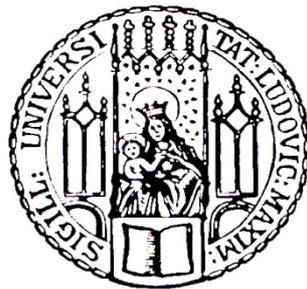


Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Strukturbiologische und mechanistische Untersuchungen zur Erkennung und
Reparatur von DNA-Photoschäden**



Andreas Glas

aus

Landsberg am Lech

2010

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 06.04.2010



Andreas Glas

Dissertation eingereicht am: 08.04.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Zipse

Mündliche Prüfung am: 21.05.2010

Meiner Familie

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei (1564 – 1642)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben...

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* ganz herzlich für die interessante Themenstellung, die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, der steten Diskussionsbereitschaft sowie dem Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten danken. Seine motivierende Art und aufbauenden Ratschläge haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Hendrik Zipse danke ich recht herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferats, sowie den anregenden Diskussionen bezüglich dem Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyase.

Den Mitarbeitern *Claudia Gräf*, *Sabine Voß* und *Slava Gärtner* danke ich für die stete Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Frage- und Problemstellungen.

Den Mitarbeitern der Abteilungen für NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie an der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Aufnahme aller NMR- und Massenspektren sowie deren Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei auftretenden Problemen.

Meinen beiden F-Praktikanten *Martin Rieger* und *Lukas Delvos* danke ich für ihre hohe Motivation und großen Einsatzbereitschaft im Labor.

Meinen Kooperationspartnern *Prof. Dr. Ilme Schlichting* vom MPI für medizinische Forschung in Heidelberg, *Prof. Dr. Wolfgang Zinth* und *Prof. Dr. de Vivie-Riedle* von der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter des Arbeitskreis Carell danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und der stetigen Hilfsbereitschaft bei den unterschiedlichsten praktischen und theoretischen Frage- und Problemstellungen. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei...

Dr. Melanie Maul, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Während meiner ganzen Promotionszeit stand sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite, wobei sie sich auch nicht scheute, ungewöhnliche Wege mit mir einzuschlagen (ich sag nur 30 g Fruchtfliegen...). Neben der gemeinsamen Arbeit am Photolyase-Projekt danke ich ihr auch für etliche außeruniversitärer Aktivitäten, welche immer mit viel Spaß verbunden waren.

Dr. Sabine Schneider, sie war das Herzstück dieser Arbeit hinsichtlich aller nur denkbaren kristallographischen Frage- und Problemstellungen. Ohne sie wäre vermutlich immer noch keine Elektronendichte für die DNA in unserer Struktur vorhanden...

Zudem möchte ich mich bei ihr für ihre Ausdauer auf all den teilweise doch sehr frustrierenden Synchrotrontrips bedanken, wobei ich ihr Leid dreimal teilen durfte.

Dr. Markus Müller, der mir nicht nur in etlichen biochemischen als auch computertechnischen Fragen des öfteren die Augen geöffnet hat, sondern auch maßgeblich an der Gestaltung des Angewandte Cover beteiligt gewesen ist.

Dr. Ulrich Hennecke, ohne dessen Vorarbeiten auf dem (6-4) Projekt und seinem immer noch vorhandenen Interesse das Gelingen dieser Arbeit stark beeinträchtigt gewesen wäre.

Daniel Globisch, mit ihm durfte ich drei Jahre Rücken an Rücken in unserer Box verbringen. Nachdem ich mich relativ schnell an seine doch teilweise sehr chaotische Arbeitsweise gewöhnt hatte, entwickelte sich zwischen uns eine echte Freundschaft in all den Jahren. Neben den Chemie relevanten Diskussionen fanden wir doch immer wieder ausreichend Zeit, uns über jedliche denkbare Sportart zu unterhalten, natürlich mit dem Hauptaugenmerk auf Fussball. Vielen Dank!

Tobias Brückl, er komplementierte schließlich unsere Cafeteria-Essensgemeinschaft, wobei er ebenfalls ein steter Begleiter bei diversen Diskussionen und außeruniversitärer Veranstaltungen war.

Emine Kaya und *Korbinian Heil* danke ich für die tatkräftige Unterstützung auf dem Photolyase-Projekt in den letzten Monaten meiner Dissertation.

Dem gesamten Labor F4.004 („Die jungen Wilden“) danke ich für eine äusserst angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre während der gesamten Zeit meiner Promotion.

Bei *Dr. Sabine Schneider*, *Dr. Markus Müller*, *Daniel Globisch* und *Martin Münzel* möchte ich mich recht herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, deren Unterstützung in jeder Hinsicht unersetzlich ist. Hierbei möchte ich mich besonders bei meiner Frau *Sabrina Glas* bedanken, die während meiner Promotionszeit etliche Entbehrungen auf sich nehmen musste, mich trotzdem zu jeder Zeit und zu jedem Punkt voll unterstützte und mir somit den nötigen Rückhalt für das Gelingen dieser Arbeit bot.

Liste der Publikationen

1. A. F. Glas, E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (10), 3254 – 3255. DNA (6-4) Photolyases Reduce Dewar Isomers for Isomerization into (6-4) Lesions.
2. A. F. Glas, M. J. Maul, M. Cryle, T. R. M. Barends, S. Schneider, E. Kaya, I. Schlichting, T. Carell, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 11540 – 11545. The Archaeal Cofactor F_o is a Light Harvesting Antenna in Eukaryotes.
3. A. F. Glas, S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (40), 10387 – 10396. Crystal Structure of the T(6-4)C Lesion in Complex with a (6-4) DNA Photolyase and Repair of UV-induced (6-4) and Dewar Photolesions.
4. M. J. Maul, T. R. M. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076 – 10080. Crystal Structure and Mechanism of a DNA (6-4) Photolyase.

Konferenzbeiträge

1. Poster Präsentation: A. F. Glas, S. Schneider, M. J. Maul, T. Carell, *118th BASF Sommerkurs*, Ludwigshafen, Deutschland, 11. – 21. August **2009**. (6-4) Photolyase – a Fascinating DNA Repair Enzyme.
2. Vortrag: A. F. Glas, *II SFB 749-Symposium*, Wildbad-Kreuth, Deutschland, 30. März – 01. April **2009**. News from the (6-4) Photolyase.
3. Poster Präsentation: A. F. Glas, M. J. Maul, S. Schneider, T. Carell, *XIVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acids Compounds*, Český Krumlov, Czech Republic, 08. – 13. Juni **2008**. New Insights into Photorepair.
4. Vortrag: A. F. Glas, *I SFB 749-Symposium*, Wildbad-Kreuth, Deutschland, 25. – 27. März **2008**. (6-4) Photoproduct – Formation, Repair and Crystallization.

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	1
II.	Summary	4
1.	Einleitung	7
1.1	DNA und DNA-Schäden	7
1.2	DNA-Reparatursysteme.....	9
1.3	DNA-Photoschäden	10
1.3.1	Cyclobutanpyrimidindimer (CPD-Photoschden).....	12
1.3.2	(6-4)-Photoschäden	13
1.3.3	Dewar Valenz-Isomere	15
1.3.4	Mutagenität von DNA-Photoschäden	17
1.4	Reparatur von DNA-Photoschäden	19
1.4.1	Einteilung der Photolyasen und Cryptochrome	19
1.4.2	CPD-Photolyase.....	21
1.4.2.1	Strukturelle Einblicke in die CPD-Photolyase.....	22
1.4.2.2	Reparaturmechanismus der CPD-Photolyase	24
1.4.2	(6-4)-Photolyase.....	25
2.	Aufgabenstellung	31
3.	Ergebnisse und Diskussion	32
3.1	Methoden zur Herstellung des (6-4)-Schadens	32
3.1.1	Direkte Belichtung von Oligonukleotiden mit UV-Licht.....	33
3.1.2	Herstellung des (6-4)-Schadens auf Dinukleotidebene	39
3.2	Herstellung und Charakterisierung des (TA)*-Photoschadens	42
3.3	Umwandlung der (6-4)-Photoprodukte in ihre entsprechenden Dewar Valenz-Isomere.....	46

3.3.1	Untersuchungen zur Umwandlung durch Belichtung von Oligonukleotiden	46
3.3.2	Untersuchungen zum Mechanismus der Dewar-Schadensbildung.....	50
3.4	Charakterisierung der (6-4)- und der (Dew)-Photoschäden	53
3.4.1	Absorptionseigenschaften	53
3.4.2	HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse der enzymatisch abgebauten Oligonukleotide	54
3.5	Reparaturstudien der (6-4)- und der (Dew)-Schäden	60
3.5.1	Bestimmung des pH-Optimums.....	61
3.5.2	Bestimmung der optimalen Belichtungszeit sowie der Enzymmenge..	62
3.5.3	Aktivitätsstudien der (6-4)-Photolyase mit (6-4)-Schäden.....	63
3.5.4	Aktivitätsstudien der (6-4)-Photolyase mit Dewar-Schäden als Substrat	66
3.6	Charakterisierung der (6-4)-Photolyase.....	73
3.6.1	Homologievergleich der Photolyase/Cryptochrom Superfamilie.....	73
3.6.2	Spektroskopische Eigenschaften der (6-4)-Photolyase.....	77
3.6.3	Identifizierung des zweiten Cofaktors der (6-4)-Photolyase	80
3.6.4	Vergleich der Reparaturaktivität der (6-4)-Photolyase mit und ohne dem zweiten Cofaktor F ₀	82
3.6.5	Direkte Isolierung von F ₀ aus <i>D. melanogaster</i>	85
3.7	Strukturbiologische und mechanistische Untersuchungen der (6-4)-Photolyase	87
3.7.1	Co-Kristallisation des T(6-4)-T-Schadens im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus <i>D. melanogaster</i>	87
3.7.2	Diffraktionsanalyse der (6-4)-Photolyase.....	88
3.7.3	Strukturanalyse der (6-4)-Photolyase	89
3.7.4	Co-Kristallisation mit dem zweiten Cofaktor F ₀	94
3.7.5	Mechanistische Untersuchungen zur Reparatur der (6-4)-Photolyase..	97
3.7.6	Co-Kristallisationsuntersuchungen der (6-4)-Photolyase aus <i>D. melanogaster</i> im Komplex mit dem T(6-4)C- bzw. T(6-4)C*-Schaden.....	103
3.7.7	Co-Kristallisationsuntersuchungen der (6-4)-Photolyase aus <i>D. melanogaster</i> im Komplex mit den Dewar-Isomeren.....	107
3.8	Synthese des Cofaktors F ₀ /8-HDF.....	109

3.9	Synthese eines (6-4)-Reparaturintermediat-Analogon	114
3.9.1	Synthese des Nukleosids A.....	116
3.9.1.1	Silyl-Schützung des 5'- und 3'-Endes von 2'-Desoxyuridin....	116
3.9.1.2	Stannylierung der C6-Position des geschützten 2'-Desoxyuridins 52	116
3.9.2	Synthese des Nukleosids B.....	117
3.9.2.1	Toluoyl-Schützung des 5'- und 3'-Endes von 2'-Desoxyuridin.....	117
3.9.2.2	Chlorierung der C4-Position des geschützten 2'-Desoxyuridins 54	118
3.9.3	Kupplung und Funktionalisierung der beiden Nukleoside A und B zum Analogon 62	118
3.9.3.1	<i>Stille</i> -Kreuzkupplung der beiden <i>building blocks</i>	118
3.9.3.2	Entschützung der „Silylklammer“ des Dinukleosids 56	119
3.9.3.3	Schützung der 5'-OH-Gruppe des Pyrimidinrings von 57 mit DMT-Cl	120
3.9.3.4	Schützung der 3'-OH-Gruppe des Pyrimidinrings von 58 mit TBDMS-Cl	121
3.9.3.5	Entschützung der Toluoylschutzgruppen des Dinukleosids 59	121
3.9.3.6	Selektive Schützung der 5'-OH-Gruppe des Pyrimidonrings von 60 mit TBDPS-Cl.....	122
3.9.3.7	Darstellung des Phosphoramidits 62	122
3.9.4	Einbau und Charakterisierung von 51 in DNA.....	123
3.9.5	Biochemische und strukturblogische Untersuchungen mit dem Reparaturanalogon und der (6-4)-Photolyase	125
3.10	Zusammenfassung und Ausblick.....	126

4.	Experimenteller Teil.....	134
4.1	Material und Methoden	134
4.2	Synthesevorschriften und analytische Daten	143
4.2.1	Synthese des (6-4)-Reparatur-Analogen	143
4.2.2	Synthese des Desazaflavins F ₀	157
4.2.3	Synthese des Formacetalverbrückten T(6-4)T-Dinukleotids.....	161
5.	Abkürzungsverzeichnis.....	162
6.	Literaturverzeichnis.....	166
7.	Anhang.....	179

I. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass der UV-Anteil des Sonnenlichts zur Schädigung der DNA und zur Ausbildung einer Vielfalt an DNA-Photoschäden führt. Die dabei entstehenden cytotoxischen und mutagenen Schäden sind Cyclobutanpyrimidindimere (CPD-Schäden), (6-4)-Photoschäden, als auch dessen Dewar Valenz-Isomere. Heutzutage besteht kein Zweifel daran, dass diese Schäden eng mit dem Auftreten von Hautkrebs in Verbindung stehen. Um sich vor den negativen Auswirkungen der Photoschäden schützen zu können, haben sich alle dem Sonnenlicht ausgesetzte Lebewesen im Laufe der Evolution ein multifunktionelles und effizientes Reparatursystem angeeignet. Hier wären zum Beispiel die Exzisionsreparatur von geschädigter DNA und die direkte Reversion der Schäden zu nennen. Die letztgenannte Form der Reparatur nennt man Photoreaktivierung und wird der Enzymklasse der Photolyasen zugeschrieben. Diese Photolyasen sind paradoxerweise in der Lage, mit Hilfe von UV-A/B- bzw. Blaulicht (300 – 500 nm), Pyrimidindimere wieder in ihre intakten Basen umzuwandeln. Die Photolyasen sind hochselektive Enzyme und lassen sich je nach Substratspezifität in CPD- und (6-4)-Photolyasen unterteilen.

In den letzten Jahren hat sich der CPD-Schaden zusammen mit der CPD-Photolyase als Modellsystem bei der Untersuchung zur Entstehung und Reparatur von DNA-Photoschäden entwickelt. So sind zum Beispiel der Reparaturmechanismus sowie die Cofaktoren-Zusammensetzung der CPD-Photolyasen weitestgehend geklärt. Im Gegensatz dazu weiß man vergleichsweise wenig über die (6-4)-Schäden und ihre Photolyasen. Aufgrund der Ähnlichkeit zu den CPD-Photolyasen, wurde für die (6-4)-Photolyasen ein ähnlicher Reparaturmechanismus postuliert, wobei jedoch der dabei auftretende viergliedrige Übergangszustand (ein Oxetan- oder Azetidin-Intermediat) experimentell nicht nachgewiesen werden konnte.

Um speziell diese als auch weitere Fragen bezüglich der (6-4)-Schadenserkennung und Reparatur durch die (6-4)-Photolyasen klären zu können, musste der (6-4)-Schaden in ausreichenden Mengen für biochemische und strukturbiologische Experimente synthetisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte schließlich eine Methode optimiert werden, mit der man durch direkte Belichtung von Oligonukleotiden bei 254 nm unter Ausschluss von Sauerstoff, ausreichende Mengen an (6-4)-Schaden enthaltener DNA isolieren konnte.

Diese Mengen an (6-4)-Schaden enthaltener DNA ermöglichten es erstmals, eine Co-Kristallstruktur eines (6-4)-Schadens im Komplex mit einer (6-4)-Photolyase zu erhalten (Abbildung 1).

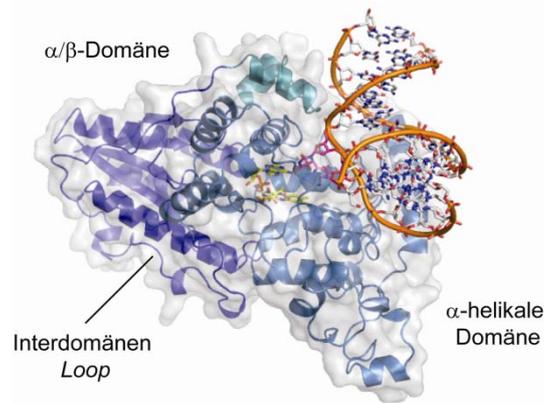


Abb. 1: Struktur der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden. Die α -helikale Domäne ist in cyan und die α/β -Domäne in blau dargestellt. Der T(6-4)T-Schaden und der FAD-Cofaktor sind in pink bzw. gelb abgebildet. Über das Modell wurde eine semitransparente Proteinoberfläche gelegt.

Die Kristallstruktur des T(6-4)T-Schadens im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* konnte mit einer Auflösung von 2.0 Å erhalten werden und zeigte eine für Photolyasen typische Architektur mit einer N-terminalen α/β -Domäne, einer C-terminalen α -helikalen Domäne sowie einem Interdomänen-Loop. Die DNA wird bei der Bindung durch die (6-4)-Photolyase vollständig geöffnet und der Schaden um nahezu 180 ° in die aktive Tasche des Enzyms gedreht. Nach Reduktion mit Natriumdithionit und Belichtung mit Weißlicht konnte die Reparatur auch im Kristall durchgeführt und die entsprechende Struktur (2.7 Å) mit den intakten Basen im aktiven Zentrum erhalten werden (Abbildung 2b). Eine weitere Struktur (2.9 Å) mit dem T(6-4)C-Schaden im Komplex mit der Photolyase zeigte eine ähnliche Struktur verglichen mit dem T(6-4)T-Schaden auf.

Anhand der erhaltenen Strukturdaten und weiteren Mutationsstudien konnte nach Aktivitätsbestimmungen der einzelnen Mutanten die katalytisch essentielle Triade His365-His369-Tyr423 charakterisiert werden (siehe Abbildung 2), wobei ebenfalls zwei Co-Kristallstrukturen der Mutanten H365N (3.2 Å) und H369M (3.2 Å) erhalten werden konnten.

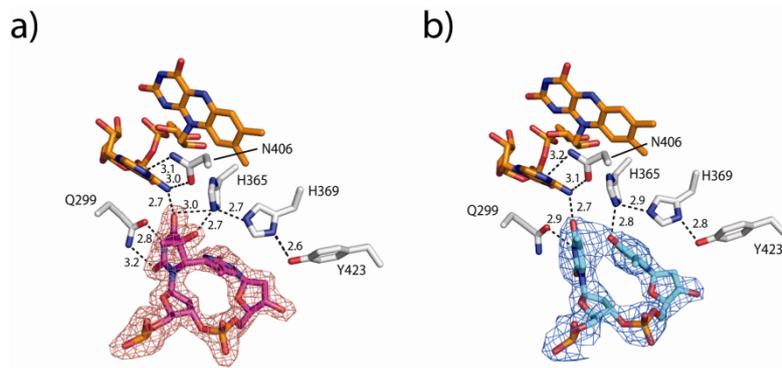


Abb. 2: Strukturelle Einsicht in die aktive Tasche der (6-4)-Photolyase. a) und b) Differenz-Fo-DFc-Elektronendichtekarte des Schadens nach „*simulated annealing*“ vor (a, Schaden in pink) und nach der Reparatur (b, TpT in cyan) berechnet ohne die jeweiligen Atome, konturiert bei 3σ . Der Cofaktor FAD ist in orange und ausgewählte Aminosäurereste in grau abgebildet.

In keiner der Co-Kristallstrukturen konnten Hinweise auf den angenommenen viergliedrigen Übergangszustand gefunden werden, so dass unter Einbeziehung der Mutationsstudien ein neuer Reparaturmechanismus postuliert wurde. Als zentrales Intermediat wird hierbei ein Radikal am C5 des Pyrimidinrings postuliert, wobei diese These durch Reparatorexperimente mit einem U(6-4)T-Schaden weiter gestützt werden konnte.

Durch die Verwendung des modifizierten T(6-4)C*-Schadens und der folgenden Umwandlung in den T(Dew)C*-Schaden, konnte zudem erstmals experimentell nachgewiesen werden, dass die Reparatur der Dewar Valenz-Isomere über die entsprechenden (6-4)-Schäden als Intermediat verläuft. Durch Reparatorexperimente mit der H365N Mutante und der oxidierten Form der (6-4)-Photolyase konnte diese Isomerisierung als ein Elektronentransfer katalysierter Prozess identifiziert werden. Die in diesem Zusammenhang erhaltenen Co-Kristallstrukturen des T(6-4)C*- (2.0 Å) und des T(Dew)C*-Schadens (2.3 Å) zeigten dabei keine großen Änderungen zu dem unmodifizierten T(6-4)C-Schaden auf.

Nach den strukturbioologischen und mechanistischen Untersuchungen konnte schließlich noch die Frage des zweiten Cofaktors der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* geklärt werden. Rekonstitutionsversuche mit den vier in Frage kommenden Cofaktoren FAD, FMN, MTHF und F_0 haben dabei in UV- und Fluoreszenzmessungen gezeigt, dass nur das F_0 von dem Enzym gebunden wurde. Aktivitätsstudien mit dem mit F_0 rekonstituierten Enzym haben dabei einen Anstieg der Reparatur um den Faktor 5 ergeben, wobei ebenfalls eine Kristallstruktur mit dem gebundenen Cofaktor erhalten werden konnte (2.1 Å). Der Cofaktor konnte zusätzlich durch Extraktion direkt aus Fruchtfliegen in *D. melanogaster* nachgewiesen werden.

II. Summary

It is known that the UV components of sunlight harm DNA and produce a plethora of different DNA photoproducts. These arising cytotoxic and mutagenic lesions are predominantly the cyclobutane pyrimidine dimers (CPD lesions), (6-4) photolesions and its Dewar valence isomer. Today there is no doubt about the direct connection of these lesions and the incidence of skin cancer. All living organisms exposed to sunlight have developed a multi functional repair system during evolution in order to protect themselves from the negative influence of photolesions. There is for example the excision repair system of damaged DNA or a direct repair pathway. The latter form of repair is called photoreactivation and is performed by DNA photolyases. These photolyases paradoxically use UV-A/B or blue light (300 – 500 nm) to revert pyrimidine dimers into the undamaged bases. Photolyases are highly selective enzymes and can be classified according to their substrate specificity into CPD and (6-4) photolyases.

In the past years the CPD lesion together with the CPD photolyase emerged as a model system for investigations of formation and repair of DNA photoproducts. Therefore the repair mechanism or cofactor composition of CPD photolyases is well understood. In contrast, there was almost nothing known about (6-4) lesions and their photolyases. Due to the analogy to CPD photolyases a similar repair mechanism was postulated for the (6-4) photolyases. However a critical four-membered ring intermediate (oxetane or azetidene) could never be experimentally detected and was consequently questioned. To clarify this question of (6-4) lesion recognition and repair by (6-4) photolyases, the (6-4) lesion had to be synthesized in sufficient quantities for biochemical and structural experiments.

The present work describes a method, which enables isolation of sufficient amounts of DNA containing a (6-4) lesion by direct irradiation of oligonucleotides at 254 nm in an oxygen-free environment.

With the (6-4) lesion in hand it was possible to obtain a co-crystal structure of the (6-4) lesion containing DNA in complex with the (6-4) photolyase for the first time (see Figure 1).

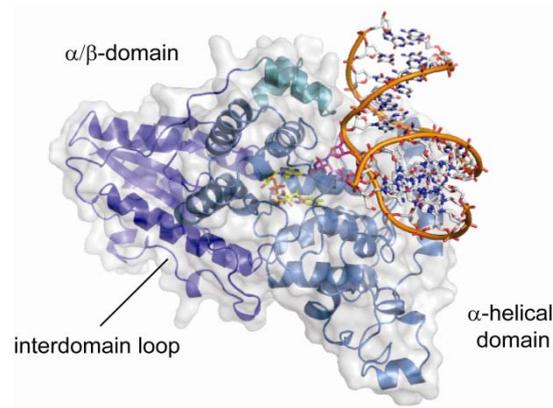


Fig. 1: Crystal structure of the (6-4) photolyase from *D. melanogaster* in complex with the T(6-4)T lesion with a semitransparent protein surface. The α -helical domain is shown in cyan and the α/β domain in blue. The T(6-4)T lesion and the FAD cofactor are shown in pink and in yellow, respectively.

The crystal structure of the T(6-4)T lesion in complex with the (6-4) photolyase from *D. melanogaster* diffracted to a resolution of 2.0 Å and showed a typical photolyase architecture with a N-terminal α/β domain, a C-terminal α -helical domain and an interdomain loop. For lesion recognition, the (6-4) photolyase opens the double strand completely at the site of the lesion and translocates the (6-4) lesion by almost 180 ° into the active site of the enzyme. After sodium dithionite reduction and irradiation with white light the repair could additionally be performed in the crystals, thus a structure (2.7 Å) with the undamaged bases in the active site could be obtained (Figure 2b). In addition, another structure with the T(6-4)C lesion in complex with the photolyase showed no differences compared to the T(6-4)T structure.

Regarding the obtained structural information and further mutational studies, the catalytically essential triad His365-His369-Tyr423 could be characterized after some additional activity determinations of the mutants (see Figure 2). Two different crystal structures of the mutants H365N (3.2 Å) and H369M (3.2 Å) were obtained.

1. Einleitung

1.1 DNA und DNA-Schäden

Eine der wohl bedeutendsten Entdeckungen des letzten Jahrhunderts war die Entschlüsselung der DNA-Struktur durch *Watson* und *Crick* im Jahre 1953.^[1] Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht aus den vier Nucleosiden 2'-Desoxyadenosin (**A**), 2'-Desoxycytidin (**C**), 2'-Desoxyguanosin (**G**) und Thymin (**T**), welche spezifische Wasserstoffbrückenbindungen mit den komplementären Basen eingehen und schließlich die charakteristische DNA-Doppelhelix ausbilden.^[2, 3] Nicht zuletzt durch die Arbeiten von *Watson* und *Crick* wissen wir heute, dass die DNA der Träger der genetischen Information ist und nahezu von allen Lebewesen, ausgenommen von einigen Viren, zu diesem Zweck verwendet wird.^[4, 5] Die Abfolge der Nucleobasen **A**, **C**, **G** und **T** spielt hierbei eine entscheidende Rolle, da der Aufbau aller Proteine und RNA-Bausteine und folglich des gesamten Organismus durch deren Abfolge bestimmt wird.

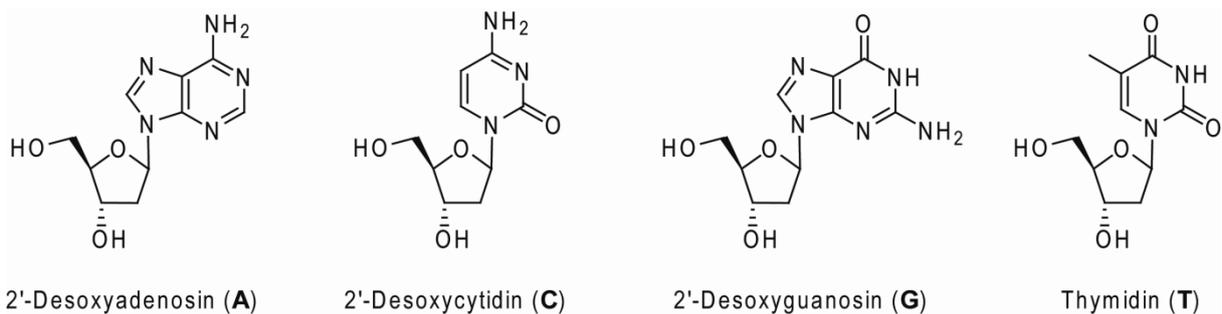


Abb. 3: Die vier Nucleoside der DNA.

Seit längerem ist schon bekannt, dass externe Einflüsse wie zum Beispiel ionisierende Strahlung, UV-Strahlung und toxische Chemikalien (z.B. alkylierende Reagenzien) die DNA schädigen und folglich die genetische Integrität beeinflussen können.^[6-9] Zusätzlich zu den bereits genannten Faktoren ist die DNA selbst unter physiologischen Bedingungen ständig spontanen Veränderungen, wie zum Beispiel der Transformation von Cytosin zu Uracil durch Deaminierung^[10] oder dem Verlust von Purinen durch Hydrolyse der Bindung zwischen Zucker und Phosphatrückgrat ausgesetzt.^[11, 12] Darüberhinaus sind stoffwechselbedingte, reaktive Spezies wie zum Beispiel *reactive oxygen species* (ROS) und *reactive nitrogen*

1. Einleitung

species (RNS) potentiell gefährliche Substanzen für die DNA.^[13] Alles in allem führt dies Schätzungen zu Folge, zu $10^4 - 10^6$ Schäden pro Zelle pro Tag.^[14] Hierbei können die Schäden an einzelnen Basen oder Nukleosiden, an mehreren Nukleosiden gleichzeitig oder aber auch am Zucker-Phosphatrückgrat der DNA auftreten. Je nach Art der Schädigung der DNA, können die Schäden in unterschiedlichste Klassen eingeteilt werden, wobei die am häufigsten auftretenden, die sogenannten oxidativen Schäden,^[15] UV-Schäden,^[16] *bulky adducts*^[17] sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche^[18] sind (siehe Abbildung 4).

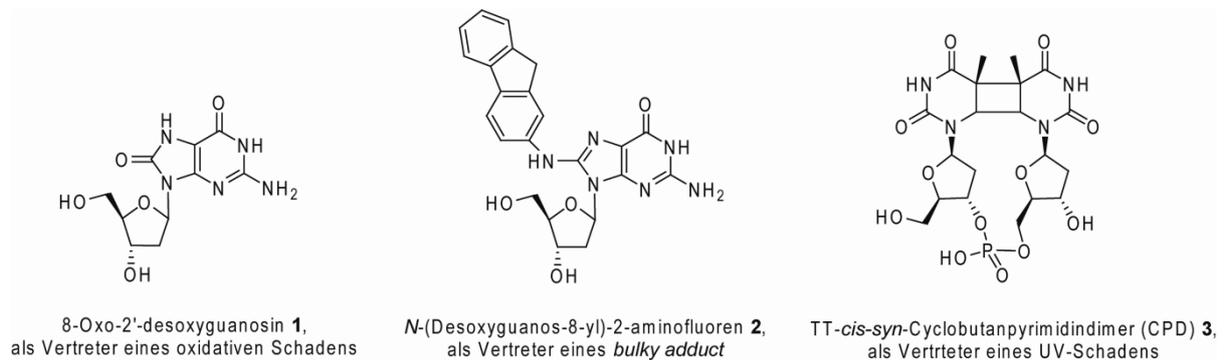


Abb. 4: Beispiele einiger häufig auftretender DNA-Schäden.

Unabhängig von der Art und Häufigkeit der Schäden, haben sie einen mutagenen und teils zytotoxischen Einfluss auf die Zelle. Die Basis hierfür ist eine fehlerhafte Transkription bzw. Replikation oder ein Replikationsstopp. Für alle Lebewesen ist es daher wichtig, die DNA vor etwaigen Schädigungen und dem daraus resultierenden Verlust genetischer Informationen zu schützen und zu bewahren. Im Laufe der Evolution hat sich ein beachtliches Repertoire an DNA-Reparatursystemen entwickelt, welches in der Lage ist, die entstandenen DNA-Schäden zu erkennen und wieder zu beseitigen, um die genetische Integrität aufrechtzuerhalten.

1.2 DNA-Reparatursysteme

Um die zahlreich entstehenden DNA-Schäden reparieren zu können, besitzt jedes Lebewesen einen enorm leistungsfähigen, komplexen und flexiblen Reparaturapparat. Im Großen und Ganzen verfügt eine Zelle über vier unterschiedliche Reparaturmechanismen, welche spezifisch die unterschiedlichen DNA-Veränderungen beheben können (Abbildung 5). Hier wären zum Einen die Exzisionsreparatursysteme *base excision repair* (BER), *nucleotide excision repair* (NER) sowie *mismatch repair* (MMR) und zum Anderen die Reparatur durch homologe DNA-Rekombination zu nennen.^[19-22] Zusätzlich zu den eben genannten Reparaturmechanismen können Schäden auch durch direkte Reversion in die intakten Basen beseitigt werden (siehe Kapitel 1.4).

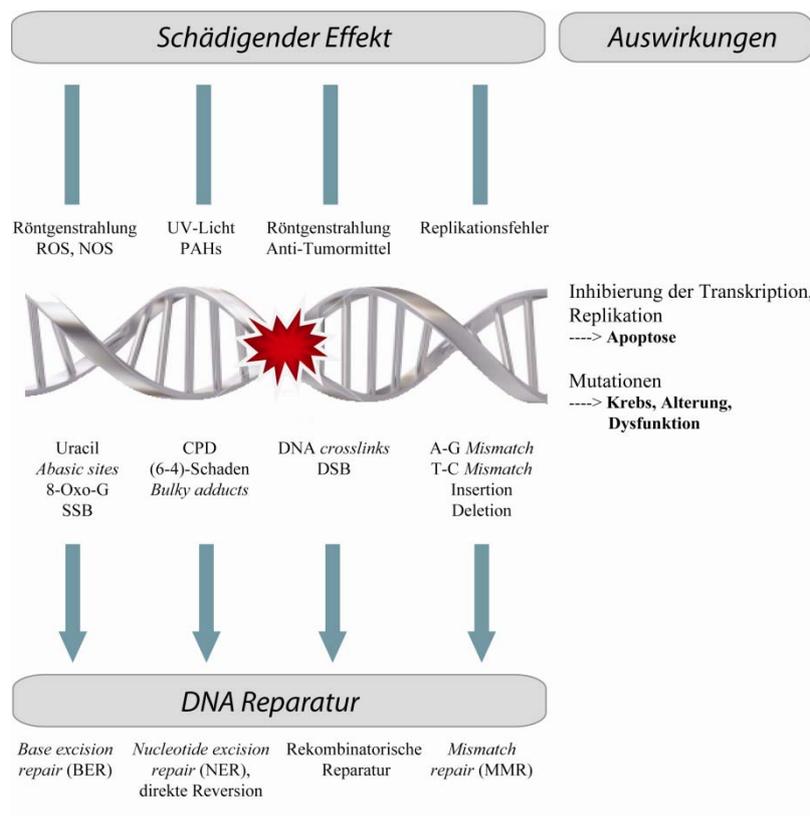
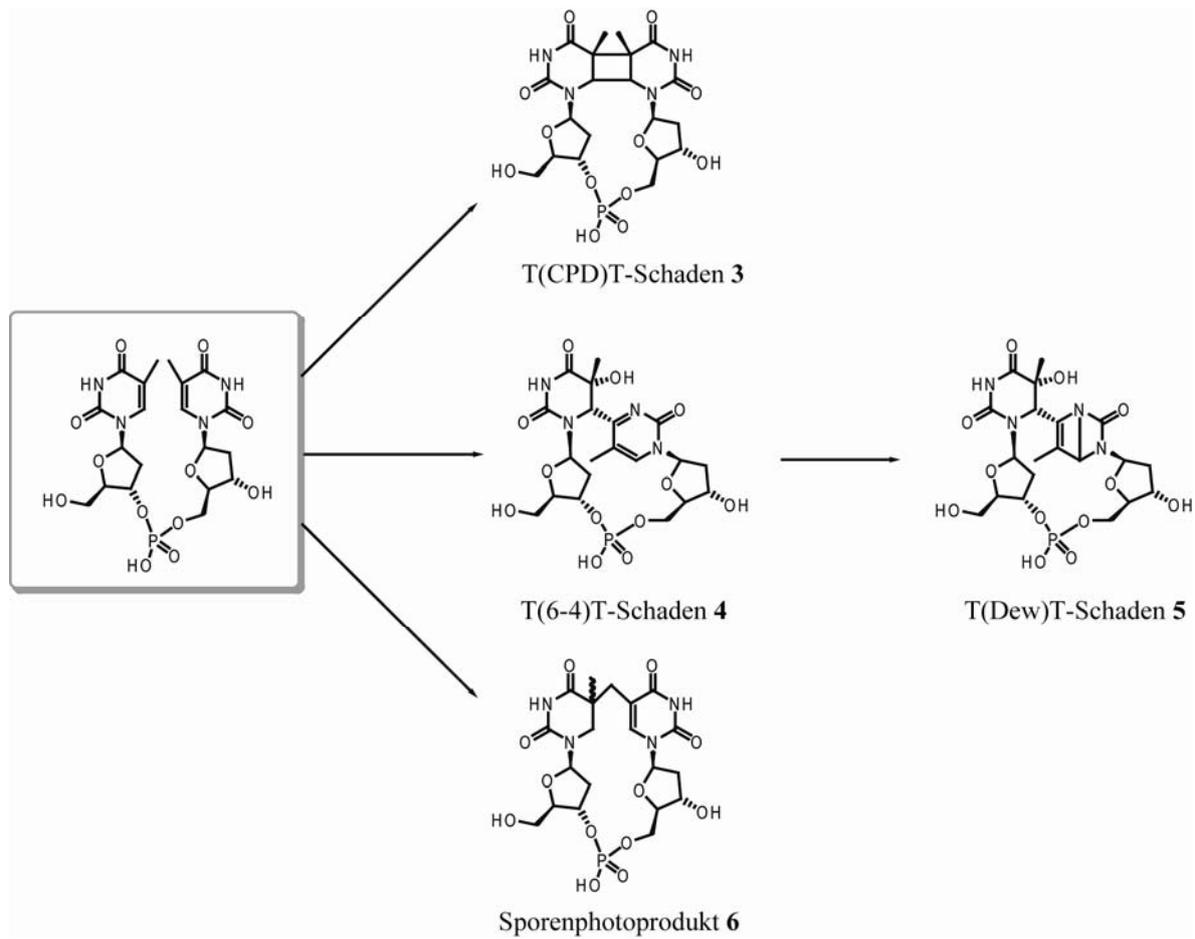


Abb. 5: Ursachen und entsprechende Reparaturmechanismen von DNA-Schäden sowie deren möglichen Auswirkungen auf die Zelle. PAH = polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, SSB = *single strand break*, DSB = *double strand break*.

MMR bietet die Möglichkeit, Fehlpaarungen während der Replikation zu beheben, wobei es sich bei einer Fehlpaarung eigentlich nicht um einen DNA-Schaden handelt, da ein intaktes Nukleotid eingebaut worden ist, jedoch an der falschen Stelle. Anhand von NER kann eine große Vielfalt an DNA-Schäden, wie zum Beispiel UV-induzierte Photoschäden (CPD **3**, (6-4)-Schaden **4**) oder Adduktschäden (*N*-(Desoxyguanos-8-yl)-2-aminofluoren **2**) behoben werden, indem die schadhafte Nukleotide großzügig entfernt und durch intakte wieder ersetzt werden. BER Enzyme reparieren hauptsächlich oxidative Schäden wie zum Beispiel 8-Oxo-G **1**, indem nur das geschädigte Nukleotid entfernt und ersetzt wird. Doppelstrangbrüche und DNA *crosslinks* werden über homologe DNA-Rekombination wieder behoben.

1.3 DNA-Photoschäden

In Anbetracht der immer besser werdenden Nachweistechnologien in den letzten Jahren, konnten seit den ersten Hinweisen bezüglich des Einflusses elektromagnetischer Strahlung verschiedener Wellenlängen auf Nukleinsäuren,^[23-25] erhebliche Fortschritte erzielt werden. Es konnten seitdem etliche DNA-Photoschäden charakterisiert und teilweise isoliert werden, welche durch den UV-Anteil des Sonnenlichts entstehen.^[16, 26] Die Natur der dabei entstehenden DNA-Photoschäden hängt stark von der Wellenlänge der einstrahlenden Photonen, welche die Zelle treffen, ab.^[27] UV-Licht wird hierbei entsprechend dem Wellenlängenbereich in einen UV-A (320 nm – 400 nm), einen UV-B (280 nm – 320 nm) und einen UV-C (100 nm – 280 nm) Anteil unterteilt.^[28] Unter den Bedingungen der UV-B und UV-C Strahlung, ist die wohl wichtigste ablaufende photochemische Reaktion die Dimerisierung zweier benachbarter Pyrimidinbasen über eine $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition (Schema 1). Hierbei entstehen hauptsächlich die sogenannten Cyclobutanpyrimidindimere (CPD-Photoschäden, **3**), die Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidindimere ((6-4)-Photoschäden, **4**), deren Folgeprodukte, die Dewar Valenz-Isomere ((Dew)-Photoschäden, **5**) und das allerdings nur in Sporen vorkommende Sporenphotoprodukt (**6**).



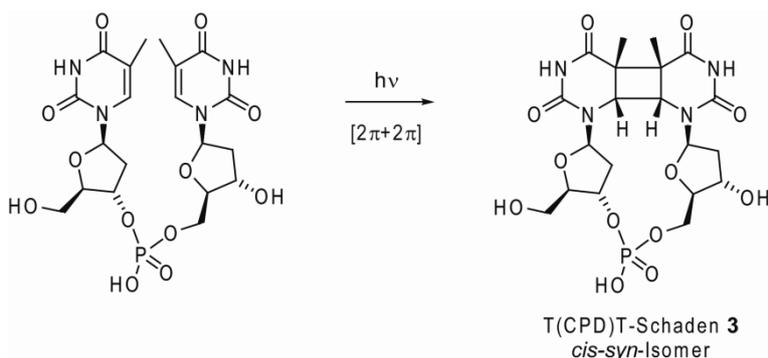
Schema 1: Hauptsächlich entstehende DNA-Photoschäden aus einer TpT-Sequenz.

Aufgrund des Absorptionsmaximums der Nukleinsäuren um 260 nm, absorbiert DNA zwar extrem schwach UV-A Strahlung, jedoch regt der UV-A Anteil endogene Chromophore wie zum Beispiel Riboflavine oder Porphyrine an, wobei reaktiver Singulett-Sauerstoff produziert wird, welcher spezifisch Guanine angreift und schädigt.^[29, 30] Die aus diesen Photooxidationsprozessen resultierenden oxidativen Schäden tragen somit zur Schädigung der Zelle bei, jedoch kann man den prozentualen Anteil verglichen mit den Pyrimidindimerschäden vernachlässigen.^[31] Im Bereich der UV-C Strahlung treten darüberhinaus noch einige weitere photochemische Reaktionen auf, wie zum Beispiel die Bildung von diversen DNA-Hydraten aus Thymin und Cytosin,^[26] der $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition zwischen zwei Adeninen^[32] bzw. zwischen einem Thymin und einem Adenin.^[33] Bedenkt man allerdings, dass der UV-C Anteil der Sonne nahezu vollständig von der Ozonschicht abgefangen wird, so haben die eben genannten Schäden nur einen geringen Anteil an der gesamten Schädigung der DNA durch UV-Licht.

In bakteriellen Sporen^[34] tritt noch ein weiterer Photoschaden auf, welcher als Sporenphotoprodukt bekannt ist. Sporen enthalten eine große Menge Dipikolinsäure, wodurch die DNA weitestgehend dehydratisiert, durch so genannten *small acid soluble proteins* (SASPs) verpackt vorliegt.^[35] Dies hat zur Folge, dass eben nicht mehr die bekannten CPD- und (6-4)-Schäden entstehen, sondern hauptsächlich das Sporenphotoprodukt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den typischen Bedingungen des Sonnenlichts, (welches aus 0.3 % UV-B (> 290 nm), 4.7 % UV-A, 40 % sichtbarem Licht und 55 % Infrarotstrahlung besteht)^[36] der relativ geringe UV-B Anteil größtenteils für die biologisch relevanten Effekte verantwortlich ist.

1.3.1 Cyclobutanpyrimidindimer (CPD-Photoschaden)

Aufgrund der relativ leichten Zugänglichkeit des bereits vor 50 Jahren erstmals isolierten *cis,syn*-Cyclobutanpyrimidindimers (CPD-Schaden, **3**),^[37] entwickelte sich dieser Photoschaden in den Folgejahren zu einer Modellverbindung für Untersuchungen zur Entstehung und Reparatur von UV-induzierten DNA-Schädigungen. Formal betrachtet entsteht der Schaden durch eine photochemische $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition zwischen den jeweiligen C5-C6 Doppelbindungen zweier benachbarter Pyrimidinbasen (Schema 2).



Schema 2: Photochemische Bildung des CPD-Schadens **3**.

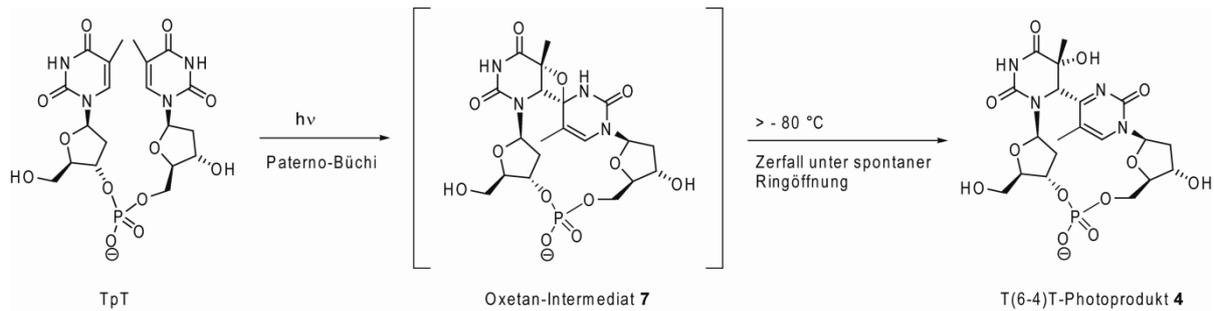
Mit 70 – 80 % an der Gesamtmenge der UV-Schäden, stellt der CPD-Schaden den mit Abstand am meist auftretenden DNA-Photoschaden dar.^[38, 39] Aufgrund der vorgegebenen Konformation der Basen in der DNA-Doppelhelix (*anti* um die glykosidische Bindung) entsteht dabei von den vier möglichen Isomeren (*cis-syn*, *cis-anti*, *trans-syn* und *trans-anti*) nahezu ausschließlich das in Schema 2 dargestellte *cis-syn*-Isomer.^[40, 41] Hierbei hat sich gezeigt, dass unter UV-B Strahlung oder Belichtung mit simuliertem Sonnenlicht (4.6 % UV-B und 95.4 % UV-A)^[28] TT und TC Sequenzen die photoreaktivsten Stellen sind, wobei CT und CC Sequenzen deutlich geringere Mengen an CPD-Schäden hervorrufen. Durch quantitative HPLC-MS/MS Studien konnte eine Bildungstendenz der CPD-Schäden erstellt werden, wobei sie in folgender Reihenfolge $5\text{'-T=T-3}' > 5\text{'-T=C-3}' > 5\text{'-C=T-3}' > 5\text{'-C=C-3}'$ abnimmt.^[42, 43]

Obwohl durch die kovalente Verknüpfung zweier Pyrimidine ein sterisch relativ anspruchsvoller DNA-Schaden entsteht, so konnte an einer Kristallstruktur eines Oligonukleotides mit einem zentralen CPD-Schaden gezeigt werden, dass dies nur zu einer relativ geringen Verzerrung der DNA-Struktur führt.^[44] Die DNA-Doppelhelix weist hierbei einen Knick von etwa 30 ° auf, wobei die Basenpaarungen geschwächt, jedoch noch aufrecht erhalten werden. In UV-Denaturierungsexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass ein CPD-Schaden die DNA um etwa 6 kJ/mol destabilisiert.^[45] Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass ein CPD-Dimer einen relativ geringen Einfluss auf die Struktur der DNA-Doppelhelix nimmt, speziell im Vergleich zu anderen Schäden wie den *bulky adducts* oder den ebenfalls durch UV-Licht induzierten (6-4)-Schäden.

1.3.2 (6-4)-Photoschäden

Die (6-4)-Schäden stellen mit 20 – 30 % aller UV-Licht induzierten Schäden nach den CPD-Dimeren die zweithäufigsten DNA-Photoschäden dar.^[38, 39] Analog den CPD-Schäden, entsteht der (6-4)-Schaden ebenfalls durch eine photochemische $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die C5-C6 Doppelbindung des 5'-Thymins mit der C4-Carbonylgruppe des 3'-Thymins in einer Paternó-Büchi-Reaktion reagiert und als Intermediat das Oxetan **7** entsteht (Schema 3).^[46]

1. Einleitung



Schema 3: Bildung des (6-4)-Schadens über das Oxetan-Intermediat **7**.

Unter physiologischen Bedingungen in der Zelle ist dieses Oxetan-Intermediat nicht stabil. Es zerfällt spontan unter Ringöffnung in den entsprechenden T(6-4)T-Schaden. Im Falle eines 3'-Cytosins ist zuerst die Isomerisierung in das Imin-Tautomer von Nöten, da erst dann die Reaktion der C5-C6-Doppelbindung des 5'-Thymins mit der C4-N4-Doppelbindung des 3'-Cytosins möglich ist. Das dabei entstehende Azetidin-Intermediat zerfällt ebenso wie das Oxetan-Intermediat in den entsprechenden T(6-4)C-Schaden.^[46-48] Im Gegensatz zu den CPD-Dimeren zeichnet sich bei den (6-4)-Schäden eine andere Bildungstendenz ab. Sowohl unter UV-B Strahlung als auch durch Belichtung mit simuliertem Sonnenlicht ist der T(6-4)C-Schaden das am meist gebildete (6-4)-Photoprodukt, gefolgt von dem T(6-4)T-Schaden. (6-4)-Schäden mit einem 5'-Cytosin sind zwar bekannt, jedoch entstehen sie sehr selten. Generell lässt sich somit sagen, dass das Verhältnis der CPD-Dimere zu den (6-4)-Schäden in etwa 3:1 beträgt, wobei bei den CPD-Dimeren der T(CPD)T-Schaden und bei den (6-4)-Photoschäden der T(6-4)C-Schaden überwiegt.^[28, 42, 43, 49, 50]

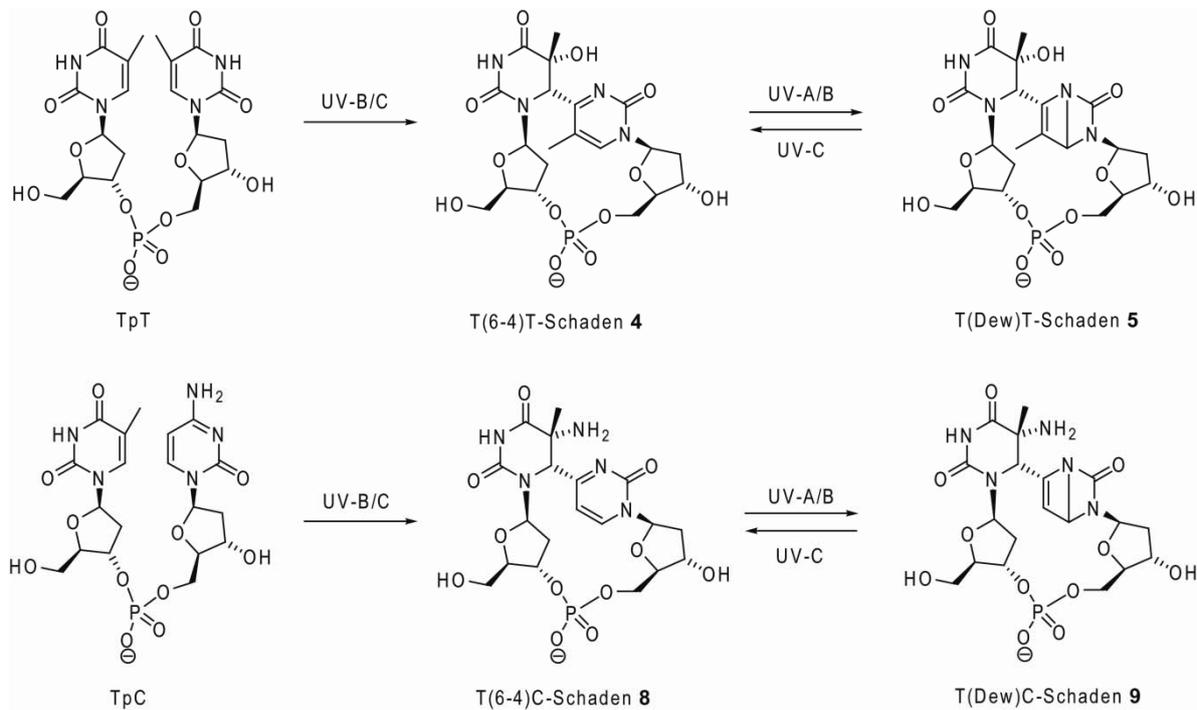
Verglichen mit den CPD-Dimeren scheinen die (6-4)-Schäden allerdings einen wesentlich größeren Einfluss auf die DNA-Struktur zu haben. Zwar konnte bislang noch keine Kristallstruktur eines Oligonukleotides mit einem (6-4)-Schaden erhalten werden, jedoch deuten sowohl UV-Denaturierungsversuche als auch NMR-Studien auf eine deutliche Verzerrung der DNA-Doppelhelix hin.^[51-55] Ein (6-4)-Schaden destabilisiert demnach einen Doppelstrang um etwa 24 kJ/mol,^[51] wobei NMR-Untersuchungen gezeigt haben, dass dabei ein Knick an der Stelle des Schadens von etwa 44 ° entsteht.^[54] Dieser große Knick in der DNA-Doppelhelix sowie die Umwandlung des 3'-Pyrimidins in einen Pyrimidinonring scheint die normale Watson-Crick Basenpaarung deutlich zu stören, da gegenüber dem 3'-Pyrimidinonring anstatt einem Adenin (im Falle des T(6-4)T-Schadens), nun ein Guanin energetisch bevorzugt ist.^[54] Hierbei entstehen zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen

dem O²-Carbonyl des 3'-Pyrimidinon und der Imino- bzw. Aminogruppe des gegenüberliegenden Guanins. Diese potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren die globale DNA-Doppelhelix und stellen die durch den Schaden stark verzerrte typische B-DNA-Form wieder her. Diese strukturelle Besonderheit dient möglicherweise als Erklärung dafür, dass während der *translesion DNA synthesis* (TLS) bevorzugt ein Adenin gegenüber dem 5'-T bzw. ein Guanin gegenüber dem 3'-T des T(6-4)T-Schadens eingebaut wird. Dies führt schließlich zu den prädominanten C→T Transitionen, welche mutagene Auswirkungen auf die Zelle haben können.^[56, 57]

1.3.3 Dewar Valenz-Isomere

Die Umwandlung der (6-4)-Schäden in ihre entsprechenden Dewar Valenz-Isomere durch Bestrahlung mit UV-A/B Licht ist schon seit langem bekannt und wurde parallel zu der Entdeckung der (6-4)-Schäden untersucht (siehe Schema 4).^[58] Hierbei spielt das Absorptionsmaximum der (6-4)-Schäden, welches für den T(6-4)T Schaden bei 325 nm^[58-60] und für den T(6-4)C-Schaden bei 314 nm liegt,^[61] eine entscheidende Rolle. Erst in dem Wellenlängenbereich von $\lambda > 300$ nm ist die Entstehung der Dewar Valenz-Isomere durch die daraus zugängliche Isomerisierung der entsprechenden (6-4)-Schäden möglich, wobei unter reiner UV-C Strahlung bzw. im niederwelligen UV-B Bereich nahezu keine Dewar-Bildung zu beobachten ist.^[50] Die Quantenausbeute für die Umwandlung der (6-4)-Schäden T(6-4)T **4** und T(6-4)C **8** in ihre entsprechenden Dewar Valenz-Isomere **5** und **9** liegt bei $\phi = 0.020$ bzw. 0.018.^[62] Durch Belichtung der Dewar-Schäden mit UV-C Licht, kann man selbige wieder in die entsprechenden (6-4)-Schäden überführen, jedoch ist die Reaktion dabei deutlich verlangsamt.^[63]

1. Einleitung



Schema 4: Darstellung der Isomerisierung der beiden (6-4)-Photoprodukte T(6-4)T und T(6-4)C in die beiden Dewar Valenz-Isomere T(Dew)T und T(Dew)C unter UV-A/B Strahlung, sowie Rückreaktion unter UV-C Strahlung.

Analog den (6-4)-Schäden, ist von den Dewar-Isomeren ebenfalls keine Kristallstruktur eines DNA-Strangs mit dem (Dew)-Schaden zugänglich.

Den Dewar Valenz-Isomeren wurde in den anfänglichen Untersuchungen bezüglich der Entstehung und Auswirkung diverser DNA-Photoschäden nur wenig Interesse entgegengebracht, da die meisten Untersuchungen früher mit UV-C bzw. UV-B Strahlung durchgeführt worden sind. Erst in den letzten Jahren wurden immer mehr Experimente mit simuliertem Sonnenlicht bzw. mit natürlichem Sonnenlicht durchgeführt.^[28, 36, 49, 50] Hierbei hat sich herausgestellt, dass neben den hauptsächlich gebildeten T(CPD)T- und T(CPD)C-Schäden die beiden Dewar Valenz-Isomere T(Dew)C und T(Dew)T erheblich an Gewicht gegenüber ihren entsprechenden (6-4)-Schäden gewinnen und folglich biologisch relevante Photoschäden darstellen, welche es in Zukunft besser zu untersuchen und zu verstehen gilt. Zurzeit geht man jedoch von einem ähnlichen Einfluss der Dewar-Isomere auf die DNA-Doppelhelix wie bei den (6-4)-Schäden aus, wobei abermals der Einbau eines Guanins gegenüber dem 3'-T des Schadens dem Einbau eines Adenins (bei dem T(Dew)T-Schaden) energetisch bevorzugt ist.^[51, 52, 64, 65]

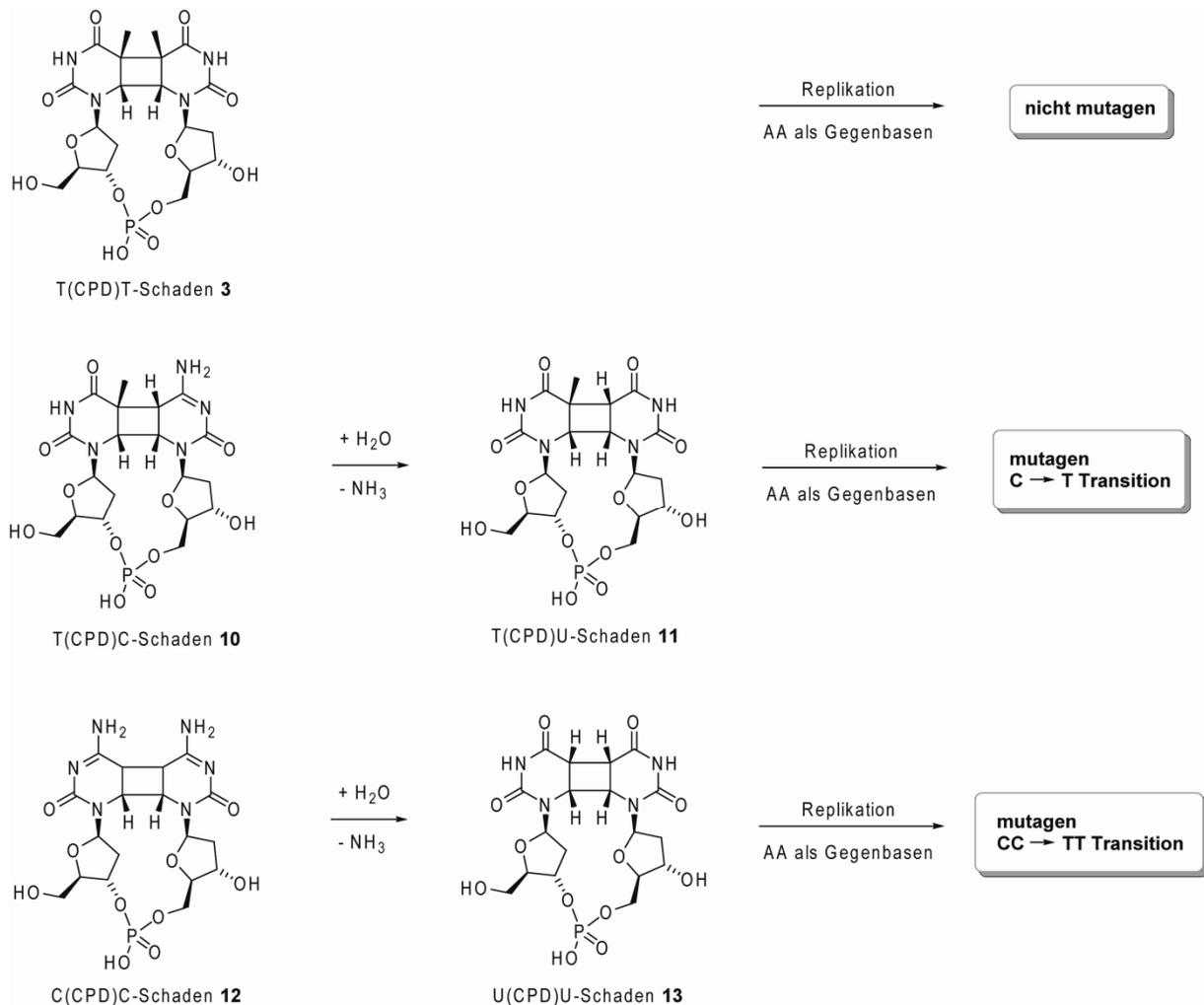
1.3.4 Mutagenität von DNA-Photoschäden

Es besteht kein Zweifel, dass die Auswirkung von UV-Strahlung auf humane Zellen im Zusammenhang steht mit dem Auftreten von Hautkrebs, wie zum Beispiel dem Plattenepithel- und dem Basalkarzinom.^[66, 67] Als Beweis dafür, dass der UV-Anteil des Sonnenlichts Hautkrebs hervorruft, gilt die seltene Erbkrankheit *xeroderma pigmentosum*, welche durch die mangelnde Möglichkeit von Zellen, DNA Photoschäden reparieren zu können, charakterisiert ist.^[68-70] Patienten mit eben diesem Gendefekt leiden unter einer erheblichen Sensitivität gegenüber Sonnenlicht und haben ein um den Faktor 1000 höheres Risiko an Hautkrebs zu erkranken.

Durch die Analyse der in dem p53 Tumorsuppressor-Gen von Hautkrebszellen gefundenen Mutationen, konnten tiefere Einblicke in die Beteiligung der unterschiedlichen DNA-Photoschäden an der Entstehung von Hautkrebs gewonnen werden. Die Sequenzierung des p53 Gens aus Plattenepithel- und Basalkarzinomen hat gezeigt, dass eine große Anzahl an C→T Transitionen sowie CC→TT Tandemmutationen gefunden werden konnten.^[71-74] Diese spezielle Verteilung der Transitionen gilt als spezielle Signatur der UV-Mutagenität und grenzt den Hautkrebs deutlich von anderen Krebsarten ab.

Um nun den genauen Einfluss der verschiedenen DNA-Photoschäden auf diese Transitionen charakterisieren zu können, darf man die CPD-Dimere, die (6-4)-Schäden und die Dewar Valenz-Isomere nicht allgemein betrachten. Vielmehr muss man hier die Schäden dahingehend unterscheiden, ob es sich um Thymin- bzw. um Cytosin-haltige Schäden handelt. Betrachtet man zum Beispiel die CPD-Dimere, so gelten die T(CPD)T-Schäden aufgrund ihres geringen Einflusses auf die DNA Doppelhelix als kaum mutagen.^[75, 76] Die T(CPD)C-Dimere haben allerdings einen hoch mutagenen Einfluss auf die Zelle, da Cytosin-haltige CPD-Dimere leicht (innerhalb weniger Stunden)^[77] zur Deaminierung und folglich zur Bildung von Uracil neigen (siehe Schema 5). Aufgrund der Ähnlichkeit des Uracils mit dem Thymin hat dies wiederum zur Folge, dass Polymerasen bevorzugt ein Adenin gegenüber dem Uracil einbauen, so dass T(CPD)C- **10** und C(CPD)C-Dimere **12** in T(CPD)U- **11** und U(CPD)U-Dimere **13** umgewandelt werden, was das erhöhte Auftreten von C→T und CC→TT Transitionen in Hautkrebszellen erklärt.^[67]

1. Einleitung



Schema 5: Deaminierung von Cytosin-haltigen CPD-Dimeren.

Die (6-4)-Schäden und ihre Dewar Valenz-Isomere gelten im Allgemeinen beide als hochmutagen, wobei die Thymin-haltigen Schäden aufgrund des bevorzugten Einbaus eines Guanins eine höhere Mutagenität als die entsprechenden Cytosin-haltigen Schäden aufweisen.^[57, 76, 78, 79] Nichtsdestotrotz treten hier ebenso gehäuft C \rightarrow T Transitionen auf, so dass man diese Klasse der Photoschäden bezüglich der Beteiligung an der Entstehung von Hautkrebs nicht vernachlässigen darf.

Um nun eine genaue Einschätzung des Einflusses der DNA-Photoschäden auf die Schädigung einer Zelle treffen zu können, muss man neben der Mutagenität der Schäden selbst, auch die prinzipielle Möglichkeit der Reparatur der Schäden in Betracht ziehen. Hierbei konnte zum Beispiel bei transgenen Mäusen gezeigt werden, dass CPD-Dimere wesentlich langsamer als (6-4)-Schäden repariert werden.^[80] Vergleicht man die Reparatureffizienz der (6-4)-Schäden

mit den Dewar Valenz-Isomeren, so hat sich bei belichteten CHO Zellen gezeigt, dass die Reparatur der Dewar-Isomere schneller von Statten geht, als die der (6-4)-Schäden.^[28]

Wie eben gezeigt, kann man nicht allgemein alle (6-4)-Schäden, ihre Dewar-Isomere sowie die CPD-Dimere als hochmutagene und karzinogene DNA-Photoschäden bezeichnen, wie es jedoch des Öfteren in der Literatur getan wird. Stattdessen muss man für eine genaue Betrachtung jeden Schaden von Fall zu Fall einzeln beurteilen. Dabei spielen schließlich mehrere Faktoren, wie zum Beispiel die auftretende Häufigkeit, die Mutagenität und die Möglichkeit der Reparatur des speziellen Schadens eine tragende Rolle, wobei die auftretenden DNA-Photoschäden wohl im Kollektiv für ihre negativen Auswirkungen auf eine Zelle verantwortlich sind und man sich nicht auf ein oder zwei Schäden beschränken kann.

1.4 Reparatur von DNA-Photoschäden

1.4.1 Einteilung der Photolyasen und Cryptochrome

Im Verlaufe der Evolution haben alle Organismen ein oder mehrere Reparaturmechanismen entwickelt, um sich vor den mutagenen und cytotoxischen Auswirkungen der UV-Schäden zu schützen (siehe Abbildung 5). Im Allgemeinen wird die Reparatur der DNA-Photoschäden in Eukaryoten, Archaea und Bakterien weitestgehend über *nucleotide excision repair* gewährleistet, wobei Menschen ausschließlich diese Form der Reparatur nutzen. Neben dieser Art der Reparatur existiert allerdings noch ein weiterer Reparaturmechanismus, welcher Photoreaktivierung genannt wird.^[46] Bei dieser lichtabhängigen Form der Reparatur, werden die geschädigten DNA-Basen nicht ausgeschnitten und durch intakte Basen ersetzt, sondern es erfolgt die direkte Reversion der geschädigten in die intakten Basen. Dieser Vorgang wird den sogenannten DNA-Photolyasen zugeschrieben und wurde erstmals von *Kelner* Ende der 40er Jahre entdeckt.^[81, 82] Er konnte damals zeigen, dass mit UV-Strahlung belichtete Bakterienkolonien eine deutlich höhere Überlebensrate aufwiesen, wenn sie in einem zweiten Belichtungsschritt wieder mit sichtbarem Licht bestrahlt worden sind.

Heutzutage gelten Photolyasen als eines der bestuntersuchteten Reparatursysteme, wobei man die Photolyasen aufgrund ihrer charakteristischen Substratspezifität in drei unterschiedliche Gruppen einteilt. Die nahezu in allen Lebewesen verbreiteten CPD-Photolyasen^[83] sind hocheffiziente und selektive Enzyme, welche für die Reparatur der CPD-

Schäden verantwortlich sind.^[46, 84-86] Aufgrund von Sequenzidentitäten lassen sich die CPD-Photolyasen noch in drei weitere Subfamilien unterteilen, den Klasse I, den Klasse II und den kürzlich identifizierten Klasse III DNA-Photolyasen,^[87] aus denen sich die pflanzlichen Cryptochrome entwickelt haben.^[88]

Eine weitere Gruppe bilden die sogenannten (6-4)-Photolyasen, welche die spezifische Reparatur der (6-4)-Schäden gewährleisten. Im Gegensatz zu den CPD-Photolyasen sind die (6-4)-Photolyasen weniger verbreitet und konnten bisher nur in einigen Eukaryoten gefunden werden.^[89]

Aus diesen Photolyasen hat sich eine spezielle Gruppe der Blaulicht-Photorezeptoren entwickelt, die sogenannten Cryptochrome, welche in der Natur weitverbreitet sind.^[46] Die Cryptochrome weisen eine hohe Sequenzhomologie zu den Photolyasen auf, jedoch besitzen sie keinerlei Reparaturaktivität gegenüber DNA-Photoschäden. Vielmehr agieren sie in vielen Organismen in der Photoerkennung und Signaltransduktion von blauem Licht. In Pflanzen zum Beispiel, sind sie an der lichtabhängigen Entwicklung selbiger beteiligt,^[90] wohingegen ihnen bei Säugern eine zentrale Aufgabe bei der Regulierung des circadianen Rhythmus eingeräumt wird.^[91] Eine weitere Untergruppe der Cryptochrome stellen die Cryptochrom-DASH Proteine (DASH = *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Homo*) dar, welche 2003 erstmals von *Getzoff* und Mitarbeitern beschrieben worden sind.^[92] Kürzlich erschienene Ergebnisse haben gezeigt, dass es sich hierbei um Einzelstrang spezifische CPD-Photolyasen handelt,^[93, 94] wobei ihre genaue Aufgaben noch nicht eindeutig geklärt und verstanden worden sind.

Eine besondere Stellung unter den Photolyasen nimmt die Sporenphotoprodukt-Lyase ein, welche spezifisch das Sporenphotoprodukt **6** repariert.^[95] Bei diesem Enzym handelt es sich nämlich um die einzigste UV-Schaden reparierende Komponente, welche eine lichtunabhängige Reparatur durchführen kann. Als zweiten Cofaktor benötigt die Sporenphotoprodukt-Lyase hierbei *S*-Adenosylmethionin (SAM), wobei die eigentliche Reparatur schließlich über einen radikalischen Mechanismus verläuft.^[95]

1.4.2 CPD-Photolyase

Photolyasen sind monomere Enzyme mit einem typischen Molekulargewicht von 55 – 65 kDa (450 – 550 Aminosäurereste) und zwei nicht-kovalent gebundenen Cofaktoren. Einer der Cofaktoren ist dabei immer das redoxaktive FAD **14**. Der zweite Cofaktor ist entweder ein Methenyltetrahydrofolat (MTHF, **15**)^[96, 97] oder ein 8-Hydroxy-7,8-dimethyl-5-desazaflavin (8-HDF bzw. F₀, **16**).^[98, 99] In seltenen Fällen konnte ein Flavinmononukleotid (FMN **17**) beziehungsweise ein weiteres FAD als zweiter Cofaktor identifiziert werden (Abbildung 6).^[100, 101] Je nach Vorhandensein des zweiten Cofaktors können die Photolyasen somit noch in eine Folat- und in eine Desazaflavinklasse eingeteilt werden.^[102]

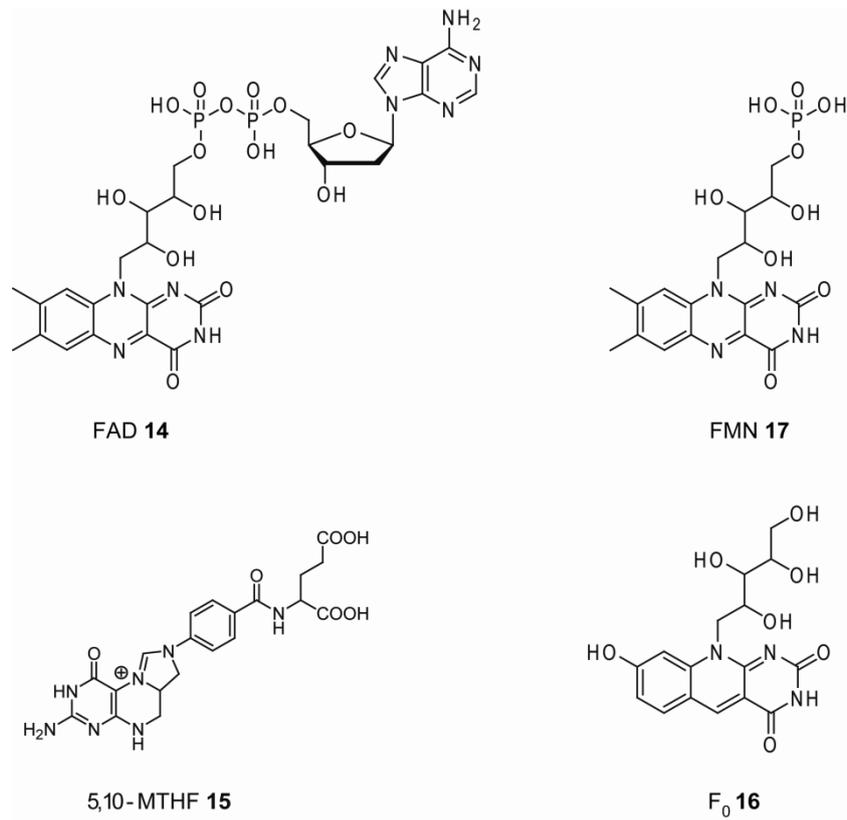


Abb. 6: Strukturformeln der Cofaktoren in Photolyasen.

Das FAD ist dabei ein essentieller Cofaktor sowohl für die Bindung an geschädigte DNA als auch für die katalytische Aktivität.^[103, 104] Der zweite Cofaktor (F₀ oder MTHF) ist dagegen nicht notwendig für die Katalyse und hat auch keinen Effekt auf die spezifische Enzym-Substrat-Bindung. Es hat sich jedoch gezeigt, dass unter reduzierter Blaulichteinstrahlung der zweite Cofaktor die Reparaturrate um den Faktor 10 – 100 steigern kann. Dies liegt an dem höheren Extinktionskoeffizienten und dem höheren Absorptionsmaximum des zweiten Cofaktors, verglichen mit dem zweifach-reduzierten FADH⁻, welches die aktive Form des FADs in der Katalyse ist.^[46]

1.4.2.1 Strukturelle Einblicke in die CPD-Photolyase

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie aller zu der Folat- als auch Desazaflavinklasse gehörigen Photolyasen in dem C-terminalen Bereich (150 Aminosäurereste), wurde diese Region bereits früh als mögliche FAD-bindende Domäne eingestuft.^[105] Diese Vermutung konnte schließlich eindeutig durch die von *Deisenhofer* und *Sancar* erhaltenen Kristallstruktur der CPD-Photolyase aus *E. coli* bestätigt werden (PDB Eintrag: 1DNP).^[106] Die globale Struktur der Photolyase gliedert sich dabei in eine N-terminale α/β -Domäne (AS 1 – 131), eine C-terminale α -helikale Domäne (AS 204 – 469) und einen Interdomänen *Loop*, welcher die beiden anderen Domänen miteinander verbindet (Abbildung 7). Im Gegensatz zu dem zweiten Cofaktor MTHF, welcher an der Proteinoberfläche gebunden ist, sitzt das FAD tief im Inneren des Enzyms. Der katalytisch essentielle Cofaktor ist dabei in einer U-förmigen Konformation gebunden.

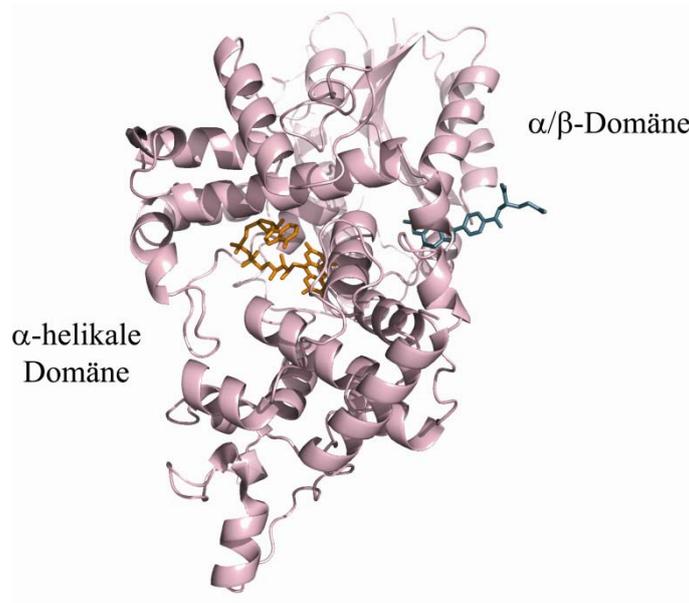


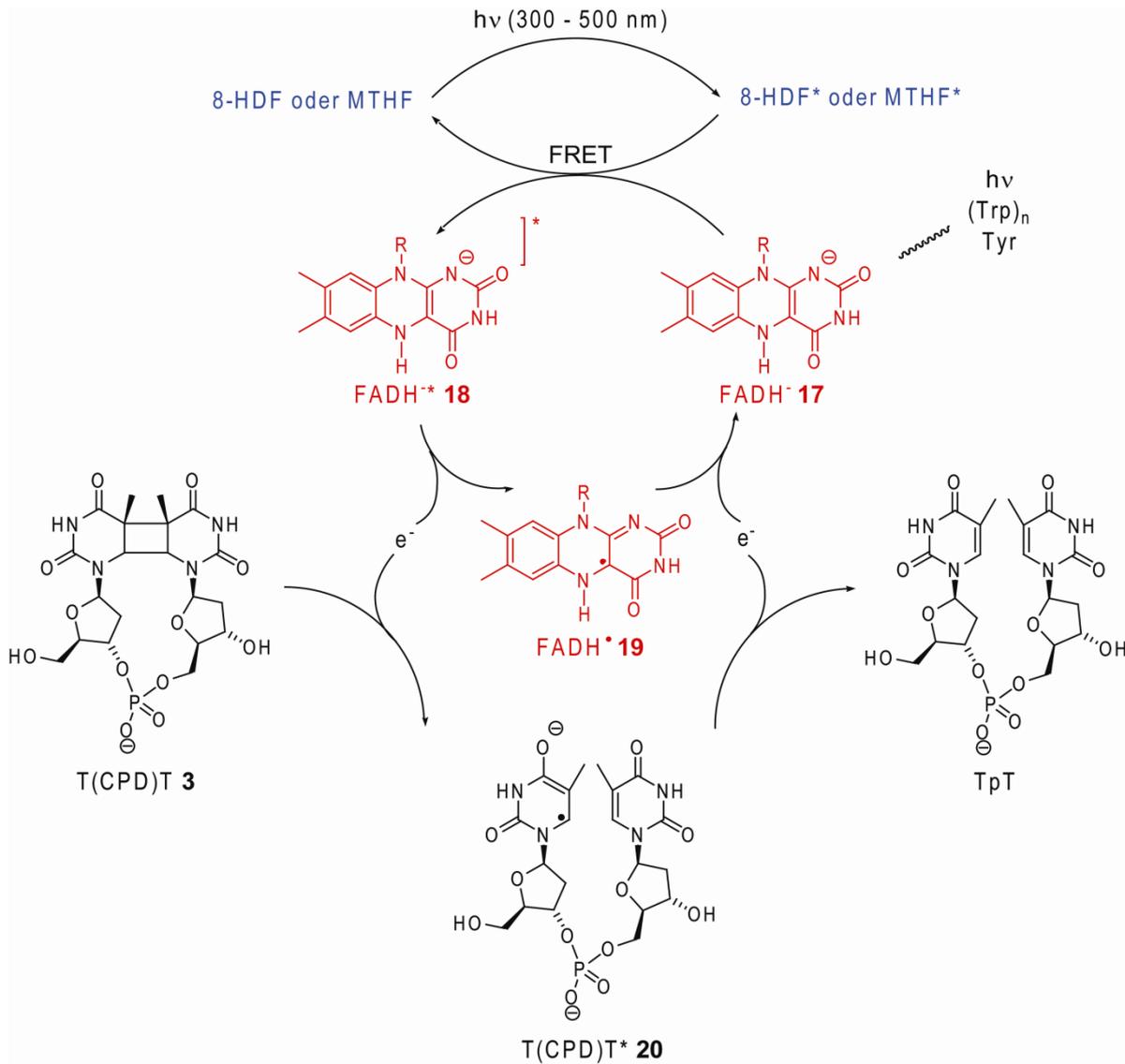
Abb. 7: Kristallstruktur der CPD-Photolyase aus *E. coli*. Die beiden Cofaktoren FAD und MTHF sind in orange bzw. cyan dargestellt.

Diese allgemeine Architektur der Photolyasen konnte durch eine weitere Kristallstruktur (PDB Eintrag: 1QNF) einer CPD-Photolyase aus *A. nidulans* bestätigt werden.^[107] Hier hat sich allerdings gezeigt, dass der zweite Cofaktor, in diesem Fall F_0 , im Gegensatz zu dem MTHF in der Photolyase aus *E. coli* nicht an der Oberfläche liegt, sondern ebenso wie das FAD im Inneren des Enzyms gebunden ist. Der für die Förster-Energieübertragung relevante Abstand zwischen den beiden Chromophoren ist jedoch ähnlich (*E. coli* Photolyase 16.4 Å, *A. nidulans* Photolyase 17.4 Å).

Im Jahr 2004 gelang es schließlich der Arbeitsgruppe *Carell* in Kooperation mit der Gruppe *Essen*, erstmals eine Co-Kristallstruktur einer CPD-Photolyase im Komplex mit einem *in situ* reparierten CPD-Schaden (PDB Eintrag: 1TEZ) zu erhalten und somit weitere Einblicke in die Schadenserkennung zu gewinnen.^[108] Wie bereits von den Apo-Enzym-Strukturen angedeutet, wird der Schaden dabei aus der DNA-Doppelhelix in eine dafür vorgesehene Tasche herausgedreht (*base flipping*). Dieser Vorgang ist notwendig, um schließlich die Elektronenübertragung und die daraus resultierende Reparatur gewährleisten zu können (siehe Schema 6 auf Seite 25).

1.4.2.2 Reparaturmechanismus der CPD-Photolyase

Der erste Schritt in der Reparatur von CPD-Schäden ist die Erkennung und Bindung des Dimers durch die CPD-Photolyase. Hierbei hat sich gezeigt, dass CPD-Photolyasen hoch spezifische und sequenzunabhängige Enzyme sind. Bei diesem ersten lichtunabhängigen Schritt konnte gezeigt werden, dass Photolyasen eine ähnlich hohe Affinität zu Einzel- bzw. Doppelstrang-DNA mit einem CPD-Schaden, aufweisen.^[109, 110] Die spezifische Bindungskonstante für das *cis-syn*-T(CPD)T-Dimer **3** in DNA liegt hier bei $K_S = 10^{-9}$ M, wobei die unspezifische Bindung von ungeschädigter DNA bei $K_{NS} \approx 10^{-4}$ M liegt. Nach der Bindung der geschädigten DNA erfolgt das Herausdrehen des Schadens in die aktive Tasche des Enzyms und folglich die Ausbildung eines stabilen Enzym-Substrat-Komplexes. Im nächsten Schritt erfolgt schließlich nach Absorption eines Photons durch den zweiten Cofaktor im UV-/Blaulicht-Bereich (300 – 500 nm), die Übertragung der Anregungsenergie nach Förster auf das deprotonierte und reduzierte FADH⁻ **17**, wobei für die Überführung des FAD in die katalytisch aktive FADH⁻ Form mehrere Tyrosin- und Tryptophanreste verantwortlich sind (Schema 6).^[46, 111, 112] Das daraus resultierende angeregte FADH* **18** injiziert dann ein Elektron in das LUMO des CPD-Dimers **3**, wobei das Dimerradikalanion **20** entsteht. Dieses Intermediat zerfällt schließlich spontan unter Ringöffnung und der Rückbildung der intakten Basen.^[113] Durch Rückübertragung des Elektrons auf das Flavin schließt sich letztendlich der Katalysezyklus wieder. Die Quantenausbeute für diese enzymkatalysierte und lichtabhängige $[2\pi+2\pi]$ Cycloreversion des CPD-Schadens liegt bei $\phi = 0.70 - 0.98$,^[46] wobei dies ein sehr hoher Wert für Enzyme ist. Der in Schema 6 dargestellte Mechanismus gilt heute als gesichert, nicht zuletzt durch unzählige Untersuchungen mit Modellverbindungen.^[114-120]



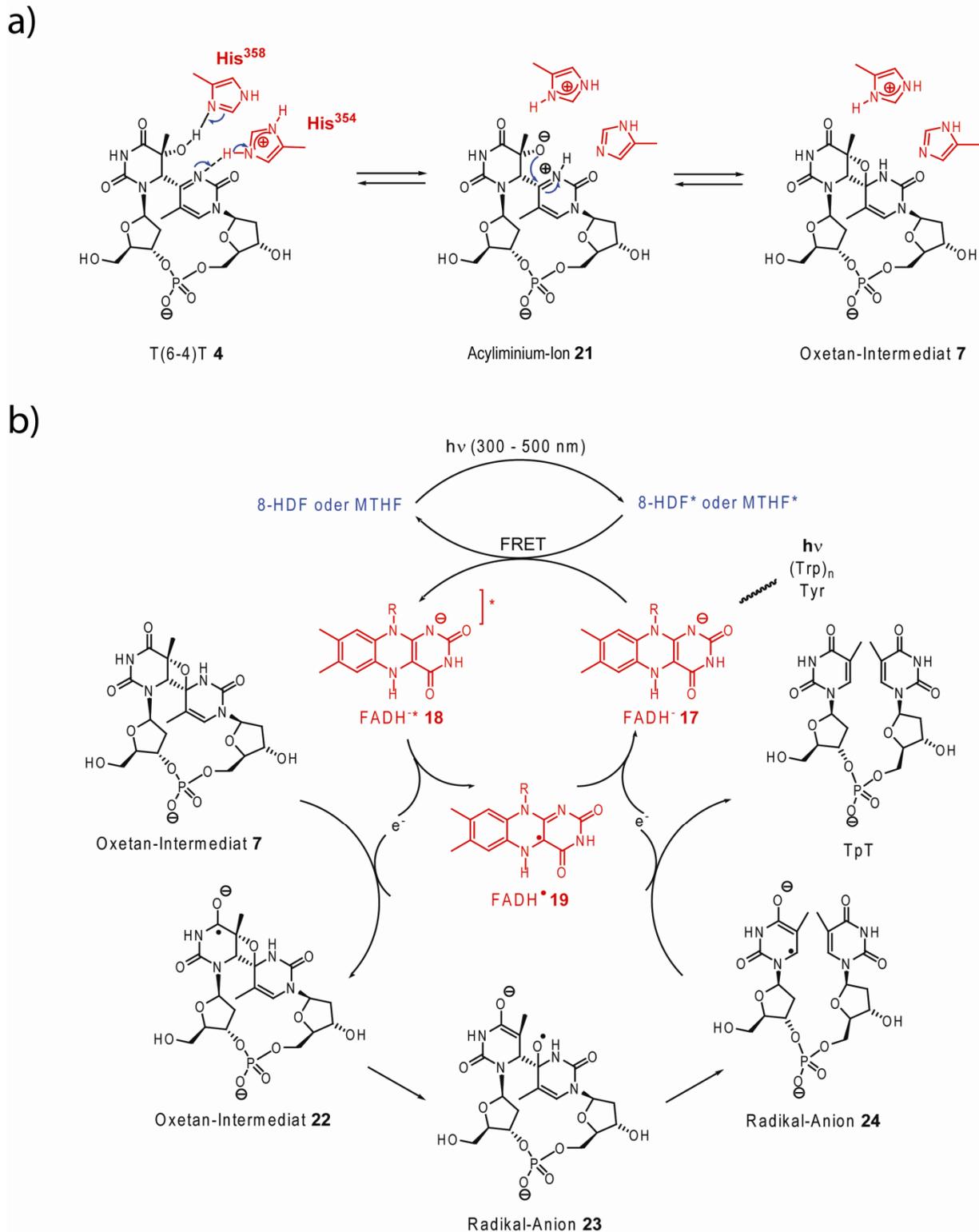
Schema 6: Reaktionsmechanismus der CPD-Photolyase. FRET = *fluorescence resonance energy transfer*, R = 5'-(ADP)-ribityl.

1.4.2 (6-4)-Photolyase

Bis Anfang der 90er Jahre dachte man, dass die *nucleotide excision repair* die einzige Methode für die Reparatur von (6-4)-Photoschäden ist.^[121, 122] Nomura und Mitarbeiter gelang es jedoch 1993 erstmals eine Photolyase aus *D. melanogaster* zu isolieren und zu charakterisieren, welche spezifisch die direkte Reparatur eines (6-4)-Schaden durchführen konnte.^[123] Im Gegensatz zu den CPD-Photolyasen, sind die (6-4)-Photolyasen weniger verbreitet und konnten bis heute erst in einigen weiteren höheren Organismen, wie zum

Beispiel *A. thaliana* und *X. leavis* nachgewiesen werden.^[89, 124-128] Analog den CPD-Photolyasen besitzen die (6-4)-Photolyasen ebenso zwei kovalent gebundene Cofaktoren. Zum einen das katalytisch essentielle FADH⁻ und zum anderen vermutlich MTHF, da weder *D. melanogaster* noch andere Eukaryoten (in denen bisher (6-4)-Photolyasen gefunden werden konnten) in der Lage sind, das Desazaflavin F₀ selbst zu synthetisieren.^[129]

Da bis dato keine Kristallstruktur einer (6-4)-Photolyase alleine bzw. im Komplex mit einem (6-4)-Schaden erhalten werden konnte, wurde für die (6-4)-Photolyasen aufgrund der hohen Sequenzhomologie und der Verwendung der gleichen Cofaktoren, ein ähnlicher Reparaturmechanismus wie im Fall der CPD-Photolyasen postuliert (siehe Schema 7).^[38, 130] Hierbei unterscheiden sich die beiden Photolyasen in einem kritischen Schritt voneinander, da nach der Bindung des Schadens, so wurde postuliert, die (6-4)-Photolyasen den Schaden zuerst in ein Oxetan- bzw. Azetidin-Intermediat umwandeln müssen (Schema 7a). Semiempirische MO-Rechnungen haben gezeigt, dass dieser thermische Schritt für eine Enzym-katalysierte Reaktion energetisch sehr ungünstig (ca. 60 kJ/mol) ist.^[131] Diese Energie könnte jedoch durch zwei essentielle Histidine im aktiven Zentrum der Photolyase durch Ladungskontakte mit dem Schaden bereit gestellt werden.^[130]

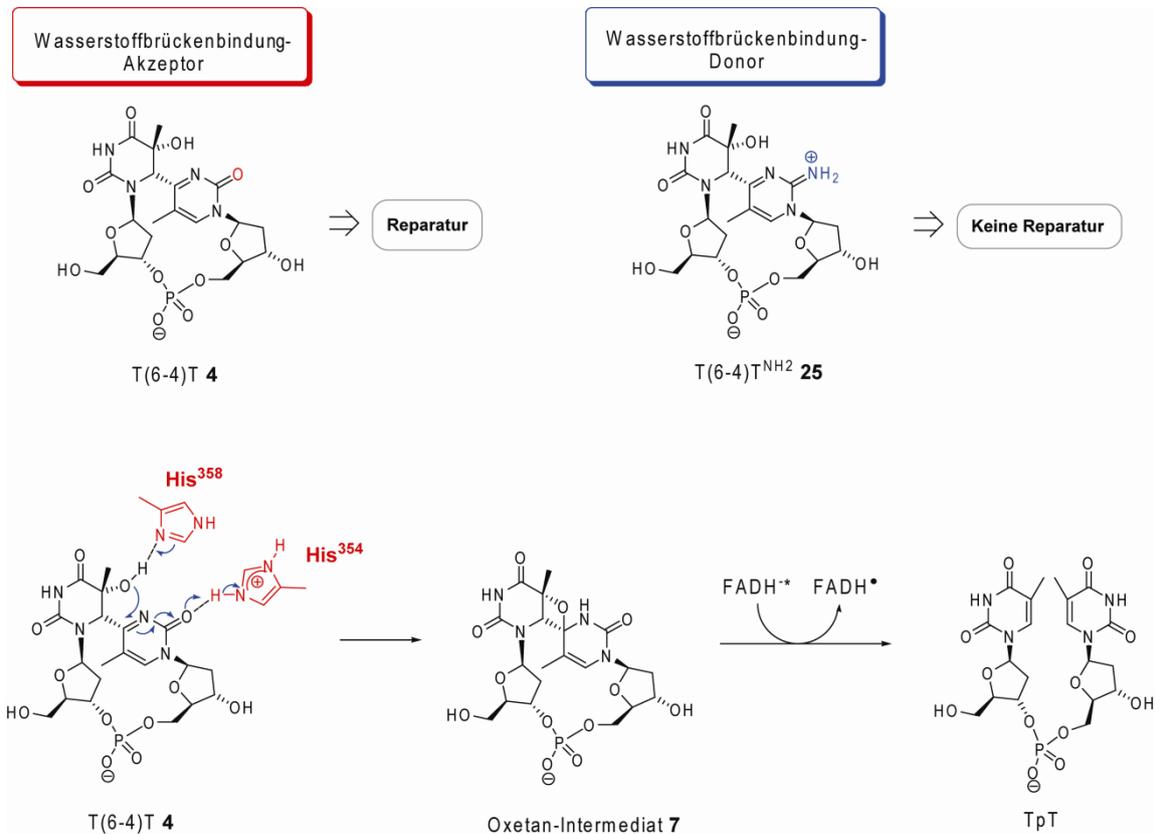


Schema 7: Postulierter Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyasen. His354 und His358 sind die für die Katalyse notwendigen Reste in der aktiven Tasche der (6-4)-Photolyase aus *X. leavis*.^[130] FRET = *fluorescence resonance energy transfer*, R = 5'-(ADP)-ribityl.

1. Einleitung

Die beiden Histidine H354 und H358 (im Fall der (6-4)-Photolyase aus *X. leavis*) könnten den (6-4)-Schaden dabei am N3 des 3'-Pyrimidinonrings protonieren bzw. eine starke Wasserstoffbrückenbindung ausüben, wobei das Acyliminium-Ion **21** entstehen würde. Dies würde es der relativ schwach nukleophilen OH-Gruppe ermöglichen, das hochreaktive Acyliminium-Ion unter der Ausbildung des Oxetan-Intermediats **7** angreifen zu können. Anschließend würde der Elektronentransfer von dem angeregten FADH* **18** auf das Oxetan-Intermediat **7** erfolgen, wobei das entstehende Radikal-Anion **24** nach Rücktransfer eines Elektrons in die intakten Basen zerfallen würde.

Neueste Ergebnisse der Gruppen *Iwai* und *Getzoff* mit einem (6-4)-Schaden-Analogen haben nun zu einer leichten Abwandlung des ursprünglich postulierten Oxetan-Mechanismus geführt.^[132] Unter der Verwendung des T(6-4)T^{NH2}-Schadens **25** konnten sie zeigen, dass das Schadensanalogon zwar mit einer ähnlich hohen Affinität wie der T(6-4)T-Schaden durch die (6-4)-Photolyase aus *X. leavis* gebunden wird, jedoch nicht mehr repariert werden kann. Dieses Resultat interpretieren sie schließlich dahingehend, dass nicht mehr das N3-Atom des 3'-Pyrimidinonrings eine Wechselwirkung mit dem Enzym eingeht, sondern die C2-Carbonylgruppe (siehe Schema 8).



Schema 8: Postulierte Wasserstoffbrückenbindung am C2-Carbonyl des 3'-Pyrimidinonrings.

1. Einleitung

Durch die Mutation der Carbonylgruppe in eine Iminiumgruppe, wird aus dem ursprünglichen Wasserstoffbrücken-Akzeptor ein Wasserstoffbrücken-Donor, so dass die zweite, für die Reparatur notwendige, Wasserstoffbrückenbindung zu dem Enzym nicht mehr ausgebildet werden kann.

In den letzten Jahren wurden zu dem postulierten Mechanismus der (6-4)-Photolyasen über einen viergliedrigen Übergangszustand etliche Studien durchgeführt,^[38, 112, 130, 131, 133-140] wobei jedoch immer noch Unklarheit über den genauen Mechanismus herrscht. Die Arbeitsgruppe *Carell* konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass ein deprotoniertes und reduziertes Flavin als Elektronendonator notwendig ist, um ein Oxetanmodell spalten zu können.^[112] Dementsprechend ist der zweite Schritt des postulierten Mechanismus, die Spaltung des Oxetan-Intermediats **7** durch reduktiven Elektronentransfer, prinzipiell möglich. Auf der anderen Seite sprechen Untersuchungen mit Modellverbindungen des (6-4)-Schadens gegen das Oxetan-Modell. So konnte zum Beispiel *Sancar* und *Taylor* zeigen, dass das *S*-Methylderivat mes⁵T(6-4)T **26** des (6-4)-Schadens durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* repariert werden kann, wenngleich die Reparatur auch stark vermindert ist (relative Quantenausbeute von $\phi = 0.5$, verglichen mit einer relativen Quantenausbeute von $\phi = 100$ für den T(6-4)T-Schaden). Das entsprechende Thioanalogon s⁵T(Thietan)T **27** des viergliedrigen Übergangszustandes (Abbildung 8), zeigte jedoch keine Bindung zu der (6-4)-Photolyase, wobei dies eindeutig gegen das Oxetan-Modell spricht.

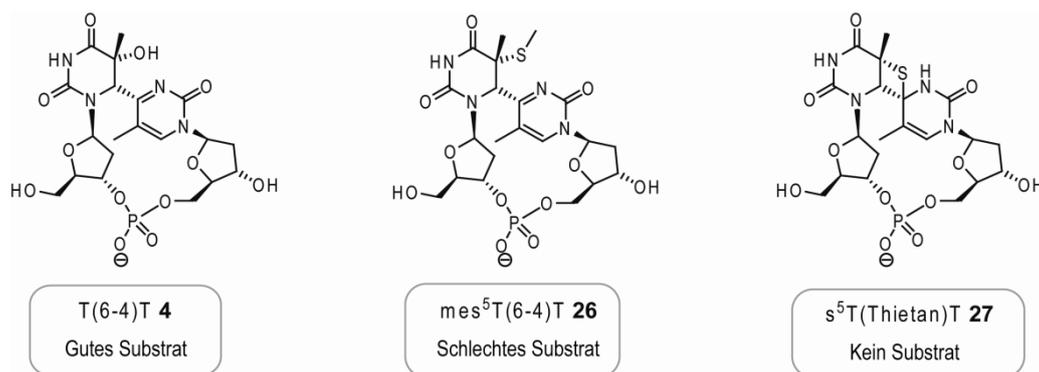


Abbildung 8: Modellverbindungen zur Untersuchung des Mechanismus der (6-4)-Photolyasen.

Alle momentan zugänglichen Daten aus der Literatur geben somit letztendlich nur Hinweise auf den Mechanismus der (6-4)-Photolyasen, wobei das Oxetan-Modell zu Beginn dieser Arbeit das wahrscheinlichste war, wenngleich es dafür auch keinen experimentellen Beweis gab. Zur endgültigen Klärung des Mechanismus bedurft es demnach noch weiterer Experimente, wobei speziell eine Co-Kristallstruktur einer (6-4)-Photolyase im Komplex mit einem (6-4)-Schaden dazu beitragen würde.

Neben dem bis heute noch ungeklärten Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyasen, geben selbige noch ein weiteres Rätsel auf. In der Literatur gibt es momentan unterschiedliche Meinungen bezüglich der Reparaturmöglichkeit der Dewar Valenz-Isomere durch die (6-4)-Photolyasen. Während *Sancar* und Mitarbeiter auf der einen Seite eine geringe Reparatur (Quantenausbeute lediglich nur 0.3 % ($\phi \sim 2 \times 10^{-3}$) verglichen mit dem T(6-4)T- und dem T(6-4)C-Schaden) des T(Dew)T-Schadens **5** durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* beobachten konnten,^[140] so haben Ergebnisse von *Todo* und *Iwai* mit der (6-4)-Photolyase aus *X. leavis* auf der anderen Seite genau das Gegenteil aufgezeigt.^[141, 142] Ob es sich bei den Ergebnissen von *Sancar* nun um etwaige Artefakte handelt oder ob die (6-4)-Photolyasen prinzipiell in der Lage sind, Dewar-Isomere reparieren zu können, muss in Zukunft noch geklärt werden. Momentan geht man bei der eventuellen Reparatur der Dewar Valenz-Isomere durch die (6-4)-Photolyasen jedoch davon aus, dass sie zuerst in ihre entsprechenden (6-4)-Isomere zurückgewandelt werden und schließlich ausgehend von den (6-4)-Schäden die Reparatur erfolgt.^[134]

Abschließend lässt sich sagen, dass die (6-4)-Photolyasen eine faszinierende Enzymklasse darstellen, welche knapp 20 Jahre nach ihrer ersten Entdeckung immer noch nicht im Detail verstanden worden sind.

2. Aufgabenstellung

Die Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht führt zur Bildung von DNA-Photoschäden, wobei hauptsächlich die Cyclobutanpyrimidindimere (CPD-Schäden, **3**) und die Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidondimere ((6-4)-Schäden, **4**) entstehen. Die Reparatur dieser Schäden ist dabei aufgrund ihres hoch-mutagenen Potentials unerlässlich. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die durch Photolyasen vermittelten Reparatursysteme, welche in der Lage sind, den CPD- bzw. (6-4)-Schaden direkt in die entsprechenden intakten Basen zu spalten. Während die Bildung und Reparatur des CPD-Schadens in den letzten Jahren ausgiebig mit biochemischen, physikalischen und kristallographischen Methoden untersucht und schließlich weitestgehend verstanden worden ist, so gab es relativ wenige Informationen über den (6-4)-Schaden, speziell über den Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyase. Dieses lückenhafte Verständnis lag wahrscheinlich an der komplizierten und ineffizienten Herstellung des (6-4)-Schadens im Vergleich zu dem CPD-Schaden, so dass sich dieser in den letzten Jahren als Modells substrat für Untersuchungen von DNA-Photoschäden entwickelt hat. Ziel dieser Arbeit war es, ausreichende Mengen an (6-4)-Schaden enthaltener DNA sowohl für biochemische als vor allem auch für strukturbiochemische Untersuchungen bereitzustellen. Eine solche Co-Kristallstruktur einer (6-4)-Photolyase im Komplex mit einem (6-4)-Schaden sollte es schließlich ermöglichen, die Frage nach dem häufig postulierten Oxetan- bzw. Azetidintermediat während der Reparatur klären zu können und erstmals tiefere Einblicke in die Schadenserkenkung und den Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyase auf atomarer Ebene gewinnen zu können. Hierbei sollte auf ein bestehendes Protokoll zur Bildung des (6-4)-Schadens durch direkte Belichtung von Oligonukleotiden mit UV-Licht zurückgegriffen und wenn möglich verbessert werden.

Durch die Belichtung der erhaltenen (6-4)-Schäden mit UV-Licht $\lambda > 300$ nm sollten zudem die entsprechenden Dewar Valenz-Isomere **5** hergestellt werden, da diese in der Literatur bisher größtenteils vernachlässigt worden sind, so dass hier durch biochemische und kristallographische Untersuchungen weitere Erkenntnisse bezüglich der Schadensbindung und Reparatur gewonnen werden sollten.

Desweiteren sollte durch Co-Kristallisations- und Rekonstituierungsexperimente mit unterschiedlichen Cofaktoren der noch unbekannt, zweite Cofaktor der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* charakterisiert und sein Einfluss auf die Reparaturaktivität des Enzyms untersucht werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Methoden zur Herstellung des (6-4)-Schadens

Im Jahre 1964 konnte der T(6-4)T-Schaden von *Johns* und Mitarbeitern erstmals isoliert werden,^[58] wobei *Varghese* und *Karle* 1968/69 die korrekte Struktur publizieren konnten.^[143, 144] Seitdem wurden enorme Anstrengungen unternommen, diesen neuartigen Photoschaden in effizienten Mengen zu isolieren und zu charakterisieren. Derartige Bemühungen wurden ebenso für den von *Varghese* und *Wang* 1967 erstmals isolierten T(6-4)C-Photoschaden unternommen.^[145] Anfang der 90er Jahre wurden die (6-4)-Schäden standardmäßig durch direkte Belichtung von kurzen Oligonukleotiden mit UV-Licht hergestellt, wobei diese Methode einige Nachteile aufweist. Die Methode war auf kurze Oligonukleotide (bis zu einem 11mer für den T(6-4)T-Schaden und einem 12mer für den T(6-4)C-Schaden)^[51, 57, 146] limitiert, da während der Belichtung einige andere DNA-Photoschäden entstanden, welche die Aufreinigung der DNA mit (6-4)-Schaden mittels HPLC erheblich erschwerten und schließlich zu geringen Ausbeuten führte. Um längere Stränge mit (6-4)-Schaden enthaltener DNA zu erhalten, musste man somit die erhaltenen kurzen Oligonukleotide mit der Templat vermittelten Ligation verlängern, wobei diese Methode relativ ineffizient und nicht ohne weiteres im großen Maßstab durchführbar ist. Da man aber für die meisten biochemischen und vor allem strukturbioologischen Untersuchungen längere DNA-Stränge in ausreichenden Mengen benötigt, konzentrierte sich die Forschung in den nächsten Jahren auf eine alternative Methode zur Herstellung des (6-4)-Photoproduktes. In diesem Zusammenhang gelang es *Iwai* und Mitarbeitern, einen T(6-4)T und T(6-4)C Phosphoramiditbaustein für die automatisierte DNA-Festphasensynthese zu synthetisieren.^[147-149] Diese Methode hat den großen Vorteil, dass man den (6-4)-Schaden an eine beliebige Stelle im DNA-Strang platzieren und man ausreichende Mengen an (6-4)-Schaden enthaltener DNA für biochemische und strukturbioologische Untersuchungen bereitstellen kann. Auf der anderen Seite ist die Synthese der Phosphoramiditbausteine sehr lang, kompliziert und die Effizienz unzufriedenstellend. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, welche es ermöglicht, ausreichende Mengen an DNA mit einem eingebauten (6-4)-Schaden bereit zu stellen. Hierbei sollte vor allem die einfache sowie schnelle Methode der direkten Belichtung von Oligonukleotiden optimiert werden, um sowohl biochemische als auch strukturelle Untersuchungen mit dem für den (6-4)-Schaden spezifischen Enzym (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* durchführen zu können.

3.1.1 Direkte Belichtung von Oligonukleotiden mit UV-Licht

Der große Vorteil der direkten Belichtung von Oligonukleotiden zur Herstellung von (6-4)-Schäden liegt in der Schnelligkeit und einfachen Durchführbarkeit des Experiments, verglichen mit der komplexen und zeitaufwendigen Synthese der Phosphoramiditbausteine. Der größte Nachteil hingegen ist die eingeschränkte Wahl der DNA Sequenz sowie die teilweise sehr komplizierte Aufreinigung der DNA Stränge mittels HPLC.

Als Ausgangspunkt zur Verbesserung der Methode diente die von *Taylor* und Mitarbeitern entwickelte Belichtung von kurzen Oligonukleotiden unter Schutzgasbedingungen.^[146] Hierbei wurde das Oligonukleotid 5'-AATTAA-3' in einer Petrischale in Wasser gelöst und in einer Argontüte belichtet, wobei der DNA Strang 5'-AAT(6-4)TAA-3' mit dem (6-4)-Schaden in einer Ausbeute von 3.4 % erhalten werden konnte. Ein möglicher Grund für die geringe Ausbeute an (6-4)-Schaden enthaltener DNA könnte hierbei die mangelnde Schutzgastechnik gewesen sein, so dass eine größere Menge an Photooxidationsprodukten entstanden sind, welche möglicherweise die Bildung des (6-4)-Schadens unterdrückt haben. Vorarbeiten von *U. Henneke*^[150] im Arbeitskreis *Carell* haben gezeigt, dass die Belichtung unter anaeroben Bedingungen in einer *glove box* (Sauerstoffgehalt < 3 ppm) deutlich bessere Ausbeuten an der gewünschten (6-4)-enthaltenen DNA liefert. Für diese Zwecke wurde eine Belichtungsapparatur angefertigt und die Belichtungen fortan in einer *glove box* durchgeführt (siehe Abbildung 9).



Abb. 9: Verwendete Belichtungsapparatur in der *glove box*.

Für die Belichtung wurde **ODN 1** (5'-AATTAA-3') in entgastem *ddH₂O* gelöst (40 – 50 μ M) und in eine Petrischale gegeben. Diese wurde in einem Abstand von 10 cm zur Lampe (254 nm, *Vilber Lourmat VL-215C*, 2 x 15 W 254 nm Röhren) platziert. Zur Kühlung der Lösung wurde die Petrischale während der gesamten Belichtung auf ein Kühlaggregat gestellt. Um die optimale Belichtungsdauer für die Formation des T(6-4)T-Photoproduktes zu erhalten, wurde nach dem Beginn der Belichtung in regelmäßigen Zeitabständen eine Probe entnommen und mit analytischer *reversed-phase* HPLC analysiert (Abbildung 10).

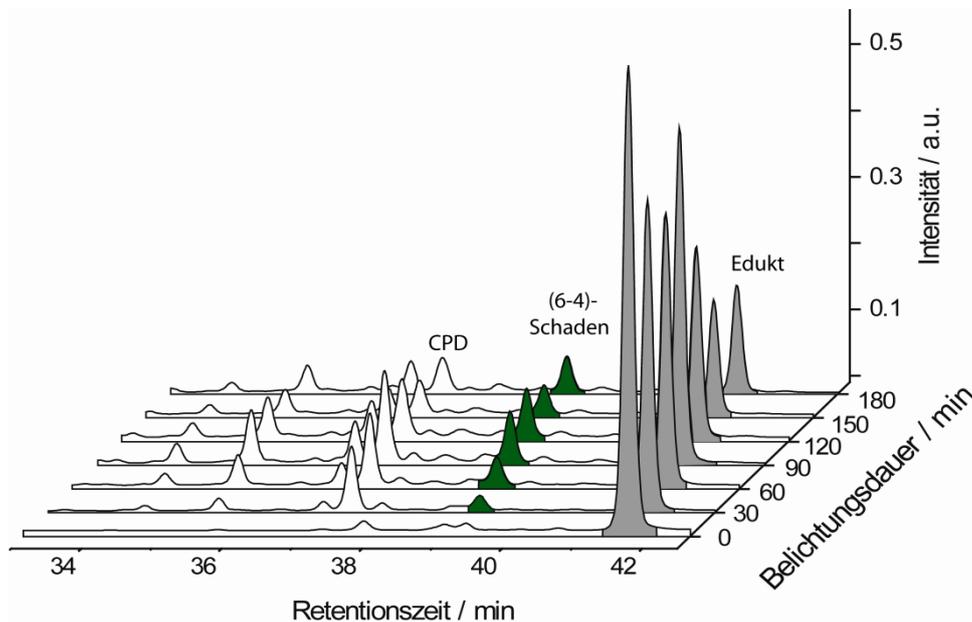
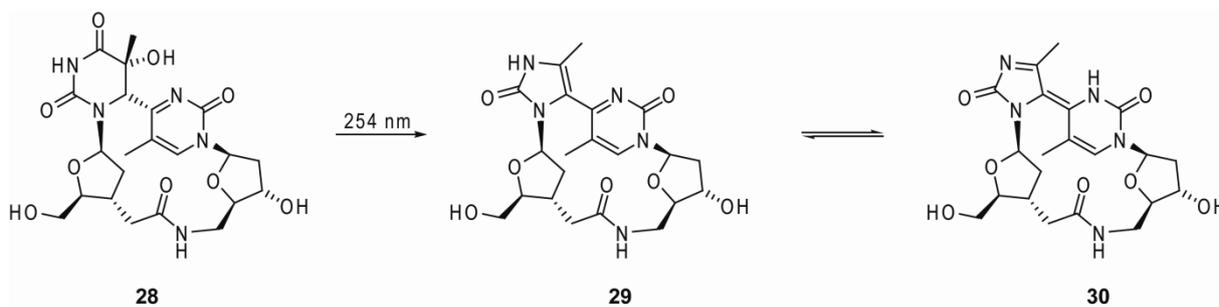


Abb. 10: Zeitabhängiges 3D-HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 20 % B, Fluss 0.5 mL/min) der Belichtung von **ODN 1** (5'-AATTAA-3').

Die dargestellten Chromatogramme in Abbildung 10 zeigen deutlich die Bildung von verschiedenen Produkten sowie die Abnahme des Eduktes (grauer Peak) in Zusammenhang mit der Belichtungsdauer. Die Entstehung des (6-4)-Photoproduktes (grüner Peak) konnte anhand der charakteristischen Absorption des T(6-4)T Schadens bei 325 nm nachgewiesen werden. Es hat sich gezeigt, dass die optimale Belichtungsdauer für **ODN 1** bei drei Stunden liegt.

Längere Belichtungszeiten führten lediglich zu einer Abnahme an der relativen Gesamtmenge des (6-4)-Schadens. Arbeiten von *Clivio* und Mitarbeitern haben gezeigt, dass sich ein T(6-4)T-Derivat **28** nach Belichtung mit 254 nm zu einem 2-Imidazolon-(5-4)-Pyrimidin Photoprodukt **30** umwandelt,^[151] wobei dies möglicherweise die Ursache für die Abnahme des (6-4)-Schadens nach einer gewissen Zeit sein kann (siehe Schema 9).



Schema 9: Umwandlung des (6-4)-Derivates **28** in das 2-Imidazolon-(5-4)-Pyrimidon Photoprodukt **30**.

Eine genauere Analyse der entstandenen Nebenprodukte bei der Belichtung von **ODN 1** hat zudem gezeigt, dass neben dem sich bildenden CPD-Schaden, die meisten aus TpA Sequenzen entstanden sind, wobei dies in Kapitel 3.2 näher beschrieben wird.

Um die Bildung dieser diversen TA-Photoprodukte zu unterdrücken, wurden für die folgenden Belichtungen ausschließlich Oligonukleotide verwendet, welche eine zentrale TpT oder TpC Einheit besaßen und keinerlei TpA Sequenzen mehr beinhalteten. Somit sollte gewährleistet werden, dass die Ausbeute an (6-4)-enthaltener DNA gesteigert und das präparative Trennproblem vereinfacht wird. In Übereinstimmung mit der Literatur hat sich dabei gezeigt, dass die besten Resultate erzielt werden konnten, wenn die zentralen TpT bzw. TpC Einheiten von Guanosinen flankiert sind,^[152] von denen keinerlei photochemische Dimerisierungen bekannt sind.

Analog zu **ODN 1** wurde hierbei in einem ersten Belichtungsexperiment zuerst die optimale Belichtungsdauer für **ODN 2** (5'-GGTTGG-3') bestimmt (Abbildung 11).

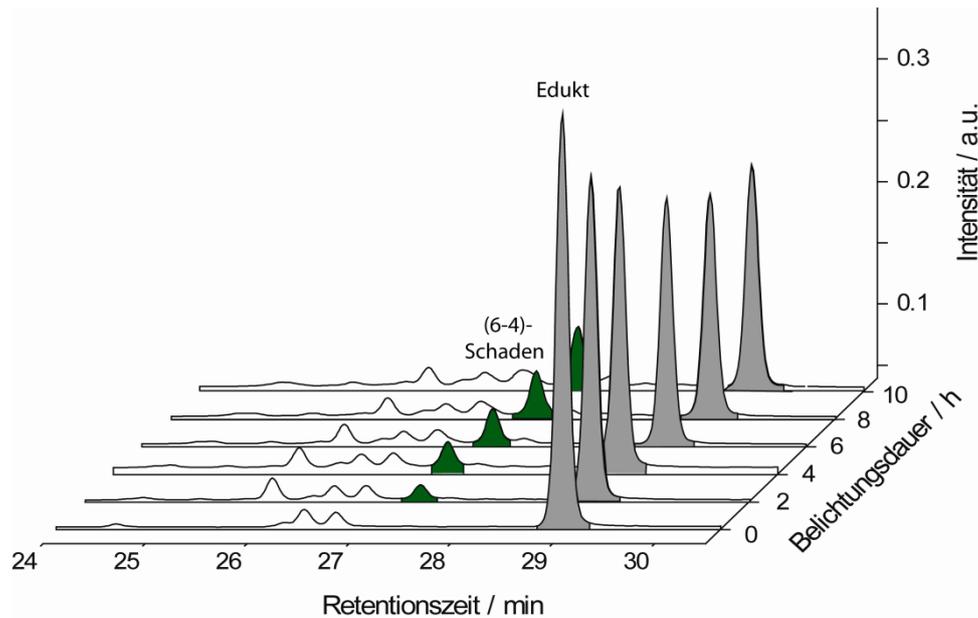


Abb. 11: Zeitabhängiges 3D-HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) der Belichtung von **ODN 2** (5'-GGTTGG-3').

Wie man Abbildung 11 entnehmen kann, waren für **ODN 2** deutlich längere Belichtungszeiten verglichen zu **ODN 1** erforderlich. Die optimale Belichtungsdauer für Oligonukleotide mit flankierenden Guanosinen der zentralen TpT bzw. TpC Sequenz betrug zwischen 14 – 15 Stunden, wobei längere Belichtungszeiten abermals zu einer Abnahme an (6-4)-enthaltener DNA führten. Die flankierenden Purinbasen scheinen vermutlich die Reaktivität der entsprechenden Dipyrimidinstelle herabzusetzen, wobei ähnliche Beobachtungen von *Kundu* und *Sage* gemacht werden konnten.^[152, 153] Hierfür eine Erklärung zu finden, ist nicht einfach, speziell für einzelsträngige DNA, da hier sterische Gründe unwahrscheinlich werden. Vielmehr könnte es sein, dass die niedrige Singulettenergie des Guanosins, welche die niedrigste aller natürlichen Nukleotide ist, verantwortlich für diesen Effekt ist. Ein angeregtes Thymidin im Singulettzustand wäre hierbei in der Lage, neben einer Cycloaddition auch einen Singulettenergietransfer auf ein Guanosin zu realisieren, wobei dies die Quantenausbeute der Cycloaddition senken und zu der beobachteten verringerten Reaktivität führen könnte.

Vergleicht man nun die beiden kurzen Oligonukleotide **ODN 1** und **ODN 2** bezüglich der Selektivität, Ausbeute und Trennbarkeit an der HPLC, so hat sich deutlich gezeigt, dass die Guanosine neben der Dipyrimidinstelle einen enorm positiven Einfluss haben und somit für hohe Ausbeuten bei längeren DNA Strängen erforderlich waren. Im nächsten Schritt wurde

ODN 2 somit sukzessive verlängert, wobei in Abbildung 12 exemplarisch die HPLC Chromatogramme von **ODN 2**, **ODN 6** und **ODN 8** (mit einem T(6-4)C-Schaden) nach der Belichtung und Aufreinigung dargestellt sind.

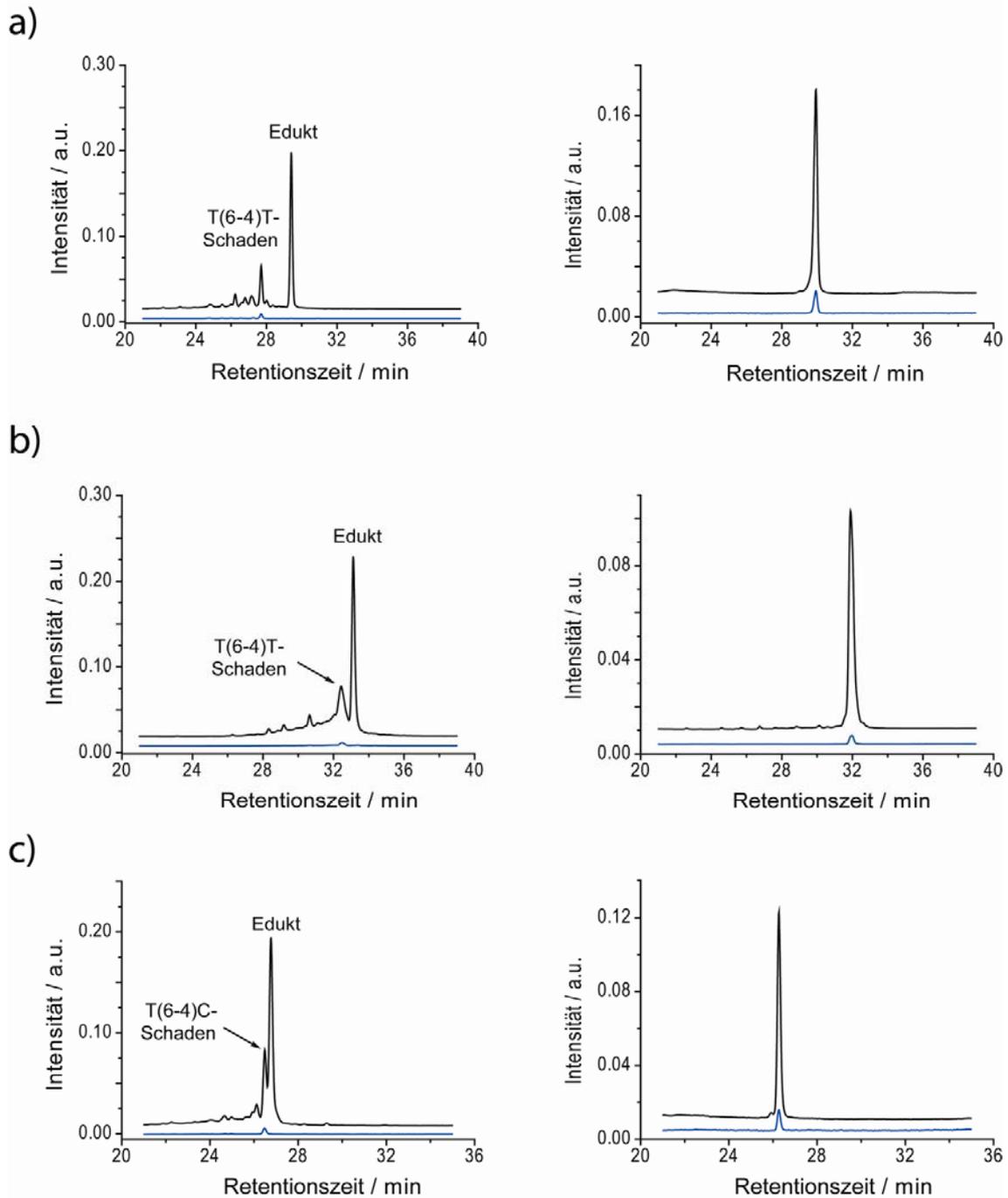


Abb. 12: Analytische *reversed-phase* HPLC Chromatogramme von a) **ODN 2** (5'-GGTTGG-3'), b) **ODN 6** (5'-ACAGCGGTTGCAGGT-3') und c) **ODN 8** (5'-GGTCGG-3') nach der Belichtung (links) sowie der Isolierung (6-4) enthaltener DNA (rechts) nach präparativer HPLC Aufreinigung (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min). Die Elution wurde bei 260 nm (schwarze Linie) und 325 nm (blaue Linie) verfolgt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Für die präparative Aufreinigung wurden *C18 reversed-phase Nukleodur* Säulen der Firma *Machery Nagel* verwendet und der Gradient von 4 – 18 % B in 45 min (Puffersystem **P1**) mit einem Fluss von 5 mL/min optimiert. Die isolierten Oligonukleotide wurden zur Reinheitsbestimmung enzymatisch abgebaut und mittels HPLC-MS sowie HPLC-MS/MS untersucht (siehe Kapitel 3.4.2). Die Oligonukleotide konnten in sehr hoher Reinheit in guten Ausbeuten erhalten werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle Oligonukleotide, welche in dieser Arbeit belichtet, aufgereinigt und isoliert werden konnten.

Tabelle 1: MALDI-TOF Daten und Ausbeuten für die belichteten Oligonukleotide **ODN 1 – ODN 15**. ¹⁾ Die Ausbeute wurde durch Integration des roh HPLC Chromatogramms bei 260 nm bestimmt. Die Ausbeute in den Klammern entspricht der Ausbeute der isolierten Oligonukleotide nach der Aufreinigung und wurde mittels Konzentrationsbestimmung ermittelt.

Nummer	Sequenz (5' → 3')	[M+H] ⁺ (ber.)	[M+H] ⁺ (gef.)	Ausbeute (%) ¹⁾
ODN 1-(6-4)	AAT(6-4)TAA	1800.20	1799.21	15 (5)
ODN 2-(6-4)	GGT(6-4)TGG	1864.20	1863.14	28 (12)
ODN 2-Dew	GGT(Dew)TGG	-	-	-
ODN 3-(6-4)	AGGT(6-4)TGCC	2466.57	2465.60	21 (11)
ODN 3-Dew	AGGT(Dew)TGCC	-	-	-
ODN 4-(6-4)	CAGGT(6-4)TGGCA	3068.94	3069.10	17 (7)
ODN 5-(6-4)	ACAGGT(6-4)TGCCAG	3711.34	3710.27	15 (5)
ODN 6-(6-4)	ACAGCGGT(6-4)TGCAGGT	4633.89	4632.94	27 (10)
ODN 6-Dew	ACAGCGGT(Dew)TGCAGGT	-	-	-
ODN 7-(6-4)	GGACAGCGGT(6-4)TGCAGGTG	5621.48	5620.58	18 (8)
ODN 8-(6-4)	GGT(6-4)CGG	1849.19	1848.23	25 (11)
ODN 8-Dew	GGT(Dew)CGG	-	-	-
ODN 9-(6-4)	AGGT(6-4)CGGC	2451.56	2450.51	14 (4)
ODN 9-Dew	AGGT(Dew)CGGC	-	-	-
ODN 10-(6-4)	ACAGCGGT(6-4)CGCAGGT	4618.88	4617.98	16 (9)
ODN 10-Dew	ACAGCGGT(Dew)CGCAGGT	-	-	-
ODN 11-(6-4)	GGU(6-4)TGG	1850.17	1850.01	5 (1)
ODN 12-(6-4)	AGGU(6-4)TGGC	2452.54	2452.55	9 (2)
ODN 13-(6-4)	GGT(6-4)C*GG	1863.22	1863.12	40 (14)
ODN 13-Dew	GGT(Dew)C*GG	-	-	-
ODN 14-(6-4)	AGGT(6-4)C*GGC	2465.59	2465.94	35 (13)
ODN 14-Dew	AGGT(Dew)C*GGC	-	-	-
ODN 15-(6-4)	ACAGCGGT(6-4)C*GCAGGT	4632.91	4632.87	15 (9)
ODN 15-Dew	ACAGCGGT(Dew)C*GCAGGT	-	-	-

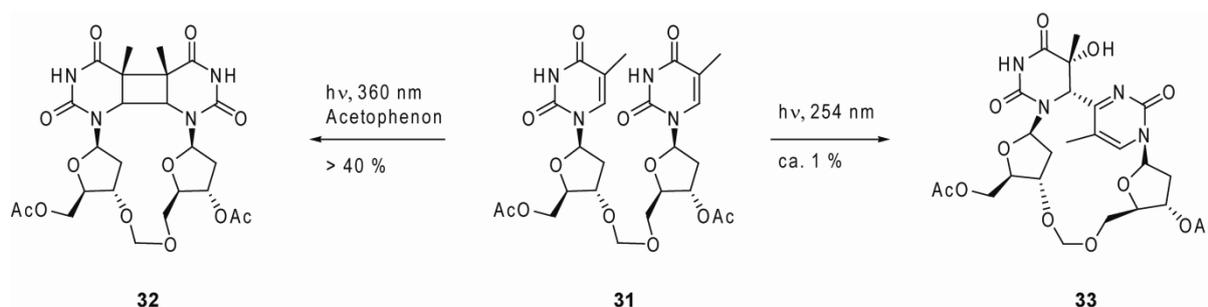
Verglichen mit den bekannten Belichtungsverfahren von *Lawrence, Taylor* und *Iwai*^[51, 57, 146] konnten zum Einen die erhaltenen Ausbeuten bis annähernd 30 % (vor der HPLC Reinigung) gesteigert werden, wobei man aufgrund der teils sehr komplexen Reinigung mittels HPLC noch etwa die Hälfte an (6-4)-enthaltener DNA einbüßt. Die Gesamtausbeute ist mit ca. 15 % jedoch immer noch deutlich über den bisher üblichen Ausbeuten. Zum Anderen waren durch die optimierten Belichtungsbedingungen erstmals längere Oligonukleotide mit einem zentralen T(6-4)T- bzw. T(6-4)C-Schaden in ausreichenden Mengen für biochemische und strukturbiochemische Untersuchungen zusammen mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* zugänglich. Ein weiterer Vorteil der direkten Belichtung von Oligonukleotiden war (neben denen in der Literatur weit verbreiteten T(6-4)T- und T(6-4)C-Schäden) die schnelle Zugänglichkeit zweier weiterer (6-4)-Schäden, welche in der Literatur bis dato vernachlässigt bzw. unbekannt waren, nämlich dem U(6-4)T- bzw. dem T(6-4)C*-Schaden. Auf diese beiden Schäden wird in den Kapiteln 3.3.1 und 3.7.5 näher eingegangen. Tabelle 1 kann man zudem entnehmen, dass von den isolierten Oligonukleotiden mit den verschiedenen (6-4)-Schäden ebenso die entsprechenden Dewar Valenz-Isomere hergestellt und isoliert werden konnten, wobei hier speziell in Kapitel 3.3 näher darauf eingegangen wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verwendung einer *glove box* als anaerobe Umgebung während der Belichtung sowie die gezielte Wahl der DNA Sequenz entscheidend dazu beigetragen haben, dass sowohl die isolierte Ausbeute als auch die Länge an (6-4)-enthaltener DNA gesteigert werden konnte. Der niedrige Sauerstoffgehalt in der *glove box* während der Belichtung scheint das entscheidende Kriterium für die selektive (6-4)-Bildung sowie für die Minimierung von weiteren Photoprodukten und der Unterdrückung von Photooxidationsprozessen zu sein, wobei zudem das übliche *Quenching* des Triplett-Zustands (aus dem der (6-4)-Schaden heraus gebildet wird) vermieden wird.

3.1.2 Herstellung des (6-4)-Schadens auf Dinukleotidebene

Neben der oben beschriebenen Methode der direkten Belichtung von Oligonukleotiden zur Herstellung von (6-4)-Schäden hat sich Mitte der 90er Jahre noch eine weitere Möglichkeit zur Darstellung des (6-4)-Schadens entwickelt. Hierbei handelt es sich um die automatisierte DNA Festphasensynthese, bei der ein Phosphoramiditbaustein des entsprechenden (6-4)-Dinukleotids notwendig ist. Der große Vorteil dieser Methode ist die freie Wahl der DNA-

Sequenz sowie die Möglichkeit der Synthese von langen DNA Strängen in hohen Ausbeuten. Nachteilig hingegen sind die langen und komplizierten Synthesen dieser Phosphoramiditbausteine, speziell der limitierende Belichtungsschritt des Dinukleotids bei 254 nm. *Ohtsuka* und Mitarbeiter konnten hierbei einen deutlich höheren Umsatz erzielen, wenn sie das von *Iwai* und Mitarbeitern verwendete Phosphatrückgrat durch ein Formacetalrückgrat ersetzen.^[147-149, 154] Sie berichten bei der Umwandlung zum (6-4)-Schaden von einer Ausbeute von 30 %, wobei ihr gezeigtes HPLC Chromatogramm deutlich geringere Ausbeuten vermuten lässt. Vorarbeiten von *M. Friedel*^[155] im Arbeitskreis *Carell* haben dagegen gezeigt, dass bei der Verwendung des acetalgeschützten Formacetalanalogons **31** zwar der CPD-Schaden **32** unter Verwendung eines Triplettensensibilisators photochemisch in guten Ausbeuten hergestellt werden kann, sich jedoch nur in geringen Ausbeuten der (6-4)-Schaden **33** bildet (siehe Schema 9).

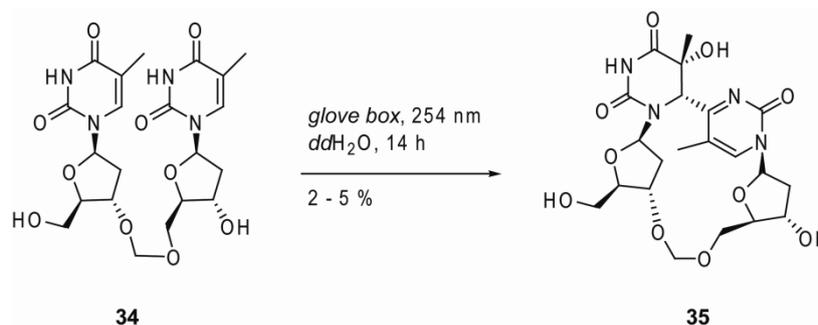


Schema 9: Herstellung eines Formacetalverbrückten CPD- und (6-4)-Schadens.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte somit untersucht werden, ob die Ergebnisse von *Ohtsuka* reproduzierbar sind und sich gegebenenfalls für eine folgende Phosphoramiditsynthese eignen. Das von *Ohtsuka* verwendete Dinukleotid war im Gegensatz zu dem Dinukleotid **31** von *M. Friedel* an der 5'-OH-Gruppe ungeschützt und hatte am 3'-OH eine TBDMS-Gruppe. Da kein ersichtlicher Grund für einen Einfluss der Schutzgruppen zur Formation des (6-4)-Schadens besteht, wurde in dieser Arbeit das komplett ungeschützte Dinukleotid **34** für die Belichtung eingesetzt, wobei die freien OH-Gruppen nach der (6-4)-Herstellung einen weiteren Entschützungsprozess für die Phosphoramiditsynthese unnötig machen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Belichtung des Dinukleotids **34** erfolgte nach dem Oligonukleotid-Protokoll (siehe Exp. Teil). Der gewünschte (6-4)-Schaden **35** konnte hierbei typischer Weise in einer Ausbeute von 2 – 5 % isoliert werden (siehe Schema 10). Die Ausbeute von *Ohtsuka* und Mitarbeitern konnte demnach nicht erreicht werden.



Schema 10: Belichtung des Formacetalverbrückten Dinukleotids **34** bei 254 nm.

In Abbildung 13 sind die analytischen HPLC Chromatogramme nach der Belichtung von **34** (links) sowie nach der präparativen HPLC (*Nucleosil 100-7 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 50 % B in 45 min, Fluss 15 mL/min) Aufreinigung (rechts) dargestellt.

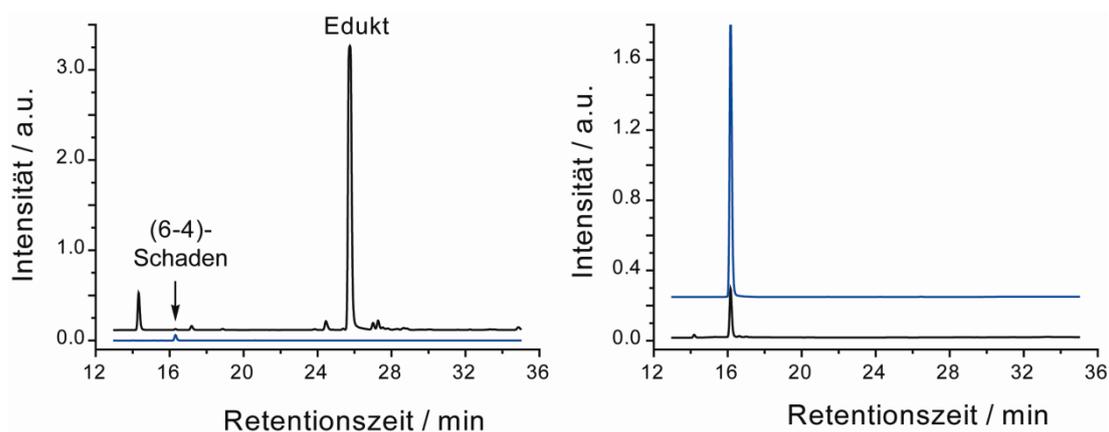
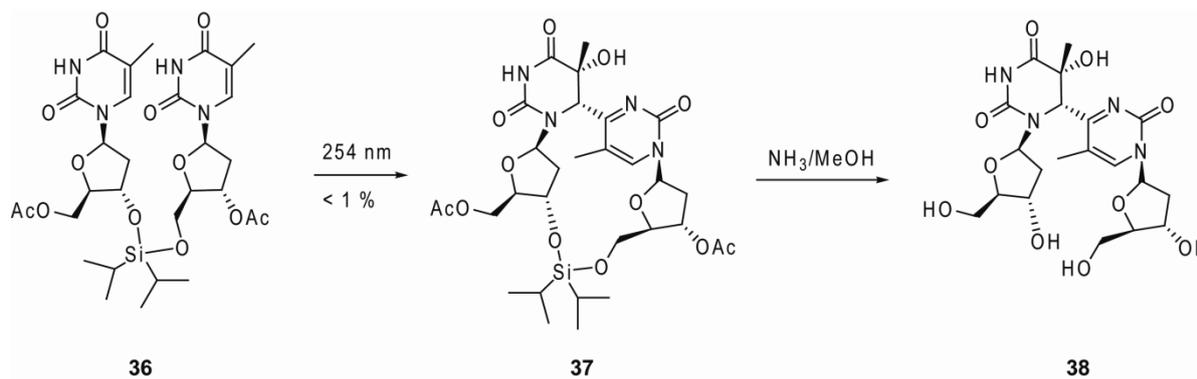


Abb. 13: Analytisches *reversed-phase* HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 50 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) nach der Belichtung von **34** (links) und anschließender Reinigung (rechts). Die Elution wurde bei 260 nm (schwarze Linie) und 325 nm (blaue Linie) verfolgt.

Aufgrund der ineffizienten Ausbeute bei der Umwandlung zu dem (6-4)-Dinukleotid, sowie den dabei noch folgenden zwei Reaktionen zum Phosphoramidit wurde diese Strategie zur Herstellung von langen Oligonukleotiden mit einem (6-4)-Schaden nicht weiter verfolgt. Neben dem (6-4)-Dinukleotid **35** konnte noch ein weiteres (6-4)-Dinukleotid **38** hergestellt werden, dass jedoch ein offenes Rückgrat aufweist (Schema 11).



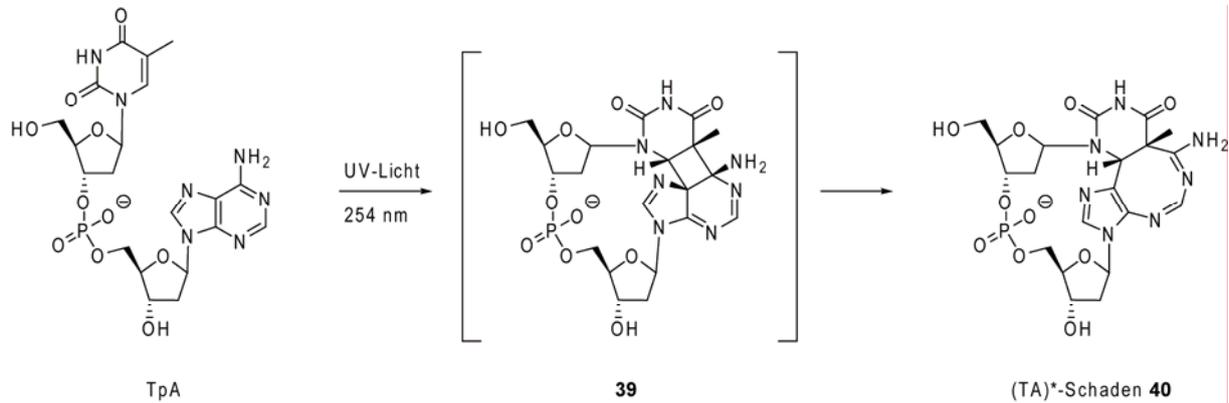
Schema 11: Herstellung des (6-4)-Schadens **38** mit offenem Rückgrat, ausgehend von **36**.

Mit dem (6-4)-Dinukleotid **38** sollte dabei die Fragestellung (welche durch Berechnungen in der Gruppe *deVivie-Riedle* aufgekommen ist) geklärt werden, ob man bei der Umwandlung des (6-4)-Schadens zu seinem Dewar Valenz-Isomer ein geschlossenes Rückgrat benötigt oder nicht. Diese Fragestellung wird in Kapitel 3.3.2 näher erläutert.

3.2 Herstellung und Charakterisierung des (TA)*-Photoschadens

Bei der genaueren Betrachtung der entstandenen Photoschäden von **ODN 1** hat sich gezeigt, dass einige davon aus TpA Sequenzen entstanden sein müssen. *McCloskey* und Mitarbeiter konnten in diesem Zusammenhang im Jahre 1983 erstmals eine Photoreaktion zwischen einem Thymin und einem Adenin nach Belichtung bei 254 nm beobachten und einen neuartigen (TA)*-Schaden **40** isolieren.^[156] *Taylor* und Mitarbeiter gelang es 1996, die richtige Struktur des Schadens zu publizieren,^[33] wobei diese durch eine kürzlich erschienene Kristallstruktur des (TA)*-Schadens bestätigt worden ist.^[157]

In Schema 12 ist die Entstehung des (TA)*-Schadens **40** durch Belichtung mit UV-Licht über das Intermediat **39** dargestellt.



Schema 12: Bildung des (TA)*-Schaden **40** über das Intermediat **39** nach Belichtung bei 254 nm.

Im ersten Schritt erfolgt eine $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition zwischen der C5-C6-Doppelbindung des Thymins mit den C5- und C6-Positionen des Adenins. Ähnlich der Bildung von CPD-Schäden^[42] bildet sich in DNA aufgrund der vorgegebenen Konformation der Basen (*anti* um die glykosidische Bindung) nahezu ausschließlich das *cis-syn* Cyclobutanintermediat **39**, welches durch eine 6π Cycloreversion zum (TA)*-Schaden **40** umlagert.

Um genauere Erkenntnisse über diese Photoreaktion zu erlangen, wurde **ODN 16** (5'-GGTAGG-3') mit einer zentralen TpA-Einheit abermals mit Guanosinen flankiert, um so ausschließlich eine Reaktion zwischen dem Thymin und dem Adenin zu gewährleisten. **ODN 16** wurde analog zu der beschriebenen Belichtungsmethode 14 Stunden bei 254 nm in der *glove box* belichtet und aufgereinigt (*Nucleodur 100-5 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 4 – 18 % B in 45 min, Fluss 5 mL/min). Das (TA)*-Photoprodukt konnte dabei in einer Ausbeute von 6 % in hoher Reinheit isoliert werden (siehe Abbildung 14).

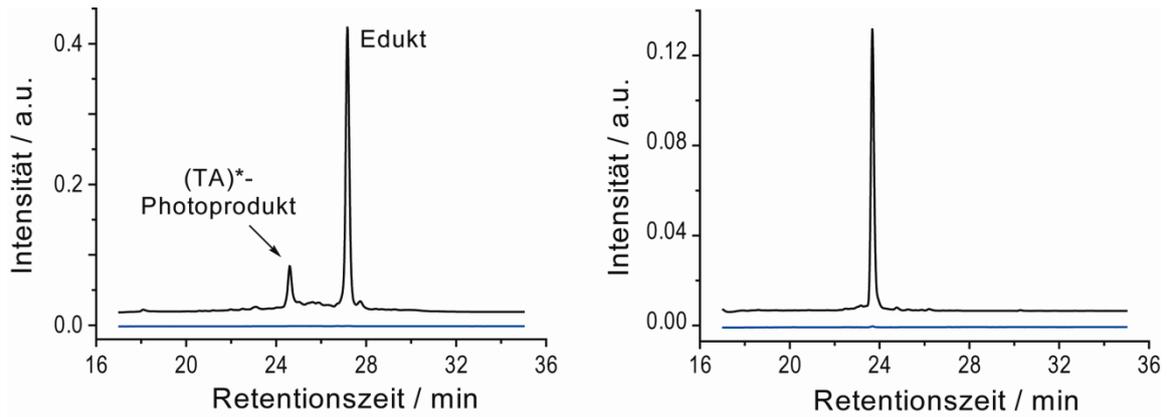


Abb. 14: Analytisches *reversed-phase* HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) von **ODN 16** nach der Belichtung (links) und Aufreinigung mittels HPLC (rechts). Die Elution wurde bei 260 nm (schwarze Linie) und 325 nm (blaue Linie) verfolgt.

Wie man Abbildung 14 entnehmen kann, zeigt der (TA)*-Schaden im Gegensatz zu den (6-4)-Schäden keinerlei Absorption bei $\lambda > 300$ nm.

Zur genauen Charakterisierung und Reinheitsbestimmung des isolierten (TA)*-Schadens, wurde ein Aliquot nach einem Standardprotokoll enzymatisch abgebaut und mittels HPLC-MS und HPLC-MS/MS analysiert (Abbildung 15).^[42, 43]

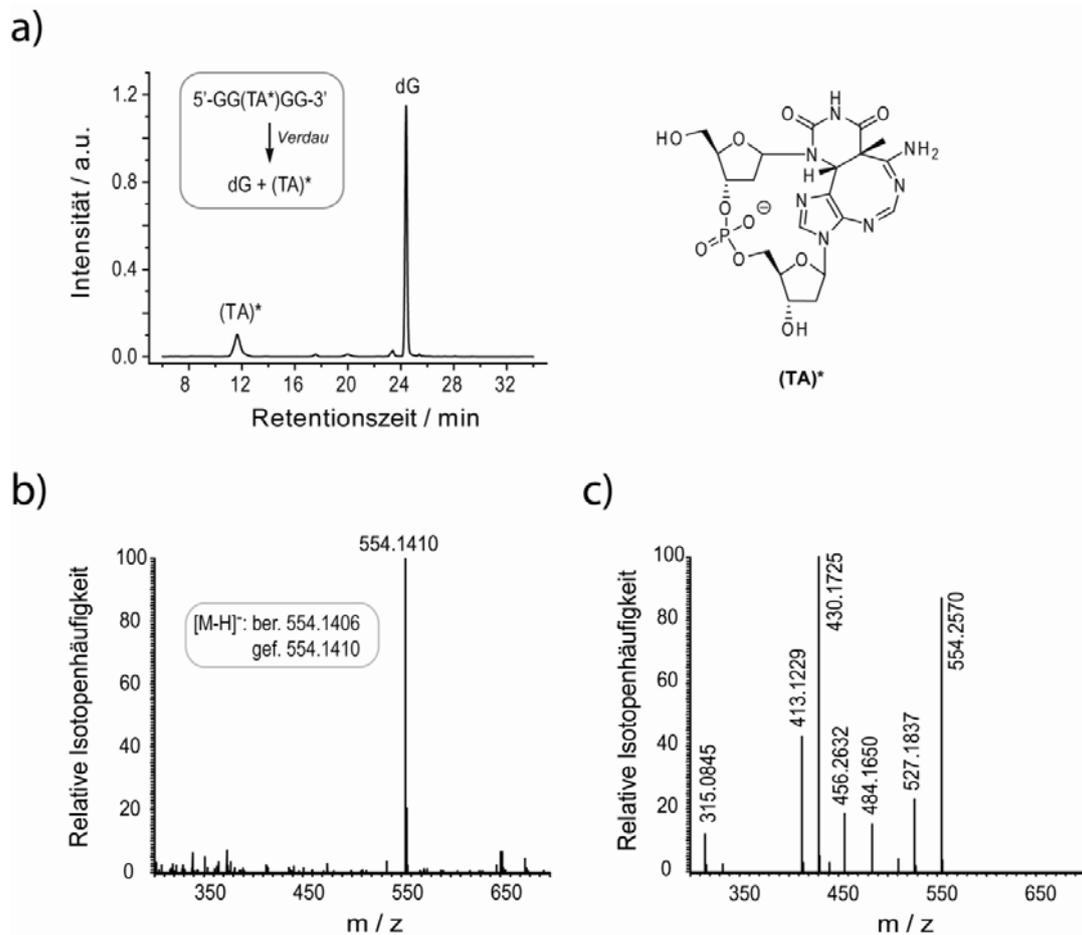


Abb. 15: HPLC, HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse von **ODN 16-TA** mit (TA)*-Schaden nach enzymatischem Abbau. a) HPLC Analyse der Komponenten von **ODN 16-TA** nach enzymatischem Abbau. b) HPLC-MS Analyse des (TA)*-Dinukleotids. c) HPLC-MS/MS Analyse des (TA)*-Dinukleotids. Das verwendete Verdau-Protokoll **P1** und die HPLC Bedingungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Alle molekularen Massen wurden im negativen Ionenmodus des Massenspektrometers gemessen.

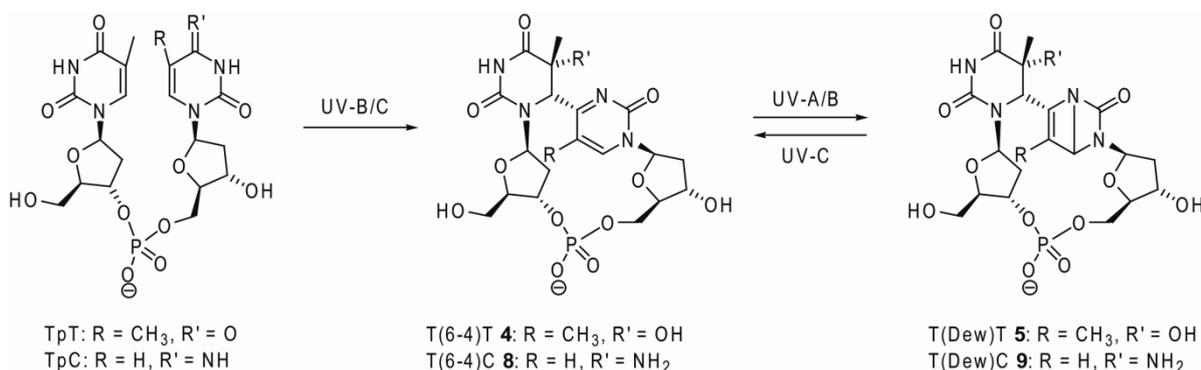
Wie man Abbildung 15 entnehmen kann, konnte der (TA)*-Schaden in sehr hoher Reinheit isoliert werden. Weitere Arbeiten von *K. Heil* im Arbeitskreis *Carell* haben gezeigt, dass der (TA)*-Schaden durchaus auch in längeren Oligonukleotiden mit zufriedenstellenden Ausbeuten hergestellt und isoliert werden kann. Dies ist dahingehend von großem Interesse, da *Taylor* und Mitarbeiter an *non-SOS* Zellen zeigen konnten, dass der (TA)*-Schaden eine ähnliche Fähigkeit wie die *cis-syn* CPD-, T(6-4)T- und T(Dew)T-Photoprodukte aufweist, DNA Replikation zu blockieren.^[33, 57, 158] Bei *SOS* Zellen zeigte sich hingegen ein wesentlich höherer Bypass, wobei der (TA)*-Schaden eine hohe Mutagenität aufweist. Der (TA)*-Schaden stellt zwar mit einer um den Faktor 0 – 100 kleineren Quantenausbeute verglichen mit den CPD- und (6-4)-Schäden einen mengenmäßig untergeordneten DNA-Schaden dar,^[159]

^{160]} nichtsdestotrotz bedarf es weiterer Untersuchungen, ob der hochmutagene (TA)*-Schaden ein Substrat für Nukleotid Exzision oder für andere Formen der zellulären DNA Reparatur ist.

3.3 Umwandlung der (6-4)-Photoprodukte in ihre entsprechenden Dewar Valenz-Isomere

3.3.1 Untersuchungen zur Umwandlung durch Belichtung von Oligonukleotiden

Von den beiden Photoschäden T(6-4)T und T(6-4)C ist bekannt, dass sie nach weiterer Belichtung mit UV-A/B Licht zu den entsprechenden Dewar Valenz-Isomeren umlagern (siehe Schema 13).^[46, 58, 161]



Schema 13: Umwandlung der beiden Photoprodukte T(6-4)T **4** und T(6-4)C **8** in ihre entsprechenden Dewar Valenz-Isomere T(Dew)T **5** und T(Dew)C **9**.

Um sowohl biochemische als auch strukturelle Untersuchungen mit den Dewar Valenz-Isomeren durchführen zu können, wurden die gereinigten DNA-Stränge, welche einen zentralen T(6-4)T- bzw. T(6-4)C-Schaden enthielten, bei 365 nm bestrahlt. Hierbei wurden die Oligonukleotide in *ddH*₂O gelöst und unter aeroben Bedingungen bei einer Distanz von 20 cm zur UV-Lampe in einer Belichtungsapparatur (365 nm, *Vilber Lourmat VL-315.BL*, 3 x 15 W 365 nm Röhren) belichtet. In Abbildung 16 sind die zeitabhängigen Umwandlungen der beiden Oligonukleotide **ODN 2-(6-4)** und **ODN 8-(6-4)** mit den Schäden T(6-4)T und

T(6-4)C zu den entsprechenden Oligonukleotiden **ODN 2-Dew** und **ODN 8-Dew** mit den Dewar-Isomeren dargestellt (siehe auch Tabelle 1).

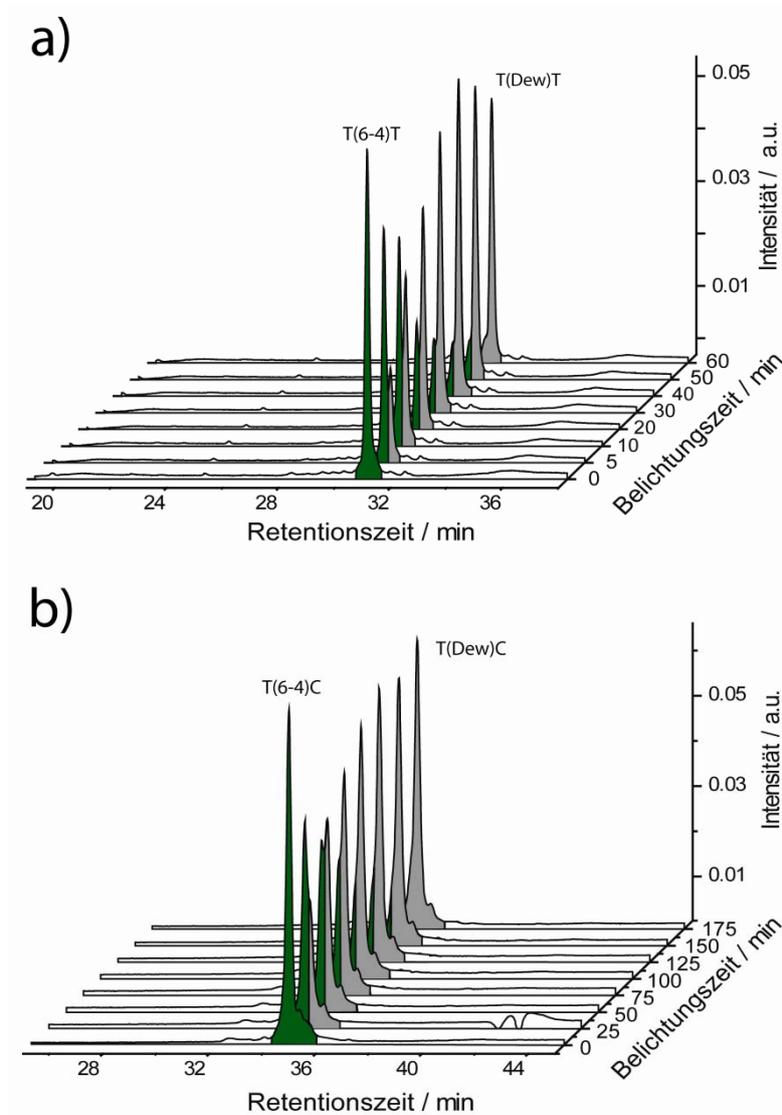


Abb. 16: Zeitabhängiges 3D-HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B, Fluss 0.5 mL/min) der Belichtung von **ODN 2-(6-4)** und **ODN 8-(6-4)** bei 365 nm. Die (6-4)-Schäden sind als grüne und die (Dew)-Schäden als graue Signale dargestellt.

Die Umwandlung in die entsprechenden Dewar-Isomere war bei allen in Tabelle 1 gezeigten Oligonukleotiden vollständig und sauber, so dass keine weitere Aufreinigung notwendig war. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich ist, war für die Umwandlung des T(6-4)C-Schadens in sein Dewar-Isomer in etwa die dreifache Zeit verglichen zur Umwandlung des T(6-4)T-Schadens

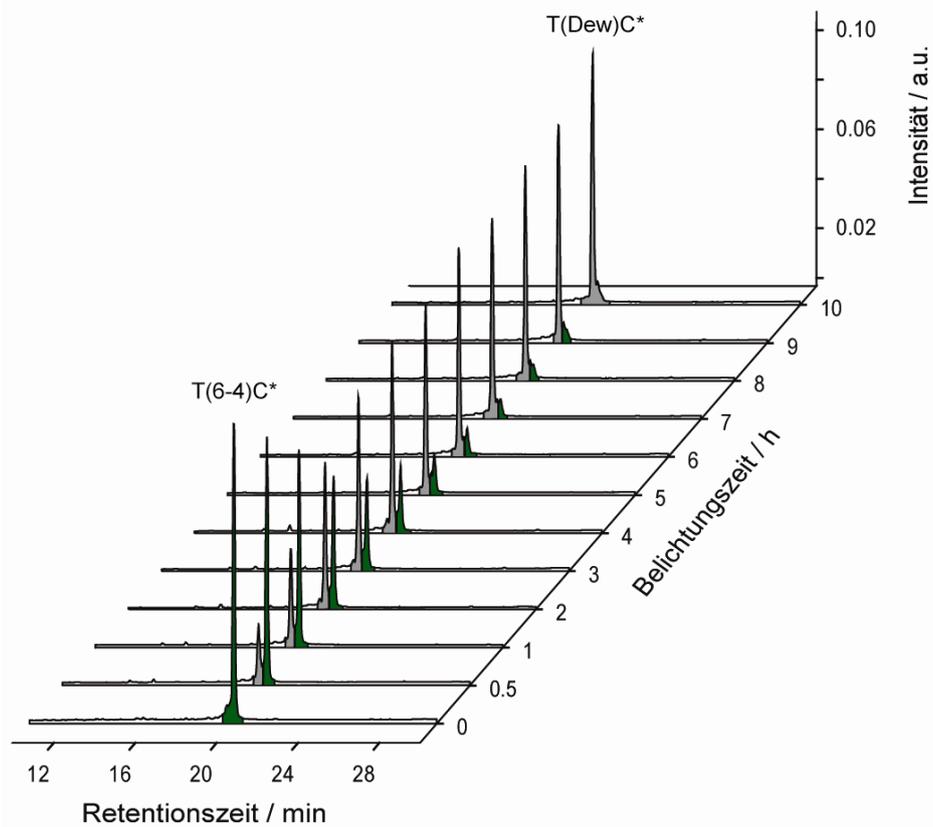


Abb. 17: Zeitabhängiges 3D-HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 40 % B, Fluss 0.5 mL/min) der Belichtung von **ODN 13-(6-4)** (grünes Signal) zu **ODN 13-Dew** (graus Signal) bei 365 nm.

Anscheinend verlangsamt die Methylgruppe an der Aminogruppe des C5-Kohlenstoffatoms die Photoisomerisierung des T(6-4)C*-Schadens zu dem T(Dew)C*-Schaden, verglichen mit dem unmethylierten T(6-4)C-Schaden an dieser Stelle. In Abbildung 17 kann man aber erneut gut erkennen, dass die Umwandlung analog zu den T(6-4)T- und T(6-4)C-Schäden ebenfalls komplett und sauber verläuft, so dass auch im Falle des T(Dew)C*-Schadens keine weitere Aufreinigung notwendig war.

Abschließend lässt sich sagen, dass das verbesserte Belichtungsverfahren zur Herstellung der (6-4)-Schäden, eine elegante Methode zur Erzeugung von (6-4)- und Dewar-Photoprodukten auch in längeren DNA Strängen ist. Die Oligonukleotidprodukte lassen sich so in ausreichenden Mengen darstellen. Die direkte Belichtung ist folglich eine schnelle und einfache Alternative zu der von *Iwai* und Mitarbeitern veröffentlichten Synthese der T(Dew)T- und auch der T(6-4)T-Phosphoramiditbausteine für die DNA Synthese.^[142]

3.3.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Dewar-Schadensbildung

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis *Zinth* sollte der Mechanismus der Umwandlung des T(6-4)T-Schadens zu seinem Dewar-Isomer mittels Femtosekunden zeitaufgelöster IR-Spektroskopie genauer untersucht werden.^[163] Hierbei waren ausreichende Mengen sowohl an (6-4)- als auch an Dewar-Schaden für erste Messungen von Nöten. Das Formacetalverbrückte (6-4)-Dinukleotid **35** konnte dabei analog zum natürlichen T(6-4)T-Schaden innerhalb von einer Stunde Belichtung bei 365 nm komplett und sauber in das entsprechende Dewar-Dinukleotid **43** umgewandelt werden (Abbildung 18).

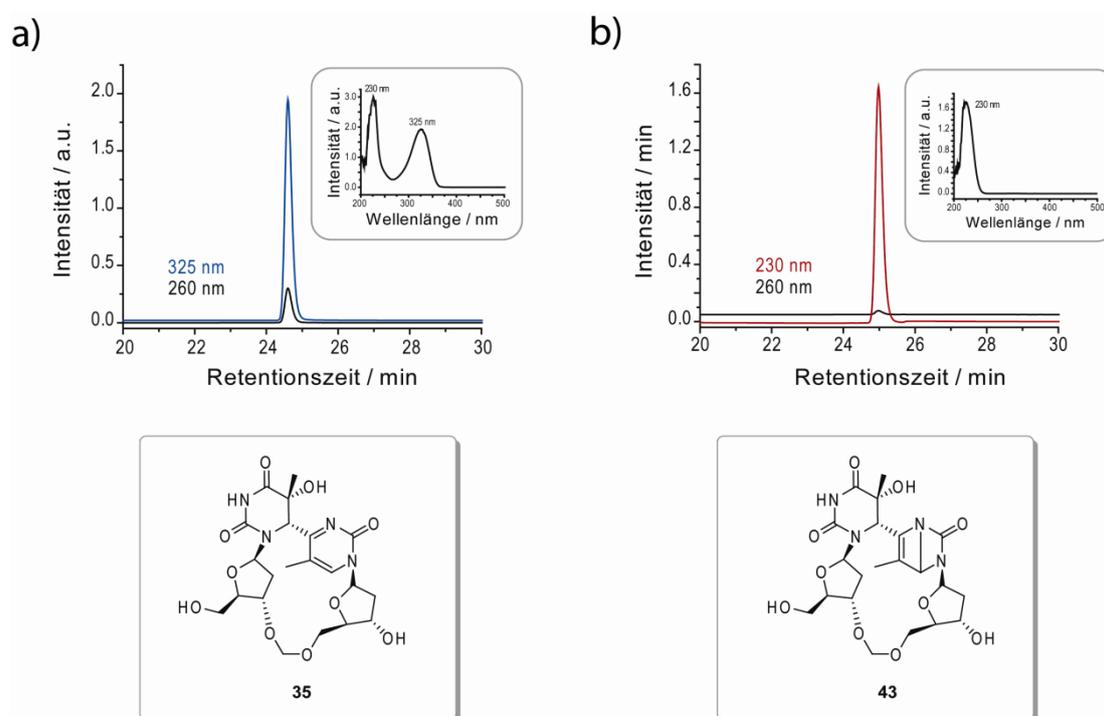


Abb. 18: Analytisches *reversed-phase* HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B, Fluss 0.5 mL/min) des (6-4)-Dinukleotids **35** a) bevor und b) nach der Belichtung bei 365 nm. Die Einschübe stellen das jeweilige Absorptionsspektrum der dargestellten Peaks dar.

Mit den beiden Dinukleotiden konnte die Gruppe *Zinth* somit erste stationäre Messungen bezüglich der Umwandlung durchführen. Hierbei verwendeten sie einen 355 nm YAG-Laser, mit dem sie eine nahezu vollständige Umwandlung (> 92 %) des (6-4)-Schadens **35** zu dem Dewar-Isomer **43** erzielen konnten. In Abbildung 19 sind die IR-Spektren des (6-4)-Dinukleotids vor und nach der Belichtung bei 355 nm sowie das entsprechende Differenzspektrum dargestellt.

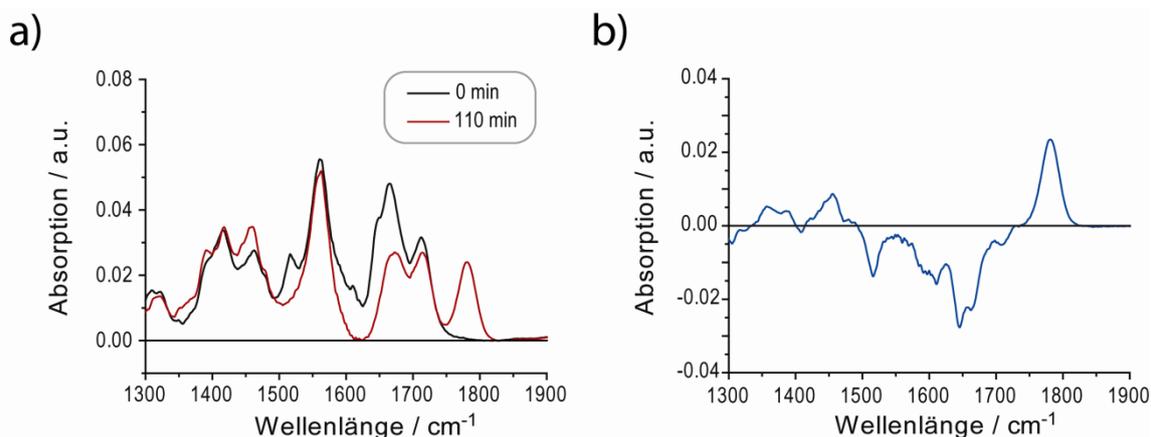


Abb. 19: a) IR-Spektrum des (6-4)-Dinukleotids **35** vor und nach der Belichtung bei 355 nm sowie b) das entsprechende Differenzspektrum.

Anhand des Differenzspektrum kann man sehr schön die für das Dewar-Isomer charakteristische IR-Bande bei $\tilde{\nu} = 1781 \text{ cm}^{-1}$ erkennen,^[62] welche nach der Belichtung bei 355 nm neu entstanden ist. In Abbildung 20 kann man eine sehr schöne Übereinstimmung der IR-Spektren der belichteten Probe der Gruppe *Zinth* mit dem bereitgestellten Dewar-Isomer erkennen.

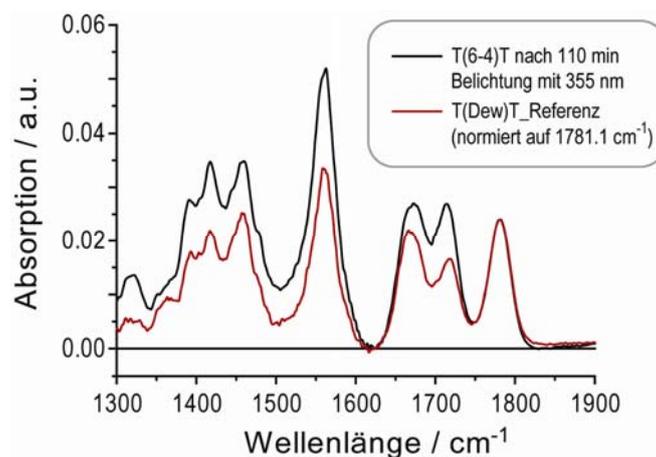


Abb. 20: Vergleich der beiden IR-Spektren des Dewar-Dinukleotids der Gruppe *Zinth* mit dem bereitgestellten Dewar-Isomer **43**.

Die Spektren wurden auf die Bande bei $\tilde{\nu} = 1781 \text{ cm}^{-1}$ normiert, wobei die geringen Differenzen auf die nicht vollständige Umwandlung des (6-4)-Dinukleotids zum Dewar-

Isomer unter den Bedingungen der *Zinth* Gruppe zurückzuführen sind. Die ermittelte Quantenausbeute für das Formacetalverbrückte (6-4)-Dinukleotid liegt mit $\sim 7\%$ deutlich über der, für das Phosphatverbrückte (6-4)-Dinukleotid bekannten Quantenausbeute von $\sim 2\%$ ^[62] und stellte somit ein aussichtsreiches Substrat für die Femtosekunden zeitaufgelösten Messungen dar, welche in der Gruppe *Zinth* momentan vorbereitet werden.

Eine weitere Fragestellung der Gruppe *deVivie-Riedle* bezüglich der Isomerisierung zu dem Dewar-Isomer sollte mit einem (6-4)-Dinukleotid mit offenem Rückgrat geklärt werden. Rechnungen in der *deVivie-Riedle* Gruppe haben gezeigt, dass für die Umwandlung des (6-4)-Schadens zu seinem Dewar-Isomer ein geschlossenes Rückgrat unbedingt notwendig ist. Um diese Fragestellung zu klären, wurde das (6-4)-Dinukleotid **44** mit offenem Rückgrat hergestellt und auf seine Umwandlungsfähigkeit untersucht.

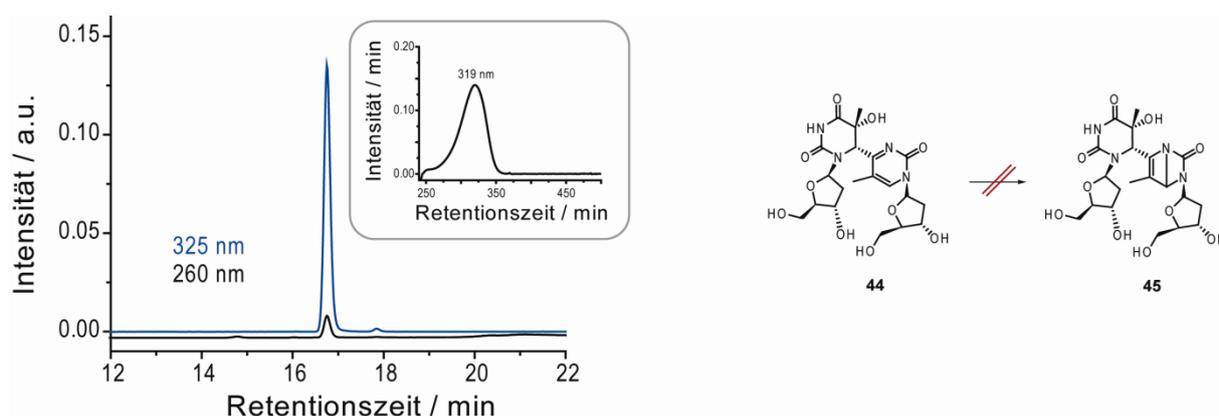


Abb. 21: Analytisches *reversed-phase* HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B, Fluss 0.5 mL/min) des (6-4)-Dinukleotids **44** und sein Absorptionsspektrum.

Das (6-4)-Dinukleotid **44** mit dem offenen Rückgrat weist gegenüber dem Formacetalverbrückten (6-4)-Dinukleotid **35** ein leicht verändertes Laufverhalten während der HPLC sowie ein leicht verschobenes Absorptionsmaximum von $\lambda = 319$ nm auf (Abbildung 21). Während der Belichtung bei 365 nm konnte jedoch keine Umwandlung zu dem Dewar-Isomer **45** beobachtet werden, wobei sich das (6-4)-Dinukleotid nach einer Stunde Belichtungszeit vollständig zersetzt hatte. Die Rechnungen der *deVivie-Riedle* Gruppe konnten somit experimentell bestätigt und weitere Einblicke in die (6-4) zu Dewar Umwandlung gewonnen werden. Weitere quantenmechanische Rechnungen der *deVivie-Riedle* Gruppe sollen nun eine Erklärung für diesen Sachverhalt liefern.

3.4 Charakterisierung der (6-4)- und der (Dew)-Photoschäden

3.4.1 Absorptionseigenschaften

Eine charakteristische Eigenschaft der (6-4)-Schäden ist das zusätzliche Absorptionsmaximum von 325 nm für den T(6-4)T-Schaden^[59, 60] und von 314 nm für den T(6-4)C-Schaden.^[61] Diese Absorptionsbande im langwelligen Bereich geht aus dem Pyrimidonring hervor, wobei die Dewar-Isomere diese spezifische Eigenschaft nicht aufweisen. Somit lassen sich die (6-4)-Schäden sehr schön von den entsprechenden Dewar-Schäden bezüglich der Absorption unterscheiden. In Abbildung 22 sind die UV/VIS-Spektren der T(6-4)T-, T(Dew)T-, T(6-4)C- und T(Dew)T-Schäden sowie die UV-Spektren der entsprechenden ungeschädigten Oligonukleotide dargestellt.

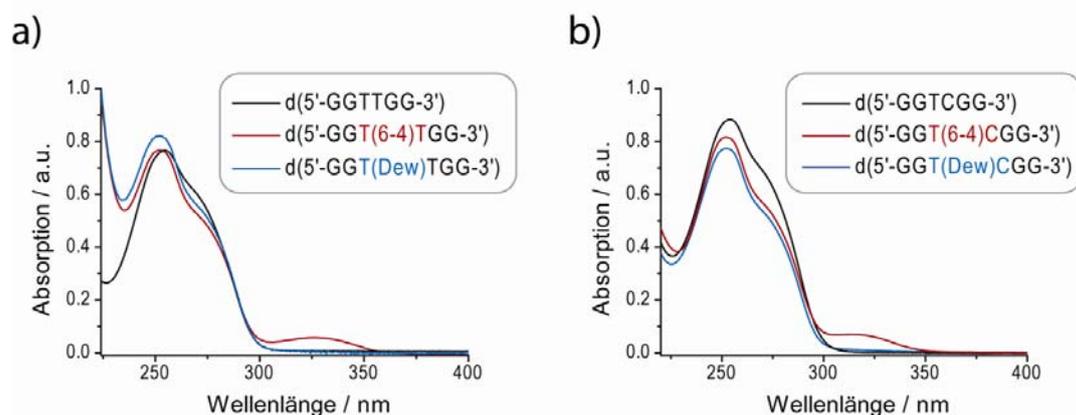


Abb. 22: UV/VIS-Absorptionsspektren von a) **ODN 2-(6-4)** (rot), **ODN 2-Dew** (blau) und dem unbelichteten Oligonukleotid **ODN 2** (schwarz) sowie b) **ODN 8-(6-4)** (rot), **ODN 8-Dew** (blau) und dem unbelichteten Oligonukleotid **ODN 8** (schwarz). Die Spektren wurden von den gereinigten Oligonukleotiden in *ddH*₂O bei Raumtemperatur aufgenommen.

In Abbildung 22 kann man deutlich die charakteristischen Wellenlängen des T(6-4)T- und des T(6-4)C-Schadens bei 325 nm sowie bei 314 nm erkennen. Die Dewar-Isomere hingegen verlieren diese Absorptionsbande und zeigen lediglich eine Absorption bei 260 nm, ähnlich der ungeschädigten DNA auf.

Auch von dem neuartigen T(6-4)C*-Schaden wurde ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen, welches in Abbildung 23 dargestellt ist.

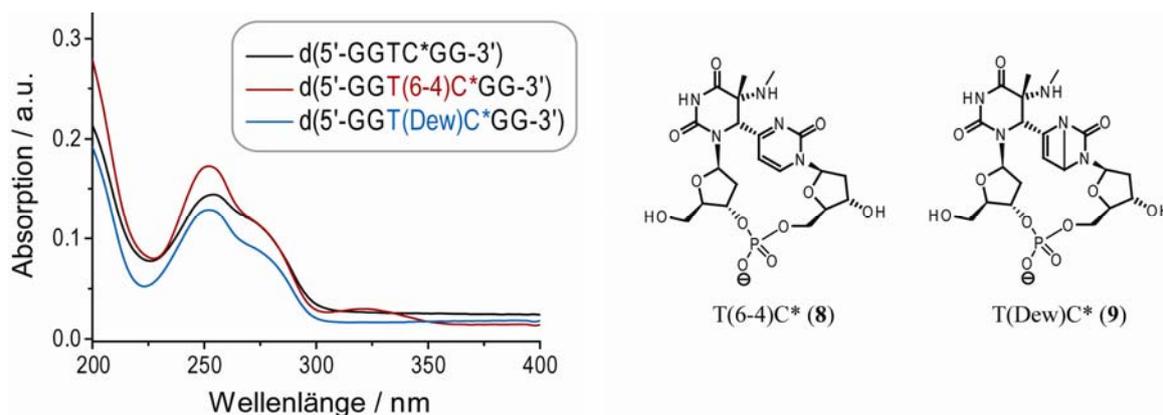


Abb. 23: UV/VIS-Absorptionsspektrum von **ODN 13-(6-4)** (rot), **ODN 13-Dew** (blau) und dem unbelichteten Oligonukleotid **ODN 13** (schwarz). Die Spektren wurden von den gereinigten Oligonukleotiden in ddH_2O bei Raumtemperatur aufgenommen.

Der T(6-4)C*-Schaden besitzt wie erwartet, analog zu dem T(6-4)C-Schaden sein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 314$ nm, wobei sein Dewar-Isomer ebenfalls keine Absorption bei $\lambda > 300$ nm mehr aufzeigt.^[162]

3.4.2 HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse der enzymatisch abgebauten Oligonukleotide

Um die isolierten Oligonukleotide auf ihre Reinheit und das Vorhandensein des entsprechenden Photoschadens zu untersuchen, wurden Aliquote der Oligonukleotide einem enzymatischen Totalverdau unterzogen und die erhaltenen Komponenten mittels HPLC-MS und HPLC-MS/MS untersucht. Diese Methode ist so wertvoll, da die entsprechenden CPD-, (6-4)- und (Dew)-Schäden alle das gleiche Molekulargewicht aufzeigen und sich nur durch ihr Fragmentierungsmuster unterscheiden lassen. Zudem bietet die Methode eine sehr sensitive Analyse der Oligonukleotide bezüglich der Reinheit, da man hier etwaige Verunreinigungen sogar im geringen prozentualen Bereich detektieren kann. Zur Charakterisierung wurden etwa 1 – 2 nmol der entsprechenden Oligonukleotide nach einem Standardprotokoll enzymatisch abgebaut und analysiert.^[42, 43] In Abbildung 24 sind die Komponenten von **ODN 1-(6-4)** nach dem enzymatischen Abbau sowie die erhaltenen HPLC-MS und HPLC-MS/MS Daten dargestellt.

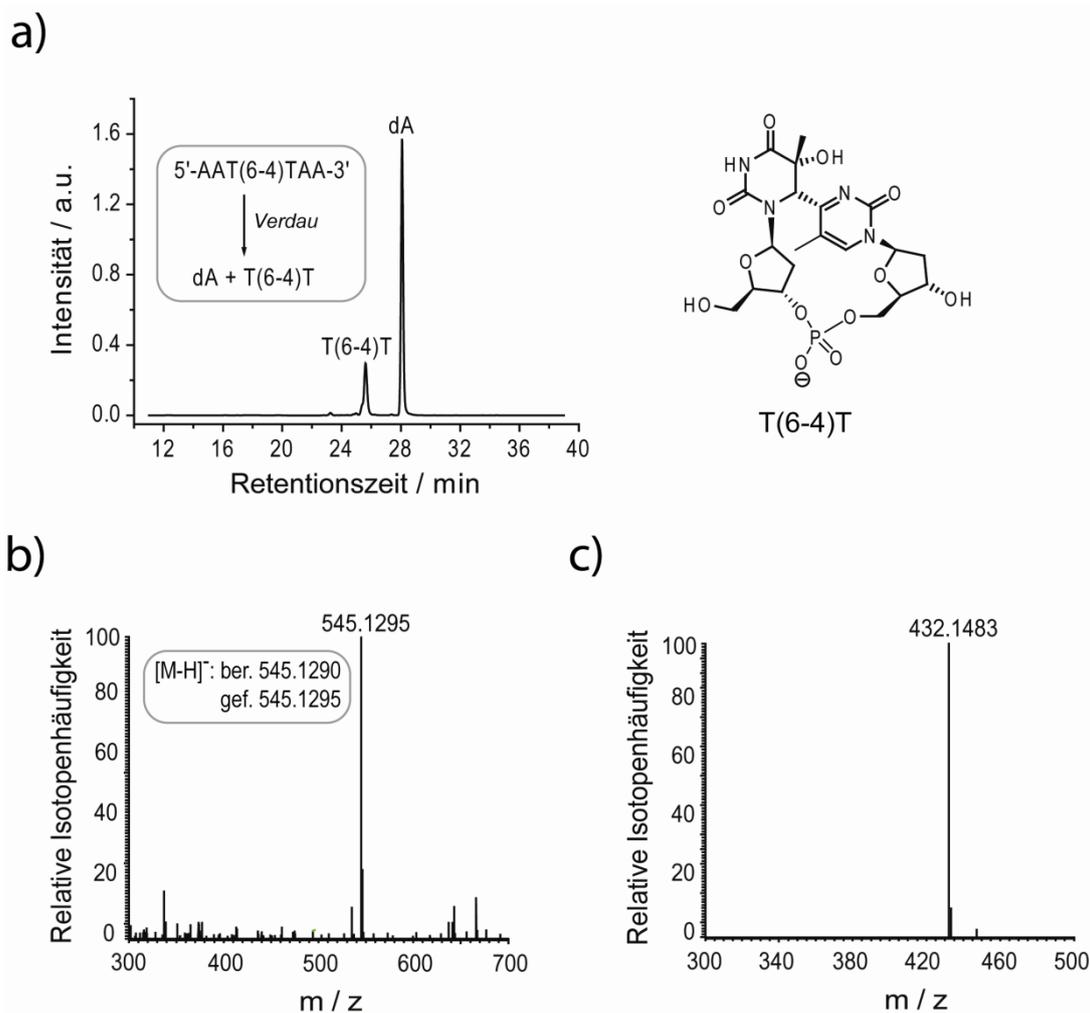


Abb. 24: HPLC, HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse von **ODN 1-(6-4)** mit T(6-4)T-Schaden nach enzymatischem Abbau. a) HPLC Analyse der Komponenten von **ODN 1-(6-4)** nach enzymatischem Abbau. b) HPLC-MS Analyse des T(6-4)T-Dinukleotids. c) HPLC-MS/MS Analyse des T(6-4)T-Dinukleotids. Das verwendete Verdau Protokoll **P1** und die HPLC Bedingungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Alle molekularen Massen wurden im negativen Ionenmodus des Massenspektrometers gemessen.

Aus Abbildung 24 ist deutlich zu erkennen, dass der T(6-4)T-Schaden mit sehr hoher Reinheit isoliert werden konnte. Nach dem enzymatischen Abbau können weder weitere Photoprodukte noch Edukt detektiert werden. Das erhaltene Molekulargewicht und das charakteristische Fragmentierungsmuster sind in vollen Einklang mit denen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen.^[43, 164]

Analog zu dem T(6-4)T-Schaden wurde auch **ODN 8-(6-4)** mit dem T(6-4)C-Schaden enzymatisch abgebaut und mittels HPLC-MS und HPLC-MS/MS analysiert (Abbildung 25).

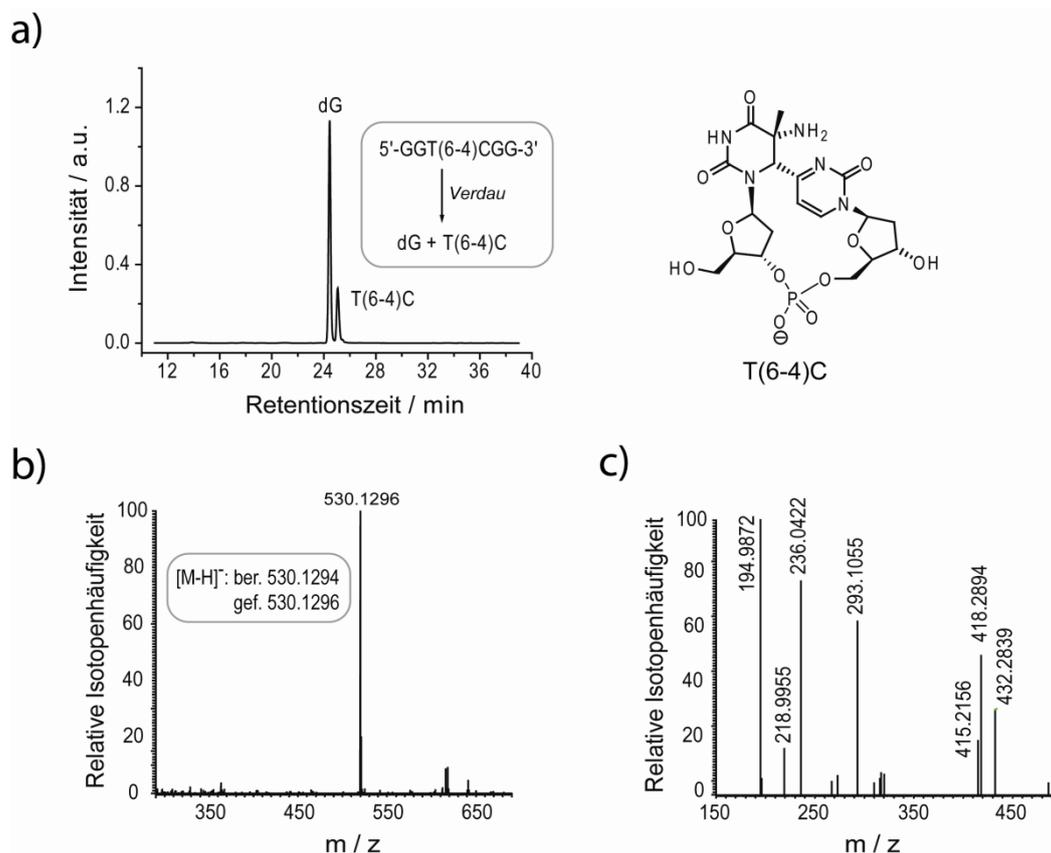


Abb. 25: HPLC, HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse von **ODN 8-(6-4)** mit T(6-4)C-Schaden nach enzymatischem Abbau. a) HPLC Analyse der Komponenten von **ODN 8-(6-4)** nach enzymatischem Abbau. b) HPLC-MS Analyse des T(6-4)C-Dinukleotids. c) HPLC-MS/MS Analyse des T(6-4)C-Dinukleotids. Das verwendete Verdau Protokoll **P1** und die HPLC Bedingungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Alle molekularen Massen wurden im negativen Ionenmodus des Massenspektrometers gemessen.

Der T(6-4)C-Schaden konnte ebenfalls ohne Verunreinigen isoliert und massenspektrometrisch nachgewiesen werden, wobei das erhaltene Fragmentierungsmuster sehr gut mit dem in der Literatur bekannten übereinstimmt.^[42] Die beiden (6-4)-Schäden T(6-4)T und T(6-4)C konnten somit mit sehr hoher Reinheit isoliert und anhand ihres Molekulargewichtes und der spezifischen Fragmentierungsmuster eindeutig zugeordnet werden. Als nächstes galt es, die beiden Dewar-Isomere der (6-4)-Schäden eindeutig zu charakterisieren und die Reinheit der isolierten Oligonukleotide zu überprüfen. Hierbei wurden die beiden isolierten Oligonukleotide **ODN 2-Dew** (mit T(Dew)T) und **ODN 8-Dew** (mit T(Dew)C) abermals nach dem Standardprotokoll **P1** enzymatisch abgebaut und analysiert (Abbildungen 26 und 27).

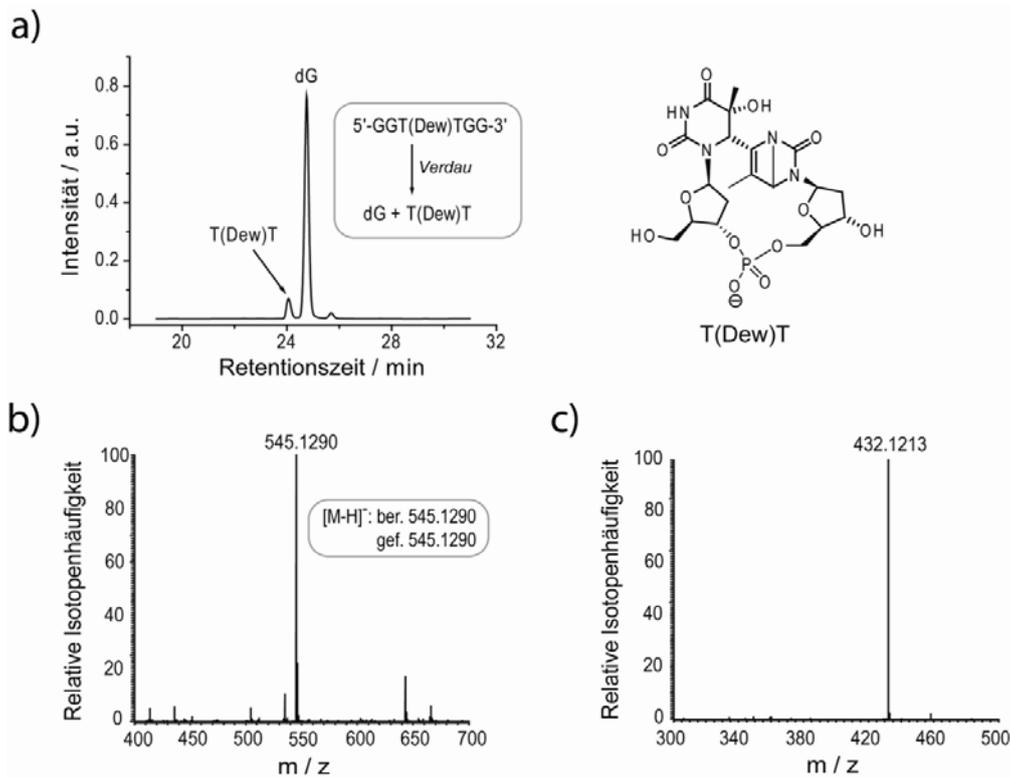


Abb. 26: HPLC, HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse von **ODN 2-Dew** mit T(Dew)T-Schaden nach enzymatischem Abbau. a) HPLC Analyse der Komponenten von **ODN 2-Dew** nach enzymatischem Abbau. b) HPLC-MS Analyse des T(Dew)T-Dinukleotids. c) HPLC-MS/MS Analyse des T(Dew)T-Dinukleotids. Das verwendete Verdau Protokoll **P1** und die HPLC Bedingungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Alle molekularen Massen wurden im negativen Ionenmodus des Massenspektrometers gemessen.

Die eindeutige Charakterisierung der Dewar-Isomere gelang zum einem durch das spezifische Fragmentierungsmuster, (welches identisch ist mit dem Fragmentierungsmuster der entsprechenden (6-4)-Schäden)^[42, 43, 164] und zum anderen anhand der fehlenden Absorption bei $\lambda > 300$ nm. Die beiden Dewar-Isomere T(Dew)T und T(Dew)C konnten somit ohne Verunreinigungen von anderen Photoprodukten in hoher Reinheit selektiv aus den aufgereinigten (6-4)-Schäden hergestellt und isoliert werden.

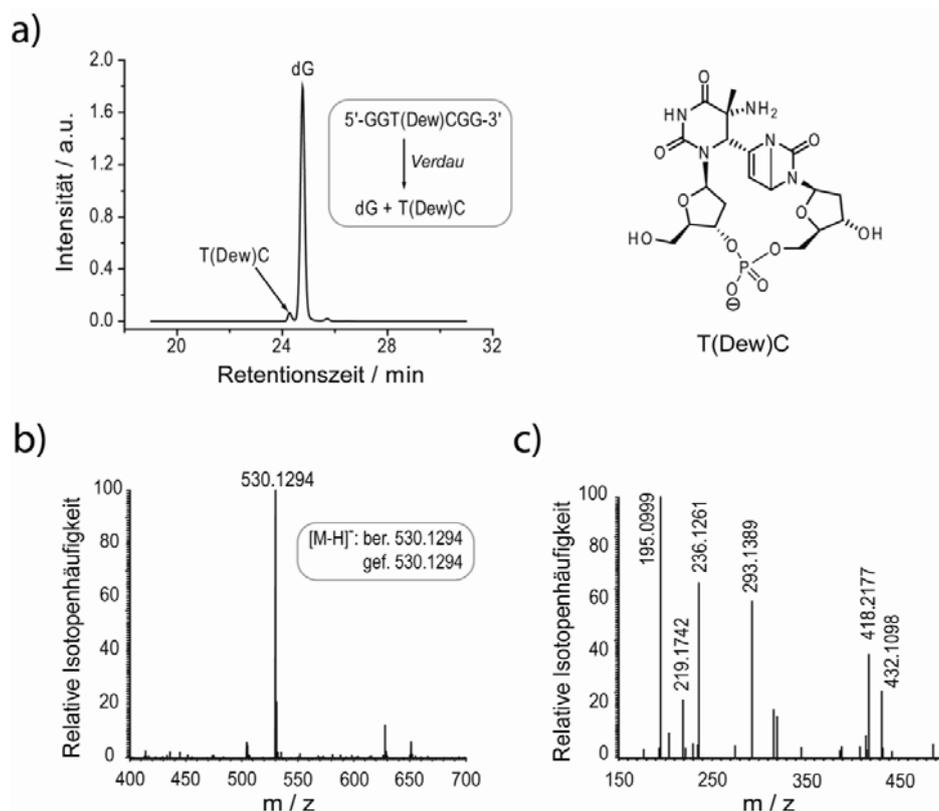


Abb. 27: HPLC, HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse von **ODN 8-Dew** mit T(Dew)C-Schaden nach enzymatischem Abbau. a) HPLC Analyse der Komponenten von **ODN 8-Dew** nach enzymatischem Abbau. b) HPLC-MS Analyse des T(Dew)C-Dinukleotids. c) HPLC-MS/MS Analyse des T(Dew)C-Dinukleotids. Das verwendete Verdau Protokoll **P1** und die HPLC Bedingungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Alle molekularen Massen wurden im negativen Ionenmodus des Massenspektrometers gemessen.

Für die neuartigen Photoschäden T(6-4)C* und T(Dew)C* gab es bis jetzt keinerlei Daten bezüglich ihres Fragmentierungsmusters, so dass dies ebenfalls durch enzymatischen Abbau eingehender untersucht werden sollte. Bei den durchgeführten enzymatischen Studien hat sich jedoch herausgestellt, dass sowohl der T(6-4)C*- als auch der T(Dew)C*-Schaden nicht bis auf die Dinukleotidebene abgebaut werden konnte. Obwohl doppelte Enzymmengen und längere Reaktionszeiten verwendet worden sind, gelang es nur, die Schäden auf das Trinukleotidniveau abzubauen, so dass am Schaden entweder am 5'- oder am 3'-Ende noch ein Guanin gebunden war. Um das Vorhandensein des T(6-4)C*- und T(Dew)C*-Schadens zu beweisen, wurde in einem Kontrollexperiment die entsprechende ungeschädigte DNA verdaut, um auszuschließen, dass der unvollständige Verdau mit dem artifiziellem Nukleosid *N*4-Methyl-dC in Zusammenhang steht.

3. Ergebnisse und Diskussion

Hierbei konnte die DNA aber komplett auf ihre Nucleoside abgebaut werden, so dass der unvollständige Verdau bei den Oligonucleotiden **ODN 13-(6-4)** und **ODN 13-Dew** nicht in Verbindung mit dem Nucleosid *N*4-Methyl-dC steht, sondern von den beiden Schäden T(6-4)C* und T(Dew)C* herrührt. Die besten Ergebnisse wurden mit dem leicht modifizierten Verdauprotokoll **P2** (siehe Exp. Teil) erzielt (Abbildung 28).

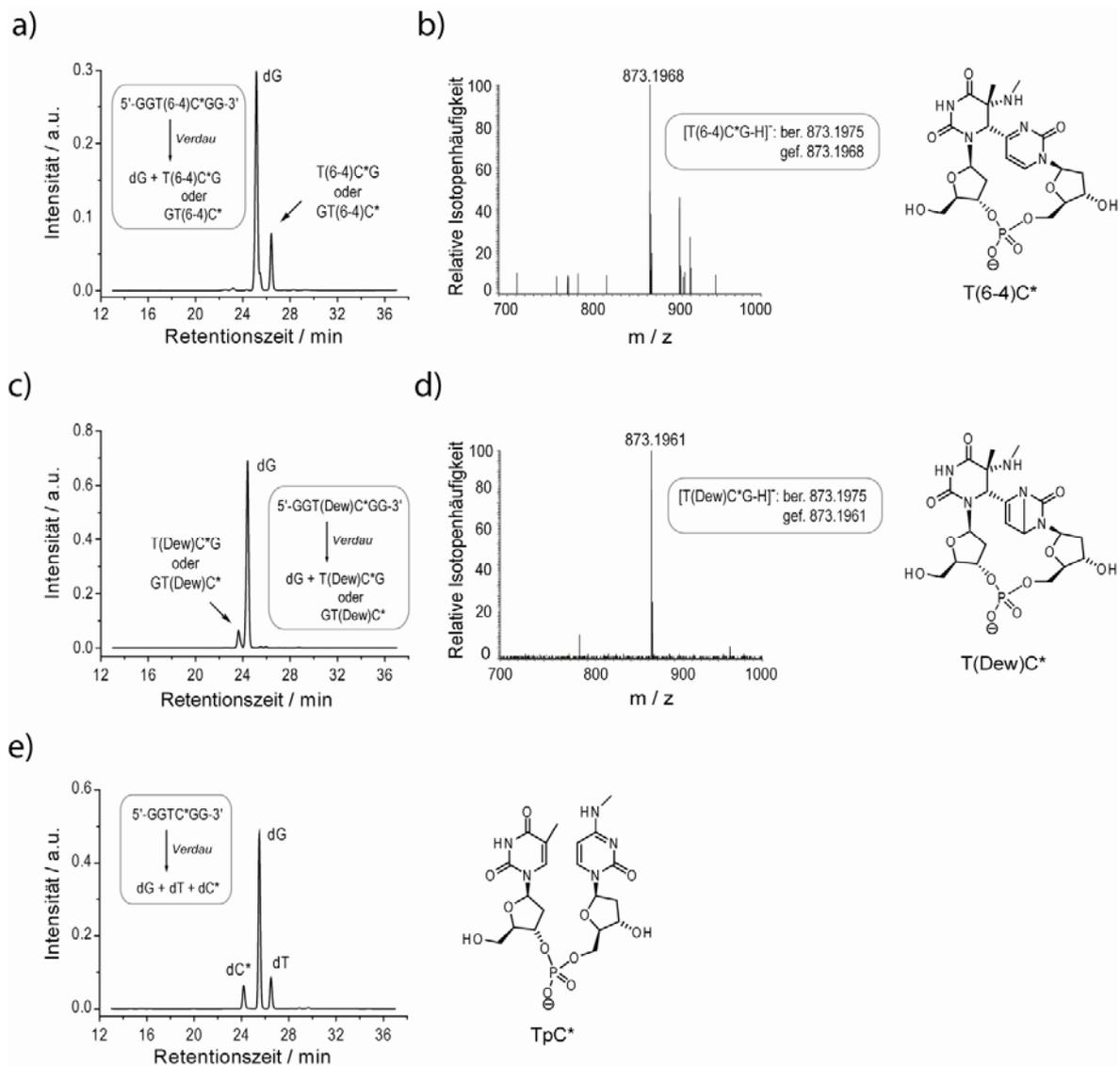


Abb. 28: HPLC und HPLC-MS Analyse von **ODN 13-(6-4)**, **ODN 13-Dew** sowie des entsprechenden ungeschädigten Oligonucleotids **ODN 13** (5'-GGTC*GG-3') nach enzymatischem Abbau. a) HPLC Analyse der Komponenten von **ODN 13-(6-4)** nach enzymatischem Abbau. b) HPLC-MS Analyse des T(6-4)C*G- bzw. GT(6-4)C*-Trinucleotids. c) HPLC Analyse der Komponenten von **ODN 13-Dew** nach enzymatischem Abbau. d) HPLC-MS Analyse des T(Dew)C*G- bzw. GT(Dew)C*-Trinucleotids. e) HPLC Analyse des ungeschädigten Oligonucleotids **ODN 13** nach enzymatischem Abbau. Das verwendete Verdau Protokoll **P2** und die HPLC Bedingungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Alle molekularen Massen wurden im negativen Ionenmodus des Massenspektrometers gemessen.

Aufgrund des unvollständigen enzymatischen Abbaus von **ODN 13-(6-4)** und **ODN 13-Dew** konnten demnach keine HPLC-MS/MS Daten der beiden Schäden T(6-4)C* und T(Dew)C* erhalten werden. Es konnte jedoch mit dem Kontrollexperiment, den Absorptionseigenschaften und den erhaltenen HPLC-MS Daten eindeutig gezeigt werden, dass sowohl der T(6-4)C*- als auch der T(Dew)C*-Schaden in sehr hoher Reinheit hergestellt und isoliert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die (6-4)-Schäden T(6-4)T, T(6-4)C und T(6-4)C* sowie die entsprechenden Dewar-Schäden T(Dew)T, T(Dew)C und T(Dew)C* in den in Tabelle 1 gezeigten Oligonukleotiden vorliegen. Mithilfe von HPLC, HPLC-MS und HPLC-MS/MS Experimenten konnten die Schäden eindeutig charakterisiert werden.

3.5 Reparaturstudien der (6-4)- und der (Dew)-Schäden

Um die Eigenschaft der in Tabelle 1 dargestellten Photoschäden bezüglich ihrer Substrateigenschaft für die (6-4)-Photolyase von *D. melanogaster* zu untersuchen, sollte ein möglichst einfacher und standardisierter Reparaturassay entwickelt werden. Aufbauend auf den Arbeiten von *Iwai* und Mitarbeitern wurde ein HPLC basierter Reparaturassay etabliert, der es ermöglicht, die Reparaturaktivität der (6-4)-Photolyase an kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden mit den unterschiedlichsten Photoschäden schnell zu bestimmen.^[142] Der große Vorteil dieser HPLC basierten Methode liegt darin, dass die Reparatur direkt bestimmt werden kann und man nicht den Umweg eines *restriction site restoration assays* gehen muss. Bei dieser Methode wird die Reparatur durch eine bestimmte Endonuklease nachgewiesen, welche die DNA nur an der reparierten Stelle schneiden kann, so dass man auf einem Polyacrylamidgel zwei DNA-Fragmente erhält.^[140, 141] Für die Optimierung und Etablierung des standardisierten HPLC-Verfahrens, wurde der Substratumsatz des T(6-4)T-Schadens in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern, wie z.B. Enzymkonzentration, Belichtungszeit und pH-Optimum bestimmt.

3.5.1 Bestimmung des pH-Optimums

Ähnlich den CPD-Photolyasen^[165] weisen die (6-4)-Photolyasen eine deutliche pH-Abhängigkeit bezüglich ihrer Reparaturaktivität auf.^[130] In diesem Zusammenhang konnten *Todo* und Mitarbeiter ein pH-Profil der (6-4)-Photolyase von *X. laevis* erstellen, wobei sie die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 8.5 feststellten. Wurde der pH-Wert auf 6.5 erniedrigt, so sank die Aktivität um den Faktor 2.4 ab. Eine Erhöhung des pH-Wertes lieferte ebenso eine leichte Absenkung der Enzymaktivität. Als Erklärung für die pH-Abhängigkeit dienen zwei hoch-konservierte Histidinreste, welche als Säure bzw. Base für die katalytische Aktivität verantwortlich sind und dementsprechend durch pH-Wert Änderungen stark beeinflusst werden können.^[130]

Für die Bestimmung des pH-Optimums der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* wurde analog den Arbeiten von *Todo* ebenso ein pH-Profil mit pH-Werten von 6.0 bis 8.6 erstellt. Der Reparaturassay wurde hierbei unter den im Experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen mit 100 pmol an **ODN 3-(6-4)** und 30 pmol Enzym durchgeführt und mittels HPLC analysiert. Wie man Abbildung 29 entnehmen kann, zeigt auch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* eine pH-Abhängigkeit auf. Im Gegensatz zur (6-4)-Photolyase aus *X. laevis* liegt ihr pH-Optimum bei etwa 7.6, wobei die Aktivität sowohl bei geringeren als auch höheren pH-Werten wieder abfällt. Alle folgenden Reparaturassays wurden dementsprechend bei einem pH-Wert von 7.6 durchgeführt.

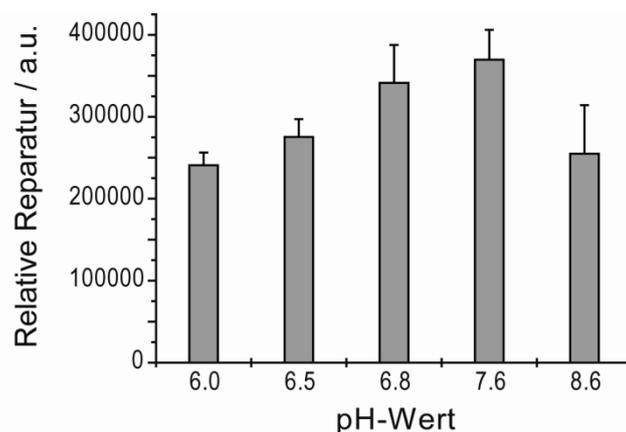


Abb. 29: Bestimmung des pH-Optimums der Reparatur der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* (die Werte sind ein Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen).

3.5.2 Bestimmung der optimalen Belichtungszeit sowie der Enzymmenge

Zur weiteren Optimierung des Reparatursystems wurden neben dem pH-Optimum der Photolyase noch die eingesetzte Enzymmenge und Reaktionszeit variiert. Die Aktivitätsassays wurden hierbei stets mit 100 pmol des T(6-4)T-Schadens enthaltenen Oligonukleotid **ODN 3-(6-4)** durchgeführt. Auf der einen Seite wurden unterschiedliche Mengen an Enzym (12 bis 100 pmol in Assaypuffer A, pH = 7.6) mit **ODN 3-(6-4)** für eine Stunde mit Weißlicht belichtet. Im Anschluss daran wurden die Proben hitzedenaturiert, abzentrifugiert und mittels analytischer HPLC analysiert (Abbildung 30).

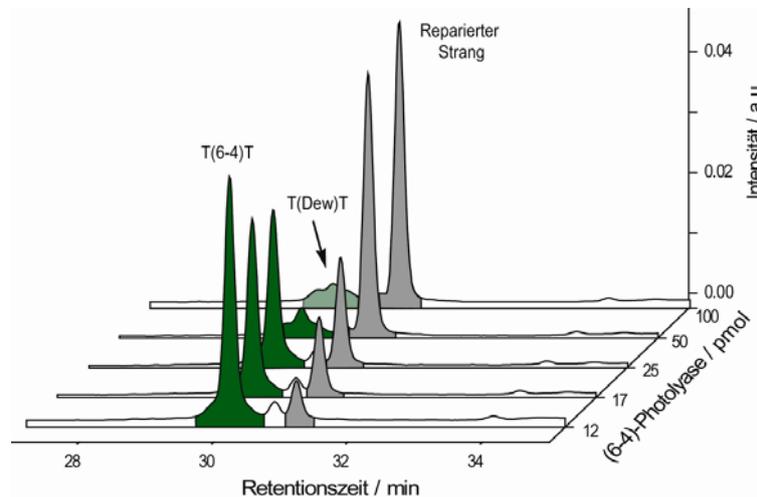


Abb. 30: Konzentrationsabhängiges 3D-HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) der Reparatur von **ODN 3-(6-4)** mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*.

In Abbildung 30 erkennt man deutlich den steigenden Umsatz des T(6-4)T-Schadens (grün) zum ungeschädigten Strang (grau) mit steigender Enzymmenge. Eine vollständige Reparatur des (6-4)-Schadens tritt erst bei der Verwendung von äquimolaren Mengen an Enzym auf, wobei aufgrund der Belichtungsbedingungen eine kleine Menge an T(Dew)T gebildet wird.

Auf der anderen Seite wurden nunmehr 100 pmol der (6-4)-Photolyase mit **ODN 3-(6-4)** über einen Zeitraum von einer bis 60 Minuten mit Weißlicht belichtet und analysiert. Wie man Abbildung 31 entnehmen kann, ist die Abnahme des T(6-4)T-Schadens (grün) mit gleichzeitiger Zunahme des reparierten Strangs in Abhängigkeit der Belichtungszeit

erkennbar. Für einen vollständigen Umsatz war eine Belichtungszeit von 60 Minuten erforderlich.

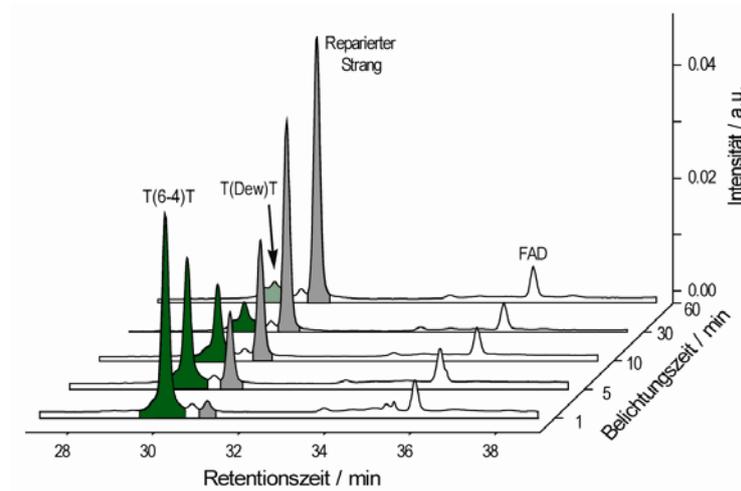


Abb. 31: Zeitabhängiges 3D-HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) der Reparatur von **ODN 3-(6-4)** mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*.

Für einen Standardaktivitätsassay wurden somit folglich äquimolare Mengen an DNA und (6-4)-Photolyase in 100 μ L Assaypuffer A (50 mM Tris-HCl, pH = 7.6, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin in *ddH*₂O) gelöst, für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Weißlicht belichtet, das Enzym hitzedenaturiert, abzentrifugiert und der Überstand mittels analytischer HPLC analysiert.

3.5.3 Aktivitätsstudien der (6-4)-Photolyase mit (6-4)-Schäden

Mit dem etablierten Standardaktivitätsassay konnte die gereinigte (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* sehr schnell und einfach auf ihre Aktivität und Fähigkeit der Photoreaktivierung diverser (6-4)-Schäden untersucht werden. Wie in Abbildung 32 gezeigt wird, werden die beiden (6-4)-Schäden T(6-4)T und T(6-4)C sehr effizient von der (6-4)-Photolyase repariert.^[166]

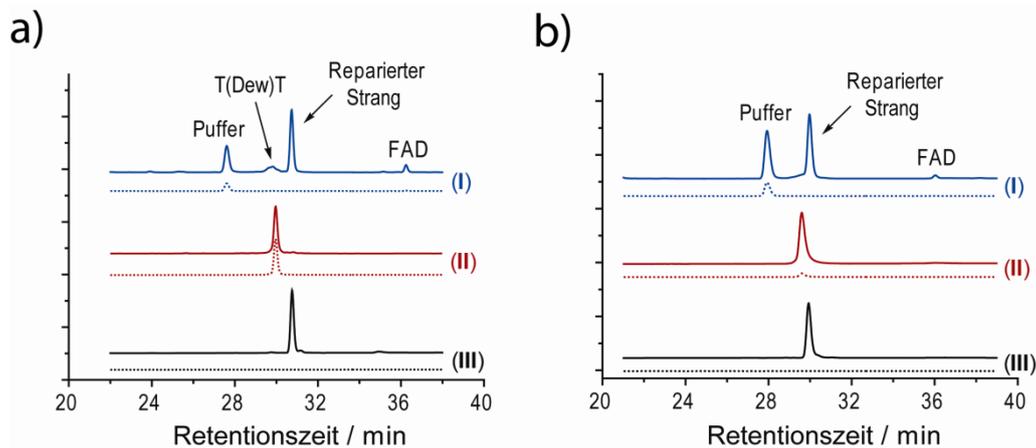


Abb. 32: Analytische *reversed-phase* HPLC Analyse (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) der Photoreaktivierung von a) **ODN 3-(6-4)** mit dem T(6-4)T-Schaden und b) **ODN 9-(6-4)** mit dem T(6-4)C Schaden durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. **(I)** Reparaturassay. **(II)** Chromatogramm von **ODN 3-(6-4)** und **ODN 9-(6-4)** mit dem zentralen (6-4)-Schaden. **(III)** Chromatogramm von **ODN 3** und **ODN 9** ohne (6-4)-Schaden. Die Elution wurde bei 260 nm (durchgezogene Linien) und 325 nm (gestrichelte Linien) detektiert.

In Abbildung 32 kann man deutlich erkennen, dass das charakteristische Absorptionsmaximum der beiden (6-4)-Schäden (gestrichelte Linien) nach der Reparatur mit der (6-4)-Photolyase vollständig verschwunden ist, wobei ein neues Maximum bei der entsprechenden Retentionszeit des ungeschädigten Oligonukleotids auftritt. Zum Vergleich wurden die Chromatogramme der beiden (6-4)-Schäden **(II)** und der entsprechenden ungeschädigten Oligonukleotide **(III)** ebenfalls dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die (6-4)-Photolyase eine vollständige Reparatur von beiden Schäden durchführt. Durch die Belichtungsbedingungen kann im Falle des T(6-4)T-Schadens während der Reparatur eine geringe Bildung des T(Dew)T-Isomers festgestellt werden, jedoch nicht im Falle des T(6-4)C-Schadens. Dieser Effekt kann mit der längeren Umwandlungszeit des T(6-4)C-Schadens zu seinem Dewar-Isomer verglichen mit dem T(6-4)T-Schaden erklärt werden (siehe Kapitel 3.3.1). Für die Isomerisierung des T(6-4)C- zum T(Dew)C-Schaden ist eine einstündige Belichtung mit Weißlicht nicht ausreichend.

Reparaturstudien unter den Standardbedingungen von **ODN 3-(6-4)** und **ODN 9-(6-4)** in Abhängigkeit von der Enzymmenge haben gezeigt, dass beide Schäden in etwa mit der gleichen Effizienz repariert werden (Abbildung 33). Dieser Sachverhalt wurde bereits früher von *Sancar* und *Todo* beobachtet, welche eine Reparaturquantenausbeute von $\phi \sim 0.05 - 0.11$ für beide Schäden bestimmten.^[38, 140, 141]

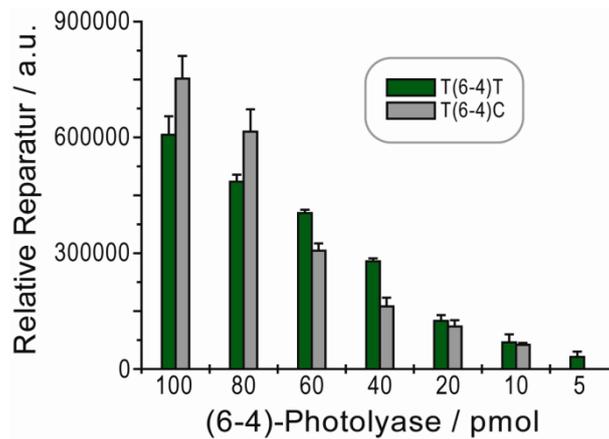


Abb. 33: Bestimmung der Reparatureffizienz von **ODN 3-(6-4)** (grün) und **ODN 9-(6-4)** (grau) durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* (die Werte sind ein Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen).

Bei den Reparaturassays mit dem leicht modifizierten (6-4)-Schaden T(6-4)C* konnte unter den Standardbedingungen keinerlei Reparatur festgestellt werden. Erst ein Überschuss von zehn Äquivalenten an (6-4)-Photolyase führte zur Reparatur, so dass die Effizienz der Reparatur deutlich unter derer von den beiden (6-4)-Schäden T(6-4)T und T(6-4)C ist (Abbildung 34).

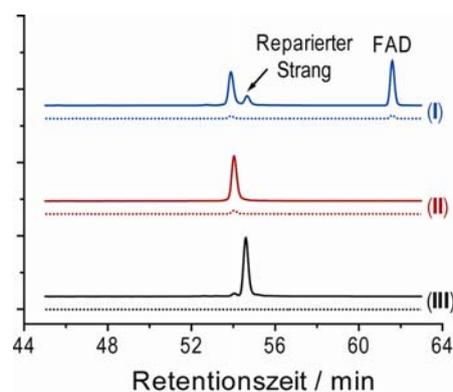


Abb. 34: Analytische *reversed-phase* HPLC Analyse (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 17 % B in 60 min, Fluss 0.5 mL/min) der Photoreaktivierung von **ODN 14-(6-4)** mit dem T(6-4)C*-Schaden durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. **(I)** Reparaturassay. **(II)** Chromatogramm von **ODN 14-(6-4)** mit dem zentralen T(6-4)C*-Schaden. **(III)** Chromatogramm von **ODN 14** ohne den (6-4)-Schaden. Die Elution wurde bei 260 nm (durchgezogene Linien) und 325 nm (gestrichelte Linien) detektiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der HPLC basierte Assay eine schnelle und einfache Methode darstellt, um die Reparatureffizienz der (6-4)-Photolyase bezüglich diverser (6-4)-Schäden zu bestimmen. Darüberhinaus kann man mit der Methode zudem sehr schnell die allgemeine Reparaturaktivität von frisch aufgereinigten bzw. weggefrorenen Enzympräparationen kontrollieren, bevor man diese für weitere Studien oder Kristallisationsexperimente einsetzt.

3.5.4 Aktivitätsstudien der (6-4)-Photolyase mit Dewar-Schäden als Substrat

Im Gegensatz zu den (6-4)-Schäden wird die Photoreaktivierung der entsprechenden Dewar-Schäden in der Literatur kontrovers diskutiert. *Sancar* und Mitarbeiter konnten anhand eines *restriction site restoration assays* eine geringe Reparatur des T(Dew)T-Schadens durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* beobachten, wobei die Quantenausbeute nur 0.3 % ($\phi \sim 2 \times 10^{-3}$) verglichen zu den T(6-4)T- und T(6-4)C-Schäden betrug.^[140] Im Kontrast zu den Ergebnissen von *Sancar* und Mitarbeitern haben allerdings Arbeiten von *Todo* und *Iwai* mit der (6-4)-Photolyase aus *X. laevis* keine Reparatur des T(Dew)T-Photoproduktes zeigen können, auch wenn längere Belichtungszeiten bzw. höhere Enzymkonzentrationen verwendet worden sind.^[141, 142] Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden im Rahmen dieser Arbeit die beiden Dewar-Isomere T(Dew)T und T(Dew)C ebenfalls auf die Möglichkeit der Reparatur durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* untersucht. Analog zu den Arbeiten von *Iwai* und Mitarbeitern wurde die Belichtungszeit mit Weißlicht von einer bis auf sieben Stunden verlängert sowie ein Überschuss von zehn Äquivalenten an (6-4)-Photolyase eingesetzt.^[142] In Abbildung 35 sind die erhaltenen HPLC Chromatogramme der Photoreaktivierung der Oligonukleotide **ODN 3-Dew** und **ODN 9-Dew** durch die (6-4)-Photolyase dargestellt.^[166]

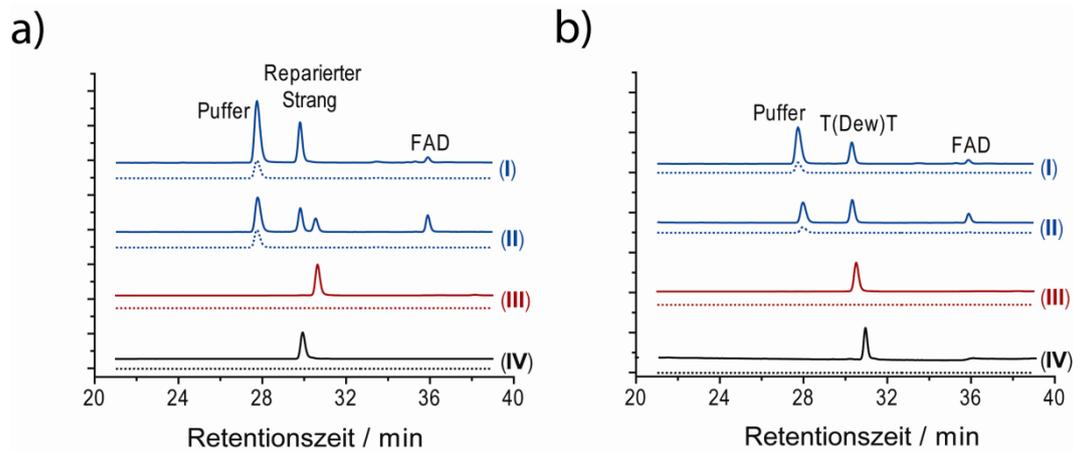


Abb. 35: Analytische *reversed-phase* HPLC Analyse (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) der Photoreaktivierung von a) **ODN 9-Dew** mit dem T(Dew)C-Schaden und b) **ODN 3-Dew** mit dem T(Dew)T Schaden durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. **(I)** Reparaturassay nach 7 h Belichtung. **(II)** Reparaturassay nach 1 h Belichtung. **(III)** Chromatogramm von **ODN 3-Dew** und **ODN 9-Dew** mit dem zentralen (Dew)-Schaden. **(IV)** Chromatogramm von **ODN 3** und **ODN 9**. Die Elution wurde bei 260 nm (durchgezogene Linien) und 325 nm (gestrichelte Linien) detektiert.

Wie man Abbildung 35a entnehmen kann, ist die (6-4)-Photolyase in der Lage, den T(Dew)C-Schaden zu reparieren. Bereits nach einer Stunde Reaktionszeit ist mehr als die Hälfte des Schadens repariert, wobei nach sieben Stunden kein T(Dew)C-Schaden mehr nachweisbar war. Die Reparatur war somit vollständig. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Todo* und *Iwai* konnte bei dem T(Dew)T-Schaden keinerlei Reparatur festgestellt werden (siehe Abb. 35b)^[141, 142]

Reparaturstudien mit dem T(Dew)C*-Schaden wurden analog zu den T(Dew)T- und T(Dew)C-Schäden mit einer verlängerten Belichtungszeit von sieben Stunden sowie einem Überschuss von zehn Äquivalenten an (6-4)-Photolyase durchgeführt (siehe Abbildung 36).

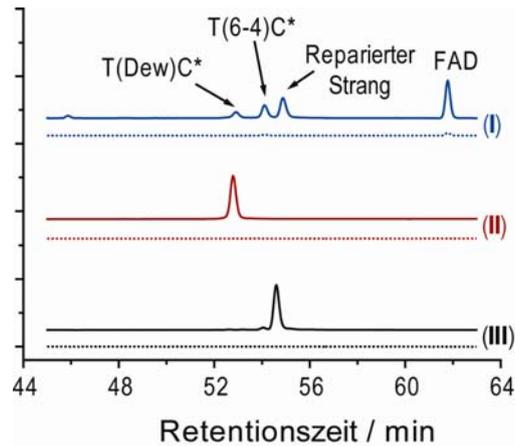


Abb. 36: Analytische *reversed-phase* HPLC Analyse (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 17 % B in 60 min, Fluss 0.5 mL/min) der Photoreaktivierung von **ODN 14-Dew** mit dem T(Dew)C*-Schaden durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. **(I)** Reparaturassay. **(II)** Chromatogramm von **ODN 14-Dew** mit dem zentralen T(Dew)C*-Schaden. **(III)** Chromatogramm von **ODN 14** ohne den T(Dew)C*-Schaden. Die Elution wurde bei 260 nm (durchgezogene Linien) und 325 nm (gestrichelte Linien) detektiert.

Bei dem in Abbildung 36 gezeigten Reparaturassay des T(Dew)C*-Schadens konnte neben dem Edukt und dem reparierten DNA-Strang überraschenderweise ein weiterer DNA-Strang beobachtet werden, welcher die gleiche Retentionszeit wie **ODN 14-(6-4)** mit dem T(6-4)C*-Schaden aufweist. Zur eindeutigen Charakterisierung der erhaltenen DNA-Stränge nach dem Reparaturassay, wurde der Assay nochmals in einem größeren Maßstab durchgeführt, so dass alle drei Stränge isoliert, enzymatisch abgebaut und mittels HPLC und HPLC-MS analysiert werden konnten (Abbildung 37).

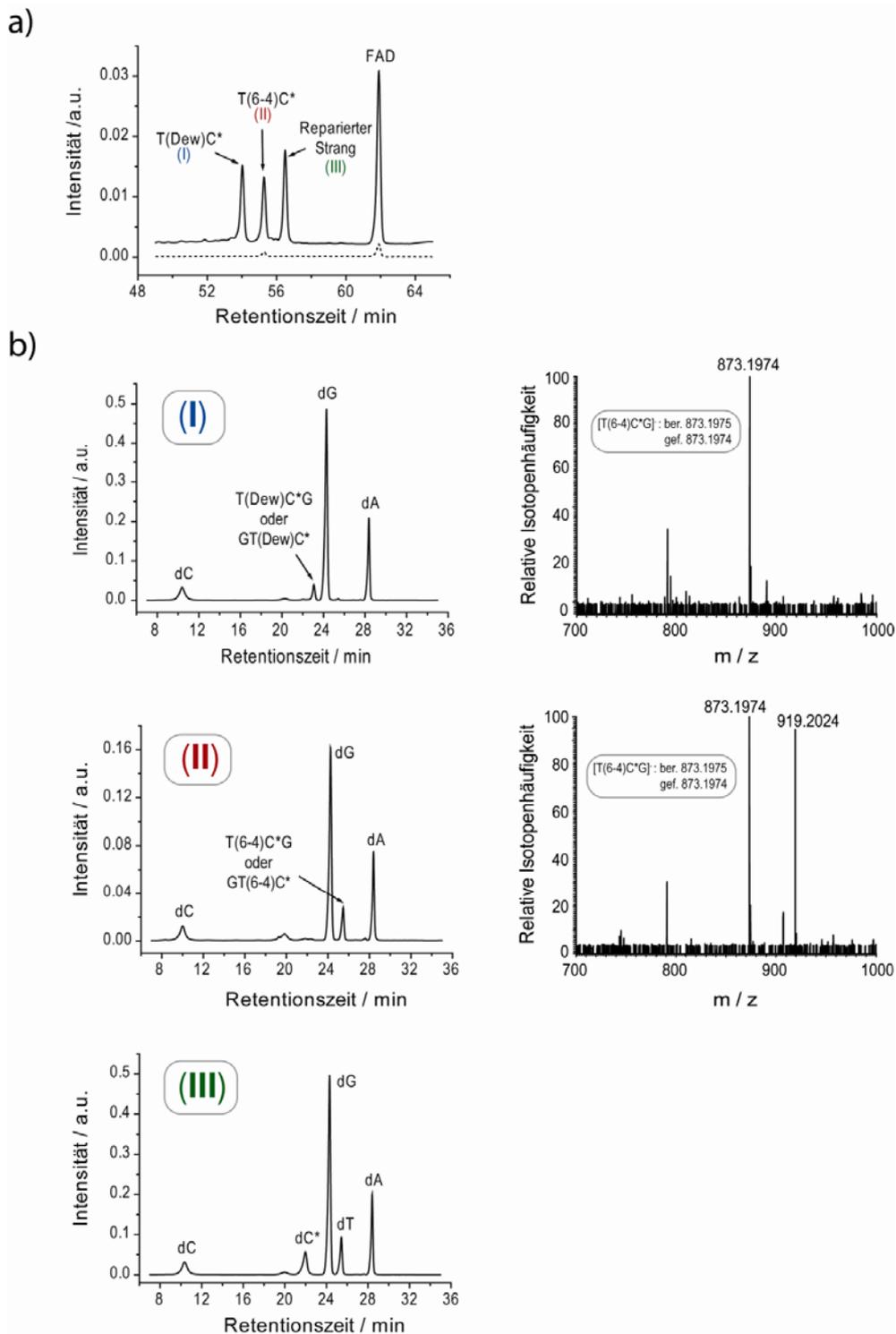


Abb. 37: Analyse der Reparaturreaktion von **ODN 14-Dew** mit der (6-4)-Photolyase mittels analytischer HPLC sowie HPLC-MS Analyse der enzymatisch abgebauten Reparaturprodukte des Assays. a) HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 17 % B in 60 min, Fluss 0.5 mL/min) des Reparaturassay von **ODN 14-Dew** mit 10 eq (6-4)-Photolyase nach 3 h Belichtung mit Weißlicht. b) Analyse der Reparaturprodukte nach enzymatischem Abbau mittels HPLC-MS. Das verwendete Verdau Protokoll **P2** und die HPLC Bedingungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Alle molekularen Massen wurden im negativen Ionenmodus des Massenspektrometers gemessen.

Die erhaltenen Daten belegen eindeutig, dass während der Reparatur des T(Dew)C*-Schadens der korrespondierende (6-4)-Schaden als Intermediat auftritt, wobei anschließend ausgehend von dem (6-4)-Schaden die Reparatur zu den intakten Basen erfolgt. Anscheinend erlaubt die sehr langsame Reparatur des T(6-4)C*-Schadens durch die (6-4)-Photolyase die Anreicherung des Schadens als Reparaturintermediat. Im Fall des natürlichen T(Dew)C-Schadens verhindert die relativ schnelle Reparatur des T(6-4)C-Schadens dessen Anhäufung und Nachweis als Intermediat. Belichtungen der beiden Dewar-Schäden T(Dew)C und T(Dew)C* mit Weißlicht ohne (6-4)-Photolyase führte zu keinen Änderungen. Die (6-4)-Photolyase ist damit essentiell für die Umlagerung der Dewar- zu den (6-4)-Schäden. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde analog zu den Arbeiten von *Jorns*, anstatt der Photolyase eine vollständig reduzierte FADH-Lösung verwendet. Hierbei sollte ausgeschlossen werden, dass die Reparatur von freigesetztem FAD eines denaturierenden Proteins erfolgt, wie es bei CPD-Schäden prinzipiell möglich ist.^[167] In diesem Experiment konnte keine Reparatur beobachtet werden, wobei anzumerken ist, dass sich die DNA bei hohen FADH-Konzentrationen zersetzte. Um weitere Erkenntnisse bezüglich der unterschiedlichen Reparatureigenschaften der Dewar-Isomere zu gewinnen, wurden weitere Reparaturstudien mit allen Dewar-Isomeren und einer Reparatur defizienten H365N Mutante (siehe Kapitel 3.7.5) der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* durchgeführt. Desweiteren wurden Reparaturexperimente mit der (6-4)-Photolyase durchgeführt, welche aber den Cofaktor FAD in seinem oxidierten Zustand enthielt (Abbildung 38).

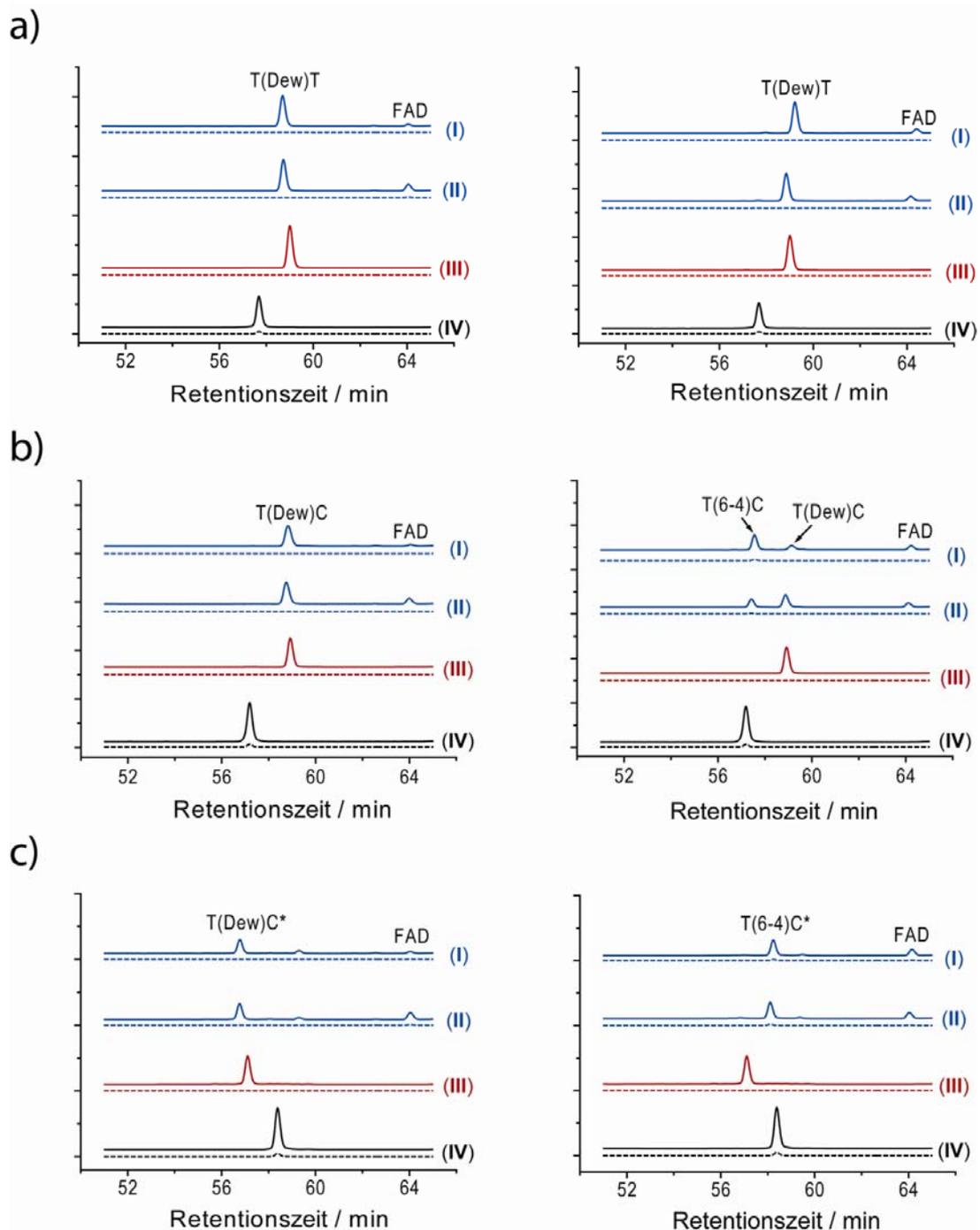


Abb. 38: Analytische *reversed-phase* HPLC Analyse (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 17 % B in 60 min, Fluss 0.5 mL/min) der möglichen Photoreaktivierung durch die oxidierte (6-4)-Photolyase (links) und der Mutante H365N (rechts) der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* von a) **ODN 3-Dew** mit dem T(Dew)T-Schaden, b) **ODN 9-Dew** mit dem T(Dew)C Schaden und c) **ODN 14-Dew** mit dem T(Dew)C*-Schaden. **(I)** Assay nach 7 h Belichtung. **(II)** Assay nach 3 h Belichtung. **(III)** Chromatogramm von **ODN 3-Dew**, **ODN 9-Dew** und **ODN 14-Dew** mit den zentralen (Dew)-Schäden. **(IV)** Chromatogramm von **ODN 3-(6-4)**, **ODN 9-(6-4)** und **ODN 14-(6-4)** mit den zentralen (6-4)-Schäden. Die Elution wurde bei 260 nm (durchgezogene Linien) und 325 nm (gestrichelte Linien) detektiert.

In den Experimenten mit der H365N Mutante konnte für die beiden Dewar-Schäden T(Dew)C und T(Dew)C* eine Akkumulierung der entsprechenden (6-4)-Schäden beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war im Fall des T(Dew)T-Schadens keine T(6-4)T-Entstehung nachweisbar, was zeigt, dass hier die Dewar zu (6-4)-Umwandlung nicht möglich ist. Mit dem oxidierten Enzym konnte in keinem der Fälle eine Umwandlung zu den (6-4)-Schäden beobachtet werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Umwandlung des T(Dew)C- und des T(Dew)C*-Schadens während der Reparatur zu den (6-4)-Schäden ein elektronenkatalysierter Prozess ist, wobei das Enzym die ursprüngliche 4π sigmatrope Umlagerung zu den Dewar-Isomeren durch Injektion eines Elektrons in das System wieder umkehrt. Dieser Sachverhalt steht im Einklang mit einer theoretischen Studie von *Taylor* und Mitarbeitern^[134].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reparatur der Dewar-Schäden durch die (6-4)-Photolyase formal eine 4π sigmatrope Umlagerung zu den entsprechenden (6-4)-Schäden beinhaltet, welche anschließend von dem Enzym in die reparierten Dinukleotide gespalten werden. Diese Umlagerung scheint der ratenbestimmende Schritt zu sein. Diese Beobachtung deutet stark darauf hin, dass die (6-4)-Photolyase zwei katalytische Funktionen besitzt. Zum einen repariert sie verschiedenste (6-4)-Photoschäden und zum anderen katalysiert sie die lichtabhängige Umwandlung der TC-Dewar-Schäden in die entsprechenden TC-(6-4)-Schäden, welche anschließend repariert werden können. Die unter unseren Bedingungen nicht nachweisbare Reparatur des T(Dew)T-Schadens könnte dadurch erklärt werden, dass eine effiziente Elektroneninjektion in die Dewar-Isomere ein elektronenarmes Ringsystem benötigt, wie es zum Beispiel durch eine protonierte Aminogruppe in den Cytidin enthaltenen Schäden der Fall wäre. Dementsprechend könnte man die sehr langsame T(Dew)T-Reparatur als ein Resultat eines ungünstigen Elektronentransferschritts ansehen.

3.6 Charakterisierung der (6-4)-Photolyase

3.6.1 Homologievergleich der Photolyase/Cryptochrom Superfamilie

Neben der in dieser Arbeit verwendeten (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*^[38, 123, 168] konnten bisher sieben weitere (6-4)-Photolyasen aus anderen Organismen eindeutig zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich um die (6-4)-Photolyasen aus *Arabidopsis thaliana*,^[124-126] *Crotalus atrox*,^[128] *Danaus plexipus*,^[169] *Danio rerio*,^[170] *Dunaliella salina*,^[171] *Halobacterium salinarum*^[172] und *Xenopus laevis*.^[127, 128] Die Konsensusidentität beträgt hierbei 73 %, wobei die Sequenzidentität lediglich bei 25 % liegt (Abbildung 39), so dass die Unterscheidung zwischen den (6-4)-Photolyasen, den CPD-Photolyasen und den Cryptochromen aufgrund der Primärstruktur sehr schwer ist. Der in Abbildung 41b dargestellte phylogenetische Vergleich zeigt die enge Verwandtschaft der Cryptochrome zu den eukaryotischen (6-4)-Photolyasen auf. Die Sequenzidentität zwischen den CPD- und den (6-4)-Photolyasen liegt im Allgemeinen zwischen 13 – 30 % (Konsensusidentität: 24 %), wobei dieser Wert zwischen den (6-4)-Photolyasen und den Cryptochromen sogar 44 – 53 % (Konsensusidentität: bis zu 84 %) beträgt. Im Vergleich zur Gesamtsequenz ist der C-terminale Bereich der (6-4)- und CPD-Photolyasen hochkonserviert, so dass hier teilweise die Identität zwischen der (6-4)-Photolyase aus *X. laevis* und der CPD-Photolyase aus *E. coli* bei 36 % liegt, obwohl die Gesamtidentität nur 24 % beträgt.^[130] Die für die DNA-Bindung und Reparatur entscheidenden Faktoren wie das aktive Zentrum und ein Großteil der an der FAD-Cofaktor Bindung beteiligten Aminosäuren befinden sich in diesem C-terminalen Bereich. Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten und der hoch-konservierten Reste im C-terminalen Bereich, zeigen die (6-4)- und CPD-Photolyasen sowie die Cryptochrome erhebliche Unterschiede bezüglich der DNA-Bindung, Substratspezifität und katalytischen Aktivität auf.

3. Ergebnisse und Diskussion

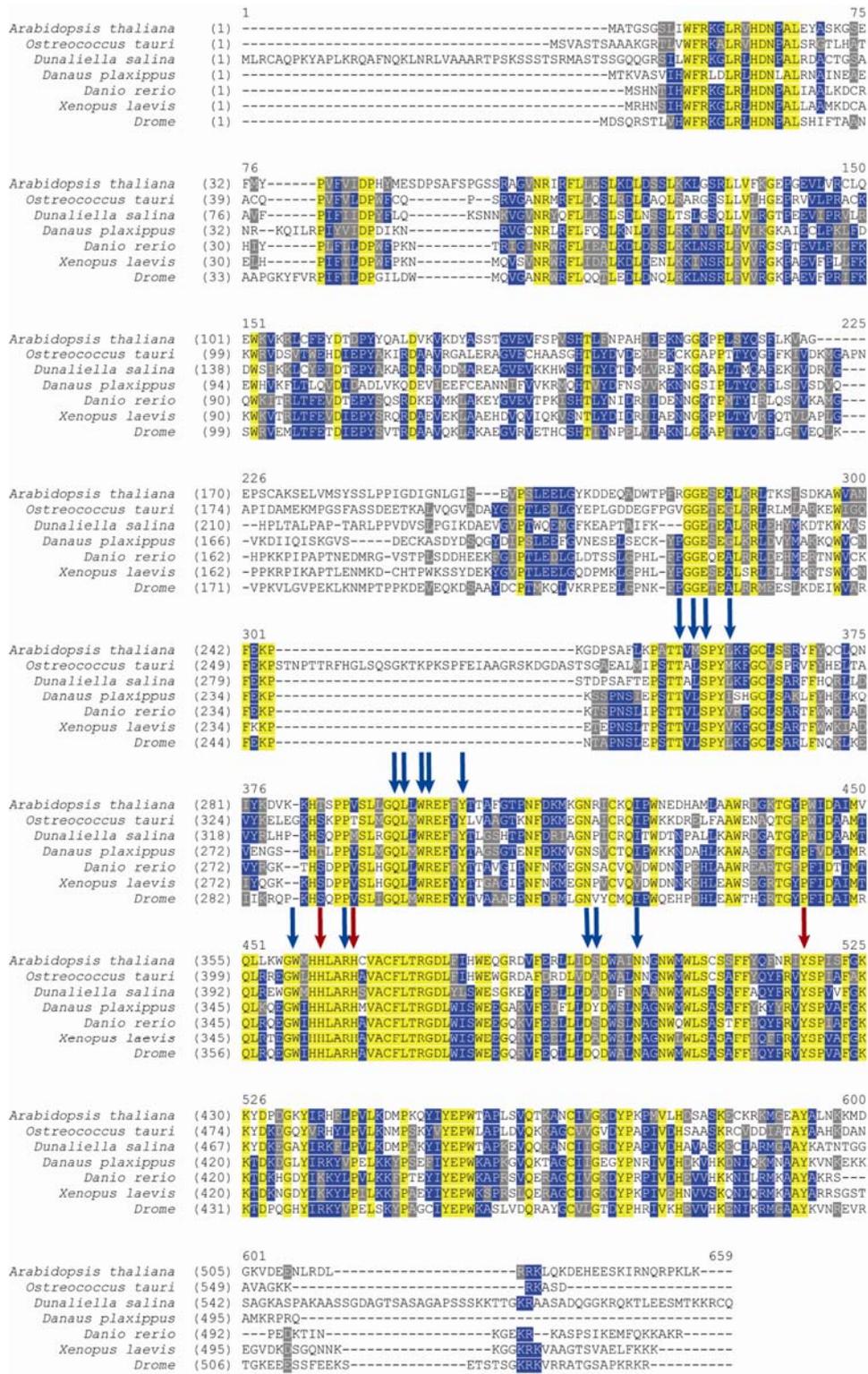


Abb. 39: Sequenzvergleich einiger (6-4)-Photolyasen. Identische Aminosäuren sind in gelb, konservierte in blau und ähnliche in grau dargestellt. Die katalytisch wichtigen Reste sind mit roten Pfeilen markiert. Konservierte Aminosäuren, welche an der FAD-Bindung beteiligt sind, sind mit blauen Pfeilen markiert (erstellt in *Vektor NTI*).

Durch Punktmutationsstudien im aktiven Zentrum der (6-4)-Photolyase aus *X. laevis* konnten *Todo* und Mitarbeiter zwei konservierte Histidinreste (His354 und His358, rot markiert in Abbildung 39) charakterisieren, welche essentiell für die katalytische Aktivität der (6-4)-Photolyase sind.^[130] Diese beiden konservierten Histidine bieten somit bei der Suche nach neuen (6-4)-Photolyasen anhand des *BLAST search* (NCBI) eine gezielte Möglichkeit, (6-4)-Photolyasen von den Cryptochromen bzw. CPD-Photolyasen zu unterscheiden. Die CPD-Photolyasen weisen ihrerseits ebenfalls zwei hoch-konservierte Reste auf, wobei es sich hier um Asparagin und Methionin handelt (Abbildung 40, rot markiert).

<i>CPD Anacystis</i>	(344)	GWMHNR CRMI VASFLTK-DL	(404)	RI FN EPASQAKKFD
<i>CPD E.coli</i>	(338)	GWMHNR LRMI TASFLVK-DL	(398)	RI FN PTTQGEKFD
(6-4) <i>Danio rerio</i>	(350)	GW IHH LARH AV ACFLTRGDL	(410)	R Y SE PI AFGKKTD
(6-4) <i>Xenopus laevis</i>	(350)	GW IHH LARH AV ACFLTRGDL	(410)	R Y SE VI AFGKKTD
(6-4) <i>Drome</i>	(361)	GW IHH LARH AV ACFLTRGDL	(421)	R Y SE VI AFGKKTD
(6-4) <i>Ostreococcus tauri</i>	(404)	GW LHH LARH AV ACFLTRGDL	(464)	R Y SE PI AFAKKYD

Abb. 40: Sequenzvergleich zwischen dem angenommenen aktiven Zentrum einiger (6-4)- und CPD-Photolyasen. Identische Reste sind in gelb und konservierte Reste in grau hinterlegt. Die für die Katalyse wichtigen Reste sind mit rot gekennzeichnet. Zum Vergleich sind die Aminosäuren in den entsprechenden Positionen der CPD-Photolyasen dargestellt.

Anhand eines *BLAST search* konnte eine potentielle bisher nicht bekannte (6-4)-Photolyase aus dem Organismus *Ostreococcus tauri* *OTH95* identifiziert werden.^[173-176] Der Organismus *Ostreococcus tauri* ist der kleinste bisher bekannte freilebende Eukaryot und gehört der Familie der Grünalgen an. In dieser Familie der Grünalgen gehört er einer der ältesten Gruppe der photosynthetisch aktiven Eukaryoten an, den sogenannten *Prasinophyceae*.

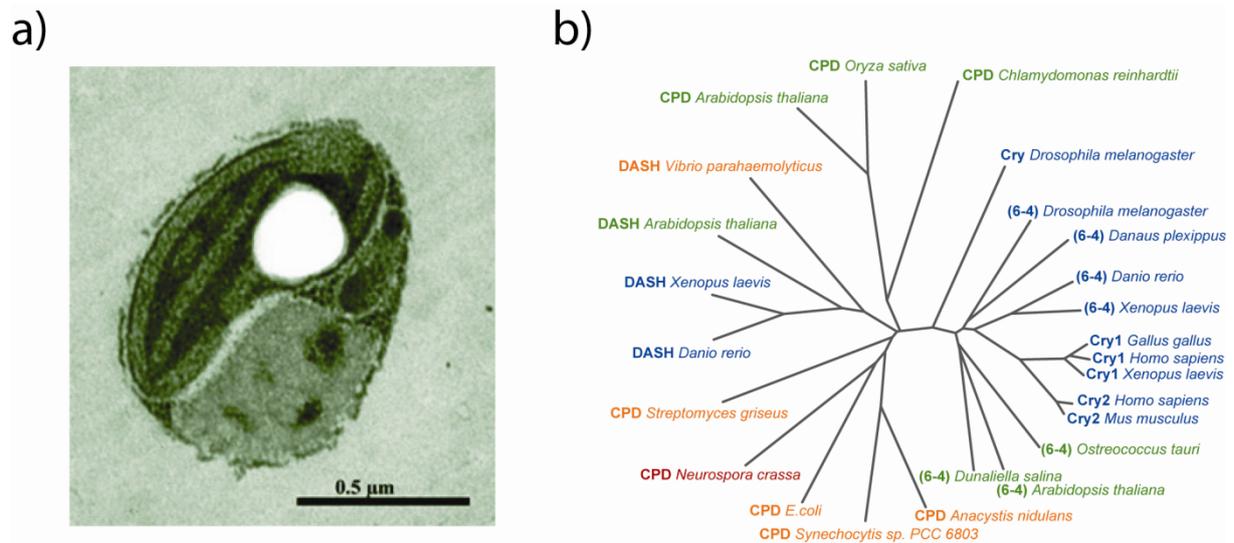


Abb. 41: a) *Ostreococcus tauri* OTH95. Photo: Hervé Moreau, Laboratoire Arago. b) Phylogenetische Analyse einiger (6-4)- und CPD-Photolyasen sowie Cryptochrome. Eukaryotische Enzyme sind in blau, Pflanzen in grün, Bakterien in orange und Pilze in rot dargestellt.

Die Sequenzidentität zwischen dieser potentiellen (6-4)-Photolyase und der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* beträgt 43 %, bei einer Konsensusidentität von 53 %. Analog den bekannten (6-4)-Photolyasen sind die essentiellen Histidinreste (His408 und His412) ebenfalls vorhanden. Phylogenetisch betrachtet, weist die Photolyase aus *O. tauri* eine nahe Verwandtschaft zu den pflanzlichen (6-4)-Photolyasen aus *A. thaliana* und *D. salina* auf (Abbildung 41b). Im Rahmen der Diplomarbeit von *E. Kaya* im Arbeitskreis *Carell* wurde die mögliche (6-4)-Photolyase kloniert, überexprimiert und aufgereinigt.^[177] Mit dem gereinigten Enzym wurden schließlich analog zu den Versuchen mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* Aktivitätsassays unter den Standardbedingungen (siehe Exp. Teil) durchgeführt, um eine eindeutige Charakterisierung der Photolyase aus *O. tauri* als (6-4)-Photolyase zu erhalten.

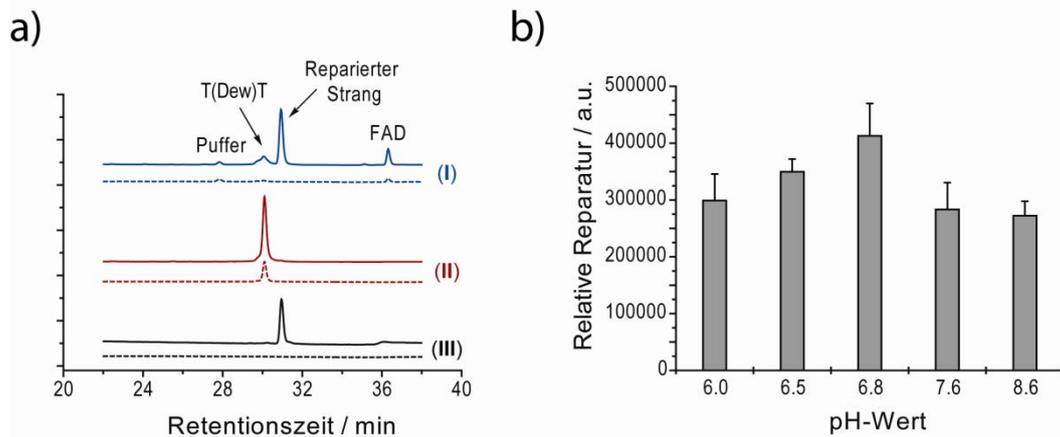


Abb. 42: a) Analytische *reversed-phase* HPLC Analyse (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) der Photoreaktivierung von **ODN 3-(6-4)** mit dem T(6-4)T-Schaden durch die (6-4)-Photolyase aus *O. tauri* unter Standardbedingungen. **(I)** Reparaturassay. **(II)** Chromatogramm von **ODN 3-(6-4)** mit dem zentralen (6-4)-Schaden. **(III)** Chromatogramm von **ODN 3** ohne (6-4)-Schaden. Die Elution wurde bei 260 nm (durchgezogene Linien) und 325 nm (gestrichelte Linien) detektiert. b) Bestimmung des pH-Optimums der Reparatur der (6-4)-Photolyase aus *O. tauri* (die Werte sind ein Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen).

Anhand der in Abbildung 42 dargestellten Ergebnisse konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Photolyase aus *O. tauri* den T(6-4)T-Schaden reparieren kann, so dass es sich somit tatsächlich um eine (6-4)-Photolyase handelt. Verglichen mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* zeigt sie ein leicht verändertes pH-Optimum von 6.8 auf. Beide Photolyasen zeigen an dem jeweiligen pH-Optimum keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Aktivität gegenüber geschädigter DNA auf.

3.6.2 Spektroskopische Eigenschaften der (6-4)-Photolyase

Die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* wurde im Rahmen der Dissertation von *M. Maul* im Arbeitskreis *Carell* kloniert, überexprimiert und aufgereinigt. Hierbei wurde eine verkürzte Version der (6-4)-Photolyase in den Vektor *pDest007* kloniert, so dass ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen *Strep-TagII* entstand. Das Enzym wurde in *E. coli* (Stamm RosettaTM DE3) überexprimiert, über eine *Strep-TagII*-Säule und schließlich über eine *Heparin*-Säule gereinigt.^[178]



Abb. 43: (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* nach *Strep-TagII* Reinigung.

Das gereinigte Enzym wurde aufgrund der geringen Stabilität bei 4 °C oder auf Eis, meist am Tag der Aufreinigung oder am darauf folgenden Tag für anschließende Kristallisationsexperimente bzw. Reparaturstudien eingesetzt.

Zur Charakterisierung möglicher Cofaktoren der (6-4)-Photolyase wurden von dem gereinigten Enzym Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Dadurch sollten Erkenntnisse bezüglich des Redoxstatus der Cofaktoren gewonnen werden. In Abbildung 44 erkennt man in dem UV/VIS-Spektrum der gereinigten Photolyase (nach der *Strep-TagII*-Säule) zwei Absorptionsbanden bei 365 nm und 450 nm, welche charakteristisch für die vollständig oxidierte Form des Flavins der Photolyase sind. Das Fluoreszenzspektrum zeigt dazu die korrespondierende Emmission bei $\lambda_{Em} \sim 490$ nm. Diese charakteristischen Banden konnten auch nach der Hitzedenaturierung des Enzyms beobachtet werden. Wurde der Enzymlösung Natriumdithionit als Reduktionsmittel zugefügt, so führte dies zu einem vollständigen Verlust der UV- und Fluoreszenzmaxima, als Resultat der vollständigen Reduktion des enzymgebundenen Flavins (FAD) zu FADH⁻. Die radikalische, semichinoide Form des Flavins (FADH[•]) konnte im typischen Absorptionsbereich zwischen 550 nm bis 600 nm nicht beobachtet werden.

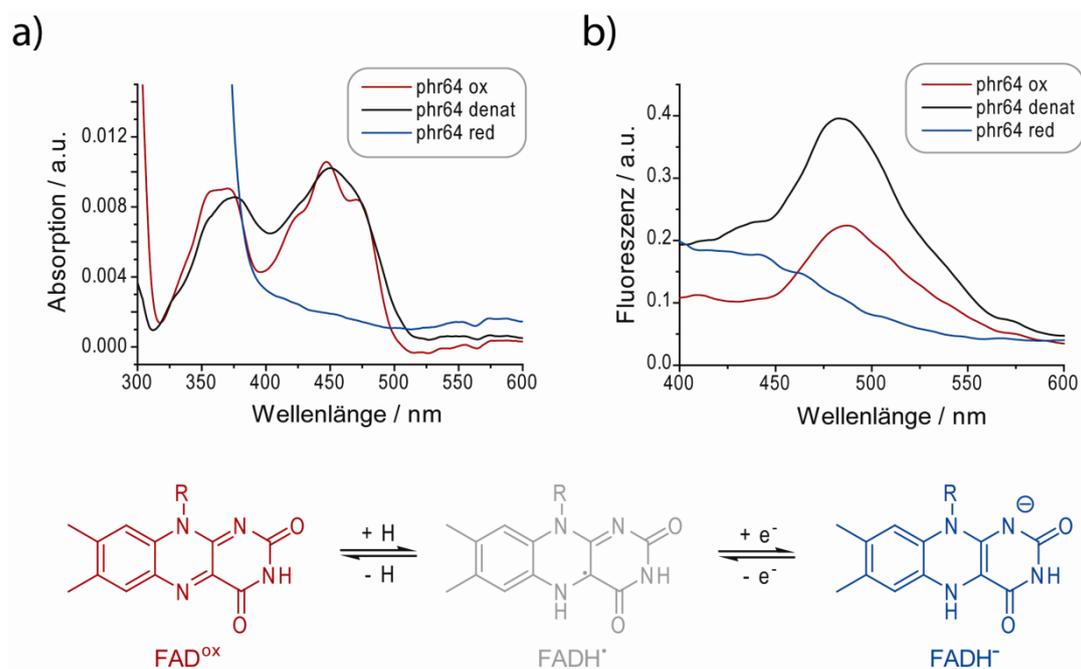


Abb. 44: Spektroskopische Analyse der (6-4)-Photolyase. a) UV/VIS- und b) Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{Ex}} = 370 \text{ nm}$) der nach der Aufreinigung oxidierten (6-4)-Photolyase vor (phr64 ox) und nach der Hitzedenaturierung (phr64 denat) sowie nach der Reduktion des Enzyms (phr64 red).

Neben dem für die Katalyse notwendigen Cofaktor FAD, besitzen bakterielle Klasse I CPD-Photolyasen noch einen weiteren Cofaktor, welcher als Lichtantenne fungiert. Hierbei handelt es sich meistens entweder um ein 8-Hydroxydesazaflavin (8-HDF oder **F₀**, **16**)^[98, 99] beziehungsweise um ein Methenyltetrahydrofolat (MTHF, **15**).^[96, 97] In einigen thermophilen Bakterien konnte auch ein Flavinmononukleotid (FMN, **17**) beziehungsweise ein weiteres FAD als zweiter Cofaktor identifiziert werden (siehe Abbildung 6).^[100, 101]

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage nach dem zweiten Cofaktor in (6-4)-Photolyasen geklärt werden. Da die spektroskopischen Daten der (6-4)-Photolyase nach der *Strep-TagII*-Reinigung keinerlei Anhaltspunkte auf das Vorhandensein eines weiteren Cofaktors lieferten, wurde die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* mit den in Abbildung 6 dargestellten Chromophoren rekonstituiert.

3.6.3 Identifizierung des zweiten Cofaktors der (6-4)-Photolyase

Für die Identifizierung des zweiten Cofaktors der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* wurde das Enzym nach einer ähnlichen Methode wie der von Jorns und Mitarbeitern^[97] mit den jeweiligen Chromophoren rekonstituiert. Die Cofaktoren FAD, FMN und MTHF waren kommerziell erhältlich, wobei F_0 selbst synthetisiert werden musste (siehe dazu Kapitel 3.8). Die gereinigte Photolyase wurde mit einem zehnfachen Überschuss der jeweiligen Cofaktoren versetzt und über Nacht in der *glove box* bei 4 °C inkubiert. Überschüssiger Cofaktor wurde mit Hilfe einer PD10-Säule der Firma *GE Healthcare* entfernt. Aufgrund der Instabilität von MTHF bei neutralen pH-Werten, wurden hier auch Rekonstitutionsversuche in einem Citratpuffer mit pH = 6.0 durchgeführt.^[179] Die spektroskopischen Eigenschaften der (6-4)-Photolyase zeigten bei den Rekonstitutionsversuchen mit FAD, FMN und MTHF keinerlei Veränderungen auf. Erst bei den Rekonstitutionsversuchen mit F_0 als Cofaktor zeigten sich Änderungen im Absorptionsspektrum des Chromophors. Freies F_0 besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 420$ nm, wobei proteingebundenes F_0 ein Absorptionsmaximum von $\lambda = 440$ nm aufweist. Diese charakteristische Rotverschiebung konnte nach der Rekonstitution mit F_0 beobachtet werden (siehe Abbildung 45), wobei dieser Befund zusätzlich durch die Fluoreszenzmessung bestätigt worden ist. Analog den bakteriellen CPD-Photolyasen tritt hier eine Fluoreszenzemission bei $\lambda_{Em} = 475$ nm (bei $\lambda_{Ex} = 400$ nm) auf, welche charakteristisch für die deprotonierte, chinoide Form des Desazaflavins ist. Der Cofaktor kann nur in dieser deprotonierten Form als Lichtantenne fungieren, da in diesem Zustand seine Redox Eigenschaften unterdrückt sind.

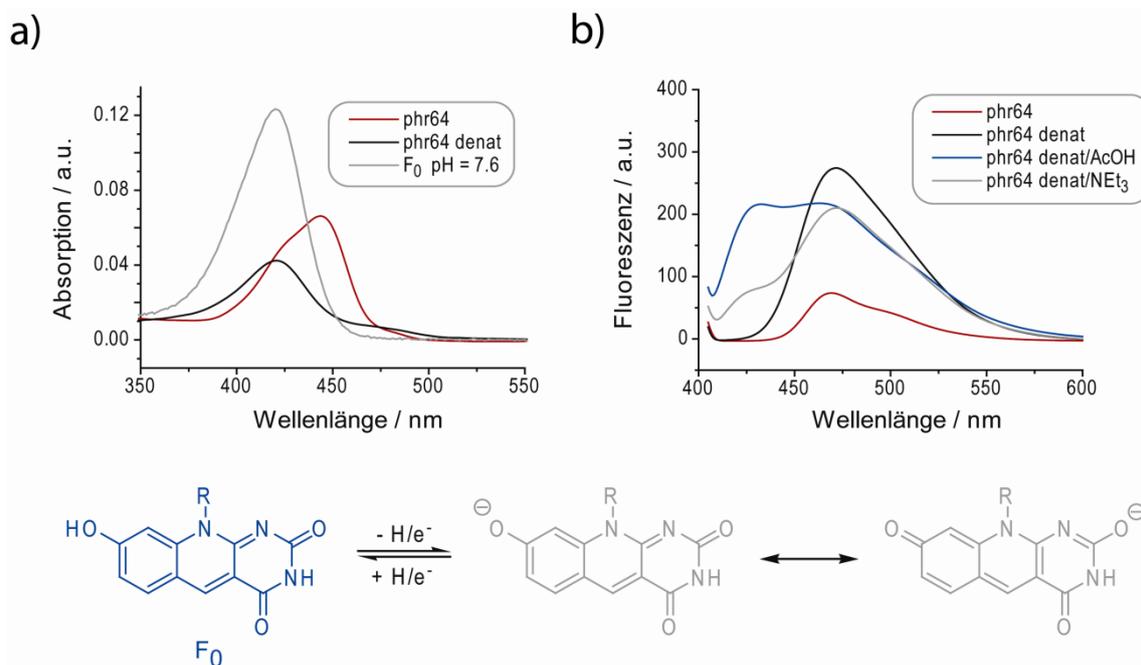


Abb. 45: Spektroskopische Analyse der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. a) UV/VIS-Spektrum der gereinigten, reduzierten und mit F₀ rekonstituierten (6-4)-Photolyase vor (rot) und nach Hitzedenaturierung (schwarz). Zum Vergleich F₀ bei pH = 7.6 (grau). b) Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{Ex}} = 400 \text{ nm}$) der nach der Aufreinigung reduzierten und mit F₀ rekonstituierten (6-4)-Photolyase vor (rot) und nach der Hitzedenaturierung (schwarz) sowie nach der Hitzedenaturierung des Enzyms und Behandlung mit Essigsäure (blau) und Triethylamin (grau).

Es hat sich auch gezeigt, dass die Zugabe von Essigsäure zu dem hitzedenaturierten Enzym eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximum nach $\lambda_{\text{Em}} = 420 \text{ nm}$ zur Folge hatte (Abb. 45b, blau). Dieses Fluoreszenzmaximum ist charakteristisch für die „hydroxy“ Form des 8-Hydroxydesazaflavin. Die Zugabe von Triethylamin hingegen zeigte keinerlei Veränderungen ihm Fluoreszenzspektrum auf, da hier weiterhin die „chinoide“ Form des Flavins zugegen ist (Abb. 45b, grau). Es konnte somit anhand von spektroskopischen Daten klar gezeigt werden, dass es sich bei dem zweiten Cofaktor der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* um das 8-Hydroxydesazaflavin F₀ handelt.^[180]

Um die Bindungskonstante des zweiten Cofaktors F₀ zur (6-4)-Photolyase zu bestimmen, wurde eine definierte F₀-Lösung mit Aliquoten an (6-4)-Photolyase titriert. Dabei wurde die Abnahme der für das freie F₀ charakteristischen Absorptionsbande bei $\lambda = 420 \text{ nm}$ gemessen und anhand der Änderung $\Delta A_{420 \text{ nm}}$ die Bindungskonstante zur (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* bestimmt.^[180] Der erhaltene Wert von $K_S \sim 8.6 \mu\text{M}$ liegt im vergleichbaren

Bereich wie die Bindungskonstante des FADs in der *E. coli* apo-CPD-Photolyase mit einem Wert von $K_S = 1.5 \mu\text{M}$.^[181]

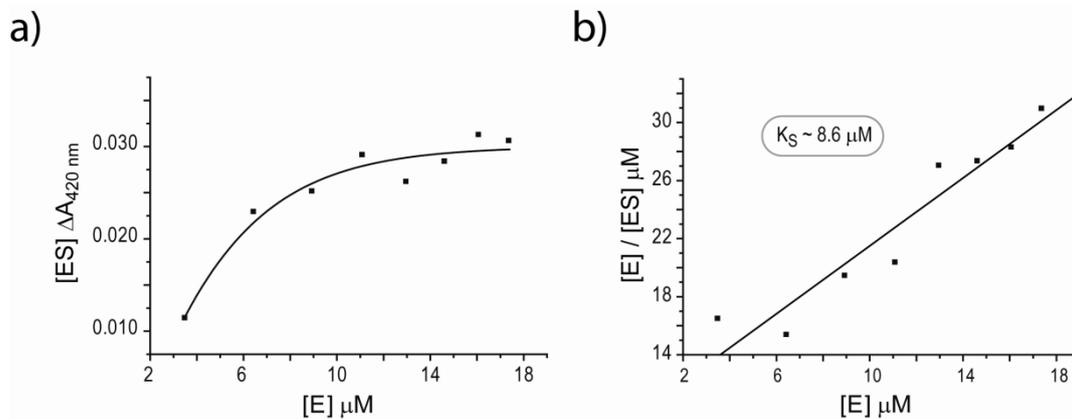


Abb. 46: Bestimmung der Bindungskonstante von F_0 zur (6-4)-Photolyase. a) Graphische Analyse der Bindung zwischen F_0 und dem Enzym. b) *Hanes-Plot* Analyse der Bindungsdaten aus a). Die Bindungskonstante K_S wurde durch Titration von 25 μL einer 40 μM F_0 -Lösung mit Aliquoten von 0.1 eq an (6-4)-Photolyase bestimmt. Die Bindung wurde anhand der totalen Änderung bei $\lambda = 420 \text{ nm}$ ($\Delta A_{420 \text{ nm}}$) nach der Zugabe der (6-4)-Photolyasealiquote und einer Wartezeit von einer Stunde für die Gleichgewichtseinstellung bestimmt.

3.6.4 Vergleich der Reparaturaktivität der (6-4)-Photolyase mit und ohne dem zweiten Cofaktor F_0

Basierend auf den erhaltenen spektroskopischen Hinweisen auf das Vorhandensein von F_0 als zweitem Cofaktor in der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*, sollte man einen deutlichen Anstieg der Aktivität des rekonstituierten Enzyms bezüglich der Reparatur von (6-4)-Schäden erwarten. Im Gegensatz zu dem FAD Cofaktor, welcher für die spezifische Bindung von geschädigter DNA sowie für die Katalyse essentiell ist, fungiert der zweite Cofaktor lediglich als Lichtantenne und ist somit nicht essentiell für die Enzymfunktion. Von CPD-Photolyasen ist allerdings bekannt, dass die Reparaturrate in Gegenwart von Lichtantennen um den Faktor 10 – 100 gesteigert werden kann, da die lichtsammelnden Chromophore höhere Extinktionskoeffizienten und ein rotverschobenes Absorptionsmaximum aufweisen, verglichen zu dem reduzierten FADH.^[46, 97, 99]

Durch Reparaturstudien mit dem T(6-4)T- und dem T(6-4)C-Schaden und der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* sowie der mit F₀ rekonstituierten Photolyase unter Standardbedingungen (100 pmol DNA, 1 h Belichtung mit Weißlicht) konnten deutliche Unterschiede in der Reparaturaktivität beobachtet werden. In Abbildung 47 kann man deutlich erkennen, dass die Aktivität der nicht rekonstituierten Photolyase bei sinkender Enzymmenge relativ rasch abnimmt. Die Aktivität der rekonstituierten Photolyase bleibt relativ lange konstant hoch. Bei sehr geringen Enzymkonzentrationen ist ebenfalls noch Substratumsatz zu erkennen.

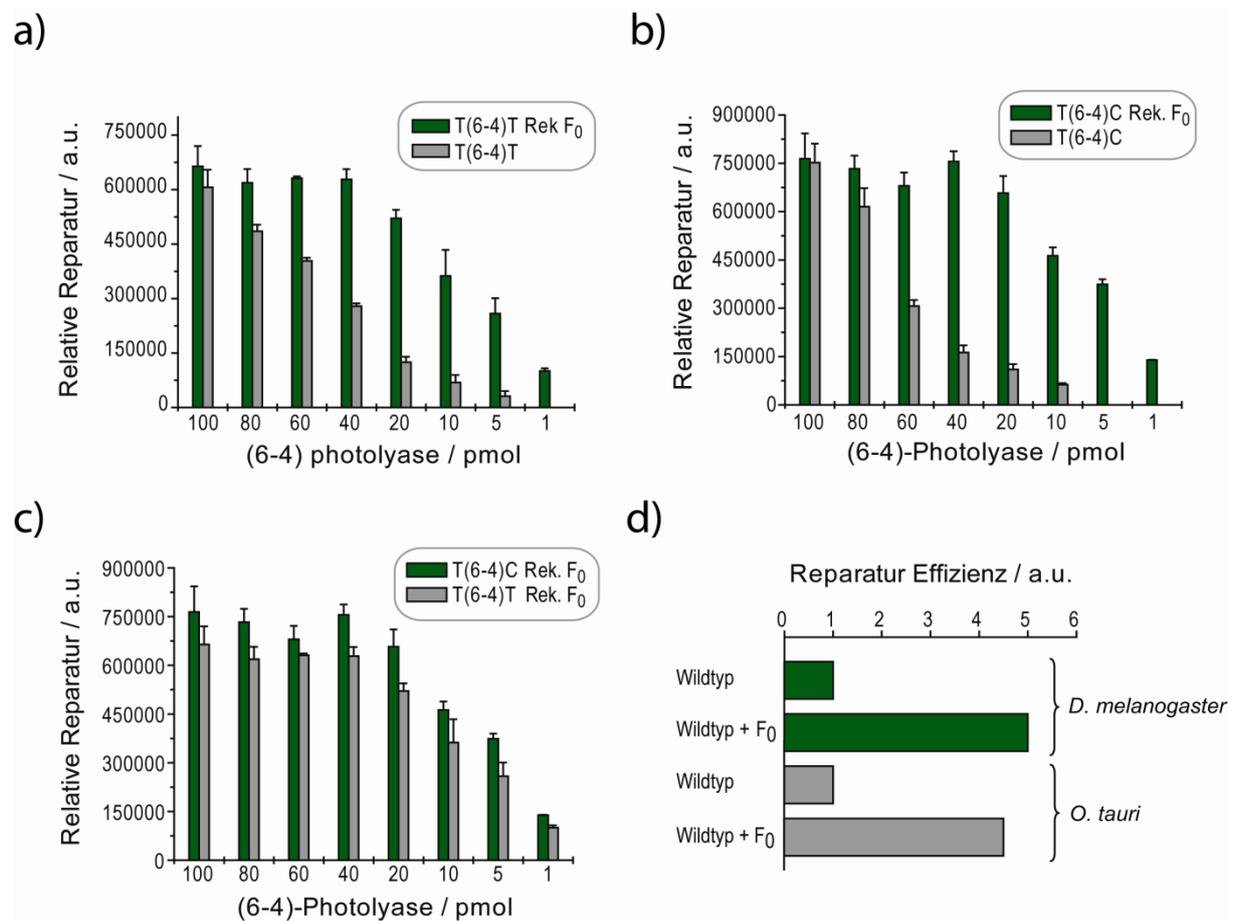


Abb. 47: a) Bestimmung der Reparatureffizienz des T(6-4)T-Schadens (ODN 3-(6-4)) und b) des T(6-4)C-Schadens (ODN 9-(6-4)) mit rekonstituierter (grün) und nicht-rekonstituierter (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. c) Vergleich der Reparatureffizienz der beiden (6-4)-Schäden T(6-4)T (ODN 3-(6-4), grau) und T(6-4)C (ODN 9-(6-4), grün) mit der rekonstituierten (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. d) Vergleich der beiden (6-4)-Photolyasen aus *D. melanogaster* (grün) und *O. tauri* (grau) in der rekonstituierten und nicht-rekonstituierten Form bezüglich der Reparatureffizienz des T(6-4)T-Schadens (ODN 3-(6-4)).

Vergleicht man die Reparatur der beiden (6-4)-Schäden T(6-4)T und T(6-4)C mit dem rekonstituierten Enzym, so kann man analog den Ergebnissen mit dem nicht-rekonstituierten Enzym ähnliche Reparatureffizienzen feststellen. Die leicht erhöhte Aktivität im Falle des T(6-4)C-Schadens liegt an der schnelleren Bildung des T(Dew)T-Isomers, so dass hierbei die Reparatur in Konkurrenz mit der Dewar-Bildung steht und dies die Effizienz leicht senkt. Zusammenfassend dargestellt ergibt sich somit eine um den Faktor fünf gesteigerte Aktivität der rekonstituierten (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* (Abb. 47d). Reparaturstudien mit der rekonstituierten (6-4)-Photolyase aus *O. tauri* führten ebenfalls zu einem deutlichen Aktivitätsanstieg um das 4- bis 5-fache, wobei auch die erhaltenen spektroskopischen Ergebnisse im Einklang mit F_0 als zweiten Cofaktor stehen. Diese Ergebnisse zeigen somit eindeutig, dass der zweite Cofaktor zwar nicht essentiell für die Reparatur ist, jedoch F_0 die absorbierte Lichtenergie gebündelt auf das reduzierte FADH⁻ überträgt und dadurch die Reparatureffizienz deutlich erhöht wird.

Das Ergebnis, dass F_0 als zweiter Cofaktor in den (6-4)-Photolyasen aus *D. melanogaster* und *O. tauri* fungiert ist sehr überraschend, da F_0 zwar eine essentielle zelluläre Komponente für Methanogene und Cyanobakterien darstellt,^[129, 182] jedoch noch nie in höheren Eukaryoten gefunden wurde.

Eine genaue Analyse des kleinsten freilebenden Eukaryoten *O. tauri* anhand des *Blast search* hat ergeben, dass der Organismus das *fbiC* Gen besitzt, welches kodierend für die bifunktionale F_0 -Synthetase ist und zunächst in *Mycobacterium tuberculosis* charakterisiert worden ist.^[183] *FbiC* gehört der Enzymklasse der *S*-Adenosyl Methionin (SAM) Superfamilie an und katalysiert die Synthese von F_0 . *FbiC* Homologe können nur in Archaeen und in einigen Spezien des Bakterienreichs, wie zum Beispiel im Stamm der Actinobakterien oder Proteobakterien gefunden werden. In Eukaryoten hingegen können *FbiC* Homologe nur in Chlorophyten (Grünalgen) gefunden werden. Die *Blast search* Ergebnisse zeigen somit, dass *O. tauri* in der Lage ist, F_0 selbst zu biosynthetisieren. Diese Daten stützen zudem frühere Ergebnisse von *Eker* und Mitarbeitern, welche anhand von spektroskopischen Daten F_0 in der Photolyase der Grünalge *Scenedesmus acutus* nachweisen konnten.^[182] Obwohl nun solche Eukaryoten wie zum Beispiel *O. tauri* in der Lage sind, F_0 selbst zu synthetisieren, haben höher entwickelte Eukaryoten diese Fähigkeit scheinbar verloren. Im Fall von *D. melanogaster* könnte F_0 daher von dem Endosymbionten/Parasiten *Wolbachia* bereitgestellt werden, von dem bekannt ist, dass er ein Darmbakterium von Fruchtfliegen ist.^[184-188] In diesem Sinne würde F_0 als eine Art Vitamin für die Fruchtfliege dienen, um die lichtabhängige Reparatur von geschädigter DNA zu steigern.

3.6.5 Direkte Isolierung von F_0 aus *D. melanogaster*

Um zu zeigen, dass die soeben dargestellten Ergebnisse keine etwaigen Artefakte sind, bzw. die in Kapitel 3.7.4 aufgezeigte F_0 -Bindetasche kein evolutionäres Relikt darstellt, sollte F_0 nach einer adaptierten Methode der Isolierung von Riboflavinderivaten aus Pilzen von *Steglich* und Mitarbeitern direkt aus *D. melanogaster* isoliert werden.^[189]

In diesem Zusammenhang wurden kommerziell erhältliche Fruchtfliegen mit Hilfe einer Vakuumapparatur gesammelt und bei -80 °C tiefgefroren. Die gefrorenen Fliegen wurden gründlich mit einem PBS-Puffer gewaschen und unter flüssigen Stickstoff mit Mörser und Pistill kleinermahlen. Die erhaltenen Zellkomponenten wurden mit RIPA-Puffer resuspendiert, wobei unlösliche Bestandteile abzentrifugiert wurden. Diese Bestandteile wurden mit Methanol/Wasser (4/1) versetzt und in einer Kugelmühle weiter aufgeschlossen. Die vereinigten Fliegenextrakte wurden anschließend einer zweistufigen Reinigung unterzogen. Im ersten Schritt erfolgte eine Grobreinigung über eine Sephadex-Säule, wobei alle fluoreszierenden Fraktionen vereint und aufkonzentriert worden sind. Im zweiten Schritt erfolgte nun die Aufreinigung mittels präparativer HPLC, wobei wiederum die fluoreszierenden Fraktionen gesammelt und mit Hilfe einer analytischen HPLC untersucht worden sind (Abbildung 48).

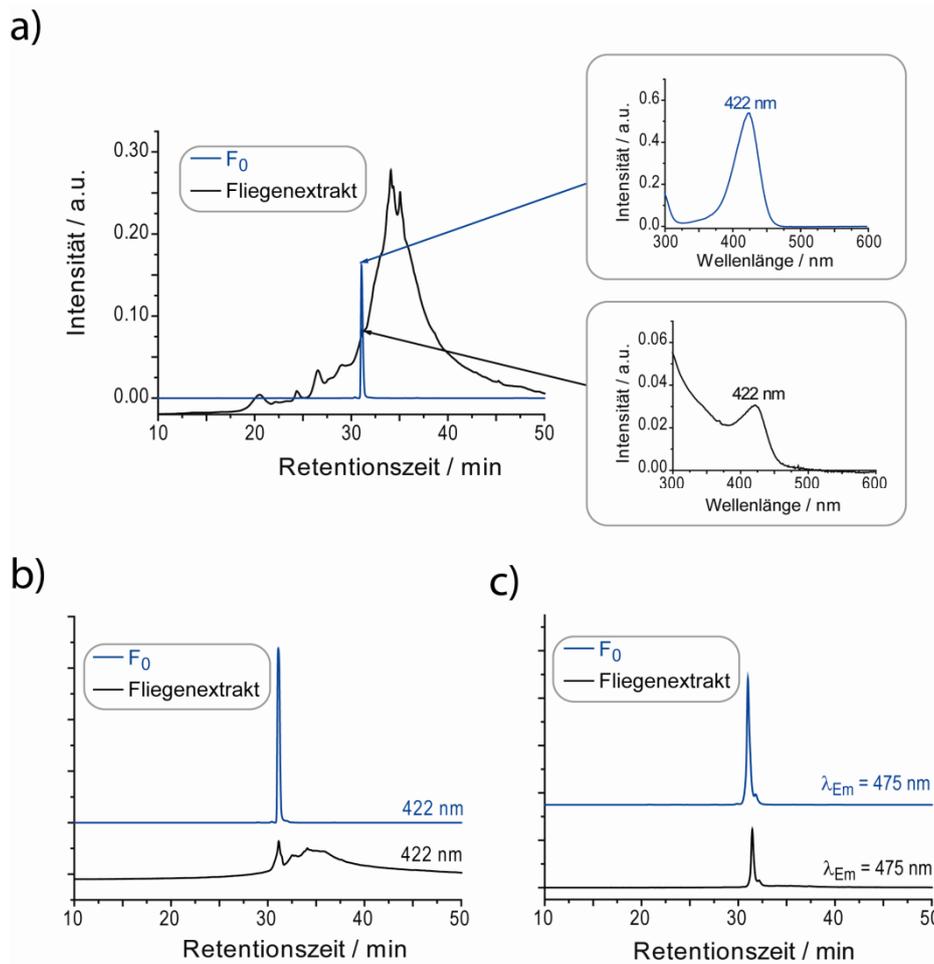


Abb. 48: Reversed-phase HPLC Analyse (Nucleodur 100-3 C18, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) des *D. melanogaster* Zellextraktes bei a) 260 nm, b) 422 nm und c) mit Fluoreszenzdetektion bei $\lambda_{\text{Ex}} = 420$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 475$ nm. Zur Kontrolle ist das synthetisierte F₀ in blau dargestellt.

Bei dem *D. melanogaster* Zellextrakt konnte ein kleiner Peak bei einer Retentionszeit von etwa 32 Minuten detektiert werden, welcher ein Absorptionsmaximum von $\lambda = 422$ nm aufweist (Abb. 48a, schwarz). Verglichen mit dem synthetisch dargestellten F₀ (blau) stimmen hierbei sowohl die Retentionszeit als auch das Absorptionsmaximum sehr gut überein. Neben der Übereinstimmung der UV/VIS-Eigenschaften kann man auch eine sehr gute Übereinstimmung bezüglich der charakteristischen Fluoreszenz von $\lambda_{\text{Em}} = 475$ nm (bei $\lambda_{\text{Em}} = 420$ nm) feststellen. Anhand der in Abbildung 48 gezeigten Ergebnisse konnte somit eindeutig das Desazaflavin F₀ direkt aus *D. melanogaster* isoliert werden und infolgedessen, als weiteres starkes Indiz dafür gewertet werden, dass F₀ tatsächlich der zweite Cofaktor in der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* ist.^[180]

3.7 Strukturbiologische und mechanistische Untersuchungen der (6-4)-Photolyase

3.7.1 Co-Kristallisation des T(6-4)-T-Schadens im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*

Im Gegensatz zum CPD-Schaden^[108] war bisher noch keine Co-Kristallstruktur eines (6-4)-Schadens im Komplex mit einer (6-4)-Photolyase verfügbar. Trotz unzähliger biochemischer als auch quantenmechanischer Untersuchungen sowie Experimenten mit Modellverbindungen,^[38, 112, 130, 131, 133-140] konnte bisher über den exakten Mechanismus der (6-4)-Photolyasen bezüglich der DNA-Bindung und Reparatur nur spekuliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte somit zum ersten mal eine Co-Kristallstruktur eines (6-4)-Schadens im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* erhalten werden, um detaillierte Informationen auf atomarer Ebene zu erhalten und daraus gegebenenfalls neue Erkenntnisse bezüglich des Mechanismus zu gewinnen.

Aufgrund der lichtabhängigen Reparatur der (6-4)-Photolyase wurden alle Schritte, welche die Kristallisation betrafen, unter striktem Lichtausschluss durchgeführt. Für die ersten Kristallisationsexperimente wurde ein *Hydra II* Kristallisationsroboter verwendet und damit im Hochdurchsatz verschiedene, kommerziell erhältliche *Screens* (Nextal/Qiagen) getestet. Für die Co-Kristallisation wurde das Protein in Assaypuffer A auf 8.5 mg/mL aufkonzentriert und im Verhältnis 1:1.1 mit der (6-4)-Schaden enthaltenden DNA vorinkubiert. Erste vielversprechende Ergebnisse konnten schließlich bei der Verwendung von doppelsträngiger 15mer DNA (**ODN 6-(6-4)**, 5'-ACAGCGGT(6-4)TGCAGGT-3'; 5'-TACCTGCAACCGCTG-3') mit Überhang in Form von kleinen Kristallnadeln unter folgenden Bedingungen erzielt werden:

- 0.1 M Hepes pH 7.0, 20 % PEG 6000
- 0.1 M MIB pH 9.0 25 % PEG 1500
- 0.1 M Hepes pH 7.0, 0.2 M NaCl, 20 % PEG 6000

Zur weiteren Optimierung dieser Bedingungen sowie dem Erhalten von größeren Kristallen, wurde fortan die *hanging-drop vapour-diffusion* Methode angewendet. Hierbei wurden verschiedene Parameter wie z. B. die Tropfengröße (1, 2 und 3 µL), die Proteinkonzentration (6.5, 7.0, 8.5, 10.0 und 12.5 mg/mL), die Länge und Sequenz der Oligonukleotide, die Kristallisationstemperatur, das Verhältnis zwischen Protein und DNA (1:1.1, 1:1.3 und 1:1.5), die Konzentration an Puffer und PEG, der verwendete pH-Wert sowie der Zusatz an

verschiedenen Additiven (*Hampton Research, Additive Screen*) getestet. Die besten Resultate wurden unter den folgenden Bedingungen erzielt.

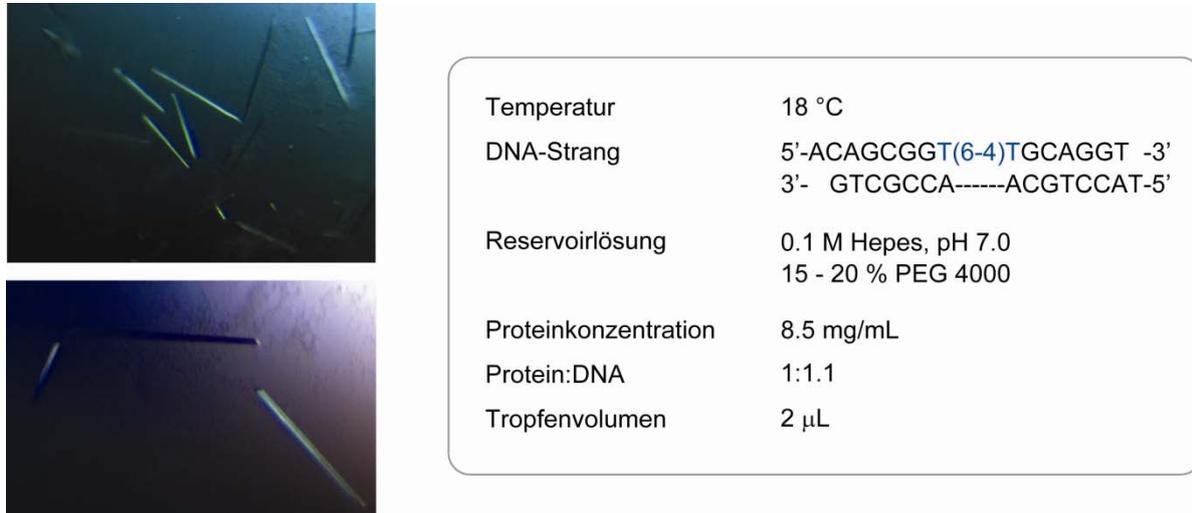


Abb. 49: Co-Kristallisation der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden nach der *hanging-drop vapour-diffusion* Methode. Typische Form der erhaltenen Kristalle als lange Nadeln (50 x 50 x 200 µm) unter den angegebenen Standardbedingungen.

Nach dem Mischen von 1 µL Protein-DNA-Komplex mit 1 µL Reservoirlösung unter den in Abbildung 49 angegebenen Bedingungen, konnten bei 18 °C nach ein bis zwei Tagen lange Kristallnadeln erhalten werden. Die Kristalle wurden anschließend zur Strukturbestimmung in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Schlichting* (MPI, Heidelberg) an der Beamline X10SA des *Swiss Light Source* (SLS, Villigen, Schweiz) Synchrotrons vermessen.

3.7.2 Diffraktionsanalyse der (6-4)-Photolyase

Die Messungen am Synchrotron und die Datenerfassung wurden von der Arbeitsgruppe *Schlichting* durchgeführt und werden daher im Folgenden nur kurz zusammenfassend dargestellt.

Die erhaltenen Kristalle wurden in eine Cryoprotektionslösung (25 % PEG 4000, 0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 15 % Ethylenglycol) transferiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Um Erkenntnisse bezüglich der pH-Abhängigkeit der Reparatur im Kristall zu gewinnen, wurden die Kristalle in verschiedene Cryoprotektionslösungen getränkt. Dabei wurde anstelle von 0.1 M Tris-HCl pH 7.8 (0.1 M Na-Citrat pH 4.6, 0.1 M Na-Hepes pH 7.0, 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 oder 0.1 M Tris-HCl pH 9.0) verwendet. Die Reparatur im Kristall wurde durch Transfer dieser in Stickstoff-gesättigten, 50 mM Na-Dithionit enthaltenen Cryoprotektionslösung mit anschließender Belichtung initiiert. Hierfür wurden die Kristalle 20 Sekunden in einem Abstand von 1 cm zu einer Leica KL1500 LCD Lichtquelle, welche vor der Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit maximaler Leistung betrieben worden ist, rotiert. In diesem Zusammenhang konnte eine maximale Reparaturaktivität im Kristall bei einem pH-Wert von 7.8 beobachtet werden. Die gesamte Datenerfassung wurde bei 100 K durchgeführt. Mit Hilfe der *XDS program suite* erfolgte die Datenverarbeitung.^[190]

Um die Phasen experimentell und somit die Struktur bestimmen zu können, wurde das Protein von *M. Maul* hierfür im Methionin auxotrophen *E. coli* Stamm B834 (DE3) in Selenomethionin-haltigem *LeMaster* Medium überexprimiert.^[191] Das mit 12 Selenomethioninen markierte Enzym verhielt sich während der Expression, Reinigung und Kristallisation ähnlich der Wildtyp (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*.

3.7.3 Strukturanalyse der (6-4)-Photolyase

Anhand der Selenomethionin markierten Proteinkristalle konnte die Struktur der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden mit Hilfe der *single-wavelength anomalous dispersion* Methode bestimmt werden. Die Bestimmung der Phase erfolgte dabei mit SHARP.^[192, 193] Nach dem Bearbeiten der Daten konnte eine gut zu interpretierende Elektronendichte erhalten werden. Hierbei konnte ein erstes Proteinmodell (98 % der (6-4)-Photolyase Sequenz) automatisch mit ARP/wARP^[194, 195] erstellt und in COOT^[196] manuell weiter vervollständigt werden. Nach mehreren zyklischen Verfeinerungsrunden mit REFMAC und CNS sowie manuellem modellieren, wurden die DNA, das FAD und Lösemittelmoleküle nacheinander mit in das Model miteinbezogen.^[197, 198] Alle weiteren Strukturen der (6-4)-Photolyase wurden durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst. Oberflächenkalkulationen wurden mit AREAIMOL^[199] berechnet. Strukturbezogene Vergleiche bezüglich der Sequenz wurden mit SSM durchgeführt.^[200] DNA-Protein Interaktionen wurden in LIGPLOT^[201] analysiert, wobei alle

Strukturabbildungen in PyMol^[202] bearbeitet worden sind. Die erfassten Daten und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 4 im Anhang zusammengefasst.

Neben der Co-Kristallstruktur des T(6-4)T-Schadens im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* konnte durch die Reduktion mit Natriumdithionit und Belichtung der T(6-4)T-Kristalle mit Weißlicht, das reparierte TpT Dinukleotid im aktiven Zentrum der (6-4)-Photolyase beobachtet werden. Im Falle der T(6-4)T-Struktur konnte eine Auflösung von 2.0 Å (PDB Eintrag: 3CVU) und im Falle der reparierten Struktur eine Auflösung von 2.7 Å (PDB Eintrag: 3CVY) erzielt werden. Analog den bekannten Strukturen der CPD-Photolyasen und der Cryptochrome, besitzt die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* eine ähnliche Architektur mit einer N-terminalen α/β -Domäne (Aminosäure 1 – 167) und einer C-terminalen FAD-bindenden helikalen α -Domäne (Aminosäure 223 – 521).^[98, 100, 106-108, 203, 204] Diese beiden Domänen sind über einen Interdomänen *Loop* (Aminosäure 168 – 224) miteinander verbunden.

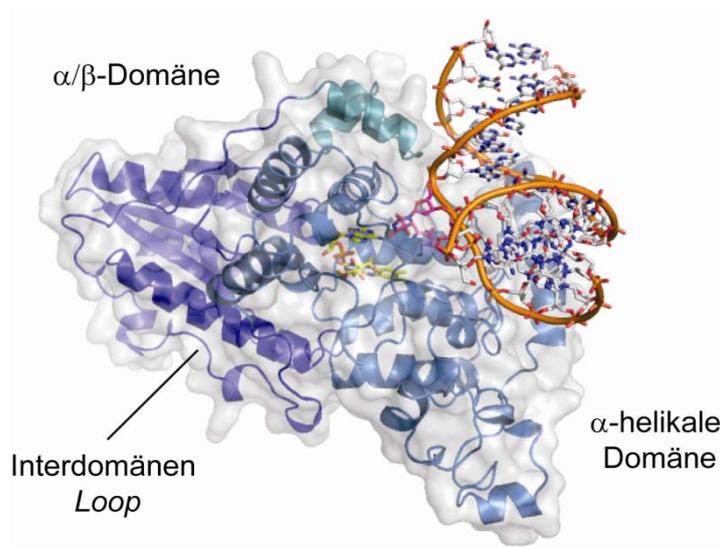


Abb. 50: Struktur der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden. Die α -helikale Domäne ist in cyan und die α/β -Domäne in blau dargestellt. Der T(6-4)T-Schaden und der FAD-Cofaktor sind in pink bzw. gelb abgebildet. Über das Modell wurde eine semitransparente Proteinoberfläche gelegt.

Analog der CPD-Photolyase aus *A. nidulans*^[108] öffnet die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* während der Erkennung des T(6-4)T-Schadens die DNA vollständig, wobei das Dinukleotid um fast 180 ° aus der DNA heraus in die aktive Tasche des Enzyms gedreht wird. Die dabei entstehende Ausbuchtung wird durch mehrere Proteinreste stabilisiert (Abbildung 51).

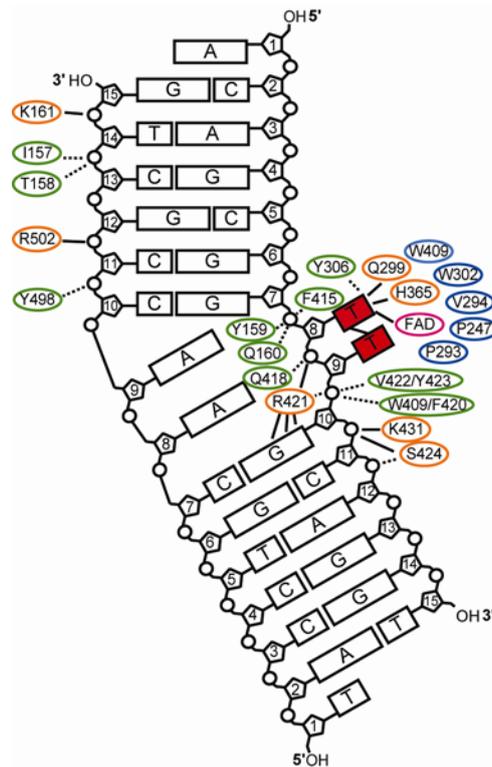


Abb. 51: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen der (6-4)-Photolyase und dem T(6-4)T-Schaden. Der herausgedrehte Schaden ist in rot und der Cofaktor FAD in pink dargestellt. Direkte H-Brücken/elektrostatische Wechselwirkungen sind orange umrandet, wobei Wasser vermittelte Kontakte in grün und mit gestrichelten Linien abgebildet sind. Die Aminosäurereste, welche die hydrophobe Bindetasche um die Pyrimidineinheit bilden, sind in blau umrandet.

Arg421, ein hoch konservierter Rest in (6-4)-Photolyasen, ragt in den Duplex, überlagert dabei die Guaninbase am 3'-Ende und interagiert mit dem Phosphatrückgrat der neunten (3.1 Å) und zehnten (3.1 Å) Base des geschädigten Strangs. In ähnlicher Art und Weise stehen die Aminosäuren Lys431 (2.8 Å) und Ser424 (2.8 Å) in Kontakt mit dem Phosphatsauerstoff der elften Base des geschädigten Strangs. Lys161 und Arg502 bilden zudem Salzbrücken zu dem Phosphatrückgrat der Basen 14 und 12 (2.6 und 3.0 Å) des

ungeschädigten Strangs in 3'-Richtung aus. Die Struktur wird darüberhinaus noch durch elf Wasser vermittelte Enzym-Rückgrat-Kontakte stabilisiert.

Ähnlich den CPD-Photolyasen und den Cryptochromen, liegt das FAD in einer U-förmigen Konformation vor. [98, 100, 106-108, 203, 204] Der Adeninrest wird zur Ribitylkette zurückgefaltet und ragt dabei aus dem Flavinringssystem heraus, welches durch Wasserstoffbrückenbindungen des N1-Atoms und dem NH₂-Rest des Asp406 (3.1 und 3.2 Å) stabilisiert wird. Der T(6-4)T-Schaden selbst (siehe Abbildung 52a) interagiert mit der (6-4)-Photolyase durch Watson-Crick Wasserstoffbrückenbindungen über Gln299 mit dem Pyrimidin N3 (2.8 Å) und O2 (3.2 Å) sowie einer weiteren Wasserstoffbrückenbindung des Pyrimidin C5 Hydroxyls und His365 (2.7 Å). Dieser Rest liegt in (6-4)-Photolyasen vollständig konserviert vor.^[130] Der Schaden ist zudem in einer auffallend hydrophoben Bindetasche lokalisiert, welche aus den Resten Trp302, Trp409, Pro247, Pro293 und Val294 besteht. In dieser Bindetasche befindet sich lediglich ein Wassermolekül, welches eine Wasserstoffbrückenbindung zum C5 Hydroxyl (2.9 Å) des Pyrimidinrestes ausbildet (Abbildung 52c). In der Struktur des reparierten Dinukleotids TpT (Abbildung 52b) bleibt His365 weiterhin in Kontakt mit dem ursprünglichen C5-Sauerstoffatom, welches sich nach der Übertragung des Sauerstoffs an Position C4 der 3'-Thyminbase befindet. Im aktiven Zentrum sind neben dem Transfer des Sauerstoffatoms kaum strukturelle Veränderungen erkennbar. Hierbei ist von besonderem Interesse, dass Glu299 in der reparierten Struktur nur eine einzige Wasserstoffbrückenbindung zum TpT Dinukleotid ausbildet, wobei dies eventuell das Zurückdrehen des erfolgreich reparierten Dinukleotids begünstigt.

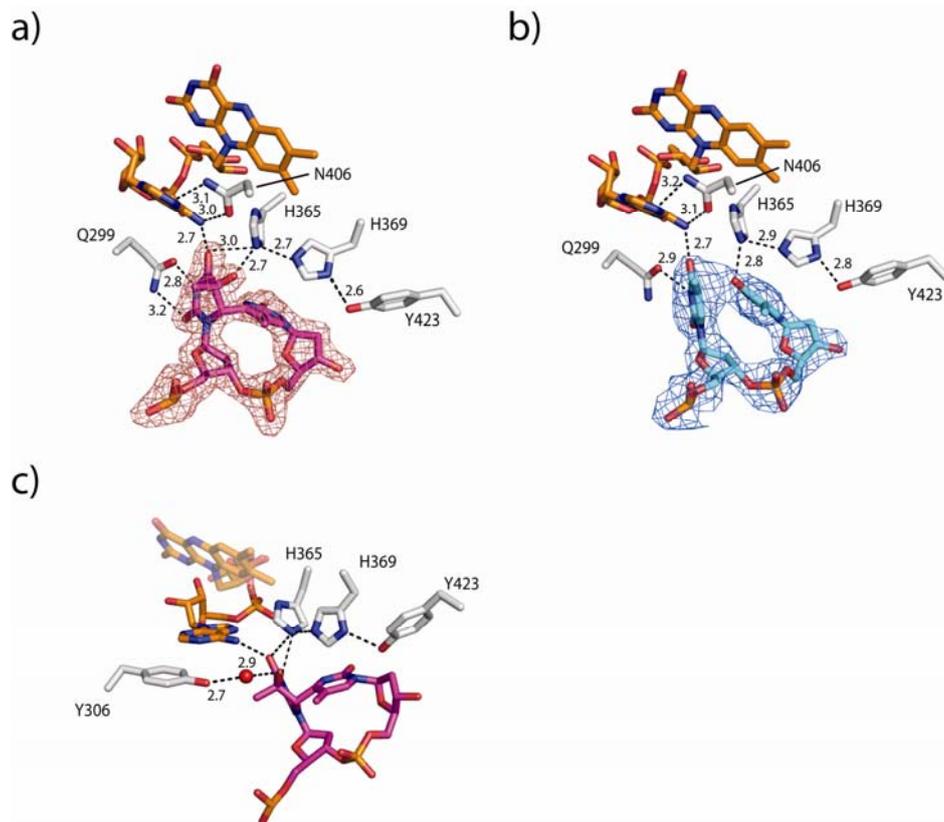


Abb. 52: Strukturelle Einsicht in die aktive Tasche der (6-4)-Photolyase. a) und b) Differenz-Fo-DFc-Elektronendichtekarte des Schadens nach „*simulated annealing*“ vor (a, Schaden in pink) und nach der Reparatur (b, TpT in cyan) berechnet ohne die jeweiligen Atome, konturiert bei 3σ . Der Cofaktor FAD ist in orange und ausgewählte Reste in grau abgebildet. c) Katalytische Reste und das Wassermolekül, welches eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Tyr306 und C5 Hydroxyl (2.9 Å) des Pyrimidinrestes ausbildet.

Die erhaltenen Kristallstrukturen lassen somit vermuten, dass die eukaryotische (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* einen ähnlichen Energie- und Elektronentransferbasierten Mechanismus wie die bakteriellen Klasse I CPD-Photolyasen benutzt, wobei hierauf näher in Kapitel 3.7.5 eingegangen wird.

3.7.4 Co-Kristallisation mit dem zweiten Cofaktor F_0

Anhand der Strukturdaten der (6-4)-Photolyase konnte eine leere Tasche in der α/β -Domäne lokalisiert werden, welche potentiell die Bindetasche für den zweiten Cofaktor darstellen könnte, da sie bezüglich ihrer Orientierung und Architektur große Ähnlichkeit bezüglich der F_0 Bindestelle der CPD-Photolyasen aufweist. Gestützt auf den spektroskopischen Ergebnissen und den Aktivitätsuntersuchungen mit der rekonstituierten (6-4)-Photolyase (siehe Kapitel 3.6.4), wurden daher Co-Kristallisationsexperimente mit MTHF, FMN und F_0 durchgeführt. Hierbei konnte ausschließlich im Falle des F_0 eine Komplexierung des zugegebenen Cofaktors beobachtet werden, wobei die erhaltenen Kristalle (0.1 M HEPES pH 7.0, 15 – 20 % PEG 4000, 18 °C) bis zu einer Auflösung von 2.1 Å (PDB Eintrag: 3CVV) streuten. Die erfassten Daten- und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 4 im Anhang zusammengefasst. In Abbildung 53 kann man die Gesamtstruktur der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden und dem zweiten Cofaktor F_0 sowie die experimentelle Elektronendichte in der dafür vorgesehenen Antennenbindetasche sehen.

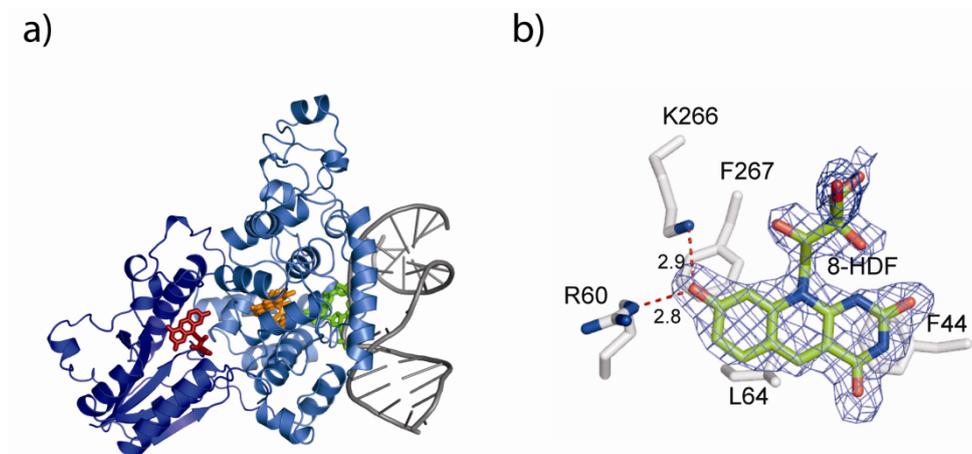


Abb. 53: Darstellung der (6-4)-Photolyase-T(6-4)T- F_0 -Struktur und Elektronendichte des zweiten Cofaktors. a) Ansicht der molekularen Architektur der *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase Struktur im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden und F_0 . Der T(6-4)T-Schaden ist in grün, das FAD in orange und das F_0 in rot dargestellt. b) Differenz- F_0 -DFc-Elektronendichtekarte für den Cofaktor F_0 , berechnet ohne dessen Atome, konturiert bei 2σ .

Die Reste Arg60 (2.8 Å) und Lys266 (2.9 Å) interagieren mit der 8-Hydroxygruppe des F_0 und führen somit zu dessen Deprotonierung. Desweiteren kann aufgrund der Cofaktor Bindung eine Neuorientierung des sich an der Oberfläche befindlichen *Loops* (Aminosäuren 47 – 65) festgestellt werden, wobei Ile50 dicht über dem Desazaflavinring liegt und Trp53 die Bindetasche gegenüber dem Lösemittel abschirmt (Abb. 54).

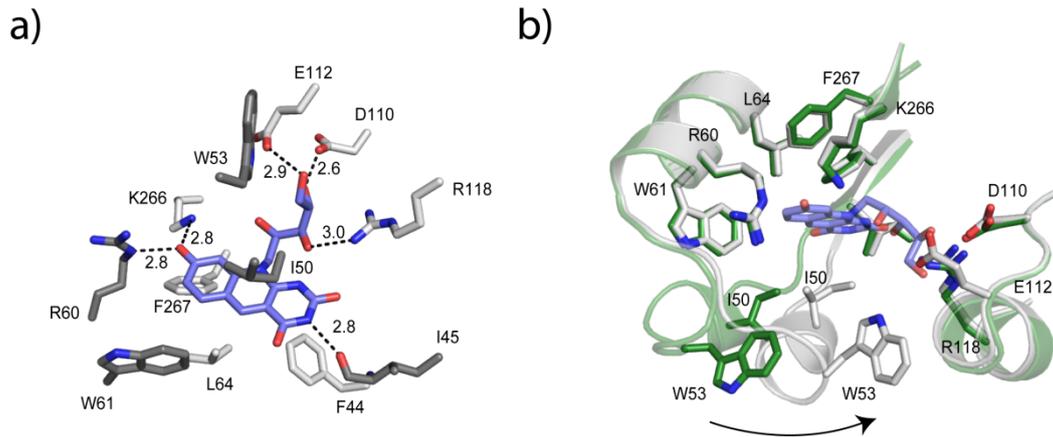


Abb. 54: a) Interaktionen zwischen dem F_0 Cofaktor und umgebenden Aminosäureresten. b) F_0 Bindetasche vor (grün) und nach (weiß) Bindung des Cofaktors.

Die Struktur der F_0 Bindetasche und die Abstände zwischen den Zentren der heterocyclischen Ringe des F_0 und des FAD (17.2 Å) ist vergleichbar mit denen der Photolyasen aus *A. nidulans* (18.2 Å, PDB Eintrag: 1TEZ)^[107, 108] und *T. thermophilus* (15.4 Å, PDB Eintrag: 2J07)^[101, 204] bzw. dem Cryptochrom aus *S. tokodaii* (17.3 Å, PDB Eintrag: 2E0I)^[100] (siehe dazu Tabelle 4 im Anhang). In Abbildung 55 sind exemplarisch die Abstände der beiden Cofaktoren zueinander und zur DNA von der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* und der CPD-Photolyase aus *A. nidulans* gegeneinander dargestellt.

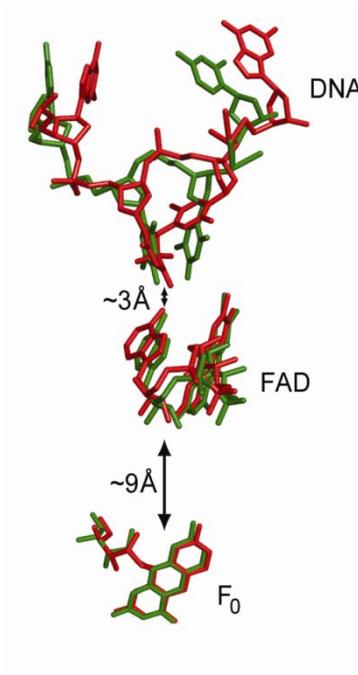
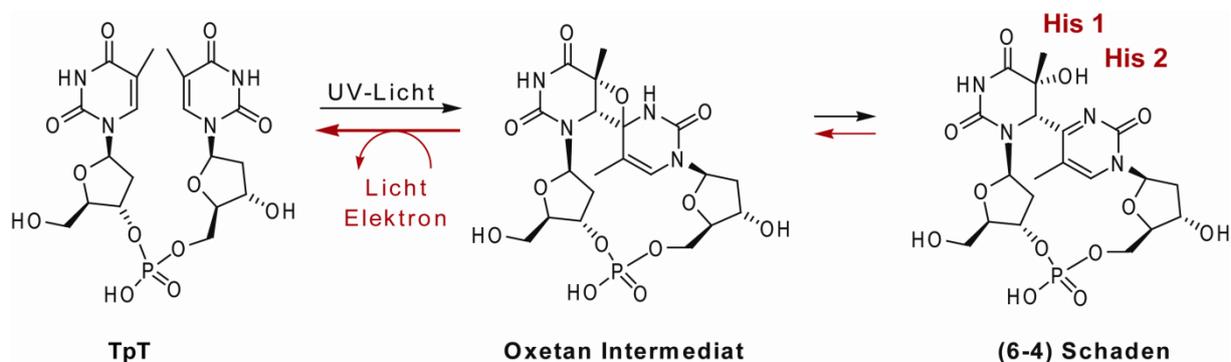


Abb. 55: Vergleich der beiden Photolyasen aus *A. nidulans* (grün) und aus *D. melanogaster* (rot) bezüglich der mittleren Abstände der Schäden zu den Cofaktoren FAD und F_0 .

Ähnlich den CPD-Photolyasen fungiert der zweite Cofaktor F_0 in der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* als lichtsammelnde Antenne, wobei die Energie über eine Distanz von etwa 15 Å (von Ring zu Ring) auf das reduzierte $FADH^-$ übertragen wird.^[115] Der Elektronentransfer auf den Schaden erfolgt schließlich von dem lichtangeregten $FADH^-$ über eine relativ kurze Distanz von nur 2.7 Å ($NH_{2FADadenin}-O_{4Schaden}$), mit der Annahme, dass der Adeninring des FADs an dem Elektronentransfer beteiligt ist. Die erhaltene Struktur der (6-4)-Photolyase zeigt eindeutig, dass die photophysikalisch kritische Cofaktor-Cofaktor-Anordnung während der Evolution erhalten wurde. Modellversuche haben gezeigt, dass der Abstand zwischen den beiden Cofaktoren einen kritischen Parameter darstellt, da der deprotonierte Cofaktor F_0 alternativ als Elektronenakzeptor fungieren kann und somit in der Lage ist, den notwendigen Elektronentransfer des reduzierten $FADH^-$ auf den Schaden abzufangen.^[115] Zusätzlich zu den spektroskopischen Daten, den Aktivitätsstudien sowie der direkten Isolierung von F_0 aus Fruchtfliegen zeigen die strukturelle Ergebnisse, dass der Cofaktor F_0 in der Natur weiter verbreitet ist, als bisher angenommen.

3.7.5 Mechanistische Untersuchungen zur Reparatur der (6-4)-Photolyase

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den CPD- und den (6-4)-Photolyasen, wurde für die (6-4)-Photolyasen ein ähnlicher Reparaturmechanismus wie bei den CPD-Photolyasen vermutet. Hierbei wurde postuliert, dass das Enzym mit der Hilfe von zwei konservierten Histidinen, den (6-4)-Schaden im aktiven Zentrum zuerst in ein Oxetan- bzw. Azetidintermediat umlagert. Anschließend erfolgt analog dem CPD-Schaden der Elektronentransfer auf den Schaden durch das reduzierte FADH⁻ und die Spaltung in die natürlichen Nukleotide.^[38, 140]



Schema 14: Vereinfachte Darstellung des postulierten Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyase.

Um die in Schema 14 vereinfacht dargestellte Hypothese der an der Katalyse beteiligten zwei konservierten Histidine zu untersuchen, wurden punktuelle Mutations- und Strukturstudien an der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* durchgeführt. Die beiden Histidine His365 und His369 sowie der Tyr423 Rest, welcher mit dem His369 interagiert, wurden somit sukzessive mutiert. In Übereinstimmung mit der Literatur war die Mutante His365 zu Asn365 (H365N) nicht in der Lage, den (6-4)-Schaden zu reparieren, wodurch nochmal dessen Schlüsselfunktion in der Reparatur verdeutlicht wird (siehe Abbildung 56).^[130]

Die H365N und H369M Mutanten wurden ebenfalls im Komplex mit (6-4)-Schaden enthaltener DNA kristallisiert, um mögliche strukturelle Effekte der Mutationen als Ursache für die beobachteten Reparatur ausschließen zu können. (siehe Abbildung 57).

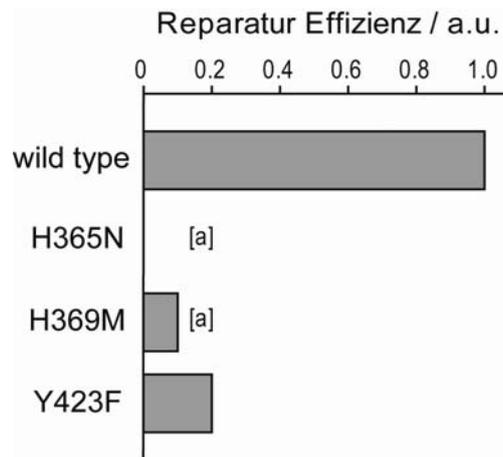


Abb. 56: Relative Reparatur Effizienzen der Wildtyp (6-4)-Photolyase sowie der drei Mutanten H365N, H369M und Y423F. ($c_{\text{DNA}} = 100 \mu\text{mol/L}$, $c_{(6-4)\text{-Photolyase}} = 100 \mu\text{mol/L}$ oder $^{[a]} c_{(6-4)\text{-Photolyase}} = 1000 \mu\text{mol/L}$ im Assaypuffer A).

Die erhaltene 3.2 Å Struktur der H365N Mutante (PDB Eintrag: 3CVW) zeigt (siehe Abbildung 57), dass die Carbamoylgruppe der Asparaginseitenkette die gleiche Position wie das εNH des Wildtyp Histidinrestes einnimmt, so dass die Inaktivierung des Enzyms aufgrund rein struktureller Effekte ausgeschlossen werden kann. Die Mutante His369 zu Met369 (H369M) zeigt im Gegensatz dazu eine zwar stark verringerte, jedoch eindeutig messbare, Reparaturaktivität auf (Abbildung 56). Die 3.2 Å Struktur dieser Mutante (PDB Eintrag: 3CVX) zeigt, dass die Methionin Seitenkette dieselbe räumliche Anordnung wie das Wildtyp Histidin einnimmt, wobei das His365 in der richtigen Orientierung gehalten wird (Abbildung 57). Die punktuellen Mutationen der beiden Histidine wurden nicht willkürlich gewählt, sondern entsprechen vielmehr den Aminosäureresten im aktiven Zentrum der CPD-Photolyasen (Abbildung 40).^[46] Die Doppelmutante H365N/H369M zeigte allerdings keinerlei Reparatur sowohl für den (6-4)-Schaden als auch für den CPD-Schaden auf, wobei von dieser Doppelmutante keine Co-Kristallstruktur erhaltenen werden konnte. Mutation von Tyr423 zu Phe423 (Y423F) führt ebenfalls zu einer Abnahme der Reparaturaktivität, wobei diese deutlich geringer ausfällt als bei der H369M Mutante (Abbildung 56). Die Punktmutationsstudien haben somit eindeutig gezeigt, dass die Triade His365-His369-Tyr423 einen entscheidenden Einfluss auf die Reparaturaktivität der (6-4)-Photolyase hat. Hierbei steigt die Aktivität mit sinkendem Abstand zum Schaden an, was für eine ladungsabhängige, stabilisierende Funktion der Triade spricht.

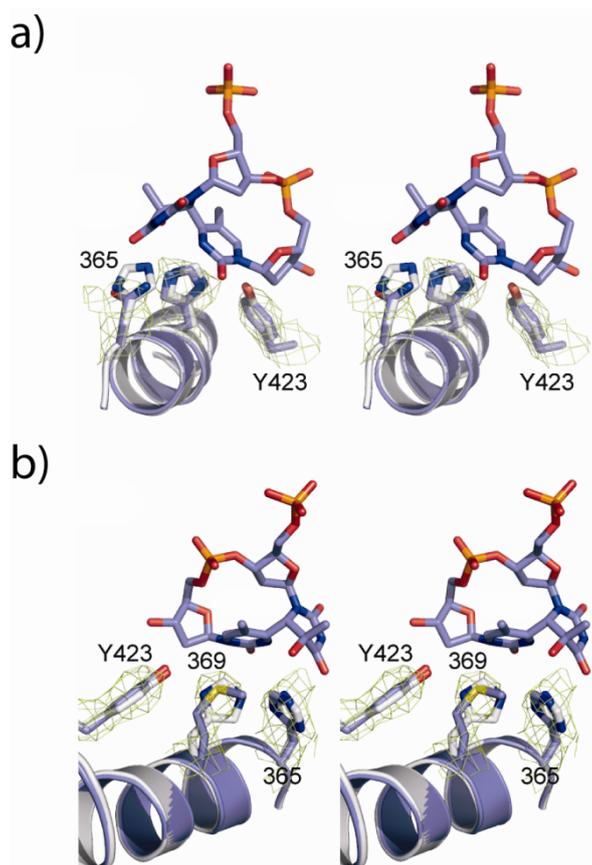


Abb. 57: Stereochemische Abbildungen der beiden Mutanten a) H365N und b) H369M. Verfeinerte 2mFo-DFc Elektronendichte der beiden Mutanten, konturiert bei 1σ . Die verfeinerten Strukturen der Mutanten (blau) sind mit der 2.0 Å Struktur der Wildtyp (6-4)-Photolyase überlagert (weiß). Informationen zur Datenmessung und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 4 im Anhang zusammengefasst.

Die Strukturdaten der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem (6-4)-Schaden vor und nach der *in situ* Reparatur stützen das bisher angenommene Oxetan-Modell (Schema 7) nicht, da man in diesem Fall von einer Deprotonierung der C5-OH Gruppe durch eines der essentiellen Histidine sowie der protonenkatalysierten Aktivierung des Acylimins durch das zweite Histidin ausgehen müsste. Die beiden Histidine können aufgrund ihrer Position unterhalb des Schadens das Acylimin nicht protonieren, welches sich in einer hydrophoben Umgebung befindet (Abbildung 51). Die Kristallstrukturen zeigen, dass die betreffende C5-OH-Gruppe Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Wassermolekül 276 (2.9 Å) und dem His365 (2.8 Å) eingeht, wobei His365 wiederum in Kontakt mit His369 (2.8 Å) steht. His369 interagiert seinerseits wieder mit der OH-Gruppe von Tyr423 (2.6 Å) (Abbildung 52).

Weber und Mitarbeiter konnten in ENDOR Studien zeigen, dass das der Ribitylkette des FADs (H1') nahegelegene Histidin (His365 in dem gezeigten Fall) mit hoher Wahrscheinlichkeit protoniert vorliegt, wobei dies eine Deprotonierung der C5-OH-Gruppe verhindern würde.^[205] Anstatt der Deprotonierung der C5-OH-Gruppe wäre eine Protonierung der Hydroxylgruppe mit Hilfe des His365, was die OH-Gruppe in eine bessere Abgangsgruppe überführt, denkbar. Diese Alternative zusammen mit der Tatsache, dass das Acylimin nicht aktiviert werden kann, macht das bis dato vermutete Oxetan-Modell daher unwahrscheinlich.

Desweiteren konnte der direkte Transfer der C5-OH-Gruppe auf das 3'-Pyrimidon in mit ¹⁸O-markiertem Wasser (95 Atom % ¹⁸O von *Sigma-Aldrich*) durchgeführten Reparaturexperimenten bestätigt und die vollständige Beibehaltung von ¹⁶O in der reparierten DNA festgestellt werden (Abbildung 58).

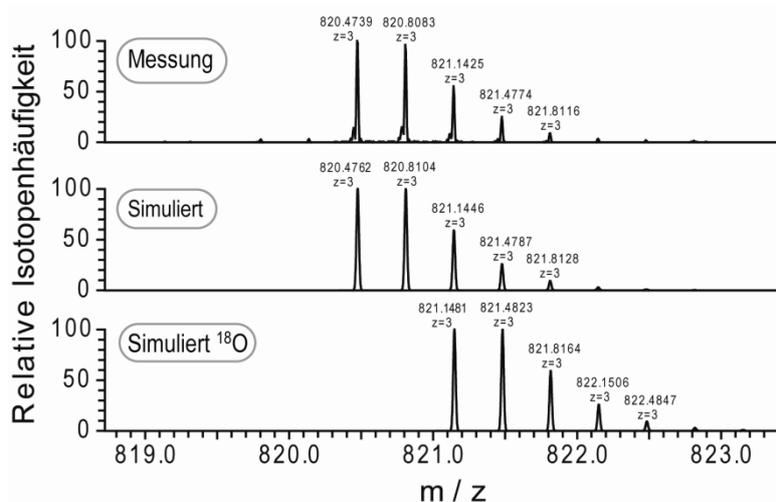
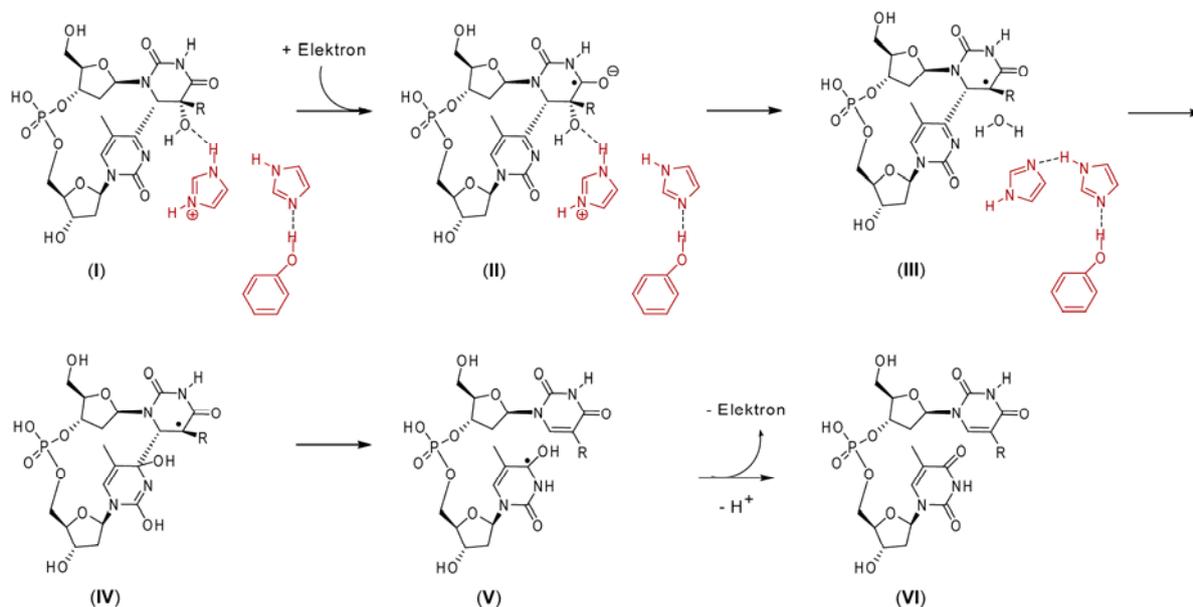


Abb. 58: Gemessenes FT-ICR-ESI Spektrum von **ODN 3-(6-4)** nach der Reparatur durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* sowie simulierte Spektren mit und ohne Einbau von ¹⁸O.

Basierend auf allen bis dahin erhaltenen biochemischen als auch strukturellen Ergebnissen kann man somit in Übereinstimmung mit den Daten einen neuen Mechanismus postulieren, dem kein Oxetan-Intermediat zu Grunde liegt. Bei diesem erfolgt zuerst ein direkter Elektronentransfer des lichtangeregten FADH* auf den (6-4)-Schaden, wobei das radikalische Anion (**II**) entsteht (Schema 15).



Schema 15: Postulierter Reparaturmechanismus der licht-induzierten und elektronentransferbasierten Spaltung des (6-4)-Schadens. T(6-4)T: R = CH₃, U(6-4)T: R = H.

Nach der Reduktion könnte durch die Protonierung der C5-OH-Gruppe durch das His365 das Intermediat **(III)** entstehen. Das Wassermolekül (welches in der aktiven Tasche gehalten wird) könnte möglicherweise nach Aktivierung des Acylimins durch die Histidine jetzt das Acylimin angreifen, um das radikalische Intermediat **(IV)** zu bilden. Das Intermediat **(IV)** würde anschließend durch einen Elektronenrücktransfer auf das FAD und dem Verlust eines Protons schnell in die natürlichen Nukleotide **(VI)** gespalten und repariert werden. Um die obige Hypothese zu stützen, wurde die Reparatur des T(6-4)T-Schadens mit der des U(6-4)T-Schadens verglichen. Durch die fehlende Methylgruppe des U(6-4)T-Schadens an der C5-Position, sollte die Stabilität des radikalischen Intermediats **(III)** deutlich herabgesetzt werden, so dass man hier entweder keine bzw. eine verringerte Reparatur erwarten würde (Abbildung 59).

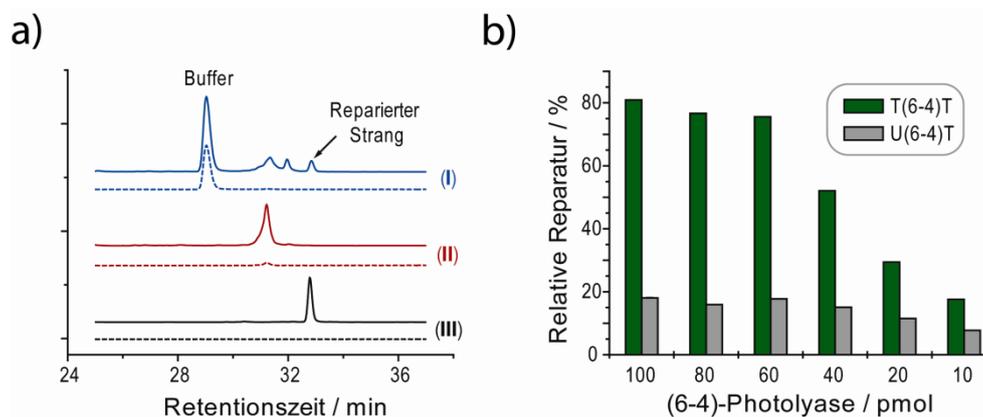


Abb. 59: a) Analytische *reversed-phase* HPLC Analyse (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) der Photoreaktivierung von **ODN 12-(6-4)** mit dem U(6-4)T-Schaden durch die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* unter Standardbedingungen. **(I)** Reparaturassay. **(II)** Chromatogramm von **ODN 12-(6-4)** mit dem zentralen (6-4)-Schaden. **(III)** Chromatogramm von **ODN 12** ohne (6-4)-Schaden. Die Elution wurde bei 260 nm (durchgezogene Linien) und 325 nm (gestrichelte Linien) detektiert. b) Vergleich der Reparatureffizienz der beiden Schäden T(6-4)T (**ODN 3-(6-4)**, grün) und U(6-4)T (**ODN 12-(6-4)**, grau) mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*.

Aus Abbildung 59 ist deutlich erkennbar, dass der U(6-4)T Schaden durch die (6-4)-Photolyase zwar repariert werden kann, jedoch die Effizienz um den Faktor vier bis fünf verglichen mit dem T(6-4)T-Schaden abnimmt. Dieser Sachverhalt steht in vollen Einklang mit dem hier postulierten Reparaturintermediat **(III)**, das durch die fehlende Methylgruppe an der C5-Position im Falle des U(6-4)T-Schadens schlechter stabilisiert ist und folglich die Reparatureffizienz mindert.

Der neue in Schema 15 vorgeschlagene Reparaturmechanismus bekommt zudem Zuspruch kürzlich erschienener Publikationen der Gruppen *Pierik*, *Buckel* und *Schlichting*.^[206-208] *Pierik* und *Buckel* schlagen bei der enzymatischen Dehydratisierung von (R)-2-Hydroxyl-CoA zu (E)-2-Enoyl-CoA durch die 2-Hydroxylacyl-CoA-Dehydratase einen ähnlichen Mechanismus bezüglich der Wasserabspaltung wie bei dem (6-4)-Schaden vor. Nach der Elektronenübertragung auf eine Carbonylgruppe, welche ein Ketylradikal erzeugt, wird hierbei ebenfalls in α -Stellung zur Carbonylgruppe ein Wasser abgespalten. Berechnungen der *Schlichting* Gruppe haben darüberhinaus gezeigt, dass ein nichtadiabatischer direkter Transfer der C5-OH-Gruppe auf das 3'-Pyrimidon wahrscheinlich ist.

Desweiteren konnte kein Oxetan-Intermediat in den Kristallstrukturen beobachtet werden. Es konnten zudem nur sehr geringe strukturelle Änderungen vor und nach der Reparatur im aktiven Zentrum festgestellt werden, was auch gegen die großen strukturellen Veränderungen des Oxetan-Modells spricht. Fasst man nun alle Ergebnisse zusammen, so erscheint das Oxetan-Modell sehr unwahrscheinlich, wobei vieles auf den in Schema 15 neu vorgeschlagenen Mechanismus hindeutet.

3.7.6 Co-Kristallisationsuntersuchungen der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit dem T(6-4)C- bzw. T(6-4)C*-Schaden

Wie bereits unter Kapitel 3.5.3 erwähnt, repariert die (6-4)-Photolyase den T(6-4)T- und den T(6-4)C-Schaden in etwa mit der gleichen Effizienz. Um die beiden Schäden bezüglich ihrer Bindungsmoden im aktiven Zentrum des Enzyms vergleichen zu können, wurde die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit dem T(6-4)C-Schaden Co-kristallisiert. Hierbei waren im Vergleich zu dem T(6-4)T-Schaden eine höhere Enzymkonzentration sowie ein größerer Überschuss an DNA für die Kristallisation notwendig.

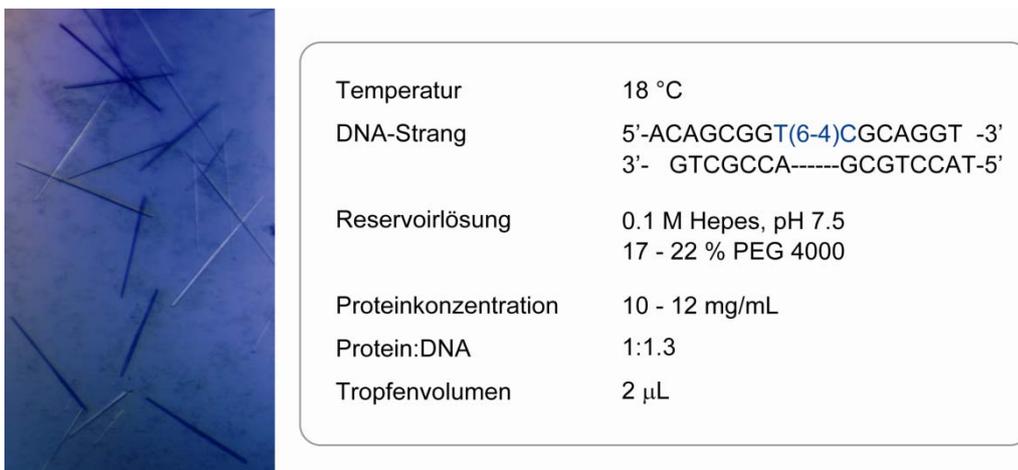


Abb. 60: Co-Kristallisation der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)C-Schaden (ODN 10-(6-4)) nach der *hanging-drop vapour-diffusion* Methode. Typische Form der erhaltenen Kristalle als lange Nadeln unter den angegebenen Standardbedingungen.

Die Kristalle wurden zur Strukturbestimmung an der Beamline PXI des *Swiss Light Source* (SLS, Villigen, Schweiz) Synchrotrons bzw. an der Beamline ID23-2 der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) vermessen. Die Daten konnten bis zu einer Auflösung von 2.9 Å (PDB Eintrag: 2WB2) gemessen und verfeinert werden (siehe Tabelle 5 im Anhang). Wie bereits bei der Struktur der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden beobachtet,^[209] wird der T(6-4)C-Schaden aus dem geöffneten DNA Duplex in die aktive Tasche des Enzyms gedreht, wobei die dabei entstehende Ausbuchtung von den gleichen Aminosäureresten wie bei dem T(6-4)T-Schaden stabilisiert wird (Abbildung 61a).

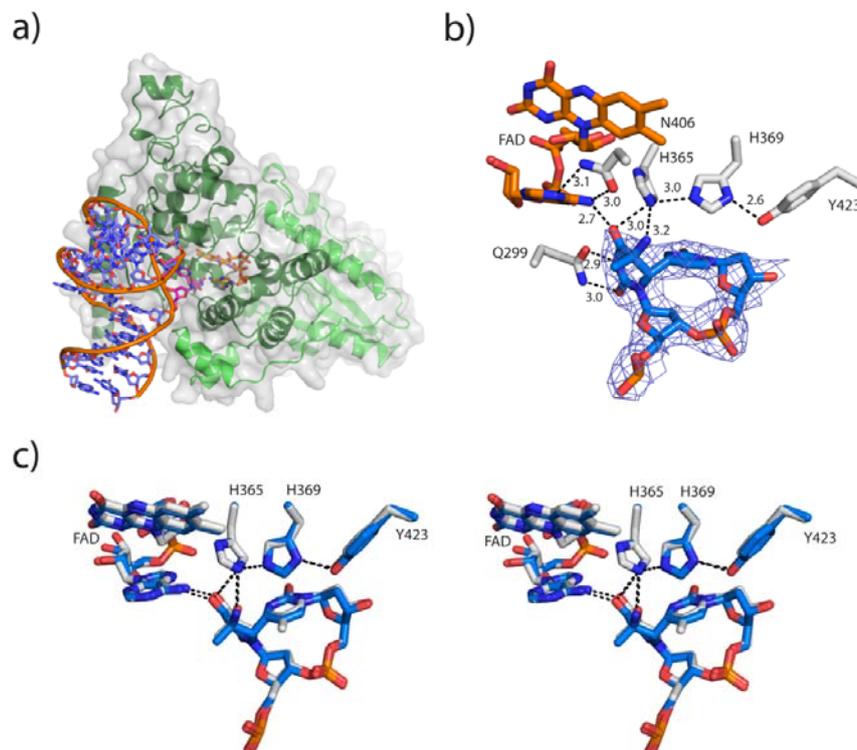
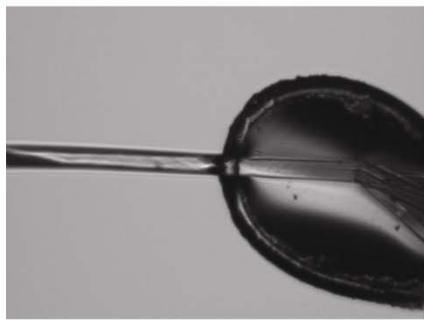


Abb. 61: Struktur des T(6-4)C-Schadens im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster*. a) Schematische Darstellung der Tertiärstruktur der Photolyase mit der α -helikalen Domäne in dunkelgrün und der α/β -Domäne in hellgrün. Der T(6-4)C-Schaden und der FAD-Cofaktor sind in pink bzw. orange abgebildet. Über das Modell wurde eine semitransparente Proteinoberfläche gelegt. b) Differenz-Fo-DFc-Elektronendichtekarte des Schadens nach „simulated annealing“ ohne die Atome des Schadens, konturiert bei 3σ . c) Stereoabbildung der Überlagerung des T(6-4)T- (grau) und des T(6-4)C-Schadens (blau) im Komplex mit der (6-4)-Photolyase.

Wie bereits von früheren NMR und NOE Studien vermutet,^[210, 211] zeigt die Kristallstruktur die gleiche absolute Konfiguration der C5 und C6 Atome des T(6-4)C-Schadens wie die des T(6-4)T-Schadens auf. Im Gegensatz zu dem T(6-4)T-Schaden fehlt dem T(6-4)C-Schaden an der C5-Position des Pyrimidonrings eine Methylgruppe und anstatt der OH-Gruppe an der C5-Position des Pyrimidinrings befindet sich eine NH₂-Gruppe. Trotz dieser Unterschiede bildet die (6-4)-Photolyase vergleichbare Interaktionen zu dem T(6-4)C- als auch zu dem T(6-4)T-Schaden aus. Wie aus Abbildung 61b ersichtlich, interagiert der T(6-4)C-Schaden mit der Photolyase durch Watson-Crick Wasserstoffbrückenbindungen über Gln299 mit dem Pyrimidin N3 (2.9 Å) und O2 (3.0 Å). Zudem besteht auch eine entscheidende Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem für die Katalyse essentiellen His365 mit der C5-Aminogruppe sowie mit dem C4-Carbonyl des Pyrimidinrings des Schadens. Die für die Katalyse wichtige Triade His365-His369-Tyr423 ist genauso angeordnet, wie bereits in der T(6-4)T-Struktur beobachtet. Abbildung 61c zeigt die Überlagerung der beiden Strukturen mit dem T(6-4)T-Schaden in grau und dem T(6-4)C-Schaden in blau. Hierbei kann man nur geringe Unterschiede feststellen. Diese kleinen Differenzen in der Länge der Wasserstoffbrückenbindungen kann durch intrinsische Koordinatenfehler der geringeren Auflösung bei 2.9 Å der T(6-4)C-Struktur erklärt werden. Anhand der strukturellen Vergleiche lässt sich jedoch eindeutig sagen, dass der T(6-4)C-Schaden in einer sehr ähnlichen Weise wie der T(6-4)T-Schaden in der aktiven Tasche der (6-4)-Photolyase gehalten wird, so dass ein ähnlicher Reparaturmechanismus für den T(6-4)C-Schaden (wie in Schema 15 dargestellt) angenommen werden kann.

Desweiteren wurde der modifizierte T(6-4)C*-Schaden im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* kristallisiert. Dabei sollte vor allem geklärt werden, ob der Schaden in einer ähnlichen Weise wie die (6-4)-Schäden T(6-4)T und T(6-4)C in der aktiven Tasche des Enzyms gebunden ist und somit dem gleichen Reparaturmechanismus folgt. Dies wäre von großem Interesse, da man somit postulieren könnte, dass die Reparatur der Dewar-Isomere allgemein über die jeweiligen (6-4)-Schäden als Intermediate verläuft.

Durch die Verwendung von ähnlichen Kristallisationsbedingungen wie bei dem T(6-4)C-Schaden formten sich in diesem Fall nach ein bis zwei Tagen lange Kristallnadeln. Die Kristalle wurden an der PXIII Beamline des *Swiss Light Source* (SLS, Villigen, Schweiz) Synchrotrons vermessen und beugten Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 2.0 Å (PDB Eintrag: 2WQ6).



Temperatur	18 °C
DNA-Strang	5'-ACAGCGGT(6-4)C*GCAGGT -3' 3'- GTCGCCA-----GCGTCCAT-5'
Reservoirlösung	0.1 M Hepes, pH 7.0 13 - 17 % PEG 1500
Proteinkonzentration	12 - 13 mg/mL
Protein:DNA	1:1.1
Tropfenvolumen	2 µL

Abb. 62: Co-Kristallisation der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)C*-Schaden (**ODN 15-(6-4)**) nach der *hanging-drop vapour-diffusion* Methode. Typische Form der erhaltenen Kristalle als lange Nadeln in einem *Loop* direkt vor der Messung am Synchrotron.

Die erfassten Daten- und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 6 im Anhang zusammengefasst. Die Kristalle gehören der gleichen Raumgruppe ($P2_12_12_1$) mit vergleichbaren Einheitszellenkonstanten wie die der T(6-4)T- und T(6-4)C-Schäden an. In Abbildung 63 ist die aktive Tasche des Enzyms mit dem T(6-4)C*-Schaden dargestellt.

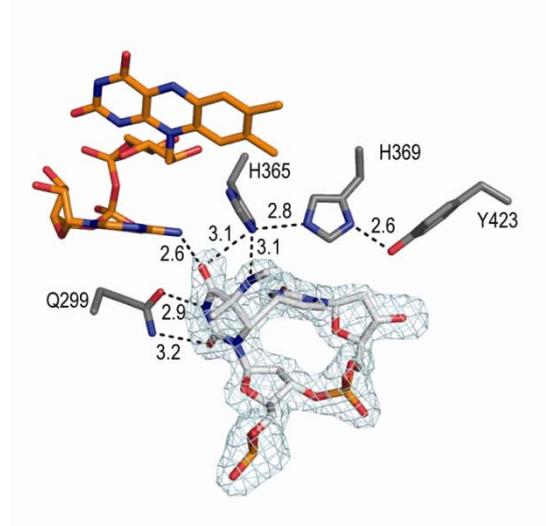


Abb. 63: Kristallstruktur der aktiven Tasche der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)C*-Schaden. Die entsprechende Differenz-Fo-DFc-Elektronendichtekarte berechnet ohne die Atome des Schadens wurde bei 3σ konturiert.

Die strukturellen Daten zeigen, dass der modifizierte T(6-4)C*-Schaden in gleicher Weise wie die natürlichen (6-4)-Schäden T(6-4)T und T(6-4)C in der aktiven Tasche des Enzyms gebunden ist. Alle essentiellen Aminosäurereste sowie der Cofaktor FAD sind in der korrekten Position für die Reparatur angeordnet. Aufgrund der gleichen Bindemoden für die verschiedenen (6-4)-Schäden, kann man somit davon ausgehen, dass die (6-4)-Photolyase bei der Reparatur der selbigen den gleichen Mechanismus verwendet (siehe dazu auch Schema 15).

3.7.7 Co-Kristallisationsuntersuchungen der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit den Dewar-Isomeren

Wie bereits in Kapitel 3.5.4 vorgestellt, ist die (6-4)-Photolyase in der Lage, den T(Dew)C- als auch den T(Dew)C*-Schaden zu reparieren, jedoch konnte unter identischen Bedingungen keine Reparatur im Falle des T(Dew)T-Schadens beobachtet werden. Dieser Sachverhalt sollte mit Hilfe von Strukturdaten der Photolyase im Komplex mit verschiedenen Dewar-Isomeren besser aufgeklärt werden.

Hierbei konnten alle Dewar-Isomere im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* unter den jeweiligen Bedingungen der (6-4)-Schäden kristallisiert und folgende Auflösungen der Röntgenbeugungsdaten erzielt werden:

T(Dew)T: 2.9 Å

T(Dew)C: 2.6 Å

T(Dew)C* 2.3 Å (PDB Eintrag: 2WQ7)

Bei den beiden Dewar-Isomeren T(Dew)T und T(Dew)C hat sich allerdings bei der Strukturlösung gezeigt, dass die Auflösung zu gering war, um eindeutig den Dewar-Schaden der erhaltenen Elektronendichte zuzuordnen. Möglicherweise werden die Dewar-Isomere während der Messung am Synchrotron durch die energiereiche Strahlung wieder zurück in die entsprechenden (6-4)-Schäden umgewandelt. Erst bei einer Auflösung von 2.3 Å der T(Dew)C*-Struktur konnte die Elektronendichtekarte eindeutig als Dewar-Schaden interpretiert werden. Bei der Verfeinerung der Struktur wurden zwei verschiedene geometrische Anordnungen des T(Dew)C*-Schadens parallel getestet. Zum Einen die

Geometrie nach einer NMR-Struktur (PDB Eintrag: 1QKG) und zum Anderen eine Geometrie nach Berechnungen von *Iwai* und Mitarbeitern.^[212] Die beiden Geometrien unterscheiden sich in der Anordnung des Winkels zwischen den beiden 4-Ringen sowie in einer leichten Drehung der beiden 4-Ringe zueinander. Es hat sich gezeigt, dass das Dewar-Isomer nach der Geometrie von *Iwai* etwas besser in die Elektronendichte passte, wenngleich man eine Drehung der beiden 4-Ring Ebenen gegeneinander bei einer Auflösung von 2.3 Å nicht ausschließen kann.

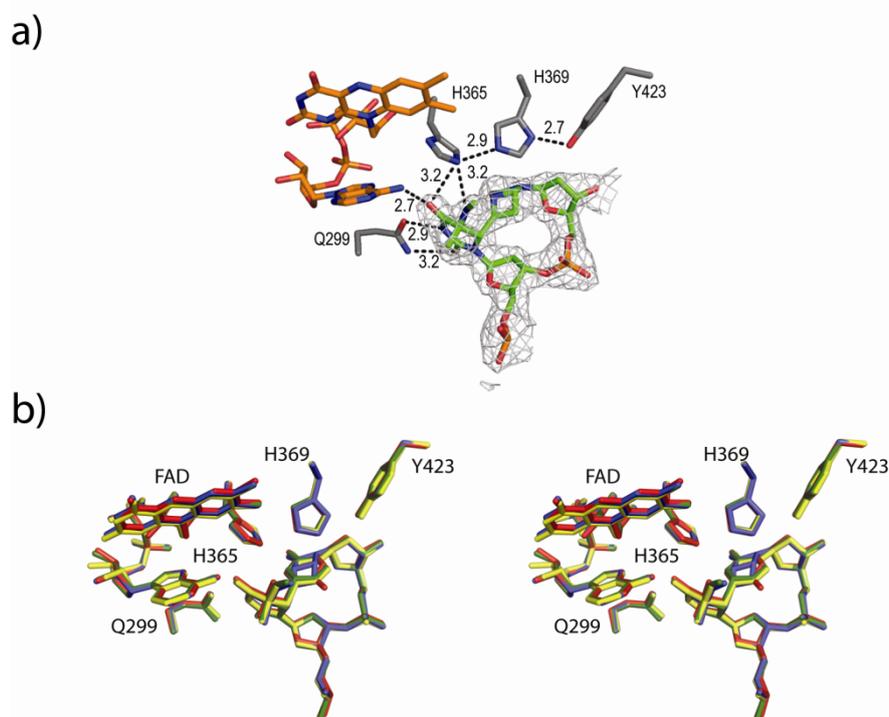


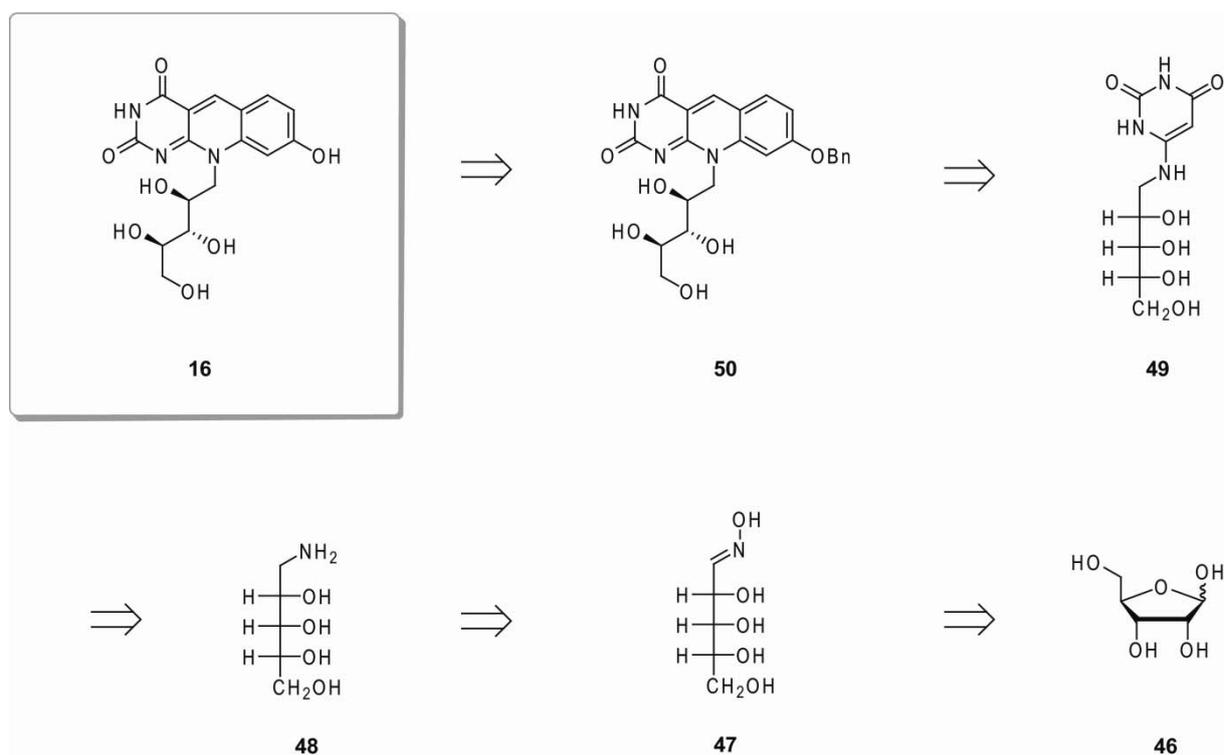
Abb. 64: a) Kristallstruktur der aktiven Tasche der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(Dew)C*-Schaden. Die entsprechende Differenz-Fo-DFc-Elektronendichtekarte berechnet ohne die Atome des Schadens wurde bei 3σ konturiert. b) Stereoansicht der strukturellen Überlagerung der (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden (rot, PDB Eintrag: 3CVU), dem T(6-4)C-Schaden (gelb, PDB Eintrag: 2WB2), dem T(6-4)C*-Schaden (grün, PDB Eintrag: 2WQ6) und dem T(Dew)C*-Schaden (blau, PDB Eintrag: 2WQ7).

In der in Abbildung 64b gezeigten strukturellen Überlagerung der (6-4)-Schäden T(6-4)T, T(6-4)C und T(6-4)C* mit dem T(Dew)C*-Schaden ist erkennbar, dass die verschiedenen Schäden nahezu identisch in der aktiven Tasche der (6-4)-Photolyase gebunden sind. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich, dass alle (6-4)- sowie Dewar-Schäden

in der gleichen Art und Weise gebunden werden und über den in Schema 15 dargestellten Mechanismus repariert werden.

3.8 Synthese des Cofaktors F₀/8-HDF

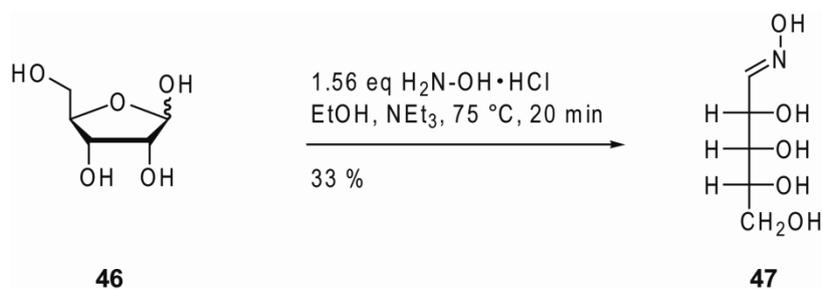
Für die Rekonstitutions- und Kristallisationsversuche der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* mit dem Chromophor 8-Hydroxy-5-desazaflavin (F₀ oder 8-HDF), musste selbiger zuerst synthetisch hergestellt werden, da F₀ kommerziell nicht erhältlich ist. Hierbei wurde auf eine alte Synthesestrategie zurückgegriffen, welche von D-Ribose als Startmaterial ausgeht.^[213-215] In Schema 16 ist eine Übersicht der Retrosynthese des Cofaktors dargestellt.



Schema 16: Retrosynthese des 8-Hydroxy-5-desazaflavins F₀ (8-HDF, **16**).

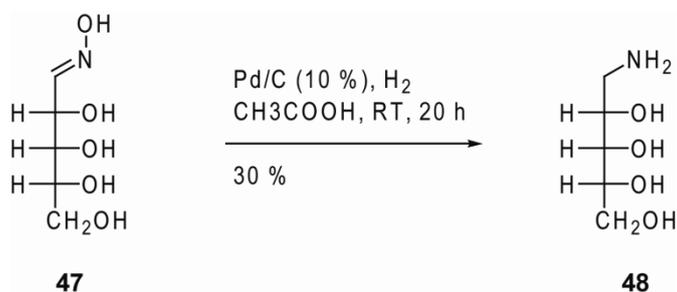
3. Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Schritt der Synthese wurde D-Ribose **46** mit Hydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin in Ethanol zu dem D-Ribose-Oxim **47** umgesetzt.^[214] Nach dem Umkristallisieren aus Ethanol konnte das Oxim in einer Ausbeute von 33 % als farbloses, kristallines Pulver erhalten werden (Schema 17).



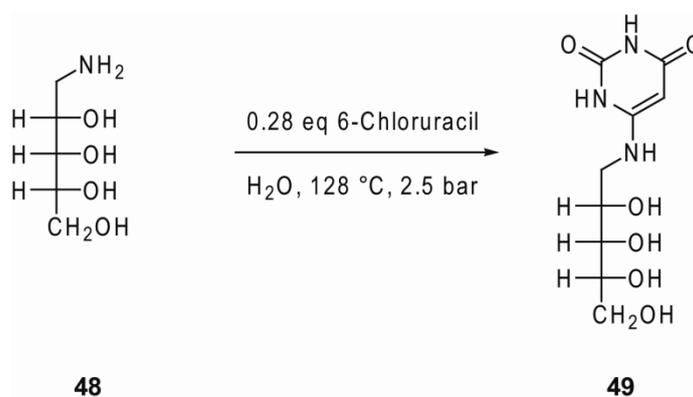
Schema 17: Umsetzung der D-Ribose **46** zum D-Ribose-Oxim **47**.

Durch katalytische Hydrierung des Oxims **47** in Essigsäure nach *Maley und Plaut*^[215] konnte das Ribitylamin **48** erhalten werden (Schema 18). Das erhaltene gelbe, ölige Rohprodukt wurde mit Hilfe einer Ionenausch-Chromatographie (Dowex 1-X8, Hydroxidform) aufgereinigt, wobei der Literatur zufolge das Ribitylamin anschließend nicht ganz rein vorliegt.^[215] Dementsprechend wurde der Gehalt an reinem Ribitylamin durch Titration mit 0.1 M HCl-Lösung bestimmt, welcher bei 60 % lag. Letztendlich konnte **48** somit in einer Ausbeute von 30 % als gelbes Öl erhalten werden.



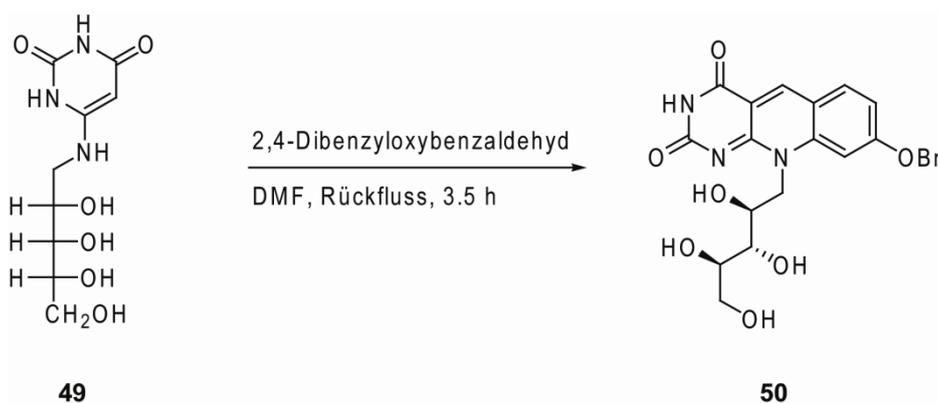
Schema 18: Katalytische Hydrierung des Oxims **47** zum Ribitylamin **48**.

Der nächste Schritt der Synthese ist die Kupplung desamins **48** mit 6-Chloruracil (Schema 19).



Schema 19: Kupplung desamins **48** mit 6-Chloruracil.

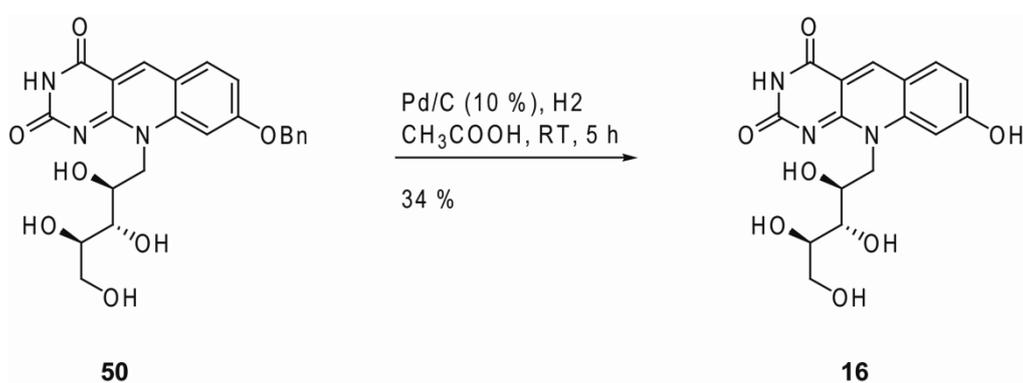
Erfahrungen von *A. Mees* im Arbeitskreis *Carell* haben hierbei gezeigt,^[216] dass die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, wenn das Amin im Überschuss eingesetzt wird, wobei keine vollständig saubere Isolierung des Ribitylaminouracilderivats **49** möglich war. Auf Grund dessen wurde das Amin **48** zusammen mit 6-Chloruracil in einem Druckrohr in Wasser gelöst, erhitzt und nach Entfernung des Lösemittels *in vacuo*, das erhaltene Rohprodukt ohne weiteren Reinigungsschritt in der nächsten Reaktion eingesetzt (Schema 20).



Schema 20: Umsetzung des Ribitylaminouracilderivats **49** zum Benzylgeschützten Desazariboflavin **50**.

Das Ribitylaminouracilderivat/Amin-Gemisch wurde mit 2,4-Dibenzoyloxybenzaldehyd in DMF versetzt und unter Rückfluss erhitzt.^[213] Während der Reaktion konnte eine starke Fluoreszenz der braunen Reaktionslösung beobachtet werden. Durch Eingießen der Reaktionslösung in Eiswasser, konnte das schwerlösliche Benzylgeschützte Desazariboflavin **50** anschließend abzentrifugiert und in Form eines gelben Pulvers isoliert werden.

Das Desazariboflavin **50** wurde letztendlich mit Pd/C (10 %) in Eisessig entschützt und mittels präparativer *reversed-phase* HPLC (*Nucleosil 100-7 C18*, Puffersystem **P2**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 15 mL/min) aufgereinigt (Schema 21 und Abbildung 65).



Schema 21: Entschützung des Desazaflavins **50** zum 8-Hydroxy-5-desazaflavin **16**.

Das gewünschte 8-Hydroxy-5-desazaflavin **16** konnte als hellgelbes Pulver in einer Ausbeute von 34 % isoliert werden. Der erhaltene Cofaktor wurde anschließend auf seine Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht und als 1 mM Stocklösung in den entsprechenden Puffern gelagert.

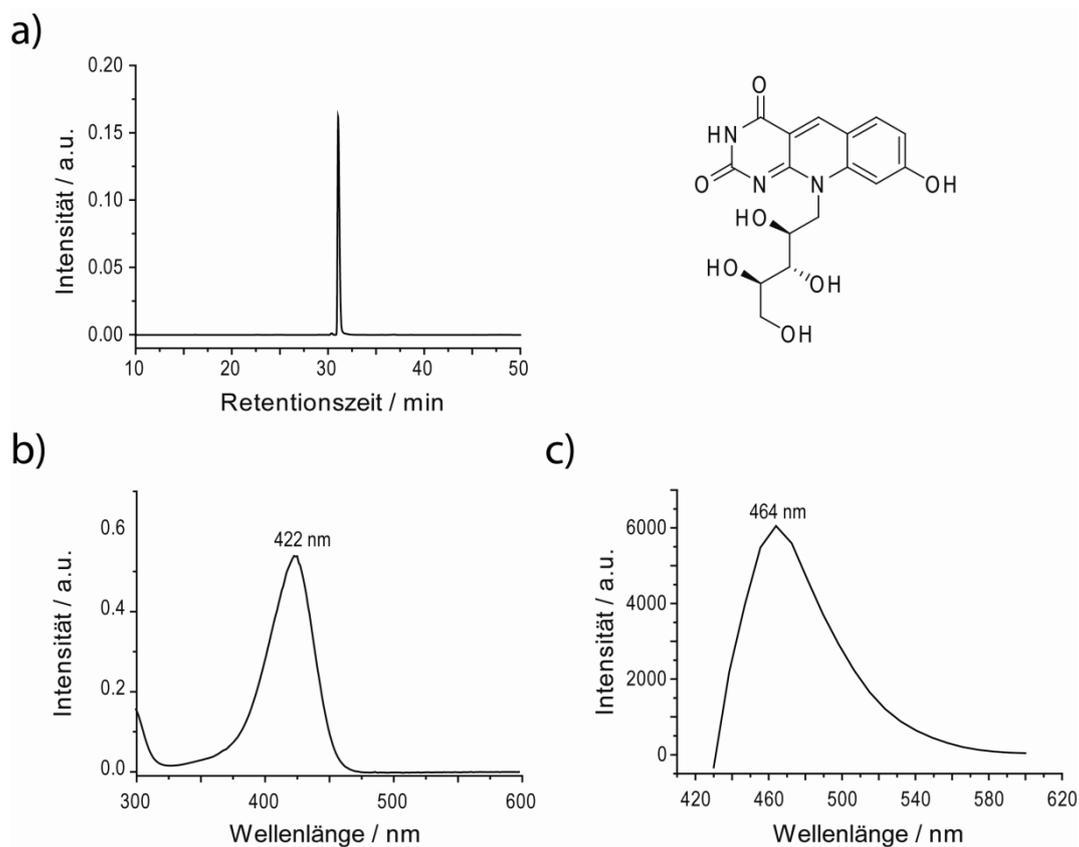


Abb. 65: a) *Reversed-phase* HPLC Analyse (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) des gereinigten F_0 bei 260 nm b) UV/VIS-Spektrum des gereinigten F_0 . c) Fluoreszenzspektrum von F_0 bei $\lambda_{\text{Ex}} = 420$ nm.

Die in Abbildung 65 dargestellten spektroskopischen Eigenschaften des synthetisch hergestellten F_0 spiegeln die charakteristischen Absorptions- und Emissionsmaxima des Chromophors wieder.^[217-219]

3.9 Synthese eines (6-4)-Reparaturintermediat-Analogen

Bei der Bildung des T(6-4)T-Schadens durch eine Paternó-Büchi $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition zweier benachbarter Thyminen entsteht zuerst ein Oxetanintermediat, welches bei Temperaturen $> -80\text{ }^\circ\text{C}$ in den entsprechenden (6-4)-Schaden zerfällt.^[48] Im Gegensatz dazu ist der entsprechende $s^5\text{T(Thietan)T}$ -Schaden **27** stabil, wobei sich jedoch herausstellte, dass dieser kein Substrat für die (6-4)-Photolyase ist.^[135, 136, 138, 140] Dieses Resultat stellt den postulierten Reparaturmechanismus der (6-4)-Photolyase über einen viergliedrigen Übergangszustand (Oxetan bzw. Azetidin) abermals in Frage. Es sollte daher versucht werden, ein Reparaturintermediat-Analogen des neu postulierten Reparaturmechanismus herzustellen, es in DNA einzubauen und im Komplex mit der (6-4)-Photolyase zu Co-kristallisieren. Dies wäre von höchstem Interesse, da man somit erstmals Informationen auf atomarer Ebene bezüglich eines Intermediats während der Reparatur durch die (6-4)-Photolyase erhalten würde. Da das hier postulierte Intermediat (**III**) der Reparatur eine radikalische Struktur darstellt, wurde bei der Wahl des Analogons an eine ähnliche Verbindung mit einer Doppelbindung gedacht, welche in Abbildung 66 dargestellt ist.

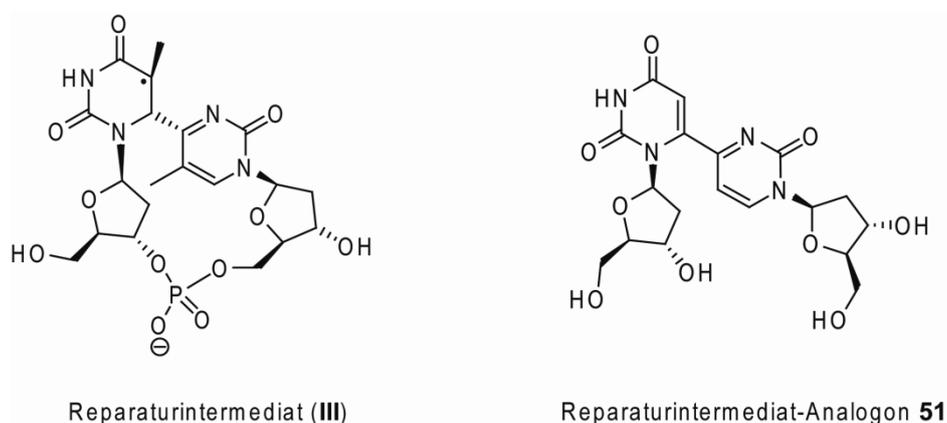
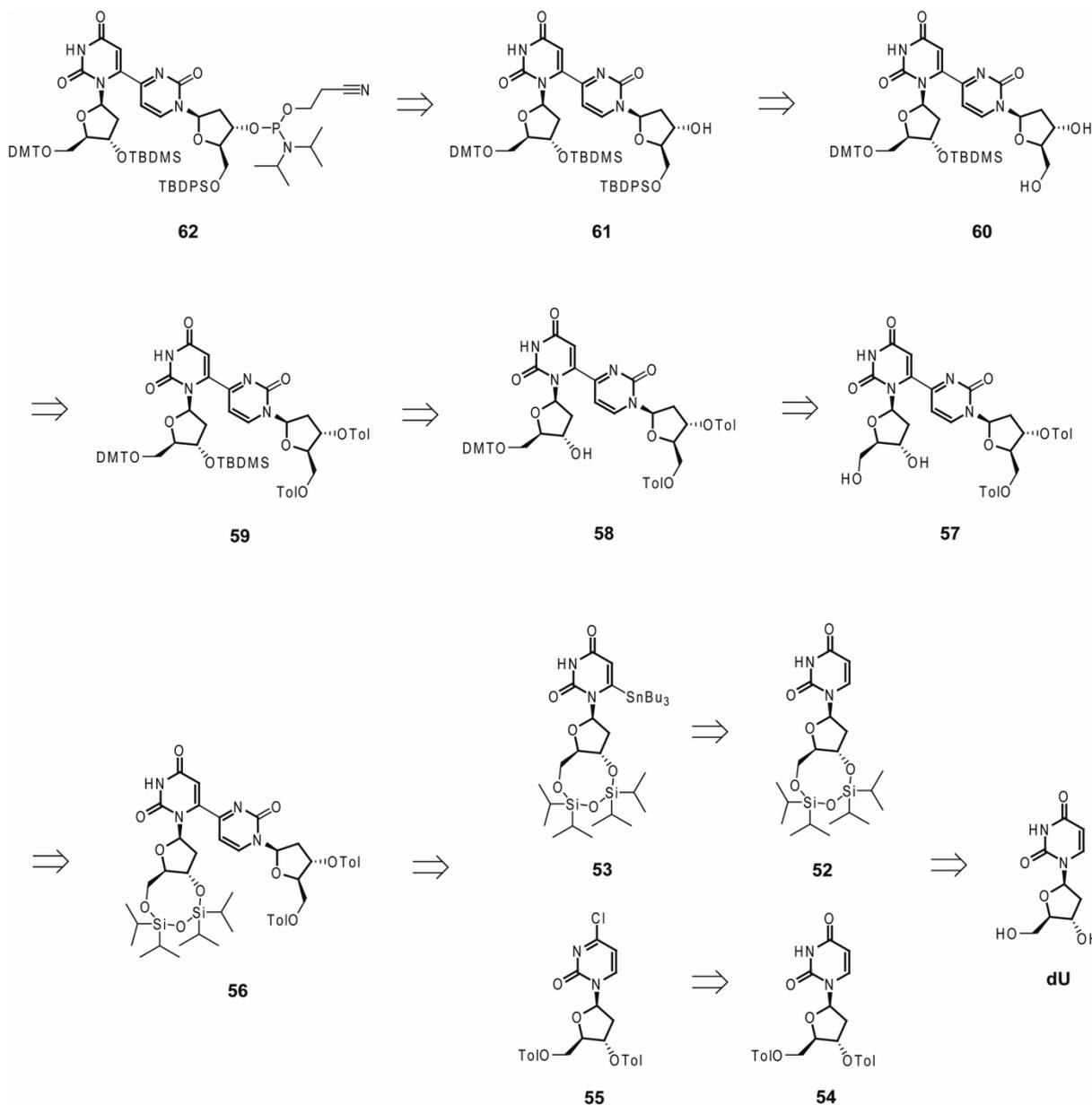


Abb. 66: Darstellung des Reparaturintermediat (**III**) und des gewählten Reparaturintermediat-Analogen **51**.

Bei der Syntheseplanung konnte auf eine generelle Route zur Synthese von 4-substituierten Pyrimidinnukleosiden zurückgegriffen werden.^[220] Ausgehend von 2'-Desoxyuridin als Startmaterial benötigt man hierbei zwei *building blocks* zur Verknüpfung der C6-Position des Pyrimidinrings mit der C4-Position des Pyrimidonrings, um die Grundstruktur des (6-4)-Schadens aufzubauen. Nach dem Schlüsselschritt, der Kupplung der beiden funktionalisierten

3. Ergebnisse und Diskussion

Nukleoside, folgen einige Entschützungs- und Schützungsstufen nacheinander, bevor man das Analogon mittels Festphasensynthese in DNA einbauen kann (Schema 22).



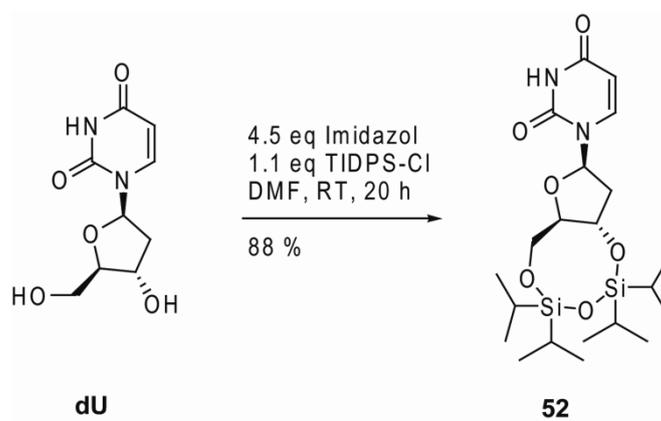
Schema 22: Darstellung der Retrosynthese des Reparaturanalogons ausgehend von 2'-Desoxyuridin.

Dieser Syntheseplanung liegt zum Einen die unterschiedliche Reaktivität des primären 5'- und des sekundären 3'-Alkohols mit den gewünschten Schutzgruppen zugrunde. Zum Anderen ermöglichen die orthogonalen Schutzgruppen der beiden *building blocks*, das Analogon gezielt für die DNA Festphasensynthese funktionalisieren zu können.

3.9.1 Synthese des Nucleosids A

3.9.1.1 Silyl-Schützung des 5'- und 3'-Endes von 2'-Desoxyuridin

Mit einem geringen Überschuss von 1.1 Äquivalenten an TIPDS-Cl wurden die beiden Alkoholgruppen des Ausgangsmaterials 2'-Desoxyuridin mit einer „Silylklammer“ geschützt.^[221] Die Umsetzung gelang problemlos bei Raumtemperatur über Nacht. Das geschützte Nucleosid **52** konnte als farbloser Schaum in einer Ausbeute von 88 % erhalten werden (Schema 23).

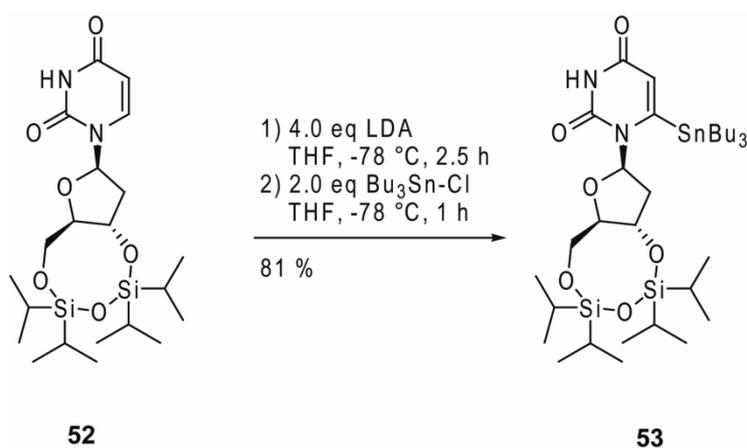


Schema 23: Schützung der 5'- und 3'-OH-Gruppe von 2'-Desoxyuridin mit TIPDS-Cl.

3.9.1.2 Stannylierung der C6-Position des geschützten 2'-Desoxyuridins **52**

Die Funktionalisierung der C6-Position des 2'-Desoxyuridins **52** mit $\text{Bu}_3\text{Sn-Cl}$ erfolgte nach einem Protokoll von *Palmisano* und *Santagostino* (Schema 24).^[222]

Hierbei hat sich gezeigt, dass ein optimaler Umsatz erzielt werden konnte, wenn das LDA zunächst frisch aus *n*-BuLi und Diisopropylamin bei 0 °C *in situ* hergestellt worden ist. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf -78 °C wurden schließlich das in THF gelöste Uridin **52** und nach 2.5 h Reaktionszeit, 2.0 Äquivalente an Tributylzinnchlorid zugegeben. Das Zinnorganyl **53** konnte in einer Ausbeute von 81 % als farbloser, amorpher Feststoff erhalten werden.

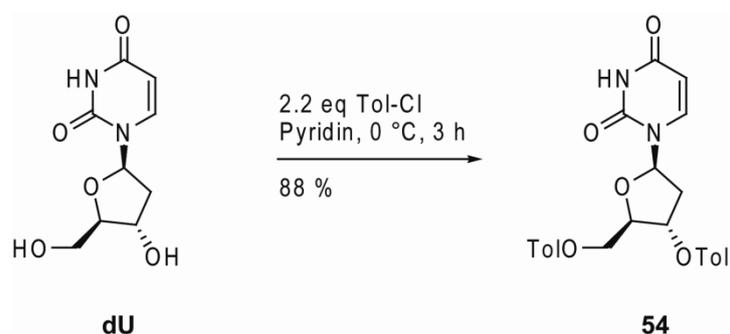


Schema 24: Funktionalisierung der C6-Position von **52**.

3.9.2 Synthese des Nukleosids B

3.9.2.1 Toluoyl-Schützung des 5'- und 3'-Endes von 2'-Desoxyuridin

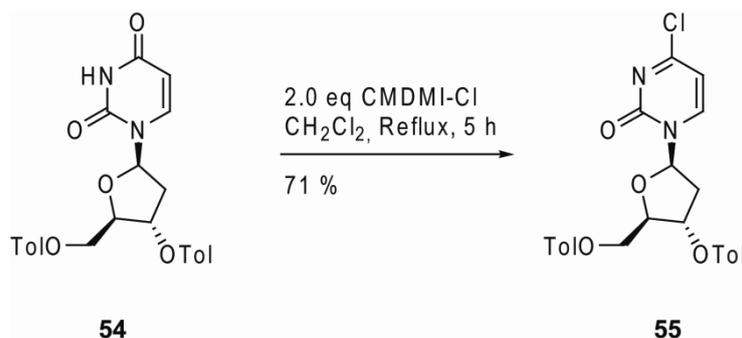
Die Synthese des zweiten Bausteins geht ebenfalls von 2'-Desoxyuridin als Startmaterial aus, wobei eine zum Silylether orthogonale Schutzgruppe verwendet werden musste. Unter Standardbedingungen wurde das 2'-Desoxyuridin unter der Verwendung von einem leichten Überschuss an Toluoylchlorid geschützt.^[223, 224] Man erhielt das geschützte Nukleosid **54** in einer Ausbeute von 88 % als farblosen Feststoff (Schema 25).



Schema 25: Schützung der 5'- und 3'-OH-Gruppe von 2'-Desoxyuridin mit Tol-Cl.

3.9.2.2 Chlorierung der C4-Position des geschützten 2'-Desoxyuridins **54**

Die Chlorierung des Uridins **54** an der C4-Position konnte unter der Verwendung des kommerziell erhältlichen Chloromethyldimethyliminiumchlorid (CMDMI-Cl, *Vilsmeier*-Reagenz) erfolgreich durchgeführt werden (Schema 26).^[225]



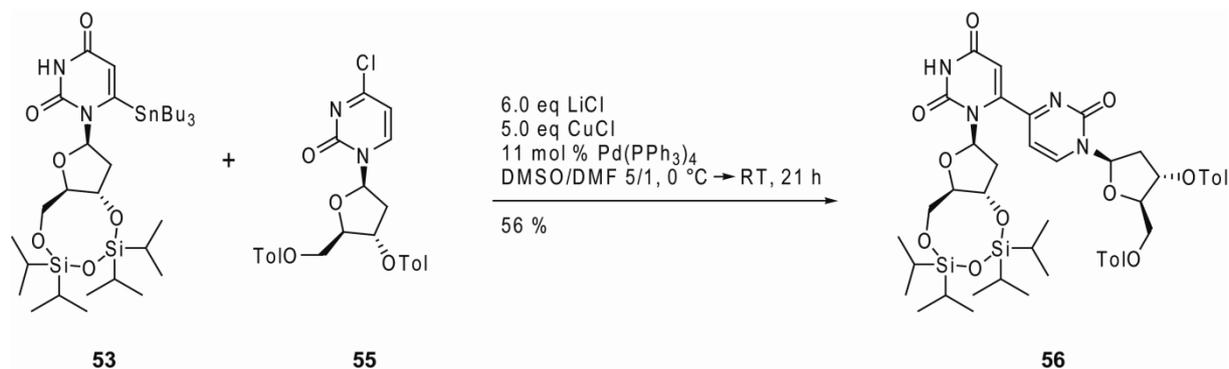
Schema 26: Chlorierung der C4-Position von **54** mit dem *Vilsmeier*-Reagenz.

Das funktionalisierte Nukleosid **55** konnte unter den in Schema 26 angegebenen Bedingungen in einer Ausbeute von 71 % als farbloser Feststoff isoliert werden. An dieser Stelle bleibt anzumerken, dass die Chlorverbindung **55** sehr Hydrolyselabil ist. Dementsprechend wurde die Verbindung nach der Aufreinigung und dem Trocknen *in vacuo* immer direkt für die nachfolgende *Stille*-Kupplung eingesetzt.

3.9.3 Kupplung und Funktionalisierung der beiden Nukleoside A und B zum Analogon **62**

3.9.3.1 *Stille*-Kreuzkupplung der beiden *building blocks*

Der Schlüsselschritt der Synthese des Analogons ist die *Stille*-Kupplung der beiden Bausteine **53** und **55**. Die besten Ergebnisse konnten hierbei mit einer optimierten Synthesevorschrift nach *Corey* und Mitarbeitern erzielt werden (Schema 27).^[226]

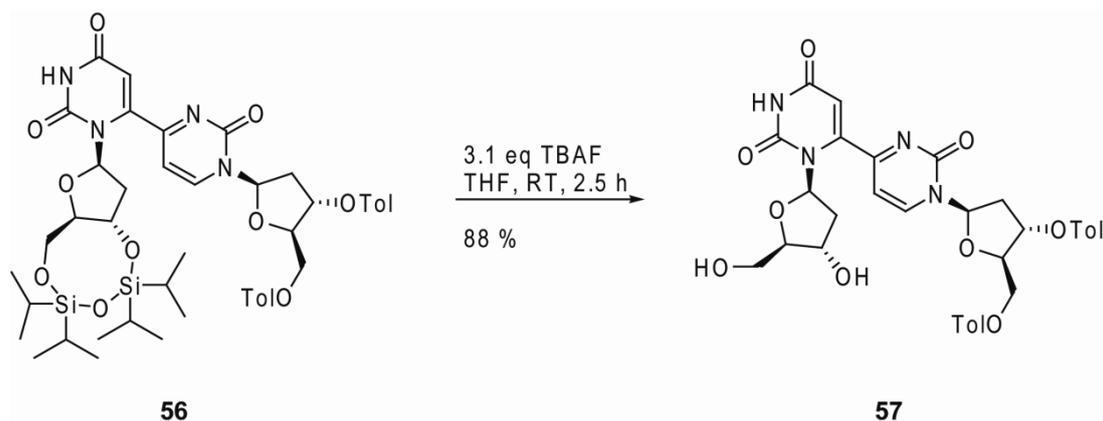


Schema 27: Stille-Kreuzkupplung der beiden *building blocks* **53** und **54** zum Dinukleosid **56**.

Unter striktem Sauerstoffausschluss und der Verwendung von sechs Äquivalenten an LiCl und fünf Äquivalenten an CuCl in DMSO/DMF, konnte das Dinukleosid **56** unter den sonst üblichen Bedingungen der *Stille*-Kupplung^[227] in einer Ausbeute von 56 % als gelber Schaum erhalten werden.

3.9.3.2 Entschützung der „Silylklammer“ des Dinukleosids **56**

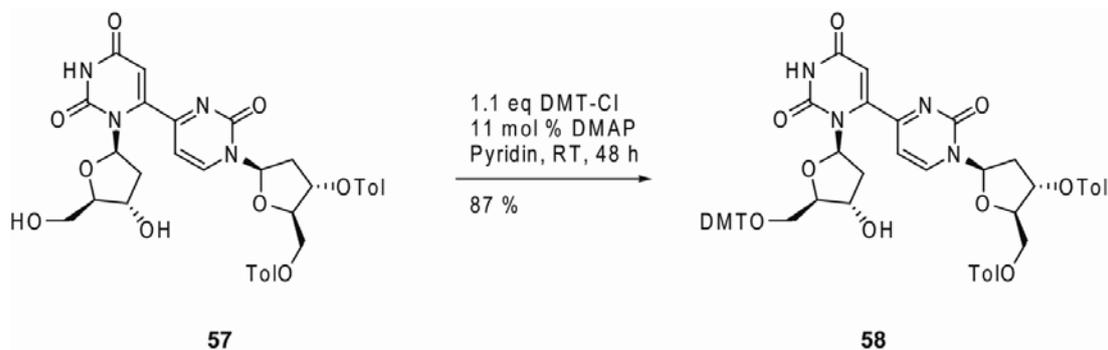
Die Entschützung der „Silylklammer“ des Dinukleosids **56** hat sich wesentlich schwieriger dargestellt, als zu vermuten ist. Bei den ersten Versuchen der Entschützung mit HF • Py, hat sich gezeigt, dass zwar das gewünschte Produkt **57** erhalten werden konnte, jedoch als Nebenreaktion die Spaltung der glykosidischen Bindung des Pyrimidinnukleosids auftrat. Erst bei der Verwendung von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) als Entschützungsmittel, konnte diese Nebenreaktion weitestgehend unterdrückt und das entschützte Dinukleosid **57** in einer Ausbeute von 88 % als nahezu farblos Schaum erhalten werden (Schema 28).



Schema 28: Entschützung der Silylklammer von **56** mit TBAF.

3.9.3.3 Schützung der 5'-OH-Gruppe des Pyrimidinrings von **57** mit DMT-Cl

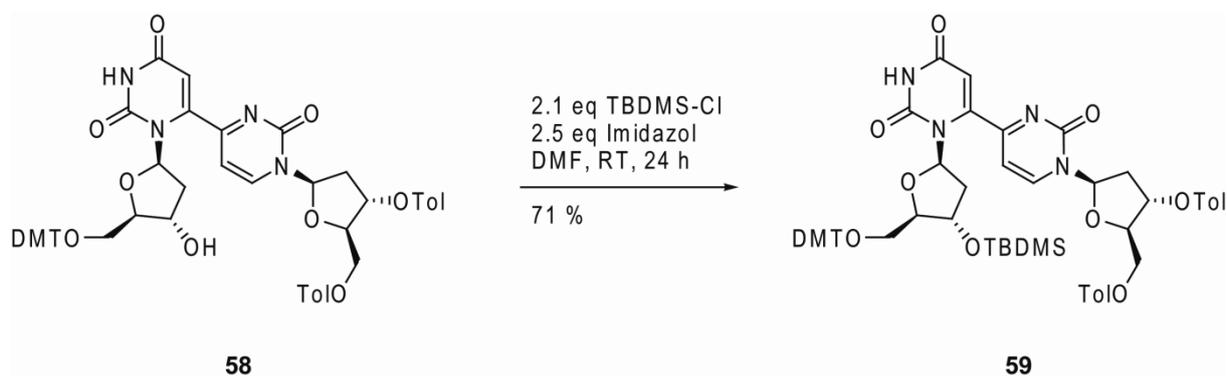
Für die DNA-Festphasensynthese ist es unabdingbar, dass die 5'-Hydroxygruppe des einzubauenden Nucleosids eine DMT-Schutzgruppe trägt. Aufgrund der gewählten Synthesestrategie mit den unterschiedlichen Reaktivitäten der vier potentiellen OH-Gruppen, musste die DMT-Schutzgruppe zwangsläufig schon relativ früh eingebaut werden. Unter Standardbedingungen konnte das Dinucleosid in einer guten Ausbeute von 87 % mit der DMT-Gruppe an dem 5'-Hydroxid versehen und als Schaum isoliert werden (Schema 29).



Schema 29: Schützung der 5'-OH-Gruppe des Pyrimidinrings des Dinucleosids **57** mit DMT-Cl.

3.9.3.4 Schützung der 3'-OH-Gruppe des Pyrimidinrings von **58** mit TBDMS-Cl

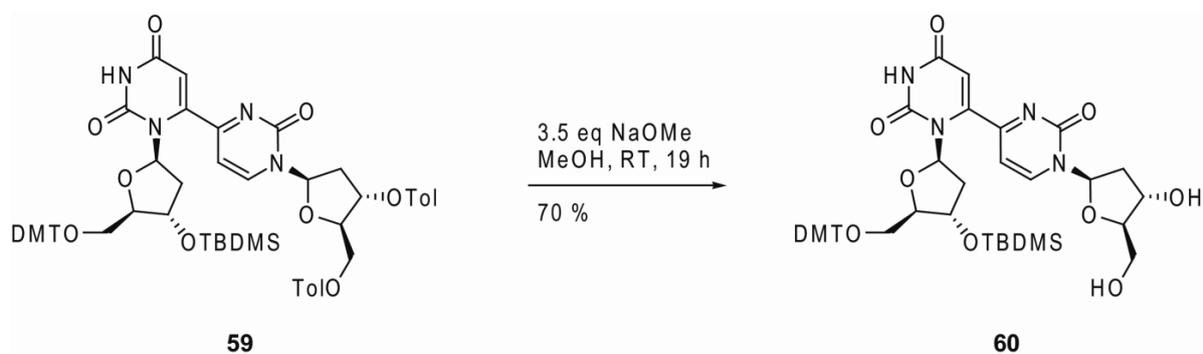
Die notwendige Schützung der 3'-Hydroxygruppe des Pyrimidinrings mit TBDMS-Cl konnte unter Standardbedingungen erfolgreich durchgeführt werden. Hierbei erhielt man **59** als farblosen Schaum in einer Ausbeute von 71 %.



Schema 30: Schützung der 3'-OH-Gruppe des Pyrimidinrings des Dinukleosids **58** mit TBDMS-Cl.

3.9.3.5 Entschützung der Toluoylschutzgruppen des Dinukleosids **59**

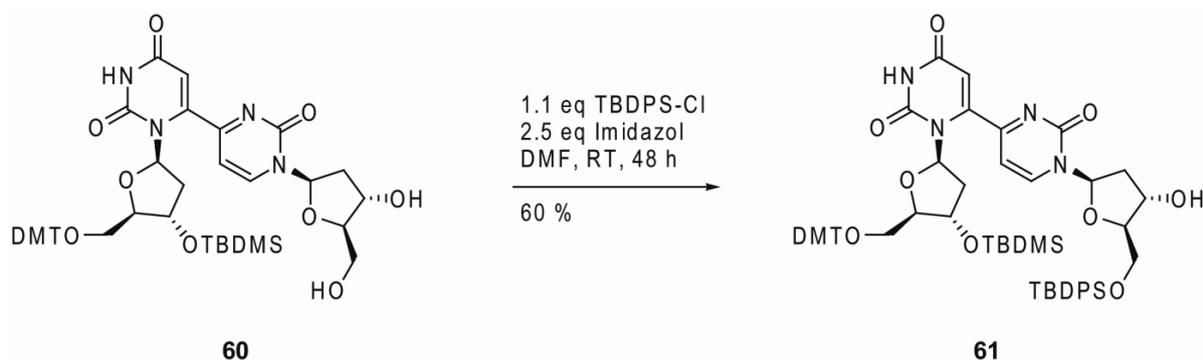
Die Entschützung der Toluoylschutzgruppen konnte mit Natriummethanolat in Methanol bei Raumtemperatur über Nacht bewerkstelligt werden. Das Dinukleosid **60** konnte hierbei in einer Ausbeute von 70 % als farbloser Schaum erhalten werden (Schema 31).



Schema 31: Entschützung der Tol-Schutzgruppen mit NaOMe.

3.9.3.6 Selektive Schützung der 5'-OH-Gruppe des Pyrimidonrings von **60** mit TBDPS-Cl

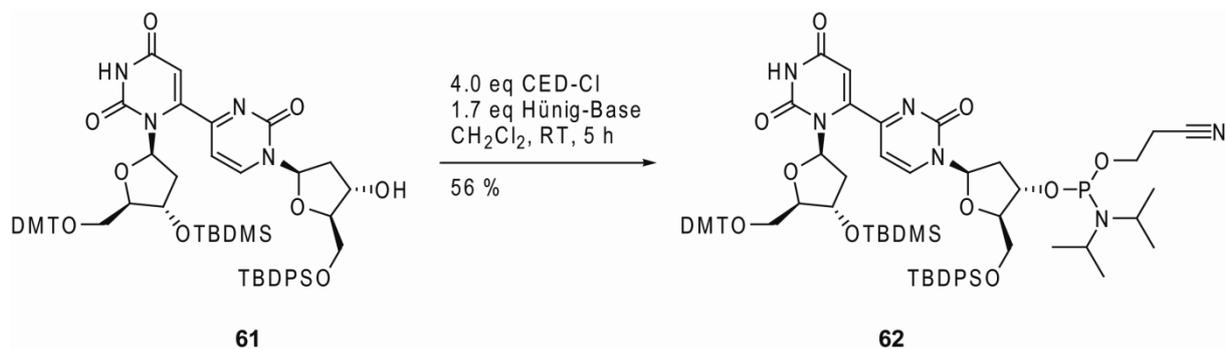
Die selektive Schützung der primären 5'-OH-Gruppe des Pyrimidonrings gelang unter der Verwendung von TBDPS-Cl. Um eine Schützung der 3'-Hydroxygruppe zu vermeiden, wurde nur ein leichter Überschuss von 1.1 Äquivalenten an TBDPS-Cl verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 48 h bei Raumtemperatur konnte das Dinukleosid **61** in einer Ausbeute von 60 % als farbloser Schaum isoliert werden (Schema 32).



Schema 32: Schützung der 5'-OH-Gruppe des Pyrimidonrings des Dinukleosids **60** mit TBDPS-Cl.

3.9.3.7 Darstellung des Phosphoramidits **62**

Der letzte Schritt vor der DNA-Synthese ist die Bildung des Phosphoramidits an der 3'-OH-Gruppe des Pyrimidonrings, um bei der Festphasensynthese eine Kupplung des Dinukleosids **62** gewährleisten zu können. Hierfür wurde **61** analog Schema 33 mit 4.0 Äquivalenten an Cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidit (CED-Cl) unter Argonatmosphäre in trockenem CH_2Cl_2 umgesetzt. Das komplett geschützte Dinukleosid **62** konnte als farbloser Schaum in einer Ausbeute von 56 % erhalten und nachfolgend in der DNA-Festphasensynthese eingesetzt werden.



Schema 33: Umsetzung von **61** mit CED-Cl.

3.9.4 Einbau und Charakterisierung von **51** in DNA

Der Phosphoramiditbaustein **62** konnte mittels Festphasensynthese in DNA eingebaut werden (siehe Exp. Teil). Es hat sich dabei gezeigt, dass das Phosphoramidit **62** bei der Verwendung der doppelten Kupplungszeit eine ähnliche Einbaueffizienz wie normale Nukleoside aufweist. Analog den Sequenzen aus den Belichtungsexperimenten (**ODN 3** und **ODN 6**) wurden zwei verschiedene DNA-Stränge synthetisiert, bei denen der zentrale (6-4)-Schaden durch das Analogon **51** ersetzt worden ist (siehe Tabelle 2). Nach dem Abspalten der DNA von Träger mit Ammoniak und Ethanol wurde selbige über *reversed-phase* HPLC (*Nucleodur 100-5 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 - 75 % B in 45 min, Fluss 5 mL/min) aufgereinigt (Abbildung 66).

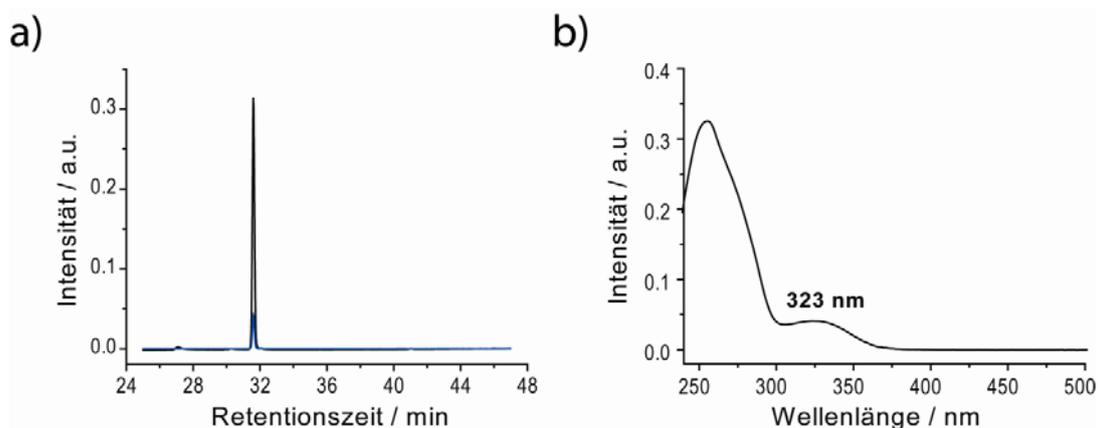


Abb. 66: a) Analytisches *reversed-phase* HPLC Chromatogramm (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 - 75 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) von **ODN 3*** nach der DNA-Synthese und Aufreinigung. Die Elution wurde bei 260 nm (schwarze Linie) und 325 nm (blaue Linie) verfolgt. B) UV/VIS-Spektrum von **ODN 3*** nach der DNA-Synthese und Aufreinigung.

3. Ergebnisse und Diskussion

Wie man Abbildung 66 entnehmen kann, konnte das Analogon **51** erfolgreich in DNA eingebaut und sauber isoliert werden. Es zeigt ähnlich dem T(6-4)T-Schaden ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 323$ nm auf (Abb. 66b). Die Entschützung der beiden Silylschutzgruppen des Analogons erfolgte mit einer 1 M TBAF-Lösung in THF über Nacht. Die erhaltenen DNA-Stränge wurden anschließend nochmals über präparative *reversed-phase* HPLC (*Nucleodur 100-5 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 30 % B in 45 min, Fluss 5 mL/min) aufgereinigt und mittels MALDI-TOF sowie enzymatischen Totalverdau charakterisiert.

Tabelle 2: MALDI-TOF Daten der synthetisierten, komplett entschützten, sowie gereinigten Oligonukleotide **ODN 3*** und **ODN 6***. X = Dinukleosid **51**.

Nummer	Sequenz (5' → 3')	[M+H] ⁺ (ber.)	[M+H] ⁺ (gef.)
ODN 3*	AGGXGGC	2358.55	2357.34
ODN 6*	ACAGCGGXGCAGGT	4525.87	4526.73

Bei dem enzymatischen Abbau hat sich erneut gezeigt, dass die glykosidische Bindung anscheinend relativ instabil ist, so dass diese während des Abbaus gebrochen wird. Man erhält folglich nur ein Fragment des Analogons **51** im HPLC-MS Chromatogramm (Abbildung 67). Nichtsdestotrotz zeigen die erhaltenen Ergebnisse (besonders die MALDI-TOF Daten) eindeutig das Vorhandensein des Analogons **51** in der DNA auf.

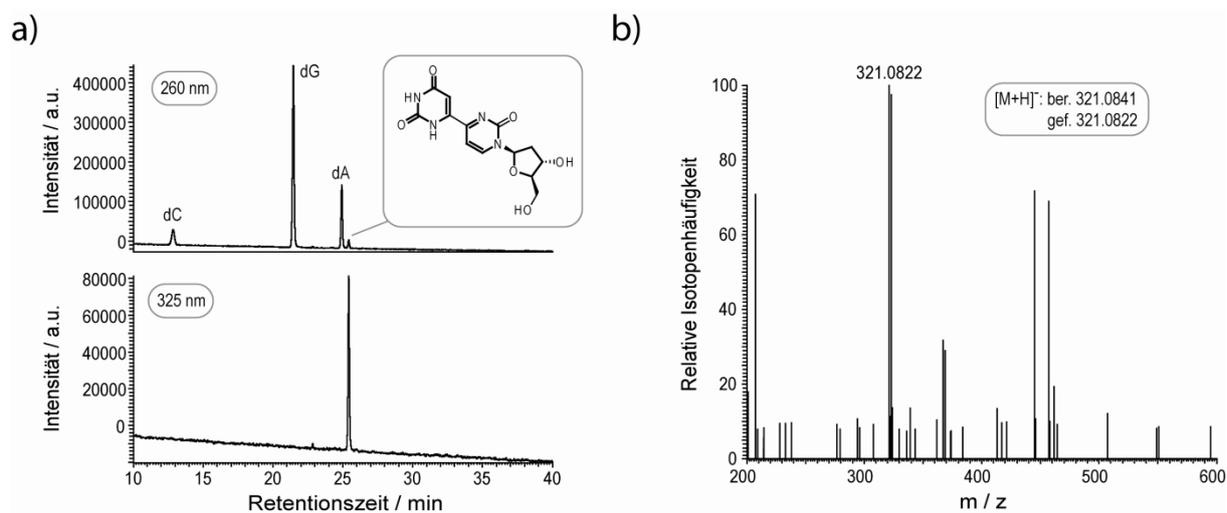


Abb. 67: HPLC und HPLC-MS Analyse von **ODN 3*** mit dem Reparaturanalogon **51** nach enzymatischem Abbau. a) HPLC Analyse der Komponenten von **ODN 3*** nach enzymatischem Abbau. b) HPLC-MS Analyse des gezeigten Fragments. Das verwendete Verdau Protokoll **P2** und die HPLC Bedingungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Alle molekularen Massen wurden im negativen Ionenmodus des Massenspektrometers gemessen.

3.9.5 Biochemische und strukturbiologische Untersuchungen mit dem Reparaturanalogon und der (6-4)-Photolyase

Mit dem eingebauten Analogon in der DNA wurden schließlich sowohl Reparatur- als auch Kristallisationsexperimente durchgeführt. Unter den Standardbedingungen konnte keine Reparatur sondern lediglich die komplette Zersetzung der DNA (**ODN 3***) beobachtet werden. Selbiges konnte ebenfalls bei dem Versuch, das entsprechende Dewar-Isomer des Reparaturanalogons herzustellen, beobachtet werden. Anscheinend führt das konjugierte Doppelbindungssystem zu etwaigen Nebenreaktionen, welche die DNA letztendlich zersetzen.

Bei den Co-Kristallisationsversuchen mit **ODN 6*** und der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* konnten auch unter den verschiedensten Bedingungen leider keine Kristalle erhalten werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das offene Rückgrat des Analogons sein, dessen Flexibilität das Kristallwachstum verhindern könnte. Für eine erfolgreiche Co-Kristallisation müsste man somit zuvor das offene Rückgrat schließen, um das System folglich allgemein etwas starrer zu gestalten, ähnlich dem phosphatverbrückten Rückgrat in den erhaltenen Strukturen.

3.10 Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl bereits seit Mitte der 90er Jahre die ersten (6-4)-Photolyasen isoliert und charakterisiert werden konnten,^[123, 228] war es bis heute nicht möglich, weitere Informationen auf atomarer Ebene bezüglich der DNA-Bindung und Reparatur zu gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl biochemische als auch Proteinröntgenkristallographische Studien an Enzym-DNA Komplexen durchgeführt werden, um einen genaueren Einblick in die Funktion der (6-4)-Photolyasen zu erhalten.

Um strukturelle Untersuchungen durchführen zu können, benötigt man zum Einen das aufgereinigte Enzym und zum Anderen DNA, welche einen (6-4)-Schaden beinhaltet, in ausreichenden Mengen. Die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* konnte hierbei im Rahmen der Dissertation von *M. Maul* bereitgestellt werden.^[178] Die Schaden enthaltende DNA konnte durch direkte Belichtung von Oligonukleotiden bei 254 nm hergestellt werden. Durch die optimierten Bedingungen während der Belichtung (*glove box*, Belichtungsabstand, Belichtungsdauer) und der *reversed-phase* HPLC Aufreinigung, konnten verschiedene Oligonukleotide mit (6-4)-Schäden hergestellt, isoliert und eindeutig charakterisiert werden. Es hat sich gezeigt, dass hierbei auch längere Oligonukleotide in guten Ausbeuten,^[51, 57, 146] sehr schnell und effizient verfügbar wurden. Die optimierte Methode erlaubt es zudem, relativ einfach neuartige Schäden wie zum Beispiel den T(6-4)C*-Schaden mittels Belichtung herzustellen. Die verschiedenen (6-4)-Schäden konnten in die entsprechenden Dewar Valenz-Isomere durch Belichtung bei 365 nm umgewandelt werden. Hierbei konnte eine komplette und sehr saubere Umwandlung bei allen belichteten (6-4)-Schäden beobachtet werden, so dass hier keine weitere Aufreinigung notwendig war. Es konnten dabei sowohl die (6-4)-Schäden als auch die entsprechenden Dewar-Isomere mit sehr hoher Reinheit in ausreichenden Mengen für strukturelle und biochemische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden.

Anhand eines HPLC basierten Reparaturassays konnte die katalytische Aktivität der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* bezüglich der unterschiedlichen (6-4)- als auch (Dew)-Schäden effizient überprüft werden. Nach Optimierung der Assaybedingungen hinsichtlich der eingesetzten Substrat- bzw. Enzymmenge sowie der Belichtungszeit und des pH-Optimums des verwendeten Assaypuffers, konnten Standardbedingungen etabliert werden, welche zur vollständigen Reparatur des T(6-4)T-Schadens führten. Dadurch konnten relative Effizienzen der Reparatur der (6-4)-Schäden und der Dewar-Isomere untereinander und zueinander gemessen werden.

Hierbei konnte man beobachten, dass der T(6-4)T- und der T(6-4)C-Schaden mit vergleichbarer Effizienz repariert werden, wobei hingegen der T(6-4)C*-Schaden deutlich schlechter repariert wird. Bei den Reparaturstudien mit den Dewar-Schäden zeigte sich schnell eine deutlich verringerte Reparatureffizienz, so dass sowohl zehn Äquivalente an (6-4)-Photolyase als auch längere Belichtungszeiten mit Weißlicht verwendet wurden. Im Gegensatz zu dem T(Dew)C-Schaden konnte bei dem T(Dew)T-Schaden keine Reparatur unter den gewählten Bedingungen beobachtet werden. Bei Untersuchungen mit dem T(Dew)C*-Schaden, konnte erstmals während einer Dewar-Reparatur der entsprechende (6-4)-Schaden als Reparaturintermediat beobachtet werden. Zwar wurde in der Literatur schon länger darüber spekuliert, dass die Dewar-Schäden zuerst in die (6-4)-Schäden zurückgewandelt werden und schließlich ausgehend von den (6-4)-Schäden die Reparatur erfolgt, jedoch konnte dies nun erstmals auch experimentell durch die Verwendung des artifiziellen T(Dew)C*-Schaden bestätigt werden. Die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* ist somit unter den gewählten Bedingungen in der Lage, die T(Dew)C- und T(Dew)C*-Schäden zu reparieren, jedoch nicht den T(Dew)T-Schaden.

Um die Frage des möglichen zweiten, lichtsammelnden Cofaktor der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* zu klären, wurden mit dem gereinigten Enzym Rekonstitutionsversuche mit den in Frage kommenden Chromophoren durchgeführt. Das hierfür benötigte F_0 , welches kommerziell nicht erhältlich ist, wurde in diesem Zusammenhang synthetisiert. Die spektroskopische Analyse zeigte, dass weder im Fall von FAD, FMN noch MTHF eine Änderung des Spektrums auftrat. Erst bei der Rekonstituierung der reduzierten (6-4)-Photolyase mit F_0 konnte ein neues Absorptionsmaximum bei $\lambda = 440$ nm beobachtet werden. Eine solche bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 420 nm hin zu 440 nm des enzymgebundenen Cofaktors wurde bereits bei CPD-Photolyasen beobachtet.^[99] Durch weitere Fluoreszenzmessungen konnte ein charakteristisches Emissionsmaximum bei $\lambda_{Em} = 475$ nm ($\lambda_{Ex} = 400$ nm) nachgewiesen werden, was eine Bindung von F_0 bestätigt. Zusammen betrachtet zeigen die UV/VIS- und Fluoreszenzmessungen das Vorhandensein des Chromophors F_0 als zweiten Cofaktor in einem Eukaryoten auf. Dieser Sachverhalt ist sehr überraschend, da F_0 bisher nur in Archaea, Methanobakterien und Cyanobakterien, wie zum Beispiel in der Photolyase aus *A. nidulans* nachgewiesen werden konnte.^[165] Obwohl höhere Eukaryoten den zweiten Cofaktor anscheinend benötigen, können sie ihn selbst jedoch nicht synthetisieren, da ihnen hierfür das notwendige codierende Gen *fbiC* fehlt, welches kodierend für die bifunktionale F_0 -Synthetase ist.

Das Desazaflavin F_0 könnte hierbei entweder aus der Nahrung aufgenommen werden oder von einem Endosymbionten stammen, wobei dies im Fall von *D. melanogaster* eventuell das Bakterium *Wolbachia* sein könnte.^[184-188] Im Rahmen der Diplomarbeit von E. Kaya im Arbeitskreis Carell konnte aufgrund von Sequenzhomologie zudem eine weitere (6-4)-Photolyase aus der Grünalge *Ostreococcus tauri* identifiziert werden, wobei dies durch Reparaturstudien mit dem T(6-4)T-Schaden und dem gereinigten Enzym eindeutig belegt werden konnte.^[177] Interessanterweise konnte hier durch spektroskopische Untersuchungen ebenfalls F_0 als zweiter Cofaktor identifiziert werden, wobei der Organismus das *fbiC* Gen besitzt. In Reparaturstudien mit den beiden rekonstituierten (6-4)-Photolyasen konnte durch die Bindung von F_0 zudem ein Aktivitätsanstieg um den Faktor 4 – 5 beobachtet werden, so dass F_0 tatsächlich als lichtsammelnde Antenne fungiert. Um zu zeigen, dass die erhaltenen spektroskopischen und biochemischen Nachweise für F_0 als zweiten Cofaktor keine Artefakte darstellen, bzw. die F_0 -Bindetasche kein evolutionäres Relikt ist, wurde das Desazaflavin F_0 nach einer adaptierten Methode direkt aus kommerziell erhältlichen Fliegen isoliert und eindeutig charakterisiert. Das Desazaflavin konnte somit neben den *in vitro* Studien auch *in vivo* nachgewiesen werden. Um die Erkennung der Photoschäden sowie die Bindung des zweiten Cofaktors durch die (6-4)-Photolyase weiter zu charakterisieren, wurden Co-Kristallisationsexperimente für Proteinröntgenkristallographische Analysen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt zehn Co-Kristallstrukturen erhalten werden, welche in Tabelle 3 zusammengefasst sind.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Übersicht der erhaltenen Co-Kristallstrukturen der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* im Komplex mit verschiedenen Schäden.

Schaden	Photolyase	Auflösung	2. Cofaktor	PDB Eintrag
T(6-4)T	Wildtyp	2.0 Å	-	3CVU
TpT	Wildtyp	2.7 Å	-	3CVY
T(6-4)T	Wildtyp	2.1 Å	F ₀	3CVV
T(6-4)T	H365N Mutante	3.2 Å	-	3CVW
T(6-4)T	H369M Mutante	3.2 Å	-	3CVX
T(Dew)T	Wildtyp	2.9 Å	-	-
T(6-4)C	Wildtyp	2.9 Å	-	2WB2
T(Dew)C	Wildtyp	2.6 Å	-	-
T(6-4)C*	Wildtyp	2.0 Å	-	2WQ6
T(Dew)C*	Wildtyp	2.3 Å	-	2WQ7

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, konnten alle untersuchten (6-4)-Schäden [T(6-4)T, T(6-4)C und T(6-4)C*] im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* Co-kristallisiert werden. Hierbei hat sich gezeigt, dass ähnlich den bekannten Strukturen der CPD-Photolyasen sowie der Cryptochrome, die (6-4)-Photolyase eine N-terminale α/β -Domäne sowie eine C-terminale FAD-bindende, helikale Domäne besitzt, welche über einen internen *Loop* miteinander verbunden sind. Während der Schadenserkenkung durch die Photolyase, wird die DNA geöffnet und der Schaden um fast 180 ° in die aktive Tasche des Enzyms gedreht, wobei die dabei entstehende Ausbuchtung durch mehrere Proteinreste stabilisiert wird.

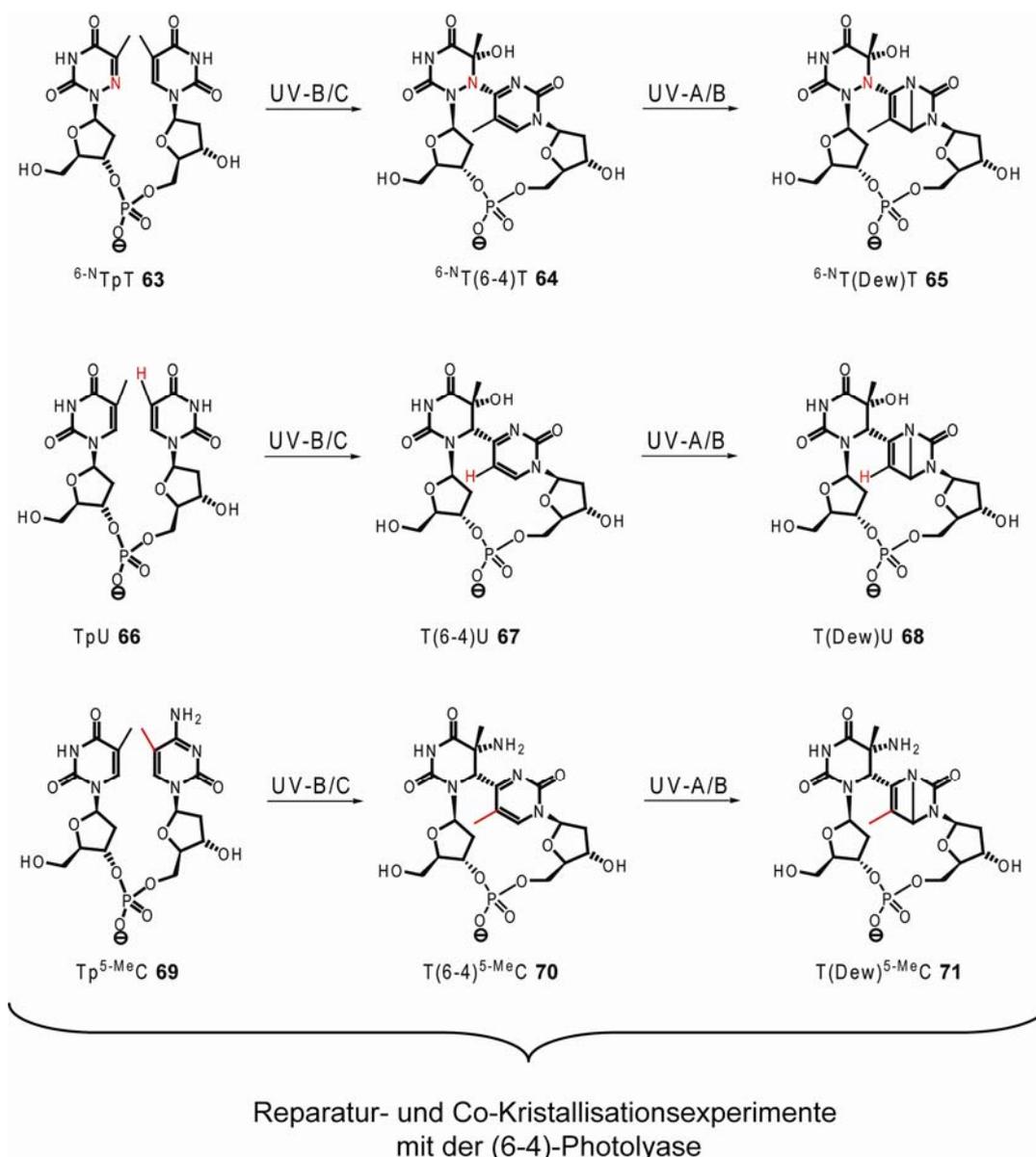
Bei den Rekonstitutionsversuchen mit den in Frage kommenden Cofaktoren konnte lediglich F₀ in die dafür vorgesehene Bindetasche eingelagert und eine Struktur davon erhalten werden. Die Bindung des zweiten Cofaktors hatte eine Neuordnung eines *Loops* zufolge, der sich an der Proteinoberfläche befindet.

Durch Reduktion mit Natriumdithionit und Weißlicht konnte sogar die Reparatur im Kristall durchgeführt und die Struktur des Enzyms nach der Reparatur mit der entsprechenden TpT-Sequenz erhalten werden. Im Zuge der Mutationsstudien konnten zudem zwei Strukturen der beiden Mutanten H365N sowie H369M erzielt werden. Weitere Strukturen konnten mit den beiden (6-4)-Schäden T(6-4)C und T(6-4)C* gelöst werden. Darüberhinaus gelang es, erstmals auch Datensätze der jeweiligen Dewar-Isomere aufzunehmen. Hier hat sich gezeigt, dass bei dem T(Dew)T- und dem T(Dew)C-Schaden keine eindeutige Zuordnung des Dewar-Schadens in die Elektronendichte möglich war, so dass man nicht ausschließen konnte, dass der Schaden während der Messung am Synchrotron nicht wieder teilweise zum (6-4)-Schaden umlagert. Erst bei der T(Dew)C*-Struktur mit einer guten Auflösung von 2.3 Å konnte der Dewar-Schaden der Elektronendichte eindeutig zugeordnet werden. Vergleicht man die erhaltenen (6-4)-Strukturen mit der T(Dew)C*-Struktur, so können nahezu keine Änderungen in der Bindung zwischen Schaden und Enzym beobachtet werden. Der in der Literatur weit verbreitete Reparaturprozess der (6-4)-Schäden über ein Oxetan- bzw. Azetidinintermediat, konnte durch die Strukturen nicht bestätigt werden.

Vielmehr sprechen die geringen strukturellen Änderungen nach der Reparatur im Kristall zudem gegen einen solchen viergliedrigen Übergangszustand, da man hier große strukturelle Änderungen erwarten würde. In diesem Sinne wurde das aktive Zentrum des Enzyms punktuell mutiert um damit Aktivitätsstudien durchführen zu können und weitere Informationen bezüglich der Reparatur sammeln zu können. Der entscheidende Schritt hierbei ist der Transfer der C5-OH-Gruppe des Pyrimidins zum C4 des Pyrimidons. Infolgedessen ist die Wechselwirkung der C5-OH-Gruppe mit dem Enzym maßgeblich an der Klärung des Mechanismus beteiligt. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Triade His365-His369-Tyr423 essentiell an der katalytischen Aktivität der Photolyase beteiligt ist. Durch die Mutation des Histidins 365 zu Asparagin 365 verlor die Photolyase vollständig ihre Aktivität. Wurde das zweite Histidin 369 zu Methionin 369 mutiert, so konnte noch eine geringe Restaktivität nachgewiesen werden, wobei die Mutation des Tyrosin 423 zu Phenylalanin 423 nur einen vergleichsweise schwachen Einfluss auf die Aktivität hatte, im Verhältnis zu den beiden Histidin Mutanten. Durch Reparaturexperimente in ¹⁸O-markiertem Wasser, konnte in der reparierten DNA ausschließlich ¹⁶O nachgewiesen werden, so dass die C5-OH-Gruppe direkt auf die Pyrimidoneinheit übertragen wird und nicht aus der Umgebung stammt.

Aufgrund all dieser Ergebnisse konnte somit ein neuer Reparaturmechanismus postuliert werden, in dem kein Oxetan- bzw. Azetidinübergangszustand auftritt. Das Histidin 365 wirkt hierbei als Protonendonator und protoniert die C5-OH-Gruppe, wobei nun eine relativ gute Abgangsgruppe entsteht (siehe Schema 15). Der direkte Angriff der C5-OH-Gruppe auf das Acylimin und das daraus resultierende Oxetanintermediat ist aufgrund der stark hydrophoben Umgebung des Pyrimidons unwahrscheinlich. Vermutlich greift das abgehende Wassermolekül das Acylimin an, eventuell nach Aktivierung durch die Histidine. Dabei entsteht das Radikalintermediat **IV**, welches nach dem Verlust eines Protons und dem Elektronenrücktransfer auf das FAD schnell in die reparierten Basen fragmentieren kann. Gestützt werden konnte dieser Mechanismus zusätzlich durch Reparaturstudien mit dem U(6-4)T-Schaden. Während der Reparatur entsteht das Radikalintermediat **III**, wobei das Radikal an der C5-Position im Fall des T(6-4)T-Schadens durch eine Methylgruppe stabilisiert wird und im Fall des U(6-4)T-Schadens lediglich durch ein Proton. Folglich sollte man somit bei dem U(6-4)T-Schaden eine deutlich verminderte Reparatur aufgrund der schlechteren Stabilisierung des Radikals erwarten. Dieser Sachverhalt konnte experimentell nachgewiesen werden, wobei der U(6-4)T-Schaden in etwa um den Faktor fünf schlechter repariert wurde, als der T(6-4)T-Schaden. In diesem Zusammenhang konnte auch das Reparaturintermediat-Analogon **51** synthetisiert und in DNA eingebaut werden. Bei den durchgeführten Co-Kristallisationsstudien konnten allerdings keine Kristalle erhalten werden, da vermutlich das offene Rückgrat des Analogons für die Kristallisation zu flexibel ist.

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, kann der ursprünglich postulierte Reparaturmechanismus der (6-4)-Schäden über einen viergliedrigen Übergangszustand (Oxetan bzw. Azetidin) nicht mehr aufrecht erhalten werden, wobei vieles für den neu postulierten Mechanismus (siehe Schema 15) spricht. Hierbei muss aber auch darauf hingewiesen werden, dass trotz der starken Indizien für den neuen Mechanismus, selbiger noch nicht eindeutig belegt werden konnte. Weitere Aktivitäts- und Co-Kristallisationsstudien mit Substratanalogen könnten hierbei zur eindeutigen Klärung des Reparaturmechanismus beitragen. Schema 34 zeigt eine Auswahl möglicher Substratanaloga, deren Wirkung auf die (6-4)-Photolyase untersucht werden könnten.



Schema 34: Mögliche Substratanaloge für weitere Untersuchungen bezüglich der Reparatur durch die (6-4)-Photolyase. Artifizielle Reste sind in rot dargestellt.

Speziell die (6-4)-Schäden **67** und **70** und die entsprechenden Dewar-Isomere **68** und **71** könnten klären, warum die T(Dew)C und T(Dew)C*-Schäden, aber nicht der T(Dew)T-Schaden durch die (6-4)-Photolyase repariert werden können.

Darüberhinaus wäre es sehr interessant, die Antennen-Cofaktoren weiterer eukaryotischer (6-4)-Photolyasen zu identifizieren, um eventuell das ungewöhnliche Auftreten des Desazaflavins in Eukaryoten weiter zu bestätigen und eventuell die Quelle des Cofaktors ausfindig machen zu können.

In einem weiteren Projekt wäre es auch von großem Interesse, erstmals strukturelle Daten des T(6-4)T-Schadens mit den für die *translesion DNA synthesis* (TLS) verantwortlichen Polymerasen zu sammeln. Hierfür wird momentan ein zwei Polymerasen Mechanismus postuliert. Im ersten Schritt baut die Polymerase Pol η ein Nukleotid gegenüber der 3'-Komponente des Schadens ein, wobei sie nicht in der Lage ist, über den Schaden hinwegzulesen. Im zweiten Schritt erfolgt schließlich der Einbau eines weiteren Nukleotids durch die Polymerase Pol ζ und folglich die vollständige Verlängerung des Primers.^[56, 229-232]

In ersten Röntgenkristallographischen Experimenten mit dem T(6-4)T-Schaden und Pol η , konnten bereits Kristalle und ein Datensatz erhalten werden, jedoch konnte die Struktur aufgrund der zu geringen Auflösung sowie der undefinierten Elektronendichte der DNA nicht gelöst werden. Aufbauend auf diesen ersten vielversprechenden Ergebnissen, sollten hierbei weitere Anstrengungen unternommen werden, Strukturen des (6-4)-Schadens mit den Polymerasen Pol η und Pol ζ zu erhalten.

4. Experimenteller Teil

4.1 Material und Methoden

Allgemeines: Sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in ofengetrockneten und mehrfach evakuierten und mit Stickstoff bzw. Argon rückbefüllten Schlenkkolben durchgeführt. Molekularsieb wurde vor der Verwendung mit Wasser staubfrei gewaschen, im Trockenschrank für 12 h vorgetrocknet und abschließend für 12 weitere Stunden im Sandbad (ca. 350 °C) unter Hochvakuum ausgeheizt. Alle **Chemikalien** und **Lösemittel** wurden, falls nicht anders erwähnt, in den kommerziell erhältlichen Qualitäten *puriss, p.a.* oder *purum* von den Firmen *Fluka*, *Aldrich*, *Acros*, *Sigma* und *Merck* bezogen und eingesetzt. Für die Verwendung trockener Lösemittel wurden diese in „absoluter“ Qualität mit Septum über Molekularsieb von den Firmen *Acros* oder *Fluka* bezogen. Lösemittel für die Säulenchromatographie sowie für Extraktionen waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung am Rotationsverdampfer der Firma *Heidolph* im Membranpumpenvakuum (*Vario PC2001*-Membranpumpenstand der Firma *Vacuubrand*) destilliert und über Molekularsieb (4 Å) getrocknet. Bidestilliertes Wasser (*ddH₂O*) wurde mit einer *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* erzeugt. Das Entfernen von Lösemittel *in vacuo* wurde mit einem Rotationsverdampfer durchgeführt. Wässrige oder Acetonitrilhaltige Lösungen wurden mit einer *SpeedVac Plus SC110A* bzw. *SpeedVac SPD 111V* der Firma *Savant* und einer *SpeedVac RVC 2-25* mit *CT 02-50*-Kompressorkühlfalle der Firma *Christ* entfernt. Reaktionsprodukte wurden am Hochvakuum ($10^{-2} - 10^{-3}$ mbar) getrocknet. Oligonukleotide wurden von den beiden Firmen *Metabion GmbH* und *IBA BioTAGnology* HPLC-gereinigt bezogen.

Das Phosphoramidit des Formacetalverbrückten CPD-Schaden **32** wurde nach einer bekannten Literaturvorschrift synthetisiert und in DNA eingebaut.^[233]

Belichtungsexperimente zur direkten Herstellung des (6-4)-Schaden in Oligonukleotiden wurden in einer *glove box* mit einem Sauerstoffgehalt von < 3 ppm durchgeführt. Hierfür wurden die Oligonukleotide in entgastem *ddH₂O* gelöst (20 – 50 µM für **ODN 1** – **ODN 15**), in eine Petrischale gegeben und in einer Belichtungskammer mit einer Distanz von 10 cm zur UV Lampe (254 nm, *Vilber Lourmat VL-215C*, 2 x 15 W 254 nm Röhren, *ltf Labortechnik GmbH & Co. KG*) belichtet, wobei die Petrischale während der Belichtung auf einem Kühlaggregat stand. Die Lösungen wurden anschließend mit Hilfe einer *SpeedVac* bis zur Trockenheit eingedampft und der Rückstand über präparative *reversed-phase* HPLC

(*Nucleodur 100-5 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 4 – 18 % B in 45 min, Fluss 5 mL/min) gereinigt. Für die Umwandlung zu den Dewar Valenz-Isomeren, wurden die entsprechenden Oligonukleotide in *ddH₂O* gelöst, in ein 1 mL Reaktionsgefäß gegeben und in einer Belichtungskammer mit einer Distanz von 20 cm zur UV Lampe (365 nm, *Vilber Lourmat VL-315.BL*, 3 x 15 W 365 nm Röhren, *ltf Labortechnik GmbH & Co. KG*) unter aeroben Bedingungen belichtet.

Bestimmung der Bindungskonstante von F₀ als zweiten Cofaktor der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* wurde durch Titration von jeweils 0.1 Äquivalenten der Photolyase zu 25 µL einer 40 µM F₀-Lösung durchgeführt. Die Bindung wurde durch die Differenz der Absorption bei $\lambda = 420 \text{ nm}$ ($\Delta A_{420 \text{ nm}}$) bestimmt. Nach Zugabe des Enzyms wurde eine Stunde zur Equilibrierung gewartet.

DNA-Konzentrationen wurden mit einem *NanoDrop ND-1000* Spektrophotometer der Firma *peqlab* bestimmt.

DNA-Synthese wurde wahlweise an einem *ExpediteTM 8900 Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *Applied Biosystems* oder an einem *Oligoplot 10* der Firma *Amersham* durchgeführt. Der Synthesemaßstab war entweder 1 oder 2 µmol. Die Phosphoramidite der Standardbasen (Bz-dA, Bz-dC, *i*Bu-dG und dT) sowie die mit Nukleotid beladenen CPG-Träger wurden von der Firma *Glen Research* bezogen. Als Lösemittel für den Aktivator (BTT) und alle Phosphoramidite wurde Acetonitril der Firma *Roth* mit einem maximalen Wassergehalt von 10 ppm verwendet. Für alle anderen Lösungen wurde Acetonitril der Firma *Roth* mit einem maximalen Wassergehalt von 30 ppm eingesetzt. Der verwendete Aktivator Benzylthiotetrazol (BTT) wurde nach einem Standardprotokoll hergestellt.^[234] Alle weiteren Reagenzien wurden von den Firmen *Fluka*, *Acros*, *VWR* und *Roth* in den beschriebenen üblichen Qualitäten bezogen und in den folgenden 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 30 ppm Acetonitril (50 %)
- *Capping B*: *N*-Methylimidazol (16 %) in 30 ppm Acetonitril
- *Deprotection*: 3 % Dichloressigsäure in Toluol
- Oxidation: 25 mM Iod in 2,6-Lutidin/Acetonitril/Wasser 6/65/30

Die Bedingungen für die Kupplungen der Standardphosphoramidite bei der DNA-Synthese entsprachen den empfohlenen Standardbedingungen der Gerätehersteller. Für die modifizierten Phosphoramidite (CPD und Reparaturanalogon **62**) wurde lediglich die Kupplungszeit auf zehn Minuten verdoppelt.

Die Abspaltung der DNA vom Träger sowie die gleichzeitige Entfernung der Schutzgruppen erfolgte durch Inkubation mit einer Mischung aus konzentrierten Ammoniak und Ethanol (3/1) für 18 h bei RT. Die Lösungen wurden anschließend mit Hilfe einer *SpeedVac* bis zur Trockenheit eingedampft und der Rückstand über präparative *reversed-phase* HPLC (*Nucleodur 100-5 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 30 % B in 45 min, Fluss 5 mL/min) gereinigt. Im Falle des Reparatur-Analogons war zuvor noch ein weiterer Entschützungsschritt der Silylschutzgruppen mit einer 1M TBAF-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur notwendig.

Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, *in vacuo* lyophilisiert und in 0.5 mL *ddH₂O* wieder aufgenommen. Mit Hilfe von *Sep-Pak[®]*-Kartuschen erfolgte das Entsalzen des DNA-Strangs. Hierfür wurde die Kartusche zunächst mit 5 mL Acetonitril aktiviert und schließlich mit 10 mL *ddH₂O* equilibriert. Man trug die wässrige DNA-Lösung langsam auf die Kartusche auf, spülte sie mit 10 mL *ddH₂O* und eluierte letztendlich mit 3 mL einer 1:1 Mischung aus *ddH₂O* und Acetonitril. Die DNA-Lösung wurde erneut *in vacuo* lyophilisiert und in 1 mL *ddH₂O* aufgenommen. Zur Kontrolle der Reinheit der synthetisierten DNA-Stränge wurde nach dem Entsalzen noch ein analytisches HPLC-Chromatogramm aufgenommen, sowie die Masse des Stranges anhand einer MALDI-TOF Messung bestimmt.

Dünnschichtchromatographie wurde auf Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck*, *Kieselgel 60 F₂₅₄*, 20 × 20 cm, ausgeführt. Die Substanzen wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht (254 nm bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit einer Ninhydrin-Lösung (0.3 g Ninhydrin gelöst in 100 mL 1-Butanol und 3 mL Ethylacetat) sowie einer Kaliumpermanganat-Lösung (0.5 %ige Lösung in 1 N NaOH) sichtbar gemacht.

Enzymatischer DNA-Abbau von Oligonukleotiden wurde nach einem Standard- und einem leicht modifizierten Protokoll durchgeführt.^[42, 43]

Protokoll P1: Die Oligonukleotide (**ODN 1-(6-4)**, **ODN 2-Dew**, **ODN 8-(6-4)**, **ODN 8-Dew** und **ODN 16-TA**, 1 – 2 nmol in 100 µL ddH₂O) wurden mit 10 µL Puffer A (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄, pH = 5.7), 20 Einheiten *Nuklease S1* (*aspergillus oryzae*, Roche) und 0.05 Einheiten *Calf Spleen Phosphodiesterase II* (Calbiochem) versetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 12 µL Puffer B (500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0), 5 Einheiten *Antarctic Phosphatase* (New England Biolabs) (für **ODN 1-(6-4)**) oder 10 Einheiten Alkine Phosphatase (*CIP*, New England Biolabs) (für **ODN 2-Dew**, **ODN 8-(6-4)**, **ODN 8-Dew** und **ODN 16-TA**) und 0.1 Einheiten *Snake Venom Phosphodiesterase I* (*crotalus adamanteus venom*, USB corporation) sowie eine weitere Inkubationsdauer von 3 h bei 37 °C.

Protokoll P2: Die Oligonukleotide (**ODN 3***, **ODN 13-(6-4)** und **ODN 13-Dew**, 1 – 2 nmol in 100 µL ddH₂O) wurden mit 10 µL Puffer A (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄, pH = 5.7) und 80 Einheiten *Nuklease S1* versetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 12 µL Puffer B (500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0), 10 Einheiten *Antarctic Phosphatase* und 0.2 Einheiten *Snake Venom Phosphodiesterase I* sowie eine weitere Inkubationsdauer von 3 h bei 37 °C.

Die erhaltenen Nukleosid-Mischungen wurden abschließend bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert und mittels HPLC-MS (Uptisphere 3 HDO, Puffersystem **P3**, Gradient 0 – 60 % B in 60 min, Fluss 0.125 mL/min) und HPLC-MS/MS analysiert.

Fluoreszenz- und UV/VIS-Spektren wurden mit einem *JASCO FP-750* Spektrofluorometer sowie mit einem *Varian Cary 100 Bio* oder einem *JASCO V-650* Spektrophotometer bei Raumtemperatur unter aeroben Bedingungen gemessen.

HPL-Chromatographie wurde auf Anlagen des Herstellers *Waters* durchgeführt. Für analytische Trennungen wurden zwei Anlagen der Alliance-Serie (*2695 Separations Module*, *2996 Photodiode Array Detector* und *2475 Multi λ Fluorescence Detector*) mit Gradientenpumpensystem, Autosampler für die Probenaufgabe und Diode-Array, sowie Fluoreszenzdetektoren verwendet. Für präparative Trennungen wurde eine Anlage der Breeze-Serie (*2487 Dual λ Absorbance Detector*, *1525 Binary HPLC Pump*) mit einem Gradientenpumpensystem, einem Mehrwegventil zur manuellen Probenaufgabe (Firma *Rheodyne*) und einem UV/VIS Detektor verwendet.

Für analytische Zwecke wurden *reversed-phase* Säulen (*Nucleodur 100-3 C18*) der Firma *Machery-Nagel* und Uptisphere 3 HDO Säulen (150 x 2.1 mm) der Firma *Interchim* verwendet. Für präparative Zwecke wurden *reversed-phase* Säulen (*Nucleodur 100-5 C18* und *Nucleosil 100-7 C18*) der Firma *Machery Nagel* verwendet.

Analytische Trennungen wurden mit einem Fluss von 0.5 mL/min (*Nucleodur 100-3 C18*) bzw. 0.125 mL/min (Uptisphere 3 HDO Säulen) und präparative Trennungen mit einem Fluss von 5 mL/min (*Nucleodur 100-5 C18*) bzw. 15 mL/min (*Nucleosil 100-7 C18*) betrieben.

Für die Trennungen wurden folgende Puffersysteme verwendet:

Puffersystem **P1**: Puffer A: 0.1 M TEAA in *ddH₂O*, pH = 7.0

Puffer B: 0.1 M TEAA in *ddH₂O/MeCN* 20/80, pH = 7.0

Puffersystem **P2**: Puffer A: 0.1 M TFA in *ddH₂O*

Puffer B: 0.1 M TFA in MeCN

Puffersystem **P3**: Puffer A: 2 mM NH₄HCOO in *ddH₂O*, pH = 5.5

Puffer B: 2 mM NH₄HCOO in *ddH₂O/MeCN* 20/80, pH = 5.5

Das von Salzen und Verunreinigungen befreite doppelt destillierte Wasser (*ddH₂O*) wurde durch eine *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* bereitgestellt. Alle Sonstigen Chemikalien mit dem Reinheitsgrad „*HPLC Grade*“ (z.B. Acetonitril, Essigsäure oder Triethylamin) wurden von den Firmen *Fisher Scientific*, *Fluka* oder *VWR* bezogen.

Hybridisieren von komplementären Strängen bzw. Strängen mit Überhang wurde wie folgt durchgeführt. Die entsprechenden Einzelstränge wurden in äquimolaren Mengen mit 6 μL NaCl (5 M) sowie 2 μL Tris-HCl (1 M) versetzt und mit *ddH*₂O auf 200 μL aufgefüllt. Die Reaktionslösung wurde schließlich auf zwei sterile 0.5 mL Reaktionsgefäße verteilt und diese in einen Thermocycler gegeben. Die Hybridisierung erfolgte dann durch Erhitzen auf 95 °C mit anschließender Abkühlung von 1 °C/min bis zu 4 °C.

Infrarot-Messungen (IR) wurden an einem *Perkin-Elmer 281-IR-Spektrometer* mit DuraSampl IR II ATR-Einheit (ATR = *attenuated total reflection*, Firma *Smith*) aufgenommen, wobei die Substanz als Feststoff auf die Messplatte gegeben wurde. Die Lage der Banden wird in cm^{-1} angegeben. Die relativen Intensitäten wurden mit den Symbolen *vs* (*sehr stark*), *s* (*stark*), *m* (*mittel*), *w* (*schwach*) und *vw* (*sehr schwach*) angegeben.

Isolierung des Cofaktors F_0 aus *D. melanogaster*. Hierbei wurde der Cofaktor aus kommerziell erhältlichen Fruchtfliegen (www.zoo-discounter.de) nach einer bekannten Methode der Isolierung von Riboflavin-Derivaten aus Pilzen isoliert.^[189] Die Fliegen wurden zuerst durch eine Vakuumapparatur eingesaugt, gesammelt und bei -80 °C eingefroren. Eine Gesamtmenge von 30 g an gefrorenen Fliegen wurde anschließend dreimal mit PBS-Puffer (pH = 7.4, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) gründlich gewaschen, bevor eine zweistufige Extraktion erfolgte. Im ersten Schritt wurden die Fliegen unter flüssigen Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert und mit Hilfe des RIPA-Puffers (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH = 7.5, 1 % Nonidet P-40, 5 mM EDTA) aufgeschlossen, wobei die gesamten Rohzellkomponenten abzentrifugiert (30 min, 33000 rpm) wurden. Das erhaltene Pellet wurde in Methanol/Wasser (4/1) resuspendiert und in einer Kugelmühle der Firma *Qiagen* erneut aufgeschlossen. Die kombinierten Rohextrakte wurden vereinigt, konzentriert und die erhaltenen 5 g Rohprodukt durch eine Sephadex G10/LH20 (*GE Healthcare*) Chromatographie einer ersten Aufreinigung unterzogen. Die entsprechenden fluoreszierenden Fraktionen wurden anschließend vereinigt, konzentriert und über präparative *reversed-phase* HPLC (*Nucleosil 100-7 C18*, Puffersystem **P2**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 15 mL/min) weiter gereinigt. Abermals wurden die entsprechenden fluoreszierenden Fraktionen aufkonzentriert und über analytische *reversed-phase* HPLC (*Nucleodur 100-3 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min) analysiert.

¹H-Kernresonanzspektren (¹H-NMR) wurden bei Raumtemperatur mit den Geräten *Varian Mercury 200*, *Varian INOVA 400*, *Bruker ARX 300* und *Bruker AMX 600* aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenzen in MHz und das Lösemittel angegeben. Die chemische Verschiebung δ wurde in parts per million (ppm) relativ zu Tetramethylsilan angegeben. Als interner Standard dienten die Lösemittelsignale von CDCl₃ ($\delta = 7.26$ ppm), D₂O ($\delta = 4.80$ ppm), DMSO-d₆ ($\delta = 2.50$ ppm) und Aceton-d₆ ($\delta = 2.05$ ppm). Die Kopplungskonstanten J wurden in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen s (Singulett, bzw. br s für breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett eines Dubletts), ddd (Dublett eines Dubletts eines Dubletts), t (Triplet), td (Triplet eines Dubletts) und m (Multiplet) beschrieben. Die Peakzuordnungen erfolgten mit Hilfe von COSY-, NOESY-, HMBC- und HSQC-Spektren.

¹³C-Kernresonanzspektren (¹³C-NMR) wurden bei Raumtemperatur mit den Geräten *Bruker ARX 300*, *Varian INOVA 400* und *Bruker AMX 600* ¹H-Breitbandentkoppelt aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenzen in MHz und das Lösemittel angegeben. Die chemische Verschiebung δ wurde in parts per million (ppm) relativ zu TMS angegeben. Als interner Standard dienten die Lösemittelsignale von CDCl₃ ($\delta = 77.00$ ppm), DMSO-d₆ ($\delta = 39.43$ ppm) und Aceton-d₆ ($\delta = 30.83$ ppm). Die Peakzuordnungen erfolgten mit Hilfe von HMBC- und HSQC-Spektren.

³¹P-Kernresonanzspektren (³¹P-NMR) wurden bei Raumtemperatur auf dem Gerät *Varian Mercury 200* aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenzen in MHz und das Lösemittel angegeben. Die chemische Verschiebung δ wurde in parts per million (ppm) relativ zu Phosphorsäure (85 % H₃PO₄ in Wasser) angegeben, welche als externer Standard diente.

Kristallisationsexperimente mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* wurden zunächst mit *CrystalEX 96 well sitting drop plate* der Firma *Corning* und *NeXtal Matrix screens* der Firma *Qiagen* durchgeführt. Die *96 well* Platten wurden hierbei mit dem *Hydra II* Proteinkristallisationsroboter (*Matrix Technologies Corporation*) pipettiert. Das Reservoirvolumen betrug dabei 100 μ L und der Kristallisationsansatz 0.4 μ L, bestehend aus 0.2 μ L Protein-/DNA-Lösung und 0.2 μ L Reservoirpuffer. Nach den ersten Resultaten aus den *Screenings*, wurde die Qualität der Kristalle durch Variation verschiedener Parameter verbessert. Hierbei wurden Parameter wie z. B. Proteinkonzentration, Konzentration der

verschiedenen Komponenten des Kristallisationspuffers, pH-Wert, Temperatur, Reservoirvolumen, Tropfengröße, das Verhältnis Protein zu DNA sowie das Verhältnis Protein-/DNA-Lösung zu Reservoirlösung variiert. Die genaueren Screenings wurden in 24 well *hanging drop Linbro* Platten (Hampton Research) durchgeführt. Alle durchgeführten Schritte der Kristallisation fanden unter striktem Ausschluss von Licht statt. Die Kristalle der (6-4)- und (Dew)-Schäden im Komplex mit der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* konnten mittels der *hanging drop vapor diffusion* Methode nach den unter Kapitel 3.7 angegebenen Bedingungen erhalten werden. Die Datenaufnahme erfolgte entweder am *Swiss Light Source* (SLS, Villigen, Schweiz) Synchrotron oder an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich).

Massenspektren (MS) wurden auf einem *Bruker Autoflex II* (MALDI-TOF) Gerät mit einer 3-Hydroxypicolinsäure-Matrix (HPA-Matrix für DNA) oder einer 6-Aza-2-thiothymin-Matrix (ATT-Matrix für kleine Moleküle) aufgenommen. Salzhaltige Proben wurden direkt vor der Messung durch „Zip-Tips C18“ der Firma *Millipore* oder durch Dialyse auf MF-*Millipore*TM Membranfiltern (Porengröße 0.025 µm) entsalzt. Hochauflösende Massenspektren (HR-MS) wurden auf einem *Thermo Finnigan LTQ FT* (ESI) Gerät im positiven oder negativen Modus gemessen. HPLC-MS und HPLC-MS/MS Messungen wurden auf den Geräten *Thermo Finnigan LTQ FT* und *Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL FTMS* unter der Verwendung einer Uptisphere 3 HDO Säule (150 x 2.1 mm) der Firma *Interchim* durchgeführt. Bei allen Massenspektren wurden die wichtigsten Signale in *m/z* Einheiten angegeben, wobei in Klammern die entsprechende Zuordnung steht, soweit diese bestimmbar war.

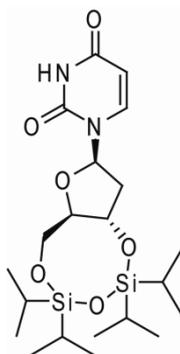
Reparaturexperimente (Reparatur Assay) von Oligonukleotiden mit einem zentralen (6-4) bzw. Dewar-Schaden zusammen mit der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* wurden stets in dem Assaypuffer A (50 mM Tris-HCl, pH = 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin in *ddH*₂O) durchgeführt. Bei einem Standardreparaturassay wurde das entsprechende Oligonukleotid zusammen mit der (6-4) Photolyase in 100 µL Assaypuffer A in äquimolaren Mengen (1 µM) gelöst. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit einem Abstand von 20 cm zur Lampe mit Weißlicht (1 x 15 W Leuchtstoffröhre) bestrahlt, 10 min bei 95 °C aufgekocht und abschließend bei 12000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Proben wurden anschließend anhand analytischer *reversed-phase* HPLC (*Nucleodur 100-3 C18*) analysiert.

Säulenchromatographie wurde unter der Verwendung von N₂-Überdruck nach der *Flash*-Methode durchgeführt. Hierbei wurde Kieselgel 60 (Korngröße 40 - 63 µm) der Firma *Merck* verwendet. Für die säulenchromatographische Reinigung von Phosphoramiditen wurde deaktiviertes Kieselgel 60 verwendet. Die verwendeten Lösemittel waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung am Rotationsverdampfer destilliert sowie über Molekularsieb (4 Å) getrocknet.

Schmelzpunkte (Smp.) wurden an einem *Melting Point-450* Gerät der Firma *Büchi* in offenen Kapillaren bestimmt, wobei diese nicht korrigiert worden sind.

4.2 Synthesevorschriften und analytische Daten

4.2.1 Synthese des (6-4)-Reparatur-Analogen

2'-Desoxy-[3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)]-uridin **52**

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde 2'-Desoxyuridin (1.50 g, 6.57 mmol) in 10 mL trockenem DMF gelöst. Man gab Imidazol (2.01 g, 29.52 mmol) und 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan (2.30 mL, 7.34 mmol) zur Reaktionslösung hinzu und ließ bei RT 20 h rühren. Die Lösung wurde mit 100 mL Wasser versetzt und anschließend dreimal mit jeweils 40 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit 60 mL Wasser und 50 mL ges. wässr. NaCl-Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, c-Hex/EtOAc, 70/30) gereinigt. Man erhielt **52** (2.71 g, 5.76 mmol, 88 %) in Form eines farblosen Schaums.

R_f-Wert: 0.21 (c-Hex/EtOAc, 70/30).

Smp.: 64.2 – 66.8 °C.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3177 vw, 3056 vw, 2943 m, 2892 w, 2866 m, 1683 vs/br, 1462 w, 1383 w, 1312 vw, 1270 w, 1189 vw, 1143 w, 1114 m, 1089 w, 1032 s, 990 w, 961 vw, 919 vw, 884 m, 807 vw, 772 vw, 693 w, 623 vw.

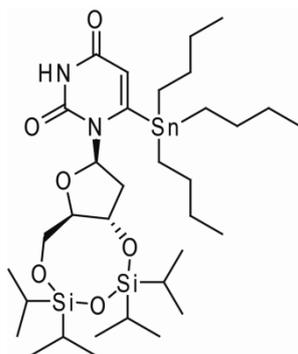
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 9.33 (br s, 1H, NH), 7.75 (d, J = 8.1, 1H, H6), 6.02 (dd, J = 7.0, J = 1.4, 1H, H5), 5.67 (dd, J = 8.2, J = 1.2, 1H, H1'), 4.41 (dt, J = 10.3, J = 7.7, 1H, H3'), 4.11 (dd, J = 13.2, J = 2.0, 1H, H5'₁), 3.98 (dd, J = 13.2, J = 2.8, 1H, H5'₂), 3.74 (dt, J = 8.3,

$J = 2.4$, 1H, H^{4'}), 2.48 (ddd, $J = 13.3$, $J = 10.4$, $J = 7.1$, 1H, H^{2'1}), 2.23 (ddd, $J = 13.3$, $J = 7.0$, $J = 1.2$, 1H, H^{2'2}), 1.08 – 0.98 (m, 28H, H_{IPr}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 163.76$, 150.34, 139.86, 101.92, 85.28, 84.53, 67.18, 60.17, 40.12, 17.70, 17.60, 17.53, 17.46, 17.25, 17.15, 17.14, 17.01, 13.62, 13.22, 13.16, 12.62.

HRMS (ESI): m/z : berechnet für C₂₁H₃₇N₂O₆Si₂ [M - H]⁻: 469.2196, gefunden: 469.2191.

2'-Desoxy-[3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)]-6-(tributylstannyl)-uridin **53**



Unter Stickstoffatmosphäre wurden Diisopropylamin (2.37 mL, 16.94 mmol) und *n*-Butyllithium (2.5 M in Hexan, 6.78 mL, 16.95 mmol) bei 0 °C zu 35 mL trockenem THF gegeben. Die Reaktionslösung wurde 1.5 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf -78 °C abgekühlt und das geschützte Uridin **52** (2.00 g, 4.25 mmol), gelöst in 15 mL trockenem THF, langsam zugetropft. Die Lösung wurde 2.5 h bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde Tributylzinnchlorid (2.30 mL, 8.79 mmol) zugegeben und 1 h bei -78 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lsg. mit 40 mL ges. wässr. NH₄Cl-Lsg. versetzt und dreimal mit jeweils 25 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit 25 mL einer ges. wässr. NaCl-Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, *c*-Hex/EtOAc, 5/1) gereinigt. Man erhielt **53** (2.63 g, 3.46 mmol, 81 %) in Form eines farblosen, amorphen Feststoffs.

R_f-Wert: 0.63 (Cyclohexan/EtOAc, 4/1).

Smp.: 85.7 – 87.4.

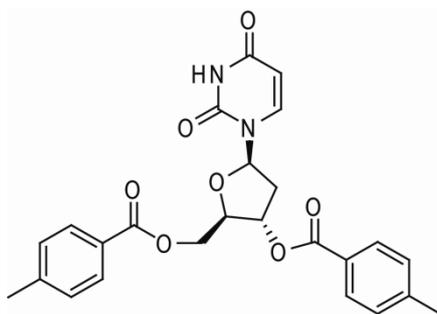
IR: $\tilde{\nu}$ = 3267 *vw/br*, 2924 *s*, 2868 *s*, 1713 *s*, 1680 *vs*, 1558 *vw*, 1462 *vw*, 1428 *vw*, 1368 *w*, 1335 *w*, 1250 *vw*, 1231 *vw*, 1212 *vw*, 1157 *vw*, 1122 *vw*, 1087 *s*, 1064 *m*, 1028 *s*, 962 *vw*, 920 *vw*, 865 *w*, 843 *vw*, 824 *w*, 781 *vw*, 690 *w*, 625 *vw*.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.02 (br s, 1H, NH), 5.65 – 5.59 (m, 1H, H5), 5.30 (dd, *J* = 9.2, *J* = 3.4, 1H, H1'), 4.99 – 4.95 (m, 1H, H3'), 3.98 (d, *J* = 5.7, 2H, H5'), 3.76 (dd, *J* = 11.9, *J* = 5.9, 1H, H4'), 2.94 (ddd, *J* = 13.3, *J* = 8.8, *J* = 3.3, 1H, H2'₁), 2.31 – 2.24 (m, 1H, H2'₂), 1.65 – 0.88 (m, 55H, H_{Bu}, H_{iPr}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 168.06, 161.83, 149.84, 110.93, 94.17, 86.12, 73.76, 64.23, 40.04, 28.87, 28.06, 27.35 (2C), 27.13, 27.07, 17.78, 17.75, 17.63, 17.62, 17.59, 17.55, 17.39, 17.25, 17.24, 13.82, 13.79 (2C), 13.48, 13.46, 12.87, 12.80, 11.79 (2C).

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₃₃H₆₄ClN₂O₆Si₂Sn [M + Cl]⁻: 795.3013, gefunden: 795.3005.

2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-uridin **54**



Unter Stickstoffschutzgasatmosphäre wurde 2'-Desoxyuridin (3.22 g, 14.11 mmol) in 40 mL trockenem Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wurde mit Toluoylchlorid (4.10 mL, 31.00 mmol) versetzt, worauf sich ein farbloser Niederschlag bildete. Die Suspension wurde 3 h bei 0 °C gerührt und anschließend mit 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die org. Phase wurde zweimal mit jeweils 35 mL verd. Schwefelsäure sowie zweimal mit jeweils 35 mL Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden erneut mit 30 mL

CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Die Lösung wurde *in vacuo* auf ein Viertel des ursprünglichen Volumens eingengt und mit 100 mL Methanol versetzt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel, welcher abfiltriert wurde. Man erhielt **54** (5.77 g, 12.42 mmol, 88 %) als farblosen Feststoff.

R_f-Wert: 0.22 (CH₂Cl₂/MeOH, 30/1).

Smp.: 217.2 – 218.4.

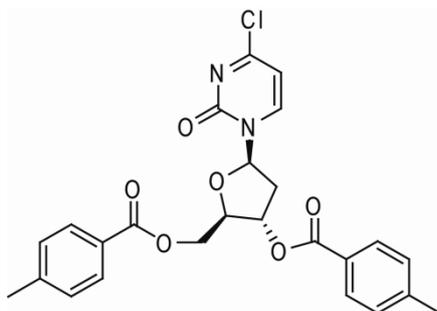
IR: $\tilde{\nu}$ = 1710 *s*, 1686 *m/br*, 1626 *vw*, 1608 *w*, 1576 *vw*, 1576 *vw*, 1508 *vw*, 1461 *w*, 1373 *w*, 1308 *vw*, 1278 *s*, 1269 *s*, 1203 *vw*, 1179 *w*, 1138 *vw*, 1121 *m*, 1111 *s*, 1098 *s*, 1041 *m*, 1018 *w*, 1009 *w*, 973 *w*, 939 *w*, 893 *vw*, 884 *vw*, 863 *w*, 843 *w*, 835 *w*, 802 *w*, 788 *vw*, 753 *vs*, 719 *w*, 712 *w*, 691 *w*, 671 *w*, 637 *vw*, 621 *w*.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.39 (br *s*, 1H, NH), 7.91 (d, *J* = 8.2, 2H, H_{Tol}), 7.87 (d, *J* = 8.2, 2H, H_{Tol}), 7.71 (d, *J* = 8.1, 1H, H₆), 7.35 (d, *J* = 8.0, 2H, H_{Tol}), 7.32 (d, *J* = 6.27, H_{Tol}), 6.27 (t, *J* = 7.1, 1H, H_{1'}), 5.62 – 5.55 (m, 2H, H₅, H_{3'}), 4.62 – 4.53 (m, 2H, H_{5'}), 4.50 – 4.46 (m, 1H, H_{4'}), 2.65 – 2.51 (m, 2H, H_{2'}), 2.39 (s, 3H, H_{Tol-Me}), 2.37 (s, 3H, H_{Tol-Me}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 165.46, 165.19, 162.98, 150.35, 144.03, 143.87, 140.48, 129.42 (2C), 129.32 (2C), 129.29 (2C), 129.26 (2C), 126.52, 126.43, 102.12, 84.84, 81.23, 74.46, 64.15, 36.06, 21.18, 21.15.

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₂₅H₂₄ClN₂O₇ [M+ Cl]⁻: 499.1278, gefunden: 499.1280.

2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-4-chloro-uridin **55**



Unter Argonatmosphäre wurde das geschützte Uridin **54** (2.16 g, 4.65 mmol) in 20 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und mit Chloromethylendimethylammoniumchlorid (1.19 g, 9.29 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 5 h refluxiert und nach dem Abkühlen zu 80 mL einer halbgesättigten, wässrigen NaHCO₃-Lsg. gegeben. Die org. Phase wurde zweimal mit jeweils 40 mL Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden erneut mit 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60, CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) gereinigt. Man erhielt **55** (1.60 g, 3.31 mmol, 71 %) in Form eines farblosen Feststoffs.

R_f-Wert: 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH, 97/3).

Smp.: 174.3 – 176.1 °C.

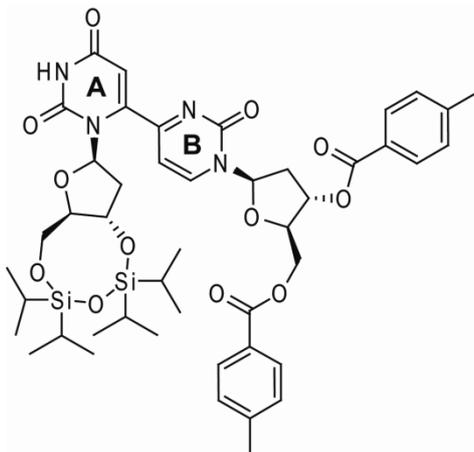
IR: $\tilde{\nu}$ = 1712 s, 1684 m/br, 1608 vw, 1462 w, 1406 vw 1373 w, 1308 vw, 1278 s, 1269 s, 1179 w, 1122 m, 1111 s, 1098 s, 1042 m, 1019 w, 973 vw, 863 vw, 803 w, 754 vs, 720 vw, 691 w, 671 vw, 621 w.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.01 (d, *J* = 7.1, 1H, H₆), 7.92 (d, *J* = 8.2, 2H, H_{Tol}), 7.78 (d, *J* = 8.2, 2H, H_{Tol}), 7.25 (d, *J* = 8.0, 2H, H_{Tol}), 7.22 (d, *J* = 8.0, 2H, H_{Tol}), 6.26 – 6.20 (m, 2H, H_{1'}, H₅), 5.59 – 5.55 (m, 1H, H_{3'}), 4.76 (dd, *J* = 11.5, *J* = 2.1, 1H, H_{5'1}), 4.67 – 4.61 (m, 2H, H_{5'2}, H_{4'}), 3.15 (ddd, *J* = 14.6, *J* = 5.7, *J* = 1.7, 1H, H_{2'1}), 2.41 (s, 3H, H_{Tol-Me}), 2.40 (s, 3H, H_{Tol-Me}), 2.23 (ddd, *J* = 14.5, *J* = 7.7, *J* = 6.6, 1H, H_{2'2}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 167.05, 166.27, 166.24, 153.27, 144.93, 144.85, 143.06, 130.04 (2C), 129.67 (2C), 129.63 (2C), 129.52 (2C), 126.47, 126.37, 105.40, 88.66, 84.55, 75.13, 64.20, 39.72, 21.96, 21.92.

HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₂₅H₂₃Cl₂N₂O₆ [M + Cl]⁻: 517.0939, gefunden: 517.0938.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-6-uridyl]-2-(*1H*)-pyrimidinon **56**



Unter Argonatmosphäre wurde **53** (508 mg, 0.67 mmol) und **55** (261 mg, 0.54 mmol) in einem Gemisch aus 20 mL trockenem DMSO und 5 mL trockenem DMF gelöst. Die Reaktionslösung wurde anschließend dreimal entgast. In einem separaten Schlenkkolben wurde ebenfalls unter Argonatmosphäre LiCl (137 mg, 3.23 mmol), CuCl (267 mg, 2.69 mmol) und Pd(PPh₃)₄ (70 mg, 0.06 mmol) vorgelegt, wobei die gelösten Nucleoside **53** und **55** anschließend mit einer Spritze langsam über ein Septum bei 0 °C zugegeben und die Lösung erneut zweimal entgast worden ist. Man ließ für 21 h bei RT rühren, gab die Reaktionslösung zu 150 mL Ethylacetat und extrahierte mit einer Lösung bestehend aus 210 mL einer gesättigten NaCl-Lösung sowie 40 mL einer 2.8 %igen NH₄OH-Lösung. Die wässrige Phase wurde erneut mit 150 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit 100 mL H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und über Kieselgur abfiltriert. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, c-Hex/EtOAc, 1/1), wobei man **56** (278 mg, 0.30 mmol, 56 %) als farblosen Schaum erhielt.

R_f: 0.40 (c-Hex/EtOAc, 1/1).

Smp.: 115.3 – 118.2 °C.

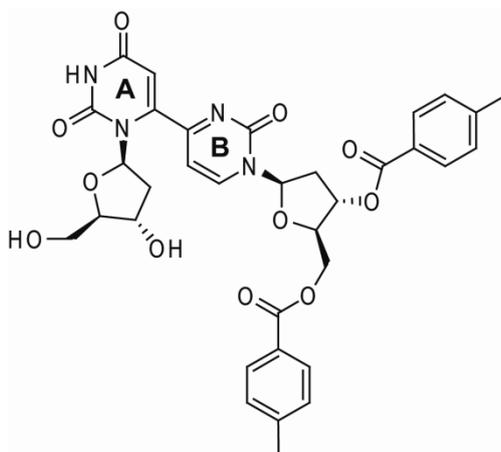
IR: $\tilde{\nu}$ = 2943 *m*, 2865 *m*, 1717 *vs*, 1692 *vs*, 1671 *vs*, 1610 *m*, 1512 *vw*, 1462 *w*, 1382 *w*, 1364 *w*, 1266 *vs*, 1176 *w*, 1091 *vs*, 1030 *s*, 1018 *m*, 883 *w*, 837 *vw*, 791 *vw*, 751 *m*, 690 *w*.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.30 (d, J = 6.8, 1H, H_{6B}), 8.23 (br s, 1H, NH), 7.94 (d, J = 8.2, 2H, H_{Tol}), 7.81 (d, J = 8.2, 2H, H_{Tol}), 7.27 – 7.22 (m, 4H, H_{Tol}), 6.47 (d, J = 6.9, 1H, H_{5B}), 6.29 (t, J = 6.6, 1H, H_{1'B}), 5.69 (d, J = 2.2, 1H, H_{5A}), 5.62 – 5.59 (m, 1H, H_{3'B}), 5.52 (dd, J = 9.0, J = 2.7, 1H, H_{1'A}), 4.94 – 4.90 (m, 1H, H_{3'A}), 4.82 (dd, J = 12.2, J = 2.6, 1H, H_{5'B1}), 4.70 – 4.65 (m, 1H, H_{4'B}), 4.66 (dd, J = 12.2, J = 3.6, 1H, H_{5'B2}), 3.95 – 3.89 (m, 2H, H_{5'A1}, H_{5'A2}), 3.67 (td, J = 6.8, J = 4.6, 1H, H_{4'A}), 3.20 (ddd, J = 14.4, J = 5.6, J = 1.7, 1H, H_{2'B1}), 2.90 (ddd, J = 2.8, J = 8.9, J = 12.1, 1H, H_{2'B2}), 2.42 (s, 3H, H_{Tol-Me}), 2.40 (s, 3H, H_{Tol-Me}), 2.36 – 2.30 (m, 2H, H_{2'A}), 1.14 – 0.84 (m, 28H, H_{iPr}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 167.75, 166.31, 166.23, 161.60, 154.11, 152.05, 149.29, 145.13, 144.94, 144.66, 130.08 (2C), 129.75 (2C), 129.68 (2C), 129.56 (2C), 126.45, 126.34, 104.70, 103.32, 88.92, 87.62, 86.51, 84.59, 74.85, 73.86, 64.27, 64.08, 40.42, 39.73, 21.98, 21.93, 17.78, 17.66, 17.64, 17.59, 17.52, 17.36, 17.22, 17.21, 13.44, 13.41, 12.83, 12.76.

HRMS (ESI): m/z : berechnet für C₄₆H₆₀ClN₄O₁₂Si₂ [M + Cl]⁻: 951.3440, gefunden: 951.3449.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(4-toluoyl)-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-6-uridyl]-2-(1*H*)
pyrimidinon **57**



In 30 mL trockenem THF wurde **56** (1.02 g, 1.11 mmol) gelöst und mit einer 1M TBAF-Lsg. (3.50 mL, 3.50 mmol) versetzt. Man ließ die Reaktion bei Raumtemperatur für 2.5 h rühren, entfernte das Lösemittel *in vacuo* und reinigte das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60, CH₂Cl₂/MeOH, 20/1) auf. Man erhielt **57** (492 mg, 0.73 mmol, 66 %) als farblosen Schaum.

R_f: 0.24 (CH₂Cl₂/MeOH, 15/1).

Smp.: > 220 °C Zersetzung.

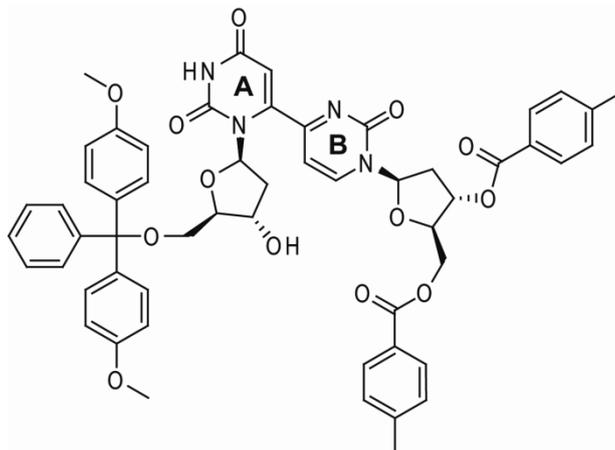
IR: $\tilde{\nu}$ = 2961 w, 2905 vw, 1257 m, 1072 s/br, 1009 vs, 863 vw, 787 vs, 700 vw, 688 vw, 600 vw.

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 10.27 (br s, 1H, NH), 8.56 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H_{6B}), 8.00 – 7.97 (m, 2H, H_{Tol}), 7.91 – 7.87 (m, 2H, H_{Tol}), 7.37 – 7.30 (m, 4H, H_{Tol}), 6.67 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H_{5B}), 6.35 – 6.31 (m, 1H, H_{1'B}), 5.82 (dd, J = 7.2 Hz, J = 6.4 Hz, 1H, H_{1'A}), 5.72 (td, J = 6.4 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H_{3'B}), 5.63 (s, 1H, H_{5A}), 4.84 – 4.81 (m, 1H, H_{4'B}), 4.76 – 4.73 (m, 2H, H_{5'B1}, H_{5'B2}), 4.54 – 4.50 (m, 1H, H_{3'A}), 4.25 (br s, 1H, 5'-OH), 3.78 – 3.75 (m, 1H, H_{4'A}), 3.70 – 3.55 (m, 2H, H_{5'A1}, H_{5'A2}), 3.06 (ddd, J = 14.8 Hz, J = 6.0 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, H_{2'B1}), 2.99 – 2.92 (m, 1H, H_{2'A1}), 2.82 (br s, 1H, 3'-OH), 2.66 – 2.59 (m, 1H, H_{2'B2}), 2.42, 2.39 (2 x s, 6H, H_{Tol-Me}), 2.17 (ddd, J = 13.6 Hz, J = 7.6 Hz, J = 4.0 Hz, 1H, H_{2'A2}).

¹³C-NMR: (100 MHz, Aceton-d₆): δ = 168.81, 166.64, 166.49, 162.46, 154.80, 153.34, 151.60, 146.45, 145.24, 145.20, 130.62 (2C), 130.43 (2C), 130.28 (2C), 130.20 (2C), 127.96, 127.95, 104.99, 103.92, 90.11, 89.70, 89.21, 84.80, 76.06, 71.97, 65.21, 63.15, 39.85 (2C), 21.69 (2C).

HRMS: (ESI⁺): m/z : ber. für C₃₄H₃₅N₄O₁₁ [M + H]⁺: 675.2297, gef.: 675.2286.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-(5'-*O*-dimethoxytrityl)-6-uridyl]-2-(1*H*)-pyrimidinon **58**



Unter Stickstoffatmosphäre wurde **57** (580 mg, 0.86 mmol) in 15 mL trockenem Pyridin gelöst und mit DMAP (12 mg, 98.22 μ mol) sowie Dimethoxytritylchlorid (325 mg, 0.96 mmol), gelöst in 5 mL trockenem Pyridin, versetzt. Man ließ die Reaktionslösung 48 h bei RT rühren, gab 1 ml Methanol zu und rührte für eine weitere Stunde bei RT. Nach Entfernung des Lösemittels *in vacuo*, wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60, CH₂Cl₂/MeOH/Py, 15/1/0.1) aufgereinigt. **58** (738 mg, 0.75 mmol, 87 %) konnte in Form eines gelben Schaums erhalten werden.

R_f: 0.40 (CH₂Cl₂/MeOH, 15/1).

Smp.: 91.3 – 94.6 °C.

IR: $\tilde{\nu}$ = 1714 vs, 1694 s, 1668 vs, 1608 m, 1508 m, 1438 w, 1267 s, 1248 s, 1176 m, 1093 m/br, 1031 w, 828 vw, 791 vw, 751 w, 702 vw.

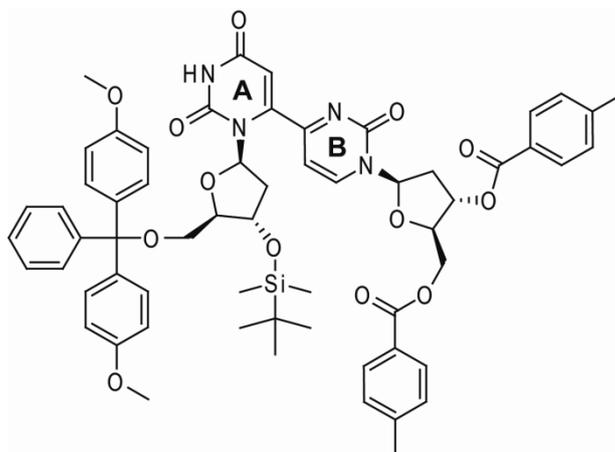
¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 10.22 (br s, 1H, NH), 8.44 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H_{6B}), 8.02 – 7.99 (m, 2H, H_{Tol}), 7.91 – 7.88 (m, 2H, H_{Tol}), 7.48 – 7.17 (m, 13H, H_{Tol}, H_{DMT}), 6.86 – 6.83 (m, 4H, H_{DMT}), 6.63 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H_{5B}), 6.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H_{1'B}), 5.93 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 4.6 Hz, 1H, H_{1'A}), 5.71 (td, *J* = 6.4 Hz, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_{3'B}), 5.59 (s, 1H, H_{5A}), 4.86 – 4.84 (m, 1H, H_{4'B}), 4.77 – 4.76 (m, 2H, H_{5'B1}, H_{5'B2}), 4.45 – 4.39 (m, 1H, H_{3'A}), 3.88 – 3.84 (m, 1H, H_{4'A}), 3.76, 3.75 (2 x s, 6H, H_{DMT-OMe}), 3.26 – 3.22 (m, 1H, H_{5'A1}), 3.13 – 3.09 (m, 1H, H_{5'A2}), 3.05 (ddd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 6.0 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{2'B1}), 2.96 – 2.89

(m, 1H, H2'_{A1}), 2.78 (br s, 1H, 3'-OH), 2.62 – 2.55 (m, 1H, H2'_{B2}), 2.43, 2.37 (2 x s, 6H, H_{Tol-Me}), 2.21 – 2.15 (m, 1H, H2'_{A2}).

¹³C-NMR: (100 MHz, Aceton-d₆): δ = 168.10, 165.65, 165.51, 161.64, 158.58, 158.56, 153.69, 152.23, 149.94, 145.48, 144.99, 144.25, 144.22, 136.14, 136.11, 130.11 (2C), 130.06 (2C), 129.63 (2C), 129.43 (2C), 129.29 (2C), 129.20 (2C), 128.16 (2C), 127.52 (2C), 126.97, 126.92, 126.43, 112.84 (2C), 112.83 (2C), 103.77, 103.05, 88.62, 88.11, 86.36, 85.75, 83.89, 75.13, 71.67, 64.60, 64.24, 54.54, 54.53, 39.40, 38.97, 20.73, 20.69.

HRMS: (ESI): m/z: ber. für C₅₆H₅₃N₄O₁₅ [M + HCOO]⁻: 1021.3513, gef.: 1021.3513.

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(4-toluoyl)-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-(5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-6-uridyl]-2-(*1H*)-pyrimidinon **59**



Unter Stickstoffatmosphäre wurden **58** (683 mg, 0.69 mmol) und Imidazol (115 mg, 1.69 mmol) in 20 mL trockenem DMF gelöst, mit TBDMS-Cl (222 mg, 1.47 mmol) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zu 100 mL CH₂Cl₂ gegeben, dreimal mit jeweils 50 mL H₂O extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen erneut mit 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösemittel *in vacuo* entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60, CH₂Cl₂/MeOH/Py, 30/1/0.3) gereinigt. Man erhielt **59** (536 mg, 0.49 mmol, 71 %) in Form eines farblosen Schaums.

R_f: 0.53 (CH₂Cl₂/MeOH, 20/1).

Smp.: 107.4 – 109.8 °C.

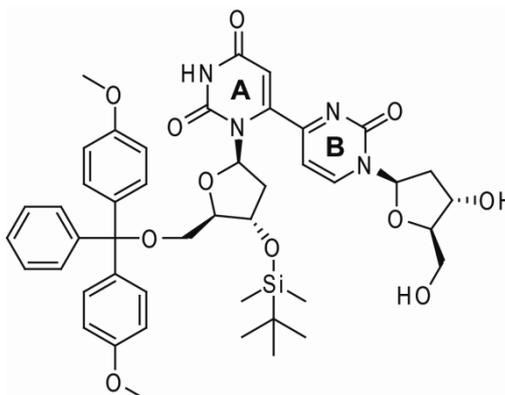
IR: $\tilde{\nu}$ = 2950 *w*, 2927 *w*, 2847 *vw*, 1717 *s*, 1697 *s*, 1672 *vs*, 1609 *m*, 1508 *m*, 1462 *vw*, 1442 *vw*, 1266 *s*, 1249 *vs*, 1175 *m*, 1095 *s/br*, 1033 *vw*, 833 *m*, 775 *vw*, 751 *w*.

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 10.19 (br *s*, 1H, NH), 8.40 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H_{6B}), 8.02 – 7.99 (m, 2H, H_{Tol}), 7.90 – 7.87 (m, 2H, H_{Tol}), 7.48 – 7.16 (m, 13H, H_{Tol}, H_{DMT}), 6.87 – 6.83 (m, 4H, H_{DMT}), 6.65 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H_{5B}), 6.23 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H_{1'B}), 5.94 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H, H_{1'A}), 5.72 (td, *J* = 6.4 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{3'B}), 5.59 (s, 1H, H_{5A}), 4.88 – 4.85 (m, 1H, H_{4'B}), 4.77 – 4.75 (m, 2H, H_{5'B1}, H_{5'B2}), 4.44 – 4.39 (m, 1H, H_{3'A}), 3.78 – 3.73 (m, 1H, H_{4'A}), 3.77, 3.76 (2 x *s*, 6H, H_{DMT-OMe}), 3.12 – 3.09 (m, 2H, H_{5'A1}, H_{5'A2}), 3.08 – 3.04 (m, 1H, H_{2'B1}), 2.93 – 2.87 (m, 1H, H_{2'A1}), 2.61 – 2.54 (m, 1H, H_{2'B2}), 2.43, 2.38 (2 x *s*, 6H, H_{Tol-Me}), 2.15 – 2.10 (m, 1H, H_{2'A2}), 0.78 (s, 9H, H_{tBu}), -0.01, -0.09 (2 x *s*, 6H, H_{Si-Me}).

¹³C-NMR: (100 MHz, Aceton-d₆): δ = 168.12, 165.65, 165.49, 161.57, 158.64, 158.63, 153.63, 152.11, 149.97, 145.34, 145.07, 144.25, 144.18, 136.11, 136.00, 130.05 (4C), 129.61 (2C), 129.43 (2C), 129.28 (2C), 129.20 (2C), 128.12 (2C), 127.56 (2C), 126.97, 126.93, 126.48, 112.89 (2C), 112.88 (2C), 103.88, 103.07, 88.68, 87.70, 85.87, 85.84, 83.96, 75.16, 72.18, 64.29, 64.04, 54.55 (2C), 39.34, 39.07, 25.23 (3C), 20.76, 20.68, 17.51, -5.39, -5.68.

HRMS: (ESI): *m/z*: ber. Für C₆₁H₆₆ClN₄O₁₃Si [M + Cl]⁻ 1125.4090: , gef.: 1125.4111.

1-[2'-Desoxyribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-(5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-6-uridyl]-2-(*1H*)-pyrimidinon **60**



In 15 mL trockenem MeOH wurde **59** (520 mg, 0.47 mmol) gelöst, mit NaOMe (90 mg, 1.67 mmol) versetzt und 19 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit NH₄Cl auf einen pH-Wert von 7 – 8 eingestellt, mit 50 mL CH₂Cl₂ verdünnt und dreimal mit jeweils 30 mL H₂O gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden erneut mit 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösemittel *in vacuo* entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60, CH₂Cl₂/MeOH/Py, 15/1/0.1) aufgereinigt. Man erhielt **60** (285 mg, 0.33 mmol, 70 %) in Form eines farblosen Schaums.

R_f: 0.30 (CH₂Cl₂/MeOH, 15/1).

Smp.: 117.2 – 119.1 °C.

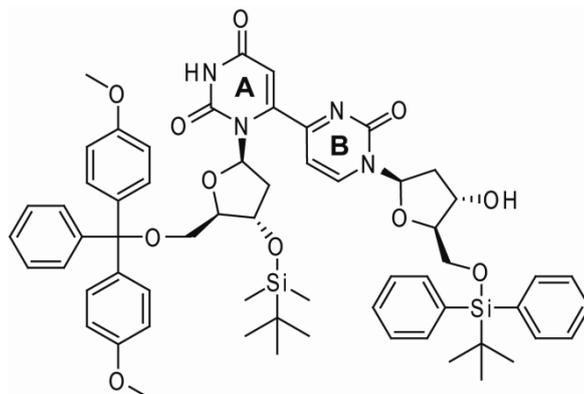
IR: $\tilde{\nu}$ = 1692 w, 1667 w/br, 1606 vw, 1591 vw, 1508 w, 1462 vw, 1440 vw, 1387 vw, 1366 vw, 1299 vw, 1281 vw, 1248 m, 1175 w, 1095 m, 1066 m, 1031 s, 1002 vw, 987 vw, 970 vw, 914 vw, 831 vs, 790 w, 777 m, 752 w, 726 vw, 702 s, 671 vw, 616 vw.

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 10.18 (br s, 1H, NH), 8.68 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H_{6B}), 7.49 – 7.18 (m, 9H, H_{DMT}), 6.88 – 6.84 (m, 4H, H_{DMT}), 6.71 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H_{5B}), 6.14 (t, J = 6.2 Hz, 1H, H_{1'B}), 5.94 (dd, J = 8.4 Hz, J = 4.4 Hz, 1H, H_{1'A}), 5.73 – 5.72 (m, 1H, H_{5A}), 4.53 – 4.48 (m, 1H, H_{3'B}), 4.46 – 4.41 (m, 1H, H_{3'A}), 4.11 – 4.09 (m, 1H, H_{4'B}), 3.92 – 3.81 (m, 2H, H_{5'B1}, H_{5'B2}), 3.80 – 3.73 (m, 1H, H_{4'A}), 3.77 (s, 6H, H_{DMT-OMe}), 3.19 – 3.10 (m, 2H, H_{5'A1}, H_{5'A2}), 2.94 – 2.88 (m, 1H, H_{2'A1}), 2.60 – 2.54 (m, 1H, H_{2'B1}), 2.25 – 2.19 (m, 1H, H_{2'B2}), 2.16 – 2.09 (m, 1H, H_{2'A2}), 0.78 (s, 9H, H_{tBu}), -0.02, -0.10 (2 x s, 6H, H_{Si-Me}).

¹³C-NMR: (100 MHz, Aceton-d₆): δ = 167.64, 161.68, 158.64, 158.62, 153.75, 152.47, 149.95, 146.10, 145.39, 136.15, 136.06, 130.07 (2C), 130.03 (2C), 128.14 (2C), 127.54 (2C), 126.47, 112.89 (2C), 112.87 (2C), 103.67, 102.72, 88.64, 87.88, 87.85, 85.87, 85.86, 72.19, 70.28, 64.14, 61.16, 54.56 (2C), 41.55, 39.17, 25.22 (3C), 17.50, -5.41, -5.68.

HRMS: (ESI): m/z : ber. für C₄₆H₅₅N₄O₁₃Si [M + HCOO]⁻: 899.3540, gef.: 899.3575.

1-[2'-Desoxy-(5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-(5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-6-uridyl]-2-(1*H*)-pyrimidinon **61**



Unter Stickstoffatmosphäre wurden **60** (175 mg, 0.20 mmol) und Imidazol (35 mg, 0.51 mmol) in 10 mL trockenem DMF gelöst, mit TBDPS-Cl (57 μ L, 0.22 mmol) versetzt und für 48 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zu 60 mL CH_2Cl_2 und dreimal mit jeweils 40 mL H_2O gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden erneut mit 60 mL CH_2Cl_2 extrahiert, wobei die vereinigten organischen Phasen anschließend über MgSO_4 getrocknet wurden und das Lösemittel *in vacuo* entfernt wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel 60, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Py}$, 30/1/0.3) konnte **61** (132 mg, 0.12 mmol, 60 %) in Form eines farblosen Schaums erhalten werden.

R_f: 0.63 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1).

Smp.: 57.3 – 59.8 °C.

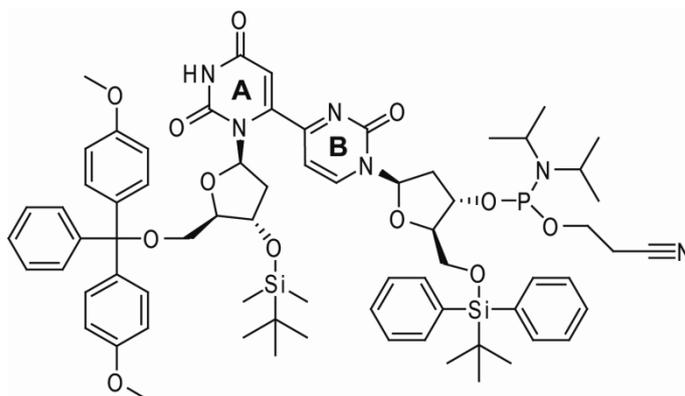
IR: $\tilde{\nu}$ = 2930 *vw*, 2855 *vw*, 1470 *vw*, 1427 *w*, 1390 *vw*, 1359 *vw*, 1111 *w*, 998 *vw*, 835 *w*, 814 *m/br*, 741 *w*, 699 *vs*, 687 *s*, 607 *m*.

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton- d_6): δ = 10.26 (br *s*, 1H, NH), 8.49 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H_{6B}), 7.79 – 7.14 (m, 19H, H_{DMT}, H_{TBDPS}), 6.85 – 6.82 (m, 4H, H_{DMT}), 6.52 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H_{5B}), 6.14 (t, *J* = 6.0 Hz 1H, H_{1'B}), 5.88 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1H, H_{1'A}), 5.70-5.69 (m, 1H, H_{5A}), 4.59 – 4.55 (m, 1H, H_{3'B}), 4.53 – 4.48 (m, 1H, H_{3'A}), 4.21 – 4.18 (m, 1H, H_{4'B}), 4.10 – 3.96 (m, 2H, H_{5'B1}, H_{5'B2}), 3.79 – 3.74 (m, 1H, H_{4'A}), 3.76, 3.75 (2 x *s*, 6H, H_{DMT-OMe}), 3.23 – 3.15 (m, 2H, H_{5'A1}, H_{5'A2}), 2.94 – 2.88 (m, 1H, H_{2'A1}), 2.71 – 2.65 (m, 1H, H_{2'B1}), 2.31 – 2.24 (m, 1H, H_{2'B2}), 2.15 – 2.08 (m, 1H, H_{2'A2}), 1.09 (*s*, 9H, H_{TBDPS-tBu}), 0.78 (*s*, 9H, H_{TBDMS-tBu}), -0.01, -0.08 (2 x *s*, 6H, H_{Si-Me}).

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 168.48, 162.73, 159.59, 159.58, 154.68, 153.37, 150.90, 146.38, 146.35, 137.37, 137.20, 137.04, 136.50, 136.42, 135.68$ (3C), 133.93, 133.63, 131.06, 131.04, 131.03, 131.02, 130.13, 129.14, 128.93, 128.90, 128.51, 128.39 (3C), 127.44, 113.85 (4C), 104.64, 103.63, 89.14, 88.96, 88.91, 87.02, 86.87, 73.19, 71.21, 65.09, 64.53, 55.56, 55.55, 42.48, 40.17, 27.47 (3C), 27.13 (3C), 19.92, 18.50, -4.37, -4.62.

HRMS: (ESI): m/z : ber. für $\text{C}_{62}\text{H}_{73}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{HCOO}$] $^-$: 1137.4718, gef.: 1137.4811.

1-[2'-Desoxy-(5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-3'-*O*-(*N,N*-diisopropyl-2-cyanoethyl-phosphoramidit))-ribofuranosyl]-4-[2'-desoxy-(5'-*O*-dimethoxytrityl)-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl]-6-uridy]-2-(1*H*)-pyrimidinon **62**

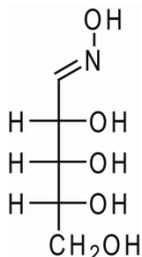


Unter Argonatmosphäre wurde **61** (50 mg, 45.73 μmol) in 5 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und mit trockenem Diisopropylethylamin (18 μL) versetzt. Man gab bei RT Cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidit (32 μL , 183.71 μmol) langsam zu der Lösung hinzu und ließ für 5 h bei RT rühren. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (deaktiviertes Kieselgel 60, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Py}$, 20/1/0.2). **62** (33 mg, 25.51 μmol , 56 %) konnte als farbloser Schaum erhalten werden.

R_f: 0.71 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1).

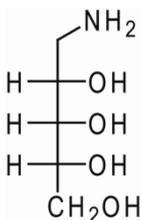
$^{31}\text{P-NMR}$: (80 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 149.61, 149.27$.

MS: (MALDI $^+$): m/z : ber. für $\text{C}_{70}\text{H}_{89}\text{KN}_6\text{O}_{12}\text{PSi}_2$ [$\text{M} + \text{K}$] $^+$: 1331.54, gef.: 1332.67.

4.2.2 Synthese des Desazaflavins F_0 D-Ribose-Oxim **47**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde Hydroxylaminhydrochlorid (8.70 g, 125.19 mmol) mit absolutem Ethanol (58 mL) und Triethylamin (18 mL, 129.85 mmol) versetzt und das Gemisch auf 75 °C erhitzt. Nach dem lösen des Hydroxylaminhydrochlorids wurde D-Ribose (12.00 g, 79.93 mmol) zugegeben und weitere 20 min bei 75 °C gerührt. Das in Form von farblosen Kristallen ausgefallene Oxim wurde abfiltriert, aus absoluten Ethanol umkristallisiert und *in vacuo* getrocknet, wobei man das Oxim **47** (4.40 g, 26.64 mmol, 33 %) als ein farbloses Pulver erhielt.

HRMS (ESI⁺): *m/z*: berechnet für C₅H₁₂NO₅ [M + H]⁺: 166.0715, gefunden: 166.0710.

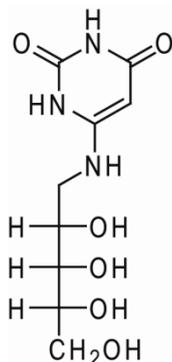
Ribitylamin **48**

Zu einer Suspension aus D-Ribose-Oxim **47** (4.40 g, 26.64 mmol) in 100 mL Eisessig wurde Pd/C(10%)-Katalysator (1.70 g) gegeben, das Gemisch 20 h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre stark gerührt und anschließend über Celite filtriert. Das Filtrat wurde

zweimal mit je 50 mL Wasser gewaschen und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das gelbe Öl wurde in 25 mL Wasser gelöst und mittels Ionenaustausch-Chromatographie (Dowex 1-X8, Hydroxidform) aufgereinigt. Hierbei wurde das Säulenmaterial zunächst mit OH-Ionen beladen und mit Wasser ein pH-Wert von 6 – 7 eingestellt. Die Fraktionen wurden ab dem Zeitpunkt gesammelt, als das Eluat alkalisch wurde, danach eingengt *in vacuo* getrocknet. Das Amin **48** wurde als gelbes Öl erhalten (2.00 g). Um die genaue Ausbeute desamins **48** zu bestimmen, wurde das erhaltene Produkt mit einer 0.1 molaren HCl-Lösung titriert, wobei die daraus bestimmte Menge an Amin 60 % betrug (1.20 g, 7.93 mmol, 30 %).

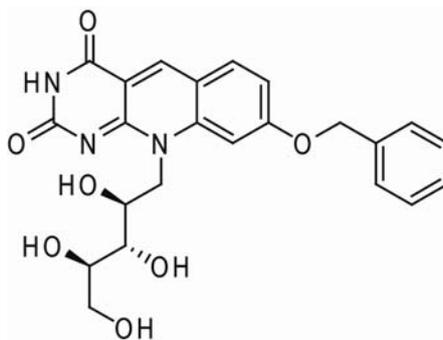
HRMS (ESI⁺): *m/z*: berechnet für C₅H₁₄NO₄ [M + H]⁺: 152.0917 gefunden: 152.0918.

4-Ribitylamino-2,6-dihoxypyrimidin **49**



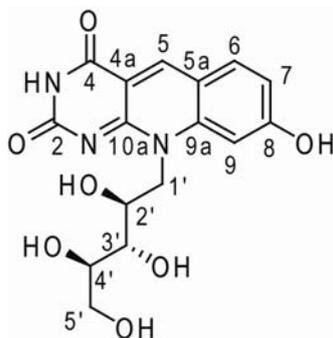
In einem Druckrohr wurde **48** (1.80 g, 11.90 mmol, davon 60 % Ribitylamin) und 6-Chloruracil (0.30 g, 2.04 mmol) in 10 mL Wasser gelöst und für 3 h bei 128 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Wasser *in vacuo* entfernt und das erhaltene Rohprodukt (2.00 g) ohne weiteren Reinigungsschritt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

HRMS (ESI⁻): *m/z*: berechnet für C₉H₁₄N₃O₆ [M - H]⁻: 260.0888, gefunden: 260.0899.

8-Benzyloxy-10-*D*-ribityl-5-desazaflavin **50**

In einem ausgeheizten Kolben wurde das Ribitylaminouracilderivat/Amin-Gemisch aus der vorausgegangenen Reaktion (2.00 g) und 2,4-Dibenzyloxybenzaldehyd (1.80 g, 5.25 mmol) in 20 mL trockenem DMF für 3.5 h refluxiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch langsam auf 1 L Eiswasser gegeben und der ausgefallene gelbe Niederschlag abzentrifugiert (12 000 rpm, 15 min). Das Präzipitat wurde zweimal mit 100 mL Methanol gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Das Desazariboflavin **50** wurde in Form eines gelben Pulvers erhalten (0.50 g, 1.10 mmol).

HRMS (ESI⁺): *m/z*: berechnet für C₂₃H₂₄N₃O₇ [M + H]⁺: 454.1609, gefunden: 454.1618.

8-Hydroxy-10-*D*-ribityl-5-desazaflavin **16**

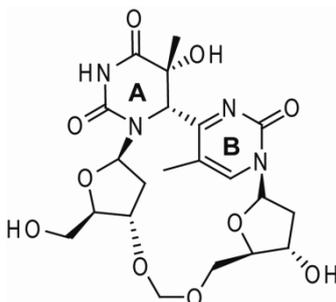
Unter Stickstoffatmosphäre wurde **50** (0.10 g, 220 μmol) und 50 mg Pd/C(10%)-Katalysator in 30 mL Eisessig gegeben. Nach Ersetzen der Stickstoffatmosphäre gegen eine Wasserstoffatmosphäre wurde die Lösung für 5 h bei RT gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Kieselgur abfiltriert, mit 50 mL Methanol gewaschen und das Lösemittel anschließend *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mit 0.2 mL Trifluoressigsäure und 5 mL eiskaltem Diethylether versetzt. Der ausgefallene gelbe Niederschlag wurde dreimal abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min) und jeweils in 5 mL eiskaltem Diethylether im Ultraschallbad resuspendiert. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer *reversed-phase* HPLC (*Nucleosil 100-7 C18*, Puffersystem **P2**, Gradient 0 – 25 % B in 45 min, Fluss 15 mL/min) aufgereinigt. Das Desazaflavin **16** konnte in Form eines hellgelben Pulvers erhalten werden (27 mg, 74 μmol , 34 %).

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO- d_6 /TFA- d_1): δ = 12.31 (br s, 1H, NH), 9.36 (s, 1H, H5), 8.29 (d, 8.8 Hz, 1H, H6), 7.60 (br s, 1H, H9), 7.36 (dd, J = 9.0 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H7), 4.76 – 4.94 (m, 2H, H1'₁, H1'₂), 4.25 – 4.30 (m, 1H, H2'), 3.69 – 3.73, 3.78 – 3.82 (2 \times m, 2H, H3', H4'), 3.62 – 3.66 (m, 1H, H5'₁), 3.47 – 3.52 (m, 1H, H5'₂).

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 164.91, 161.80, 158.39, 158.15, 143.71, 142.39, 134.07, 116.06, 114.43, 110.27, 102.25, 73.77, 72.90, 69.43, 63.25, 48.73.

HRMS (ESI): m/z : berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_7$ [H - H]⁻: 362.0994 gefunden: 362.0993.

4.2.3 Synthese des Formacetalverbrückten T(6-4)T-Dinukleotids 35



Das Formacetalverbrückte Dinukleotid **34** (416 mg, 0.84 mmol) wurde in der *glove box* mit einem Sauerstoffgehalt von < 3 ppm in *ddH*₂O (120 mL) gelöst. Jeweils 20 mL der Lösung wurde in Petrischalen auf einem Kühlaggregat über Nacht mit einem Abstand von 10 cm zur UV-Lampe (254 nm, *Vilber Lourmat VL-215C*, 2 x 15 W 254 nm Röhren) belichtet. Die Fraktionen wurden vereinigt und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels *reversed-phase* HPLC (*Nucleosil 100-7 C18*, Puffersystem **P1**, Gradient 0 – 50 % B in 45 min, Fluss 15 mL/min) aufgereinigt. Der Formacetalverbrückte (6-4)-Schaden **35** wurde als farbloser Schaum erhalten (21 mg, 0.04 mmol, 5 %).

¹H-NMR: (600 MHz, D₂O): δ = 8.04 (s, 1H, H_{6B}), 6.55 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H_{1'B}), 6.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H_{1'A}), 5.15 (s, 1H, H_{6A}), 4.93 – 4.90 (m, 1H, H_{3'B}), 4.74 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H_{Formacetal,1}), 4.64 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_{Formacetal,2}), 4.19 – 4.18 (m, 1H, H_{4'B}), 4.03 – 3.96 (m, 1H, H_{5'B1}), 3.84 – 3.74 (m, 2H, H_{5'B2}, H_{5'A1}), 3.69 – 3.65 (m, 1H, H_{3'A}), 3.48 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H_{5'A2}), 3.41 – 3.36 (m, 1H, H_{4'A}), 3.11 – 3.00 (m, 1H, H_{2'B1}), 2.35 (s, 3H, CH_{3,B}), 2.63 – 2.58 (m, 1H, H_{2'B2}), 2.13 – 2.08 (m, 1H, H_{2'A1}), 1.77 (s, 3H, CH_{3,A}), 1.53 – 1.49 (m, 1H, H_{2'A2}).

¹³C-NMR: (150 MHz, D₂O): δ = 174.14 (2C), 157.48, 154.04, 144.86, 116.47, 97.23, 88.52, 86.32, 82.57, 81.82, 73.98, 72.60, 70.27, 68.31, 58.35, 58.28, 35.76, 35.58, 25.31, 13.84.

HRMS (ESI⁺): m/z : berechnet für C₂₁H₂₉N₄O₁₀ [M + H]⁺: 497.1878 gefunden: 497.1882.

5. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
Å	Angström
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>attenuated total relection</i>
ATT	6-Aza-2-thithymin
BER	<i>base excision repair</i> , Basenexzisionsreparatur
BTT	Benzylthiotetrazol
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Bu	n-Butyl
Bz	Benzoyl
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
CED-Cl	Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid
CMDMI-Cl	Chloromethylendimethylammoniumchlorid (<i>Vilsmeier</i> -Reagenz)
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
CPG	<i>controlled pore glass</i>
Cry	Cryptochrom
δ	NMR: chemische Verschiebung
d	Tage
DASH	<i>Drosophila Arabidopsis Synechocystis Homo</i>
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
dG	2'-Desoxyguanosin
dT	2'-Desoxythymidin
dd	doppelt destilliert
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl
DMT-Cl	4,4'-Dimethoxy-triphenyl-methyl-chlorid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	<i>electron impact ionisation</i>
Em	Emission
eq	Äquivalent(e)
ESI	Elektronensprayionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EtOAc	Essigsäureethylester
Ex	Anregung
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
FRET	fluorescence resonance energy transfer
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
G	Guanin, 2'-Desoxyguanosin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
h ν	Photoreaktion
8-HDF	8-Hydroxydesazaflavin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMBC	<i>heteronuclear multi bond connectivity</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HOMO	<i>(Highest occupied molecular orbital)</i> energetisch höchstes, besetztes Molekülorbital
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
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
λ	Wellenlänge
L	Liter
LB	<i>Luria Bertani</i>
Lsg.	Lösung
LUMO	(<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>) energetisch niedrigstes, unbesetztes Molekülorbital
M	Molekulargewicht
M	MS: Molekülion
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MS	Massenspektrum
MS/MS	MS eines mit MS isolierten Ions
MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotides
NER	<i>nucleotide excision repair</i> , Nukleotidexzisionsreparatur
NEt ₃	Triethylamin
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
Nu	Nukleophil
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
Py	Pyridin
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde(n)
SASP	<i>small acid soluble proteins</i>
Smp.	Schmelzpunkt
T	Temperatur
T	Thymin, 2'-Thymidin
TB	<i>terrific broth</i>
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBDPS-Cl	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilylchlorid
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TEAA	Triethylamoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLS	<i>trans lesion synthesis</i>
TMS	Trimethylsilyl
Tol	Toluoyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil, 2'-Desoxyuridin
UV	ultraviolett
Vis	<i>visible</i>
z	MS: Ladungszahl

6. Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738. Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
- [2] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, *6*, 201-209. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation.
- [3] E. Chargaff, *Fed. Proc.* **1951**, *10*, 654-659. Structure and function of nucleic acids as cell constituents.
- [4] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137-158. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III.
- [5] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *J. Am. Med. Assoc.* **1993**, *269*, 1967-1969. Genetic-Implications of the Structure of Deoxyribonucleic-Acid.
- [6] C. Auerbach, J. M. Robson, *Nature* **1946**, *157*, 302-302. Chemical Production of Mutations.
- [7] J. A. V. Butler, K. A. Smith, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3411-3418. The Action of Ionizing Radiations and of Radiomimetic Substances on Deoxyribonucleic Acid .1. The Action of Some Compounds of the Mustard Type.
- [8] B. E. Conway, L. Gilbert, J. A. V. Butler, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3421-3425. The Action of Ionizing Radiations and of Radiomimetic Substances on Deoxyribonucleic Acid .3. The Molecular Weights of Deoxyribonucleic Acid Degraded by X-Rays and by Treatment with a Nitrogen Mustard.
- [9] R. M. Herriott, *J. Gen. Physiol.* **1948**, *32*, 221-239. Inactivation of Viruses and Cells by Mustard Gas.
- [10] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709-715. Instability and decay of the primary structure of DNA.
- [11] T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3610-3618. Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid.
- [12] T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3405-3410. Heat-Induced Deamination of Cytosine Residues in Deoxyribonucleic-Acid.
- [13] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974. Chemistry and Biology of DNA Repair.
- [14] S. Loft, H. E. Poulsen, *J. Mol. Med.* **1996**, *74*, 297-312. Cancer risk and oxidative DNA damage in man.
- [15] J. Cadet, S. Bellon, M. Berger, A. G. Bourdat, T. Douki, V. Duarte, S. Frelon, D. Gasparutto, E. Muller, J. L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 933-943. Recent aspects of oxidative DNA damage: Guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases.
- [16] M. G. Friedel, M. K. Cichon, T. Carell, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology (2nd Edition)* **2004**, (Ed.: W. M. Horspool), 141/141-141/122.
- [17] W. L. Xue, D. Warshawsky, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *206*, 73-93. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review.
- [18] A. J. Pierce, J. M. Stark, F. D. Araujo, M. E. Moynahan, M. Berwick, M. Jasin, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, S52-S59. Double-strand breaks and tumorigenesis.
- [19] E. C. Friedberg, *Nature* **2003**, *421*, 436-440. DNA damage and repair.
- [20] G. M. Li, *Cell Res.* **2008**, *18*, 85-98. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair.

- [21] S. C. Shuck, E. A. Short, J. J. Turchi, *Cell Res.* **2008**, *18*, 64-72. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology.
- [22] W. Yang, *Cell Res.* **2008**, *18*, 184-197. Structure and mechanism for DNA lesion recognition.
- [23] C. W. Emmons, A. Hollaender, *Am. J. Botany* **1939**, *26*, 467-475. The action of ultraviolet radiation on dermatophytes. II. Mutations induced in cultures of dermatophytes by exposure of spores to monochromatic ultraviolet radiation.
- [24] F. L. Gates, *Science* **1928**, *68*, 479-480. On Nuclear Derivatives and the Lethal Action of Ultra-Violet Light.
- [25] E. Knapp, A. Reuss, O. Risse, H. Schreiber, *Naturwissenschaft* **1939**, *27*, 304. Quantitative Analyse der mutations auslösenden Wirkung monochromatischen UV-Lichtes.
- [26] J. Cadet, P. Vigny, *Bioorganic Photochemistry (Vol. 1)* **1990**, (Ed.: H. Morrison), 1-272.
- [27] J. L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *63*, 88-102. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components.
- [28] T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, E. Sage, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9221-9226. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation.
- [29] J. Cadet, R. Teoule, *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28*, 661-667. Comparative-Study of Oxidation of Nucleic-Acid Components by Hydroxyl Radicals, Singlet Oxygen and Superoxide Anion Radicals.
- [30] J. L. Ravanat, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J. Cadet, *J. Biol. Chem.* **2001**, *275*, 40601-40604. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA.
- [31] S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Mutat. Res.* **2004**, *556*, 135-142. Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells.
- [32] S. Kumar, N. D. Sharma, R. J. H. Davies, D. W. Phillipson, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1199-1216. The Isolation and Characterization of a New Type of Dimeric Adenine Photoproduct in UV-Irradiated Deoxyadenylates.
- [33] X. D. Zhao, S. Nadji, J. L. F. Kao, J. S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1554-1560. The structure of d(TpA)*, the major photoproduct of thymidylyl-(3'-5')-deoxyadenosine.
- [34] J. E. Donnelly, R. B. Setlow, *Science* **1965**, *149*, 308-310. Thymine Photoproducts but Not Thymine Dimers Found in Ultraviolet-Irradiated Bacterial Spores.
- [35] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 163-169. Effects of the binding of alpha/beta-type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of *Bacillus subtilis* and in vitro.
- [36] P. H. Clingen, C. F. Arlett, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido, M. H. L. Green, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2245-2248. Induction of Cyclobutane Pyrimidine Dimers, Pyrimidine(6-4)Pyrimidone Photoproducts, and Dewar Valence Isomers by Natural Sunlight in Normal Human Mononuclear-Cells.
- [37] R. Beukers, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *41*, 550-551. Isolation and Identification of the Irradiation Product of Thymine.
- [38] S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8535-8540. Characterization of (6-4)-Photoproduct DNA Photolyase.
- [39] D. L. Mitchell, R. S. Nairn, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 805-819. The Biology of the (6-4) Photoproduct.
- [40] M. N. Khattak, S. Y. Wang, *Tetrahedron* **1972**, *28*, 945-957. Photochemical Mechanism of Pyrimidine Cyclobutyl Dimerization.

- [41] A. Wacker, H. Dellweg, L. Trager, A. Kornhauser, E. Lodemann, G. Turck, R. Selzer, P. Chandra, M. Ishimoto, *Photochem. Photobiol.* **1964**, *3*, 369-394. Organic Photochemistry of Nucleic Acids.
- [42] T. Douki, J. Cadet, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495-2501. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions.
- [43] T. Douki, M. Court, S. Sauvaigo, F. Odin, J. Cadet, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11678-11685. Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
- [44] H. Park, K. Zhang, Y. Ren, S. Nadji, N. Sinha, J. S. Taylor, C. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15965-15970. Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer.
- [45] J. S. Taylor, D. S. Garrett, I. R. Brockie, D. L. Svoboda, J. Telser, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8858-8866. H1-NMR Assignment and Melting Temperature Study of Cis-Syn and Trans-Syn Thymine Dimer Containing Duplexes of d(CGTATTATGC).d(GCATAATACG).
- [46] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.
- [47] P. F. Heelis, R. F. Hartman, S. D. Rose, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 289-297. Photoenzymic Repair of Uv-Damaged DNA - a Chemists Perspective.
- [48] R. O. Rahn, J. L. Hosszu, *Photochem. Photobiol.* **1969**, *10*, 131-137. Photochemical studies of thymine in ice.
- [49] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, *571*, 3-17. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA.
- [50] D. Perdiz, P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, E. Sage, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26732-26742. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells - Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis.
- [51] Y. Fujiwara, S. Iwai, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1544-1550. Thermodynamic studies of the hybridization properties of photolesions in DNA.
- [52] Y. Q. Jing, J. F. L. Kao, J. S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3845-3853. Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing cis-syn, (6-4) and Dewar photoproducts of TT.
- [53] J. K. Kim, B. S. Choi, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 849-854. The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement.
- [54] J. H. Lee, G. S. Hwang, B. S. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6632-6636. Solution structure of a DNA decamer duplex containing the stable 3' T.G base pair of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: implications for the highly specific 3' T --> C transition of the (6-4) adduct.
- [55] J. H. Lee, G. S. Hwang, J. K. Kim, B. S. Choi, *FEBS Lett.* **1998**, *428*, 269-274. The solution structure of DNA decamer duplex containing the Dewar product of thymidylyl(3-->5')thymidine by NMR and full relaxation matrix refinement.
- [56] R. E. Johnson, L. Haracska, S. Prakash, L. Prakash, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 3558-3563. Role of DNA polymerase eta in the bypass of a (6-4) TT photoproduct.
- [57] J. E. LeClerc, A. Borden, C. W. Lawrence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9685-9689. The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in Escherichia coli.

- [58] H. E. Johns, M. L. Pearson, C. W. Helleiner, J. C. Leblanc, *J. Mol. Biol.* **1964**, *9*, 503-524. Ultraviolet Photochemistry of Thymidylyl-(3'to5')-Thymidine.
- [59] M. L. Pearson, F. P. Ottensmeyer, H. E. Johns, *Photochem. Photobiol.* **1965**, *4*, 739-747. Properties of an unusual photoproduct of U.V. irradiated thymidylyl-thymidine.
- [60] R. E. Rycyna, J. L. Alderfer, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 5949-5963. UV irradiation of nucleic acids: formation, purification and solution conformational analysis of the '6-4 lesion' of dTpdT.
- [61] W. A. Franklin, K. M. Lo, W. A. Haseltine, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13535-13543. Alkaline lability of fluorescent photoproducts produced in ultraviolet light-irradiated DNA.
- [62] D. G. E. Lemaire, B. P. Ruzsicska, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 755-769. Quantum Yields and Secondary Photoreactions of the Photoproducts of dTpdT, dTpdC and dTpdU.
- [63] L. S. Kan, L. Voituriez, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, *12*, 339-357. The Dewar Valence Isomer of the (6-4) Photoadduct of Thymidylyl-(3'-5')-Thymidine Monophosphate - Formation, Alkaline Lability and Conformational Properties.
- [64] G. S. Hwang, J. K. Kim, B. S. Choi, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 359-365. NMR structural studies of DNA decamer duplex containing the Dewar photoproduct of thymidylyl(3'→5')thymidine - Conformational changes of the oligonucleotide duplex by photoconversion of a (6-4) adduct to its Dewar valence isomer.
- [65] J. Yamamoto, D. Loakes, C. Masutani, S. Simmyo, K. Urabe, F. Hanaoka, P. Holliger, S. Iwai, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, 339-340. Translesion synthesis across the (6-4) photoproduct and its Dewar valence isomer by the Y-family and engineered DNA polymerases.
- [66] H. S. Black, F. R. deGruijl, P. D. Forbes, J. E. Cleaver, H. N. Ananthaswamy, E. C. deFabo, S. E. Ullrich, R. M. Tyrrell, *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *40*, 29-47. Photocarcinogenesis: an overview.
- [67] J. S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76-82. Unraveling the Molecular Pathway from Sunlight to Skin-Cancer.
- [68] E. C. Friedberg, J. P. Bond, D. K. Burns, D. L. Cheo, M. S. Greenblatt, L. B. Meira, D. Nahari, A. M. Reis, *Mutat. Res.* **2000**, *459*, 99-108. Defective nucleotide excision repair in xpc mutant mice and its association with cancer predisposition.
- [69] R. B. Setlow, *Nature* **1978**, *271*, 713-717. Repair deficient human disorders and cancer.
- [70] H. van Steeg, L. H. Mullenders, J. Vijg, *Mutat. Res.* **2000**, *450*, 167-180. Mutagenesis and carcinogenesis in nucleotide excision repair-deficient XPA knock out mice.
- [71] D. E. Brash, J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin, J. Ponten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10124-10128. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma.
- [72] L. Daya-Grosjean, N. Dumaz, A. Sarasin, *J. Photochem. Photobiol. B* **1995**, *28*, 115-124. The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers.
- [73] N. Dumaz, C. Drougard, A. Sarasin, L. Daya-Grosjean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10529-10533. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients.
- [74] H. Nakazawa, D. English, P. L. Randell, K. Nakazawa, N. Martel, B. K. Armstrong, H. Yamasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 360-364. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement.
- [75] J. E. Cleaver, *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 377-379. Mutagenic lesions in photocarcinogenesis: the fate of pyrimidine photoproducts in repair-deficient disorders.

- [76] C. A. Smith, M. Wang, N. Jiang, L. Che, X. Zhao, J. S. Taylor, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4146-4154. Mutation spectra of M13 vectors containing site-specific Cis-Syn, Trans-Syn-I, (6-4), and Dewar pyrimidone photoproducts of thymidylyl-(3'-->5')-thymidine in *Escherichia coli* under SOS conditions.
- [77] D. Fix, R. Bockrath, *Mol. Gen. Genet.* **1981**, *182*, 7-11. Thermal resistance to photoreactivation of specific mutations potentiated in *E. coli* B/r ung by ultraviolet light.
- [78] M. J. Horsfall, C. W. Lawrence, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 465-471. Accuracy of replication past the T-C (6-4) adduct.
- [79] J. H. Lee, S. H. Bae, B. S. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4591-4596. The Dewar photoproduct of thymidylyl(3'-->5')- thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in accordance with the "A rule".
- [80] Y. H. You, G. P. Pfeifer, *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 389-399. Similarities in sunlight-induced mutational spectra of CpG-methylated transgenes and the p53 gene in skin cancer point to an important role of 5-methylcytosine residues in solar UV mutagenesis.
- [81] A. Kelner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1949**, *35*, 73-79. Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury.
- [82] A. Kelner, *J. Bacteriol.* **1949**, *58*, 511-522. Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation.
- [83] S. Kanai, R. Kikuno, H. Toh, H. Ryo, T. Todo, *J. Mol. Evol.* **1997**, *45*, 535-548. Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family.
- [84] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2-9. Structure and Function of DNA Photolyase.
- [85] A. Sancar, F. W. Smith, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6028-6032. Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase.
- [86] G. B. Sancar, A. Sancar, *Methods Enzymol.* **2006**, *408*, 121-156. Purification and characterization of DNA photolyases.
- [87] N. Ozturk, Y. T. Kao, C. P. Selby, I. H. Kavakli, C. L. Partch, D. Zhong, A. Sancar, *Biochemistry* **2008**, *47*, 10255-10261. Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*.
- [88] M. Müller, T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 277-285. Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes.
- [89] C. Lin, T. Todo, *Genome Biol.* **2005**, *6*, 220. The cryptochromes.
- [90] C. Lin, *Trends Plant Sci.* **2000**, *5*, 337-342. Plant blue-light receptors.
- [91] D. P. King, J. S. Takahashi, *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**, *23*, 713-742. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals.
- [92] R. Brudler, K. Hitomi, H. Daiyasu, H. Toh, K. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. A. Roberts, T. Todo, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 59-67. Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution.
- [93] R. Pokorny, T. Klar, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer, L. O. Essen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 21023-21027. Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome.
- [94] C. P. Selby, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17696-17700. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity.
- [95] T. A. Slieman, R. Rebeil, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6412-6417. Spore photoproduct (SP) lyase from *Bacillus subtilis* specifically binds to and cleaves SP (5-thyminyl-5,6-dihydrothymine) but not cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA.

- [96] J. L. Johnson, S. Hammalvarez, G. Payne, G. B. Sancar, K. V. Rajagopalan, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 2046-2050. Identification of the 2nd Chromophore of Escherichia-Coli and Yeast DNA Photolyases as 5,10-Methenyltetrahydrofolate.
- [97] M. S. Jorns, B. Y. Wang, S. P. Jordan, L. P. Chanderkar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 552-561. Chromophore Function and Interaction in Escherichia-Coli DNA Photolyase - Reconstitution of the Apoenzyme with Pterin and or Flavin Derivatives.
- [98] R. Kort, H. Komori, S. Adachi, K. Miki, A. Eker, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1205-1213. DNA apophotolyase from Anacystis nidulans: 1.8 angstrom structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction.
- [99] K. Malhotra, S. T. Kim, C. Walsh, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 15406-15411. Roles of FAD and 8-Hydroxy-5-Deazaflavin Chromophores in Photoreactivation by Anacystis-Nidulans DNA Photolyase.
- [100] M. Fujihashi, N. Numoto, Y. Kobayashi, A. Mizushima, M. Tsujimura, A. Nakamura, Y. Kawarabayasi, K. Miki, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 903-910. Crystal structure of archaeal photolyase from Sulfolobus tokodaii with two FAD molecules: Implication of a novel light-harvesting cofactor.
- [101] T. Ueda, A. Kato, S. Kuramitsu, H. Terasawa, I. Shimada, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36237-36243. Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from Thermus thermophilus HB27.
- [102] G. B. Sancar, A. Sancar, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 259-261. Structure and Function of DNA Photolyases.
- [103] M. S. Jorns, E. T. Baldwin, G. B. Sancar, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 486-491. Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis.
- [104] G. Payne, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7715-7727. Absolute action spectrum of E-FADH₂ and E-FADH₂-MTHF forms of Escherichia coli DNA photolyase.
- [105] A. J. Ramsey, J. L. Alderfer, M. S. Jorns, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7134-7142. Energy transduction during catalysis by Escherichia coli DNA photolyase.
- [106] H. W. Park, S. T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866-1872. Crystal-Structure of DNA Photolyase from Escherichia-Coli.
- [107] T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. deRuiter, A. P. M. Eker, K. Miki, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 887-891. Crystal structure of DNA photolyase from Anacystis nidulans.
- [108] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell, L. O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789-1793. Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair.
- [109] I. Husain, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1109-1120. Binding of Escherichia-Coli DNA Photolyase to a Defined Substrate Containing a Single T Reversible T Dimer.
- [110] G. B. Sancar, F. W. Smith, A. Sancar, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1849-1855. Binding of Escherichia-Coli DNA Photolyase to UV-Irradiated DNA.
- [111] C. Aubert, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5423-5427. Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from Anacystis nidulans.
- [112] M. K. Cichon, S. Arnold, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 767-770. A (6-4) photolyase model: Repair of DNA (6-4) lesions requires a reduced and deprotonated flavin.
- [113] A. W. MacFarlane, R. J. Stanley, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8558-8568. Cis-syn thymidine dimer repair by DNA photolyase in real time.

- [114] R. Epple, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 938-941. Flavin- and deazaflavin-containing model compounds mimic the energy transfer step in type-II DNA-photolyases.
- [115] R. Epple, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7318-7329. Efficient light-dependent DNA repair requires a large cofactor separation.
- [116] R. Epple, E. U. Wallenborn, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7440-7451. Investigation of flavin-containing DNA-repair model compounds.
- [117] P. J. W. Pouwels, R. F. Hartman, S. D. Rose, R. Kaptein, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 563-574. Photo-Cidnp Study of Pyrimidine Dimer Splitting .1. Reactions Involving Pyrimidine Radical-Cation Intermediates.
- [118] P. J. W. Pouwels, R. F. Hartman, S. D. Rose, R. Kaptein, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 575-583. Photo-Cidnp Study of Pyrimidine Dimer Splitting .2. Reactions Involving Pyrimidine Radical-Anion Intermediates.
- [119] M. P. Scannell, D. J. Fenick, S. R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1971-1977. Model studies of DNA photorepair: Reduction potentials of thymine and cytosine cyclobutane dimers measured by fluorescence quenching.
- [120] S. R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8557-8558. Model Studies of DNA Photorepair - Radical-Anion Cleavage of Thymine Dimers Probed by Nanosecond Laser Spectroscopy.
- [121] A. Sancar, W. D. Rupp, *Cell* **1983**, *33*, 249-260. A Novel Repair Enzyme - Uvrabc Excision Nuclease of Escherichia-Coli Cuts a DNA Strand on Both Sides of the Damaged Region.
- [122] D. L. Svoboda, C. A. Smith, J. S. A. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 10694-10700. Effect of Sequence, Adduct Type, and Opposing Lesions on the Binding and Repair of Ultraviolet Photodamage by DNA Photolyase and (a)Bc Excinuclease.
- [123] T. Todo, H. Takemori, H. Ryo, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido, K. Sato, T. Nomura, *Nature* **1993**, *361*, 371-374. A New Photoreactivating Enzyme That Specifically Repairs Ultraviolet Light-Induced (6-4)Photoproducts.
- [124] J. J. Chen, D. L. Mitchell, A. B. Britt, *Plant Cell* **1994**, *6*, 1311-1317. A Light-Dependent Pathway for the Elimination of UV-Induced Pyrimidine (6-4) Pyrimidinone Photoproducts in *Arabidopsis*.
- [125] C. Z. Jiang, J. Yee, D. L. Mitchell, A. B. Britt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7441-7445. Photorepair mutants of *Arabidopsis*.
- [126] S. Nakajima, M. Sugiyama, S. Iwai, K. Hitomi, E. Otoshi, S. T. Kim, C. Z. Jiang, T. Todo, A. B. Britt, K. Yamamoto, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 638-644. Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*.
- [127] K. Hitomi, S. T. Kim, S. Iwai, N. Harima, E. Otoshi, M. Ikenaga, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32591-32598. Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase.
- [128] S. T. Kim, K. Malhotra, J. S. Taylor, A. Sancar, *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 292-295. Purification and partial characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase from *Xenopus laevis*.
- [129] C. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 216-221. Naturally-Occurring 5-Deazaflavin Coenzymes - Biological Redox Roles.
- [130] K. Hitomi, H. Nakamura, S. T. Kim, T. Mizukoshi, T. Ishikawa, S. Iwai, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10103-10109. Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction.
- [131] P. F. Heelis, S. B. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2936-2937. Photoenzymic repair of the DNA 6-4 photoproduct - A density functional theory and semiempirical study.

- [132] J. Yamamoto, K. Hitomi, R. Hayashi, E. D. Getzoff, S. Iwai, *Biochemistry* **2009**, *48*, 9306-9312. Role of the carbonyl group of the (6-4) photoproduct in the (6-4) photolyase reaction.
- [133] O. A. Borg, L. A. Eriksson, B. Durbeej, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 2351-2361. Electron-transfer induced repair of 6-4 photoproducts in DNA: A computational study.
- [134] Y. S. Wang, P. P. Gaspar, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5510-5519. Quantum chemical study of the electron-transfer-catalyzed splitting of oxetane and azetidine intermediates proposed in the photoenzymatic repair of (6-4) photoproducts of DNA.
- [135] P. Clivio, J. L. Fourrey, *Chem. Commun.* **1996**, 2203-2204. (6-4) Photoproduct DNA photolyase mechanistic studies using s⁵-(6-4) photoproducts.
- [136] P. Clivio, J. L. Fourrey, J. Gasche, A. Favre, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5481-5483. DNA Photodamage Mechanistic Studies - Characterization of a Thietane Intermediate in a Model Reaction Relevant to 6-4 Lesions.
- [137] S. Asgatay, C. Petermann, D. Harakat, D. Guillaume, J. S. Taylor, P. Clivio, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12618-12619. Evidence that the (6-4) photolyase mechanism can proceed through an oxetane intermediate.
- [138] S. K. Matus, J. L. Fourrey, P. Clivio, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3316-3320. Synthesis of the TT pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct-thio analogue phosphoramidite building block.
- [139] J. Yamamoto, Y. Tanaka, S. Iwai, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 161-166. Spectroscopic analysis of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct: insights into the (6-4) photolyase reaction.
- [140] X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32580-32590. Reaction mechanism of (6-4) photolyase.
- [141] K. Hitomi, S. T. Kim, S. Iwai, N. Harima, E. Otsoshi, M. Ikenaga, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32591-32598. Binding and catalytic properties of Xenopus (6-4) photolyase.
- [142] J. Yamamoto, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4406-4415. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6-4) photoproduct and their use in (6-4) photolyase studies.
- [143] I. L. Karle, S. Y. Wang, A. J. Varghese, *Science* **1969**, *164*, 183-184. Crystal and molecular structure of a thymine-thymine adduct.
- [144] A. J. Varghese, S. Y. Wang, *Science* **1968**, *160*, 186-187. Thymine-thymine adduct as a photoproduct of thymine.
- [145] A. J. Varghese, S. Y. Wang, *Science* **1967**, *156*, 955-957. Ultraviolet irradiation of DNA in vitro and in vivo produces a 3d thymine-derived product.
- [146] C. A. Smith, J. S. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11143-11151. Preparation and characterization of a set of deoxyoligonucleotide 49-mers containing site-specific cis-syn, trans-syn-I, (6-4), and Dewar photoproducts of thymidylyl(3'-->5')-thymidine.
- [147] S. Iwai, T. Mizukoshi, Y. Fujiwara, C. Masutani, F. Hanaoka, Y. Hayakawa, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2299-2303. Benzimidazolium triflate-activated synthesis of (6-4) photoproduct-containing oligonucleotides and its application.
- [148] S. Iwai, M. Shimizu, H. Kamiya, E. Ohtsuka, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7642-7643. Synthesis of a phosphoramidite coupling unit of the pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct and its incorporation into oligodeoxynucleotides.
- [149] T. Mizukoshi, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10634-10642. Studies on the chemical synthesis of oligonucleotides containing the (6-4) photoproduct of thymine-cytosine and its repair by (6-4) photolyase.
- [150] U. Hennecke, *Dissertation (LMU München)* **2007**. DNA Photoschäden: Untersuchungen zur Synthese, enzymatischen Erkennung und Reparatur.

- [151] M. Thomas, D. Guillaume, J. L. Fourrey, P. Clivio, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2400-2401. Further insight in the photochemistry of DNA: Structure of a 2-imidazolone (5-4) pyrimidone adduct derived from the mutagenic pyrimidine (6-4) pyrimidone photolesion by UV irradiation.
- [152] L. M. Kundu, U. Linne, M. Marahiel, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5697-5705. RNA is more UV resistant than DNA: The formation of UV-induced DNA lesions is strongly sequence and conformation dependent.
- [153] E. Sage, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 163-174. Distribution and Repair of Photolesions in DNA - Genetic Consequences and the Role of Sequence Context.
- [154] K. Satou, Y. Komatsu, T. Torizawa, K. Kato, I. Shimada, O. Nikaido, E. Ohtsuka, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2175-2179. Efficient chemical synthesis of a pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct analog and its properties.
- [155] M. Friedel, *Dissertation (LMU München)* **2005**. Synthese von Modellverbindungen zur Untersuchung der Struktur und Reparatur des Sporen- und (6-4) Photoproduktes.
- [156] S. N. Bose, R. J. H. Davies, S. K. Sethi, J. A. McCloskey, *Science* **1983**, *220*, 723-725. Formation of an Adenine-Thymine Photoadduct in the Deoxydinucleoside Monophosphate D(Tpa) and in DNA.
- [157] R. J. Davies, J. F. Malone, Y. Gan, C. J. Cardin, M. P. Lee, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1048-1053. High-resolution crystal structure of the intramolecular d(TpA) thymine-adenine photoadduct and its mechanistic implications.
- [158] S. K. Banerjee, R. B. Christensen, C. W. Lawrence, J. E. Leclerc, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 8141-8145. Frequency and Spectrum of Mutations Produced by a Single Cis-Syn Thymine-Thymine Cyclobutane Dimer in a Single-Stranded Vector.
- [159] S. N. Bose, S. Kumar, R. J. H. Davies, S. K. Sethi, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 7929-7947. The Photochemistry of d(T-A) in Aqueous-Solution and in Ice.
- [160] M. H. Patrick, *Photochem. Photobiol.* **1977**, *25*, 357-372. Studies on Thymine-Derived Uv Photoproducts in DNA .1. Formation and Biological Role of Pyrimidine Adducts in DNA.
- [161] J. S. Taylor, D. S. Garrett, M. P. Cohrs, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7206-7215. Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidylyl-(3'----5')-thymidine.
- [162] A. F. Glas, E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3254-3255. DNA (6-4) Photolyases Reduce Dewar Isomers for Isomerization into (6-4) Lesions.
- [163] W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, *315*, 625-629. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction.
- [164] T. Douki, M. Court, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **2000**, *54*, 145-154. Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts.
- [165] A. P. M. Eker, P. Kooiman, J. K. C. Hessels, A. Yasui, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8009-8015. DNA Photoreactivating Enzyme from the Cyanobacterium *Anacystis-Nidulans*.
- [166] A. F. Glas, S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10387-10396. Crystal Structure of the T(6-4)C Lesion in Complex with a (6-4) DNA Photolyase and Repair of UV-induced (6-4) and Dewar Photolesions.
- [167] M. S. Jorns, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3133-3136. Photosensitized Cleavage of Thymine Dimer with Reduced Flavin - a Model for Enzymatic Photorepair of DNA.

- [168] T. Todo, H. Ryo, K. Yamamoto, H. Toh, T. Inui, H. Ayaki, T. Nomura, M. Ikenaga, *Science* **1996**, 272, 109-112. Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family.
- [169] Q. Yuan, D. Metterville, A. D. Briscoe, S. M. Reppert, *Mol. Biol. Evol.* **2007**, 24, 948-955. Insect cryptochromes: Gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks.
- [170] Y. Kobayashi, T. Ishikawa, J. Hirayama, H. Daiyasu, S. Kanai, H. Toh, I. Fukuda, T. Tsujimura, N. Terada, Y. Kamei, S. Yuba, S. Iwai, T. Todo, *Genes Cells* **2000**, 5, 725-738. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish.
- [171] Y. Yi, C. Yi, L. Qian, L. Min, C. Long, B. Linhan, Y. Zhirong, Q. Dairong, *Biotechnol. Lett.* **2006**, 28, 309-314. Cloning and sequence analysis of the gene encoding (6-4)photolyase from *Dunaliella salina*.
- [172] S. McCready, L. Marcello, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 694-698. Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum*.
- [173] C. Courties, R. Perasso, M. J. Chretiennot-Dinet, M. Gouy, L. Guillou, M. Troussellier, *J. Phycol.* **1998**, 34, 844-849. Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae).
- [174] E. Derelle, C. Ferraz, S. Rombauts, P. Rouze, A. Z. Worden, S. Robbens, F. Partensky, S. Degroeve, S. Echeynie, R. Cooke, Y. Saeys, J. Wuyts, K. Jabbari, C. Bowler, O. Panaud, B. Piegu, S. G. Ball, J. P. Ral, F. Y. Bouget, G. Piganeau, B. De Baets, A. Picard, M. Delseny, J. Demaille, Y. Van de Peer, H. Moreau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 11647-11652. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features.
- [175] B. Palenik, J. Grimwood, A. Aerts, P. Rouze, A. Salamov, N. Putnam, C. Dupont, R. Jorgensen, E. Derelle, S. Rombauts, K. M. Zhou, R. Otilar, S. S. Merchant, S. Podell, T. Gaasterland, C. Napoli, K. Gendler, A. Manuell, V. Tai, O. Vallon, G. Piganeau, S. Jancek, M. Heijde, K. Jabbari, C. Bowler, M. Lohr, S. Robbens, G. Werner, I. Dubchak, G. J. Pazour, Q. H. Ren, I. Paulsen, C. Delwiche, J. Schmutz, D. Rokhsar, Y. Van de Peer, H. Moreau, I. V. Grigoriev, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 7705-7710. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation.
- [176] A. Usman, J. Brazard, M. M. Martin, P. Plaza, M. Heijde, G. Zabulon, C. Bowler, *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, 96, 38-48. Spectroscopic characterization of a (6-4) photolyase from the green alga *Ostreococcus tauri*.
- [177] E. Kaya, *Diplomarbeit (LMU München)* **2007**. Expression, Isolierung und Charakterisierung einer (6-4)-Photolyase aus *Ostreococcus tauri*.
- [178] M. J. Maul, *Dissertation (LMU München)* **2009**. DNA Photolyasen: Biochemische Charakterisierung, Co-Kristallstruktur und Untersuchungen zum Mechanismus der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster*.
- [179] S. Hammalvarez, A. Sancar, K. V. Rajagopalan, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 9649-9656. Role of Enzyme-Bound 5,10-Methenyltetrahydropteroylpolyglutamate in Catalysis by *Escherichia-Coli* DNA Photolyase.
- [180] A. F. Glas, M. J. Maul, M. Cryle, T. R. M. Barends, S. Schneider, E. Kaya, I. Schlichting, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 11540-11545. The archaeal cofactor F₀ is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes.
- [181] G. Payne, M. Wills, C. Walsh, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, 29, 5706-5711. Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues.
- [182] A. P. Eker, J. K. C. Hessels, J. Vandeveld, *Biochemistry* **1988**, 27, 1758-1765. Photoreactivating Enzyme from the Green-Alga *Scenedesmus-Acutus* - Evidence for the Presence of 2 Different Flavin Chromophores.

- [183] K. P. Choi, N. Kendrick, L. Daniels, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2420-2428. Demonstration that fbiC is required by Mycobacterium bovis BCG for coenzyme F-420 and FO biosynthesis.
- [184] L. M. Hedges, J. C. Brownlie, S. L. O'Neill, K. N. Johnson, *Science* **2008**, *322*, 702-702. Wolbachia and Virus Protection in Insects.
- [185] P. R. Holden, P. Jones, J. F. Y. Brookfield, *Genet. Res.* **1993**, *62*, 23-29. Evidence for a Wolbachia Symbiont in Drosophila-Melanogaster.
- [186] M. Mateos, S. J. Castrezana, B. J. Nankivell, A. M. Estes, T. A. Markow, N. A. Moran, *Genetics* **2006**, *174*, 363-376. Heritable endosymbionts of Drosophila.
- [187] M. M. van Oers, M. H. Lampen, M. I. Bajek, J. M. Vlak, A. P. M. Eker, *DNA Repair* **2008**, *7*, 1309-1318. Active DNA photolyase encoded by a baculovirus from the insect Chrysodeixis chalcites.
- [188] F. Xu, J. M. Vlak, M. M. van Oers, *Virus Res.* **2008**, *136*, 58-64. Conservation of DNA photolyase genes in group II nucleopolyhedroviruses infecting plusiine insects.
- [189] W. Steglich, L. Zechlin, *Z. Naturforsch. C* **1977**, *32*, 520-522. Pigments of Fungi .32. 3-Methylriboflavine from Panellus-Serotinus (Agaricales).
- [190] W. Kabsch, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795-800. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants.
- [191] D. M. Lemaster, F. M. Richards, *Biochemistry* **1985**, *24*, 7263-7268. H1-N15 Heteronuclear NMR-Studies of Escherichia-Coli Thioredoxin in Samples Isotopically Labeled by Residue Type.
- [192] E. de La Fortelle, G. Bricogne, *Meth. Enzymol.* **1997**, *276*, 472-494. Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for the Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods.
- [193] C. Vonrhein, E. Blanc, P. Roversi, G. Bricogne, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *364*, 215-230. Automated structure solution with autoSHARP.
- [194] A. Perrakis, M. Harkiolaki, K. S. Wilson, V. S. Lamzin, *Acta Crystallogr. D* **2001**, *57*, 1445-1450. ARP/wARP and molecular replacement.
- [195] A. Perrakis, R. Morris, V. S. Lamzin, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 458-463. Automated protein model building combined with iterative structure refinement.
- [196] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D* **2004**, *60*, 2126-2132. Coot: model-building tools for molecular graphics.
- [197] A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Crystallogr. D* **1998**, *54*, 905-921. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination.
- [198] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. D* **1997**, *53*, 240-255. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.
- [199] CCP4, *Acta Crystallogr. D* **1994**, *50*, 760-763. The CCP4 suite: programs for protein crystallography.
- [200] E. Krissinel, K. Henrick, *Acta Crystallogr. D* **2004**, *60*, 2256-2268. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions.
- [201] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Protein Eng.* **1995**, *8*, 127-134. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions.
- [202] W. L. DeLano, DeLano Scientific, San Carlos, CA., **2002**.
- [203] Y. H. Huang, R. Baxter, B. S. Smith, C. L. Partch, C. L. Colbert, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17701-17706. Crystal structure of cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana and its implications for photolyase activity.

- [204] T. Klar, R. Pokorny, J. Moldt, A. Batschauer, L. O. Essen, *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 954-964. Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: Structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna.
- [205] E. Schleicher, K. Hitomi, C. W. Kay, E. D. Getzoff, T. Todo, S. Weber, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4738-4747. Electron nuclear double resonance differentiates complementary roles for active site histidines in (6-4) photolyase.
- [206] W. Buckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6779-6787. Radical and Electron Recycling in Catalysis.
- [207] T. Domratcheva, I. Schlichting, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17793-17799. Electronic structure of (6-4) DNA photoproduct repair involving a non-oxetane pathway.
- [208] J. Kim, D. J. Darley, W. Buckel, A. J. Pierik, *Nature* **2008**, *452*, 239-242. An allylic ketyl radical intermediate in clostridial amino-acid fermentation.
- [209] M. J. Maul, T. R. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076-10080. Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase.
- [210] W. A. Franklin, P. W. Doetsch, W. A. Haseltine, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 5317-5325. Structural determination of the ultraviolet light-induced thymine-cytosine pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct.
- [211] J. S. Taylor, H. F. Lu, J. J. Kotyk, *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51*, 161-167. Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight.
- [212] J. Yamamoto, Y. Tanaka, S. Iwai, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 161-166. Spectroscopic analysis of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct: insights into the (6-4) photolyase reaction.
- [213] T. Kimachi, K. Tanaka, F. Yoneda, *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 439-443. Synthesis of a Proposed Isomer of F420 Having Alpha-Glutamyl Bonding.
- [214] R. Kuhn, F. Weygand, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, *68*, 1282-1288. Improvement of the flavin-synthesis, boric acid-practice.
- [215] G. F. Maley, G. W. E. Plaut, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 641-647. Isolation, Synthesis, and Metabolic Properties of 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine.
- [216] A. Mees, *Dissertation (LMU München)* **2005**. Co-Kristallisation von DNA-Photolyase aus *A. nidulans* mit Thymidindimer enthaltender DNA Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Cofaktoren in Oligonukleotide.
- [217] S. E. Rokita, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4589-4595. Flavin and 5-Deazaflavin Photosensitized Cleavage of Thymine Dimer - a Model of Invivo Light-Requiring DNA-Repair.
- [218] M. Sun, P. S. Song, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4663-4669. Excited-States and Reactivity of 5-Deazaflavine Comparative Studies with Flavine.
- [219] H. Yamaguchi, A. Koshiro, Y. Harima, K. Mori, F. Yoneda, *Spectrochim. Acta* **1981**, *37*, 51-55. Magnetic Circular-Dichroism and Fluorescence-Spectra of 5-Deazaflavins.
- [220] U. Hennecke, D. Kuch, T. Carell, *Synthesis* **2007**, 929-935. A general route to 4-C-substituted pyrimidine nucleosides.
- [221] M. Adamczyk, S. R. Akireddy, P. G. Mattingly, R. E. Reddy, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5749-5761. Synthesis of hapten-phosphoramidites from 2'-deoxyuridine.
- [222] G. Palmisano, M. Santagostino, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2533-2542. Base-Modified Pyrimidine Nucleosides - Efficient Entry to 6-Derivatized Uridines by Sn-Pd Transmetalation-Coupling Process.
- [223] G. Deglane, F. Morvan, F. Debart, J. J. Vasseur, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 951-954. 5-Propynylamino alpha-deoxyuridine promotes DNA duplex stabilization of anionic and neutral but not cationic alpha-oligonucleotides.

- [224] X. Jin, R. Yang, P. Jin, Q. Xiao, Y. Ju, *Synthesis* **2007**, 2967-2972. Synthesis of carbohydrate-conjugated dT analogues using 'Click chemistry'.
- [225] C. Hobartner, C. Kreutz, E. Flecker, E. Ottenschlager, W. Pils, K. Grubmayr, R. Micura, *Monatsh. Chem.* **2003**, *134*, 851-873. The synthesis of 2'-O-[(triisopropylsilyloxy) methyl (TOM) phosphoramidites of methylated ribonucleosides (m(1)G, m(2)G, m(2)(2)G, m(1)I, m(3)U, m(4)C, m(6)A, m(2)(6)A) for use in automated RNA solid-phase synthesis.
- [226] X. J. Han, B. M. Stoltz, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7600-7605. Cuprous chloride accelerated Stille reactions. A general and effective coupling system for sterically congested substrates and for enantioselective synthesis.
- [227] J. K. Stille, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 508-523. The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organotin Reagents with Organic Electrophiles.
- [228] T. Todo, S. T. Kim, K. Hitomi, E. Otsoshi, T. Inui, H. Morioka, H. Kobayashi, E. Ohtsuka, H. Toh, M. Ikenaga, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 764-768. Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4)photolyase.
- [229] P. E. M. Gibbs, J. McDonald, R. Woodgate, C. W. Lawrence, *Genetics* **2005**, *169*, 575-582. The relative roles in vivo of *Saccharomyces cerevisiae* Pol eta, Pol xi, Rev1 protein and Pol32 in the bypass and mutation induction of an abasic site, T-T (64) photoadduct and T-T cis-syn cyclobutane dimer.
- [230] D. Y. Guo, X. H. Wu, D. K. Rajpal, J. S. Taylor, Z. G. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2875-2883. Translesion synthesis by yeast DNA polymerase zeta from templates containing lesions of ultraviolet radiation and acetylaminofluorene.
- [231] A. Hendel, O. Ziv, Q. Gueranger, N. Geacintov, Z. Livneh, *DNA Repair* **2008**, *7*, 1636-1646. Reduced efficiency and increased mutagenicity of translesion DNA synthesis across a TT cyclobutane pyrimidine dimer, but not a TT 6-4 photoproduct, in human cells lacking DNA polymerase eta.
- [232] S. Shachar, O. Ziv, S. Avkin, S. Adar, J. Wittschieben, T. Reissner, S. Chaney, E. C. Friedberg, Z. G. Wang, T. Carell, N. Geacintov, Z. Livneh, *EMBO J.* **2009**, *28*, 383-393. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals.
- [233] J. Butenandt, A. P. M. Eker, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 642-654. Synthesis, crystal structure, and enzymatic evaluation of a DNA-photolesion isostere.
- [234] R. Welz, S. Muller, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 795-797. 5-(benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis.

7. Anhang

Tabelle 4: Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstrukturen mit dem T(6-4)T-Schaden

Structure, pdb code	Se-Met 64PL SAD dataset	Native 64PL / photolesion, 3CVU	Native 64PL / photolesion and F ₀ , 3CVV	Native H365N 64PL / photolesion, 3CVW	Native H369M 64PL / photolesion, 3CVX	Native 64PL / Repaired photolesion, 3CVY
Data collection						
X-ray source	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA
Wavelength	0.97886	0.978589	0.97925	0.97895	0.97895	0.97925
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell param.[Å]	<i>a</i> =86.9, <i>b</i> =88.6, <i>c</i> =89.3	<i>a</i> =87.0, <i>b</i> =89.4, <i>c</i> =91.3	<i>a</i> =84.6, <i>b</i> =88.3, <i>c</i> =91.1	<i>a</i> =86.5, <i>b</i> =89.5, <i>c</i> =89.3	<i>a</i> =87.4, <i>b</i> =89.0, <i>c</i> =90.2	<i>a</i> =83.4, <i>b</i> =86.6, <i>c</i> =88.8
Resolution (highest shell)	20-2.5 (2.6-2.5)	20-2.0 (2.1-2.0)	40-2.1 (2.15-2.1)	20-3.2 (3.3-3.2)	20-3.2 (3.3-3.2)	40-2.7 (2.8-2.7)
No. unique reflections	45797 (5024)	47357 (6065)	39271 (4836)	10625 (526)	11606 (933)	17459 (1642)
Completeness (highest shell)	99.4% (98.4%)	97.2% (92.9%)	97.0% (93.0%)	89.2% (52.2%)	96.0% (90.8%)	95.8% (90.2%)
Rmerge (highest shell)	0.124 (0.344)	0.046 (0.297)	0.082 (0.362)	0.089 (0.308)	0.086 (0.327)	0.087 (0.338)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>) (highest shell)	23.2 (11.0)	20.8 (5.7)	15.2 (5.0)	17.8 (3.1)	15.1 (4.8)	13.0 (4.8)
Redundancy	17.6	4.8	5.2	5.7	4.0	4.4
Wilson B-factor [Å ²]	31.8	30.7	27.4	65.5	75.2	58.7
Phasing statistics	FOM (after SHARP, 12 sites) 0.44 Phasing power (anomalous) 1.92	Not applicable				
Refinement	Not applicable					
Resolution in refinement [Å]		20-2.0	40-2.1	20-3.2	20-3.2	40-2.7
Rwork/Rfree		0.184/0.212	0.166/0.213	0.272/0.329	0.230/0.282	0.212/0.266
Number of atoms		5093	5435	4817	4791	4781
Protein		4110	4259	4117	4116	4110

7. Anhang

FAD/DNA/F ₀	53/608/-	53/609/26	53/609/26	53/609/-	53/608/-
Water	320	468/16	12	13	9
mol./((HOCH ₂) ₂)					
Average B-factors [Å ²]					
Protein	33.2	34.4	Overall refined B-factor 49.9	Overall refined B- factor 44.6	42.3
FAD/DNA/F ₀	33.3/42.6	27.3/46.2/28.2			38.3/67.1
Water	37.4	44.6/52.9			29.4
mol./((HOCH ₂) ₂)					
R.m.s deviations from target values					
Bond lengths [Å]	0.009	0.009	0.005	0.006	0.007
Bond angles [°]	1.257	1.393	0.881	0.956	1.112
Nr. residues in regions of Ramachandran plot (percentage)	Not applicable				
Most favoured	392 (89.7%)	411 (90.7%)	388 (88.6%)	385 (87.9%)	394 (90.2%)
Allowed	43 (9.8%)	39 (8.6%)	48 (11.0%)	50 (11.4%)	41 (9.4%)
Generously allowed	1 (0.2%)	2 (0.7%)	1 (0.2%)	2 (0.5%)	1 (0.2%)
Disallowed*	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)
Overall G-factors from Procheck	0.14	0.12	0.24	0.20	0.15

Tabelle 5: Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstruktur mit dem T(6-4)C-Schaden.

T(6-4)C - photolyase	
Data collection	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	86.4, 88.7, 90.4
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Wavelength (nm)	1.000
Resolution (Å)	45.8 - 2.95 (3.1-2.95)
R_{merge}	0.07 (0.41)
Mean $I/\sigma I$	13.9 (3.2)
Completeness (%)	99.9 (100)
Redundancy	5.3 (5.6)
Refinement	
Resolution (Å)	44.0 - 2.95
No. reflections	14835
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	20.6 / 24.3
No. atoms	4821
Protein	4160
DNA	608
FAD	53
Waters	0
<i>B</i> -factors	
Protein	59.8
DNA	84.1
FAD	36.7
Waters	0
R.m.s deviations	
Bond lengths (Å)	0.014
Bond angles (°)	1.49

Tabelle 6: Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstrukturen mit dem T(6-4)C*- und dem T(Dew)C*-Schaden.

	T(6-4)C* - photolyase	T(Dew)C* - photolyase
Data collection		
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions		
<i>a, b, c</i> (Å)	86.8, 89.3, 91.5	89.2, 87.5, 91.8
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Wavelength (nm)	1.000	1.000
Resolution (Å)	40.5 -2.0 (2.1 - 2.0)	43.7 -2.3 (2.42 - 2.3)
R_{merge}	0.061 (0.382)	0.06 (0.40.3)
Mean $I/\sigma I$	14.7 (3.7)	18.1 (3.9)
No. of observations	177,177 (24,391)	130,29 (19125)
No. of unique reflections	48,592 (6760)	32,351 (4660)
Completeness (%)	99.2 (96.2)	99.3 (99.7)
Redundancy	3.6	4.0
Refinement		
Resolution (Å)	49.5 - 2.0	43.7 - 2.3
No. reflections	48536	30688
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	17.8 / 20.9	20.1 / 22.9
No. atoms		
Protein	4178	4173
DNA	609	609
FAD	53	53
Waters	403	170
<i>B</i> -factors		
Protein	27.6	30.9
DNA	36.8	43.8
FAD	17.8	20.3
Waters	31.8	30.5
R.m.s deviations		
Bond lengths (Å)	0.011	0.013
Bond angles (°)	1.377	1.220

Curriculum vitae

Andreas Glas

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 22.11.1981
Geburtsort: Landsberg am Lech
Familienstand: Verheiratet, keine Kinder
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulausbildung

09/1988 - 07/1992 Grundschole in Türkenfeld
09/1992 - 06/2001 Viscardi-Gymnasium in Fürstenfeldbruck
Abitur (Note 2.2)

Studium

10/2001-03/2005 Bachelorstudium in Chemie und Biochemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/2005-09/2006 Masterstudium in Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
03/2006-09/2006 Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Thema: *Synthese von carbacyclischem 8-Brom-2'-desoxyguanosin sowie Isolierung und Charakterisierung der Formamidopyrimidin DNA-Glykosylase: Bindungsstudien mit geschädigter und ungeschädigter DNA* (Note 1.0)
09/2006 Hochschulabschluss: Master of Science (Gesamtnote 1.4)

Promotion

seit 12/2006 Promotionsstudium in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München.