wenn kein Niederschlag von Silberchlorid mehr beobachtet werden konnte, wurde die dunkelbraune Lösung an der Lyophylle vom Lösungsmittel befreit und anschließend erneut in Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und war 7.7 mg/mL.<sup>[212]</sup>

**7-Amino-1-(3-hydroxy-4-hydroxymethyl-cyclopentyl)-1,3,6,8-tetraaza-spiro[4.4]non-6-ene-2,4,9-trion (103)**

Zu einer Lösung von **93** (10  $\mu\text{L}$ , 6.8 mM) wurde Natriumphosphatpuffer (50  $\mu\text{L}$ , 100 mM, pH 8.0) und doppelt destilliertes Wasser hinzugefügt und die Lösung für 2 min auf 60 °C erwärmt. Eine Lösung von Natriumhexachloroiridat(IV) (34  $\mu\text{L}$ , 6 mM) wurde hinzugefügt und die Mischung für 1 h bei 60 °C inkubiert. Zur Aufreinigung des oxidierten Nucleosids **103** wurde die komplette Lösung per HPLC getrennt. Dazu verwendete man Puffersystem **P2** mit einem Gradienten von 0 – 25 % Puffer B in 45 min auf einer Macherey-Nagel *Nucleodur* 120-3 Säule und einem Fluss von 0.5 mL/min. HPLC-MS Messungen wurden durchgeführt unter Verwendung von Puffersystem **P3** mit einem Gradienten von 100 % Puffer A für 10 min, 0 – 10 % Puffer B für weitere 18 min bei einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  auf einer *Interchrom Uptisphere* 150  $\times$  2.1 Säule. Das ESI Spektrometer war im Negativ Modus mit einer *ion-spray* Spannung von 4 kV, einer Kapillartemperatur von 200 °C und einem *ion gas* Fluss von 40. Die Ionisierungsenergie für MS/MS und MS/MS/MS Experimente betrug 35 eV.

**Einelektronenoxidation von 93 (niedrige Temperatur, lange Reaktionszeit)**

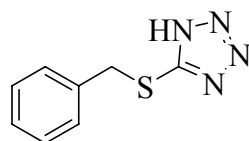
Zu einer Lösung von **93** (5  $\mu\text{L}$ , 6.8 mM) wurde Natriumphosphatpuffer (12.5  $\mu\text{L}$ , 100 mM, pH 6.5) und doppelt destilliertes Wasser (15.5  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Die Mischung wurde mit einer Lösung aus Natriumiridat(IV) in Wasser (17  $\mu\text{L}$ , 8 mM) versetzt und für 1 h bei 0 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionsmischung per analytischer HPLC getrennt. Dazu verwendete man Puffersystem **P2** mit einem Gradienten von 0 – 25 % Puffer B in 45 min auf einer Macherey-Nagel *Nucleodur* 120-3 Säule mit einem Fluss von 0.5 mL/min. HPLC-MS Messungen wurden durchgeführt unter Verwendung von Puffersystem **P3** mit einem Gradienten von 100 % Puffer A für 10 min, 0 – 10 % Puffer B für weitere 18 min bei einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  auf einer *Interchrom Uptisphere* 150  $\times$  2.1 Säule. Das ESI Spektrometer war im Negativ Modus mit einer *spray* Spannung von 4 kV, einer

Kapillartemperatur von 200 °C und einem *ion gas* Fluss von 40. Das Produkt zeigte das Signal des  $[M-H^+]^-$ -Ions eines carbocyclischen Analogons des Dehydroguanidinohydantoin (cdDGh, **104**) bei  $m/z = 268.1049$  (berechnet für  $[M-H^+]^-$  von cdDGh:  $m/z = 268.1051$ ).

### Einelektronenoxidation von **93** (niedrige Temperatur, kurze Reaktionszeit)

Zu einer Lösung von **93** (5  $\mu$ L, 6.8 mM) wurde Natriumphosphatpuffer (12.5  $\mu$ L, 100 mM, pH 6.5) und doppelt destilliertes Wasser (15.5  $\mu$ L) gegeben. Die Mischung wurde mit einer Lösung aus Natriumiridat(IV) in Wasser (17  $\mu$ L, 6 mM) versetzt und für 15 min bei 0 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionsmischung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (28  $\mu$ L) versetzt und per analytische HPLC getrennt. Dazu verwendete man Puffersystem **P2** mit einem Gradienten von 0 – 25 % Puffer B in 45 min auf einer Macherey-Nagel *Nucleodur* 120-3 Säule mit einem Fluss von 0.5 mL/min. HPLC-MS Messungen wurden durchgeführt unter Verwendung von Puffersystem **P3** mit einem Gradienten von 100 % Puffer A für 10 min, 0 – 10 % Puffer B für weitere 18 min bei einem Fluss von 200  $\mu$ L/min auf einer *Interchrom Uptisphere* 150 $\times$ 2.1 Säule. Das ESI Spektrometer war im Negativ Modus mit einer *spray* Spannung von 4 kV, einer Kapillartemperatur von 200 °C und einem *ion gas* Fluss von 40. Das Produkt zeigte das Signal des Ameisensäureaddukts  $[M+FA-H^+]^-$  eines carbocyclischen Analogons des Guanidinohydantoin (cdGh, **105**) bei  $m/z = 316.1261$  (berechnet für  $[M+FA-H^+]^-$  von cdGh:  $m/z = 316.1263$ ).

### Benzylthiotetrazol (**113**, zur DNA Synthese)



Benzylthiocyanat (35.7 g, 0.24 mol) wurde in Dioxan (190 mL) gelöst und mit einer Lösung aus Ammoniumchlorid (12.8 g) in destilliertem Wasser (48 mL) versetzt. Zu der zweiphasigen Mischung fügte man unter starkem Rühren langsam Natriumazid (1 eq, 15.6 g, 0.24 mol) hinzu und erhitze für 4 h auf 85 °C unter Stickstoffatmosphäre. Dann engte man die Lösung am Rotationsverdampfer bis auf ein Volumen von etwa 60 mL ein und überführte in ein großes Becherglas. Die Mischung wurde durch die Zugabe von etwa 200 mL Eiswasser gekühlt und das Rohprodukt durch vorsichtiges Ansäuern auf pH 2 unter kontinuierlichem Rühren mit konz. HCl ausgefällt. Der farblose Niederschlag wurde mit einer großen Glasfritte

abgetrennt und gründlich durch mehrmaliges Resuspendieren in destilliertem Wasser gewaschen. Das so erhaltene Rohprodukt wurde zum Umkristallisieren in Toluol (120 mL) suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Der Feststoff ging dabei in Lösung und die abgeschiedene Wasserphase wurde mit einer großen Pipette abgesaugt. Nach der Zugabe von 10 mL Acetonitril ließ man erneut für einige Zeit sieden und filtrierte danach heiß. Das gereinigte Produkt **113** fällt aus dem erkalteten Filtrat in Form weißer Plättchen aus (25.3 g, 0.13 mol, 55 %).

### 5.7 Oxidation der Oligonukleotide

#### Synthese von carbocyclischem Imidazolon: ODN5'/ODN5'' und ODN6'

Zu einer Lösung von entweder **ODN5** oder **ODN6** (2  $\mu\text{L}$ , 0.8 mM) wurde Natriumcacodylatpuffer (0.24  $\mu\text{L}$ , 100 mM, pH 7.0) und eine gesättigte Lösung von Riboflavin in Wasser (0.4  $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt. Die Mischung wurde zwischen die Wände einer 200  $\mu\text{L}$  Quartz Küvette (Schichtdicke 1 mm) platziert und für 5 min bei Raumtemperatur mit belichtet. Dazu wurde die verwendete luftgekühlte 1000 W Hg(Xe)-Kurzbogenlampe (max. Strahlungsdichte:  $700 \text{ mW/cm}^{-1}$ ) auf eine Ausgangsleistung von 500 W eingestellt.<sup>[213]</sup> Anschließend wurde die Probe mit Wasser (15  $\mu\text{L}$ ) verdünnt, auf 0 °C gekühlt und direkt per HPLC unter Verwendung von Puffersystem **P4** und einem Gradienten von entweder 25 - 50 % Puffer B in 45 min (**ODN5'/ODN5''**) oder 0 – 50 % Puffer B in 45 min (**ODN6'**) auf einer Dionex *DNA Pac-PA 100* 4 $\times$ 250 bei einem Fluss von 1.0 mL/min aufgetrennt. Die entsprechenden Fraktionen wurden aufgefangen, an einer Savant *Speed Vac* eingeeengt und für 20 min auf einer 0.2  $\mu\text{m}$  Nylon Membran (Whatman *Puradisc*) gegen Wasser dialysiert. Die so entsalzten Proben konnten anschließend mittels HPLC unter den oben beschriebenen Bedingungen auf Reinheit geprüft werden. Die Dialyse wurde dreimal wiederholt, wenn die Proben mittels MALDI-TOF analysiert werden sollten. Für die enzymatischen Verdauexperimente wurden die Reaktionsmengen im Maßstab 1:5 vergrößert.

#### Synthese von carbocyclischem Spiroiminodihydantoin: ODN8'

Eine Lösung von **ODN8** (42  $\mu\text{L}$ , 0.77 mM) wurde mit Natriumphosphatpuffer (140  $\mu\text{L}$ , 100 mM, pH 8.0), Natriumchloridlösung (28  $\mu\text{L}$ , 5 M), doppelt destilliertem Wasser (1050  $\mu\text{L}$ ) und Natriumhexachloroiridat(IV) (140  $\mu\text{L}$ , 1 mM) versetzt. Die Zugabe des letzten Reagenzes erfolgte, nachdem die Mischung zuvor für etwa 2 min auf 60 °C erhitzt worden

war. Man ließ anschließend für 1 h bei 60 °C reagieren und stoppte die Reaktion nach dieser Zeit, indem man die oxidierte DNA auf einer mit 5 mL Acetonitril aktivierten und mit 10 mL doppelt destilliertem Wasser äquilibrierten Waters *Sep-Pak* Kartusche absorbiert und anschließend durch Waschen mit Wasser (6 mL) entsalzte. Die DNA wurde mit Acetonitril/Wasser (4 mL, 4:1) eluiert und an der Speed Vac vom Lösungsmittel befreit. Die Probe wurde erneut in doppelt destilliertem Wasser gelöst und mittels MALDI-TOF und HR-ESI Spektrometrie charakterisiert. ODN8' wurde mittels analytischer HPLC (Macherey-Nagel Nucleodur 120-3, Puffer **P1**, Gradient von 0 – 22 % Puffer-B in 50 min, 0.5 mL/min) auf Reinheit geprüft.



## 6 Abkürzungen

$\lambda$	Wellenlänge
A	Adenin, DNA: 2'-Desoxyadenosin
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i> , chemische Ionisierung bei Normaldruck
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Bu	n-Butyl
Bz	Benzoyl
C	Cytosin, DNA: 2'-Desoxycytidin
cBnFaPydG	carbocyclisches N7-Benzyl-Formamidopyrimidin (DNA-Schaden)
cdDGh	carbocyclisches Dehydroguanidinohydantoin (DNA-Schaden)
cdG	carbocyclisches 2'-Desoxyguanosin
cdGh	carbocyclisches Guanidinohydantoin (DNA-Schaden)
cdIz	carbocyclisches Imidazolon (DNA-Schaden)
cdOG	carbocyclisches 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanoïn (DNA-Schaden)
cdZ	carbocyclisches Oxazolon (DNA-Schaden)
CEDCl	Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid
cFaPydG	carbocyclisches Formamidopyrimidin (DNA-Schaden)
cFaPydG	carbocyclisches Formamidopyrimidin (DNA-Schaden)
CPG	<i>controlled pore glass</i>
d	Tage
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
DCM	Dichlormethan
dDGh	Dehydroguanidinohydantoin (DNA-Schaden)
dG	2'-Desoxyguanosin
dG	2'-Desoxyguanosin

dGh	Guanidinohydantoin (DNA-Schaden)
DIEA	Diisopropylethylamin
dIz	Imidazolon (DNA-Schaden)
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl
DMTCI	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl-chlorid
DNA	( <i>deoxyribonucleic acid</i> ) Desoxyribonukleinsäure
dOA	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxy-adenosin (DNA-Schaden)
dOa	Oxazolusäure (DNA-Schaden)
dPa	Parabansäure (DNA-Schaden)
dSp	Spiroiminodihydantoin (DNA-Schaden)
dZ	Oxazolon (DNA-Schaden)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Electron Impact Ionisation
eq.	Äquivalent(e)
ESI	Elektronensprayionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EtOAc	Essigsäureethylester
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FaPydG	Formamidopyrimidin (DNA-Schaden)
Fl	Flavin
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
G	Guanin, DNA: 2'-Desoxyguanosin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Planck'sches Wirkungsquantum
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HMBC	Heteronuclear Multi-Bond Connectivity
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPLC-MS/MS	MS eines per HPLC und MS isolierten Ions

HR-MS	<i>(High resolution mass spectrometry)</i> hochaufgelöstes Massenspektrum
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
HV	Hochvakuum ( $10^{-3} - 10^{-2}$ mbar)
I	Intensität
ISC	<i>inter system crossing</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Lsg.	Lösung
M	mol/L
M	MS: Molekülion
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrum
MS/MS	MS eines mit MS isolierten Ions
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NTP	Nukleosidtriphosphat
Nu	Nukleophil
Ph	Phenyl
Py	Pyridin
R	Rest
<i>R<sub>f</sub></i>	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
<i>RP</i>	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SG	Schutzgruppe
Smp.	Schmelzpunkt
T	Temperatur
T	Thymin, DNA: Thymidin

TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEAA	Triethylamoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
Tol	Toluol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil, RNA: Uridin
UV	ultraviolett
Vis	<i>visible</i>
<i>z</i>	MS: Ladungszahl
$\delta$	NMR: chemische Verschiebung

## 7 Literatur

- [1] M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2006**.
- [2] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137-158.
- [3] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, *6*, 201-209.
- [4] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [5] H. J. Muller, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1928**, *14*, 714-726.
- [6] K. A. Butler, B. Smith, *J. Chem. Soc* **1950**, 3411-3418.
- [7] B. E. C. Butler, *J. Chem. Soc* **1950**, 3418-3421.
- [8] B. E. Conway, L. Gilbert, J. A. V. Butler, *J. Chem. Soc* **1950**, 3421-3425.
- [9] C. Auerbach, J. M. Robson, *Nature* **1946**, *157*, 302.
- [10] R. M. Herriott, *J. Gen. Physiol.* **1948**, *32*, 221-239.
- [11] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA Mutagenesis and Repair*, American Society for Microbiology, Washington, **1995**.
- [12] O. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974.
- [13] G. R. Hoffmann, R. P. P. Fuchs, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 347-359.
- [14] L. L. Bedard, T. E. Massey, *Cancer Lett.* **2006**, *241*, 174-183.
- [15] S. M. Cohen, S. J. Lippard, in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. Volume 67*, Academic Press, **2001**, pp. 93-130.
- [16] Y. Jung, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1387-1407.
- [17] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709-715.
- [18] J. Cadet, M. Berger, T. Douki, J.-L. Ravanat, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1997**, *131*, 1 - 87.
- [19] J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat, *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 348-349.
- [20] P. Regulus, D. Duroux, P.-A. Bayle, A. Favier, J. Cadet, J.-L. Ravanat, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 14032-14037.
- [21] S. Bjelland, E. Seeberg, *Mutat. Res.* **2003**, *531*, 37 - 80.
- [22] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J.-L. Ravanat, *Mutat. Res.* **2003**, *531*, 5 - 23.
- [23] T. Gimisis, C. Cismas, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1351 - 1378.
- [24] G. Pratviel, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6018 - 6030.
- [25] S. Steenken, S. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617 - 618.
- [26] I. Saito, M. Takayama, H. Sugiyama, K. Nakatani, A. Tsuchida, M. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6406-6407.

- [27] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7063-7068.
- [28] P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Kan, G. B. Schuster, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 8353-8358.
- [29] M. E. Nunez, D.B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85-97.
- [30] B. Giese, *Ann. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51-70.
- [31] G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J.-L. Ravanat, J. Cadet, P. Di Mascio, *Trends Photochem. Photobiol.* **2002**, *9*, 25 - 39.
- [32] M. J. Napolitano, B. J. Green, J. S. Nicoson, D. W. Margerum, *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 501-508.
- [33] J. Cadet, J.-L. Ravanat, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1219 - 1225.
- [34] G. R. Martinez, A. P. M. Loureiro, S. A. Marques, S. Miyamoto, L. F. Yamaguchi, J. Onuki, E. A. Almeida, C. C. M. Garcia, L. F. Barbosa, M. H. G. Medeiros, P. D. Mascio, *Mutat. Res.* **2003**, *544*, 115-127.
- [35] L. P. Candeias, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1094-1099.
- [36] K. Kobayashi, S. Tagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10213-10218.
- [37] J. Cadet, M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, S. Raoul, J.-L. Ravanat, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7403-7404.
- [38] S. Raoul, M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, Morin B., M. Weinfeld, J. Cadet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 371 - 381.
- [39] A. Kupan, A. Sauliere, S. Broussy, C. Seguy, G. Pratviel, B. Meunier, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 125 - 133.
- [40] K. Kino, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7373-7374.
- [41] R. Misiaszek, C. Crean, A. Joffe, N. E. Geacintov, V. Shafirovich, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 32106-32115.
- [42] T. Douki, J. Cadet, *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, *75*, 571 - 581.
- [43] C. Vialas, G. Pratviel, C. Claparols, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11548-11553.
- [44] C. Vialas, G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 1061 - 1063.
- [45] C. Vialas, C. Claparols, G. Pratviel, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2157-2167.
- [46] S. Choi, R. B. Cooley, A. S. Hakemian, Y. C. Larrabee, R. C. Bunt, S. D. Maupas, J. G. Muller, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 591-598.

- [47] L. B. Avalle, J. Dillon, S. Tari, E. R. Gaillard, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 1347-1350.
- [48] S. A. Gorman, S. B. Brown, J. Griffiths, *J. Environ. Path. Toxicol. Oncol.* **2006**, *25*, 79 - 108.
- [49] T. Mohammad, H. Morrison, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1221-1222.
- [50] L. Torun, H. Morrison, *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 370-375.
- [51] H. Tatsuzawa, T. Maruyama, K. Hori, Y. Sano, M. Nakano, *BiochemBiophys Res. Commun.* **1999**, *262*, 647-650.
- [52] S. Miyamoto, G. R. Martinez, A. P. B. Martins, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4510-4517.
- [53] S. Miyamoto, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6172-6179.
- [54] J. W. Snyder, E. Skovsen, J. D. C. Lambert, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14558-14559.
- [55] J.-L. Ravanat, C. Saint-Pierre, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J. Cadet, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3702 - 3708.
- [56] C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10446-10447.
- [57] Y. Ye, J. G. Muller, W. Luo, C. L. Mayne, A. J. Shallop, R. A. Jones, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13926-13927.
- [58] J. L. Ravanat, M. Berger, F. Benard, R. Langlois, R. Ouellet, J. E. Van Lier, J. Cadet, *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 809 - 814.
- [59] J.-L. Ravanat, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 379-388.
- [60] G. W. Buchko, J. Cadet, M. Berger, J.-L. Ravanat, *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 4847-4851.
- [61] J. C. Niles, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 963-966.
- [62] W. Adam, M. A. Arnold, M. Grune, W. M. Nau, U. Pischel, C. R. Saha-Moller, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 537-540.
- [63] A. Durandin, L. Jia, C. Crean, A. Kolbanovskiy, S. Ding, V. Shafirovich, S. Broyde, N. E. Geacintov, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 908-913.
- [64] B. Karwowski, F. Dupeyrat, M. Bardet, J. L. Ravanat, P. Krajewski, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1357-1365.
- [65] J. Cadet, T. Douki, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, P. Lester, S. Helmut, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 319*, Academic Press, **2000**, pp. 143-153.
- [66] A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, *18*, 1033-1077.

- [67] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc., Trans.* **1894**, 65, 899-905.
- [68] T. Kuzuya, S. Hoshida, Y. Kim, M. Nishida, H. Fuji, A. Kitabatake, M. Tada, T. Kamada, *Circ. Res.* **1990**, 66, 1160-1165.
- [69] H. A. Kontos, *Stroke* **2001**, 32, 2712.
- [70] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1152.
- [71] T. Douki, R. Martini, J. L. Ravanat, R. J. Turesky, J. Cadet, *Carcinogenesis* **1997**, 18, 2385-2391.
- [72] J. M. Essigmann, R. G. Croy, A. M. Nadzan, W. F. Busby, V. N. Reinhold, G. Buchi, G. N. Wogan, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1977**, 74, 1870-1874.
- [73] P. J. Hertzog, J. R. L. Smith, R. C. Garner, *Carcinogenesis* **1982**, 3, 723-725.
- [74] S. Steenken, S. V. Jovanovic, M. Bietti, K. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2373-2374.
- [75] R. Misiaszek, Y. Uvaydov, C. Crean, N. E. Geacintov, V. Shafirovich, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 6293-6300.
- [76] W. Luo, J. G. Muller, C. J. Burrows, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2801-2804.
- [77] W. Luo, J. G. Muller, E. M. Rachlin, C. J. Burrows, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, 14, 927-938.
- [78] W. Luo, J. G. Muller, E. M. Rachlin, C. J. Burrows, *Org. Lett.* **2000**, 2, 613-616.
- [79] V. Duarte, J. G. Muller, C. J. Burrows, *Nucl. Acids Res.* **1999**, 27, 496-502.
- [80] C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6439-6442.
- [81] C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 474-477.
- [82] J. E. B. McCallum, C. Y. Kuniyoshi, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16777-16782.
- [83] V. Duarte, D. Gasparutto, L. F. Yamaguchi, J. L. Ravanat, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12622-12628.
- [84] J.-L. Ravanat, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, J. Cadet, *Arch. Biochem. Biophys* **2004**, 423, 23-30.
- [85] G. R. Martinez, J. L. Ravanat, M. H. G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10212-10213.
- [86] J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, S. Caillat, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, A. Favier, J. Cadet, *Biological Chemistry* **2005**, 385, 17-23.
- [87] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mut. Res./Fund. Mol. Mech. Mutag.* **2005**, 571, 3-17.
- [88] S. Frelon, T. Douki, J. Cadet, *Free Rad. Res.* **2002**, 36, 499-508.
- [89] J.A. Raleigh, A.F. Fuciarelli, *Radiat. Res.* **1985**, 102, 165 - 175.



- [90] H. Kamiya, H. Kasai, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19446-19450.
- [91] N. Murata-Kamiya, H. Kamiya, M. Muraoka, H. Kaji, H. Kasai, *J. Radiat. Res.* **1997**, *38*, 121 - 131.
- [92] H. Yanagawa, Y. Ogawa, M. Ueno, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13320-13326.
- [93] P. Simon, D. Gasparutto, S. Gambarelli, C. Saint-Pierre, A. Favier, J. Cadet, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 3660-3669.
- [94] T. Douki, T. Delatour, F. Paganon, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1145-1151.
- [95] J. R. Wagner, C. Decarroz, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4101-4110.
- [96] W. Hiraoka, M. Kuwabara, F. Sato, A. Matsuda, T. Ueda, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*, 1217-1223.
- [97] J. R. Wagner, C. Hu, B. N. Ames, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 3380-3384.
- [98] M. Dizdaroglu, E. Holwitt, M. P. Hagan, W F Blakely, *Biochem. J.* **1986**, *235*, 531 - 536.
- [99] J. Riviere, F. Bergeron, S. Tremblay, D. Gasparutto, J. Cadet, J. R. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6548-6549.
- [100] J. Riviere, K. Klarskov, J. R. Wagner, *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1332-1338.
- [101] P. Jaruga, M. Dizdaroglu, *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*, 1389-1394.
- [102] M. Dizdaroglu, C. Bauche, H. Rodriguez, J. Laval, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5586-5592.
- [103] R. Flyunt, J. A. Theruvathu, A. Leitzke, C. von Sonntag, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 1572 - 1582.
- [104] W. A. Pryor, *Free Rad. Biol. Med.* **1988**, *4*, 219-223.
- [105] S. Uesugi, M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3250-3253.
- [106] M. Ober, H. Muller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18143-18149.
- [107] K. Hoogsteen, *Acta Cryst.* **1963**, *16*, 907-916.
- [108] K. E. McAuley-Hecht, *Biochemistry* **1994**, 10266- 10270.
- [109] S. Shibutani, M. Takeshita, A. P. Grollman, *Nature* **1991**, *349*, 431-434.
- [110] L. G. Brieba, B. F. Eichman, R. J. Kokoska, S Doublié, T. A. Kunkel, T. Ellenberger, *EMBO J.* **2004**, *23*, 3452 - 3461.
- [111] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, *431*, 217-221.
- [112] L. L. Furge, F. P. Guengerich, *Biochemistry* **1997**, *36*, 6475-6487.
- [113] L. Jia, V. Shafirovich, R. Shapiro, N. E. Geacintov, S. Broyde, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6043-6051.

- [114] K. Kino, H. Sugiyama, *Mut. Res./Fund. Mol. Mech. Mutag.* **2005**, 571, 33-42.
- [115] X. Zhao, J. G. Muller, M. Halasyam, S. S. David, C. J. Burrows, *Biochemistry* **2007**, 46, 3734-3744.
- [116] F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* **1966**, 19, 548 - 555.
- [117] O. Korniyushyna, A. M. Berges, J. G. Muller, C. J. Burrows, *Biochemistry* **2002**, 41, 15304-15314.
- [118] K. D. Sugden, B. D. Martin, *Environ. Health Perspect.* **2002**, 110, 725.
- [119] K. Kino, H. Sugiyama, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 369-378.
- [120] V. Duarte, D. Gasparutto, M. Jaquinod, J. Cadet, *Nucl. Acids Res.* **2000**, 28, 1555-1563.
- [121] D. Gasparutto, S. Da Cruz, A. G. Bourdat, M. Jaquinod, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12, 630-638.
- [122] V. Duarte, D. Gasparutto, M. Jaquinod, J. L. Ravanat, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, 14, 46-53.
- [123] C. M. Gedik, A. Collins, *FASEB J.* **2005**, 19, 82-84.
- [124] EUROPEAN STANDARDS COMMITTEE ON OXIDATIVE DNA DAMAGE (ESCODD), *Free Rad. Biol. Med.* **2003**, 34, 1089 - 1099.
- [125] M. K. Hailer, P. G. Slade, B. D. Martin, K. D. Sugden, *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 1378-1383.
- [126] B. Matter, D. Malejka-Giganti, A. S. Csallany, N. Tretyakova, *Nucl. Acids Res.* **2006**, 34, 5449-5460.
- [127] W. L. Neeley, J. M. Essigmann, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, 19, 491-505.
- [128] S. S. David, V. L. O'Shea, S. Kundu, *Nature* **2007**, 447, 941 - 950
- [129] S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1221-1262.
- [130] T. Paz-Elizur, R. Ben-Yosef, D. Elinger, A. Vexler, M. Krupsky, A. Berrebi, A. Shani, E. Schechtman, L. Freedman, Z. Livneh, *Cancer Res* **2006**, 66, 11683-11689.
- [131] P. J. Berti, J. A. B. McCann, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 506-555.
- [132] J. B. Parker, M. A. Bianchet, D. J. Krosky, J. I. Friedman, L. M. Amzel, J. T. Stivers, *Nature* **2007**, 449, 433-437.
- [133] L. H. Pearl, *Mutat. Res./DNA Repair* **2000**, 460, 165-181.
- [134] A. R. Parker, J. R. Eshleman, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, 60, 2064.
- [135] P. J. O'Brien, T. Ellenberger, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 26876-26884.
- [136] S. Boiteux, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 5(From DNA Photolesions to Mutations, Skin Cancer and Cell Death), 93-102.

- [137] A. Klungland, S. Bjelland, *DNA Repair* **2007**, *6*, 481-488.
- [138] T. K. Hazra, A. Das, S. Das, S. Choudhury, Y. W. Kow, R. Roy, *DNA Repair* **2007**, *6*, 470-480.
- [139] M. L. Michaels, J. H. Miller, *J. Bact.* **1992**, *174*, 6321–6325.
- [140] S. Boiteux, T. R. O'Connor, J. Laval, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3177 - 3183.
- [141] D. O. Zharkov, G. Shoham, A. P. Grollman, *DNA Repair* **2003**, *2*, 839-862.
- [142] M. Sugahara, T. Mikawa, T. Kumasaka, M. Yamamoto, R. Kato, K. Fukuyama, Y Inoue, S Kuramitsu, *EMBO J.* **2000**, *19*, 3857–3869.
- [143] L Serre, K. Pereira de Jésus, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *EMBO J.* **2002**, *21*, 2854–2865.
- [144] J. C. Fromme, G. L. Verdine, *Nat Struct Mol Biol* **2002**, *9*, 544-552.
- [145] J. C. Fromme, G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51543-51548.
- [146] C. A. S. A. Minetti, D. P. Remeta, D. O. Zharkov, G. Eric Plum, F. Johnson, A. P. Grollman, K. J. Breslauer, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 1047-1060.
- [147] F. Coste, M. Ober, T. Carell, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44074-44083.
- [148] P. C. Blainey, A. M. van Oijen, A. Banerjee, G. L. Verdine, X. S. Xie, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 5752-5757.
- [149] A. Banerjee, W. L. Santos, G. L. Verdine, *Science* **2006**, *311*, 1153-1157.
- [150] R. Gilboa, D. O. Zharkov, G. Golan, A. S. Fernandes, S. E. Gerchman, E. Matz, J. H. Kycia, A. P. Grollman, G. Shoham, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19811-19816.
- [151] K. P. de Jesus, L. Serre, C. Zelwer, B. Castaing, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 5936-5944.
- [152] G. L. Verdine, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 329-334.
- [153] D. O. Zharkov, A. P. Grollman, *Mut. Res./ Fund. Mol. Mech. Mutag.* **2005**, *577*, 24-54.
- [154] D. O. Zharkov, R. A. Rieger, C. R. Iden, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5335-5341.
- [155] M. Bhagwat, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1996**, *35*, 659-665.
- [156] S. D. Bruner, D. P. G. Norman, G. L. Verdine, *Nature* **2000**, *403*, 859-866.
- [157] P. de Jesus, L. Serre, N. Hervouet, V. Bouckson-Castaing, C. Zelwer, B. Castaing, *Acta Cryst.* **2002**, *58*, 679-682.
- [158] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 293-301.
- [159] M. Ober, U. Linne, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5097-5101.

- [160] E. De Clercq, G. Andrei, R. Snoeck, L. De Bolle, L. Naesens, B. Degreve, J. Balzarini, Y. Zhang, D. Schols, P. Leyssen, C. Ying, J. Neyts, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* **2001**, *20*, 271-285.
- [161] T. Kishi, M. Muroi, T. Kuaaka, M. Nishikawa, K. Kamiya, K. Mizuno, *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 940.
- [162] T. Kusaka, H. Yamamoto, M. Shibata, M. Mwoi, T. Kishi, K. Mizuno, *J. Antibiot.* **1968**, *21*, 255.
- [163] L. S. Jeong, J. A. Lee, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **2004**, *15*, 235 - 250.
- [164] W. Traube, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 3035-3056.
- [165] W. Traube, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 1371-1383.
- [166] B. M. Dominguez, P. M. Cullis, *Tetrahed. Lett.* **1999**, *40*, 5783-5786.
- [167] M. Ishikura, N. S. Katagiri, *Rec. Res. Develop. Org. Chem.* **2004**, *8*, 197-205.
- [168] H. S. Forrest, R. Hull, H. J. Rodda, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1951**, 3-6.
- [169] W. Pfeleiderer, H. Walter, *Liebigs Ann. Chem.* **1964**, *677*, 113-126.
- [170] J. C. Temple, B. H. Smith, J. A. Montgomery, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3141-3142.
- [171] A. Rosenquist, I. Kvarnström, S. C. T. Svensson, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1779-1782.
- [172] P. Wang, L. A. Agrofoglio, M. G. Newton, C. K. Chu, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4173-4178.
- [173] E. Taylor, E. Garcia, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4720 - 4721.
- [174] G. Cristalli, P. Franchetti, M. Grifantini, S. Vittori, G. Lupidi, F. Riva, T. Bordoni, C. Geroni, M. A. Verini, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 390-393.
- [175] M. Melguizo, M. Nogueras, A. Sanchez, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 559-565.
- [176] R. K. Robins, H. H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 490-494.
- [177] R. Vince, S. Daluge, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 531-533.
- [178] M. L. Peterson, R. Vince, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1214-1219.
- [179] F. Johnson, G. Dorman, R. A. Rieger, R. Marumoto, C. R. Iden, R. Bonala, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 193-202.
- [180] H. Ikeda, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10836-10837.
- [181] A. G. Arvanitis, J. T. Rescinito, C. R. Arnold, R. G. Wilde, G. A. Cain, J. Hui Sun, J.-S. Yan, C. A. Teleha, L. W. Fitzgerald, J. McElroy, R. Zaczek, P. R. Hartig, S. Grossmann, S. P. Arneric, P. J. Gilligan, R. E. Olson, D. W. Robertson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 125-128.

- [182] Y. Abe, H. Kayakiri, S. Satoh, T. Inoue, Y. Sawada, N. Inamura, M. Asano, I. Aramori, C. Hatori, H. Sawai, T. Oku, H. Tanaka, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4062-4079.
- [183] A. J. Kresge, R. J. Preto, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4593-4596.
- [184] P. Deslongchamps, Y. L. Dory, S. Li, *Tetrahed.* **2000**, *56*, 3533-3537.
- [185] S. Koizume, H. Kamiya, H. Inoue, E. Ohtsuka, *Nuclos. Nucleot.* **1994**, *13*, 1517-1534.
- [186] P. M. Gannett, T. P. Sura, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1611 - 1615.
- [187] L. C. J. Gillet, O. D. Scharer, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4205-4208.
- [188] G. R. Martinez, D. Gasparutto, J.-L. Ravanat, J. Cadet, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, *Free Rad. Biol. Med.* **2005**, *38*, 1491-1500.
- [189] L. Zhang, Z. Cui, B. Zhang, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 703-710.
- [190] F. W. Kotch, V. Sidorov, Y. F. Lam, K. J. Kayser, H. Li, M. S. Kaucher, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15140-15150.
- [191] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281-285.
- [192] S. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahed.* **1992**, *48*, 2223-2311.
- [193] C. Vargeese, J. Carter, J. Yegge, S. Krivjansky, A. Settle, E. Kropp, K. Peterson, W. Pieken, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 1046-1050.
- [194] T. Douki, J. Cadet, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495-2501.
- [195] R. A. McClelland, R. Panicucci, A. M. Rauth, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4308-4313.
- [196] R. S. Morrell, A. E. Bellars, *J. Chem. Soc.* **1907**, *91*, 1010.
- [197] A. F. McKay, R. O. Braun, W. G. Hatton, *Can. J. Chem.* **1954**, *32*, 1012-1016.
- [198] W. Schulze, *J. prakt. Chem.* **1969**, *311*, 353-528.
- [199] Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1691-1696.
- [200] D. Gasparutto, J. L. Ravanat, O. Gerot, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10283-10286.
- [201] L.-K. Zhang, D. Rempel, M. L. Gross, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3263-3273.
- [202] L.-K. Zhang, Y. Ren, D. Rempel, J. S. Taylor, M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 1127-1135.
- [203] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* **1980**, *65*, 499-560.
- [204] H. Müller, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1438-1445.
- [205] J. Tchou, V. Bodepudi, S. Shibutani, I. Antoshechkin, J. Miller, A. P. Grollman, F. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15318-15324.

- [206] F. Coste, M. Ober, Y.-V. Le Bihan, M. A. Izquierdo, N. Hervouet, H. Müller, T. Carell, B. Castaing, *EMBO Journal* **2008**, eingereicht.
- [207] M. Ober, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2005**.
- [208] A. Romieu, D. Gasparutto, D. Molko, J.-L. Ravanat, J. Cadet, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 49-56.
- [209] G. D. Fasman, *Optical properties of nucleic acids, absorption and circular dichroism spectra*, 3 ed., CRC Press, Cleveland, Ohio, **1975**.
- [210] C. R. Cantor, M. M. Warshaw, H. Shapiro, *Biopolymers* **1970**, 9, 1059-1077.
- [211] L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, 26, 1601-1620.
- [212] J. P. Bernadou, F. Bennis, M. Girardet, B. Meunier, *Biochemistry* **1989**, 28, 7268 - 7275.
- [213] C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1842-1844.

## Heiko Carl Müller

Geburtsdatum und -ort  
Nationalität  
Familienstand

05. April 1978 in Groß-Gerau  
deutsch  
verheiratet

**Hochschullaufbahn**

Seit März 2004

**Promotion**

Ludwig-Maximilians-Universität München  
in der Gruppe von Prof. Thomas Carell

Okt 2003 – März 2004

**Diplomarbeit**

Ludwig-Maximilians-Universität München  
unter der Leitung von Prof. Thomas Carell

Sept 2003

**Diplomprüfung**

Ludwig-Maximilians-Universität München

Okt 2000 – Sept 2003

**Hauptstudium**

Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München

Okt 1998 – Sept 2000

**Grundstudium**

Chemie, Philipps-Universität Marburg

Juli 1997 – Aug 1998

**Zivildienst**

Intensivstation des Kerckhoff Klinikums, Bad Nauheim

Juni 1997

**Abitur**

Ernst-Ludwig Gymnasium, Bad Nauheim

1988 - 1997

Besuch des Ernst-Ludwig Gymnasium, Bad Nauheim

**Praktika**

Seit April 2004

Forschungsassistent an der Ludwig-Maximilians-Universität:  
Theoretische und praktische Betreuung von Studenten

Juni 2002 – Juli 2002

Werkstudent bei der 4SC AG, Martinsried

Feb 2001 - März 2001

Praktikum bei der 4SC AG, Martinsried,  
Thema: "Oberflächenmodifikation von  
Polypropylenplatten zur Festphasensynthese."

**Engagement**

Jan 2006 – Dez 2006

Sprecher des Jungchemikerforums München, verantwortlich  
für die

Seit Dez 2004

Organisation des Alpenforum Symposiums

Mitglied im Jungchemikerforum München (JCF) Organisation  
von

Vorträgen, Symposien und dem JCF Fußballturnier

München, 25.03.2008