

Untersuchungen zur Schädigung von DNA

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines

Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Anne-Kathrin Köhler

aus Deutschland

Basel 2004

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel auf
Antrag der Herren Professoren:

Prof. Dr. B. Giese

Prof. Dr. T. A. Bickle

Basel, den 20. Januar 2004

Prof. Dr. M. Tanner
(Dekan)

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge so sind, wie sie sind.

Aristoteles (384 – 322 v. Chr.), griechischer Philosoph

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Giese in der Zeit von Oktober 1999 bis Januar 2004 am Institut für Organische Chemie der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

22. *Regio-Symposium*, Falkau, Deutschland, September **2002**.

23. *Regio-Symposium*, Falkau, Deutschland, September **2003**.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318.

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Bernd Giese, der mir diese Arbeit ermöglicht und mich dabei jederzeit unterstützt und motiviert hat.

Prof. Dr. Thomas A. Bickle für seine Hilfsbereitschaft und die Ermöglichung von Arbeiten im Biozentrum, sowie für die Übernahme der Korreferats.

Prof. Dr. Heiko Ihmels und seiner Mitarbeiterin Dr. Katja Faulhaber für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Acridiziniumsalzes.

Dr. Martin Spormann für die Bereitstellung des pivaloylmodifizierten Guanosins.

Thomas Carl, der seinen Computer großzügig zur Verfügung gestellt hat.

Fabienne Hamburger und Dr. Aude Bourniquel für ihre Hilfe bei biologischen Problemen.

Allen Institutsangestellten für ihre Unterstützung.

Barbara Carl, Dr. Christoph Meyer, Dr. Florian Janetzko und Peter Stoller für die Durchsicht des Manuskripts.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Giese und Bickle für eine unvergessliche Zeit.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	IV
SUMMARY	VII
THEORETISCHER TEIL	
1 EINLEITUNG	1
1.1 STRUKTUR DER DNA	1
1.2 FUNKTION DER DNA	3
1.3 SCHÄDIGUNG UND REPARATUR	4
2 ELEKTRONENTRANSFER IN DER DNA	5
2.1 EINFÜHRUNG	5
2.1.1 Ladungsinjektion	5
2.1.2 Detektion der Ladung	6
2.1.3 Das Hopping-Modell	8
2.1.4 Hopping über Adenin	10
2.2 AUFGABENSTELLUNG	15
2.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR BETEILIGUNG VON ADENIN AM LADUNGSTRANSFER	16
2.3.1 Superaustausch-Mechanismus	16
2.3.2 A-Hopping	18
2.3 ZUSAMMENFASSUNG	20
3 SCHÄDIGUNG DER DNA DURCH ACRIDIZINIUMSALZE	21
3.1 EINFÜHRUNG	21
3.1.1 Oxidative Schädigung von DNA	21
3.1.2 Singulett-Sauerstoff	24
3.1.3 Hydroxylradikale	30
3.1.4 Acridiziniumsalze	39
3.2 AUFGABENSTELLUNG	43
3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUM DNA-STRANGBRUCH DURCH ACRIDIZINIUMSALZE	44
3.3.1 Einfluss der Stranglänge	46
3.3.2 Kontrollexperimente	48
3.3.3 Vergleich von Einzel- und Doppelsträngen	50
3.3.4 Einfluss der Konzentration und des Verhältnisses von Acridiziniumsalz zu Basenpaar	52
3.3.5 Ursache der Schädigung unter aeroben und anaeroben Bedingungen	56
3.3.6 Einfluss der Sequenz	59
3.3.7 Weitere Beiträge zum aeroben und anaeroben Strangbruch	65
3.4 ZUSAMMENFASSUNG	72
3.5 AUSBLICK	74

EXPERIMENTELLER TEIL

4	GERÄTE UND MATERIALIEN	75
4.1	VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	75
4.2	LÖSUNGSMITTEL UND CHEMIKALIEN	76
4.3	ENZYME	77
4.4	OLIGONUKLEOTIDE UND DNA	77
4.5	PUFFERLÖSUNGEN	77
5	ÜBERSICHT ÜBER ALLE VERWENDETEN DNA-STRÄNGE	79
5.1	SEQUENZEN	79
5.2	ALLGEMEINE DATEN	80
5.3	SCHMELZPUNKTE	81
6	ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN	82
6.1	OLIGONUKLEOTIDE	82
6.1.1	Synthese	82
6.1.2	Reinigung	83
6.1.3	Massenbestimmung	83
6.1.4	Quantifizierung durch Absorption	84
6.1.5	Hybridisierung	85
6.1.6	Schmelzpunktbestimmung	85
6.1.7	Radioaktive Markierung	85
6.1.8	Piperidin- und Ammoniakspaltung	85
6.1.9	Maxam-Gilbert-Sequenzierung	86
6.2	PCR	87
6.3	BESTRAHLUNGEN	88
6.4	PAGE	100
6.4.1	Herstellen der Polyacrylamidgele	100
6.4.2	Beladen der Gele	100
6.4.3	Elektrophorese	101
6.5	QUANTIFIZIERUNG	102
6.5.1	Exponieren und Scannen	102
6.5.2	Auswertung	102
	LITERATURVERZEICHNIS	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	2'-Desoxyadenosin (Adenin im Text)
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Acrid	Acridiziniumsalz 85
APS	Ammoniumpersulfat
ber.	berechnet
Bp	Basenpaar(e)
C	2'-Desoxycytidin (Cytosin im Text)
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CPM	Zählungen pro Minute
d	Schichtdicke
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ϵ_{260}	Extinktionskoeffizient bei 260 nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Elektronentransfer
G	2'-Desoxyguanosin (Guanin in Strukturformeln und im Text)
G ^{ox}	oxidativ geschädigtes Guanin
G _E	Enolether
G*	4'-pivaloylmodifiziertes Guanosin
γ -ATP	Adenosintriphosphat mit radioaktiv markierter γ -Phosphatgruppe
h	Stunde(n)
h ν	Strahlung (Licht)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz

I	Intensität
k	Geschwindigkeitskonstante
kV	Kilovolt
λ	Wellenlänge
M	molar
m/z	Masse pro Ladung
MALDI-ToF MS	Matrizen unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol
min	Minute(n)
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mm	Millimeter
mM	millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
ns	Nanosekunde(n)
OD	optische Dichte
^{oxo} G	8-Oxo-2'-desoxyguanosin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMMA	Polymethylmethacrylat
pmol	Pikomol
R	Rest
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)

T	2'-Desoxythymidin (Thymin im Text)
T _{Kryostat}	am Kryostat eingestellte Temperatur
T _{Probe}	Temperatur der Probe
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>tert</i>	tertiär
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VIS	visuell
vs NHE	bezogen auf Standardwasserstoffelektrode
X	modifiziertes Nukleotid
X Y	Brücke (Sequenz) zwischen Donor und Akzeptor
z.B.	zum Beispiel

ZUSAMMENFASSUNG

Inhalt dieser Arbeit sind Untersuchungen zum Schädigungsprozess von DNA. Zuerst wurde der Mechanismus des Elektronentransfers näher untersucht, welcher auch von Bedeutung für Reparaturprozesse in der DNA ist (Kapitel 2). Dann wurde eine neue Klasse von photospaltenden Reagenzien (Acridiziniumsalze) untersucht, die DNA in An- und Abwesenheit von Sauerstoff effektiv spalten können (Kapitel 3). Der Mechanismus des aeroben und anaeroben Strangbruchs sollte aufgeklärt werden.

Der Elektronentransfer in DNA war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen. Es ist gelungen, zunächst konträre Ergebnisse über Reichweite und Geschwindigkeit des Ladungstransports durch ein neues Modell, das Hopping-Modell, zu erklären. Dabei wird angenommen, dass eine Ladung lange Strecken in der DNA zurücklegen kann, indem sie Guanine als Relaisstationen benutzt (Abb. A). Dafür dürfen die Guaninbasen nur durch wenige AT-Basenpaare (maximal drei) voneinander getrennt sein. So kann man den Gesamtladungstransport als Abfolge einzelner, reversibler Ladungstransferschritte zwischen Guaninen beschreiben. Diese sind stark distanzabhängig, da die Ladung zwischen Donor und Akzeptor tunnelt. Die Brücke (AT-Basenpaare) wird dabei nicht oxidiert oder reduziert. Dieser Prozess wird als Superaustausch-Mechanismus bezeichnet (Abb. A).

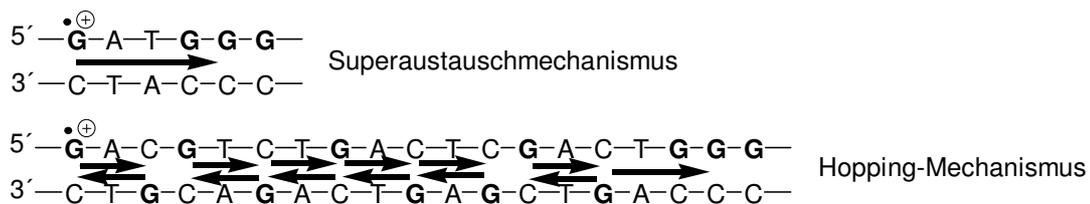


Abb. A Superaustauschmechanismus und Hopping-Mechanismus

Mit dem Hopping-Modell konnte jedoch nicht der Ladungstransfer über zehn oder mehr AT-Basenpaare erklärt werden. Deswegen wurde das A-Hopping-Modell entwickelt, bei dem angenommen wird, dass auch Adenin oxidiert wird und zum Ladungstransferprozess beiträgt (Abb. B).

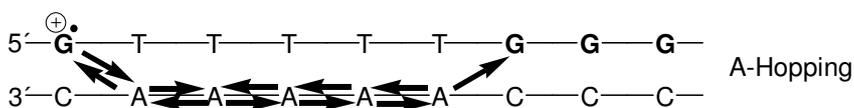


Abb. B A-Hopping

Um die Beteiligung von Adenin nachzuweisen, wurde der Elektronentransfer über zwei, drei und sieben AT-Basenpaare untersucht. Lediglich bei einer Distanz über sieben AT-Basenpaare (A-Hopping) wurde eine Beteiligung von Adenin beobachtet. Damit konnte bewiesen werden, dass Adenin am Ladungstransferprozess über mehrere AT-Basenpaare beteiligt ist und das Modell des A-Hoppings zutrifft. Über kurze Distanzen (zwei und drei AT-Basenpaare) dagegen wurde keine Oxidation von Adenin beobachtet (Superaustauschmechanismus). Weiterhin wurde eine starke Distanzabhängigkeit festgestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass entsprechend der Distanz zwischen Donor und Akzeptor und der Sequenz der Brücke der Elektronentransfer in der DNA über verschiedene Mechanismen ablaufen kann.

Acridiziniumsalze (Abb. C) sind eine neue Klasse von interkalierenden Farbstoffen, die nach photolytischer Anregung DNA-Strangbrüche in An- und Abwesenheit von Sauerstoff verursachen. Der Mechanismus des Strangbruchs unter aeroben und anaeroben Bedingungen sollte untersucht werden.

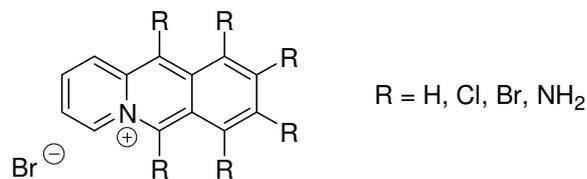


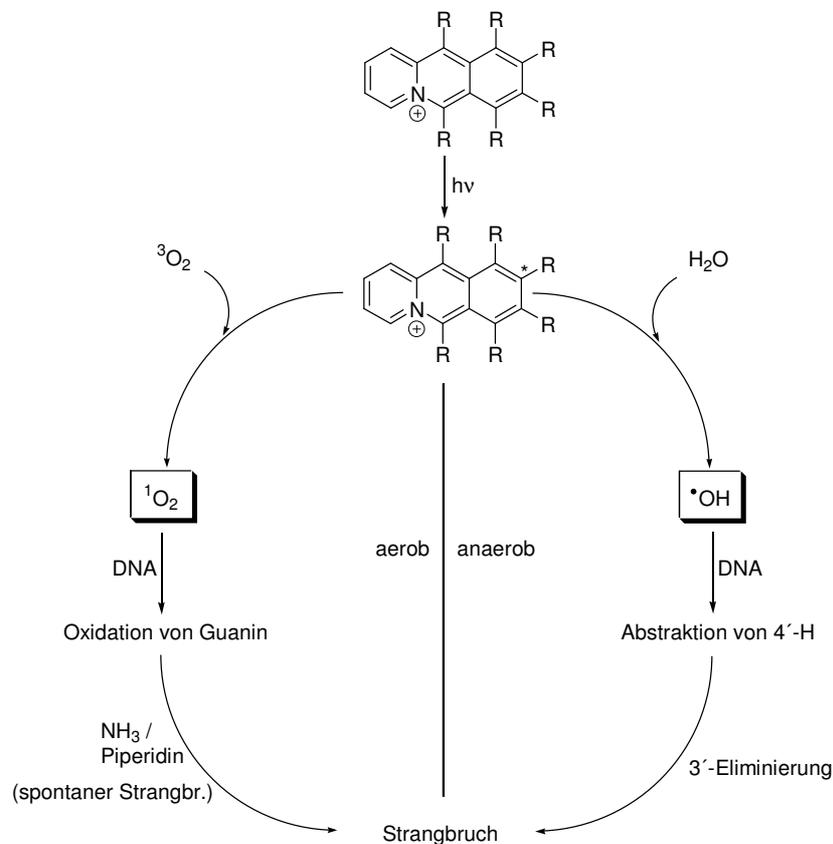
Abb. C Acridiziniumsalze

Durch Vergleich der Strangbruchraten langer und kurzer DNA-Stränge konnte festgestellt werden, dass die Länge des DNA-Strangs keinen Einfluss auf die Effektivität des Strangbruchs hat. Weiterhin wurde beobachtet, dass auch Einzelstränge durch Bestrahlung in Anwesenheit von Acridiziniumsalz geschädigt werden, unter anaeroben Bedingungen sogar effektiver als Doppelstränge. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Interkalation keine Voraussetzung für den Strangbruch ist.

Anhand von Piperidin- und Ammoniakspaltung des Photolysats konnte festgestellt werden, dass es unter aeroben Bedingungen auch zu Schädigungen in Form von alkalilabilen Modifikationen kommt. Unter anaeroben Bedingungen dagegen konnte keine Zunahme des Strangbruchs durch Alkalibehandlung beobachtet werden. Damit waren zwei verschiedene Mechanismen in An- und Abwesenheit von Sauerstoff wahrscheinlich.

Bestrahlungen mit geeigneten Zusätzen (NaN_3 , D_2O , *tert*-Butylalkohol) führten zu dem Schluss, dass Singulett-Sauerstoff unter aeroben Bedingungen und Hydroxylradikale unter anaeroben Bedingungen die reaktiven Spezies sind. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss der Nucleobasen bzw. der Sequenz untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass unter aeroben Bedingungen Strangbrüche und alkalilabile Modifikationen ausschließlich an Guanin auftraten. Je höher der Guanin-Gehalt des Stranges ist, desto effektiver wurde er gebrochen. Unter anaeroben Bedingungen dagegen konnte keine Sequenzselektivität festgestellt werden. Dies waren weitere Indizien für Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale als reaktive Spezies, da von Singulett-Sauerstoff bekannt ist, dass er ausschließlich mit Guanin reagiert, während Hydroxylradikale aufgrund ihrer hohen Reaktivität unselektiv reagieren.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht die Acridiziniumsalze direkt mit der DNA reagieren und so Schädigungen verursachen. Stattdessen generieren sie nach photolytischer Anregung unter aeroben Bedingungen Singulett-Sauerstoff aus dem gelösten Sauerstoff. Unter anaeroben Bedingungen reagieren die angeregten Acridiziniumsalze mit Wasser unter Ausbildung von Hydroxylradikalen. Diese beiden reaktiven, oxidierenden Spezies sind für die beobachteten spontanen Strangbrüche und oxidativen Schädigungen verantwortlich (Schema A).



Schema A Reaktionen der Acridiziniumsalze unter aeroben und anaeroben Bedingungen

SUMMARY

The aim of this work was to investigate DNA damage. One area of interest was the mechanism of electron transfer which is important for repair processes, while the second topic of investigation was the breakage of DNA strands caused by a new class of photocleaving reagents (acridinium salts) in the presence and absence of oxygen. The mechanism of the aerobic and anaerobic cleavage was to be examined.

The mechanism of electron transfer in DNA has been widely debated in recent years. It was possible to explain the contradictory results regarding the range and rate of the electron transfer by a new model: the hopping model. In this model it is assumed that a charge can travel great distances in DNA by hopping between guanine bases (figure A). This is only possible if the distance between the guanine bases is less than four AT base pairs. The total charge transport is considered to be a sequence of single, reversible transfer steps between guanine bases, and these steps are highly distance dependent since the charge is tunnelling between donor and acceptor. The bridge (AT base pairs) is not oxidized or reduced in this process. It is characterized as a super exchange mechanism (figure A).

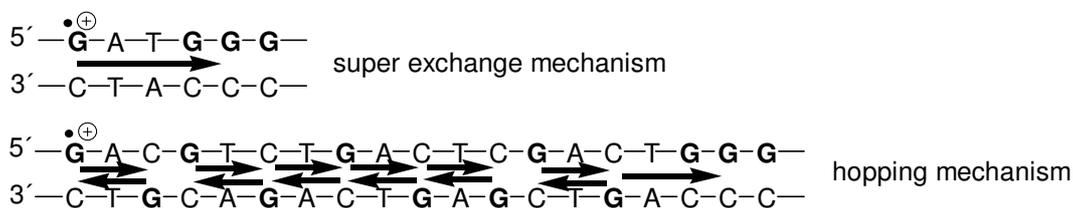


Figure A Super exchange mechanism and hopping mechanism

With the hopping model that has been proposed, it was not possible to explain the electron transfer via ten or more AT base pairs with no guanine bases inbetween. Therefore a new model was developed which takes into consideration the oxidation of adenine. In this A-hopping model it is assumed that adenine contributes directly to the charge transport process (figure B).

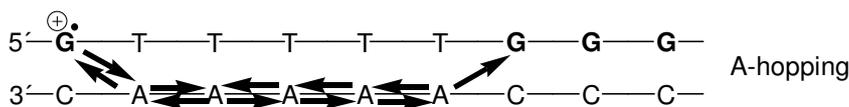


Figure B A-hopping

To prove the participation of adenine in the charge transport process, the electron transfer via two, three and seven AT base pairs was investigated. Over a distance of seven AT base pairs (A-hopping) adenine participation could be detected. Therefore it was concluded that over long distances, adenine is oxidized and contributes to the charge transport process. For short distances (two or three AT base pairs) no such oxidation or participation could be detected due to the tunnelling of the charge (super exchange mechanism) and a high distance dependence was observed.

Therefore it was shown that the charge transport can occur via different mechanisms, depending on distance and base sequence.

Acridicinium salts (figure C) are a new class of DNA intercalating dyes which are able to cleave DNA strands upon photolytic excitation in the presence and absence of oxygen. The aim of this part of the work was to investigate the mechanism of cleavage under aerobic and anaerobic conditions.

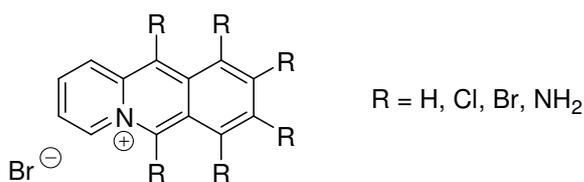


Figure C Acridicinium salts

By comparing the rate of strand breakage of long and short DNA strands, it was found that the length of the DNA strand does not affect the degree to which DNA is damaged by acridicinium salts. Furthermore, it was observed that single strands are also cleaved upon irradiation in the presence of acridicinium salts. Under anaerobic conditions the cleavage of single strands was even more effective than that of double strands. Hence, intercalation is not required for DNA strand cleavage.

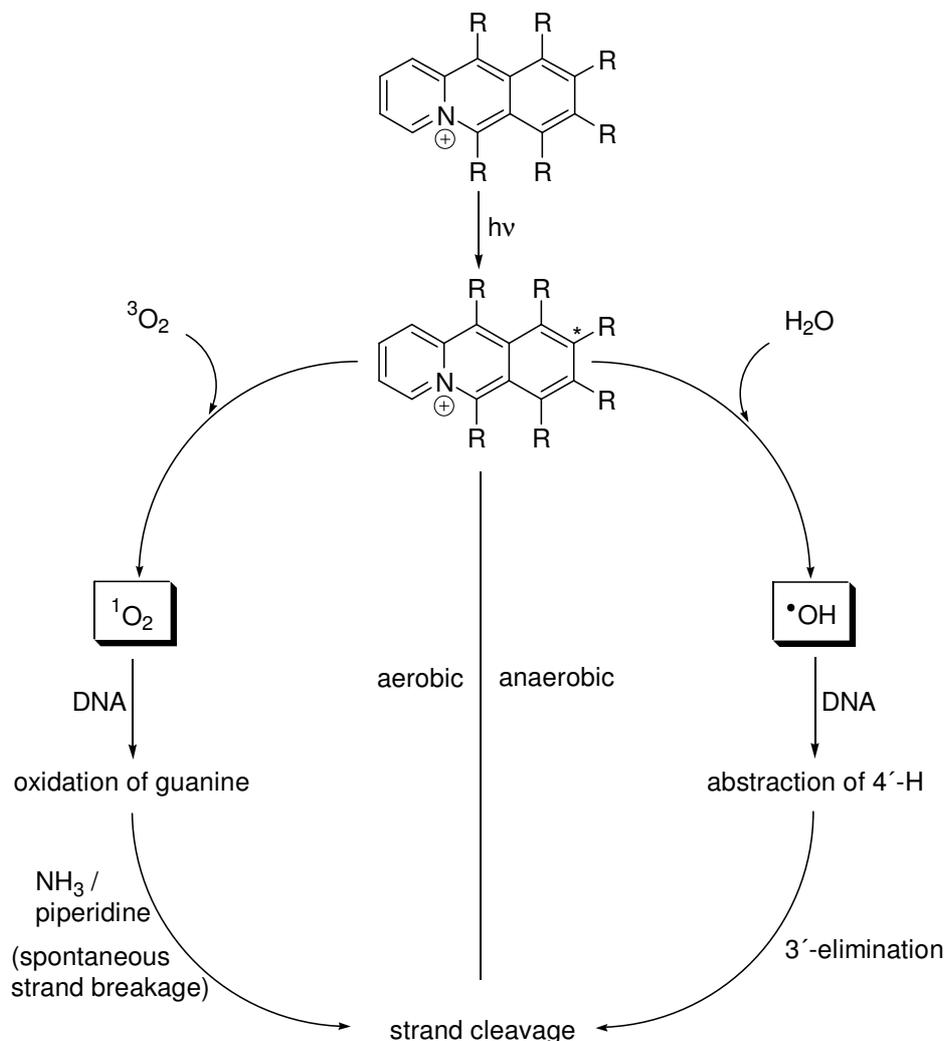
When the DNA was treated with ammonia or piperidine after irradiation, additional strand breakage was observed under aerobic conditions which was due to alkali labile modifications. Under anaerobic conditions none of these modifications could be detected. Consequently, it was proposed that two different mechanisms were involved.

Irradiation in the presence of suitable additives (NaN_3 , D_2O , *tert*-butyl alcohol) led to the assumption that singlet oxygen and hydroxyl radicals are the reactive species under aerobic and anaerobic conditions respectively. For further confirmation, the influence of the nucleotides or

the DNA sequence was investigated. It was found that in the presence of oxygen damage occurred exclusively at the guanine bases. The more guanines the DNA strand contained the more effective was the damage. On the other hand the damage under anaerobic conditions occurred at all nucleotides without any preference. Since singlet oxygen is known for its G selective reactions and hydroxyl radicals are known for their high reactivity and lack of selectivity, this result added proof to the theory of these two species being responsible for the DNA damage.

Thus, it could be shown that acridinium salts do not react with the DNA directly but generate reactive oxygen species upon photolytic excitation. Under aerobic conditions singlet oxygen is generated from oxygen dissolved in the aqueous solution. Under anaerobic conditions the reaction of activated acridinium salt results in hydroxyl radicals.

These two reactive oxygen species are responsible for the observed strand breaks and oxidative damage (scheme A).



Scheme A Reactions of acridinium salt under aerobic and anaerobic conditions

THEORETISCHER TEIL

1 EINLEITUNG

1.1 STRUKTUR DER DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist die Trägerin der gesamten genetischen Information aller Lebewesen. Dabei reichen ihr vier verschiedene Bausteine aus, um alle Erbinformationen zu speichern.

Den entscheidenden Hinweis auf die Bewältigung dieser komplexen Aufgabe fanden Watson und Crick 1953, indem sie die Struktur der nativen DNA durch Röntgenbeugung aufklärten.^[1-4]

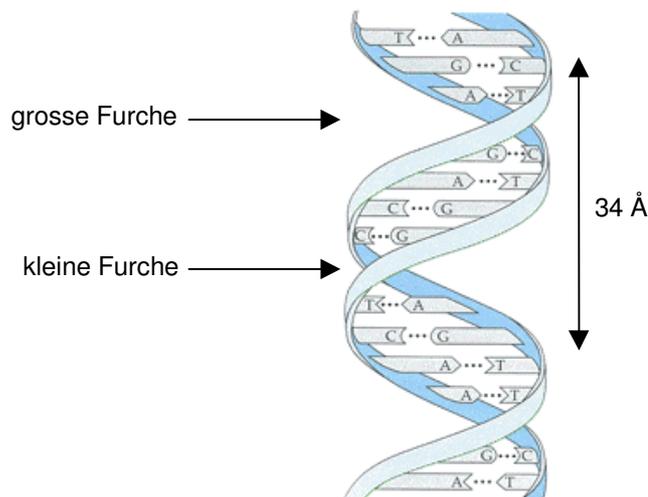


Abb. 1 DNA-Doppelhelix

Zwei Polynukleotidketten sind entgegengesetzt um eine gemeinsame Achse gewunden und ergeben so eine rechtsgängige Doppelhelix (Abb. 1). Dabei bilden Desoxyribosen und Phosphatgruppen das strukturelle Rückgrat, während Purin- bzw. Pyrimidinbasen die Speicherung der Erbinformationen ermöglichen. Diese Basen sind mit der Zuckereinheit N-glykosidisch verknüpft und zeigen ins Innere der Helix, wo jeweils eine Purin- mit einer Pyrimidinbase durch Wasserstoffbrücken verbunden ist. Diese spezifische Basenpaarung zwischen Adenin (A) und Thymin (T) bzw. Guanin (G) und Cytosin (C) bildet die molekulare Grundlage der Genetik (Abb. 2).^[5]

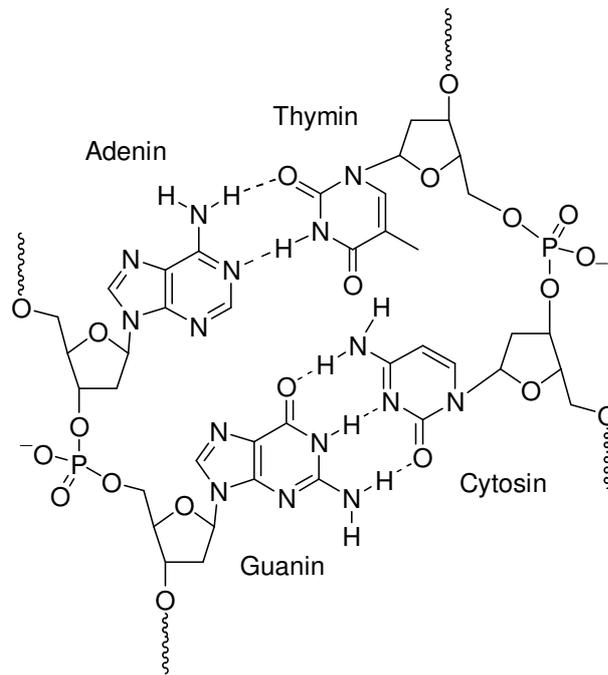


Abb. 2 spezifische Basenpaarung

Die Basen haben bei der nativen Form, der B-DNA, einen Abstand von 3.4 \AA und sind um 36° gegeneinander verdreht.^[6] Daraus resultiert alle zehn Basenpaare eine Windung in der Helix. Allerdings gibt es noch andere Formen der DNA als die von Watson und Crick beschriebene.^[6-10] Dabei kann z.B. die Helixachse gebogen oder benachbarte Basenpaare gegeneinander geneigt sein. Auch die Basen eines Basenpaares können gegeneinander verdreht sein. Diese Propellerverdrehung ermöglicht eine kompaktere Stapelung der Basen und trägt damit zur Stabilität bei.^[11]

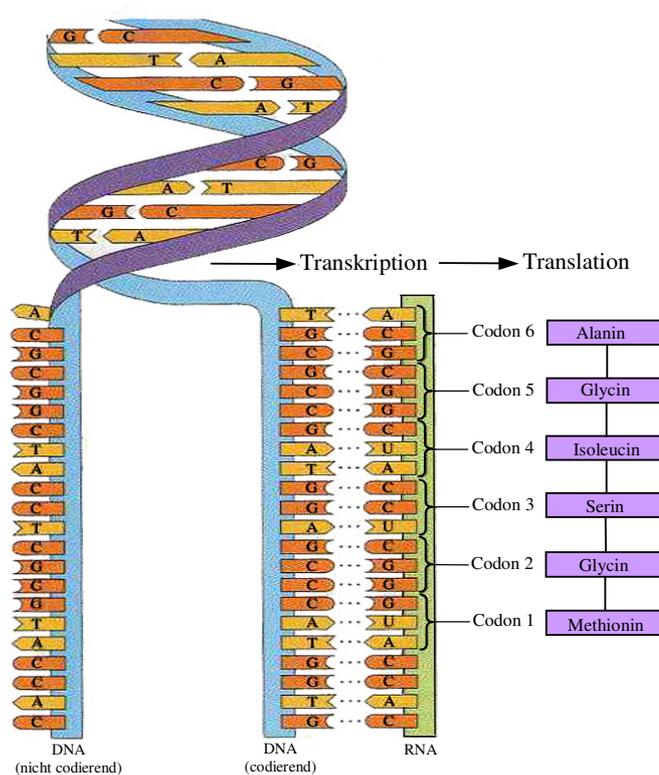
1.2 FUNKTION DER DNA

Die Information über Struktur und Funktion eines Proteins, d.h. die Sequenz der Aminosäuren, ist in der DNA enthalten. Der entsprechende codierende Bereich wird als Gen bezeichnet.

Kommt es zur Expression eines Gens, wird zuerst eine Kopie der DNA in Form von Ribonukleinsäure (RNA) angefertigt (Schema 1). Diesen Prozess bezeichnet man als Transkription. Die RNA ähnelt der DNA stark in Aufbau und Struktur, die RNA enthält aber Ribose statt Desoxyribose und Uracil statt Thymin.^[12]

Jeweils drei Basen der RNA bilden ein Codon für eine Aminosäure. So kann anhand der Sequenz der DNA bzw. der RNA ein Protein korrekt aufgebaut werden (Schema 1). Diese sogenannte Translation findet in den Ribosomen statt.^[12-14]

Damit ist die spezifische Basenpaarung Voraussetzung für den korrekten Aufbau eines Proteins.



Schema 1 Transkription und Translation

1.3 SCHÄDIGUNG UND REPARATUR

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, ist in der Sequenz der DNA die gesamte Information über Aufbau und Funktion der Zellen enthalten. Kommt es zu einer Schädigung der Basen kann dies weitreichende Folgen haben.

Wird beispielsweise eine Base falsch eingebaut oder nicht korrekt erkannt, kann das entsprechende Protein bei der Translation unvollständig oder nur fehlerhaft aufgebaut werden. Mögliche Folgen sind der Zelltod oder die Bildung von Tumorzellen.

Entsprechende Schädigungen in der DNA können durch physikalische Einflüsse wie beispielsweise ionisierende Strahlung^[15] oder durch chemische Einflüsse verursacht werden. So kann eine Vielzahl von Reagenzien in Form von Oxidationen, Additionen oder Alkylierungen mit den Basen reagieren.^[16-18]

Vor allem in den letzten Jahren hat der sogenannte oxidative Stress vermehrt an Bedeutung gewonnen.^[19] Reaktive Sauerstoffspezies wie beispielsweise das Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$), das Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) oder Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) können die Basen oxidieren.^[20]

Besonders anfällig dafür ist Guanin, da es das niedrigste Oxidationspotential der vier Nukleobasen besitzt (1.29 V vs NHE).^[21,22] Auf diese Art der Schädigung soll im dritten Kapitel dieser Arbeit näher eingegangen werden.

Eine Zwischenstufe bei der Oxidation von Guanin ist das langlebige Guaninradikalkation. Dieses kann durch einen exergonischen Elektronentransfer von einer entfernten GG- oder GGG-Einheit repariert werden. Solche leicht oxidierbaren Einheiten befinden sich an den Enden eukaryontischer Chromosomen, den Telomeren.^[23,24] Diese sind nicht kodierend und bestehen aus einer einfachen, sich viele Male wiederholenden Sequenzabfolge (TTAGGG in menschlichen Zellen).^[25] Es wird vermutet, dass die telomere DNA eine Art kathodischen Schutz vor Oxidationen in kodierenden Regionen bildet.

Aufgrund der oben beschriebenen Struktur der DNA wurde lange spekuliert, ob durch die σ -Überlappung von π -Orbitalen benachbarter Basen eine entsprechende elektronische Leitung möglich sei.^[26,27] In den letzten Jahren konnte dann gezeigt werden, dass in der DNA Elektronen über große Entfernungen transportiert werden können.^[28-34]

Nähere Untersuchungen zum Mechanismus des Elektronentransfers sind Gegenstand des zweiten Kapitels dieser Arbeit.

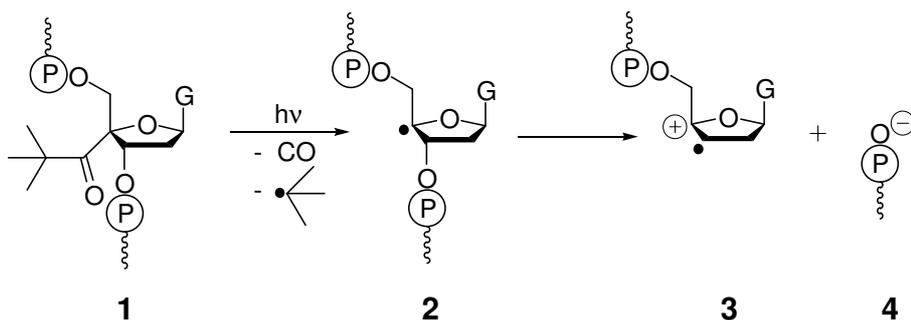
2 ELEKTRONENTRANSFER IN DER DNA

2.1 EINFÜHRUNG

2.1.1 LADUNGSINJEKTION

Um Elektronentransfer in der DNA zu untersuchen, muss zuerst eine Ladung im DNA-Doppelstrang erzeugt werden. Darum soll in diesem Kapitel die Ladungsinjektion beschrieben werden.

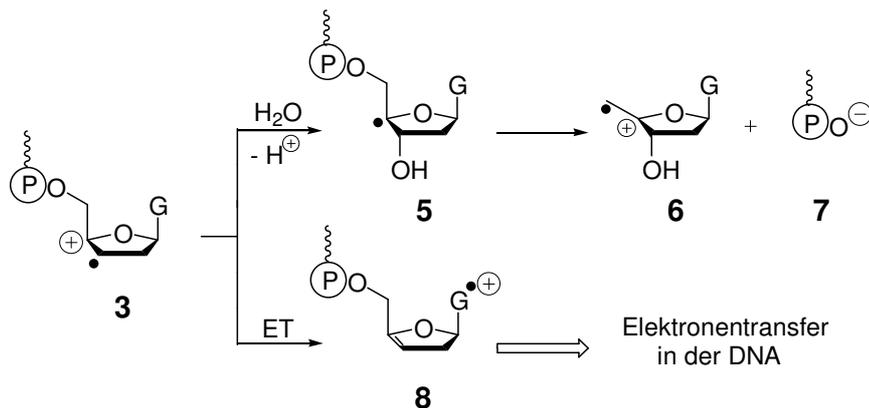
Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde zur Ladungsinjektion ein 4'-pivaloylmodifiziertes Guanosin (G^*) **1** verwendet, das von M. Spormann synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut wurde.^[35] Daraus kann durch Photolyse das 4'-Riboseradikal **2** nach Norrish I erzeugt werden, aus welchem dann durch Heterolyse das Radikalkation **3** entsteht (Schema 2).



Schema 2 Photolyse des G^* **1**

Das Radikalkation **3** kann nun unter anaeroben Bedingungen auf zwei mögliche Arten weiterreagieren (Schema 3):

- 1) Durch Reaktion mit Wasser als Nukleophil und anschließende β -Eliminierung entsteht das 3'-Phosphat **7**.
- 2) Durch Elektronentransfer von einem geeigneten Elektronendonator (in diesem Fall die Nukleobase Guanin) wird der Enolether **8** gebildet.



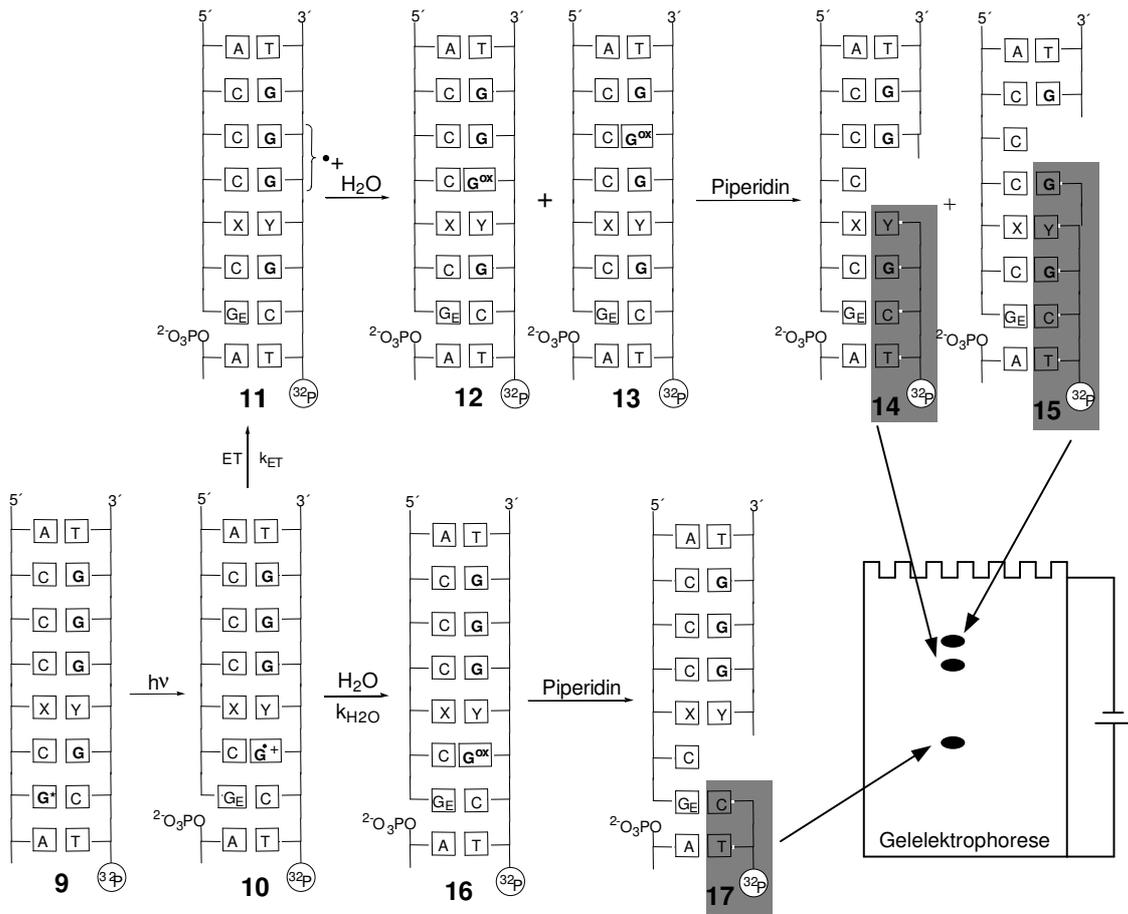
Schema 3 Reaktionen des Radikalkations **3**

M. Spormann zeigte anhand von Photolyseexperimenten, dass der Enolether **8** in 83 % Ausbeute entsteht.^[35] Für den Elektronentransfer wurde eine Geschwindigkeitskonstante $> 5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ bestimmt.^[35] Sie ist damit um eine Größenordnung schneller als die der konkurrierenden Wasserreaktion.^[36]

2.1.2 DETEKTION DER LADUNG

Eine Methode zur quantitativen Untersuchung des Elektronentransfers wurde von E. Meggers im Rahmen seiner Doktorarbeit entwickelt.^[37] Als Ladungsakzeptor wird in alle DNA-Stränge eine GGG-Einheit eingebaut. Diese GGG-Einheit ist leichter oxidierbar als ein einzelnes Guanin und bildet damit die thermodynamische Triebkraft für den Ladungstransfer.^[38]

Im ersten Schritt entsteht durch Photolyse das Guaninradikalkation **8**. Da es bei dieser Ladungsinjektion zu einem Strangbruch kommt (vgl. Schema 2 und 3), wird die Ladung aus praktischen Gründen in einem kurzen Elektronentransferschritt auf ein benachbartes Guanin im Gegenstrang übertragen (**9** \rightarrow **10**). Dieser Gegenstrang ist am 5'-Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert (Schema 4). Es kann nun die Wasseraddition (**10** \rightarrow **16**) oder Elektronentransfer zur GGG-Einheit eintreten (**10** \rightarrow **11**). Das Verhältnis von Wasserabfangreaktion zu Elektronentransfer ist abhängig von der Geschwindigkeit des Elektronentransfers und damit von Länge und Sequenz der Brücke (Schema 4).



Schema 4 Bestimmung der Ladungstransfergeschwindigkeit durch Quantifizierung der Produkte

Durch Piperidinspaltung kommt es an den oxidativ geschädigten Guaninen der DNA-Stränge **12**, **13** und **16** zum Strangbruch und es entstehen die entsprechend verkürzten Stränge **14**, **15** und **17**. Diese werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar und quantifizierbar gemacht. Da es sich beim Elektronentransfer und bei der Wasseraddition um Reaktionen erster bzw. pseudo-erster Ordnung handelt, ist das Verhältnis von Ladungstransfergeschwindigkeit k_{ET} und Wasseradditionsgeschwindigkeit k_{H_2O} proportional zum Produktverhältnis von (**14** + **15**) zu **17**. Dieser Sachverhalt wird durch Gleichung (1) beschrieben.

$$k_{rel} = \frac{k_{ET}}{k_{H_2O}} \propto \frac{14 + 15}{17} \quad (1)$$

Der Quotient aus k_{ET} und k_{H_2O} ist die relative Ladungstransfergeschwindigkeit k_{rel} . So ermöglicht die Detektion der oxidativ geschädigten Produkte eine quantitative Angabe über die Geschwindigkeit des Ladungstransports.

2.1.3 DAS HOPPING-MODELL

Die Fähigkeit der DNA, elektrische Ladungen zu leiten, war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen. Diese führten jedoch teilweise zu Ergebnissen, die kontrovers diskutiert wurden, vor allem in Bezug auf Mechanismus, Reichweite und Geschwindigkeit des Elektronentransfers.^[39-42]

Die Geschwindigkeitskonstante k_{ET} wird durch die Markus-Levich-Jortner-Gleichung (2) beschrieben, in der sie exponentiell von der Donor-Akzeptor-Distanz Δr abhängt.^[43,44]

$$k_{ET} \propto e^{-\beta \Delta r} \quad (2)$$

Dabei beschreibt der Parameter β wie stark die Elektronentransfergeschwindigkeit von der Distanz abhängt. β ist also ein direktes Maß für die Fähigkeit eines Mediums, den Elektronentransfer zu unterstützen. So können Orbitale des überbrückenden Mediums in elektronische Wechselwirkung mit denen des Donors und Akzeptors treten, wenn sie energetisch tief genug liegen. Ist dies der Fall kommt es zu einer erhöhten elektronischen Kopplung zwischen Donor und Akzeptor. Dadurch sinkt die Distanzabhängigkeit des Ladungstransports, man spricht von einem Superaustausch-Mechanismus.^[45]

Von verschiedenen Forschungsgruppen wurden jedoch unterschiedlich starke Distanzabhängigkeiten in DNA beobachtet. So konnte von Barton *et al.* Elektronentransfer über 26 Å beobachtet werden, dessen Effizienz sich als kaum distanzabhängig erwies.^[46-48] Dagegen ergaben Untersuchungen von Lewis *et al.* und Tanaka *et al.* eine starke Distanzabhängigkeit mit β -Werten von 0.64 Å⁻¹ bzw. 1.4 Å⁻¹.^[49,50] Demnach sollte der Elektronentransfer nur von kurzer Reichweite sein. Diese Diskrepanz ließ sich teilweise durch Arbeiten von Giese *et al.* erklären. So beobachtete E. Meggers eine starke Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers über AT-Basenpaare, entsprechend den Ergebnissen von Lewis *et al.* und Tanaka *et al.*. Wurde jedoch die AT-Brücke in kurzen Abständen durch GC-Basenpaare unterbrochen, konnte ein Elektronentransfer über 54 Å beobachtet werden (Abb.3).^[30,37]

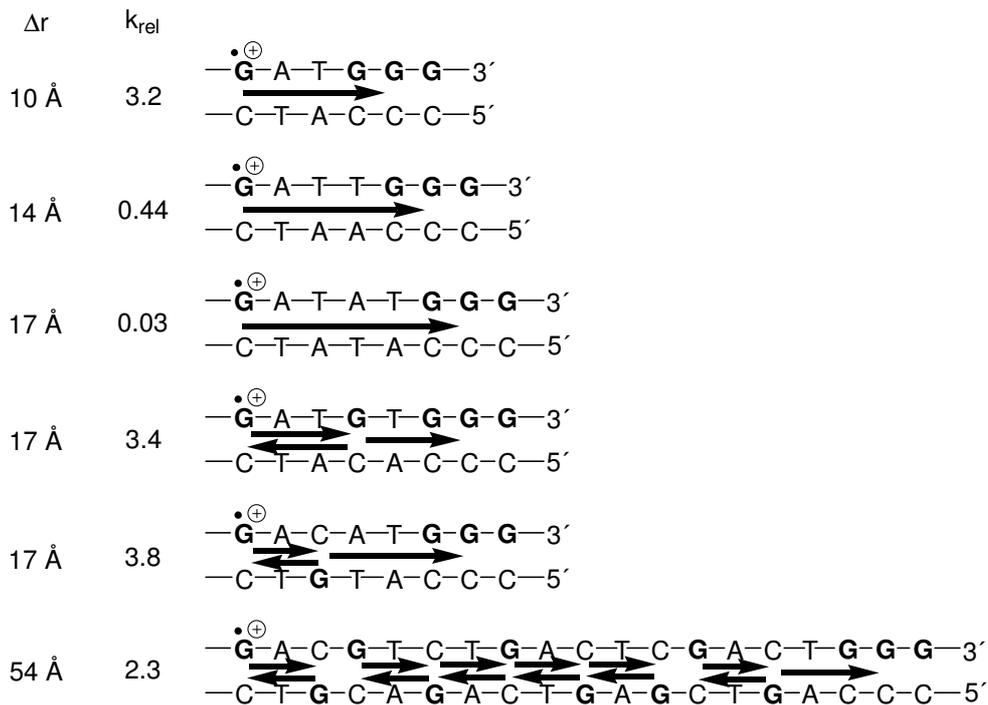


Abb. 3 Effizienz des Ladungstransports über verschiedene Distanzen

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Hopping-Modell entwickelt, das den Gesamtladungstransport als Abfolge einzelner, reversibler Ladungstransferschritte zwischen Guaninbasen beschreibt. Diese Ladungstransferschritte bleiben weiterhin stark distanzabhängig, so dass der Schritt über die längste Distanz wie ein Flaschenhals wirkt. Sind jedoch die Guaninbasen nur durch wenige AT-Basenpaare voneinander getrennt, ist ein Ladungstransfer über große Distanzen möglich (Abb. 3). Damit spielt nicht mehr nur die Distanz zwischen Donor und Akzeptor eine Rolle, sondern auch die Sequenz.

Physikalisch kann man den Hopping-Mechanismus als eindimensionale Zufallsbewegung (random walk) betrachten. Die Geschwindigkeitskonstante des Ladungstransports über äquidistante Hopping-Schritte wird mathematisch durch die Random-Walk-Theorie (3) beschrieben.^[31,36]

$$k_{\text{ET}} \propto k_{\text{HOP}} \times N^{-\eta} \quad (3)$$

Dabei ist k_{HOP} die Geschwindigkeitskonstante des einzelnen Hopping-Schritts und k_{ET} die des Gesamtprozesses. Mit $\eta = 1-2$ ^[31] ergibt sich eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Anzahl der einzelnen Hopping-Schritte N und damit ein wesentlich geringerer Einfluss der Distanz gegenüber dem reinen Superaustausch-Mechanismus.

Durch das von Giese *et al.* entwickelte Hopping-Modell ließen sich nun die bisher konträren Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen erklären anhand der Annahme zweier verschiedener Mechanismen die am Elektronentransfer beteiligt sind: der stark distanzabhängige Superaustausch und der mehrstufige Hoppingprozess.

Obwohl ein mehrstufiger Prozess mittlerweile von den meisten Arbeitsgruppen akzeptiert wird,^[51-55] existieren noch andere Modelle für den Elektronentransfer bzw. Verfeinerungen des oben beschriebenen Hoppingprozesses:

So wurde von Saito *et al.* ein Einfluss auf das Redoxpotential von GC-Basenpaaren durch benachbarte Basen gefunden, was zu Unterschieden bei äquidistanten Hopping-Schritten verschiedener Sequenzen führen kann.^[38]

Nach Schuster *et al.* ist die positive Ladung in der DNA über einen bestimmten Bereich delokalisiert, beschrieben als "phononunterstützter Polaron-Hopping-Prozess".^[56]

Jortner *et al.* konnten zeigen, dass aufeinanderfolgende Thymin im gleichen Strang einen effizienteren Elektronentransfer erlauben als gemischte AT-Sequenzen.^[57]

2.1.4 HOPPING ÜBER ADENIN

Trotz der Entwicklung des Hopping-Modells konnte nicht erklärt werden, warum Barton *et al.* Ladungstransfer über zehn AT-Basenpaare beobachten konnte.^[55]

Auch von Schuster *et al.* war mittlerweile über einen effizienten Ladungstransfer über fünf AT-Basenpaare berichtet worden,^[56] obwohl nach Gleichung (1) ein Elektronentransfer über mehr als vier AT-Basenpaare zu langsam sein sollte unter Annahme eines β -Wertes von 0.7 \AA^{-1} .^[29,49]

Ein einfacher Guanin-Hopping-Prozess konnte dieses Phänomens nicht mehr erklären. Deswegen wurde eine neue Theorie entwickelt, die die Oxidation von Adenin berücksichtigt. Dabei wird angenommen, dass in langen AT-Sequenzen (vier oder mehr aufeinanderfolgende AT-Basenpaare) ein Adenin vom Guaninradikalkation oxidiert wird und der Ladungstransport dann über mehrere Einzeltransferschritte zwischen den Adeninen stattfindet (Abb. 4). Dieser Prozess wird als A-Hopping bezeichnet.^[35,58,59]



Abb. 4 Ladungstransfer durch A-Hopping

Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist dabei die Oxidation des ersten Adenins durch das Guaninradikalkation. Dieser Prozess ist aufgrund des höherliegenden Oxidationspotentials von Adenin (1.42 V vs NHE gegenüber 1.29 V vs NHE für Guanin)^[21,22] endotherm. Er kann aber trotzdem stattfinden, wenn die Wasserabgangsreaktion am Guaninradikalkation energetisch ungünstig und damit sehr langsam ist.^[60] Der Ladungstransfer zwischen den Adeninen erfolgt dagegen mit großer Geschwindigkeit, da er thermoneutral ist. Dies lässt sich durch eine Curtin-Hammett-Situation beschreiben (Abb. 5).^[60]

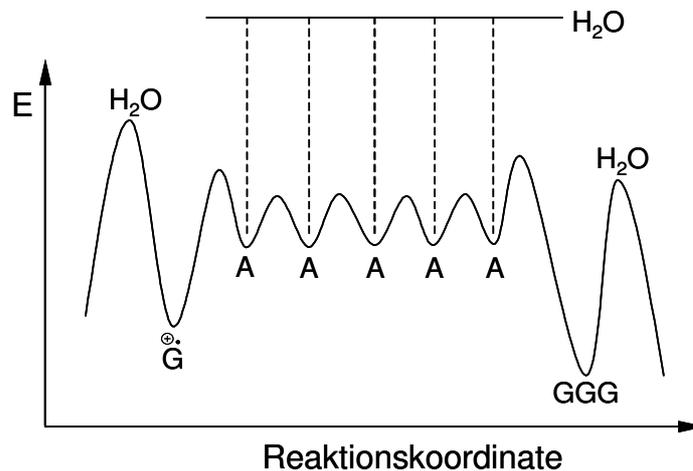


Abb. 5 Curtin-Hammett-Darstellung des Ladungstransfers über fünf Adenine

Um dieses Erklärungsmodell zu überprüfen, wurden von M. Spormann Doppelstränge mit verschiedenen langen AT-Sequenzen untersucht (Tabelle 1).^[35,59]



	Sequenz (X und Y)	n	k_{rel}
18	T A	1	≥ 250
19	TT AA	2	32 ± 3
20	TTT AAA	3	4.0 ± 0.6
21	TTTT AAAA	4	3.4 ± 0.3
22	TTTTT AAAAA	5	3.0 ± 0.6
23	TTTTTTT AAAAAAA	7	2.5 ± 0.5
24	TTTTTTT AAAAAAA	8	2.4 ± 0.3
25	TTTTTTTTTTTTTTTTT AAAAAAAAAAAAAAAAA	16	2.3 ± 0.3

Tabelle 1 Ergebnisse des Ladungstransports über verschieden lange AT-Sequenzen

Die Ergebnisse untermauern die oben aufgestellte Theorie. Über kurze Abstände (ein bis drei AT-Basenpaare) gilt der Superaustausch-Mechanismus, d.h. die Effizienz des Ladungstransports ist stark abhängig von der Donor-Akzeptor-Distanz. Ab einer Distanz von vier oder mehr AT-Basenpaaren verstärkt sich der Einfluss des A-Hoppings. Der Elektronentransfer ist nur schwach distanzabhängig, da die einzelnen A-Hopping-Schritte sehr schnell erfolgen.

Es kommt also zum Wechsel des Mechanismus abhängig von der Anzahl der überbrückenden AT-Basenpaare (Abb. 6). Durch diesen Wechsel kann der viel diskutierte Widerspruch zwischen starker und schwacher Distanzabhängigkeit des Ladungstransports erklärt werden.

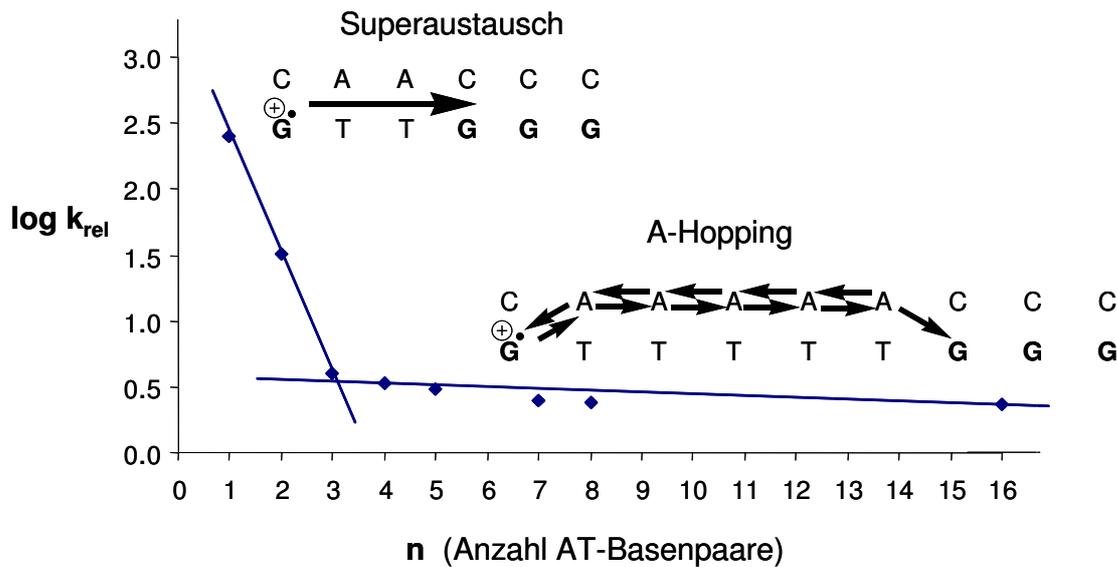


Abb. 6 Wechsel des Mechanismus beim Ladungstransfer

Eine weitere Möglichkeit zur Bestätigung des A-Hopping ist die explizite Untersuchung der Beteiligung von Adenin am Ladungstransport. So dürfte bei kurzen AT-Sequenzen keine Beteiligung der Adenin-Basen zu beobachten sein (Superaustausch-Mechanismus). Bei langen Sequenzen dagegen sollte deren Beteiligung sichtbar sein (A-Hopping), entsprechend des oben beschriebenen Mechanismus-Wechsels.

Von Spormann wurden deshalb auch zwei Doppelstränge gemischter Sequenzen synthetisiert und untersucht (Tabelle 2).^[35]



Sequenz (X und Y)	n	k _{rel}
22 TTTT AAAA	5	3.0 ± 0.6
26 TTATT AATAA	5	2.8 ± 0.4
27 TATAT ATATA	5	1.4 ± 0.3

Tabelle 2 Elektronentransfer in Strängen gemischter Sequenz (26, 27)

Erkennbar ist, dass die Effizienz des Gesamtladungstransfers nur wenig durch Interstrang-Ladungstransfer beeinträchtigt wird. Darüberhinaus konnte aber nur eine schwache Schädigung am Adenin beobachtet werden (< 10%). Dies kann einerseits auf eine schwache Beteiligung des

Adenins am Ladungstransport hinweisen. Andererseits kann es aber auch so interpretiert werden, dass die Wasserabfangsreaktion beim Adenin nur wenig effizient ist, da der Ladungstransport zwischen den einzelnen Adeninen sehr schnell erfolgt.

Der konkrete Nachweis über die Beteiligung von Adenin konnte nicht erbracht werden.

2.2 AUFGABENSTELLUNG

Mit der Erweiterung des Hopping-Modells durch das A-Hopping konnte nun erstmals Ladungstransfer über kurze und lange AT-Brücken erklärt werden. Dabei konnte aber bisher die Beteiligung des Adenins nicht nachgewiesen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die Beteiligung der Adeninbasen am Elektronentransfer in der DNA zu untersuchen. Durch Wahl geeigneter Sequenzen sollten weitere Erkenntnisse zu den verschiedenen Mechanismen gefunden werden (Tabelle 3).

5'-ACGCACGTCGCATAATATTAC **GXGGG**TATTATATTACGC-3' **28-31**
 3'-TGCGTGCAGCGTATTATAATG***CYCCC**ATAATATAATGCG-5'

	Sequenz (X und Y)	n	Mechanismus
28	TA AT	2	Superaustausch
29	TAT ATA	3	Superaustausch
30	TTTATTT AAATAAA	7	A-Hopping
31	TATATAT ATATATA	7	A-Hopping

Tabelle 3 zu untersuchende Stränge gemischter Sequenz (**28-31**)

Die in Tabelle 3 gezeigten Doppelstränge mit gemischten AT-Brücken sollten hergestellt und untersucht werden. Sie entsprechen in der Sequenz denen von M. Spormann (**18-27**, s. Tabelle 1 und 2), nur die Brücke zwischen Donor (GGG) und Akzeptor (G^{•+}) wurde variiert.

Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl der Bereich des Superaustausch-Mechanismus (n = 2, 3) als auch der Bereich des A-Hoppings (n = 7) abgedeckt werden.

Mit diesen Strängen sollte die Beteiligung von Adenin am Ladungstransfer gezielt untersucht werden.

2.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR BETEILIGUNG VON ADENIN AM LADUNGSTRANSFER

Die Doppelstränge (Tabelle 3) wurden in pH5-Citratpuffer gelöst und mit einer Quecksilberhochdrucklampe bei $\lambda \geq 320$ nm bestrahlt. Wie oben beschrieben entsteht dabei aus dem pivaloylmodifizierten Guanosin (G^*) durch radikalinduzierten Strangbruch das Guaninradikalkation ($G^{\bullet+}$). Dieses wird aus analytischen Gründen in den radioaktiv markierten Gegenstrang gebracht, wo dann der Elektronentransfer über die AT-Basenpaare beobachtet werden kann (vgl. Schema 4).

Um Hintergrundschädigungen auszuschließen, wird ein Blindexperiment unter exakt den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dazu wird ein unmodifizierter Doppelstrang verwendet, d.h. statt einem G^* ist ein unmodifiziertes G vorhanden. Dadurch kommt es nicht zu einer Ladungsinjektion sondern lediglich zu allgemeiner Schädigung durch UV-Licht bei der Bestrahlung. Bei der späteren Auswertung werden die daraus resultierenden Bandenintensitäten von denen des Experiments subtrahiert. Bei allen im Folgenden dargestellten Histogrammen handelt es sich um die Differenz aus Experiment und Blindprobe, so dass nur Schädigung zu sehen ist, die durch Ladungstransfer verursacht wird.

Die Histogramme entstehen durch Integration entlang der Gelbanden mithilfe des Software-Programmes ImageQuant[®].

2.3.1 SUPERAUSTAUSCH-MECHANISMUS

Zuerst sollte überprüft werden, ob im Superaustausch-Mechanismus tatsächlich keine Beteiligung von Adenin zu sehen ist. Dazu wurden die Stränge **28** und **29** (Tabelle 3) mit zwei bzw. drei überbrückenden AT-Basenpaaren verwendet (Abb. 7). Unter diesen Voraussetzungen sollte nach bisherigen Erkenntnissen der Superaustausch-Mechanismus eintreten (vgl. Abb. 6).

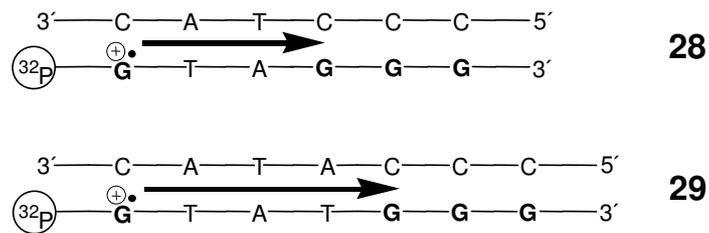


Abb. 7 Ladungstransfer in den Doppelsträngen 28 und 29

Nach entsprechender Bestrahlung konnte zum einen effektiver Elektronentransfer über diese kurzen Distanzen beobachtet werden, zum anderen konnte nur sehr geringe Schädigung am Adenin festgestellt werden. Dies zeigen die Autoradiogramme der Gelelektrophorese und die daraus resultierenden Histogramme (Abbildung 8).

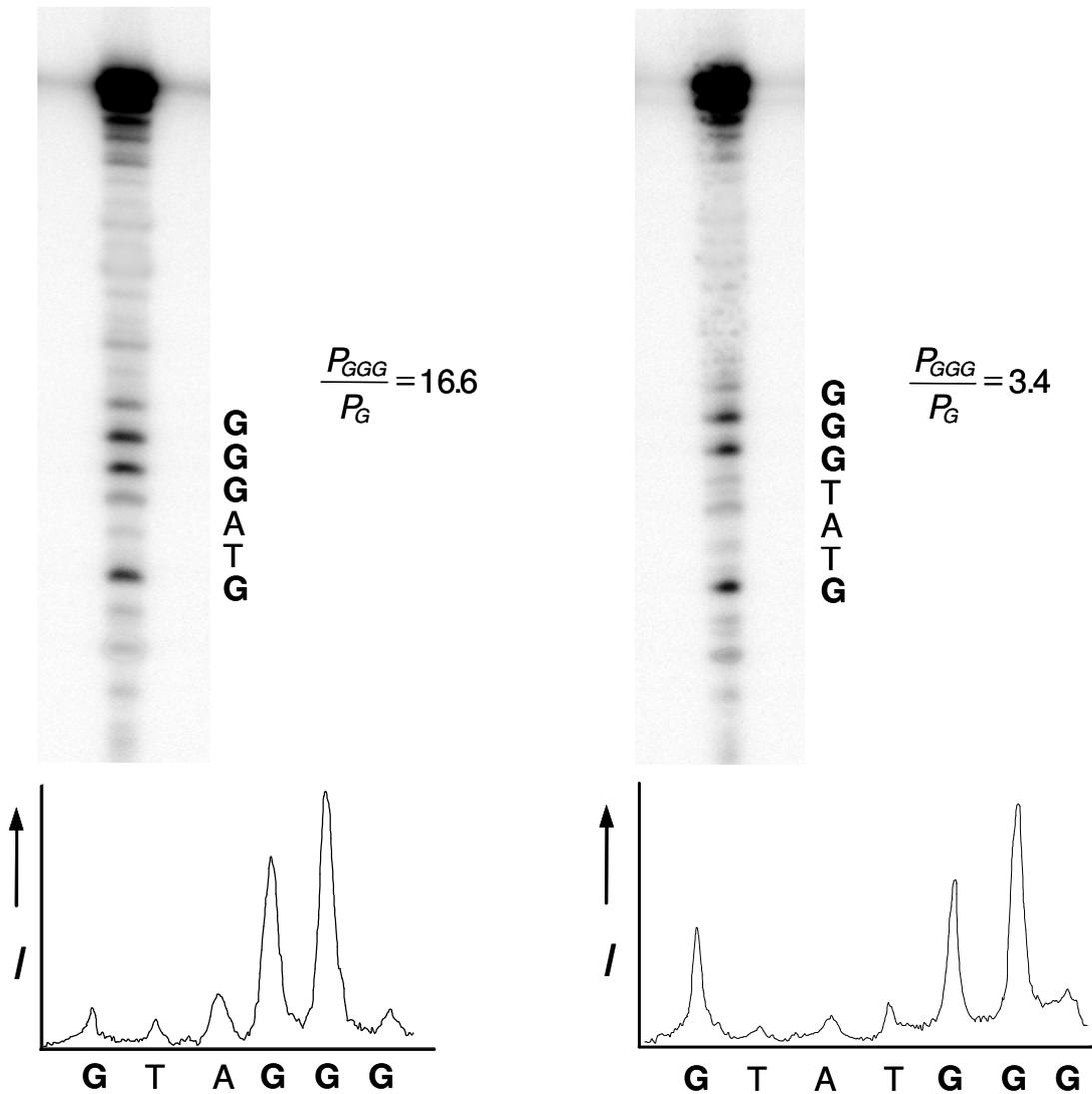


Abb. 8 Autoradiogramme und Histogramme für den Superaustausch (n = 2, 3)

Neben der sehr schwachen Schädigung am Adenin kann man außerdem die für den Superaustausch-Mechanismus typische starke Distanzabhängigkeit beobachten. So verringert sich die relative Elektronentransfergeschwindigkeit k_{rel} bei Verlängerung der Brücke um ein AT-Basenpaar um mehr als den Faktor vier. Entsprechendes wurde auch von M. Spormann beobachtet.^[35]

Eine Schädigung von Adenin wurde nicht beobachtet. Dies ist ein weiteres Indiz für das Vorliegen eines einstufigen Superaustausch-Mechanismus, der durch die Marcus-Levich-Jortner-Gleichung (1) beschrieben werden kann.

2.3.2 A-HOPPING

Von den Doppelsträngen **30** und **31** wurden Erkenntnisse über die Beteiligung von Adenin am Ladungstransfer durch A-Hopping erwartet (Abb. 9).

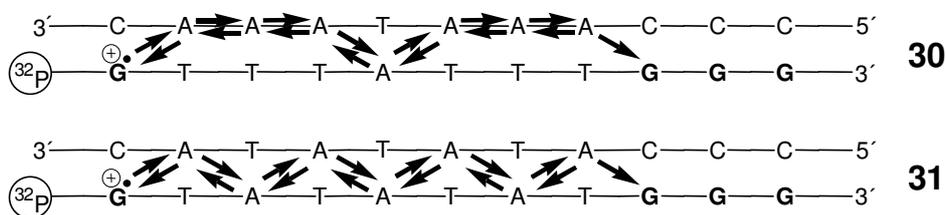


Abb. 9 Ladungstransfer in den Doppelsträngen **30** und **31**

Bei der Untersuchung dieser Doppelstränge waren in beiden Fällen erhebliche Schädigungen am Adenin zu sehen. Im Fall der komplett gemischten Sequenz des Doppelstranges **31** sind diese besonders deutlich, da mehrere Adenine im radioaktiv markierten Strang vorhanden sind (Abb. 10).

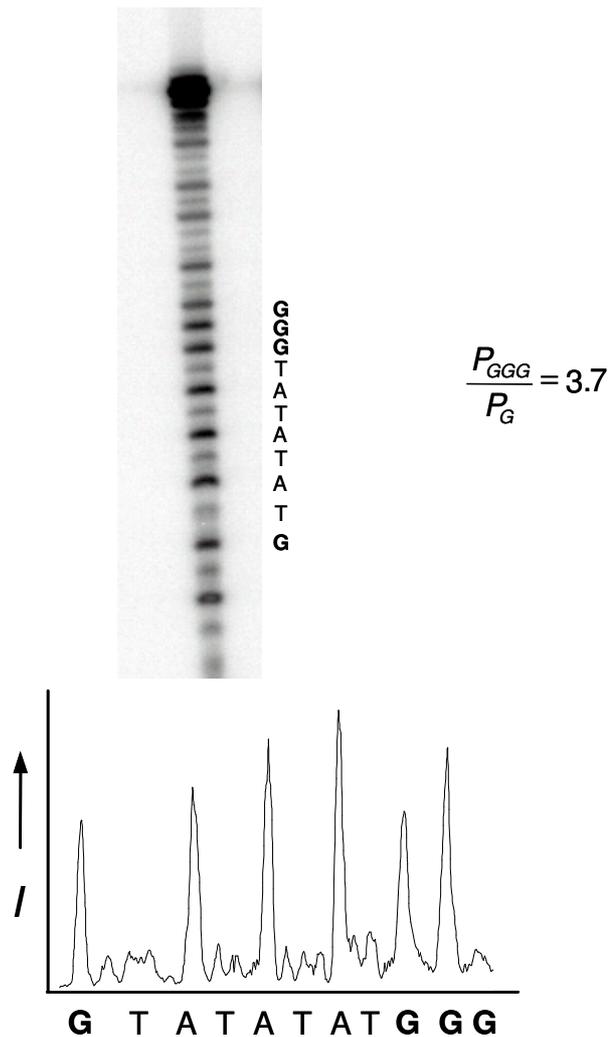


Abb. 10 Autoradiogramm und Histogramm für das A-Hopping ($n = 7$)

Das Histogramm in Abbildung 10 zeigt eine starke Schädigung an allen Adeninen. Die Adenin-Basen sind also am mehrstufigen Ladungstransferprozess beteiligt und werden entsprechend oxidiert. Auch wenn der Ladungstransport zwischen den einzelnen Adenin sehr schnell ist, kann man dessen Wasseradditionsprodukte detektieren.

Auch die große Geschwindigkeit k_{rel} des Ladungstransfers entspricht dem erwarteten A-Hopping. Trotz der relativ großen Distanz (ca. 27 Å) findet immer noch ein sehr effektiver Elektronentransfer statt.

2.4 ZUSAMMENFASSUNG

Für das A-Hopping (über sieben AT-Basenpaare) wurde die Beteiligung der Adenin-Basen am Ladungstransferprozess gezeigt. Die Wasseradditionsprodukte der oxidierten Adenine konnten per PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Es handelt sich also tatsächlich um einen mehrstufigen Prozess des Ladungstransports, an dem die Adenin-Basen unmittelbar beteiligt sind und auch entsprechend oxidiert werden. Dagegen wurde über kurze Distanzen (zwei bzw. drei AT-Basenpaare) keine Schädigung am Adenin beobachtet. Es handelt sich damit um einen einstufigen Prozess bei dem die Ladung direkt vom Akzeptor auf den Donor übergeht. Entsprechend ist die Distanzabhängigkeit relativ groß. Dieser Vorgang wird als Superaustausch-Mechanismus bezeichnet.

Der Wechsel zwischen Superaustausch- und A-Hopping-Mechanismus konnte nicht nur, wie bisher, anhand der relativen Ladungstransfergeschwindigkeiten sondern auch durch Nachweis der fehlenden bzw. vorhandenen Beteiligung der Adenin-Basen am Ladungstransferprozess gezeigt werden. Die Beteiligung des Adenins am A-Hopping wurde gezeigt und dieser neue Mechanismus dadurch bewiesen. Damit ist es möglich, den Ladungstransport in der DNA über unterschiedliche Distanzen und Sequenzen zu erklären.

3 SCHÄDIGUNG DER DNA DURCH ACRIDIZINIUMSALZE

3.1 EINFÜHRUNG

3.1.1 OXIDATIVE SCHÄDIGUNG VON DNA

Die Schädigung von Biomolekülen (insbesondere der DNA als Trägerin des Erbguts) durch Umwelteinflüsse ist seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Diskussionen. Diese meist oxidativen Schädigungen werden durch sogenannte reaktive, oxidierende Spezies (ROS: reactive oxygen species) hervorgerufen. Dabei handelt es sich um radikalische und nicht-radikalische Oxidationsmittel, die auf mehreren enzymatischen und nicht-enzymatischen Wegen gebildet werden können, z.B. durch die unvollständige Umwandlung von Sauerstoff in Wasser bei Stoffwechselprozessen.^[19,20,61-63] Einige ROS sind in Tabelle 4 dargestellt. Auf zwei ihrer Vertreter (Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale) soll in den Kapiteln 3.1.2 und 3.1.3 noch näher eingegangen werden, da sie für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind.

<i>Spezies</i>	<i>Name</i>	<i>Bemerkung</i>
$O_2^{\bullet -}$	Superoxidradikal	Ein-Elektronen-Reduktionszustand
HO_2^{\bullet}	Perhydroxylradikal	protonierte Form von $O_2^{\bullet -}$, besser lipidlöslich
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	Zwei-Elektronen-Reduktionszustand
$\bullet OH$	Hydroxylradikal	Drei-Elektronen-Reduktionszustand, s. 3.1.3
RO^{\bullet}	Alkoxyradikal	organisches Radikal
ROO^{\bullet}	Alkyldioxyradikal	entsteht aus ROOH durch H^{\bullet} -Abstraktion
ROOH	Alkylhydroperoxid	organisches Peroxid
1O_2	Singulett-Sauerstoff	erster elektronisch angeregter Zustand von Sauerstoff (3O_2), s. 3.1.2

Tabelle 4 Reaktive, oxidierende Spezies (ROS)

Die oxidative Schädigung durch ROS wird als oxidativer Stress bezeichnet. Die Bedeutung des oxidativen Stresses wird deutlich, wenn man den Zusammenhang zwischen Stoffwechselumsatz und Lebenserwartung betrachtet. Mittlerweile ist erwiesen, dass ein Anstieg des

Stoffwechselumsatzes mit einem Anstieg der Konzentration von Superoxidradikalen und einer Verkürzung der maximalen Lebenserwartung korreliert.^[64]

Die größte oxidative Schädigung konnte in Geweben wie Gehirn, Herz und Skelettmuskulatur festgestellt werden, die oft von altersbedingten Krankheiten betroffen sind.^[65,66] Gründe für altersbedingte Zunahme des oxidativen Stresses können die erhöhte Produktion von ROS, der abnehmende Schutz durch Antioxidantien und eine weniger effiziente Reparatur sein.

Weitere Ursachen für oxidative Schädigung von DNA können auch ionisierende Strahlung oder Licht sein. Die am leichtesten durch γ -Strahlung oder Photooxidation zu schädigende Base ist Guanin aufgrund ihres niedrigen Oxidationspotentials. Thymin kann durch [2+2]-Photozyklisierung Dimere bilden.^[67] Adenin und Cytosin sind dagegen relativ oxidationsstabil. Auch synthetische Reagenzien können nach photolytischer Anregung Nucleobasen angreifen. Führt der Angriff zu einem Strangbruch, werden solche Reagenzien oft als Photonukleasen bezeichnet. Dies trifft aber nur dann zu, wenn der Strangbruch direkt durch das elektronisch angeregte Reagenz verursacht wird. Oft tritt jedoch der Fall ein, dass durch den angeregten Zustand andere chemische Reaktionen initiiert werden, die dann indirekt zum Strangbruch führen. Diese Substanzen werden zutreffenderweise als Photospalter oder photospaltende Reagenzien bezeichnet.^[68]

Angriffsziel können aber nicht nur die Nucleobasen sein, sondern auch das Rückgrat der DNA. Diese Unterscheidung ist wichtig, da die Ergebnisse eines Angriffs auf die Nucleobase sehr verschieden von denen eines Angriffs auf den Zucker sein können. Für die oben erwähnten photospaltenden Reagenzien gibt es zahlreiche Reaktionsmöglichkeiten am Zucker (s. 3.1.3),^[69] jedoch nur drei mögliche Reaktionswege für die Reaktion an der Nucleobase.^[68]

1. Direkter Elektronentransfer von der Nucleobase zum Photospalter, der sich in einem angeregten Zustand befindet.
2. Transfer der Triplett-Energie des angeregten Photospalters auf $^3\text{O}_2$ zur Generierung von $^1\text{O}_2$, welches dann mit der Nucleobase reagieren kann.
3. Bildung eines Addukts mit der Base.

Bei einer Reaktion am Rückgrat kommt es häufig zu spontanen Strangbrüchen. Deren Beobachtung ist ein starkes Indiz für eine Reaktion am Zucker der DNA (meist Abstraktion von Wasserstoff-Atomen). Reaktionen an den Nucleobasen dagegen führen in der Regel nicht zum direkten Strangbruch, sondern erfordern eine zusätzliche Behandlung bei erhöhter Temperatur

und mit Basen wie Piperidin.^[68,16] Oft wird dabei eine Selektivität für eine bestimmte Nukleobase (meist Guanin) beobachtet, während bei der Reaktion am Zucker nur unselektive Strangbrüche stattfinden.^[16] Die Untersuchung von spontanen DNA-Strangbrüchen ist von besonderer Bedeutung, da sie zu Mutagenese, Karzinogenese, Alterung, Erbkrankheiten und Zelltod führen können.^[69]

Verschiedene zelluläre Reparatursysteme arbeiten den Schädigungen entgegen.^[70,71] Oxidierte Nukleobasen beispielsweise können erkannt und ausgetauscht oder repariert werden. Dies ist zur Aufrechterhaltung der Identität des genetischen Materials notwendig. Neben der Reparatur bestehender Schäden ist auch die Verhütung neuer durch Abwehr von ROS wichtig. Dies kann durch nicht-enzymatische Abfänger (sog. Scavenger) oder enzymatische Systeme (z.B. Superoxid-Dismutasen oder Hydroperoxidasen) geschehen. Diese Abwehrsysteme werden auch als Antioxidantien bezeichnet. Bekannte Scavenger sind α -Tocopherol (Vitamin E **32**, Abb. 11) als wichtigstes lipidlösliches Antioxidans^[72] und Ascorbinsäure (Vitamin C **33**, Abb. 11) als wesentliches Antioxidans in der wässrigen Phase. Ascorbinsäure kann mit dem Radikal von Vitamin E reagieren und dieses so in der Membran regenerieren.^[73]

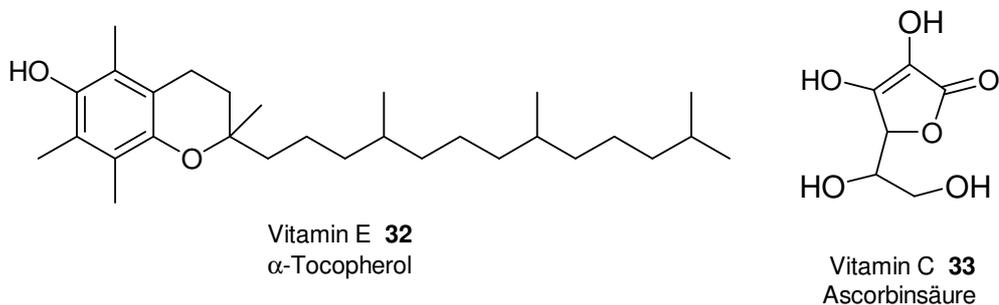


Abb. 11 Vitamin E **32** und Vitamin C **33**

Betroffen durch den oxidativen Stress sind nicht nur DNA-, sondern auch andere Biomoleküle wie Proteine, Lipide und Kohlenhydrate. Auch sie können durch ROS reversibel oder irreversibel geschädigt werden.

Dabei sollte man jedoch nicht außer Betracht lassen, dass auch zahlreiche, physiologisch wichtige Reaktionen in den Zellen über reaktive, oxidierende Spezies ablaufen.^[74]

3.1.2 SINGULETTSAUERSTOFF

Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta_g\text{O}_2$ oder einfacher $^1\text{O}_2$) ist der erste elektronisch angeregte Zustand von Sauerstoff ($^3\text{O}_2$, Abb. 12).

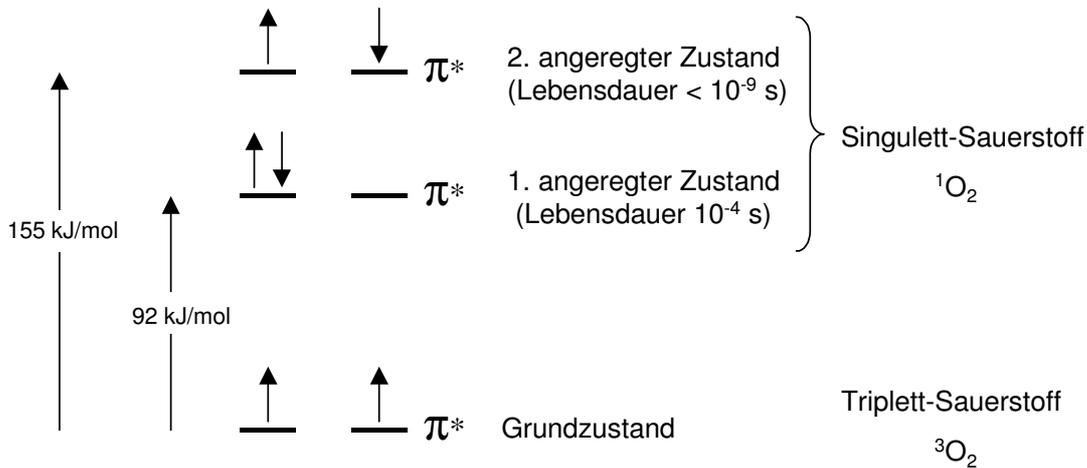
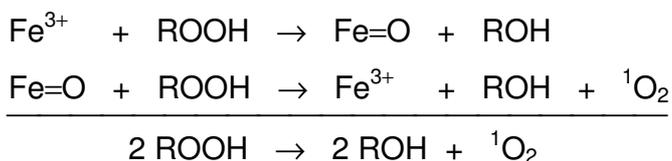


Abb. 12 Elektronenanordnungen und Energieniveaus von Singulett- und Triplett-Sauerstoff

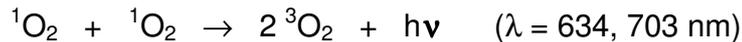
Das paramagnetische Diradikal $^3\text{O}_2$ ist wesentlich weniger reaktiv als das nicht radikalische, diamagnetsische $^1\text{O}_2$.^[75]

Singulett-Sauerstoff kann durch chemische oder photochemische Anregung aus Triplett-Sauerstoff gebildet werden. Bei Lichtanregung wird Energie von einem elektronisch angeregten Sensibilisator auf Sauerstoff übertragen. Porphyrine sind bekannt für ihre Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu generieren und DNA selektiv am Guanin zu spalten.^[76-78] Andere Beispiele für Sensibilisatoren sind Ruthenium- und Vanadium-Komplexe.^[79-82] Für die chemische Anregung gibt es verschiedene Möglichkeiten.^[83,84] Beispiele sind Radikal-Radikal-Wechselwirkungen (Russell-Mechanismus)^[85,86] oder die Zersetzung von Endoperoxiden (Oxentransfer)^[87], bei der dreiwertiges Eisen beteiligt ist (Schema 5).



Schema 5 Generierung von Singulett-Sauerstoff durch Oxentransfer

In biologischen Systemen kann es durch die Peroxidierung von Lipiden zu chemischer Anregung kommen, beispielsweise katalysiert durch Lactoperoxidase, Lipoxigenase oder Chloroperoxidase.^[88,89] Der Nachweis von Singulett-Sauerstoff in Zellen gelingt durch die Photoemission bzw. Chemolumineszenz der Dimol-Reaktion (Schema 6) mithilfe von empfindlicher Einzelphotonenzählung.^[89,90]



Schema 6 Dimol-Reaktion

Vor allem in biologischen Systemen kann Singulett-Sauerstoff von besonderer Bedeutung sein, da er eine relativ lange Lebensdauer (Halbwertszeit von 4-50 μs) und einen Diffusionsradius von 100 \AA besitzt.^[91,92] Es konnte bereits experimentell nachgewiesen werden, dass Singulett-Sauerstoff zur Schädigung biologisch aktiver DNA, genauer, zum Verlust von Transformationsaktivität in einem Testsystem mit pBR322 führen kann.^[93] Auf die Schädigung von DNA durch Singulett-Sauerstoff soll nun im Folgenden näher eingegangen werden.

Singulett-Sauerstoff ist eine hochreaktive Sauerstoff-Spezies, welche die DNA ausschließlich Guanin (als Nukleosid und in DNA) angreift.^[94-96] Dieser Angriff resultiert in einem oxidativ geschädigten Guanin, das labil gegenüber Basen wie Piperidin ist und nach entsprechender Behandlung zum Strangbruch führt. Es sind aber auch spontane Strangbrüche beobachtet worden, deren Entstehung noch nicht erklärt werden konnten.^[97,98] Diese spontanen Strangbrüche gaben lange Zeit Anlass zu Kontroversen, da sie nur 5% der gesamten Schädigung der DNA durch Singulett-Sauerstoff ausmachen und deswegen schwer zu detektieren sind.^[99,100]

Der genaue Mechanismus der Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Guanin ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. Cadet *et al.*^[101,102] ist es gelungen, deren Hauptreaktionsprodukte zu isolieren. Das wichtigste Oxidationsprodukt von Guanin ist das 7,8-Dihydro-8-oxoguanin **34** (im Folgenden: 8-oxoGuanin, Abb. 13). Dieses konnte in allen Experimenten nachgewiesen werden.

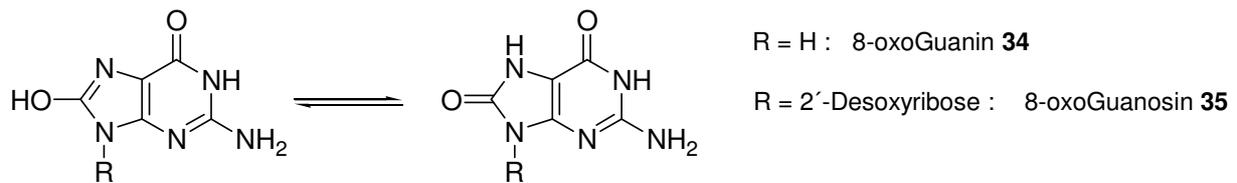
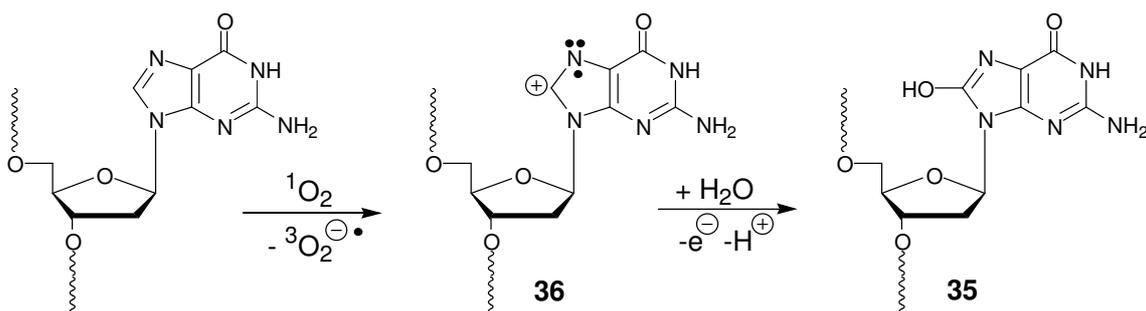


Abb. 13 8-oxoGuanin **34** und 8-oxoGuanosin **35**

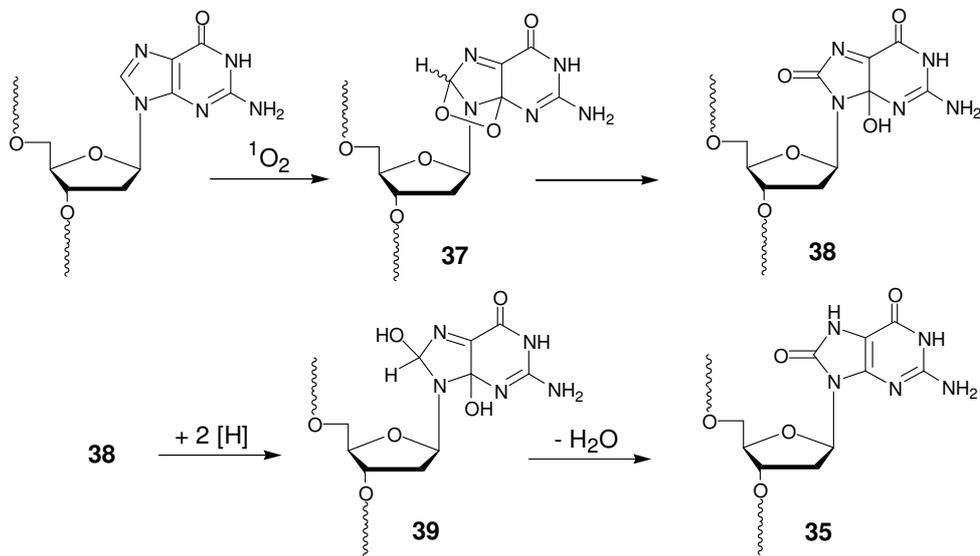
Außerdem haben Untersuchungen ergeben, dass 8-oxoGuanosin **35** gegenüber Singulett-Sauerstoff wesentlich reaktiver ist als Guanosin selbst. Die Differenz der Oxidationspotentiale reicht aus, um eine selektive Reaktion zu gewährleisten (8-oxoGuanosin: 0.58 – 0.75 V vs NHE, Guanosin: 1.29 V vs NHE).^[103-106] Eine Anreicherung von 8-oxoGuanosin **35** ist dadurch eher unwahrscheinlich. Dies könnte erklären, warum in einigen Fällen nur sehr kleine Konzentrationen gefunden wurden.

8-oxoGuanosin **35** spielt eine zentrale Rolle in der Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit DNA bzw. Guanosin. Über den Reaktionsmechanismus gibt es verschiedene Theorien.^[107-109] Boiteux *et al.*^[107] gehen von einem Elektronentransfer von Guanin zum Singulett-Sauerstoff aus. Dabei entsteht ein Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$, vgl. Kapitel 3.1.1) und das Guanosinradikalkation **36**, das bereits im ersten Teil (Kapitel 2) dieser Arbeit beschrieben wurde. Dessen Ladung kann dann durch Elektronentransfer in der DNA zu einem energetisch günstigeren Guanin wandern oder sofort durch die Wasserreaktion (vgl. Kapitel 2.1.1 und 2.1.2) abgefangen werden. In beiden Fällen entsteht das 8-oxoGuanosin **35** (Schema 7).



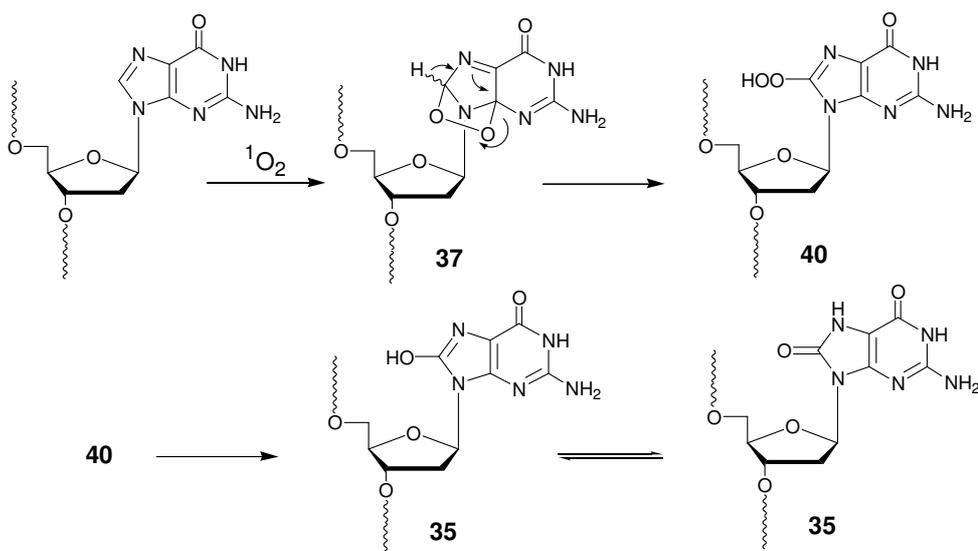
Schema 7 Theorie I: Generierung von 8-oxoGuanosin **35** durch Elektronentransfer

Devasagayam *et al.*^[108] zufolge kommt es im ersten Schritt zu einer Cycloaddition von Singulett-Sauerstoff an Guanin (Schema 8). Daraus resultiert das Endoperoxid **37**. Dies kann durch Öffnen des Rings das 4-Hydroxy-8-oxoguanosin **38** generieren, das mithilfe von zwei reduzierenden Äquivalenten und unter Wasserabspaltung das 8-oxoGuanosin **35** bildet.



Schema 8 Theorie II: Generierung von 8-oxoGuanosin **35** über das Endoperoxid **37** und Reduktion

Foote *et al.*^[109] gehen ebenfalls von einer Cycloaddition zum Endoperoxid **37** aus. Allerdings sind für diesen Mechanismus keine reduzierenden Spezies erforderlich. Durch eine Umlagerung entsteht aus dem Endoperoxid **37** das Hydroperoxid **40**. Diese hochreaktive Iminopersäure kann andere Moleküle oxidieren, dabei entsteht das 8-oxoGuanosin **35** (Schema 9).



Schema 9 Theorie III: Generierung von 8-oxoGuanosin **35** über das Endoperoxid **37** und Umlagerung

Neben dem wichtigen und intensiv untersuchten 8-oxoGuanin **34** sollen noch kurz die anderen beobachteten Produkte der Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Guanin erwähnt werden. Dabei handelt es sich um das 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyGuanin) **41** und ein Derivat von Cyanursäure **42** (Abb. 14). Letzteres wird vermutlich aus einem instabilen Enamin gebildet, das ein zweites Molekül Singulett-Sauerstoff addieren kann.^[110]

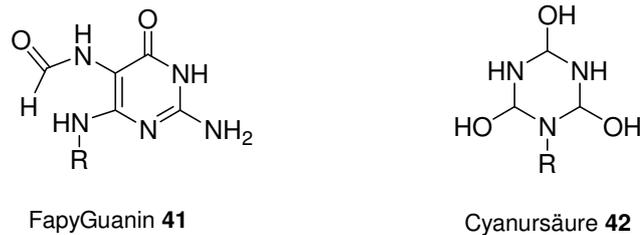


Abb. 14 Andere Oxidationsprodukte: FapyGuanin **41** und Cyanursäure **42**

Wie beschrieben, ist bisher nicht bekannt, nach welchem der Mechanismen 8-oxoGuanin **34** oder die anderen isolierten und charakterisierten Produkte gebildet werden. Ebenso unbekannt ist der Mechanismus, der zu direkten Strangbrüchen durch Singulett-Sauerstoff führt. Erwiesen ist jedoch, dass spontane Strangbrüche viel seltener auftreten (17mal seltener)^[111] als die Bildung von 8-oxoGuanin. Bis heute konnte nicht geklärt werden, ob 8-oxoGuanin eine Vorstufe für den spontanen Strangbruch ist oder beide Prozesse lediglich identische Vorstufen haben, wie z.B. das Endoperoxid **37**.^[93] Da zeitaufgelöste Messungen ergaben, dass für einen Strangbruch zwei Moleküle Singulett-Sauerstoff nötig sind, wäre es möglich, dass eine weitere Oxidation von 8-oxoGuanin zum spontanen Strangbruch führt.^[101,102] Auch wenn der Mechanismus des direkten Strangbruchs noch nicht genau bekannt ist, ist sicher, dass sowohl alkalilabile Modifikationen wie auch Strangbrüche selektiv am Guanin auftreten.

Weitere Hinweise auf Singulett-Sauerstoff sind die Zunahme der Schädigung von DNA in D₂O und die Abnahme der Schädigung durch Zugabe von Natriumazid. Die Zunahme der Schädigung bei Durchführung des Experiments in D₂O statt H₂O ist auf eine Verlängerung der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff zurückzuführen.^[103] Natriumazid hingegen quencht Singulett-Sauerstoff, es kommt daher zu weniger Strangbrüchen.^[103] Dagegen haben die bekannten Fänger von Hydroxylradikalen (*tert*-Butylalkohol, Isopropylalkohol und Natriumformiat) keinerlei Auswirkungen.

In Experimenten konnte gezeigt werden, wie sich Singulett-Sauerstoff auf die Transformationsaktivität von Plasmid-DNA (pBR322) und Phagen-DNA (ϕ X174) in *E. coli* auswirkt. Die Transformationsaktivität wird in Gegenwart von Singulett-Sauerstoff um 70 % verringert, in D₂O sogar um 85 %.^[93,99] Eine häufige Mutation bei Auftreten von 8-oxoGuanin **34** ist der Austausch eines GC-Basenpaares gegen ein AT-Basenpaar. 8-oxoGuanin bildet in seiner bevorzugten Keto-Form eine stabile Fehlpaarung mit Adenin (Abb. 15).^[112-114]

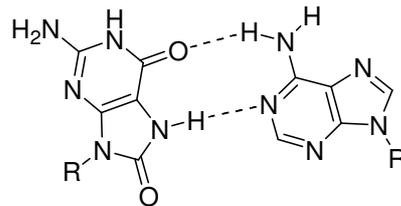


Abb. 15 Basenpaarung zwischen Adenin und 8-oxoGuanin

An AT-Basenpaaren konnten, in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Eigenschaften von Singulett-Sauerstoff, keine Mutationen festgestellt werden.^[115] Auch ein dem 8-oxoGuanin entsprechendes Produkt von Adenin konnte nicht detektiert werden.^[103]

Wie in diesem Kapitel beschrieben wurde, kann Singulett-Sauerstoff zu erheblichen Schädigungen der DNA führen. Um dem entgegenzuwirken, existieren in der Natur verschiedene Schutzmechanismen. Einer ist die Prävention der Reaktion mit Guanin durch Quenchen von Singulett-Sauerstoff. Eine Reihe von Verbindungen stehen dafür zur Verfügung, besonders wichtig sind die Carotenoide.^[116,117] Eine andere Möglichkeit ist die Reparatur bestehender Schäden. Ein bereits vorhandenes 8-oxoGuanin kann enzymatisch erkannt, entfernt und durch die korrekte Base (Guanin) ersetzt werden. Die entsprechenden Enzyme sind die Glykosylasen.^[118] Es ist sogar möglich, die Konzentration von 8-oxoGuanin im Urin zu bestimmen, als Maß für die oxidative Schädigung von DNA *in vivo*.^[119-121]

An dieser Stelle sollen noch einmal die wichtigsten Erkenntnisse über die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit DNA zusammengefasst werden:

- Ein Angriff erfolgt ausschließlich an Guanin, nicht an einer der anderen Nucleobasen oder das DNA-Rückgrat.
- Direkter (spontaner) Strangbruch konnte ebenfalls beobachtet werden, allerdings nur in geringem Ausmaß ($\leq 5\%$).

- Hauptprodukt der Reaktion mit Singulett-Sauerstoff sind oxidativ geschädigte Guanine.
- Wichtigstes Oxidationsprodukt ist das alkalilabile 8-oxoGuanin.
- 8-oxoGuanin ist Singulett-Sauerstoff gegenüber wesentlich reaktiver als Guanin.
- Für die Mechanismen, die zu oxidierten Guaninen oder zu spontanem Strangbruch führen, existieren verschiedene theoretische Ansätze. Eindeutige experimentelle Befunde stehen jedoch noch aus.
- Durch Zusätze wie D₂O oder Natriumazid kann eine Zu- bzw. Abnahme der Schädigung an der DNA beobachtet werden.
- Eine häufig beobachtete Mutation durch Behandlung mit Singulett-Sauerstoff ist der Austausch eines GC-Basenpaares gegen ein AT-Basenpaar, verursacht durch den Einbau von Adenin gegenüber von 8-oxoGuanin durch Polymerasen.
- Schutz vor Mutationen durch Singulett-Sauerstoff findet in der Natur durch Prävention (Carotenoide) und Reparatur (Glykosylasen) statt.

3.1.3 HYDROXYLRADIKALE

Das Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) ist ein starkes Oxidationsmittel, das nahezu diffusionskontrolliert mit den meisten organischen Verbindungen reagieren kann.^[122] Dabei wird von der organischen Verbindung ein Wasserstoffatom (oder Elektron) abstrahiert und es entstehen Wasser und ein organisches Radikal(kation). Durch dessen Weiterreaktion mit Sauerstoff oder Wasser kommt es zu einer oxidativen Schädigung. Eine andere Möglichkeit ist die Addition von Hydroxylradikalen an organische Verbindungen, die ebenfalls zu Radikalbildung führt.

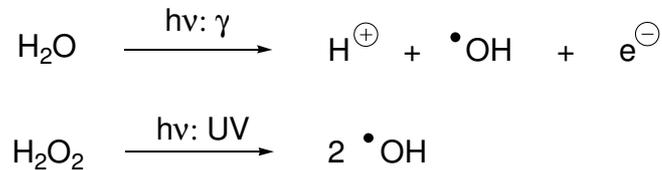
Die bekannteste Reaktion zur Generierung von Hydroxylradikalen ist die Fenton-Reaktion (Schema 10).^[123,124]



Schema 10 Generierung von Hydroxylradikalen über die Fenton-Reaktion

Darüber hinaus sind weitere Möglichkeiten bekannt, wie z.B. die Radiolyse von Wasser (mit γ -Strahlen) oder die homolytische Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung von

Wasserstoffperoxid oder entsprechenden organischen Hydroperoxiden durch UV-Strahlen (Schema 11).^[125-132]



Schema 11 Generierung von Hydroxylradikalen durch Radiolyse von Wasser oder Photolyse von Peroxiden

Wie bereits erwähnt, ist das Hydroxylradikal ein hochreaktives Oxidationsmittel, das mit fast allen organischen Molekülen reagiert. Im Gegensatz zum sehr selektiven Singulett-Sauerstoff kann das Hydroxylradikal mit der DNA eine Vielzahl von Reaktionen eingehen. Bekannt sind z.B. Oxidation von Nucleobasen, Generierung basenfreier Stellen (abasic sites), DNA-DNA-Intrastrang-Addukte^[133,134], DNA-Protein-Vernetzungen^[135] und DNA-Strangbrüche.

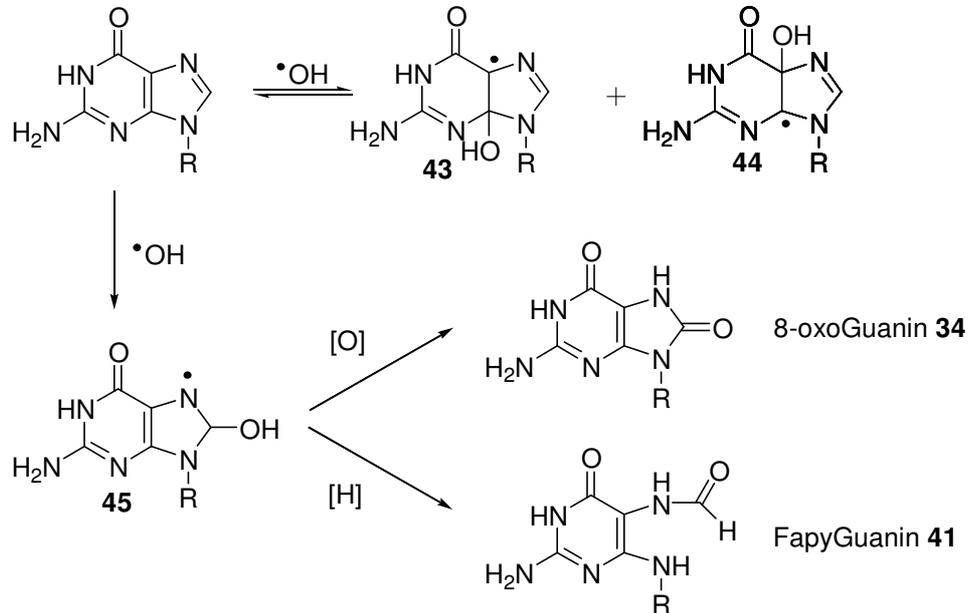
Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Reaktionen an der Nucleobase und am DNA-Rückgrat. Beide Arten des Angriffs sind für Hydroxylradikale bekannt und sollen im Folgenden beschrieben werden:

Reaktionen an den Nucleobasen:

Die elektronenreichen Purine und Pyrimidine sind primäres Ziel von elektrophilen Reagenzien, zu denen auch das Hydroxylradikal gehört.^[21] Dementsprechend ist die Addition von Hydroxylradikalen an die Doppelbindungen der Nucleobasen die Hauptreaktion (80 %) von Hydroxylradikalen mit DNA.^[136] Mit allen vier Nucleobasen sind Reaktionen beschrieben und in allen Fällen gibt es mehr als nur ein Reaktionsprodukt.

Purine: Im Fall von Guanin kann das Hydroxylradikal an drei möglichen Stellen addieren: am C-4, am C-5 oder am C-8 (Schema 12).^[16] Die Addukte **43** und **44** reagieren meist wieder zurück zum Guanin unter Aufnahme eines Elektrons und Freisetzung eines Hydroxylanions. Das Elektron kann aus dem Lösungsmittel stammen oder in vivo von Thiolen in der Zelle. Eine andere mögliche Quelle ist die Desoxyriboseeinheit im Rückgrat. Paillous *et al.*^[98] erklären den sehr effektiven und völlig unselektiven Strangbruch von DNA durch Hydroxylradikale dadurch,

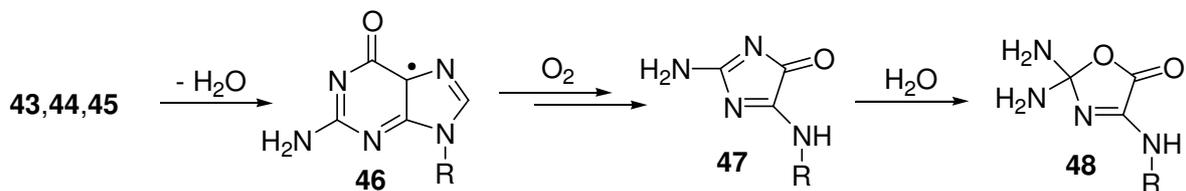
dass die entstandenen Radikale an den Nucleobasen ein Wasserstoffatom von der angrenzenden Desoxyribose abstrahieren. Dies resultiert in Radikalen am Zucker, die zum DNA-Strangbruch führen (s.u.).



Schema 12 Addition des Hydroxylradikals an Guanin

Das Addukt am C-8 des Purinrings führt unter aeroben Bedingungen zum 8-oxoGuanin **34**, in Abwesenheit von Sauerstoff hingegen unter Öffnung des Imidazolrings zum FapyGuanin **41**. Die beiden modifizierten Nucleobasen sind alkalilabil.

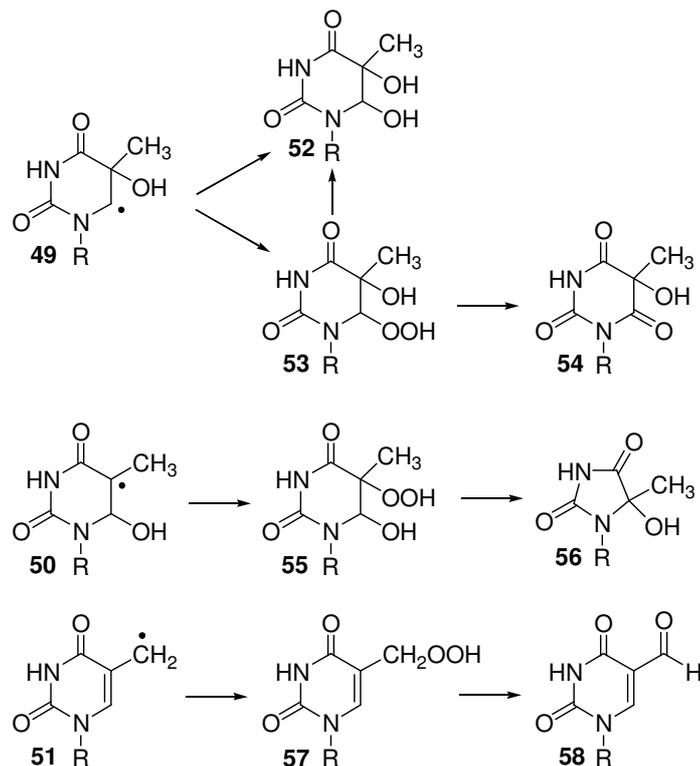
Weitere beobachtete Produkte unter aeroben Bedingungen sind Imidazolon **47** und Oxazolon **48** (Schema 13). Diese entstehen durch Dehydratisierung der Adduktionsprodukte **43**, **44**, und **45**.



Schema 13 Entstehung von Imidazolon **47** und Oxazolon **48**

Die Chemie von Adenin entspricht der von Guanin, auch wenn Schädigungen am Adenin weniger verbreitet sind. Allerdings ist das 8-oxoAdenin, im Gegensatz zum FapyAdenin oder den entsprechenden Guanin-Produkten, nicht alkalilabil.^[16]

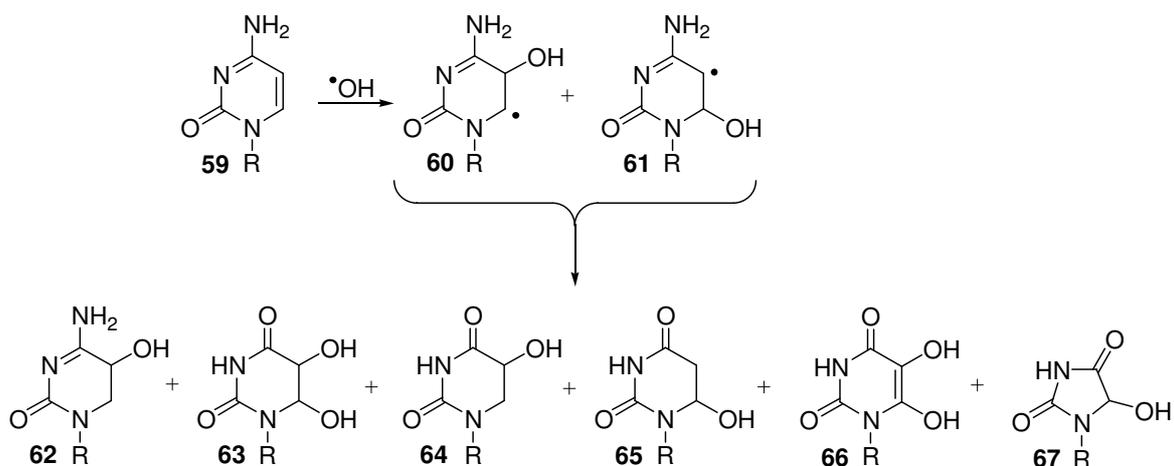
Pyrimidine: Thymin kann auf eine Vielzahl von Wegen mit Hydroxylradikalen reagieren.^[18,137,138] Die wichtigsten Reaktionen sind Addition am C-5 oder C-6 und Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der exo-Methylgruppe.^[16] Dies führt zu den primären Radikalen **49**, **50** und **51** in einem Verhältnis von 56:35:9 (Schema 14).^[139] Diese können Wasserstoffatome von angrenzenden Desoxyriboseeinheiten abstrahieren und so zum Strangbruch führen.



Schema 14 Reaktion von Thymin mit Hydroxylradikalen unter aeroben Bedingungen

In Konkurrenz dazu können unter aeroben Bedingungen durch Reaktion mit Sauerstoff die oxidierten Thymin-Derivate **54**, **56** und **58** und das Thymin-Glykol **52** entstehen. Zwischenstufen sind dabei die Hydroperoxide **53**, **55** und **57** (Schema 14). Mit Ausnahme des Aldehyds **58** sind alle diese Produkte alkalilabil.

Die Reaktionen von Cytosin sind komplex, da die N-4-Aminogruppe durch die Addition von Hydroxylradikalen an die C-5- und C-6-Position anfälliger für hydrolytische Deaminierung wird.^[140] Folglich sind Uracilderivate häufige Produkte der Oxidation von Cytosin. Die primären Radikale **60** und **61** (Schema 15) entstehen in einem Verhältnis von 87:10^[141] durch die Addition eines Hydroxylradikals an die 5,6-Doppelbindung (Schema 15). Eine Kaskade von Reaktionen führt dann zu den zahlreichen beobachteten Produkten **62-67**, von denen das 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrouracil **63** eines der Hauptprodukte ist.^[142]



Schema 15 Produkte der Reaktion von Cytosin **59** mit Hydroxylradikalen

Allgemein: Wie oben beschrieben können die Nucleobasen auf eine Vielzahl von verschiedenen Arten mit dem Hydroxylradikal reagieren. Dabei kommt es neben den Reaktionsbedingungen (oxidierende oder reduzierende Bedingungen d.h. An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff) auch darauf an, ob die Nucleobase als freie Nucleobase, in Form des Nucleosids/Nucleotids oder in einem DNA-Strang untersucht wurde. So konnte beispielsweise festgestellt werden, dass die freie Nucleobase etwas reaktiver ist als das entsprechende Nucleosid oder Nucleotid (Tabelle 5). Grund hierfür ist neben der Zugänglichkeit die geringere Elektronendichte aufgrund des elektronenziehenden Effekts der Desoxyriboseeinheit am N-9.^[21]

Verbindung	Geschwindigkeitskonstanten [$10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
Adenin	6.1 ^[143]
Adenosin	5.8 ^[143]
Adenosin-5'-phosphat	4.1 ^[143]
Guanin	9.2 ^[143]
Guanosin	7.8 ^[143]
Guanosin-5'-phosphat	4.7 ^[143]
2'-Desoxyribose	2.0 ^[144]

Tabelle 5 Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von Hydroxylradikalen mit Nucleobasen, Nucleosiden und Nucleotiden

Auffallend ist auch die Abnahme der Reaktivität eines Poly-A-Stranges gegenüber der eines einzelnen Adenosins (Tabelle 5 und 6). Noch größer ist dieser Effekt bei einem DNA-Doppelstrang. Da die Zugänglichkeit der Nucleobase in einer Doppelhelix oder in einem

Polyoligonukleotid viel geringer ist als bei einem Monomer, ist dies ein starkes Indiz dafür, dass die Zugänglichkeit der Nukleobase eine große Rolle spielt für ihre Reaktivität.^[145]

Verbindung	Geschwindigkeitskonstanten [$10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
PolyA (pro Nukleotid)	RT $11.0^{[144]}$
	80°C $14.0^{[144]}$
DNA (pro Nukleotid)	RT $1.1^{[144]}$
	80°C $1.9^{[144]}$

Tabelle 6 Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von Hydroxylradikalen mit Polynukleotiden

Die Zugänglichkeit der Nukleobase ist auch von entscheidender Bedeutung, weil Hydroxylradikale hochreaktiv sind und dementsprechend dort reagieren, wo sie generiert werden.^[146]

Reaktionen am DNA-Rückgrat (Zucker):

Das Rückgrat der DNA besteht aus Desoxyriboseeinheiten, die durch Phosphatgruppen verbunden sind. Reaktionen an den Phosphatgruppen werden kaum beobachtet, da die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von Hydroxylradikalen mit Phosphatgruppen mit $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ um zwei Größenordnungen niedriger ist als die der Reaktion mit Desoxyribose (vgl. Tabelle 5).^[144]

Nur etwa 20 % der Reaktionen von Hydroxylradikalen mit DNA finden direkt am Rückgrat bzw. der Desoxyribose statt.^[136] Hinzu kommen die Reaktionen der primären Radikale der Nukleobasen, die (vor allem unter anaeroben Bedingungen) ebenfalls mit dem Zucker reagieren. In beiden Fällen wird ein Wasserstoffatom von der Desoxyribose abstrahiert und ein spontaner Strangbruch ausgelöst.

Nicht jede Abstraktion eines der sieben Wasserstoffatome der Desoxyribose (Abb. 16) führt zum Strangbruch. Die unterschiedliche Reaktivität der Wasserstoffatome, die Sauerstoffkonzentration und die Form der untersuchten DNA ((Poly)Nukleotid, DNA-Strang) haben Einfluss auf die Zusammensetzung der Produkte. So konnten z.B. bei der Untersuchung von Duplex-DNA nur ein oder zwei Reaktionsprodukte an jedem Nukleotid beobachtet werden.^[147,148]

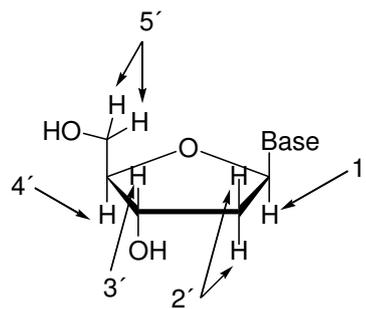


Abb. 16 Wasserstoffatome an der Desoxyribose

Auf die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten von Hydroxylradikalen mit der Desoxyribose soll im Folgenden näher eingegangen werden.

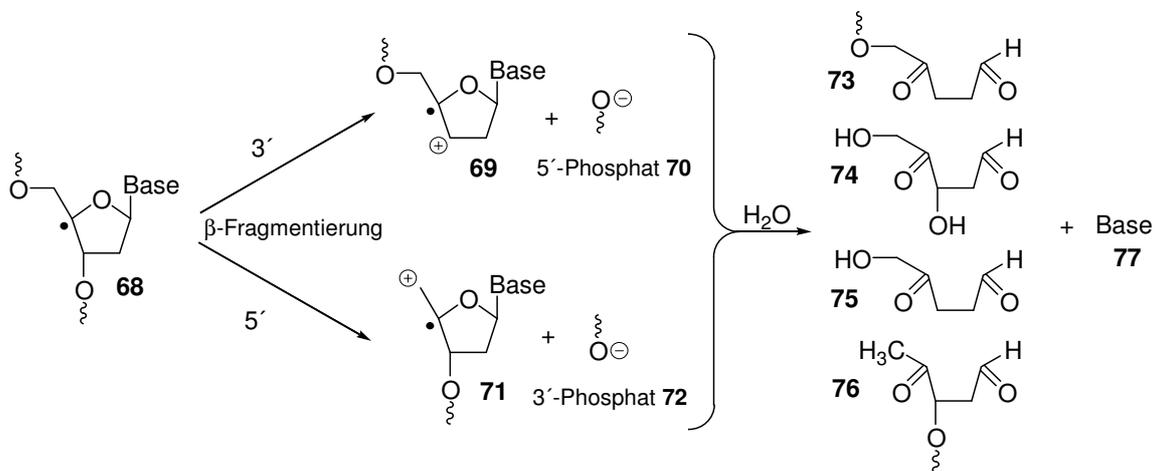
Abstraktion von H-1': In B-DNA befindet sich das Wasserstoffatom der 1'-Position in der kleinen Furche und ist daher nur wenig zugänglich.^[149,150] Es ist nur für Verbindungen relevant, die in der kleinen Furche binden, wie beispielsweise Bis(1,10-phenanthrolin)-Kupfer(I)^[151,152] und Neocarzinostatin^[153,154]. Für eine Abstraktion des H-1' durch Hydroxylradikale besteht Berechnungen zufolge nur eine geringe Wahrscheinlichkeit.^[149]

Abstraktion von H-2': Auch Strangbruch durch eine Abstraktion der Wasserstoffatome in der 2'-Position wird kaum beobachtet. In kurzen Oligonukleotiden konnte man durch ionisierende Strahlung eine Änderung der Konformation beobachten, welche die Distanz zwischen der Base und dem Zucker verkürzte und so eine Abstraktion von 1'- oder 2'-Wasserstoffatomen durch die Base ermöglichte.^[155,156] Bei Modellexperimenten mit halogeniertem Uracil wurde festgestellt, dass von den beiden prochiralen 2'-Wasserstoffatomen bevorzugt das in 2' α -Position abstrahiert wurde, wahrscheinlich aufgrund der geringeren Distanz zum Uracilyl-Radikal.^[157]

Abstraktion von H-3': Der Beitrag des 3'-Wasserstoffatoms zum Strangbruch ist gering, obwohl es sich in der großen Furche befindet und damit gut zugänglich ist. Dies kann daran liegen, dass nur wenig oxidierende Reagenzien bekannt sind, die DNA-Strangbruch verursachen und in der großen Furche binden. Selbst hochreaktive, unselektive Oxidationsmittel wie das Hydroxylradikal scheinen kaum Strangbruch durch Abstraktion von 3'-Wasserstoffatomen zu verursachen.^[145]

Abstraktion von H-4': Spontaner Strangbruch nach Abstraktion des Wasserstoffatoms in 4'-Position ist eine häufig beobachtete Reaktion, verursacht beispielsweise durch

Hydroxylradikale^[145], ionisierende Strahlung^[158] oder Bleomycin^[159-161]. Durch Abstraktion des 4'-Wasserstoffatoms entsteht das Radikal **68** (Schema 16). Aus diesem werden durch β -Fragmentierung die Radikalkationen **69** und **70** generiert. Das Radikalkation **69** und seine Reaktionsmöglichkeiten sind bereits im Kapitel 2 erläutert worden. Neben dem dort beschriebenen Elektronentransfer kann es zur Reaktion mit Wasser kommen. Dadurch entstehen die Diketone **73-76** und die freie Base **77**. Hier sollen noch einmal die möglichen Reaktionswege und Produkte gezeigt werden, die von Schulte-Frohlinde^[162] und von Sonntag^[158] vorgeschlagen wurden (Schema 16). Giese *et al.*^[163] ist es später gelungen, einige Zwischenstufen durch Abfangreaktionen nachzuweisen.



Schema 16 Mechanismus für den spontanen Strangbruch nach 4'-Wasserstoffabstraktion unter anaeroben Bedingungen

Im Gegensatz zu den meisten anderen Strangbruchmechanismen (z.B. dem von Bleomycin) kommt der in Schema 16 dargestellte ohne Sauerstoff aus, d.h., er kann unter anaeroben Bedingungen stattfinden. Die 4'-Wasserstoffabstraktion spielt aufgrund der guten Zugänglichkeit des entsprechenden Wasserstoffatoms eine wichtige Rolle.

Abstraktion von H-5': Die beiden Wasserstoffatome in der 5'-Position sind am leichtesten zugänglich.^[145,150,164] Beide befinden sich in der kleinen Furche der DNA, eines zeigt sogar weg von der Furche in Richtung des Lösungsmittels. Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, ob eines der beiden prochiralen Wasserstoffatome bevorzugt abstrahiert wird. Strangbruchmechanismen, die von einer 5'-Wasserstoffabstraktion ausgehen, treten bei der

Radiolyse von DNA auf,^[165] sowie bei Einwirkung von kationischen Porphyrinen,^[166] Hydroxylradikalen^[145,159,167] und Perhydroxylradikalen.^[168]

Allgemein: Die Reaktivität aller Wasserstoffatome wurde durch kinetische Isotopeneffekte nach Deuterierung der entsprechenden Positionen untersucht und es wurde festgestellt, dass im Fall von B-DNA die Reaktivität mit der Zugänglichkeit korreliert.^[145] Insgesamt wurde die Reaktivität der Wasserstoffatome an der Desoxyribose wie folgt eingestuft: $5' > 4' > 3' \approx 2' \approx 1'$. Durch Berechnungen vom Melikyan *et al.*,^[169] die auf der Stabilisierung der entstehenden Radikale von Desoxythymidin-3',5'-diphosphorsäure beruhen, wurde eine andere Reihenfolge gefunden: $4' > 5' > 5\text{-Me} > 1' > 3' > 2'$.

Die für die Abstraktion eines Wasserstoffatoms entscheidenden Eigenschaften sind also die Reaktivität und Zugänglichkeit des Wasserstoffs, sowie die Stabilisierung des entsprechenden Radikals. Insgesamt kann festgestellt werden, dass die 4'- und 5'-Positionen der Desoxyribose die für eine Wasserstoffabstraktion in Frage kommenden Positionen sind.

Es wird zwischen zwei Arten der Abstraktion unterschieden: die direkte Abstraktion durch Hydroxylradikale und die indirekte durch Radikale der Nucleobasen. Messungen ergaben, dass die direkte Abstraktion sehr schnell erfolgt und unabhängig von der Nucleobase bzw. der Sequenz ist. Die indirekte Abstraktion dagegen erfolgt langsamer (0.02–2 s) und zeigt eine leichte Sequenzabhängigkeit. Bei Einzelsträngen konnten mehr Strangbrüche an Guanin und Cytosin als an Adenin und Thymin festgestellt werden.^[170]

Auch hier sollen noch einmal die wichtigsten Erkenntnisse über die Reaktionen von Hydroxylradikalen mit Nucleotiden und DNA zusammengefasst werden:

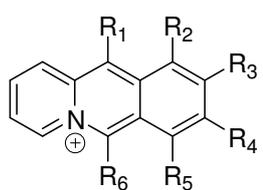
- Hydroxylradikale sind hochreaktive, unselektive Spezies, die diffusionskontrolliert mit den meisten organischen Verbindungen reagieren.
- Im Fall von Nucleotiden reagieren sie hauptsächlich mit den Nucleobasen (80 %) und nur zu einem geringeren Teil direkt mit der Desoxyriboseeinheit (20 %).
- Für die Reaktion mit den Nucleobasen sind zahlreiche Produkte bekannt, ihre Entstehung hängt stark von den Reaktionsbedingungen ab. Obwohl (hauptsächlich unter aeroben Bedingungen) auch alkalilabile Produkte entstehen können, reagiert in vielen Fällen das

primäre Radikal der Nukleobase mit der Desoxyribose und führt so zum direkten Strangbruch.

- Bei der direkten Reaktion mit dem Zucker stehen verschiedene Wasserstoffatome zur Verfügung. Abstrahiert wird aber hauptsächlich in 4'- oder 5'-Position. Dies wird einerseits durch die Reaktivität und Zugänglichkeit der Wasserstoffatome, andererseits die Stabilisierung der entsprechenden Radikale bestimmt.
- Für den Strangbruch nach Abstraktion des 4'-Wasserstoffatoms ist ein Mechanismus vorgeschlagen worden, der unter anaeroben Bedingungen stattfindet. Für die meisten anderen postulierten Strangbruchmechanismen ist die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich.
- Die direkte Abstraktion von Wasserstoffatomen der Desoxyribose durch Hydroxylradikale verläuft schnell und zeigt keine Abhängigkeit von der Sequenz.
- Da die Hydroxylradikale hochreaktiv sind, finden ihre Reaktionen am Ort ihrer Entstehung statt.
- Die Zugänglichkeit der Nukleobasen bzw. der Wasserstoffatome der Desoxyribose spielt eine große Rolle.
- Anwesenheit von Sauerstoff erhöht die Ausbeute an Strangbrüchen.^[165]

3.1.4 ACRIDIZINIUMSALZE

Bei Acridiziniumsalzen (Abb. 17) handelt es sich um annellierte Chinoliziniumsalze. Sie sind eine neue Klasse von Farbstoffen, die an DNA binden und diese durch Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Sauerstoff schädigen können.^[171-175] Damit gehören sie zu den in Kapitel 3.1.1 angesprochenen Photonukleasen oder photosplattendenden Reagenzien.



78 - 86

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
78	H	H	H	H	H	H
79	H	H	H	H	H	NH ₂
80	H	H	H	H	NH ₂	H
81	H	H	H	NH ₂	H	H
82	H	H	NH ₂	H	H	H
83	H	NH ₂	H	H	H	H
84	NH ₂	H	H	H	H	H
85	H	H	Br	H	H	H
86	H	H	Cl	H	H	H

Abb. 17 Verschiedene Acridiziniumsalze

Einer der größten Vorteile der Acridiziniumsalze ist, dass sie bei hohen Wellenlängen ($\lambda \geq 350$ nm) effektiv angeregt werden. Da die Nukleobasen in diesem Bereich nicht absorbieren, werden sie durch die Bestrahlung nicht geschädigt (Abb. 18).

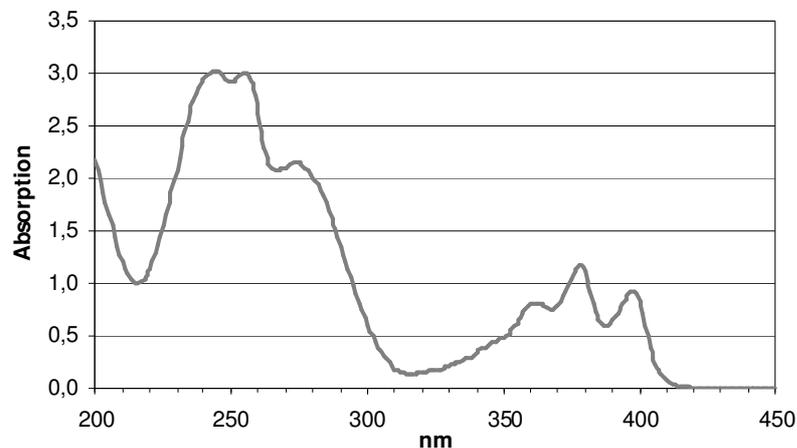
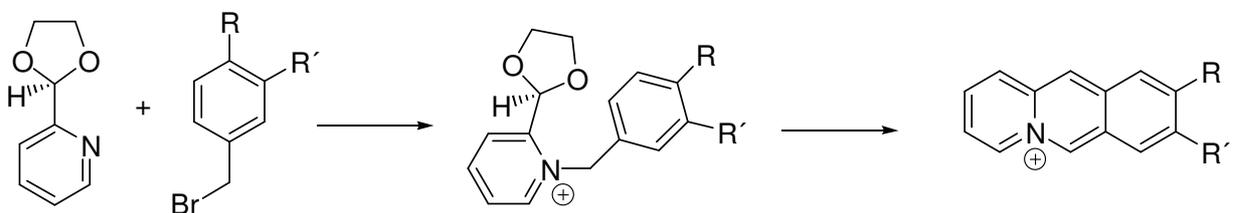


Abb. 18 UV-Spektrum einer 0.1 mM Lösung des Acridiziniumsalzes **85**

Synthetisiert und untersucht wurden die Acridiziniumsalze von Ihmels *et al.*^[171-175] Die Synthese kann durch Cyclodehydratisierung nach Bradsher erfolgen (Schema 17).^[176]



Schema 17 Prinzipielle Synthese von Acridiziniumsalzen

Acridiziniumsalze verursachen nach photolytischer Aktivierung die spontane Spaltung von DNA-Strängen in An- und Abwesenheit von Sauerstoff (Abb. 19). Vor allem die anaerobe Spaltung ist hochinteressant, da für die meisten bekannten Mechanismen von DNA-Strangbrüchen die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich ist (vgl. Kapitel 3.1.3). Abbildung 19 zeigt, wie effektiv die Acridiziniumsalze **78**, **81**, **82** und **85** das Plasmid pBR322 unter aeroben und anaeroben Bedingungen spalten.

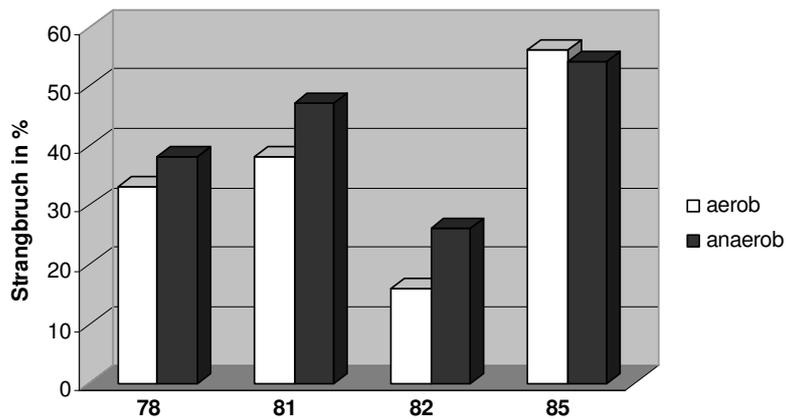


Abb. 19 Strangbruchausbeuten nach Bestrahlung von pBR322 unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen in Anwesenheit der Acridiziniumsalze **78**, **81**, **82** und **85**

Durch Bestrahlung der Acridiziniumsalze ist nicht nur eine Reaktion mit der DNA möglich, sondern es kann auch zu einer Photodimerisierung kommen.^[173] Dabei können theoretisch vier verschiedene Reaktionsprodukte entstehen, von denen aber fast ausschließlich (> 95%) die Dimere **87** und **88** in einem Verhältnis von 1:1 gebildet werden (Abb. 20).

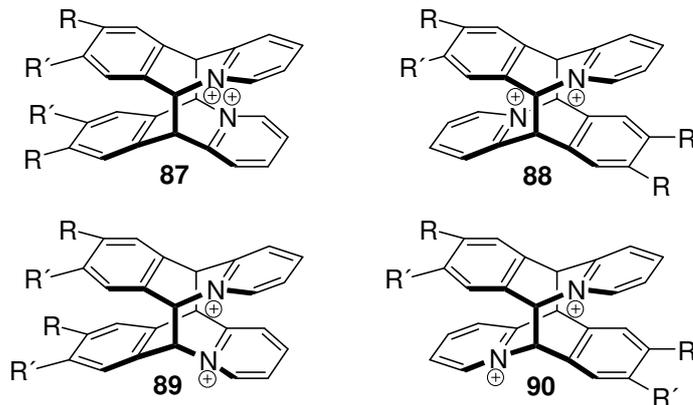


Abb. 20 Photodimerisierungsprodukte

Von Ihmels *et al.*^[171-175] wurden auch die Bindungseigenschaften verschiedener Acridiziniumsalze mit der DNA untersucht. Dazu wurden Circular dichroismus- (CD-), Linear dichroismus- (LD-) und ¹H-NMR-Spektroskopie verwendet. Man unterscheidet grundsätzlich drei Bindungsarten:

1. Interkalation parallel zu den Basenpaaren
2. Bindung in der großen oder der kleinen Furche
3. Assoziation am Zuckerphosphatrückgrat

Während die beiden ersten Bindungsarten durch π,π -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht werden, handelt es sich bei der letzten ausschließlich um elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem positiv geladenen Substrat und dem negativ geladenen Zuckerphosphatrückgrat der DNA.

Ihmels *et al.*^[171-175] haben gezeigt, dass die Bindungseigenschaften der Acridiziniumsalze mit DNA von den elektronischen Eigenschaften und dem Substitutionsmuster abhängen. So wurden Verbindungen gefunden, die eher in der DNA interkalieren, während andere auch eine Bindung am DNA-Rückgrat zeigen.^[171,175]

Durch spektrophotometrische und spektrofluorimetrische Titrations konnten für alle Acridiziniumsalze stark bindende Wechselwirkungen (10^4 - 10^5 M⁻¹) mit der DNA nachgewiesen werden. Außerdem haben Messungen mit synthetischen Oligonukleotiden (Poly[dAdT]-Poly[dAdT] und Poly[dGdC]-Poly[dGdC]) ergeben, dass eine Bindungspräferenz für GC-Basenpaare vorliegt.^[171,172,175] Auch eine Primer-Verlängerungs-Analyse nach Bestrahlung des Plasmids pUC18 in Anwesenheit von Acridiziniumsalzen ergab, dass hauptsächlich Strangbrüche an Guanin (70%) auftraten.^[171]

3.2 AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung des Mechanismus des DNA-Strangbruchs durch Acridiziniumsalze. Dabei ist der anaerobe Strangbruch von besonderem Interesse.

Die Aufklärung der Strangbruchmechanismen unter aeroben und anaeroben Bedingungen soll durch gezielte Untersuchung der folgenden Fragen erfolgen:

- Hat die Stranglänge einen Einfluss auf die Strangbruchausbeute?
- Ist Interkalation eine Voraussetzung für die Schädigung?
- Welchen Einfluss haben die Konzentrationen und Konzentrationsverhältnisse von DNA und Acridiziniumsalz?
- Entstehen nur spontane Strangbrüche oder auch alkalilabile Produkte?
- Ist der Mechanismus des Strangbruchs unter aeroben und anaeroben Bedingungen der gleiche?
- Welchen Einfluss haben die Basen bzw. die Sequenz?

In den folgenden Kapiteln sollen diese Fragen beantwortet und der Mechanismus des DNA-Strangbruchs durch Acridiziniumsalze aufgeklärt werden.

3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUM DNA-STRANGBRUCH DURCH ACRIDIZINIUMSALZE

Wie in Abb. 19 zu sehen ist, zeigt das 9-bromsubstituierte Acridiziniumsalz **85** die höchsten Strangbruchausbeuten. Es wurde deswegen für die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, verwendet, und wird im Folgenden nur noch als Acridiziniumsalz (Acrid) bezeichnet (Abb. 21).

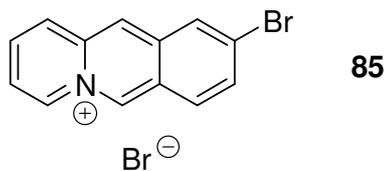
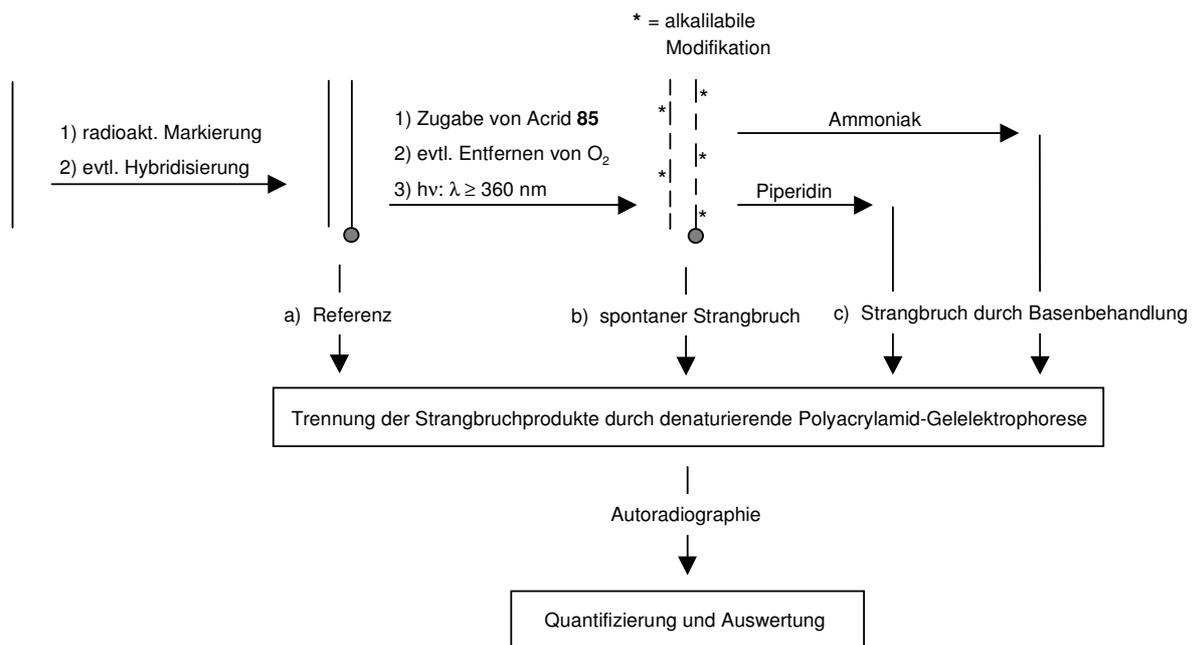


Abb. 21 In dieser Arbeit verwendetes Acridiziniumsalz **85**

Als DNA wurde für das in Abb. 19 gezeigte Experiment ein Plasmid verwendet (pBR322). Mit diesem Plasmid können Strangbrüche effektiv detektiert werden, es kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, an welcher Stelle genau der Strang gespalten wird. Dies ist aber von entscheidender Bedeutung, wenn man den Mechanismus des Strangbruchs durch Acridiziniumsalze verstehen will. Deshalb wurden für die folgenden Experimente hauptsächlich Oligonukleotide verwendet. Sie haben den Vorteil, dass sie variabel bezüglich ihrer Länge und Sequenz sind und sowohl als Einzel- wie auch als Doppelstrang verwendet werden können.

Alle Untersuchungen erfolgten durch die Analyse der Bestrahlungslösung. Um trotz der geringen Mengen genaue Werte zu erhalten, werden die DNA-Stränge bzw. Oligonukleotide wie auch bei den Untersuchungen zum Elektronentransfer radioaktiv markiert (vgl. Schema 4, Kapitel 2.1.2).

Von der zu untersuchenden Lösung (ca. 200 μ l) werden vor (Referenz) und nach der Bestrahlung Proben (ca. 30 μ l) entnommen. Die Bestandteile dieser Proben werden entweder direkt oder nach entsprechender Behandlung (Piperidin, Ammoniak) mithilfe von Gelelektrophorese aufgetrennt und dann durch Autoradiographie quantifiziert (Schema 18).



Schema 18 Prinzip der Analytik

Aus der Differenz der Menge des intakten Stranges vor und nach der Bestrahlung (und Behandlung) erhält man folgende Angaben:

- a – b: nur spontaner Strangbruch
- a – c: Summe aus spontanem Strangbruch und alkalilabilen Modifikationen
- b – c: nur alkalilabile Modifikationen

Zusätzlich ist auch die Detektion von Strangbruchprodukten (verkürzten Strängen) von großem Interesse. Diese gelang jedoch nur in Ausnahmefällen. Grund dafür können zu kleine Strangbruchprodukte sein, die mit der herkömmlichen Gelelektrophorese nicht beobachtet werden können.

Dagegen kann die Abnahme des intakten Oligonukleotids sehr genau beobachtet werden. Dadurch können quantitative Aussagen zum Strangbruch gemacht werden.

Die genauen Reaktionsbedingungen sowie die exakten Strangbruchwerte der im Folgenden dargestellten Versuche sind im experimentellen Teil vollständig beschrieben (Kapitel 6.3) und dort den entsprechenden Abbildungen zugeordnet.

3.3.1 EINFLUSS DER STRANGLÄNGE

Nach ersten Experimenten mit dem Plasmid pBR322, die die Ergebnisse von Ihmels *et al.*^[171-175] bestätigten, sollte nun untersucht werden, ob die Länge der Doppelstränge (Anzahl der Basenpaare) einen Einfluss auf die Strangbruchausbeute hat.

Dazu wurde eine DNA-Leiter in Gegenwart von Acridiziniumsalz **85** unter aeroben Bedingungen bestrahlt. Zuvor wurden die einzelnen Bestandteile radioaktiv markiert, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und diese mithilfe von Gelelektrophorese in ihre Bestandteile aufgetrennt. Bei der verwendeten DNA-Leiter handelt es sich um ein enzymatisch verdautes Plasmid (pUC19). Sie enthält die folgenden Bruchstücke: 501 Bp, 489 Bp, 404 Bp, 331 Bp, 242 Bp, 190 Bp, 147 Bp, 111 Bp, 110 Bp, 67 Bp, 34 Bp (zwei verschiedene), 26 Bp.

Abbildung 22 zeigt die prozentuale Abnahme der Anteile ausgewählter Bestandteile mit der Zeit. Es wird deutlich, dass die Anteile der langen Stränge (501 und 331 Bp) schneller abnehmen als die der kurzen (67 Bp).

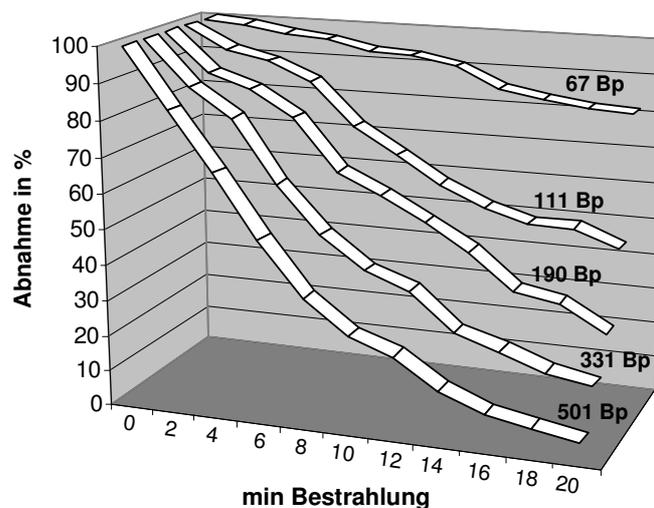


Abb. 22 Prozentuale Abnahme ausgewählter Doppelstränge

Nach den oben präsentierten Ergebnissen, ist zu vermuten, dass die Länge der Doppelstränge einen Einfluss hat: Lange Stränge (> 111 Bp) werden effizienter gebrochen als kurze (< 111 Bp). Dabei müssen jedoch zwei Dinge berücksichtigt werden: Zum einen ist noch nicht bekannt, welchen Einfluss die Sequenz spielt. Zum anderen muss man einen statistischen Effekt berücksichtigen. Betrachtet man die Zahl der Basenpaare, so gibt es wesentlich weniger Basenpaare in kurzen als in langen Strängen. Zieht man die Grenze bei 120 Basenpaaren, so sind

nur 14 % aller Basenpaare in kurzen Strängen vorhanden und 86 % in langen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein langer Doppelstrang gebrochen wird, ist also viel größer. Außerdem wurde ein Verhältnis von Acridiziniumsalz zu Basenpaaren von 1:4 verwendet, die verschiedenen Bestandteile konkurrieren also um das Acridiziniumsalz.

Deswegen wurde ein neues Experiment durchgeführt, bei dem ein Überschuss von Acridiziniumsalz (Acrid: Bp=100:1) und gleiche Konzentrationen von Basenpaaren (bei langen und kurzen Strängen) vorlagen. Verwendet wurden ein kurzer, synthetischer Doppelstrang **91a/b** mit gemischter Sequenz (Abb. 23) und ein Ausschnitt aus einem Plasmid (lacZ').



Abb. 23 Sequenz der komplementären Oligonukleotide **91a** und **91b**

Um gleiche Konzentrationen zu gewährleisten, wurden 32 pmol **91a/b** (21 Bp) und 1 pmol lacZ' (670 Bp) verwendet (Tabelle 7). So liegen in beiden Fällen gleiche Konzentrationen von Basenpaaren vor. Mit der Bezugsgröße Basenpaare lassen sich auch Konzentrationen unterschiedlich langer DNA-Stränge vergleichen, sie wird daher für den Rest dieser Arbeit als relevante Größe verwendet.

	Lösung A	Lösung B
DNA-Doppelstrang	32 pmol 91a/b	1 pmol lacZ'
Basenpaare	32 pmol x 21 = 672 pmol	1 pmol x 670 = 670 pmol
Acridiziniumsalz	67 nmol	67 nmol
Acrid : Bp	100 : 1	100 : 1

Tabelle 7 Konzentrationen

Es wurde unter aeroben und anaeroben Bedingungen je vier Minuten bei einer Wellenlänge von $\lambda \geq 360$ nm bestrahlt und die Bestrahlungslösung dann per Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend quantifiziert. Dabei ergibt sich ein anderes Bild als es bei der Untersuchung der DNA-Leiter der Fall war.

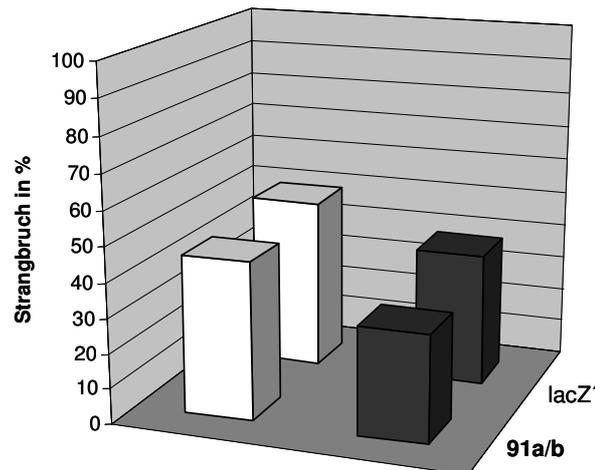


Abb. 24 Strangbruch von **91a/b** und lacZ' nach Bestrahlung unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen

Wie Abbildung 24 zeigt, ist der Unterschied im Strangbruch nur minimal (< 10%, innerhalb der Fehlergrenze). Daraus kann man schließen, dass die unterschiedlich großen Strangbruchraten der Abbildungen 21 und 22 nur durch die Sequenz oder durch statistische Effekte verursacht werden. Die Länge der DNA-Stränge hat dagegen keinen Einfluss. Das bedeutet, dass für zukünftige Untersuchungen synthetische Oligonukleotide definierter Länge und Sequenz verwendet werden können.

3.3.2 KONTROLLEXPERIMENTE

Um sicherzugehen, dass der beobachtete Strangbruch auch wirklich vom Acridiziniumsalz **85** verursacht wird, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt: Zum einen wurden Bestrahlungen von lacZ' unter den exakt gleichen Bedingungen mit und ohne Acridiziniumsalz **85** durchgeführt (Abb. 25). Dieses Experiment zeigte, dass der beobachtete Strangbruch tatsächlich ausschließlich durch das Acridiziniumsalz verursacht wird. Ist kein Acridiziniumsalz in der Lösung vorhanden, kann keine Abnahme des intakten Strangs detektiert werden. Dies zeigt auch deutlich, dass die Bestrahlung an sich nicht zu einer Schädigung der DNA führt, was aufgrund der relativ hohen Wellenlänge der Strahlung ($\lambda \geq 360$ nm) auch nicht zu erwarten war.

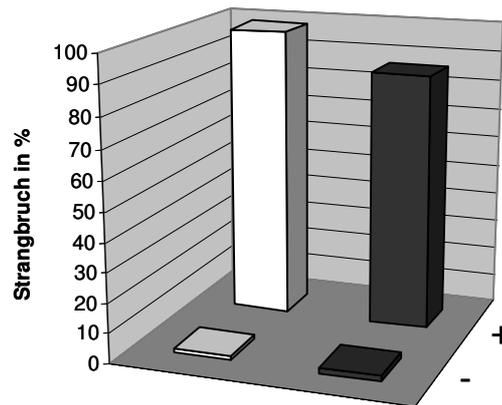


Abb. 25 Strangbruch von lacZ' nach Bestrahlung mit (+) und ohne (-) Acridiziniumsalz **85** unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen

Zum anderen wurde überprüft, ob die Bestrahlung nötig ist. Dazu wurde lacZ' unter aeroben und anaeroben Bedingungen einmal für 20 Minuten bestrahlt und einmal unter Lichtausschluss für 20 Minuten bei 20°C inkubiert. Bei der Analyse zeigte sich, dass es ohne Bestrahlung zu keinem nennenswerten Strangbruch kam (Abb. 26). Die Bestrahlung ist also notwendig, um die Acridiziniumsalze in den für den Strangbruch benötigten angeregten Zustand zu versetzen.

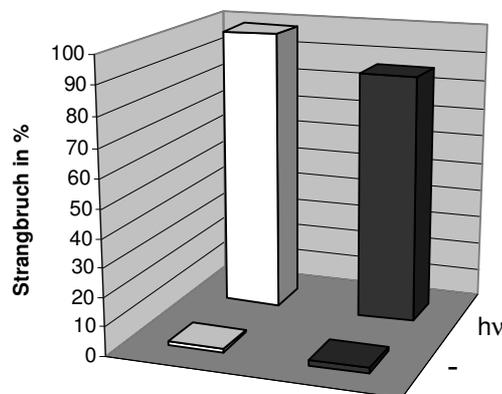


Abb. 26 Strangbruch von lacZ' mit (hv) und ohne (-) Bestrahlung in Gegenwart von Acridiziniumsalz **85** unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen

Es konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Strangbruch ausschließlich durch das Acridiziniumsalz **85** verursacht wird. Außerdem ist die Bestrahlung nötig, um das Acridiziniumsalz entsprechend zu aktivieren.

3.3.3 VERGLEICH VON EINZEL– UND DOPPELSTRÄNGEN

Mit der Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden ist auch die Bestrahlung von Einzel- und Doppelsträngen möglich. Diese ist von entscheidender Bedeutung, um die Rolle der Interkalation zu untersuchen. Von Acridiziniumsalzen ist bekannt, dass sie in der DNA interkalieren (vgl. Kapitel 3.1.4). Deswegen wurde vermutet, dass der Strangbruch durch Reaktion der DNA mit den interkalierenden Acridiziniumsalzen verursacht wird. Werden die beobachteten Strangbrüche tatsächlich durch interkalierende Acridiziniumsalze verursacht, sollten nur Brüche bei Doppelsträngen, aber nicht bei Einzelsträngen zu beobachten sein. Um dies zu untersuchen, wurde das 21mer **91b** radioaktiv markiert und dann als Einzelstrang (**91b**) und als Doppelstrang (**91a/b**) in Anwesenheit des Acridiziniumsalzes **85** unter aeroben und anaeroben Bedingungen bestrahlt. Dabei wurden die gleichen Konzentrationen von Acridiziniumsalz und Basen bzw. Basenpaaren verwendet (Tabelle 8).

	Lösung A	Lösung B
DNA-Doppelstrang	1 pmol 91b	1 pmol 91a/b
Basen(paare)	1 pmol x 21 = 21 pmol	1 pmol x 21 = 21 pmol
Acridiziniumsalz	2.1 nmol	2.1 nmol
Acrid : Bp	100 : 1	100 : 1

Tabelle 8 Konzentrationen

Abbildung 27 zeigt das Ergebnis: Beim Einzelstrang konnte in Bezug auf die Strangbruchausbeute fast kein Unterschied zum Doppelstrang festgestellt werden. Unter anaeroben Bedingungen konnten sogar geringfügig mehr Strangbrüche beim Einzelstrang beobachtet werden.

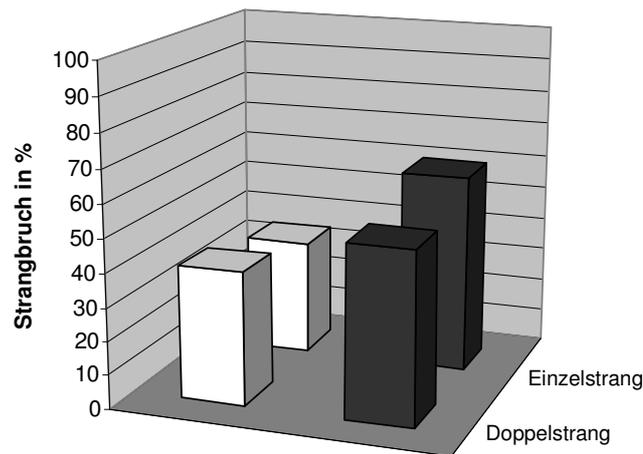


Abb. 27 Vergleich des Strangbruchs von Einzel- und Doppelstrang nach Bestrahlung unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen (21 pmol Bp)

Dieser Effekt wird bei höherer Konzentration noch deutlicher (Abb. 28). Bei dreissigfacher Konzentration (630 pmol Basenpaare) finden unter anaeroben Bedingungen ca. 20 % mehr Strangbrüche bei Einzel- als bei Doppelsträngen statt. Ein möglicher Grund dafür könnte die bessere Zugänglichkeit von Einzelsträngen gegenüber Doppelsträngen sein.

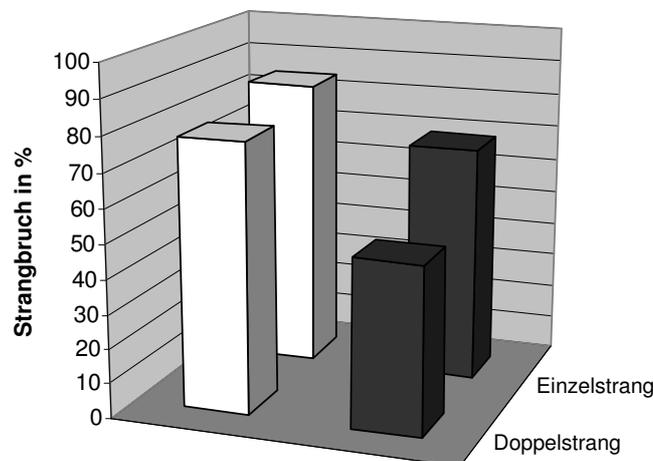


Abb. 28 Vergleich des Strangbruchs von Einzel- und Doppelstrang nach Bestrahlung unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen (630 pmol Bp)

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Strangbruchraten von Einzelsträngen genauso groß oder sogar größer sind als die von Doppelsträngen. Die Interkalation ist folglich keine Voraussetzung für den Strangbruch. Vielmehr wird er durch die sich frei in Lösung befindenden Acridiziniumsalze verursacht. Um diesen Mechanismus aufklären zu können, soll im nächsten

Kapitel der Einfluss des Verhältnisses von Acridiziniumsalz zu Basen bzw. Basenpaaren und der Einfluss der absoluten Konzentration untersucht werden.

3.3.4 EINFLUSS DER KONZENTRATION UND DES VERHÄLTNISSSES VON ACRIDIZINIUMSALZ ZU BASEN

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus des aeroben und anaeroben Strangbruchs soll nun der Einfluss der Konzentration von Basenpaaren und Acridiziniumsalz untersucht werden. Als Bezugsgröße dienen dabei die Bestrahlungsbedingungen von Ihmels *et al.*^[175] (Tabelle 9).

	Gehalt (berechnet auf 200 μ l)
pBR322 (4361 Bp)	4 μ g = 1.45 pmol
Basenpaare	1.45 pmol x 4361 = 6.3 nmol
Acridiziniumsalz	10 nmol
Acrid : Bp	1.6 : 1

Tabelle 9 Bezugskonzentrationen

Ausgehend von diesen Werten soll nun die Konzentration an Basenpaaren erniedrigt werden und das Verhältnis von Acridiziniumsalz zu Basenpaar variiert werden. Zusätzlich sollen die bestrahlten Oligonukleotide auf basenlabile Modifikationen untersucht werden. Deswegen wird nach der Bestrahlung zusätzlich noch eine Ammoniak- oder Piperidinspaltung durchgeführt. Zuerst sollte bei entsprechender Konzentration (6.7 nmol Bp) das Verhältnis von Acridiziniumsalz zu Basenpaaren variiert werden (Abb. 29a), dann unter stark verminderter Konzentration (67 pmol Bp, Abb. 29b). Verwendet wurde dazu der bereits bekannte Doppelstrang **91a/b**.

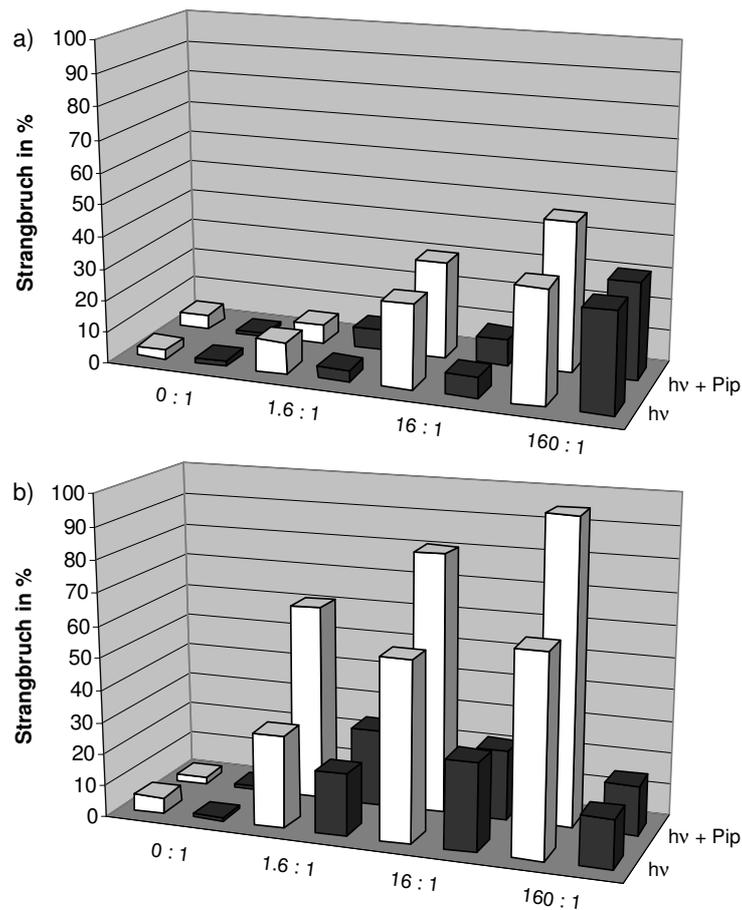


Abb. 29 Vergleich des Strangbruchs beim Doppelstrang **91a/b** bei niedriger (a) und hoher (b) Konzentration nach Bestrahlung unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen mit verschiedenen Acrid:BP-Verhältnissen vor (hv) und nach Piperidinspaltung (hv + Pip)

Unter aeroben Bedingungen kommt es mit steigendem Verhältnis von Acridiziniumsalz zu Basenpaaren auch zu einem Anstieg der Strangbruchrate. Dies konnte unter anaeroben Bedingungen nicht beobachtet werden. Lediglich bei der niedrigen Konzentration kommt es erst bei einem Verhältnis von 160 (Acrid:BP=160:1) zu einem nennenswerten Strangbruch. Dies kann daran liegen, dass bei niedriger Gesamtkonzentration erst bei 160:1 eine genügend große Acridiziniumsalzkonzentration erreicht wird (Grenz- oder Schwellenkonzentration). Ein weiterer Unterschied zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen ist die Zunahme des Strangbruchs durch die Piperidinspaltung. Diese ist lediglich unter aeroben Bedingungen zu beobachten und beträgt bis zu 30 %.

Wird das entsprechende Experiment mit Einzelsträngen durchgeführt, erhält man vergleichbare Ergebnisse (Abb. 30). Allerdings sind die Effekte stärker ausgeprägt. Sehr deutlich ist hier der oben beschriebene Schwellenwert bei niedriger Konzentration unter aeroben Bedingungen

sichtbar. Ebenfalls deutlicher ausgeprägt sind die Zunahme des Strangbruchs mit steigendem Verhältnis von Acridiziniumsalz zu Basen und die Zunahme durch Piperidinbehandlung.

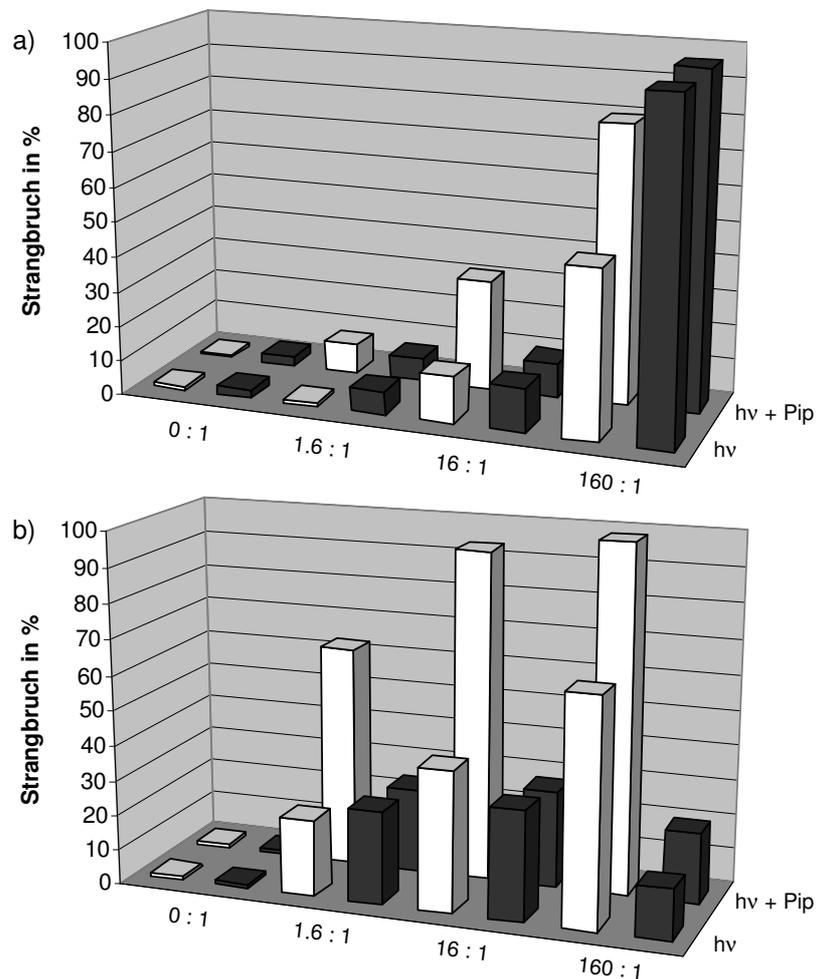


Abb. 30 Vergleich des Strangbruchs beim Einzelstrang **91b** bei niedriger (a) und hoher (b) Konzentration nach Bestrahlung unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen mit verschiedenen Acrid:Bp-Verhältnissen vor (hv) und nach Piperidinspaltung (hv + Pip)

Um ein sequenzspezifisches Verhalten auszuschließen, wird noch ein anderer Einzel- bzw. Doppelstrang untersucht. Dabei handelt es sich um ein 33mer zufälliger Sequenz (Abb. 29).



Abb. 31 Sequenz der komplementären Oligonukleotide **92a** und **92b**

Es wurden Bestrahlungen des Einzelstrangs **92b** und des Doppelstrangs **92a/b** bei hoher Konzentration (6.6 nmol Bp) und bei verschiedenen Verhältnissen von Acridiziniumsalz zu

Basen(paar) durchgeführt (Abb. 32). Unter aeroben und anaeroben Bedingungen wurde nach der Bestrahlung zusätzlich eine Ammoniak- und eine Piperidinspaltung vorgenommen.

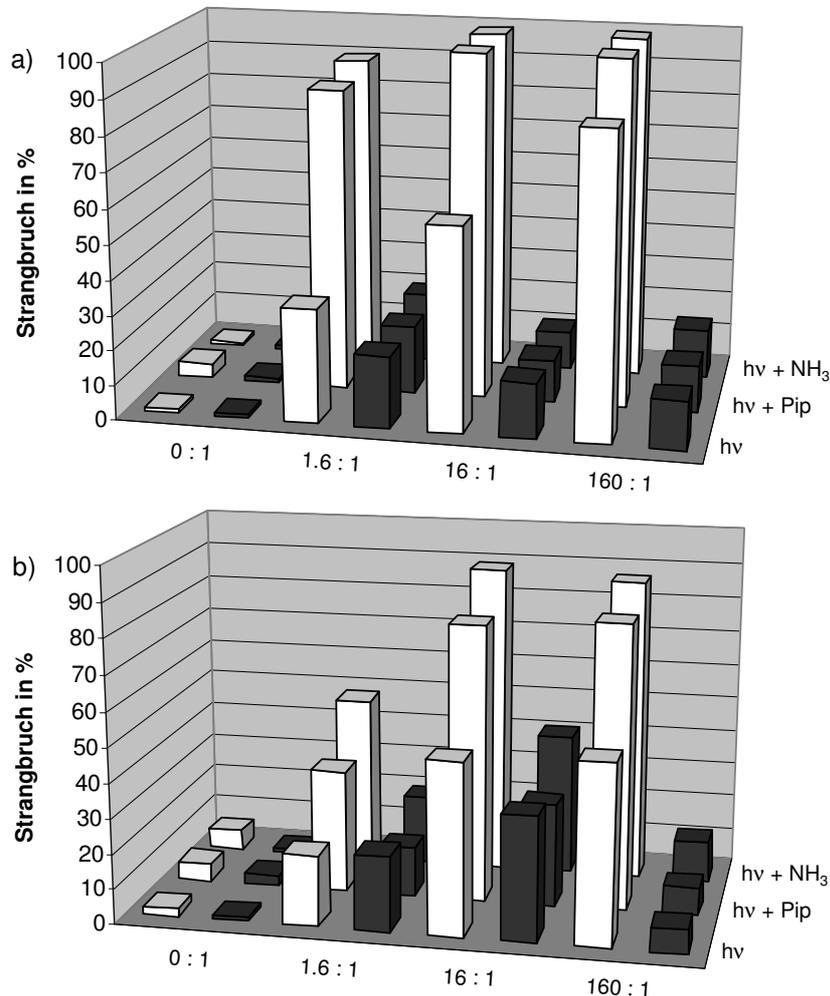


Abb. 32 Vergleich des Strangbruchs von Doppel- (a: **92a/b**) und Einzelstrang (b: **92b**) bei hoher Konzentration nach Bestrahlung unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen mit verschiedenen Acrid:BP-Verhältnissen vor (hv) und nach Piperidin- (hv + Pip) und Ammoniakspaltung (hv + NH₃)

Die Ergebnisse bestätigen die oben beschriebenen Effekte: Die Strangbruchrate ist bei Einzelsträngen genauso groß oder größer als bei Doppelsträngen (vgl. Abb. 29a/30a und Kapitel 3.3.2). Bei großen Verhältnissen von Acridiziniumsalz zu Basenpaaren (> 10) beobachtet man unter aeroben Bedingungen mehr Strangbruch als unter anaeroben Bedingungen. Unter aeroben Bedingungen ist auch die Zunahme des Strangbruchs mit steigendem Acrid:Basen(paar)-Verhältnis viel ausgeprägter. Auffällig ist auch der Effekt der Piperidin- bzw.

Ammoniakspaltung: Während unter aeroben Bedingungen nach der Basenbehandlung viel mehr Strangbrüche beobachtet werden können, kommt es unter anaeroben Bedingungen zu keiner Zunahme.

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse sollen noch einmal zusammengefasst werden:

- Die Stranglänge (Anzahl der Basenpaare) hat keinen Einfluss auf das Strangbruchverhalten (vgl. Kapitel 3.3.1).
- Einzelstränge werden genauso gut oder besser gebrochen als Doppelstränge (vgl. Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Daraus folgt, dass der Strangbruch nicht von interkalierenden Acridiziniumsalzen verursacht wird.
- Unter aeroben Bedingungen steigt mit dem Verhältnis von Acridiziniumsalz zu Basen(paar) auch die Strangbruchrate, unter anaeroben Bedingungen nicht.
- Bei niedriger Konzentration scheint unter anaeroben Bedingungen eine gewisse Mindestkonzentration (Schwellenwert) von Acridiziniumsalz erforderlich zu sein, damit es zu einem Strangbruch kommt.
- Betrachtet man nur den spontanen Strangbruch, so sind die Werte für aerobe und anaerobe Bedingungen bei niedrigen Verhältnissen von Acridiziniumsalz zu Basen(paar) (< 10) etwa gleich. Dies entspricht den Ergebnissen von Ihmels *et al.*^[171,175] Bei höheren Verhältnissen (>10) beobachtet man unter aeroben Bedingungen mehr Strangbrüche.
- Unter aeroben Bedingungen kommt es durch Piperidin- und Ammoniakspaltung zu einer deutlichen Zunahme der Strangbruchrate. Unter anaeroben Bedingungen kann man keinen derartigen Effekt beobachten.

3.3.5 URSACHE DER SCHÄDIGUNG UNTER AEROBEN UND ANAEROBEN BEDINGUNGEN

Aufgrund der bisher gemachten Beobachtungen konnten folgende Aussagen getroffen werden:

- Es gibt zwei verschiedene Strangbruchmechanismen: Einen für anaerobe Bedingungen, der nur spontane Strangbrüche verursacht, und einen für aerobe Bedingungen, der zu spontanen Strangbrüchen und alkalilabilen Modifikationen führt.

→ Da der Strangbruch nicht von interkalierenden, sondern von "freien" Acridiziniumsalzen verursacht wird, ist es möglich, dass nicht die Acridiziniumsalze direkt mit der DNA reagieren. Stattdessen könnten von den durch Bestrahlung angeregten Acridiziniumsalzen andere reaktive Spezies gebildet werden, die dann mit der DNA reagieren.

Aufgrund dieser Aussagen wurden folgende Thesen aufgestellt: Unter aeroben Bedingungen überträgt das photochemisch angeregte Acridiziniumsalz dem im Wasser gelösten Sauerstoff seine Triplett-Energie und generiert so Singulett-Sauerstoff. Dieser reagiert mit der DNA in der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Weise (Schema 7-9) und führt zu alkalilabilen Modifikationen und Strangbrüchen ausschließlich am Guanin. Unter anaeroben Bedingungen generiert das angeregte Acridiziniumsalz aus Wassermolekülen Hydroxylradikale. Diese schädigen die DNA auf vielfältige Weise (Kapitel 3.1.3) und führen zu unselektiven Strangbrüchen.

Um diese Theorien zu überprüfen, wurde der Einzelstrang **91b** unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Acridiziniumsalz **85** bestrahlt (Tabelle 10). Dabei sollten durch verschiedene Zusätze weitere Hinweise auf Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale als reaktive Spezies erhalten:

- Zusatz von Natriumazid: Quencher von Singulett-Sauerstoff^[103,177]
- Bestrahlung in D₂O statt H₂O: D₂O führt zu einer erhöhten Bildungsrate von Singulett-Sauerstoff aufgrund einer Verlängerung der Lebensdauer^[100,103,177,178]
- Zusatz von *tert*-Butylalkohol: Fänger von Hydroxylradikalen^[103,179,180]

Die entsprechenden Konzentrationen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

	Referenz	NaN ₃	D ₂ O	<i>tert</i> -BuOH
91b (21 Basen)	300 pmol	300 pmol	300 pmol	300 pmol
Basen	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol
Acridiziniumsalz	10 nmol	10 nmol	10 nmol	10 nmol
Acrid : Bp	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1
Zusatz	kein Zusatz	200 nmol (→ 1 mM)	vollst. Ersatz von H ₂ O durch D ₂ O	20 µmol (→ 100 mM)

Tabelle 10 Konzentrationen (zu Abb. 33)

Unter aeroben Bedingungen führt der Zusatz des Singulett-Sauerstoff-Quenchers Natriumazid zu einer deutlichen Abnahme beim spontanen Strangbruch und bei der Bildung alkalilabiler Modifikationen (Abb. 33). Wird die Bestrahlung in deuteriertem Wasser durchgeführt, ist eine deutliche Zunahme beim spontanen und alkaliinduzierten Strangbruch zu beobachten. Der Zusatz von *tert*-Butylalkohol dagegen hat unter aeroben Bedingungen keinen Einfluss. Unter anaeroben Bedingungen dagegen verhindert die Zugabe von *tert*-Butylalkohol den Strangbruch vollständig. Zusatz von Natriumazid und Verwendung von D₂O haben unter anaeroben Bedingungen keinen Effekt.

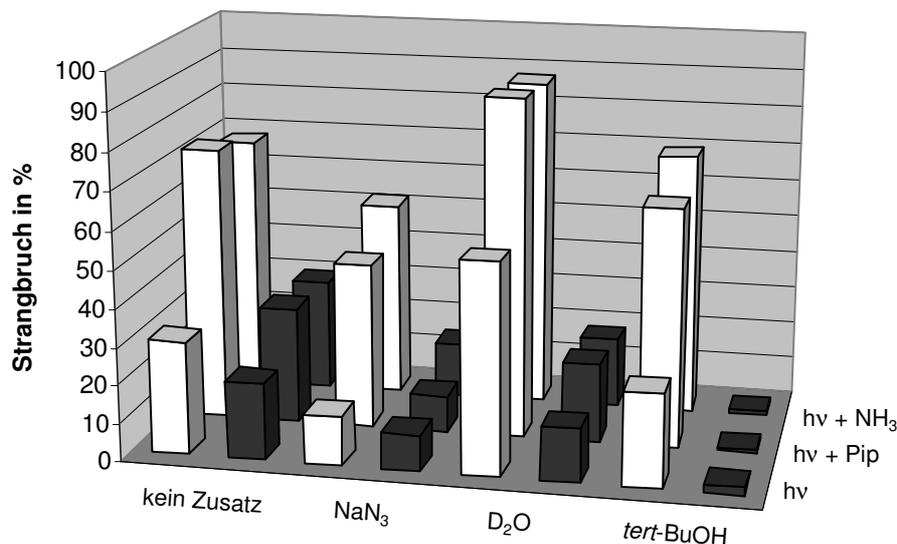


Abb. 33 Strangbruch nach Bestrahlung des Einzelstrangs **91b** unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen bei Verwendung verschiedener Zusätze vor (hv) und nach Piperidin- (hv + Pip) und Ammoniakspaltung (hv + NH₃)

Untersucht wurden auch Dithiothreitol (10 mM) und Spermidin (10 mM). Für sie konnte aber kein eindeutiger Effekt beobachtet werden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie durch Reaktion oder Interaktion mit den Acridiziniumsalzen die Reaktion beeinträchtigen. Mit den Zusätzen Natriumazid, D₂O und *tert*-Butylalkohol konnte dagegen die oben aufgestellte Theorie von Singulett-Sauerstoff als reaktive Spezies unter aeroben Bedingungen bzw. Hydroxylradikalen als reaktive Spezies unter anaeroben Bedingungen bestätigt werden.

3.3.6 EINFLUSS DER SEQUENZ

Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, reagiert Singulett-Sauerstoff ausschließlich mit Guanin. Neben 8-oxoGuanin **34** entstehen dabei auch direkte Strangbrüche und, in geringeren Ausbeuten, andere alkalilabile Modifikationen. Deshalb sollten unter aeroben Bedingungen nur Strangbrüche bei Oligonukleotiden erwartet werden, die Guanin enthalten.

Um dies zu überprüfen, wurden die Homooligonukleotide **93**, **94**, **95** und **96** (Abb. 34) unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Gegenwart des Acridiziniumsalzes **85** bestrahlt.

5'- AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA - 3'	93
5'- GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG - 3'	94
5'- CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC - 3'	95
5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT - 3'	96

Abb. 34 Sequenzen der Homooligonukleotide **93**, **94**, **95** und **96**

Die Konzentrationen und das Verhältnis von Acridiziniumsalz zu Basenpaaren entsprach den Bezugskonzentrationen (Tabelle 9). Das Ergebnis zeigt eine starke Basenselektivität in Anwesenheit von Sauerstoff. So konnte unter aeroben Bedingungen lediglich für den Poly-G-Strang **94** effektiver Strangbruch beobachtet werden (Abb. 35), der nach entsprechender Alkalibehandlung nahezu quantitativ verlief. Bei den anderen Homooligonukleotiden dagegen konnten sowohl beim spontanen Strangbruch, wie auch beim alkaliinduzierten Strangbruch keine Werte über 10 % festgestellt werden (innerhalb der Fehlergrenze).

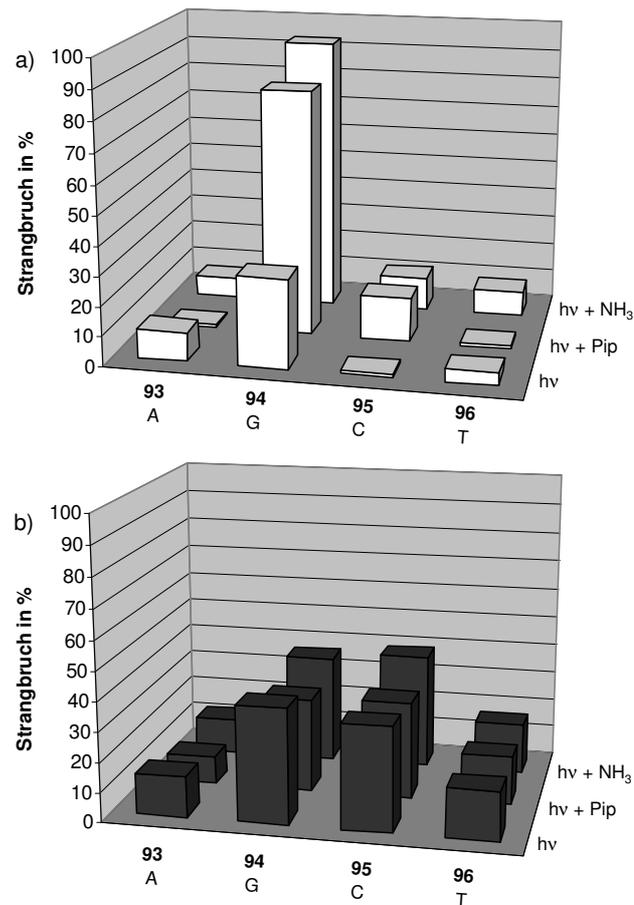


Abb. 35 Strangbruch nach Bestrahlung der Homooligonukleotide **93** - **96** unter aeroben (a: weiße Säulen) und anaeroben (b: schwarze Säulen) Bedingungen vor (hv) und nach Piperidin- (hv + Pip) und Ammoniakspaltung (hv + NH₃)

Unter anaeroben Bedingungen konnte für alle Stränge eine vergleichbare Anzahl von Strangbrüchen detektiert werden (Abb. 35). Der anaerobe Strangbruch ist also weitgehend unabhängig von der Nukleobase bzw. der Sequenz. Dies überrascht nicht, da Hydroxylradikale mit allen Nukleobasen oder direkt mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat reagieren können (vgl. Kapitel 3.1.3).

Obwohl dieses Experiment deutlich die Sequenzdependenz unter aeroben Bedingungen zeigt, bleiben doch Unklarheiten. Die hier verwendeten DNA-Stränge sind Homooligonukleotide, die aufgrund ihrer ungewöhnlichen Sequenz in der Lage sind Überstrukturen auszubilden. Vor allem von einem Poly-G-Strang wie **94** sind solche Überstrukturen (Quadruplex- bzw. Quartett-Bildung) bekannt und ausführlich untersucht.^[181-183] Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese deutliche Präferenz für den Poly-G-Strang **94** auf seine besondere Struktur zurückzuführen ist.

Deswegen wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt, bei dem statt der Homooligonukleotide **93 – 96** DNA-Stränge gemischter Sequenz und unterschiedlicher Anzahl an Guaninbasen verwendet wurden (Abb. 36).

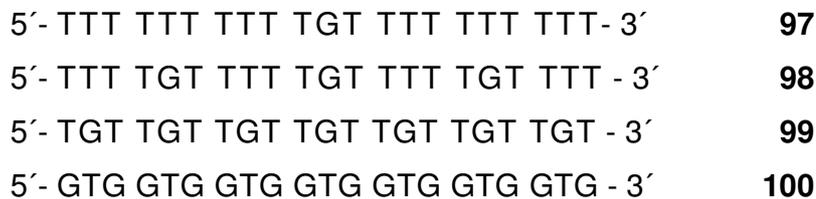


Abb. 36 Sequenzen der gemischten Stränge **97, 98, 99** und **100**

Mit diesen gemischten Oligonukleotiden **97 – 100** und dem Poly-T-Strang **96** wurde das oben gezeigte Experiment wiederholt. Dabei konnte die beobachtete G-Selektivität des aeroben Strangbruchs und die Sequenz-Unabhängigkeit des anaeroben Strangbruchs bestätigt werden (Abb. 37).

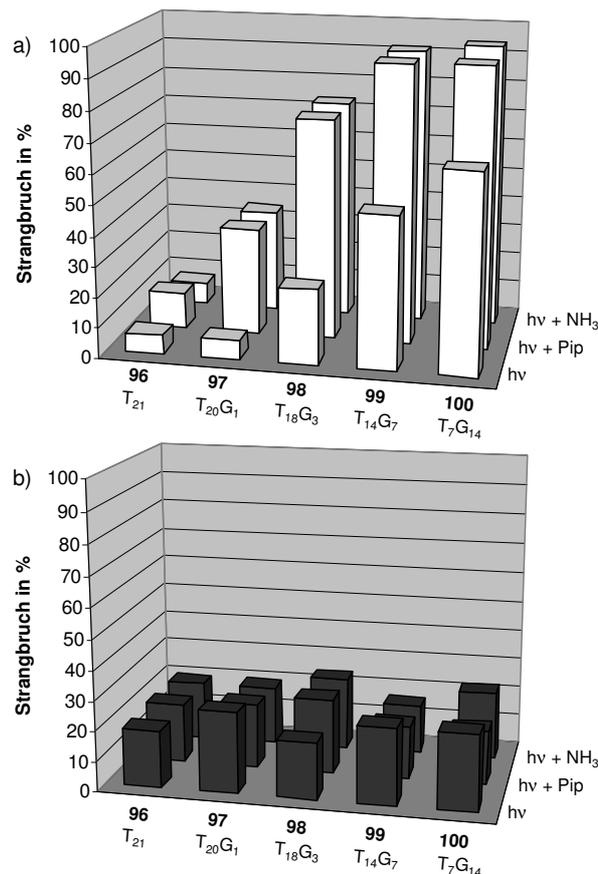


Abb. 37 Strangbruch nach Bestrahlung der Einzelstränge **96 - 100** unter aeroben (a: weiße Säulen) und anaeroben (b: schwarze Säulen) Bedingungen vor (hv) und nach Piperidin- (hv + Pip) und Ammoniakspaltung (hv + NH₃)

Deutlich erkennbar sind die unter aeroben Bedingungen nach der Piperidinbehandlung zusätzlich auftretenden Spots. Diese entsprechen denen der Maxam-Gilbert-Sequenzierung^[184,185]. Das bedeutet, dass die zusätzlichen Strangbrüche ausschließlich an den Guaninen auftreten. Diese wurden durch die Reaktion mit Singulett-Sauerstoff oxidativ geschädigt unter Bildung von 8-oxoGuanin und anderen alkalilabilen Modifikationen (vgl. Kapitel 3.1.2). Diese oxidativ geschädigten Guanine sind wahrscheinlich auch für den nach der Bestrahlung auftretenden "Schmiereffekt" (Lane B, aerobe Bedingungen) verantwortlich. Unter anaeroben Bedingungen kann man dagegen gleichmäßigen Strangbruch an allen Nukleobasen feststellen. Es besteht auch kein Unterschied vor und nach der Piperidin- und Ammoniakbehandlung.

Im Kapitel 3.1.2 ist bereits beschrieben worden, dass Singulett-Sauerstoff nicht mit Adenin reagiert und auch kein dem 8-oxoGuanin entsprechendes Produkt von Adenin beobachtet werden konnte.^[103] Um dies zu bestätigen, wurde das oben gezeigte Experiment (Abb. 36/37) noch einmal mit den entsprechenden Adenin-Strängen wiederholt (Abb. 39).

5'- TTT TTT TTT TAT TTT TTT TTT - 3'	101
5'- TTT TAT TTT TAT TTT TAT TTT - 3'	102
5'- TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT - 3'	103
5'- ATA ATA ATA ATA ATA ATA ATA - 3'	104

Abb. 39 Sequenzen der gemischten Stränge **101**, **102**, **103** und **104**

Dabei zeigt sich das erwartete Ergebnis: Unter aeroben Bedingungen kommt es zu keinem Strangbruch (< 10 %) weil kein Guanin im Strang enthalten ist (Abb. 40). Es sind auch keine alkalilabilen Modifikationen wie das entsprechende 8-oxoAdenin zu beobachten. Unter anaeroben Bedingungen wird der übliche, sequenzunspezifische Strangbruch beobachtet.

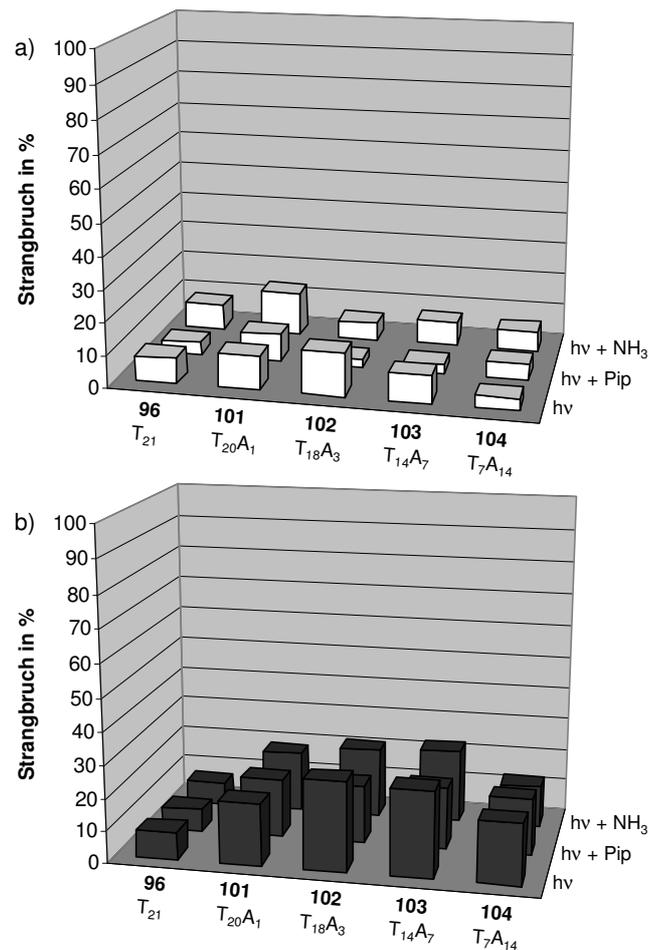


Abb. 40 Strangbruch nach Bestrahlung der Einzelstränge **96** und **101 - 104** unter aeroben (a: weiße Säulen) und anaeroben (b: schwarze Säulen) Bedingungen vor (hv) und nach Piperidin- (hv + Pip) und Ammoniakspaltung (hv + NH₃)

Der Einfluss der Sequenz soll hier noch einmal zusammengefasst werden:

- Unter aeroben Bedingungen findet sowohl der direkte, wie auch der baseninduzierte Strangbruch ausschließlich am Guanin statt. Es ist möglich, die entsprechenden Strangbruchprodukte zu detektieren.
- Durch Piperidin- und Ammoniakspaltung kommt es unter aeroben Bedingungen zu einer großen Zunahme von Strangbrüchen, ebenfalls ausschließlich an den Guaninen. Diese Zunahme kann auf die Bildung alkalilabiler Modifikationen zurückgeführt werden.
- Je mehr Guanine im Strang enthalten sind, desto effizienter ist der Strangbruch unter aeroben Bedingungen.

- Unter anaeroben Bedingungen wird das Ausmaß des Strangbruchs nicht von der Sequenz beeinflusst. Durch Piperidin- oder Ammoniakbehandlung werden keine zusätzlichen Strangbüche verursacht. Der Strangbruch tritt gleichmäßig an allen Nukleobasen auf.

Diese Beobachtungen sind weitere Bestätigungen für Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale als die reaktiven Spezies unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen.

3.3.7 WEITERE BEITRÄGE ZUM AEROBEN UND ANAEROBEN STRANGBRUCH

Alle im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten Bestrahlungen wurden in einem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7.4 vorgenommen. Dieser Puffer enthielt auch Natriumchlorid (50 mM) für die Hybridisierung von Oligonukleotiden zur effektiven Generierung von DNA-Doppelsträngen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde dieser Puffer auch für die Einzelstrangexperimente verwendet, obwohl dort kein Natriumchlorid nötig wäre. In der Literatur sind Fälle bekannt, in denen durch angeregte Photosensibilisatoren (z.B. Anthrachinone) aus Chloridionen Chloratome generiert wurden, die dann die DNA schädigten.^[68,186-190] Diese Art der Schädigung ist der von Hydroxylradikalen sehr ähnlich. Die Entstehung von Chloratomen wäre durch einen Elektronentransfer vom Chloridion zum angeregten Acridizinium denkbar. Um die Beteiligung von Chloratomen am anaeroben Strangbruch auszuschließen, wurden Bestrahlungen in Gegenwart des Acridiziniumsalzes **85** unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit den Einzelsträngen **91b**, **92b** und **99** in Phosphatpuffer (pH 7.4) ohne den Zusatz von Natriumchlorid durchgeführt. Diese wurden mit den entsprechenden Bestrahlungen in pH7.4-Puffer mit Natriumchlorid verglichen (Abb. 41, vgl. Abb. 30a, 32b und 37).

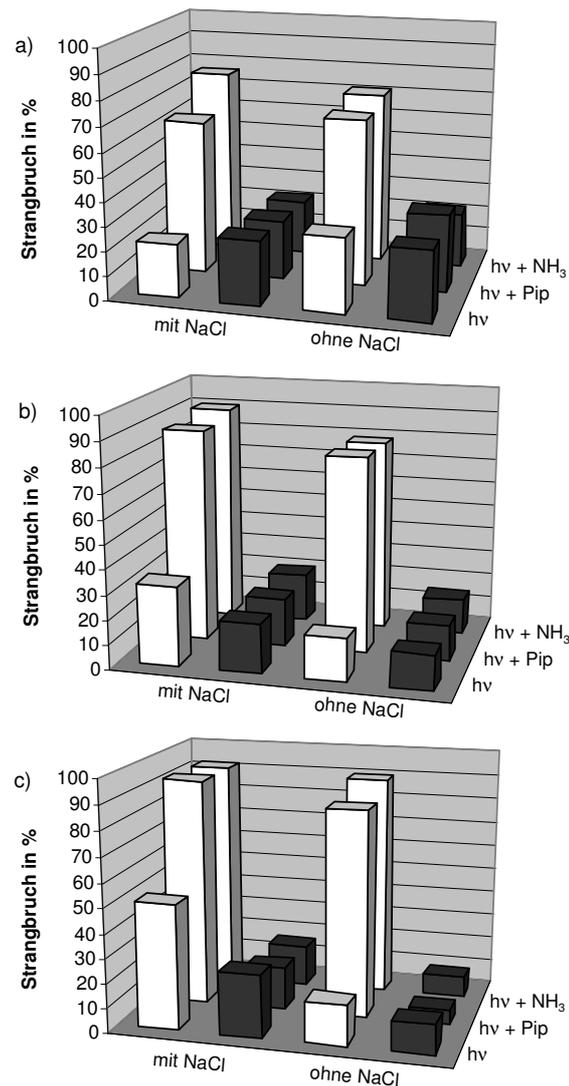


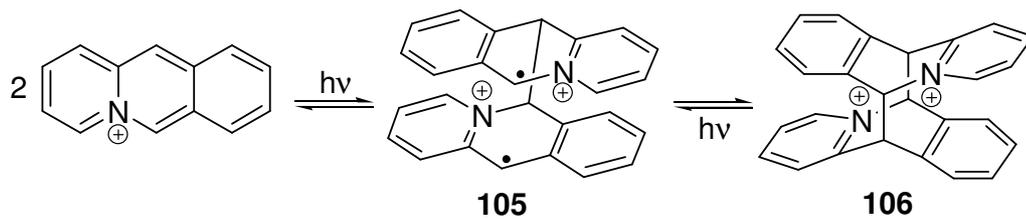
Abb. 41 Strangbruch nach Bestrahlung der Einzelstränge **91b** (a), **92b** (b) und **99** (c) in Phosphatpuffer mit (+) und ohne (-) Zusatz von Natriumchlorid unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen vor (hv) und nach Piperidin- (hv + Pip) und Ammoniakspaltung (hv + NH₃)

Dabei konnte kein Unterschied zwischen den Bestrahlungen mit und ohne Natriumchlorid festgestellt werden. Während für die Oligonukleotide **92b** und **99** etwas weniger spontane Strangbrüche ohne den Zusatz von NaCl detektiert werden konnten, waren es für den Strang **91b** mehr. Insgesamt lässt sich also sagen, dass der Einfluss von Natriumchlorid auf die Strangbruchausbeute gering ist und Chloratome lediglich in geringem Ausmaß zur Schädigung der DNA beitragen. Die Anwesenheit von Bromid dagegen lässt sich nicht vermeiden, da es als Gegenion des Acridiziniumkations (vgl. Abb. 20) immer in Lösung vorhanden sind. Laut Literatur verursachen aber Bromatome nur eine geringe Schädigung der DNA.^[68,186] Von K.

Faulhaber (Arbeitskreis H. Ihmels, Universität Würzburg) wurden außerdem spektrofluorometrische Titrations mit Natriumbromid und -chlorid durchgeführt.^[175] Bei einer entsprechenden Reaktion der Acridiziniumsalze mit den Halogenidionen sollte eine Löschung der Fluoreszenz zu beobachten sein. Diese konnte jedoch im Fall des Bromacridiziniumsalzes **85** für Bromidionen nur in sehr geringem Maß und für Chloridionen gar nicht beobachtet werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass weder der aerobe noch der anaerobe Strangbruch durch Halogenatome verursacht wird.

Für Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale als reaktive Spezies dagegen konnten von K. Faulhaber weitere Hinweise gefunden werden:^[175]

- 1) Durch Laserblitz-Transientenspektroskopie konnten für alle untersuchten Acridiziniumsalze (vgl. Abb. 17) angeregte Tripletzustände detektiert werden, die durch Sauerstoff effizient gelöscht wurden. Dabei wurde festgestellt, dass das in dieser Arbeit verwendete 9-bromsubstituierte Acridiziniumsalz **85** signifikant mehr Triplet bildet, als die übrigen Acridiziniumsalze. Dies kann auf einen internen Schweratomeffekt des Bromsubstituenten zurückgeführt werden.
- 2) Für die Acridiziniumsalze wurden die Triplet-Energien durch Löschversuche mit Substanzen bekannter Tripletenergien bestimmt. Dabei hat das Acridiziniumsalz **85** 1,3-Cyclohexadien (219 kJ/mol) effizient gelöscht. Damit reicht die Tripletenergie dieses Acridiziniumsalzes nicht für einen Energietransfer zu den Nucleobasen aus. Für die Bildung von Singulett-Sauerstoff dagegen ist sie ausreichend, da dessen Tripletenergie nur 92 kJ/mol beträgt (vgl. Abb. 12).
- 3) In Anwesenheit von DNA wurde die Triplet-Lebenszeit der Acridiziniumsalze nicht beeinträchtigt. Es konnte auch kein neuer Transient detektiert werden und die Löschung durch Sauerstoff verlief mit der gleichen Rate wie in Proben reiner Acridiziniumsalze. Das weist darauf hin, dass das an die DNA gebundene (interkalierende) Acridiziniumsalz nicht mit der DNA reagiert und somit nicht direkt für die photoschädigende Wirkung verantwortlich ist. Vielmehr wird die Schädigung indirekt durch "freie" Acridiziniumsalze verursacht.
- 4) Als reaktive Spezies für den anaeroben Strangbruch käme auch das bei der Photodimerisierung und bei der Cycloreversion entstehende Diradikal **105** des Acridiziniumsalzes in Frage (Schema 19).



Schema 19 Entstehung eines Diradikals **105** durch Photodimerisierung oder Cycloreversion von Acridiziniumsalzen

Dann sollte man aber beim Einsatz des Dimers **106** mehr Strangbruch erwarten, da durch Cycloreversion mehr Diradikale gebildet werden als durch die bimolekulare Dimerisierung. Eine solche Zunahme an Strangbruch konnte jedoch nicht beobachtet werden.

- 5) Bei Bestrahlungen des Acridiziniumsalzes **77** konnten unter anaeroben Bedingungen Hydroxylradikale durch Abfang mit Terephthalsäure fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen werden.

Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass der aerobe Strangbruch durch Singulett-Sauerstoff und der anaerobe Strangbruch durch Hydroxylradikale verursacht wird. Nachdem der Mechanismus des DNA-Strangbruchs durch Hydroxylradikale weitestgehend geklärt ist (vgl. Kapitel 3.1.3), ist der des spontanen Strangbruchs durch Singulett-Sauerstoff unbekannt. Vor allem die Rolle des 8-oxoGuanins ist noch ungeklärt (vgl. Kapitel 3.1.2). Nachdem zeitaufgelöste Messungen ergeben haben, dass für einen Strangbruch zwei Moleküle Singulett-Sauerstoff nötig sind, könnten die Strangbrüche durch Reaktion von 8-oxoGuanin mit einem weiteren Molekül Singulett-Sauerstoff entstehen.^[101,102] Sies *et al.*^[91] zufolge sind der Strangbruch und die Bildung von 8-oxoGuanin zwei verschiedene Prozesse, die lediglich gemeinsame Vorläufer haben wie z.B. das Endoperoxid **37** (vgl. Schema 8 und 9). Mit der hier verwendeten Technik zur Untersuchung von DNA-Strangbrüchen durch Singulett-Sauerstoff kann man die Rolle von 8-oxoGuanin beim spontanen Strangbruch näher untersuchen. Dies ist möglich, da hier synthetische Oligonukleotide definierter Sequenz eingesetzt werden können, die dank radioaktiver Markierung eine quantitative Aussage über das Ausmaß des Strangbruchs und eventuell sogar über Strangbruchprodukte ermöglichen. So wurde für das folgende Experiment ein Einzelstrang mit einem 8-oxoGuanin (**107**) und als Referenz der entsprechende Strang mit einem unmodifizierten Guanin (**97**) verwendet (Abb. 42).

5'- TTT TTT TTT TGT TTT TTT TTT- 3' **97**

5'- TTT TTT TTT TXT TTT TTT TTT- 3' X = 8-oxoGuanosin **107**

Abb. 42 Sequenzen der Stränge **97** und **107**

Beide Oligonukleotide wurden in Anwesenheit des Acridiziniumsalzes **85** bei gleichen Bedingungen (Bezugskonzentrationen, vgl. Tabelle 9) unter aeroben und anaeroben Bedingungen als Einzelstrang bestrahlt (Abb. 43). Dabei wurde nur der spontane Strangbruch betrachtet, da einerseits dessen Mechanismus Gegenstand der Untersuchung war und andererseits die Modifikation 8-oxoGuanin **34** ohnehin alkalilabil ist.

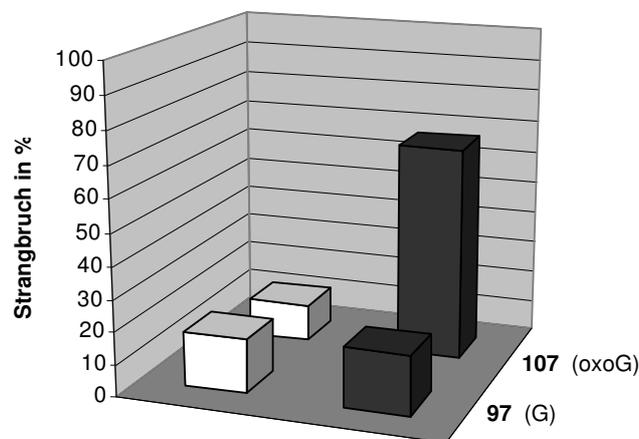
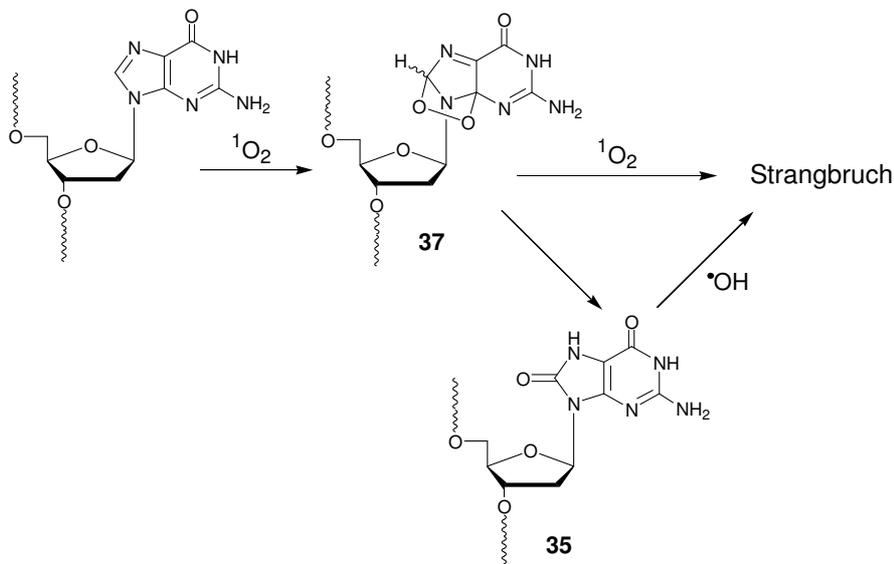


Abb. 43 Strangbruch nach Bestrahlung der Einzelstränge **97** und **107** unter aeroben (weiße Säulen) und anaeroben (schwarze Säulen) Bedingungen

Die Strangbruchraten des Referenzstrangs **97** entsprechen den bereits in Abbildung 34 beobachteten. Die Strangbruchausbeuten des modifizierten Oligonukleotids **107** dagegen zeigen ein überraschendes, aber deutliches Ergebnis: Unter aeroben Bedingungen findet fast kein Strangbruch statt. Der durch Singulett-Sauerstoff generierte spontane Strangbruch kann daher nicht durch weitere Oxidation des 8-oxoGuanins verursacht werden. Wahrscheinlich ist dagegen, dass die Reaktion eines Vorläufers von 8-oxoGuanin mit Singulett-Sauerstoff zum Strangbruch führt. Da diese Vorstufe (z.B. das Endoperoxid **37**, Schema 8 und 9) hier nicht gebildet werden kann, kommt es auch nicht zu einem spontanen Strangbruch. In Kapitel 3.1.2 wurde auch beschrieben, dass das 8-oxoGuanin gegenüber Singulett-Sauerstoff wesentlich reaktiver ist als Guanin. Das Ergebnis dieses Experiments widerspricht dem nicht. Es sagt lediglich aus, dass das Produkt dieser Reaktion kein direkter Strangbruch ist.

Unter anaeroben Bedingungen beobachtet man sehr effektiven Strangbruch beim modifizierten Strang **107**, deutlich effektiver als beim Referenzstrang **97**. Das bedeutet, dass Hydroxylradikale den Strang am 8-oxoGuanin sehr effizient spalten. Damit ergibt sich noch eine andere Möglichkeit, den aeroben Strangbruch durch Acridiziniumsalze zu erklären: Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch unter aeroben Bedingungen neben Singulett-Sauerstoff in kleinen Konzentrationen Hydroxylradikale gebildet werden, könnten diese zum Strangbruch an den durch Singulett-Sauerstoff gebildeten 8-oxoGuaninen führen. Dies würde auch erklären, warum in den gezeigten Experimenten unter aeroben Bedingungen sehr effektiver spontaner Strangbruch beobachtet wurde, obwohl in der Literatur berichtet wird, dass Strangbrüche weniger als 5 % der Gesamtschädigung durch Singulett-Sauerstoff ausmachen.^[111]

Schema 20 fasst die beiden Möglichkeiten des spontanen aeroben Strangbruchs zusammen.

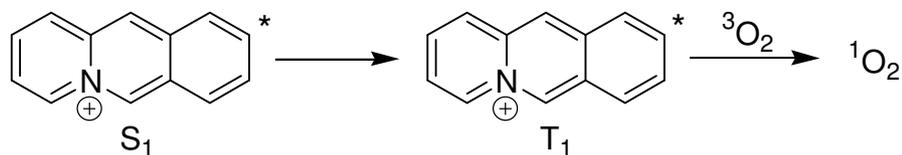


Schema 20 Mögliche Mechanismen des Strangbruchs durch Acridiziniumsalze unter aeroben Bedingungen

Abgesehen von dem hier beobachteten sehr effizienten Strangbruch an 8-oxoGuanin konnte für den anaeroben Strangbruch keine Präferenz für eine Nucleobase festgestellt werden. Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, reagiert das Hydroxylradikal sowohl mit den Nucleobasen als auch mit dem DNA-Rückgrat. Bei der Reaktion mit dem Rückgrat (Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der Desoxyribose) ist offensichtlich, dass keine Basenselektivität zu beobachten ist. Im Fall der Reaktion des Hydroxylradikals mit der Nucleobase dagegen sind die elektronenreichen Purine das primäre Ziel. Dass eine solche Präferenz nicht beobachtet werden konnte, kann mehrere Ursachen haben. Die Addition von Hydroxylradikalen an Nucleobasen führt meist nur in

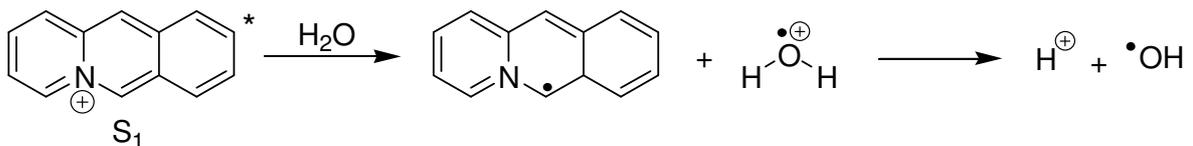
Gegenwart von Sauerstoff zu stabilen Produkten. In Abwesenheit von Sauerstoff kommt es oft zu einer Rückreaktion zur unmodifizierten Nukleobase (vgl. Schemata 12-15). Daher steht beim anaeroben Strangbruch durch Acridiziniumsalze die Reaktion mit der Desoxyribose im Vordergrund. Ein anderer Grund für die bevorzugte Reaktion am DNA-Rückgrat könnte die hohe Reaktivität der Hydroxylradikale sein. Diese bewirkt, dass sie meist direkt dort reagieren, wo sie entstehen. Da das Acridiziniumsalz positiv geladen ist, ist eine bevorzugte Assoziation am Zuckerphosphatrückgrat der DNA wahrscheinlich.

Die Generierung von Singulett-Sauerstoff kommt durch eine Übertragung der Triplettenergie vom angeregten Acridiziniumsalz zustande (Schema 21).



Schema 21 Generierung von Singulett-Sauerstoff

Über den Mechanismus der Bildung von Hydroxylradikalen können nur Vermutungen angestellt werden. Eine plausible Erklärung wäre die Reaktion des angeregten Acridiziniumsalzes mit Wasser unter Ausbildung eines resonanzstabilisierten Acridizinylnradikals und eines Wasserradikalkations. Durch Zersetzung des Wasserradikalkations entsteht dann neben einem Proton ein Hydroxylradikal (Schema 22).

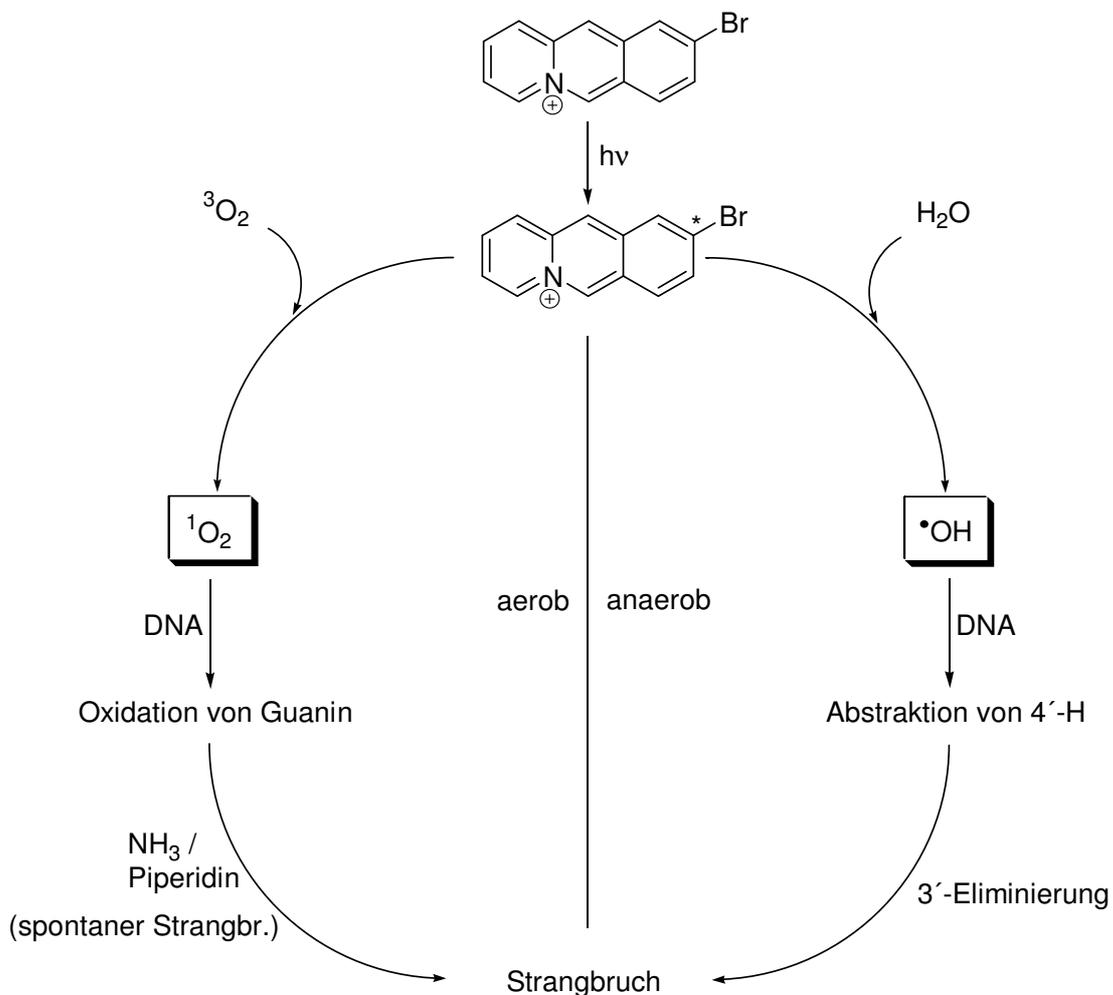


Schema 22 Mögliche Generierung von Hydroxylradikalen

3.4 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus des aeroben und anaeroben DNA-Strangbruches durch Acridiziniumsalze aufzuklären. Dazu wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die schließlich zu der These führten, dass nicht die Acridiziniumsalze direkt mit der DNA reagieren, sondern Singulett-Sauerstoff bzw. Hydroxylradikale als reaktive Spezies bilden, die dann die DNA schädigen. Durch weitere Experimente konnte nachgewiesen werden, dass der aerobe Strangbruch durch Singulett-Sauerstoff und der anaerobe Strangbruch durch Hydroxylradikale verursacht wird. Durch geeignete Reaktionsbedingungen kann DNA dementsprechend selektiv an Guanin (aerob) oder gleichmäßig an allen Basen (anaerob) gespalten werden.

Die Mechanismen sind in Schema 23 noch einmal zusammengefasst.



Schema 23 Übersicht über den aeroben und anaeroben DNA-Strangbruch durch Acridiziniumsalze

So wurde mit der Aufklärung des anaeroben Strangbruchs auch eine neue Methode zur Generierung von Hydroxylradikalen gefunden. Bemerkenswert dabei ist, dass diese neue Methode die Bildung von Hydroxylradikalen unter sehr milden Bedingungen erlaubt: stabile Photosensibilisatoren, neutraler pH-Wert und vor allem Bestrahlung im langwelligen Bereich ($\lambda \geq 360$ nm). Bisher wurde zur Erzeugung von Hydroxylradikalen vor allem die Fenton-Reaktion^[123,124] oder die Radiolyse von Wasser^[125,126] benutzt (vgl. Kapitel 3.1.3). Beispiele für die Generierung von Hydroxylradikalen durch Bestrahlung im UV-VIS-Bereich sind hauptsächlich für Moleküle bekannt, die Hydroperoxidfunktionen enthalten und deshalb eine gewisse Labilität aufweisen.^[126-128] Zwar wurde in der Literatur auch schon von N-Hydroxypyridonen als Quelle für Hydroxylradikale berichtet, aber diese erfordern Anregung durch Bestrahlung bei 300 nm, so dass die DNA auch schon durch die Bestrahlung selbst geschädigt wird.^[191] Die Acridiziniumsalze dagegen absorbieren nicht im Bereich der Nukleobasen. Ein weiterer Vorteil ist ihre Assoziation mit dem DNA-Rückgrat aufgrund ihrer positiven Ladung.

Diese neue Methode zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies wurde auch angewendet, um einen Beitrag zur Aufklärung des DNA-Strangbruchs durch Singulett-Sauerstoff zu leisten. Dabei wurde festgestellt, dass der Strangbruch nicht durch eine weitere Reaktion des 8-oxoGuanins entsteht, sondern wahrscheinlich aus dessen Vorläufer, z.B. dem Endoperoxid **37**.

Insgesamt steht nach Aufklärung ihrer Reaktionen unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit den Acridiziniumsalzen eine neue Substanzklasse zur Verfügung, die in der Lage ist, gezielt Singulett-Sauerstoff oder Hydroxylradikale unter sehr milden Bedingungen zu generieren.

3.5 AUSBLICK

Mit den Acridiziniumsalzen steht eine Bandbreite von Verbindungen zur Verfügung, die zahlreiche Möglichkeiten bietet, die oxidative Schädigung von DNA unter sehr milden Bedingungen zu untersuchen.

Die Anwendung der Acridiziniumsalze ist nicht nur auf DNA beschränkt. Sie können auch im Bereich der organischen Chemie oder zur Untersuchung anderer Biomoleküle wie z.B. von Peptiden eingesetzt werden.

Erste Experimente zeigen, dass auch kleine Peptide durch das Acridiziniumsalz **85** effektiv gespalten werden, während es ohne das Acridiziniumsalz zu keiner nennenswerten Schädigung kommt. Auf lange Sicht wäre es durch einen gezielten Einbau von Acridiziniumsalz in ein Peptid eventuell möglich, dieses durch langwellige Bestrahlung an einer bestimmten Stelle zu spalten.

Außerdem bieten die Acridiziniumsalze mit ihren verschiedenen Substitutionsmustern und verschiedenen Substituenten eine große Vielfalt von Verbindungen. Man könnte durch gezielte Variation der Substituenten das für eine bestimmte Anwendung "ideale Acridiziniumsalz" entwickeln.

Insgesamt ergeben sich mit den Acridiziniumsalzen noch zahlreiche Möglichkeiten zur gezielten Generierung von Singulett-Sauerstoff oder Hydroxylradikalen und zur Untersuchung der Wirkung von oxidativem Stress auf biologisch relevante Moleküle.

EXPERIMENTELLER TEIL

4 GERÄTE UND MATERIALIEN

4.1 VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN

Anlage für nanopures Wasser	<i>Barnstead</i> , ultrapure water system
Bestrahlungsapparatur	<i>Oriel</i> , 68810
Bestrahlungslampe	<i>Osram</i> , HBO 500W/2
DNA Synthesizer	<i>PerSeptive Biosystems</i> , Expedite
Festphasen für Oligonukleotidsynthese	<i>Glen Research</i>
Filterpapier	<i>Whatman</i> , 3 MM Chr
Gelelektrophoreseapparatur (PAGE)	<i>Life Technologies</i> , Model 2
Gelelektrophoreseapparatur (Agarose)	<i>Biowerk</i>
Geltrockner	<i>Savant</i> , SG210D
HPLC	<i>Hewlett-Packard</i> , 1050 Series
Küvetten (Quantifizierung)	<i>Hellma</i> , Quarz
Küvetten (Bestrahlung)	<i>Semadeni</i> , PMMA
Lösungsmittelgemisch für Szintillationszähler	<i>Zinsser Analytik</i> , irgasafe plus
Lyophilisator	<i>Savant</i> , Speed Vac Plus
MALDI-ToF Massenspektrometer	<i>Applied Biosystems</i> , Voyager Elite
Netzteil für Gelelektrophorese	<i>Pharmacia</i> , EPS3500
Phosphorscreen und Kassette	<i>Molecular Dynamics</i>
mini Quick Spin Column	<i>Roche</i> , G-25 und G-50
MinElute Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
Qiaquick PCR Purification Kit	<i>Qiagen</i>
RP18-Säule	<i>Merck</i> , LiChrospher 100 (5 µm)
Steilkanten-Filter für Bestrahlungen (cutoff)	<i>Schott</i> , 320 nm und 360 nm
Szintillationszähler	<i>Packard</i> , Tri-Carb 460 C
Temperaturregler für Schmelzpunktmessungen	<i>Perkin-Elmer</i> , PTP-6-Temperaturregler
Thermoshaker	<i>Eppendorf</i> , 5436
UV-Gerät	<i>Perkin-Elmer</i> , Lambda Bio 40
Vortexer	<i>Bender</i> , Genie 2
Zentrifuge	<i>Eppendorf</i> , 5415 D

4.2 LÖSUNGSMITTEL UND CHEMIKALIEN

[γ ³² P]-2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	<i>Amersham, 3000 Ci/mmol</i>
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	<i>Pharmacia</i>
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	<i>Pharmacia</i>
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	<i>Pharmacia</i>
2,6-Dihydroxyacetophenon	<i>Fluka</i>
Acetonitril	<i>Romil</i>
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 19:1)	<i>National Diagnostics</i>
Agarose	<i>SeaKem LE</i>
Ammoniak (35 %)	<i>BDH</i>
Ammoniumperoxodisulfat	<i>Fluka</i>
Ammoniumtartrat	<i>Fluka</i>
Borsäure	<i>Fluka</i>
<i>tert</i> -Butylalkohol	<i>Fluka</i>
deutერიertes Wasser (D ₂ O)	<i>Fluka</i>
Dikaliumhydrogenphosphat	<i>Fluka</i>
Ethanol	<i>Fluka</i>
Ethidiumbromid	<i>Fluka</i>
Ethylendiamintetraessigsäure	<i>Fluka</i>
Formamid	<i>Fluka</i>
Harnstoff	<i>Fluka</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Fluka</i>
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Fluka</i>
Natriumazid	<i>Fluka</i>
Natriumchlorid	<i>Fluka</i>
Natriumhydroxid	<i>Fluka</i>
Phosphoramiditchemikalien für den Synthesizer	<i>Glen Research</i>
Piperidin	<i>Fluka</i>
Thymidin-5'-triphosphat	<i>Pharmacia</i>
Triethylammoniumacetat 1.0 M	<i>Fluka</i>

4.3 ENZYME

Deep vent Polymerase	<i>New England Biolabs</i>
Deep vent exo ⁻ Polymerase	<i>New England Biolabs</i>
T4 Polynukleotid Kinase (PNK)	<i>New England Biolabs</i>

4.4 OLIGONUKLEOTIDE UND DNA

Alle unmodifizierten Oligonukleotide, sowie das 8-oxoGuanin enthaltende Oligonukleotid (**107**), wurden bei der Firma *Microsynth* PAGE-gereinigt bestellt. Sie wurden dann noch einmal per HPLC gereinigt (6.1.2) und durch MALDI-ToF MS (6.1.3) charakterisiert.

Die modifizierten Oligonukleotide (mit G*) wurden mithilfe eines DNA Synthesizers an fester Phase hergestellt.

lacZ' wurde durch PCR (6.2) hergestellt und mit dem PCR Purification Kit von *Qiagen* gereinigt. Das für die PCR benötigte Plasmid pUC19 wurde bei *New England Biolabs* bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Die verwendete DNA-Leiter wurde bei *MBI Fermentas* bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

4.5 PUFFERLÖSUNGEN

Bestrahlungspuffer (Kapitel 2): 20 mM Natriumcitrat, 100 mM NaCl (pH 5.0)

Bestrahlungspuffer (Kapitel 3): 25 mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 50 mM NaCl (pH 7.4)

Lade-Puffer (Agarose): 0.04 % Bromphenolblau, 0.04 % Xylencyanol, 5 % Glycerin

Lade-Puffer (PAGE): 0.9 M Tris-Borat, 20 mM EDTA, 0.04 % Bromphenolblau, 0.04 % Xylencyanol, 90 % Formamid

PNK-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM Spermidin-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)

TAE-Puffer: 2.0 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA (pH 8.0)

TBE-Puffer: 0.9 M Tris-Borat, 20 mM EDTA (pH 8.0)

Thermopol-Puffer: 20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2.0 mM MgSO₄, 0.1 % Triton X-100 (pH 8.0)

5 ÜBERSICHT ÜBER ALLE VERWENDETEN DNA-STRÄNGE

5.1 SEQUENZEN

Nr.	Basen	Sequenz
28a	40	5'- ACG CAC GTC GCA TAA TAT TAC GTA GGG TAT TAT ATT ACG C - 3'
28b	40	5'- GCG TAA TAT AAT ACC CTA CG*T AAT ATT ATG CGA CGT GCG T - 3'
28c	40	5'- GCG TAA TAT AAT ACC CTA CGT AAT ATT ATG CGA CGT GCG T - 3'
29a	41	5'- ACG CAC GTC GCA TAA TAT TAC GTA TGG GTA TTA TAT TAC GC - 3'
29b	41	5'- GCG TAA TAT AAT ACC CAT ACG* TAA TAT TAT GCG ACG TGC GT - 3'
29c	41	5'- GCG TAA TAT AAT ACC CAT ACG TAA TAT TAT GCG ACG TGC GT - 3'
30a	45	5'- ACG CAC GTC GCA TAA TAT TAC GTT TAT TTG GGT ATT ATA TTA CGC - 3'
30b	45	5'- GCG TAA TAT AAT ACC CAA ATA AAC G*TA ATA TTA TGC GAC GTG CGT - 3'
30c	45	5'- GCG TAA TAT AAT ACC CAA ATA AAC GTA ATA TTA TGC GAC GTG CGT - 3'
31a	45	5'- ACG CAC GTC GCA TAA TAT TAC GTA TAT ATG GGT ATT ATA TTA CGC - 3'
31b	45	5'- GCG TAA TAT AAT ACC CAT ATA TAC G*TA ATA TTA TGC GAC GTG CGT - 3'
31c	45	5'- GCG TAA TAT AAT ACC CAT ATA TAC GTA ATA TTA TGC GAC GTG CGT - 3'
91a	21	5'- CGG TAT TTT CTC CTT ACG CAT - 3'
91b	21	5'- ATG CGT AAG GAG AAA ATA CCG - 3'
92a	33	5'- CGT AAT AGC GAA GAG GCC CGC ACC GAT CGC CCT - 3'
92b	33	5'- AGG GCG ATC GGT GCG GGC CTC TTC GCT ATT GCA - 3'
93	21	5'- AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA - 3'
94	21	5'- GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG - 3'
95	21	5'- CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC - 3'
96	21	5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT - 3'
97	21	5'- TTT TTT TTT TGT TTT TTT TTT - 3'
98	21	5'- TTT TGT TTT TGT TTT TGT TTT - 3'
99	21	5'- TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT - 3'
100	21	5'- GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG - 3'
101	21	5'- TTT TTT TTT TAT TTT TTT TTT - 3'
102	21	5'- TTT TAT TTT TAT TTT TAT TTT - 3'
103	21	5'- TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT - 3'
104	21	5'- ATA ATA ATA ATA ATA ATA ATA - 3'
107	21	5'- TTT TTT TTT TXT TTT TTT TTT - 3' X = 8-oxoGuanosin

5.2 ALLGEMEINE DATEN

Nr.	Summenformel	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	M berechnet [g/mol]	M gemessen [m/z]
28a	A ₁₂ G ₈ C ₈ T ₁₂	396.4	12 294.3	12 301
28b	A ₁₂ G ₇ C ₈ T ₁₂ G*	396.4	12 378.3	12 379
28c	A ₁₂ G ₈ C ₈ T ₁₂	396.4	12 294.3	12 297
29a	A ₁₂ G ₈ C ₈ T ₁₃	404.2	12 598.5	12 606
29b	A ₁₃ G ₇ C ₈ T ₁₂ G*	410.2	12 691.7	12 685
29c	A ₁₃ G ₈ C ₈ T ₁₂	410.2	12 607.6	12 611
30a	A ₁₂ G ₈ C ₈ T ₁₇	435.5	13 815.3	13 822
30b	A ₁₇ G ₇ C ₈ T ₁₂ G*	465.7	13 944.5	13 948
30c	A ₁₇ G ₈ C ₈ T ₁₂	465.7	13 860.4	13 867
31a	A ₁₄ G ₈ C ₈ T ₁₅	447.6	13 833.4	13 824
31b	A ₁₅ G ₇ C ₈ T ₁₄ G*	453.6	13 926.4	13 919
31c	A ₁₅ G ₈ C ₈ T ₁₄	453.6	13 842.4	13 844
91a	A ₃ G ₃ C ₆ T ₉	183.1	6 338.3	6 343
91b	A ₉ G ₆ C ₃ T ₃	230.1	6 512.5	6 518
92a	A ₈ G ₉ C ₁₂ T ₄	315.3	10 093.8	10 088
92b	A ₄ G ₁₂ C ₉ T ₈	302.2	10 177.9	10 168
93	A ₂₁	291.1	6 515.6	6 521
94	G ₂₁	217.4	6 851.6	6 862
95	C ₂₁	139.9	6 011.0	6 021
96	T ₂₁	164.4	6 326.2	6 330
97	T ₂₀ G ₁	169.5	6 351.3	6 353
98	T ₁₈ G ₃	172.0	6 401.3	6 405
99	T ₁₄ G ₇	182.1	6 501.4	6 508
100	T ₇ G ₁₄	199.7	6 676.5	6 687
101	T ₂₀ A ₁	170.5	6 335.2	6 331
102	T ₁₈ A ₃	182.5	6 353.3	6 364
103	T ₁₄ A ₇	206.6	6 389.4	6 386
104	T ₇ A ₁₄	248.9	6 452.5	6 451
107	T ₂₀ ^{oxo} G	169.5	6 367.2	6 378

Zur Berechnung wurden folgende Massen angenommen:

A:	249.24 g/mol	G*:	349.36 g/mol
G:	265.24 g/mol	8-oxoGuanosin:	281.24 g/mol
C:	225.21 g/mol	Phosphat:	63.98 g/mol
T:	240.22 g/mol		

Für lacZ' (669 Bp) und pBR322 (4361 Bp) wurde eine durchschnittliche Masse von 618 g/mol pro Basenpaar angenommen. Zur Bestimmung der Menge wurde angenommen, dass 1 OD einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht (0.15 mM bezogen auf Nukleotide).

lacZ': 413 442 g/mol

pBR322: 2 695 098 g/mol

5.3 SCHMELZPUNKTE

Doppelstrang	Basenpaare	Bemerkung	Schmelzpunkt
28a / 28b	40	mit G*	58.5 °C
28a / 28c	40	ohne G*	67.9 °C
29a / 29b	41	mit G*	57.9 °C
29a / 29c	41	ohne G*	68.4 °C
30a / 30b	45	mit G*	58.3 °C
30a / 30c	45	ohne G*	71.5 °C
31a / 31b	45	mit G*	58.0 °C
31a / 31c	45	ohne G*	71.4 °C
91a / 91 b	21	-	66.6 °C
92a / 92b	33	-	78.2 °C

6 ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

6.1 OLIGONUKLEOTIDE

6.1.1 SYNTHESE

Die mit einem G* modifizierten Oligonukleotide (**28b**, **29b**, **30b** und **31b**) wurden selbst per automatisierter DNA-Festphasensynthese hergestellt. Dabei wurde die Oligonukleotidkette vom 3'- zum 5'-Ende aufgebaut und die Synthese im 1 μ mol-Maßstab durchgeführt. Das erste Nukleotid (in allen Fällen Thymin) war bereits über einen basenlabilen Succinyl-linker kovalent an der festen Phase gebunden. Als Festphasenmaterial wurden aminoderivatisierte Borsilikate (Controlled Pore Glas: CPG) mit einer Porengröße von 1000 Å verwendet.

Die Nukleotidbausteine trugen an der 5'-Hydroxylgruppe eine Tritylschutzgruppe und in 3'-Position eine Phosphoramiditgruppe, die nach der Kupplung abgespalten bzw. oxidiert wurde. Die Aminofunktionen von Adenin, Guanin und Cytidin waren als Amide geschützt und wurden erst nach Ende der Synthese freigesetzt.

Im ersten Syntheseschritt wird die Tritylgruppe durch 2%ige Trichloressigsäure abgespalten. Die dabei freigesetzte 5'-Hydroxylfunktion wird im nächsten Schritt mit Tetrazol aktiviert und kann mit dem im Überschuss eingesetzten Nukleotid reagieren (Kupplung). Im dritten Schritt (capping) werden nicht umgesetzte, freie 5'-Hydroxylgruppen als Acetat geschützt, um Fehlsequenzen zu vermeiden. Im letzten Schritt wird die Phosphitgruppe zum Phosphat oxidiert. Nun kann mit einer erneuten Abspaltung der Tritylgruppe ein neuer Syntheseyklus beginnen.

Das getrocknete 4'-pivaloylmodifizierte Guanosin (G*), das ebenfalls die entsprechenden Schutzgruppen trug, wurde in Acetonitril gelöst (0.08 M). Der Synthesizer wurde im Standardmodus betrieben, nur für das G* wurde die Kupplungszeit von 1.5 auf 15 Minuten verlängert.

Nach Ende der Synthese wurde die Festphase im Argonstrom getrocknet und das Oligonukleotid von der festen Phase abgespalten. Das geschah durch Inkubation in 1 ml konzentriertem Ammoniak bei 55°C über Nacht (15-16 h). Dabei wurden auch die Aminfunktionen von Adenin, Guanin und Cytidin entschützt. Nach Lyophilisierung zur Trockne wurde das entschützte, abgespaltene Oligonukleotid in 0.1 M TEAA-Puffer (pH 7) gelöst und per HPLC weiter gereinigt (6.1.2).

6.1.2 REINIGUNG

Da die Synthese des Oligonukleotids im trityl-on-Modus durchgeführt wurde, behielt das zuletzt eingebaute Nukleotid seine Trityl-Schutzgruppe. Dies hilft bei der ersten Reinigung (trityl-on), bei der in erster Linie unvollständige (gecappte) Oligonukleotide abgetrennt werden. Diese trityl-on-Reinigung erfolgte bei Raumtemperatur in 0.1 M TEAA-Puffer (pH 7) durch HPLC mit einer RP18-Säule und einem Acetonitrilgradienten von 15 % auf 40 % in 25 Minuten und einem Fluss von 1 ml/min. Die gewünschten Oligonukleotide eluierten meist nach etwa 10 Minuten. Entsprechende Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert.

Das so vorgereinigte Oligonukleotid wurde dann mit 200 µl 80 %iger Essigsäure versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Dann wurde durch Zugabe von 50 µl 3 M Natriumacetatlösung neutralisiert und durch Zugabe von 800 µl Isopropylalkohol und Lagerung bei -20°C über Nacht das Oligonukleotid ausgefällt. Nach Zentrifugieren für 10 Minuten bei 10000 rpm (14000 g) konnte die überstehende Lösung abdekantiert werden. Der Niederschlag (Pellet) wurde noch zweimal mit je 500 µl Isopropylalkohol gewaschen und dann in 600 µl 0.1 M TEAA-Puffer (pH 7) gelöst. Durch diese Prozedur wurde die letzte Trityl-Schutzgruppe abgespalten, so dass nun die trityl-off-Reinigung durchgeführt werden konnte. Sie erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur mit HPLC unter Verwendung einer RP18-Säule in 0.1 M TEAA-Puffer mit einem Fluss von 1 ml/min. Der Acetonitrilgradient betrug diesmal 6 % bis 20 % in 40 Minuten. Das gewünschte Oligonukleotid eluierte zwischen 13 und 18 Minuten, das um das G* verkürzte etwa 1 bis 2 Minuten eher. Entsprechende Fraktionen wurden gesammelt.

Mit den unmodifizierten, bei *Microsynth* bestellten Oligonukleotiden wurde ebenfalls eine trityl-off-Reinigung durchgeführt zur Überprüfung der Reinheit.

Die Identität aller Oligonukleotide wurde mittels MALDI-ToF MS überprüft (6.1.3).

6.1.3 MASSENBESTIMMUNG

Von der nach trityl-off-Reinigung erhaltenen Lösung wurde 1 µl entnommen und auf der Messplatte mit 1 µl Matrixlösung (0.5 M Dihydroxyacetophenon und 0.3 M Ammoniumnitrat in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril im Verhältnis 3:1) versetzt. Nach erfolgreicher Kristallisation erfolgte die Messung mit einem Voyager Elite von Applied Biosystems im Modus zur Detektion negativer Ionen ($\lambda = 337$ nm, Frequenz 20 Hz, Pulsenergie 300 mJ, Pulsdauer 4 ns,

Verzögerungszeit 300 ns, Beschleunigungsspannung 25 kV). Es wurden etwa 50 Pulse akkumuliert. Zur Kalibrierung wurden synthetische, unmodifizierte Oligonukleotide als externe Standards verwendet.

6.1.4 QUANTIFIZIERUNG DURCH UV-ABSORPTION

Zuerst werden die molaren Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide mittels Inkrementwerten nach der folgenden Formel berechnet:^[192]

$$\epsilon_{260} = (\epsilon_A \times n_A + \epsilon_G \times n_G + \epsilon_C \times n_C + \epsilon_T \times n_T) \times 0.9 \quad (4)$$

Dabei ist n die Anzahl der entsprechenden Basen im Oligonukleotid und ϵ ihr Extinktionskoeffizient. Als Extinktionskoeffizienten wurden folgende Werte verwendet:^[192]

$$\epsilon_A : 15.4 \text{ cm nmol}^{-1}$$

$$\epsilon_G : 11.7 \text{ cm nmol}^{-1}$$

$$\epsilon_C : 7.3 \text{ cm nmol}^{-1}$$

$$\epsilon_T : 8.8 \text{ cm nmol}^{-1}$$

Zur Bestimmung der Menge wurden die gereinigten Oligonukleotide in 1 ml Wasser (nanopur) gelöst und so eine Stammlösung hergestellt. Von einer mit 900 μl Wasser gefüllten Quarzküvette ($d = 1 \text{ cm}$) wurde der Blindwert bestimmt (Autozero). Dann wurden 100 μl der Stammlösung zu den 900 μl Wasser hinzugegeben und gut durchmischt. Die Absorption (OD) bei 260 nm wurde gemessen und daraus mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die in 100 μl der Stammlösung gelöste Menge an Oligonukleotid bestimmt:

$$N = \frac{OD \times 1 \text{ cm}}{\epsilon_{260}} \quad (N = \text{Menge Oligonukleotid in nmol}) \quad (5)$$

Für lacZ' wird angenommen, dass 1 OD einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entspricht (0.15 mM bezogen auf die Nukleotide).

6.1.5 HYBRIDISIERUNG

Um eine effiziente Doppelstrangbildung zu gewährleisten, wurden die beiden komplementären Oligonukleotide (je 3-300 pmol) im jeweiligen Bestrahlungspuffer (ca. 200 µl) für 5 Minuten auf 80°C erhitzt und dann langsam (ca. 3 h) auf Raumtemperatur abgekühlt.

6.1.6 SCHMELZPUNKTBESTIMMUNG

Die Messung der Schmelzpunkte wurde bei 260 nm im entsprechenden Bestrahlungspuffer durchgeführt. Dazu wurden je 1.0 nmol der kurzen Oligonukleotide (**91, 92**) und je 0.5 nmol der langen (**28-31**) verwendet. Der Temperaturgradient betrug 1 °C/min. Die angegebenen Schmelzpunkte sind Mittelwerte aus je zwei Aufheiz- und Abkühlphasen.

6.1.7 RADIOAKTIVE MARKIERUNG

Das zu markierende Oligonukleotid (5 pmol – 1.8 nmol) bzw. lacZ' (6-8 pmol) wurde im Kinasepuffer mit 2-10 pmol [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP und 10-20 Einheiten T4 Polynukleotid Kinase versetzt und mit Wasser auf 20 bzw. 40 µl aufgefüllt. Nach 45 Minuten Inkubation bei 37°C wurde das Gemisch auf eine mini Quick Spin Column aufgetragen und 4 Minuten bei 3500 rpm (1000xg) zentrifugiert. Das Eluat (25 - 50 µl) enthält den gereinigten radioaktiv markierten DNA-Strang. Aufgrund der geringen Halbwertszeit von Phosphor-32 (14.3 Tage) wurde stets frisches [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP verwendet (nicht älter als 4 Wochen).

Alle Stränge wurden innerhalb der nächsten 24 Stunden eingesetzt, um eine Schädigung durch Radioaktivität zu vermeiden.

6.1.8 PIPERIDIN- UND AMMONIAKSPALTUNG

Mit den nach der Bestrahlung entnommenen Proben (30 – 40 µl) wurde eine Piperidin- oder Ammoniakspaltung durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 300 – 400 µl einer 0.1 M Piperidinlösung oder 35% igem Ammoniak versetzt und bei 90°C für 30 Minuten (Piperidin)

bzw. 60 Minuten (Ammoniak) erhitzt. Im Anschluss wurden alle Lösungen bis zur Trockne lyophilisiert.

6.1.9 MAXAM-GILBERT-SEQUENZIERUNG^[184,185]

Um Strangbruch selektiv an Guanin zu verursachen, wurden 1 – 5 pmol des entsprechenden radioaktiv markierten Oligonukleotids in 50 µl Phosphatpuffer (pH 7) mit 0.5 µl Dimethylsulfat versetzt. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 200 µl 0.1 M Piperidinlösung dazugegeben und es wurde für 15 Minuten auf 90°C erhitzt. Im Anschluss wurde die Lösung bis zur Trockene lyophilisiert.

6.2 PCR

Es wurden die folgenden beiden Startoligonukleotide (Primer) verwendet:

Primer 1: 5' – AAT CAT GAC GTC CAG CTT GTC TGT AAG CGG – 3'

Primer 2: 5' – TGA ATG ACG TCT CAG TGA GCG AGG AAG CG – 3'

Zehn identische Lösungen aus je 30 pmol der Startoligonukleotide (Primer), je 20 nmol jedes Nukleotids (dATP, dGTP, dCTP, TTP), 50 ng pUC19, 1.2 Einheiten Polymerase (Deep vent oder Deep vent exo⁻) und 5 µl Thermopol-Puffer wurden mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Dann wurden 25 Wiederholungen folgenden Temperaturprogramms durchgeführt:

- 1) 95°C für 95 s
- 2) 55°C für 55 s
- 3) 72°C für 2 min

Die Reinigung erfolgte direkt mit dem *Qiaquick PCR Purification Kit* oder durch präparative Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde 1.0 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (2 %) gelöst, 50 µg Ethidiumbromid zugegeben und aus der Lösung ein 1 %iges Gel gegossen. Die PCR-Proben wurden mit 10 µl Lade-Puffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Elektrolyt wurde TAE-Puffer (2 %) mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 80 V über einen Zeitraum von 2 – 3 Stunden durchgeführt.

Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht (260 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA dann daraus mit dem *MinElute Gel Extraction Kit* aus dem Gel extrahiert.

6.3 BESTRAHLUNGEN

Für alle Bestrahlungen wurde dieselbe Apparatur verwendet. Lediglich die Steilkanten-Filter wurden variiert (320 nm für Kapitel 2 und 360 nm für Kapitel 3). Alle Bestrahlungen wurden mithilfe eines Kryostats thermostatisiert.

Aerobe Proben wurden ohne Vorbehandlung bestrahlt. Anaerobe Proben wurden vor der Bestrahlung für 5 – 10 Minuten mit Argon gespült, um gelösten Sauerstoff zu entfernen.

Nach einer Vorglühzeit der Lampe von 20 Minuten wurden alle Bestrahlungen bei 500 Watt durchgeführt. Die Lampe wurde spätestens nach 600 Stunden ausgetauscht.

Die genauen Reaktionsbedingungen und Konzentrationen der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente werden im Folgenden angegeben und sind den entsprechenden Abbildungen zugeordnet:

Kapitel 2:

- Alle Bestrahlungen wurden mit einem 320 nm-Steilkanten-Filter durchgeführt ($\lambda \geq 320$ nm).
- $T_{\text{Kryostat}} = 15^{\circ}\text{C}$ ($\rightarrow T_{\text{Probe}} \approx 30^{\circ}\text{C}$)
- Alle Bestrahlungen wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.
- Alle verwendeten Gele sind 12 %ig und denaturierend.

Abb. 9: 202 pmol **28a** (davon 2 pmol radioaktiv markiert)
600 pmol **28b / 28c** (G* / Blindprobe)
in 220 μl Citratpuffer (pH 5.0)
t = 4.0 min

201 pmol **29a** (davon 1 pmol radioaktiv markiert)
600 pmol **29b / 29c** (G* / Blindprobe)
in 220 μl Citratpuffer (pH 5.0)
t = 4.0 min

Abb. 11: 202 pmol **31a** (davon 2 pmol radioaktiv markiert)
600 pmol **31b / 31c** (G* / Blindprobe)
in 220 μl Citratpuffer (pH 5.0)
t = 3.5 min

Kapitel 3:

- Alle Bestrahlungen wurden mit einem 360 nm-Steilkanten-Filter durchgeführt ($\lambda \geq 360$ nm).
- $T_{\text{Kryostat}} = 0^\circ\text{C}$ ($\rightarrow T_{\text{Probe}} \approx 20^\circ\text{C}$)
- Sofern nicht anders angegeben, sind alle Angaben auf 200 μl Bestrahlungslösung bezogen.
- In der zweiten Tabelle sind die jeweiligen Strangbruchwerte in % angegeben.
- Einzige Ausnahme: Abb. 22 (prozentuale Abnahme der Anteile an intakten Bruchstücken).

Abb. 20: $t = 120$ min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

Agarose-Gel

5 μl Acridiziniumsalzlösung (0.1 mM)

5 μl DNA-Lösung in Puffer (40 mg/l pBR322, 50 mM Phosphat, 500 mM NaCl)

10 μl Gesamtlösung

Daraus ergeben sich bezogen auf 200 μl Bestrahlungslösung folgende Werte:

	200 μl Lösung
DNA	4 μg pBR322
Basenpaare	6.45 nmol
Acridiziniumsalz	10 nmol
Phosphat	5 μmol
Natriumchlorid	500 μmol
Acrid : Bp	1.6 : 1

Anmerkung: Versuch von K. Faulhaber an der Universität Würzburg durchgeführt

Abb. 22: t = 0 – 20 min (Proben nach verschiedenen Bestrahlungszeiten)
 aerobe Bestrahlung
 8 %iges, natives Gel

	DNA-Leiter (26 – 501 Bp)
DNA	2.5 µg
Basenpaare	4 nmol
Acridiziniumsalz	1 nmol
Phosphat	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol
Acrid : Bp	0.25 : 1

Bruchstück	Zeit [min]									
	0	1	2	4	6	8	10	15	20	
67 bp	100 %	84 %	68 %	51 %	36 %	27 %	23 %	15 %	10 %	
111 bp	100 %	88 %	80 %	63 %	50 %	41 %	37 %	27 %	23 %	
190 bp	100 %	89 %	86 %	79 %	64 %	59 %	53 %	46 %	36 %	
331 bp	100 %	88 %	80 %	63 %	50 %	41 %	37 %	27 %	23 %	
501 bp	100 %	84 %	68 %	51 %	36 %	27 %	23 %	15 %	10 %	

Abb. 24: t = 4 min
 aerobe und anaerobe Bestrahlung
 18 %iges denaturierendes Gel (**91a/b**) und 6 %iges natives Gel (lacZ')

	91a/b	lacZ'
DNA	je 32 pmol	1 pmol
Basenpaare	672 pmol	669 pmol
Acridiziniumsalz	67 nmol	67 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	100 : 1	100 : 1

DNA	aerob	anaerob
91a/b	45 %	31 %
lacZ'	49 %	38 %

Abb. 25: t = 20 min
aerobe und anaerobe Bestrahlung
6 %iges natives Gel

	mit Acridiziniumsalz	ohne Acridiziniumsalz
DNA	1 pmol lacZ'	1 pmol lacZ'
Basenpaare	669 pmol	669 pmol
Acridiziniumsalz	67 nmol	0 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	100 : 1	0 : 1

	aerob	anaerob
ohne Acrid	2 %	2 %
mit Acrid	98 %	87 %

Abb. 26: t = 20 min
aerobe und anaerobe Bestrahlung
6 %iges natives Gel

	mit Bestrahlung	ohne Bestrahlung
DNA	1 pmol lacZ'	1 pmol lacZ'
Basenpaare	669 pmol	669 pmol
Acridiziniumsalz	67 nmol	67 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	100 : 1	100 : 1

	aerob	anaerob
ohne Bestr.	1 %	2 %
mit Bestr.	98 %	87 %

Abb. 27: t = 15 min
aerobe und anaerobe Bestrahlung
20 %iges denaturierendes Gel

	91a/b	91b
DNA	je 1 pmol	1 pmol
Basen(paare)	21 pmol	21 pmol
Acridiziniumsalz	2.1 nmol	2.1 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	100 : 1	100 : 1

	aerob	anaerob
Doppelstrang	40 %	52 %
Einzelstrang	34 %	60 %

Abb. 28: t = 15 min
aerobe und anaerobe Bestrahlung
20 %iges denaturierendes Gel

	91a/b	91b
DNA	je 30 pmol	30 pmol
Basen(paare)	630 pmol	630 pmol
Acridiziniumsalz	63 nmol	63 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	100 : 1	100 : 1

	aerob	anaerob
Doppelstrang	78 %	49 %
Einzelstrang	84 %	69 %

Abb. 29a: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

Anmerkung: hohe Konzentration (a)

	91a/b	91a/b	91a/b	91a/b
DNA	je 300 pmol	je 300 pmol	je 300 pmol	je pmol
Basenpaare	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol
Acridiziniumsalz	0 nmol	10.1 nmol	101 nmol	1010 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	0 : 1	1.6 : 1	16 : 1	160 : 1

	aerob		anaerob	
	hv	hv + Pip	hv	hv + Pip
0 : 1	3 %	5 %	2 %	1 %
1.6 : 1	10 %	6 %	4 %	7 %
16 : 1	27 %	30 %	7 %	8 %
160 : 1	36 %	47 %	32 %	31 %

Abb. 29b: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

Anmerkung: niedrige Konzentration (b)

	91a/b	91a/b	91a/b	91a/b
DNA	je 3 pmol	je 3 pmol	je 3 pmol	je 3 pmol
Basenpaare	63 pmol	63 pmol	63 pmol	63 pmol
Acridiziniumsalz	0 nmol	101 pmol	1.01 nmol	10.1 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	0 : 1	1.6 : 1	16 : 1	160 : 1

	aerob		anaerob	
	hv	hv + Pip	hv	hv + Pip
0 : 1	5 %	2 %	1 %	1 %
1.6 : 1	29 %	61 %	19 %	24 %
16 : 1	56 %	81 %	28 %	22 %
160 : 1	62 %	95 %	15 %	15 %

Abb. 30a: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

Anmerkung: hohe Konzentration (a)

	91b	91b	91b	91b
DNA	300 pmol	300 pmol	300 pmol	300 pmol
Basen	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol
Acridiziniumsalz	0 nmol	10.1 nmol	101 nmol	1010 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	0 : 1	1.6 : 1	16 : 1	160 : 1

	aerob		anaerob	
	hv	hv + Pip	hv	hv + Pip
0 : 1	1 %	1 %	3 %	3 %
1.6 : 1	1 %	9 %	7 %	7 %
16 : 1	13 %	32 %	13 %	10 %
160 : 1	48 %	80 %	96 %	96 %

Abb. 30b: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

Anmerkung: niedrige Konzentration (b)

	91b	91b	91b	91b
DNA	3 pmol	3 pmol	3 pmol	3 pmol
Basen	63 pmol	63 pmol	63 pmol	63 pmol
Acridiziniumsalz	0 nmol	101 pmol	1.01 nmol	10.1 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	0 : 1	1.6 : 1	16 : 1	160 : 1

	aerob		anaerob	
	hv	hv + Pip	hv	hv + Pip
0 : 1	1 %	1 %	1 %	1 %
1.6 : 1	22 %	63 %	27 %	24 %
16 : 1	40 %	94 %	31 %	28 %
160 : 1	65 %	99 %	15 %	20 %

Abb. 32a: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

Anmerkung: Doppelstrang (a)

	92a/b	92a/b	92a/b	92a/b
DNA	je 200 pmol	je 200 pmol	je 200 pmol	je 200 pmol
Basenpaare	6.6 nmol	6.6 nmol	6.6 nmol	6.6 nmol
Acridiziniumsalz	0 nmol	10.6 nmol	106 nmol	1056 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	0 : 1	1.6 : 1	16 : 1	160 : 1

	aerob			anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH₃	hv	hv + Pip	hv + NH₃
0 : 1	1 %	4 %	1 %	1 %	1 %	1 %
1.6 : 1	33 %	87 %	90 %	21 %	19 %	20 %
16 : 1	58 %	99 %	99 %	16 %	12 %	11 %
160 : 1	86 %	99 %	99 %	14 %	14 %	14 %

Abb. 32b: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

Anmerkung: Einzelstrang (b)

	92b	92b	92b	92b
DNA	200 pmol	200 pmol	200 pmol	200 pmol
Basen	6.6 nmol	6.6 nmol	6.6 nmol	6.6 nmol
Acridiziniumsalz	0 nmol	10.6 nmol	106 nmol	1056 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	0 : 1	1.6 : 1	16 : 1	160 : 1

	aerob			anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH₃	hv	hv + Pip	hv + NH₃
0 : 1	2 %	5 %	6 %	1 %	3 %	1 %
1.6 : 1	20 %	35 %	48 %	22 %	14 %	20 %
16 : 1	49 %	80 %	89 %	36 %	29 %	41 %
160 : 1	52 %	82 %	87 %	7 %	8 %	12 %

Abb. 33: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

Anmerkung: verwendet wurde der Einzelstrang **91b**

	-	NaN ₃	D ₂ O	tert-BuOH
DNA	300 pmol	300 pmol	300 pmol	300 pmol
Basen	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol
Acridiziniumsalz	10.1 nmol	10.1 nmol	10.1 nmol	10.1 nmol
Zusatz	-	200 nmol	11 mmol ¹⁾	20 µmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1

¹⁾: vollständiger Ersatz von H₂O durch D₂O

	aerob			anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH ₃	hv	hv + Pip	hv + NH ₃
kein Zusatz	30 %	72 %	68 %	20 %	31 %	30 %
NaN ₃	13 %	44 %	52 %	12 %	13 %	14 %
D ₂ O	55 %	89 %	88 %	14 %	21 %	19 %
tert-BuOH	25 %	63 %	70 %	4 %	1 %	1 %

Abb. 35: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

	93	94	95	96
DNA	300 pmol	300 pmol	300 pmol	300 pmol
Basen	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol
Acridiziniumsalz	10.1 nmol	10.1 nmol	10.1 nmol	10.1 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1

	a) aerob			b) anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH ₃	hv	hv + Pip	hv + NH ₃
93	10 %	1 %	7 %	14 %	9 %	12 %
94	30 %	83 %	93 %	39 %	32 %	37 %
95	1 %	15 %	11 %	35 %	33 %	39 %
96	4 %	1 %	9 %	17 %	17 %	17 %

Abb. 37/38: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

	96	97	98	99	100
DNA	300 pmol				
Basen	6.3 nmol				
Acridiziniumsalsz	10.1 nmol				
Phosphat	5 µmol				
Natriumchlorid	10 µmol				
Acrid : Bp	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1

	a) aerob			b) anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH₃	hv	hv + Pip	hv + NH₃
96	6 %	18 %	7 %	19 %	20 %	20 %
97	6 %	35 %	34 %	27 %	21 %	19 %
98	25 %	73 %	73 %	19 %	25 %	24 %
99	51 %	92 %	92 %	25 %	18 %	16 %
100	66 %	93 %	94 %	25 %	18 %	22 %

Abb. 40: t = 10 min

aerobe und anaerobe Bestrahlung

15 %iges denaturierendes Gel

	96	101	102	103	104
DNA	300 pmol	300 pmol	300 pmol	300 pmol	300 pmol
Basen	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol	6.3 nmol
Acridiziniumsalsz	10.1 nmol	10.1 nmol	10.1 nmol	10.1 nmol	10.1 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1	1.6 : 1

	a) aerob			b) anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH₃	hv	hv + Pip	hv + NH₃
96	8 %	4 %	8 %	8 %	7 %	7 %
101	10 %	9 %	12 %	19 %	18 %	19 %
102	13 %	3 %	5 %	27 %	18 %	21 %
103	8 %	3 %	7 %	26 %	19 %	23 %
104	4 %	5 %	6 %	19 %	17 %	13 %

Abb. 41: t = 10 min
aerobe und anaerobe Bestrahlung
15 %iges denaturierendes Gel

	91b	92b	99
DNA	300 pmol	200 pmol	300 pmol
Basen	6.3 nmol	6.6 nmol	6.3 nmol
Acridiziniumsalz	10.1 nmol	10.1 nmol	10.1 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	0 µmol	0 µmol	0 µmol
Acrid : Bp	1.6 : 1	1.5 : 1	1.6 : 1

a) **91b**

	aerob			anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH₃	hv	hv + Pip	hv + NH₃
mit NaCl	22 %	63 %	70 %	27 %	24 %	22 %
ohne NaCl	31 %	68 %	71 %	29 %	32 %	22 %

b) **92b**

	aerob			anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH₃	hv	hv + Pip	hv + NH₃
mit NaCl	33 %	87 %	90 %	21 %	19 %	20 %
ohne NaCl	18 %	80 %	79 %	14 %	14 %	14 %

c) **99**

	aerob			anaerob		
	hv	hv + Pip	hv + NH₃	hv	hv + Pip	hv + NH₃
mit NaCl	51 %	92 %	92 %	25 %	18 %	16 %
ohne NaCl	17 %	84 %	90 %	12 %	6 %	9 %

Abb. 43: t = 10 min
 aerobe und anaerobe Bestrahlung
 15 %iges denaturierendes Gel

	97	107
DNA	300 pmol	300 pmol
Basen	6.3 nmol	6.3 nmol
Acridiziniumsalz	10.1 nmol	10.1 nmol
Phosphat	5 µmol	5 µmol
Natriumchlorid	10 µmol	10 µmol
Acrid : Bp	1.6 : 1	1.6 : 1

	aerob	anaerob
97 (G)	9 %	19 %
107 (oxoG)	4 %	39 %

6.4 PAGE

6.4.1 HERSTELLEN DER POLYACRYLAMIDGELE

Für alle Oligonukleotide wurden 12 %ige, 15 %ige oder 20 %ige, denaturierende Gele verwendet, für die DNA-Leiter ein 8 %iges, natives Gel. Die Herstellung erfolgte unter Verwendung einer Lösung von Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 19:1) und Harnstoff gelöst in Wasser (nanopur) und TBE-Puffer:

	8 %ig nativ	12 %ig denat.	15 %ig denat.	20 % denat.
AccuGel 19:1	15 ml	30 ml	40 ml	50 ml
Harnstoff	0 g	50 g	50 g	50 g
TBE-Puffer	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Wasser (nanopur)	75 ml	20 ml	10 ml	0 ml

Die so hergestellte Lösung wurde mithilfe der Wasserstrahlpumpe für 4 Minuten entgast. Dann wurde die Polymerisation durch Zugabe von je 100 µl TEMED und APS-Lösung (10 %) initiiert. Anschließend wurde das Gel in einer Schichtdicke von 0.4 mm gegossen und mindestens 3 Stunden gewartet bis zur weiteren Verwendung.

6.4.2 BELADEN DER GELE

Der Rückstand der lyophilisierten Proben wurde in je 30 µl Wasser und Ladepuffer (PAGE) gelöst. Davon wurden 5-10 µl entnommen und in 8 ml eines Lösungsmittelgemisches (irgasafe plus) gegeben. Davon wurde dann mithilfe eines Szintillationsmessgerätes die Intensität der β -Strahlung gemessen.

Die Auftragungsvolumina der Proben (5-20 µl) wurden dann so berechnet, dass für alle eine gleich starke Radioaktivität auf das Gel aufgetragen wurde (80000 – 150000 CPM).

6.4.3 ELEKTROPHORESE

Als Elektrolyt wurde TBE-Puffer (10 %) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte potentiostatisch bei 1500 V (denaturierend) bzw. 800 V (nativ). Nach einem Vorlauf von etwa 1 Stunde wurde das Gel mit den Proben beladen (s.o.). Dann wurde die Elektrophorese über einen Zeitraum von 1 – 2 Stunden durchgeführt. In manchen Fällen wurde dann noch ein zweites Mal beladen und die Elektrophorese für weitere 1 – 2 Stunden fortgeführt. So konnten mehr Proben aufgetragen werden.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig auf Filterpapier transferiert und mit Klarsichtfolie geschützt. Um es zu konservieren, wurde es dann auf einem Geltrockner für 3 Stunden bei 70°C im Vakuum getrocknet. Das Exponieren kann vor oder nach diesem Trocknungsvorgang durchgeführt werden.

6.5 QUANTIFIZIERUNG

6.5.1 EXPONIEREN UND SCANNEN

Zur quantitativen Auswertung wurden die Gele vor oder nach dem Trocknen für 15 – 20 Stunden auf einem Phosphorscreen exponiert. Erfolgte das Exponieren mit dem ungetrockneten Gel, musste dieses mehrmals in Klarsichtfolie eingeschlagen sein, um den Screen vor Feuchtigkeit zu schützen. Nach dem Exponieren wurde der Screen mithilfe eines Phosphorimagers gescannt.

6.5.2 AUSWERTUNG

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software *ImageQuant*. Die Intensität (Schwärzung) der Spots aller relevanten Strangbruchprodukte und der intakten Oligonukleotide wurde bestimmt. Für die in Kapitel 3 durchgeführten Experimente konnten die Werte direkt miteinander verglichen werden.

Im Fall der in Kapitel 2 gezeigten Experimente wurden erst alle Spots mit der Intensität der gesamten Bande gewichtet, damit dann die Werte der Blindprobe von der des Experiments subtrahiert werden konnten. Die Differenz entspricht dann der durch Elektronentransfer verursachten Schädigung.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737 und 964.
- [2] F. H. Crick, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 425.
- [3] M. H. F. Wilkins, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 429.
- [4] J. D. Watson, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 439.
- [5] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH Weinheim, **1992**.
- [6] G. M. Blackburn, M. J. Gait, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press, Oxford/New York/Tokyo, **1996**.
- [7] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, **1984**.
- [8] R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, M. L. Kopka, *Science* **1982**, 216, 475.
- [9] Z. Shakked, D. Rabinovich, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1988**, 210, 127.
- [10] C. A. Hunter, *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 1025.
- [11] E. T. Kool, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1437.
- [12] L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, **1995**.
- [13] D. T. Suzuki, A. J. F. Griffiths, J. H. Miller, R. C. Lewontin, *Genetik*, VCH Weinheim, **1991**.
- [14] T. Kodadek, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 79.
- [15] H. Sies, W. A. Schulz, S. Steenken, *Photochem. Photobiol. B* **1996**, 32, 97.
- [16] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109.
- [17] K. B. Beckman, B. N. Ames, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 19633.
- [18] A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 18, 1033.
- [19] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
- [20] T. Özben, *Free Radicals, oxidative Stress and Antioxidants*, NATO ASI Series, Plenum Press, New York, London, **1998**.
- [21] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503.
- [22] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 617.
- [23] S.-H. Kim, P. Kaminker, J. Campisi, *Oncogene* **2002**, 21, 503.
- [24] T. R. Cech, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 34.
- [25] A. Heller, *Faraday Discuss.* **2000**, 116,1.

- [26] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, 58, 411.
- [27] T. A. Hoffmann, J. Ladik, *Adv. Chem. Phys.* **1964**, 7, 84.
- [28] S. M. Gasper, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12762.
- [29] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12950.
- [30] B. Giese, S. Wessely, M. Spormann, U. Lindemann, E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 996.
- [31] B. Giese, S. Wessely, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3490.
- [32] D. B. Hall, E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, 382, 731.
- [33] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. C. Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 389.
- [34] D. B. Hall, S. O. Kelly, J. K. Barton, *Biochemistry* **1998**, 37, 15933.
- [35] M. Spormann, *Dissertation*, Universität Basel **2002**.
- [36] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12759.
- [37] E. Meggers, *Dissertation*, Universität Basel **1999**.
- [38] I. Saito, T. Nakamura, K. Nakatani, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12686.
- [39] G. Taubes, *Science* **1997**, 275, 1420.
- [40] D. N. Beratan, S. Priyadarshi, S. M. Risser, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 3.
- [41] M. W. Grinstaff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3629.
- [42] M. Ratner, *Nature* **1999**, 397, 480.
- [43] R. A. Marcus, M. Sutin, *Biochem. Biophys. Acta* **1985**, 265, 811.
- [44] G. L. Closs, J. R. Miller, *Science* **1988**, 240, 440.
- [45] M. Bixon, M. Jortner, *Adv. Chem. Phys.* **1999**, 106, 35.
- [46] P. J. Dandliker, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Science* **1997**, 275, 1465.
- [47] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 2714.
- [48] P. J. Dandliker, M. E. Nunez, J. K. Barton, *Biochemistry* **1998**, 37, 6491.
- [49] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, 277, 673.
- [50] K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 167.
- [51] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 159.
- [52] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5893.
- [53] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 253.
- [54] M. E. Nunez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 85.

- [55] T. T. Williams, D. T. Odom, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9048.
- [56] P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Kan, G. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8353.
- [57] A. A. Voityuk, N. Rösch, M. Bixon, J. Jortner, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9740.
- [58] S. Wessely, *Dissertation*, Universität Basel **2002**.
- [59] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318.
- [60] B. Giese, M. Spichthy, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 195.
- [61] H. Sies, *Angew. Chemie* **1986**, *98*, 1061.
- [62] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, *Physiol. Rev.* **1979**, *59*, 527.
- [63] H. Sies, *Oxidative Stress*, Academic Press, London **1991**.
- [64] R. S. Sohal, R. Weindruch, *Science* **1996**, *273*, 59.
- [65] K. J. A. Davies, *Biochem. Soc. Symp.* **1995**, *61*, 1231.
- [66] R. Weindruch, H. R. Warner, P. E. Starke-Reed, *Free Radicals in Ageing*, CRC Press, Boca Raton FL, **1993**.
- [67] B. H. Jennings, S. C. Pastra, J. L. Wellington, *Photochem. Photobiol.* **1970**, *11*, 215.
- [68] B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171.
- [69] W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089.
- [70] V. A. Bohr, *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, *32*, 804.
- [71] B. Demple, J. D. Levin, *Oxid. Stress* **1991**, 119.
- [72] G. W. Burton, A. Joyce, K. U. Ingold, *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *221*, 281.
- [73] J. E. Packer, T. F. Slater, R. L. Wilson, *Nature* **1979**, *278*, 737.
- [74] R. J. P. Williams, *Phil. Trans. R. Soc. B* **1986**, *311*, 593.
- [75] H. H. Wassermann, W. A. Murray, *Singlet Oxygen*, Academic Press, New York, **1979**.
- [76] J. B. Verlhac, A. Gaudemer, I. Kraljic, *Nouv. J. Chim.* 1984, *45*, 401.
- [77] W. F. Keir, F. J. Land, A. H. MacLennan, D. J. MacGarvaey, T. G. Truscott, *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 587.
- [78] D. T. Croke, L. Perrouault, M. A. Sari, J. P. Battioni, D. Mansuy, C. Hélène, T. Le Duan, *J. Photochem. Photobiol. B* **1993** *18*, 41.
- [79] H.-Y. Mei, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1339.
- [80] C. Hiort, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12354.
- [81] C. Hiort, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *Mol. Cell Biochem.* **1995**, *153*, 31.
- [82] D. W. J. Kwong, O. Y. Chan, R. N. S. Wong, S. M. Musser, L. Vaca, S. I. Chan, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1276.

- [83] H. H. Wasserman, R. W. Murray, *Singlet Oxygen*, Academic Press, New York **1979**.
- [84] W. Adam, G. Cilento, *Chemical and Biological generation of Electronically Excited States*, Academic Press, New York **1982**.
- [85] G. A. Russel, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3871.
- [86] J. A. Howard, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 1058.
- [87] E. Cadenas, H. Sies, W. Nastainczyk, V. Ullrich, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1983**, 364, 519.
- [88] J. R. Kanofsky, *Chem.-Biol. Interact.* **1989**, 70, 1.
- [89] E. Cadenas, H. Sies, *Methods Enzymol.* **1984**, 105, 221.
- [90] A. Boveris, E. Cadenas, R. Reiter, M. Filipkowski, Y. Nakase, B. Chance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 77, 347.
- [91] H. Sies, C. F. M. Menck, *Mutation Res.* **1992**, 275, 367.
- [92] B. Schnuriger, J. Bourdon, *Photochem. Photobiol.* **1968**, 8, 361.
- [93] H. Wefers, D. Schulte-Frohlinde, H. Sies, *FEBS Lett.* **1987**, 211, 49-52.
- [94] J. Cadet, R. Téoule, *Photochem. Photobiol.* **1978**, 28, 661.
- [95] S. Kawanishi, S. Inoue, S. Sano, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 6090.
- [96] P. C. C. Lee, M. A. Rodgers, *Photochem. Photobiol.* **1987**, 45, 79.
- [97] L. R. Blazek, J. G. Peak, M. J. Peak, *Photochem. Photobiol.* **1989**, 49, 607.
- [98] N. Paillous, P. Vicendo, *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, 20, 203.
- [99] B. Epe, P. Mützel, W. Adam, *Chem. Biol. Interact.* **1988**, 67, 149.
- [100] P. Di Mascio, H. Wefers, H.-P. Do-Thi, M. V. M. Lafleur, H. Sies, *Biochem. Biophys. Acta* **1989**, 1007, 151.
- [101] J.-L. Ravanat, C. Saint-Pierre, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J. Cadet, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 3702.
- [102] J.-L. Ravanat, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J. Cadet, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 40601.
- [103] R. P. Hickerson, F. Prat, J. G. Muller, C. S. Foote, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9423.
- [104] R. N. Goyal, N. Jain, D. K. Garg, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, 43, 105.
- [105] H. Yanagawa, Y. Ogawa, M. Ueno, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13320.
- [106] M. Berger, C. Anselmino, J.-F. Mouret, J. Cadet, *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, 13, 929.
- [107] S. Boiteux, E. Gajewski, J. Laval, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **1992**, 31, 106.

- [108] T. P. A. Devasagayam, S. Steenken, M. S. W. Obendorf, W. A. Schulz, H. Sies, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6283.
- [109] C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6349.
- [110] T. Matsuura, I. Saito, S. Kato, *Chem. Biochem.* **1972**, *4*, 418.
- [111] J. E. Schneider, S. Price, L. Maidt, J. M. C. Gutteridge, R. A. Floyd, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 631.
- [112] S. Shibutani, M. Takeshita, A. P. Grollmann, *Nature* **1991**, *349*, 431.
- [113] M. Kouchakdijan, V. Bodepudi, S. Shibutani, M. Eisenberg, F. Johnson, A. F. Grollmann, D. J. Patel, *Biochemistry* **1991**, *30*, 1403.
- [114] P. Cysewski, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, *94*, 3117.
- [115] D. Decuyper-Debergh, J. Piette, A. van de Vorst, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3155.
- [116] C. S. Foote, R. W. Denny, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6233.
- [117] A. A. Krasnovsky Jr., *Photochem. Photobiol.* **1979**, *29*, 29.
- [118] S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1221.
- [119] E.-M. Park, M. K. Shigenaga, P. Degan, T. S. Korn, J. W. Kitzler, C. M. Wehr, P. Kolachana, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3375.
- [120] M. K. Shigenaga, B. N. Ames, *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 211.
- [121] M. K. Shigenaga, E.-M. Park, K. C. Cundy, C. J. Gimeno, B. N. Ames, *Meth. Enzymol.* **1990**, *186*, 521.
- [122] J. A. Imlay, S. Linn, *Science* **1988**, *240*, 1302.
- [123] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc.* **1894**, *65*, 899.
- [124] C. Walling, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 125.
- [125] A. O. Allen, *Discussions Faraday Soc.* **1952**, *12*, 79.
- [126] I. Štefanić, J. A. La Verne, *J. Phys. Chem.* **2002**, *106*, 447.
- [127] F. S. Dainton, J. Rowbottom, *Trans. Faraday Soc.* **1953**, *49*, 1160.
- [128] J. P. Hunt, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5999.
- [129] D. H. Volman, J. C. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4141.
- [130] U. S. Singh, R. T. Scannel, H. An, B. J. Carter, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12691.
- [131] S. Matsugo, S. Kumaki, C. Shimasaki, T. Mori, I. Saito, *Chem. Lett.* **1993**, 453.
- [132] M. Sako, K. Nagai, Y. Maki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 750.
- [133] K. Randerath, E. Randerath, C. V. Smith, J. Chiang, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 247.
- [134] D. R. Lloyd, D. H. Phillips, P. L. Carmichael, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 393.

- [135] J. Cadet, M. Berger, T. Douki, J. L. Ravanat, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1997**, *131*, 1.
- [136] G. Scholes, R. L. Willson, M. Ebert, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1969**, 17.
- [137] M. Kuwabara, *Radiat. Phys. Chem.* **1991**, *37*, 691.
- [138] J. R. Wagner, J. E. van Lier, C. Decarroz, M. Berger, J. Cadet, *Methods Enzymol.* **1990**, *196*, 502.
- [139] S. V. Jovanovic, M. G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5968.
- [140] R. B. Setlow, W. L. Carrier, F. J. Bollum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *53*, 1111.
- [141] D. K. Hazra, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4380.
- [142] M. Polverelli, A. Bonicel, R. Teoule, *J. Radiat. Res.* **1976**, *17*, 127.
- [143] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513.
- [144] T. Masuda, H. Shinohara, M. Eda, M. Kondo, *J. Radiat. Res.* **1980**, *21*, 173.
- [145] B. Balasubramanian, W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9738.
- [146] J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, S. Souvaigo, *Mutation Res.* **1999**, *424*, 9.
- [147] W. D. Henner, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, W. A. Haseltine, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 711.
- [148] W. D. Henner, S. M. Grunberg, W. A. Haseltine, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 11750.
- [149] K. Miaskiewicz, R. Osman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 232.
- [150] C. J. Alden, S. Kim, *J. Mol. Biol.* **1979**, *132*, 411.
- [151] M. Kuwabara, C. Yoon, T. Goyne, T. Thedarahn, D. S. Sigman, *Biochemistry* **1986**, *25*, 7401.
- [152] L. E. Marshall, D. R. Graham, K. A. Reich, D. S. Sigman, *Biochemistry* **1981**, *20*, 244.
- [153] I. H. Goldberg, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 191.
- [154] A. Meyers, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4493.
- [155] M. M. Greenberg, M. R. Barvian, G. P. Cook, B. K. Goodman, T. J. Matray, C. Tronche, H. Venkatesan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1828.
- [156] R. Osman, L. Pardo, J. Banfelder, A. P. Mazurek, L. Shvartzman, R. Strauss, H. Weinstein, *Free Rad. Res. Commun.* **1991**, *12-13*, 465.
- [157] H. Sugiyama, K. Fujimoto, I. Saito, E. Kawashima, T. Sekine, Y. Ishido, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1805.

- [158] C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor&Francis, London, **1987**.
- [159] J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1107.
- [160] S. Hecht, *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 83.
- [161] L. Giloni, M. Takeshita, F. Johnson, C. Iden, A. Grollmann, *J. Biol. Chem.* **1981**, 8608.
- [162] D. Schulte-Frohlinde, *Radioprotectors and Anticarcinogens*, Academic Press, New York, **1986**.
- [163] B. Giese, X. Beyrich-Graf, J. Burger, C. Kesselheim, M. Senn, T. Schäfer, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1850.
- [164] A. O. Colson, M. D. Sevilla, *Int. J. Radiat. Biol.* **1995**, 67, 627.
- [165] M. Isildar, M.-N. Schuchmann, D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag, *Int. J. Radiat. Biol.* **1990**, 18, 1217.
- [166] G. Pratviel, M. Pitié, J. Bernadou, B. Meunier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, 36, 702.
- [167] L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1983**, 22, 4872.
- [168] T. A. Dix, K. M. Hess, M. A. Medina, R. W. Sullivan, S. L. Tilly, T. L. L. Webb, *Biochemistry* **1996**, 35, 4578.
- [169] P. Toure, F. Villena, G. S. Melikyan, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3989.
- [170] T. Melvin, P. O'Neill, G. D. D. Jones, *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, 66, 499.
- [171] H. Ihmels, K. Faulhaber, C. Sturm, G. Bringmann, K. Messer, N. Gabellini, D. Vedaldi, G. Viola, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 74, 505.
- [172] H. Ihmels, K. Faulhaber, K. Wissel, G. Bringmann, K. Messer, G. Viola, D. Vedaldi, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1157.
- [173] H. Ihmels, B. Engels, K. Faulhaber, C. Lennartz, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 2854.
- [174] H. Ihmels, K. Faulhaber, K. Wissel, G. Viola, D. Vedaldi, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2999.
- [175] K. Faulhaber, *Dissertation*, Universität Würzburg **2003**.
- [176] C. K. Bradsher, J. C. Parham, *J. Heterocyclic Chem.* **1964**, 1, 30.
- [177] A. U. Khan, P. Di Mascio, M. H. G. Medeiros, T. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 11428.
- [178] B. M. Monroe, *Singlet O₂*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton FL, **1985**.
- [179] M. A. Siddiqi, E. Bothe, *Radiation Res.* **1987**, 112, 449.
- [180] S. M. Afzal, P. C. Kesavan, *Int. J. Radiation Biol. Rel. Studies Phys. Chem. Med.* **1979**, 35, 287.

- [181] A.-J. Cheng, M. W. Van Dyke, *Gene* **1997**, *197*, 253.
- [182] V. Đapić, V. Abdomerović, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J. O. Trant, P. J. Bates, *Nucl. Acids Res.* **2003**, *31*, 2097.
- [183] K. Poon, R. B. Macgregor Jr., *Biopolymers* **1998**, *45*, 427.
- [184] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 560.
- [185] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* **1980**, *65*, 499.
- [186] B. Armitage, G. B. Schuster, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 164.
- [187] I. Loeff, J. Rabani, A. Treinin, H. Linschitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8933.
- [188] I. Loeff, A. Treinin, H. Linschitz, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4931.
- [189] I. Loeff, A. Treinin, H. Linschitz, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2536.
- [190] A. Treinin, I. Loeff, J. K. Hurley, H. Linschitz, *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *95*, 333.
- [191] W. Adam, S. Marquardt, C. R. Santu-Möller, *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 287.
- [192] F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, **1991**.

Dipl.-Chem. Anne-Kathrin Köhler

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation "Untersuchungen zur Schädigung von DNA" nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Basel, den 10.2.2004

(Anne-Kathrin Köhler)

LEBENS LAUF

Anne-Kathrin Köhler

geboren am 16. August 1974 in Hannover, Deutschland

Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule Osterwald
1985 - 1987	Orientierungsstufe Berenbostel
1987 - 1994	Gymnasium Berenbostel

Studium

Okt. 1994 – Aug. 1999	Studium der Chemie an der Universität Hannover, Deutschland
Okt. 1997 – März 1998	Auslandssemester an der University of Cambridge, England, unter der Leitung von Dr. J. M. Goodman im Rahmen des Erasmus-Sokrates-Programmes
Feb. 1999 – Aug. 1999	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover, Deutschland, unter Anleitung von Prof. Dr. E. Winterfeldt: "Unsymmetrische Pyrazine via Azapyryliumsalze – Selektivität und Reaktivität"

Promotion

Okt. 1999 – Jan. 2004	Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Basel, Schweiz, unter Anleitung von Prof. Dr. B. Giese: "Untersuchungen zur Schädigung von DNA"
-----------------------	--

Lehrtätigkeit

Okt. 2001 – Juli 2003	Assistentin im Organisch-Chemischen Praktikum für Studierende der Biologie und Pharmazie an der Universität Basel, Schweiz
-----------------------	--

Stipendien

Okt. 1999 – Sept. 2000	Volkswagen-Stiftung
Okt. 2000 – Mai 2002	Schweizer Nationalfonds

An meiner Hochschulausbildung waren folgende Dozenten beteiligt:

Universität Hannover:

P. Behrends, M. Binnewies, J.-Ch. Buhl, H. Butenschön, H. Duddeck, D. Feldmann, J. Heidberg, P. Heitjans, D. Hesse, H. M. R. Hoffmann, R. Imbuhl, J. Janek, M. Kock, G. Meyer, H. Schamlzried, T. Scheper, B. Schmidt, H. Willner, E. Winterfeldt, G. Wunsch.

University of Cambridge:

J. M. Goodman.

Universität Basel:

T. A. Bickle, B. Giese, U. Séquin.