

**Chemie auf Distanz:  
Reduktiver Elektronentransport in DNA**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Würde eines  
Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Basel

von

Diplom-Chemiker

**Thomas Carl**

aus Nagold (Deutschland)

Basel 2004

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

Prof. Dr. B. Giese

Prof. Dr. W.-D. Woggon

Basel, den 04. Mai, 2004

Prof. Dr. M. Tanner  
(Dekan)

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Giese in der Zeit von Dezember 1999 bis März 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**.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

- O. Schiemann, E. Feresin, T. Carl, B. Giese "4'-Pivaloyl Substituted Thymidine as a Precursor for the Thymyl Radical. An EPR Spectroscopic Study." *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 270-274.
- B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin "Excess Electron Transport through DNA: A Single Electron Repairs more than One UV-Induced Lesion." *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1884-1887; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848-1851.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Bernd Giese danke ich für die engagierte Betreuung und die Weitsicht, die er für das in dieser Arbeit beschriebene Projekt bewiesen hat.

Herrn Prof. Dr. Thomas Carell sowie den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit sowie die Bereitstellung des modifizierten Thymidindimers.

Dr. Olav Schiemann und Emiliano Feresin danke ich für die ESR-Untersuchungen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Giese danke ich für die gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Arbeitsklima.

Den Herren Wolfgang Seufert und Martin Keßler danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

Meiner Frau Barbara danke nicht nur für ihre uneingeschränkte Unterstützung auf unserem gemeinsamen Forschungsgebiet, sondern auch für die Harmonie innerhalb und außerhalb des Labors. Sie hat großen Anteil daran, dass die Chemie zwischen uns in allen Situationen des Lebens stimmt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Liste der verwendeten Abkürzungen</b>	I
<b>Zusammenfassung</b>	III
<b>Theoretischer Teil</b>	
<b>1 Einleitung</b>	1
<b>2 Grundlagen</b>	
2.1 Oxidativer Lochtransfer	3
2.1.1 Einleitung	3
2.1.2 Superaustausch-Mechanismus	6
2.1.3 Hopping-Mechanismus	7
2.2 Reduktiver Elektronentransfer	10
2.2.1 Einleitung	10
2.2.2 Radiolyse-Experimente	10
2.2.3 Photochemische Studien	14
2.2.4 Geschwindigkeit der Elektroneninjektion	16
2.2.5 Spektroskopische Detektion der Ladungsinjektion	17
2.2.6 Chemische Detektion des reduktiven Elektronentransfers	18
2.2.7 Überschusselektronentransfer in der Natur	21
<b>3 Aufgabenstellung</b>	24
<b>4 Elektroneninjektion in die DNA</b>	26
4.1 Prinzip der selektiven Elektronenfreisetzung	26
4.2 Injektorsystem	29
4.3 Synthese des Injektorsystems	32

<b>5</b>	<b>Modelle zur Untersuchung der Elektroneninjektion</b>	35
5.1	Einleitung	35
5.2	Synthese von 5'-[( <i>R,S</i> )-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl]-thymidin	36
5.3	Synthese von 6-[( <i>R,S</i> )-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amido]-adenosin	37
5.4	Synthese der Guanosin-Modifikation	38
5.5	Synthese der Photolyseprodukte	39
5.5.1	Einleitung	39
5.5.2	Synthese der T*-Referenzverbindungen	40
5.5.3	Synthese der 5'-Thymidin-Referenzverbindungen	41
5.5.4	Synthese der Guanosin-Referenzverbindungen	41
<b>6</b>	<b>Photolyseexperimente</b>	43
6.1	Einleitung	43
6.2	Photolyse des 5-modifizierten Thymidins (T*) <b>59</b>	44
6.3	Photolyse des 5'-modifizierten Thymidins <b>62</b>	46
6.4	Photolyse des 5'-modifizierten Guanosins <b>64</b>	47
6.5	Photolyse des Amino-modifizierten Adenosins <b>63</b>	49
6.6	Zusammenfassung	50
<b>7</b>	<b>Thymindimer als Elektronenakzeptor</b>	51
7.1	Einleitung	51
7.2	Synthese der Modellverbindung <b>103</b>	52
7.3	Photolyse der Modellverbindung <b>103</b>	54
7.4	Synthese des Thymidindimer-Bausteins	56
<b>8</b>	<b>Thymidin-Radikalanion als intermediärer Ladungsträger</b>	59
8.1	Laserspektroskopische Untersuchungen	59
8.2	ESR-spektroskopische Untersuchungen	62
<b>9</b>	<b>Ladungstransfer in DNA</b>	67
9.1	Die Modifikationen T* und T-Dimer im DNA-Duplex	67
9.1.1	Einleitung	67
9.1.2	Strukturelle Merkmale der T*- und CPD-enthaltenden Oligonukleotide	68

9.1.3	Stabilität der Oligonukleotide	70
9.2	Das Konzept des reduktiven Elektronentransports	71
9.3	Ladungstransferexperimente	72
9.3.1	Distanzabhängigkeit	72
9.3.2.	Superaustausch oder Hopping ?	77
9.3.3	Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers	78
9.3.4	Der Einfluss des Injektorsystems	81
9.3.5	Das Überschusselektron als Katalysator	83
9.3.6	Geschwindigkeit und Richtungseffekt des Elektronentransfers	85
9.4	Zusammenfassung	88
<b>10</b>	<b>Phenazinium-Derivate als alternative Elektronenakzeptoren</b>	<b>89</b>
10.1	Einleitung	89
10.2	Experimente mit dem Phenaziniumsystem	90
10.2.1	Synthese des Redoxindikators	90
10.2.2	Photolyse von Verbindung <b>159</b>	91
10.3	Zusammenfassung und Ausblick	93
<b>Experimenteller Teil</b>		
<b>1</b>	<b>Vorbemerkungen</b>	<b>95</b>
1.1	Physikalische Daten	95
1.2	Chromatographische Methoden	96
1.3	Sonstige Apparaturen und Geräte	97
1.4	Lösungsmittel und Reagenzien	98
1.5	Produktreinigung und Aufarbeitung	99
1.6	Charakterisierung der Verbindungen	99
<b>2</b>	<b>Allgemeine Arbeitsmethoden</b>	<b>99</b>
2.1	Quantifizierung von Oligonukleotiden durch UV-Absorption	99
2.2	Doppelstrangbildung	100
2.3	Photolysen der Oligonukleotide	100
2.4	Massenbestimmung mittels MALDI-ToF-MS	100

<b>3</b>	<b>Oligonukleotide</b>	101
3.1	Oligonukleotidsynthesen	101
3.2	Bestimmung der Schmelzpunkte	102
<b>4</b>	<b>Quantifizierung der Photolyseprodukte mittels HPLC</b>	103
<b>5</b>	<b>Synthesen der beschriebenen Verbindungen</b>	104
5.1	Synthesen der Thymindimere	104
5.1.1	1,2,3,4-Tetrahydro-5-methyl-2,4-dioxypyrimidin-1-essigsäure ( <b>96</b> )	104
5.1.2	Benzyl-1,2,3,4-tetrahydro-5-methyl-2,4-dioxypyrimidin-1-acetat ( <b>97</b> )	105
5.1.3	Photodimerisierung von Benzylester ( <b>97</b> )	106
5.1.3.1	Dibenzyl- <i>cis</i> -[4 <i>a</i> ]- <i>transoid</i> -[4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ]- <i>cis</i> -[4 <i>b</i> ]-dodecahydro-9,11-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2- <i>d</i> :3,4- <i>d'</i> ]dipyrimidin-1,5-diacetat ( <b>98</b> )	107
5.1.3.2	Dibenzyl- <i>cis</i> -[4 <i>a</i> ]- <i>transoid</i> -[4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ]- <i>cis</i> -[4 <i>b</i> ]-dodecahydro-11,12-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2- <i>d</i> :3,4- <i>d'</i> ]dipyrimidin-1,8-diacetat ( <b>100</b> )	108
5.1.3.3	Dibenzyl- <i>cis</i> -[4 <i>a</i> ]- <i>cisoid</i> -[4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ]- <i>cis</i> -[4 <i>b</i> ]-dodecahydro-9,11-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2- <i>d</i> :3,4- <i>d'</i> ]dipyrimidin-1,5-diacetat ( <b>99</b> )	109
5.1.4	<i>cis</i> -[4 <i>a</i> ]- <i>transoid</i> -[4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ]- <i>cis</i> -[4 <i>b</i> ]-Dodecahydro-11,12-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2- <i>d</i> :3,4- <i>d'</i> ]dipyrimidin-1,8-diessigsäure ( <b>102</b> )	110
5.1.5	Di-(3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl)- <i>cis</i> -[4 <i>a</i> ]- <i>transoid</i> -[4 <i>a</i> ,4 <i>b</i> ]- <i>cis</i> -[4 <i>b</i> ]-dodecahydro-11,12-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2- <i>d</i> :3,4- <i>d'</i> ]dipyrimidin-1,8-diessigsäure ( <b>103</b> )	111
5.1.6	(3-Oxo-butanoyl)-1,2,3,4-tetrahydro-5-methyl-2,4-dioxypyrimidin-1-acetat ( <b>105</b> )	112
5.2	Synthese des modifizierten Thymidin-Derivates T*	113
5.2.1	3',5'-Di- <i>O</i> -( <i>tert</i> -butyldiphenyl)silyl- $\alpha$ -(3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino)-thymidin ( <b>58</b> )	113
5.2.2	$\alpha$ -[( <i>R,S</i> )-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin ( <b>59</b> )	114
5.2.3	5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytrityl)- $\alpha$ -[( <i>R,S</i> )-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin ( <b>60</b> )	116
5.2.4	5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytrityl)- $\alpha$ -[( <i>R,S</i> )-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin-3'- <i>O</i> -[(2-cyanoethyl)- <i>N,N</i> -diisopropyl-( <i>R,S</i> )-phosphoramidit ( <b>61</b> )	117
5.3	Synthese der Photolyse-Referenzverbindungen	119
5.3.1	3',5'-Di- <i>O</i> -( <i>tert</i> -butyldiphenyl)silyl- $\alpha$ -(3-oxo-butanoyl-amino)-thymidin ( <b>86</b> )	119
5.3.2	$\alpha$ -(3-Oxo-butanoyl-amino)-thymidin ( <b>76</b> )	120



5.3.3	3',5'-Di- <i>O</i> -( <i>tert</i> -butyldimethyl)silyl- $\alpha$ -(3-oxo-5-hydroxy-butanoyl-amino)-thymidin ( <b>87</b> )	121
5.3.4	$\alpha$ -(3-Oxo-5-hydroxy-butanoyl-amino)-thymidin ( <b>77</b> )	122
5.3.5	3'- <i>O</i> -( <i>tert</i> -butyldimethyl)silyl-5'[( <i>R,S</i> )-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl]-thymidin ( <b>68</b> )	123
5.3.6	5'-[( <i>R,S</i> )-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl]-thymidin ( <b>62</b> )	124
5.3.7	3'- <i>O</i> -( <i>tert</i> -butyldimethyl)silyl-5'-[3-oxo-butanoyl]-thymidin ( <b>88</b> )	125
5.3.8	5'-[3-Oxo-butanoyl]- thymidin ( <b>77</b> )	126
5.3.9	3'- <i>O</i> -( <i>tert</i> -Butyldimethyl)silyl-5'-(3-hydroxy-butanoyl)-thymidin ( <b>89</b> )	127
5.3.10	5'-(3-Hydroxy-butanoyl)-thymidin ( <b>78</b> )	128
5.3.11	3',5'-Di- <i>O</i> -( <i>tert</i> -butyldimethyl)silyl-6-[( <i>R,S</i> )-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amido]-adenosin ( <b>71</b> )	129
5.3.12	6-[( <i>R,S</i> )-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amido]-adenosin ( <b>63</b> )	130
5.3.13	Guanosin-Modifikation ( <b>64</b> )	131
5.3.14	Keto-Guanosin-Modifikation ( <b>79</b> )	132
5.3.15	Hydroxy-Guanosin-Modifikation ( <b>80</b> )	133
5.4	Synthese des Phenazinderivats	135
5.4.1	2-[( <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)- <i>N</i> -methyl)amino]-9-ethylphenaziniumethylsulfat ( <b>158</b> )	135
5.4.2	3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-[(10-ethyl-phenazinium-ethylsulfat-2-yl)-methyl-amino]ethylester ( <b>159</b> )	136
<b>6</b>	<b>Photolysen der Modellverbindungen mit HPLC Analytik</b>	137
6.1	Bestrahlung der Verbindung <b>59</b>	137
6.2	Bestrahlung der Verbindung <b>63</b>	138
6.3	Bestrahlung der Verbindung <b>64</b>	138
6.4	Bestrahlung der Verbindung <b>62</b>	139
6.5	Bestrahlung der Verbindung <b>103</b>	139
6.6	Bestrahlung der Verbindung <b>159</b>	140
6.7	Bestrahlung der Verbindung <b>165</b>	141
<b>7</b>	<b>Photolysen der Oligonukleotide mit HPLC Analytik</b>	142
	<b>Literaturverzeichnis</b>	144

## Liste der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (wasserfrei)
Ac	Acetyl
Bn	Benzyl
ber.	berechnet
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butyl
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
cm	Zentimeter
CMC	<i>N</i> -Cyclohexyl- <i>N'</i> -(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-methyl- <i>p</i> -toluolsulfonat
d	Schichtdicke
δ	Chemische Verschiebung in ppm (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ε	molarer Extinktionskoeffizient in 1 mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (UV-VIS)
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid Hydrochlorid
EE	Ethylacetat (Essigester)
eq	Äquivalente
ESR	Elektronenspinresonanz
ET	Elektronentransfer
G	Guanin
h	Stunde(n)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
hν	Strahlung (Licht)

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
IR	Infrarotspektroskopie
$k$	Geschwindigkeitskonstante
$\lambda$	Wellenlänge
M	molar
m/z	Masse pro Ladung
MALDI-ToF MS	Matrix unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit- Massenspektrometrie
mM	millimolar
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz
OD	optische Dichte
ppm	parts per million
$R_f$	Retentionsfaktor (DC)
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
s	Sekunde(n)
T	Thymin
T*	5-modifiziertes Thymidin mit Pivaloylgruppe (Photoedukt)
T <sup>#</sup>	5- modifiziertes Thymidin ohne Pivaloylgruppe (Photoprodukt)
TBAF	<i>n</i> -Tetrabutylammoniumfluorid
TBAN	<i>n</i> -Tetrabutylammoniumnitrat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyl-Radikal
<i>tert</i>	tertiär
$t_R$	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
NHE	Standardwasserstoffelektrode
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Während der oxidative Lochtransfer (Wanderung einer positiven Ladung) mechanistisch weitgehend aufgeklärt wurde, ist bisher sehr wenig bekannt über den Transport negativer Ladung durch den DNA Duplex. In der vorliegenden Arbeit wird über die Injektion und den Transport eines Überschusselektrons in DNA berichtet. Zur Untersuchung des Elektronentransferprozesses wurde ein neuartiges Injektionssystem **A** (**T\***) entwickelt, das in der Lage ist, ortsselektiv ein einzelnes Elektron freizusetzen und dieses auf den DNA-Basenstapel zu übertragen. Das Prinzip der Elektroneninjektion beruht in dem hier vorgestellten System auf dem weniger negativen Redoxpotential der am leichtesten zu reduzierenden Nukleobase Thymin im Vergleich zu Dialkylketonen. Durch die in einer *Norrish I* Reaktion photochemisch angeregte Generierung des Ketylradikals **B** und des Ketylradikalanions **C** aus der Pivaloyl-Einheit des Injektormoleküls ist es möglich, ein Elektron auf die benachbarte Nukleobase zu übertragen (Abb. A).

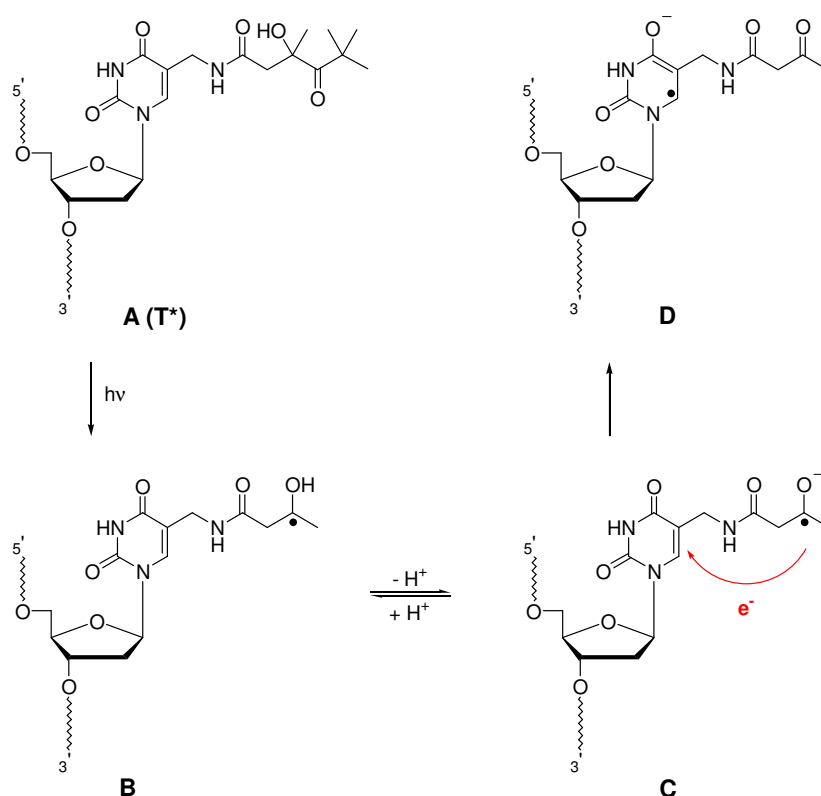
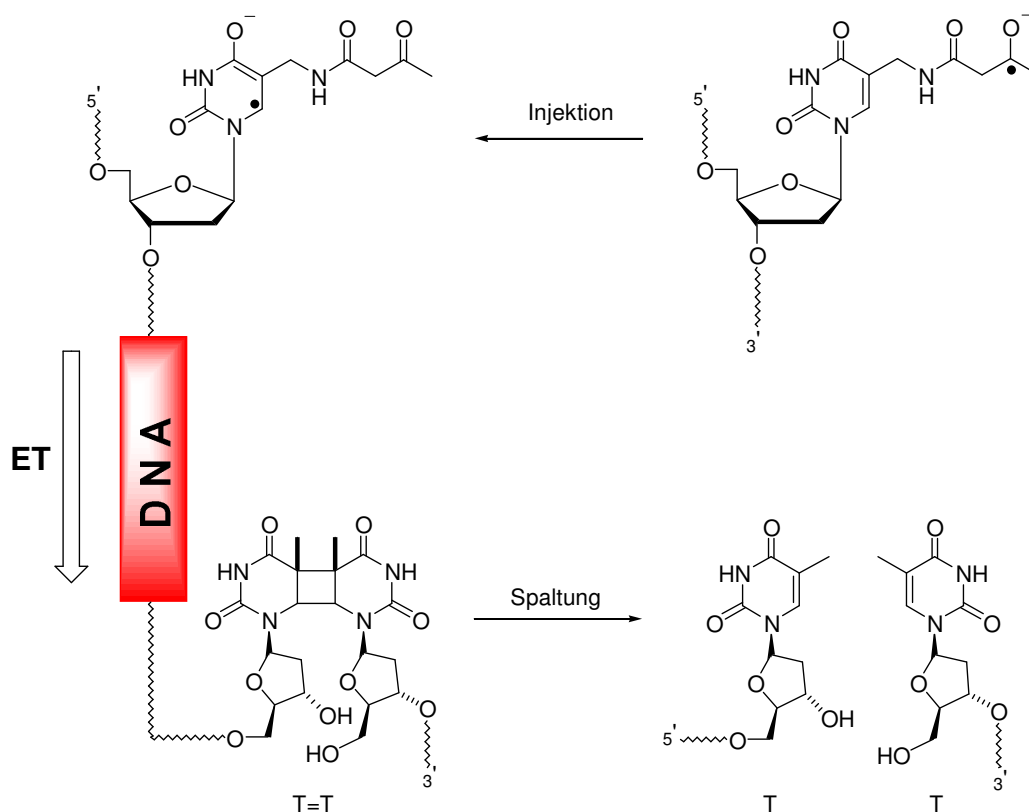


Abb. A Prinzip der Elektroneninjektion in die DNA ausgehend von Ketylradikalanionen.

Durch Modellsysteme wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass der Injektionsvorgang im Falle des Thymidins effizient und mit hoher Geschwindigkeit ( $k_{inj} > 10^7 \text{ s}^{-1}$ ) vor sich geht. Das nach der Ladungsinjektion gebildete Thymidin-Radikalanion ist als intermediärer

Ladungsträger Ausgangspunkt für den weiteren Transport des Elektrons zum endgültigen Elektronenakzeptor. Der Vorteil einer Ein-Elektronen-Reduktion eröffnete mit dieser neuen Methode die Möglichkeit bislang postulierte, aber bei der chemischen Untersuchung von Ladungstransferprozessen nicht nachgewiesene Zwischenstufen spektroskopisch sichtbar zu machen. So konnte in dieser Doktorarbeit erstmals die Existenz eines Thymyl-Radikals, das während des Hopping-Vorgangs des Überschusselektrons vom Donor über die Thyminbasen zum Akzeptor generiert wird, mittels ESR-Spektroskopie dokumentiert werden.

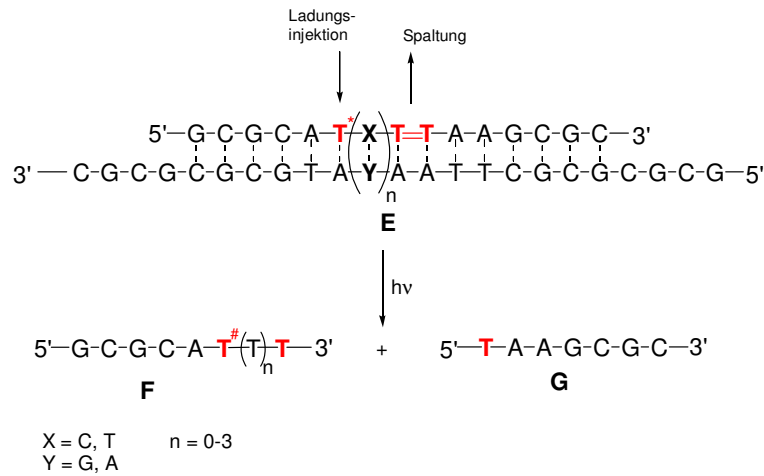
Die Detektion des Elektronentransferprozesses in DNA wurde mit der Spaltung eines Thymidindimers realisiert. Thymidindimere sind oxidative DNA-Schädigungen, die enzymatisch durch DNA-Photolyasen repariert werden. Grundlage dieser Reparatur ist eine Ein-Elektronen-Reduktion des Dimers, die in einer Spaltung in die Monomere resultiert (Abb. B).



**Abb. B** Elektronentransfer ausgehend von einem Thymidinradikalanion führt zur Spaltung eines Thymidindimers.

Der Transfer eines Überschusselektrons löst eine spontane Cycloreversion des Dimers aus, was im DNA-Duplex zu einer Strangspaltung führt. Experimente mit den in Abb. C dargestellten Doppelsträngen belegten einen effizienten Ladungstransfer über (A:T)-Basenpaare. Die geringe Abnahme der Spaltausbeute von 15 auf 5% über mehrere (A:T)-

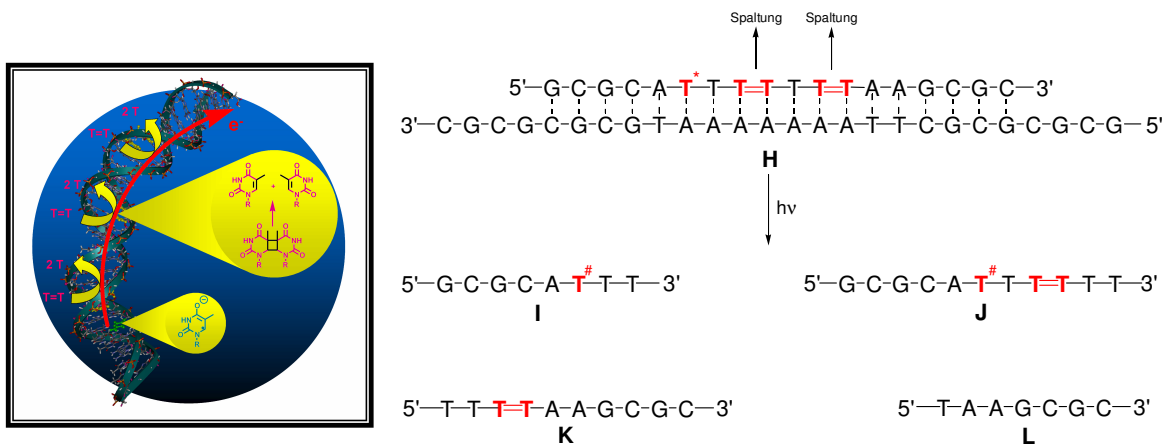
Basenpaare steht im Einklang mit einem mehrstufigen Hopping-Mechanismus des Elektrons über Thyminbasen.



**Abb. C** Oligonukleotide zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA.

Es stellte sich heraus, dass die Basensequenz einen großen Einfluss auf die Effizienz der Ladungsübertragung hatte. Bei der Substitution eines (A:T)-Basenpaares durch ein (G:C)-Basenpaar oder durch den Einbau einer künstlichen Nukleobase ohne Akzeptoreigenschaften sank die Ausbeute um den Faktor 10.

Durch den Einbau eines zweiten Thymidindimers als weiteres Detektorsystem konnten die katalytischen Eigenschaften des Überschusselektrons bei seiner Reise durch den DNA-Duplex unter Beweis gestellt werden. Das Elektron bewirkt dabei eine Cycloreversion der ersten Schädigung und wandert weiter zum nächsten Dimer, das ebenfalls gespalten wird (Abb. D).



**Abb. D** Katalytische Fähigkeiten eines Überschusselektrons – mehr als ein T-Dimer wird gespalten.

Aus der Konkurrenz zwischen der Spaltung eines Dimers und der fortschreitenden Elektronenwanderung in der DNA konnte eine Mindestgeschwindigkeit des negativen Ladungstransfers von  $k_{\text{ET}} > 10^9 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden. Aus der Produktverteilung der zweifachen Dimerspaltung konnte man darüber hinaus Erkenntnisse über die Richtung des Elektronentransfers gewinnen. Aufgrund struktureller Deformationen an der 5'-Seite des Thymidindimers ist eine Elektronenaufnahme über diesen Teil des Moleküls erschwert, es erfolgt daher eine bevorzugte Wanderung des Überschusselektrons in die 3'-Richtung.

Die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass das neu entwickelte System T\* / T-Dimer ein wirkungvolles Instrument zur Untersuchung reduktiver Elektronentransferprozesse in DNA darstellt. Neben der selektiven Elektroneninjektion war der wichtigste Faktor, den Effekt eines einzelnen Elektrons beobachten zu können. Dadurch waren sowohl die Nachweise intermediärer Zwischenstufen als auch der katalytischen Fähigkeiten eines Elektrons möglich.

# **Theoretischer Teil**



# 1 Einleitung

Die DNA ist als Träger der genetischen Information in allen zellulären Lebensformen ein Biopolymer, das zentrale Funktionen ausführt.<sup>[1,2]</sup> Zum einen steuert sie die eigene Replikation während der Zellteilung, zum anderen regelt sie die Transkription der komplementären RNA-Moleküle, die danach durch Translation die Biosynthese von Proteinen bewirken. Sie besteht aus relativ einfachen Einheiten, die sich aus einem Heterocyclus (Nukleobase) und einem als Rückgrat dienenden Zuckerphosphatpolymer, die kovalent miteinander verbunden sind, zusammensetzen.<sup>[3]</sup> Im Einzelstrang kann die DNA in einer Vielzahl von sekundären und tertiären Strukturen vorliegen. Zelluläre DNA existiert hauptsächlich als Duplex, in dem wasserstoffverbrückte Basenpaare eindimensionale  $\pi$ -gestapelte Anordnungen bilden.<sup>[4,5]</sup> Eine solch hochgeordnete Struktur findet sich sonst nirgends in der Natur, weshalb dieses Molekül gleichermaßen eine Faszination bei Chemikern und Biologen auslöst.

Die Primärstruktur der DNA enthält vier verschiedene Desoxyribonukleotide.<sup>[6]</sup> Jedes Nukleotid besteht aus drei Teilen: einem negativ geladenen Phosphat, der 2'-Desoxyribose und einer heterocyclischen Nukleobase. Die Nukleobasen sind Cytosin (C), Thymin (T), Adenin (A) und Guanin (G). Unter physiologischen Bedingungen existiert die DNA als Duplex, der sich aus zwei komplementären antiparallelen Strängen der DNA aufbaut, in der die Purine des einen Stranges (A,G) mit den Pyrimidinen des anderen Stranges (C,T) durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind und dadurch (G:C)- und (A:T)-Basenpaare bilden. Die Watson-Crick (G:C)-Basenpaare besitzen drei Wasserstoffbrücken während die (A:T)-Basenpaare nur deren zwei aufweisen, wobei jede H-Brücke ca. 2 kcal/mol zur Stabilität des Duplexes beiträgt. Es gibt mehrere Sekundärstrukturen der Duplex-DNA, wobei neben der A- und der Z-Form die B-Form am häufigsten auftritt. In dieser Form nimmt die DNA eine rechtsläufige Helix-Struktur ein, in der die Basenpaare in einer  $\pi$ -gestapelten Anordnung, senkrecht zur helikalen Achse, vorliegen. Eine Windung besteht aus zehn Basenpaaren, die dabei um  $36^\circ$  gegeneinander verdreht sind und eine Stapeldistanz von 3.4 Å aufweisen.<sup>[7]</sup> Das Zuckerphosphatrückgrat liegt außerhalb der Helix und bildet zwei Furchen (grooves) mit ähnlicher Tiefe aber unterschiedlicher Höhe, die als große (major) und kleine (minor) Furche bezeichnet werden (Abb. 1.1).

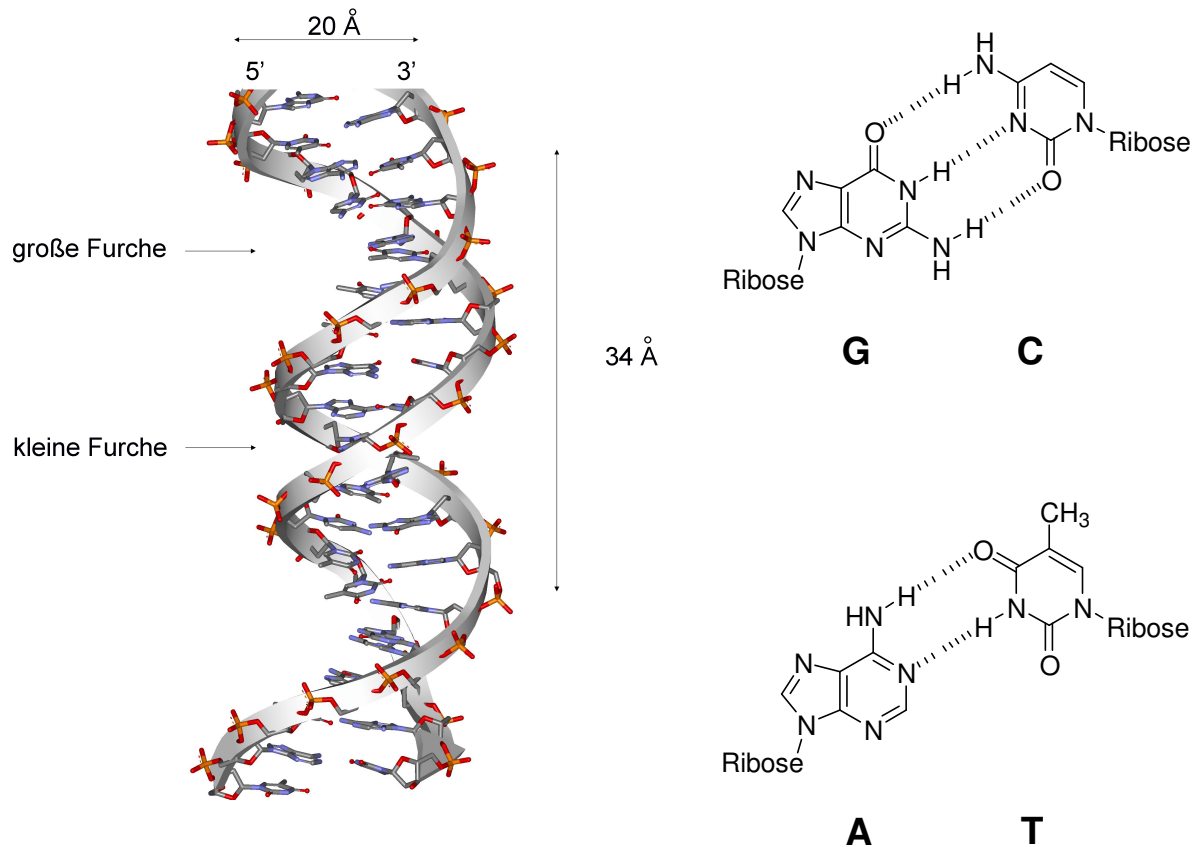


Abb. 1.1 Struktur der B-DNA mit den Watson-Crick-Basenpaaren.

Von besonderem Interesse ist die Oxidierbarkeit der Nucleinsäuren, die sowohl durch chemische und photochemische Oxidationsmittel als auch durch ionisierende Strahlung erreicht werden kann.<sup>[8-11]</sup> Oxidation kann zum Strangbruch führen, was sich im Verlust oder in der Mutation der genetischen Information äußern kann.<sup>[12]</sup> Da Strahlung alle Nucleobasen ionisieren kann, muss folglich eine Ladungswanderung von der Anfangsstelle der Oxidation (Radikalbildung) bis hin zur eigentlichen Schädigung auftreten. Das Verständnis eines solchen Ladungswanderungsprozesses ist daher notwendig, um sowohl die oxidative Schädigung der DNA als auch deren Reparatur, die ebenfalls über derartige Prozesse stattfindet, zu verstehen.

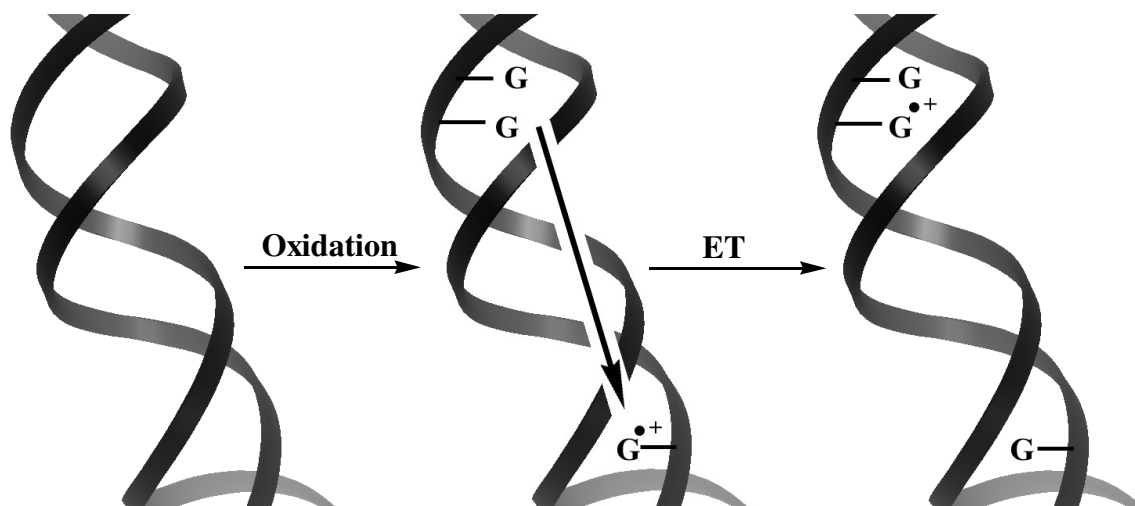
Die Möglichkeit, dass die  $\pi$ -gestapelten Basen der Duplex-DNA als " $\pi$ -way" für den Elektronentransfer dienen, wurde erstmals 1962 von Eley und Spivey vorgeschlagen.<sup>[13]</sup> In den vergangenen Jahren wurde vor allem der Transport von Radikalkationen (Lochtransport) intensiv untersucht.<sup>[14-17]</sup> Die Ergebnisse dieser Studien erlaubten tiefe Einblicke in den Elektronentransferprozess in der DNA und bildeten auch die Grundlage für den in dieser Arbeit näher beschriebenen reduktiven Elektronentransfer durch die DNA.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Oxidativer Lochtransfer

#### 2.1.1 Einleitung

Die fundamentale Frage, ob DNA ein geeignetes Medium für den Ladungstransfer über große Entfernungen ist, wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert.<sup>[18-21]</sup> Heutzutage besteht kein Zweifel mehr daran, dass Ladungstransfer durch die DNA über längere Distanzen stattfindet und im wesentlichen auch mechanistisch verstanden wird.<sup>[22-24]</sup> Das Zentrum des Interesses war die photochemisch oder photophysikalisch induzierte Oxidation der DNA, bei der der DNA oder dem endgültigen Akzeptor ein Elektron entzogen und auf den photoangeregten Ladungsdonor übertragen wird. Der oxidative Lochtransfer ist direkt verbunden mit der Bildung von DNA-Schädigung und die Distanz, die ein "Loch" in DNA zurücklegen kann, bestimmt, an welchen Positionen des Genoms oxidative DNA-Schädigungen vorkommen können (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1** Oxidation eines Guanins und Ladungswanderung durch DNA ausgehend von  $G^{\bullet+}$ .

Die Ladungsinjektion betreffende Experimente wurden mit Anthrachinonen,<sup>[23]</sup> Metallkomplexen<sup>[25]</sup> und Stilbenen<sup>[26]</sup> durchgeführt –  $\pi$ -Systeme, die im photoangeregten Zustand ein benachbartes Guanin, die Nukleobase mit dem geringsten Oxidationspotential, oxidieren (Abb. 2.2). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass ein durch diese selektive Oxidation generiertes G-Radikalkation  $G^{\bullet+}$  eine Elektronenwanderung von einem entfernten

G durch den Basenstapel der DNA induziert.<sup>[21-23]</sup> Die Gruppe um Barton war die erste, die Elektronentransferprozesse in DNA auf diese Weise untersuchte. Für die Ladungsinjektion wurde ein Rutheniumkomplex in die DNA interkaliert, der nach Anregung ein Elektron an den Duplex abgibt.<sup>[25]</sup> Als Elektronenakzeptor fungierte ein Rhodiumkomplex. Der Vorteil dieser Methode war, dass nur geringe Energien für die Metall-Photochemie benötigt wurden und somit keine Gefahr für unmittelbare Strangschädigung durch die Bestrahlung bestand.

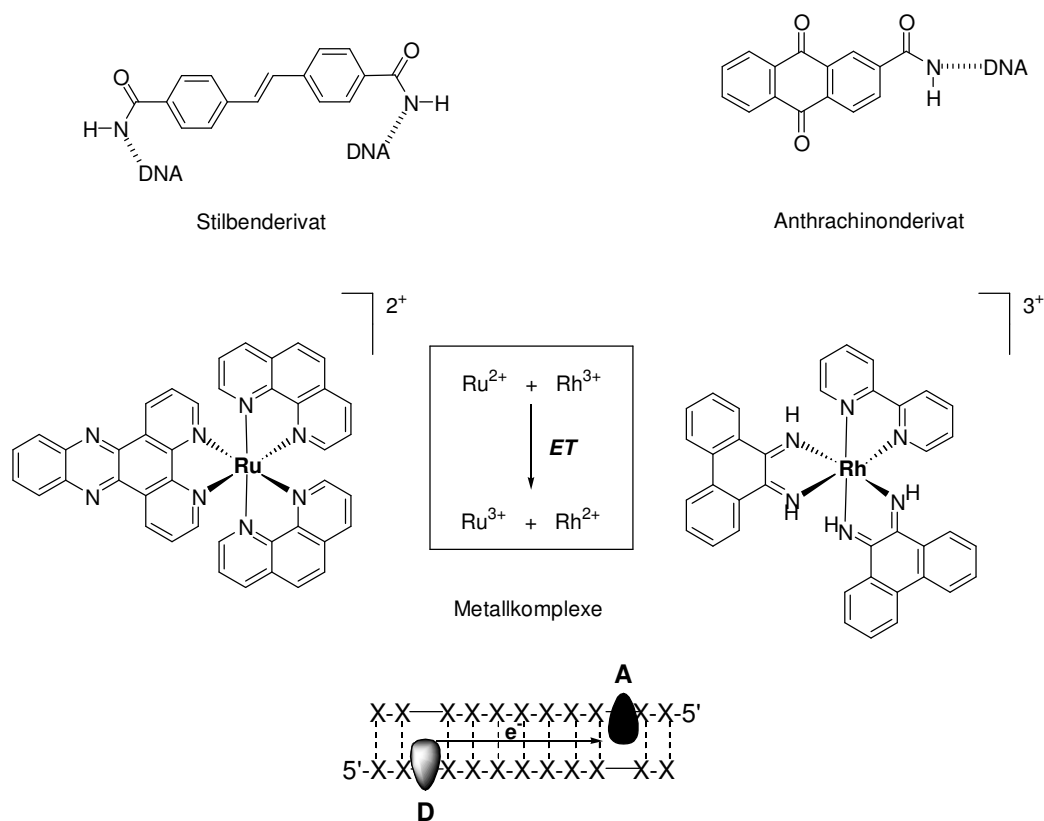
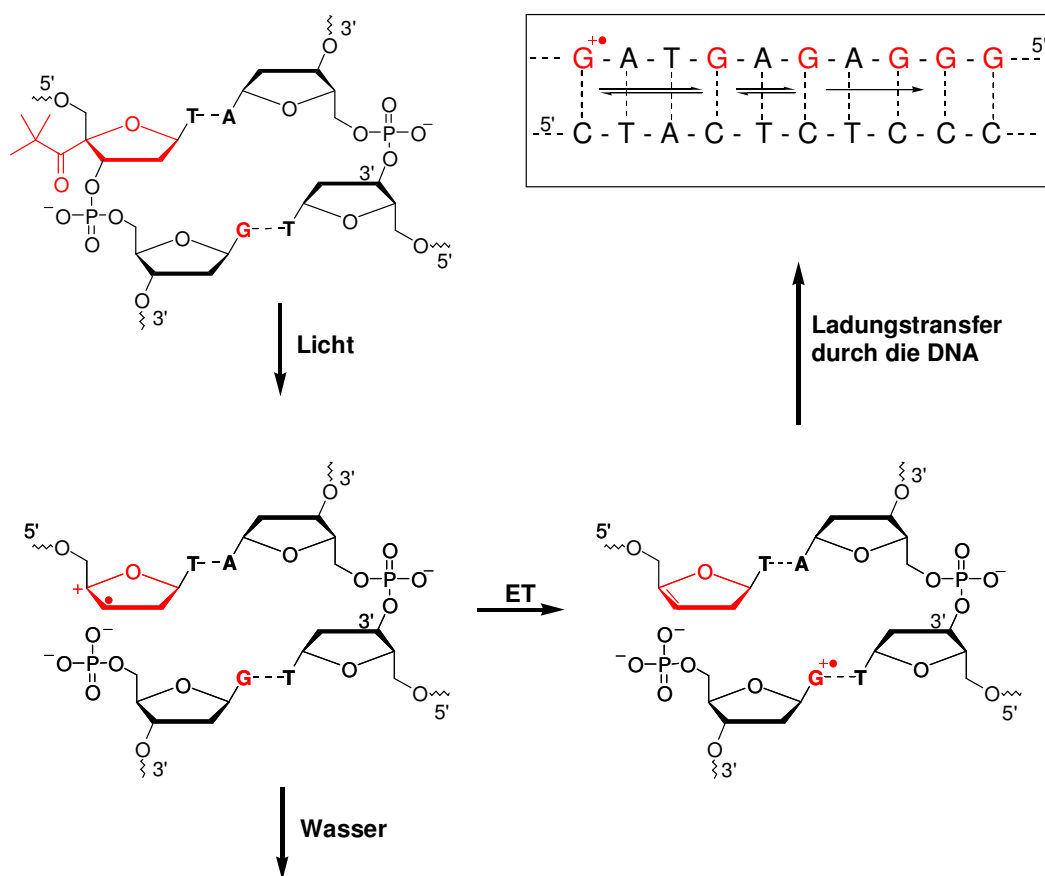


Abb. 2.2 Elektronendonoren für die Ladungsinjektion in DNA.

Basierend auf den Arbeiten zum 4'-radikalinduzierten DNA-Strangbruch wurde in der Arbeitsgruppe Giese ein neues Konzept zur Untersuchung von oxidativen Lochtransferprozessen in DNA entwickelt.<sup>[27]</sup> Hierbei konnte die Ladung erstmals ortsspezifisch in die DNA injiziert werden, was genauere Aussagen in Bezug auf die Distanz und Konkurrenzreaktionen zum Elektronentransfer erlaubte. Ausgehend von 4'-pivaloylmodifizierter DNA führt nach Photoanregung bei 320 nm eine *Norrish I*-Spaltung selektiv zur Bildung eines 4'-DNA-Radikals (Abb. 2.3).<sup>[28]</sup> Spontaner heterocyclischer C,O-Bindungsbruch liefert das 3'-DNA-Radikal, das entweder mit Wasser reagiert oder in einem Elektronentransferschritt zum Enolether reduziert wird. Ein wichtiger Faktor bei dieser Art der Elektroneninjektion ist, dass es sich um einen irreversiblen Elektronentransferprozess

handelt. Es findet kein Rücktransport der Ladung statt, was bei den vorher erwähnten System stets der Fall ist und zu einer Minderung der Effizienz führte.

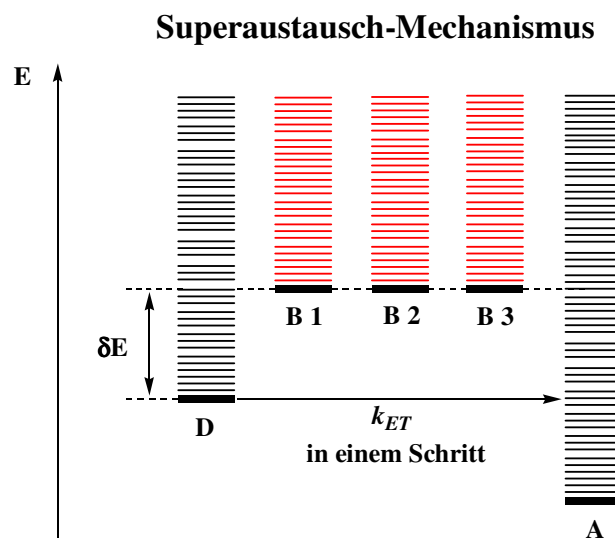


**Schema 2.1** Photochemisch angeregte Ladungsinjektion in die DNA ausgehend von einem modifizierten Thymidin.

Verschiedene Untersuchungen zum Transport einer positiven Ladung in der DNA deuteten auf unterschiedliche Mechanismen hin. So wurde einerseits ein einstufiger Prozess postuliert, bei dem die Ladung direkt vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird.<sup>[18-21]</sup> Diese Art des Ladungstransports ist aber mit einer starken Abnahme der Effizienz über längere Distanzen verbunden. Experimente, in denen die Ladung über eine größere Entfernung ohne nennenswerte Verluste transportiert wurden, waren mit diesem Mechanismus nicht vereinbar. So wurde ein weiterer Mechanismus postuliert, demzufolge die Ladung nicht in einem Schritt vom Donor auf den Akzeptor wandert, sondern in mehreren Hopping-Schritten über die leicht zu oxidierenden Guanin-Basen als Ladungsträger.<sup>[24]</sup> Auf diese Weise würde die Ladung wesentlich effizienter durch den DNA-Duplex wandern, und auch ein Transport über größere Distanzen wäre mit dieser Theorie zu erklären.

### 2.1.2 Superaustausch-Mechanismus

Anfänglich wurden Elektronentransferprozesse entsprechend der Marcus-Theorie mit dem Superaustausch-Mechanismus beschrieben.<sup>[29,30]</sup> Die DNA-Brücke zwischen Ladungsdonor (D) und -akzeptor (A) wird als ein großes delokalisiertes Molekülorbital betrachtet, durch das die Ladung in einem Schritt wandert. Die Ladung hält sich somit in diesem Tunnelprozess nie auf der DNA-Brücke selbst auf, und nur die Produktradikale nach erfolgter Ladungstrennung sind sichtbar.



**Abb. 2.3** Superaustausch-Mechanismus des photoinduzierten Lochtransfers in DNA.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ET}$  hängt dabei exponentiell von der Distanz  $R$  zwischen Elektronendonor und -akzeptor ab:

$$k_{ET} \propto e^{-\beta R} \quad \beta: \text{Konstante}$$

(Maß für die Distanzabhängigkeit)

Aus den ersten Experimenten erhielt man im Wesentlichen folgende Erkenntnisse:

- Der Lochtransfer ist auf kleine Entfernungen ( $< 10 \text{ \AA}$ ) beschränkt.
- Der ET verläuft über kurze Distanzen sehr schnell ( $k_{ET} = 10^9 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ).
- Typische  $\beta$ -Werte liegen zwischen  $0.6 - 0.8 \text{ \AA}^{-1}$ .
- Die Interkalation von Donor und Akzeptor ist entscheidend für einen schnellen und effizienten Prozess.

Spätere Experimente zeigten jedoch, dass Elektronentransfer auch über Distanzen von 200 Å erfolgen kann, ein Prozess, der nicht mit dem Superaustauschmechanismus erklärt werden konnte und auf eine geringe Abstandsabhängigkeit des Ladungstransfers deutete.<sup>[22]</sup> Daraufhin wurde ein zweiter Mechanismus formuliert, das sogenannte Hopping-Modell.

### 2.1.3 Hopping-Mechanismus

Bei diesem Mechanismus wird die Ladung in mehreren Schritten vom Donor zum Akzeptor transportiert.<sup>[17,31]</sup> Nach jedem Schritt ist die Ladung folglich für kurze Zeit auf einer Nukleobase lokalisiert. Ein solcher Prozess kann nicht mit der Marcus-Gleichung beschrieben werden, da der  $\beta$ -Wert kein entscheidender Parameter ist. Die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses hängt vielmehr von der Anzahl der Hopping-Schritte sowie von der Lage der Potentiale von Donor und Akzeptor relativ zur DNA-Brücke ab. Geschwindigkeitsbestimmend ist somit der längste Schritt innerhalb einer Sequenz.

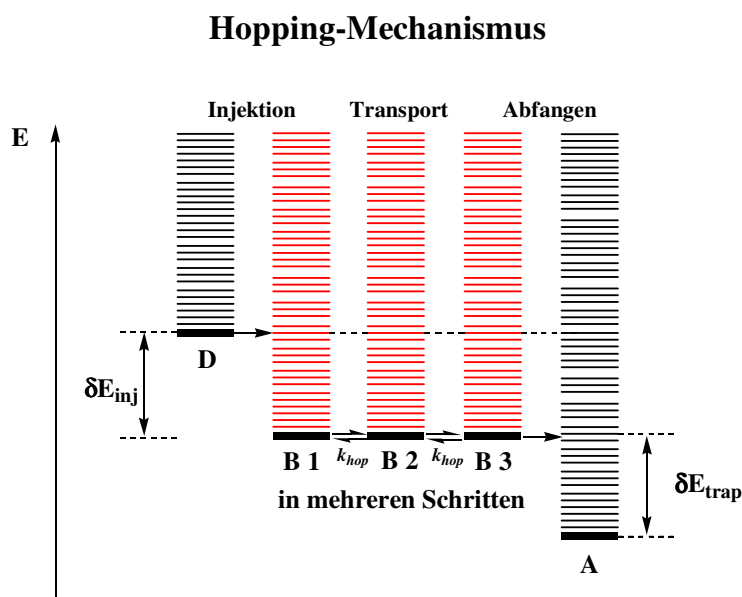


Abb. 2.4 Hopping-Mechanismus des photoinduzierten Lochtransfers in DNA.

Aufgrund des geringsten Oxidationspotentials aller Nukleobasen kommt Guanin eine besondere Rolle zu.<sup>[32,33]</sup> Während des Elektronentransferprozesses wird G zum Radikalkation  $G^{\bullet+}$  oxidiert, welches als Ladungsträger fungiert. Die Ladung hüpft, nachdem sie in den Basenstapel injiziert wurde, von G zu G und kann schließlich durch einen geeigneten Akzeptor eingefangen werden. Der Mechanismus konnte durch die Detektion des  $G^{\bullet+}$ -Radikalkations, welches durch Abfangreaktionen mit Wasser zu Strangbruchprodukten führte,

unterstützt werden.<sup>[34,35]</sup> Diese Abfangreaktion des Radikalkations steht in Konkurrenz zum ET-Prozess. Da die Geschwindigkeit der Wasserreaktion bekannt ist, gibt es im Hopping-Modell zwei Fälle, um die Geschwindigkeit des Lochtransports abzuschätzen:<sup>[34]</sup>

1. Die Abfangreaktion mit Wasser ist viel langsamer als der Hoppingschritt, was zur Folge hat, dass die Ladung über die DNA nach thermodynamischen Parametern verteilt ist.
2. Die Abfangreaktion mit Wasser ist ungefähr gleich schnell wie der Hopping-Schritt. In diesem Fall bestimmt der langsamste Hoppingschritt die Gesamtgeschwindigkeit.

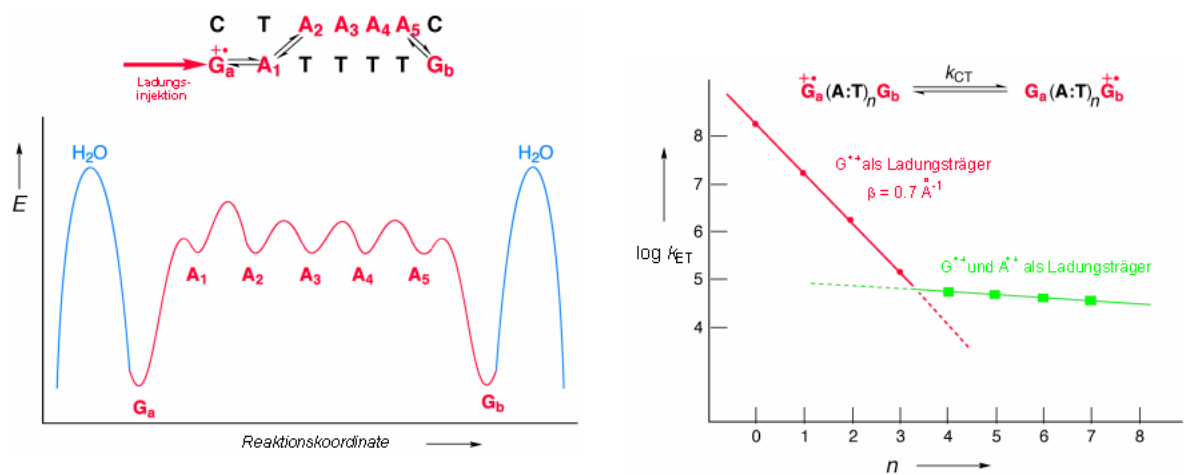
Die Geschwindigkeit des Lochtransportes kann diesem Modell entsprechend mit folgender Beziehung beschrieben werden:

$$k_{ET} \propto N^{-\eta}$$

$\eta$ : Konstante  
N: Zahl der Hopping-Schritte

Lewis bestimmte die Geschwindigkeit eines einzelnen Hopping-Schrittes von G nach GG auf  $k_{hop} = 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ .<sup>[36]</sup> Je mehr (A:T)-Basenpaare sich zwischen den Guaninen als Ladungsträger befinden, desto ineffizienter wird der Elektronentransfer.<sup>[24,37]</sup> Diese Distanzabhängigkeit steht wiederum im Einklang mit der Theorie des Tunnelns eines Elektrons von G zum Injektor. So wurde zunächst vermutet, dass eine zwischen zwei Guaninen liegende (A:T)-Sequenz als Brücke fungiert, die während der Reaktion nicht oxidiert wird. Rechnungen belegten, dass ein Lochtransfer zwischen zwei Guaninen, die durch vier (A:T)-Basenpaare getrennt sind, zu langsam sein sollte, um mit der Wasserabfangreaktion zu konkurrieren.<sup>[34,38,39]</sup> Jedoch verdeutlichten mehrere Experimente von unabhängigen Gruppen, dass ein ET-Prozess auch unter solchen Bedingungen stattfindet.<sup>[40-42]</sup> In (A:T)-reichen Basensequenzen fungiert demnach auch A als intermediärer Ladungsträger. Das thermodynamisch bevorzugte Tunneln zwischen  $G^{\bullet+}$  und G ist bei längeren (A:T)-Sequenzen derart langsam, dass eine endotherme Oxidation eines benachbarten Adenins stattfindet.<sup>[34]</sup> Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in diesem Prozess ist die Oxidation eines Adenins durch ein  $G^{\bullet+}$ -Radikalkation (Abb. 2.5).





**Abb. 2.5** Ladungstransport durch längere (A:T)-Sequenzen mit G<sup>•+</sup> und A<sup>•+</sup> als Ladungsträger.

Eine Alternative, die den Hopping-Mechanismus erweitert, ist das Polaron-Modell, das von Schuster vorgeschlagen wurde.<sup>[23]</sup> Er postuliert, dass eine dynamische Strukturänderung der DNA ein Elektron von einer Base zur nächsten über mehrere Hopping-Schritte bewegt. Die deformierte Region (Polaron) selbst bewegt sich entlang des Stranges, wobei sich Basenpaare in der Nähe der Deformation dem Polaron anschließen und wieder verlassen.

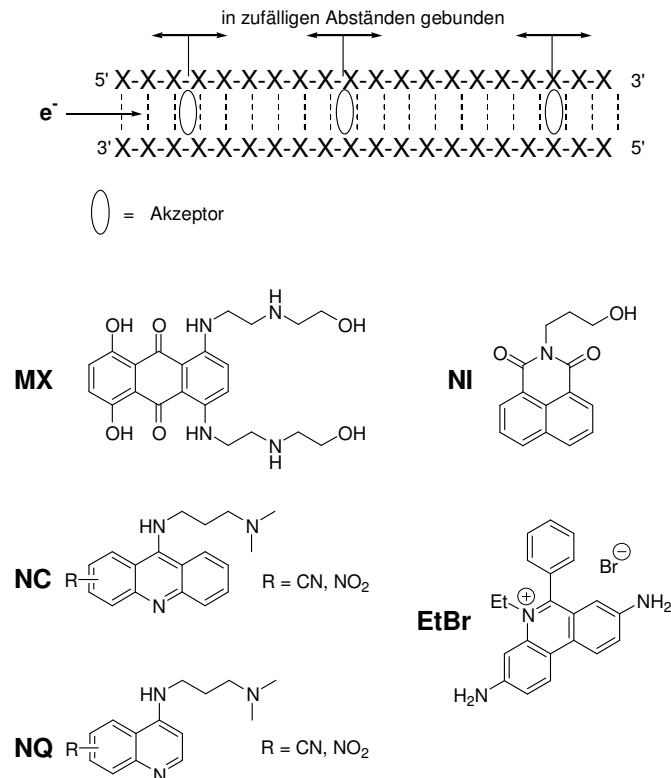
## 2.2 Reduktiver Elektronentransfer

### 2.2.1 Einleitung

Im Gegensatz zum oxidativen Lochtransfer ist bisher sehr wenig bekannt über den Transport negativer Ladung, eines Überschusselektrons, durch den DNA-Duplex. Mechanistische Details darüber, wie sich ein injiziertes Elektron in der DNA verbreitet, sind weitestgehend noch unklar. Analog der Oxidierbarkeit der Nukleobasen konnte ein Trend für die Reduzierbarkeit der DNA-Basen abgeleitet werden, der auch durch theoretische Untersuchungen bestätigt wurde. Demnach nimmt die Reduzierbarkeit der einzelnen Basen in folgender Reihenfolge ab:  $T, U \approx C > A > G$ .<sup>[33,43,44]</sup> Detaillierte Berechnungen der Elektronenaffinitäten der Nukleobasen in Oligonukleotiden verschiedener Basensequenzen zeigten, dass 5'-XCY-3' und 5'-XTY-3' die stärksten Elektronenakzeptoren sind, wenn X,Y = C oder T sind.<sup>[45]</sup> Die Basen C und T sollten als Ladungsträger fungieren, wobei die durch Reduktion intermediär gebildeten Radikalanionen  $C^{\bullet-}$  und  $T^{\bullet-}$  eine stark unterschiedliche Basizität aufweisen. Protonierung der Radikalanionen durch komplementäre Basen oder durch Wassermoleküle aus der Umgebung kann hierbei den Elektronentransfer oder das Hopping behindern.<sup>[46]</sup>

### 2.2.2 Radiolyse-Experimente

Erste Studien, die zu Erkenntnissen über das Verhalten von Überschusselektronen in DNA führten, wurden mit  $\gamma$ -Puls-Radiolyse-Experimenten, die meistens in Eis oder in glasartigen, wässrigen LiBr-Lösungen bei tiefen Temperaturen erfolgten, durchgeführt.<sup>[47-51]</sup> Zur Herstellung solvatisierter Elektronen, die in der Lage sind, DNA zu reduzieren und so einen Elektronentransferprozess auszulösen, wurden entsprechende Proben  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt. DNA wurde mit Elektronenakzeptoren wie z. B. Mitoxantron (MX), Acridin- (NC) oder Chinolinderivaten (NQ) dotiert (Abb 2.6). Diese interkalieren im DNA-Duplex in zufälligen Abständen. Die auftretenden Radikale der DNA sowie des Akzeptors wurden durch ESR nachgewiesen.



**Abb. 2.6** Elektronenakzeptoren in  $\gamma$ -Puls-Radiolyse-Experimenten zur Untersuchung des ET in DNA.

Der Nachteil dieses Verfahrens bestand in der nicht vorhandenen Regiospezifität der Injektion und der Detektion des Überschusselektrons. Trotzdem waren interessante Aussagen möglich:

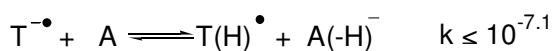
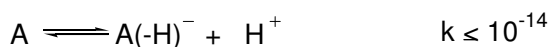
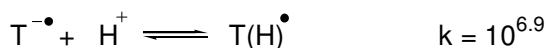
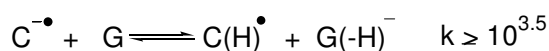
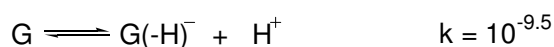
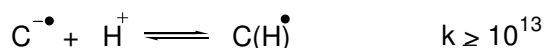
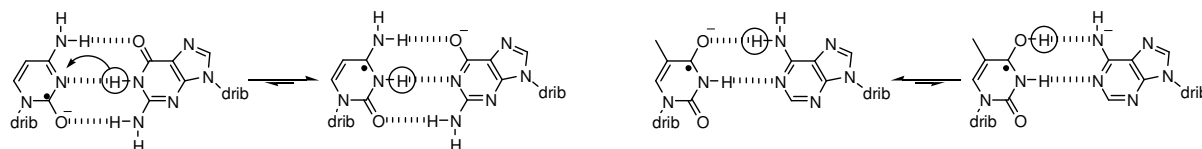
- Unterhalb 77 K erfolgt der ET als Superaustausch entsprechend der Marcus-Theorie. Es wurde ein temperaturunabhängiger  $\beta$ -Wert von  $0.9 \text{ \AA}^{-1}$  ermittelt, der darauf hindeutet, dass DNA bei dieser Temperatur kein gutes Medium für den ET darstellt.
- Oberhalb 130 K tritt zum Elektronentunneln mit der Protonierung des Radikalanions  $T^{\bullet-}$  ein Konkurrenzprozess auf, der ein irreversibles Abfangen des Elektrons bewirkt. Der Elektronentransfer von einem reduzierten  $C^{\bullet-}$  ist unterhalb 170 K zu langsam, um beobachtet zu werden.
- Oberhalb 170 K tritt als intermediärer Ladungsträger auch  $C^{\bullet-}$  auf, welches sofort durch ein komplementäres G protoniert wird, da dabei eine hohe Stabilitätsenergie frei wird. Aufgrund der Reversibilität und der thermischen Aktivierung des Protonentransfers wird die Reichweite des ET jedoch nicht limitiert.

Anderson et al. verwendeten in ihren Studien Nitroacridine und Nitrochinoline (NC, NQ) als Elektronenakzeptoren.<sup>[50]</sup> Sie bestimmten die Aktivierungsenergie  $E_a$  für einen Elektronentransfer von einem protonierten Cytosin  $C(H)^{\bullet}$  zum Akzeptor mit 5 kcal/mol. In Übereinstimmung mit den oben diskutierten Resultaten sollte demnach die Aktivierungsenergie für einen Elektronentransfer von  $T^{\bullet}$  geringer sein, und sie wurde mit 2 kcal/mol bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass die Wanderung von Überschusselektronen durch die DNA ein Prozess ist, der deutlich durch die Aktivierungsenergie kontrolliert wird. In neueren Arbeiten untersuchten Kawai und Mitarbeiter Elektronentransferprozesse mittels  $\gamma$ -Radiolyse an Naphthalimid-modifizierten Oligonukleotiden. Es konnte nur ein Ladungstransport über drei Basenpaare hinweg beobachtet werden. Die Autoren begründeten diesen Befund mit der geringen Beweglichkeit von Überschusselektronen in der DNA verglichen mit dem Lochtransport, der über große Distanzen ( $> 200 \text{ \AA}$ ) stattfindet.<sup>[52]</sup>

Sevilla hingegen, der ET-Prozesse von einem durch Radiolyse generierten Nukleobasen-Radikalanion zu zufällig gelegenen Interkalatoren wie Mitoxantron (MX) oder Ethidiumbromid (EtBr) mittels ESR erforscht und dabei den zeitabhängigen Abfall des Basenanion-Signals bei tiefen Temperaturen misst (77 K), kann Elektronentransfer über Distanzen von vier bis zu zehn Basenpaaren ( $35 \text{ \AA}$ ) detektieren.<sup>[47-49]</sup> Seine Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefasst werden:

- Die Elektronentransfargeschwindigkeiten sind distanzabhängig und stehen mit einem  $\beta$ -Wert von  $0.8 - 1.2 \text{ \AA}^{-1}$  im Einklang mit einem einstufigen Tunnelprozess bei Temperaturen unter 100 K.
- Die Temperatur beeinflusst den Mechanismus des reduktiven Elektronentransfers. Bei 77 K kann die Aktivierungsenergie von 5 kcal/mol für einen Hopping-Schritt nicht aufgebracht werden. Bei 130 K ist die thermische Aktivierung möglich, und es dominiert ein Elektronen-Hopping.
- Im Vergleich zum Lochtransfer ( $> 200 \text{ \AA}$ ) sind nur geringe Distanzen möglich.
- Der Prozess ist sequenzabhängig. In (polyAT:polyAT)-Bereichen ist der Transfer weitreichender als in (polyGC:polyGC)-Abschnitten, da Protonentransfer von G zu  $C^{\bullet}$  stattfindet und der Gesamtprozess zwar nicht abgebrochen aber verlangsamt wird.

Der Effekt des Protonentransfers ist von großer Bedeutung für den reduktiven Elektronentransfer, da er unmittelbaren Einfluß auf die Geschwindigkeit eines solchen Prozesses hat.<sup>[43,53]</sup> Die Basizität der beiden potentiellen Ladungsträger  $T^{\bullet-}$  und  $C^{\bullet-}$  ist sehr unterschiedlich. Während  $T^{\bullet-}$  einen  $pK_a$ -Wert von 7.1 aufweist, wird  $C^{\bullet-}$  mit einem  $pK_a > 13$  sehr schnell protoniert, was in den folgenden Gleichungen deutlich wird:



Gl. 2.1 Protonentransfer von den Radikalanionen  $C^{\bullet-}$  und  $T^{\bullet-}$  zu den komplementären Nucleobasen.

Die Tendenz von  $C^{\bullet-}$ , durch ein komplementäres G protoniert zu werden, ist also um die Größenordnung 10 höher als beim Basenpaar ( $T^{\bullet-}:A$ ). Die energetische Begünstigung des Protonentransfers im Falle von C wird durch Abbildung 2.7 verdeutlicht.

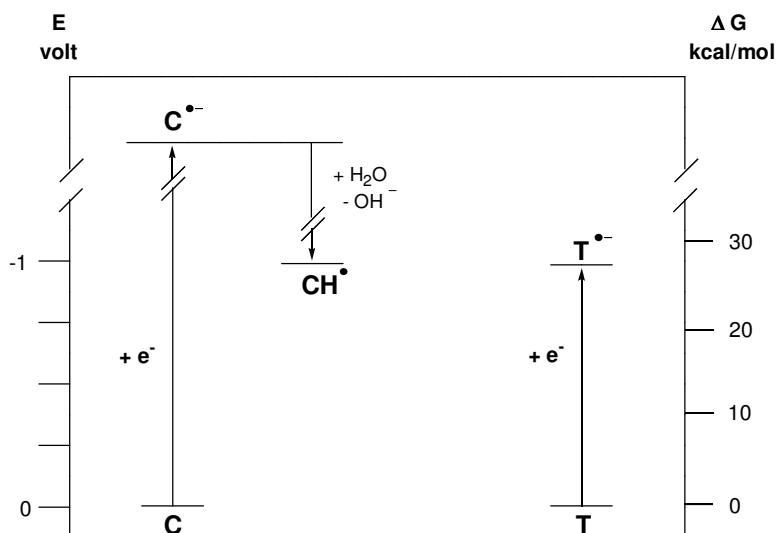


Abb. 2.7 Protonierungseffekt auf das Reduktionspotential von Cytidin bei pH 8.5.

Der Protonentransfer von G nach  $C^{\bullet-}$  erhöht die Elektronenaffinität von C um 0.52 eV und erniedrigt die Ionisierungsenergie von G um 0.54 eV, während diese Effekte beim Basenpaar ( $T^{\bullet-}:A$ ) vernachlässigbar sind. Der Protonentransfer führt zu einer Trennung von Ladung und

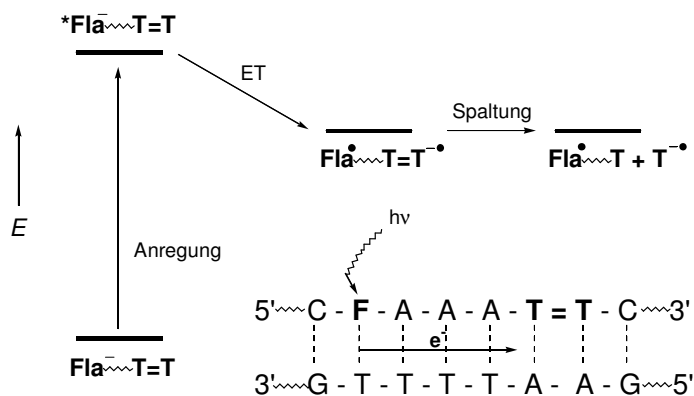
Spin, d.h. aus einem Radikalanion wird ein Radikal. Das Radikal bleibt auf dem Originalstrang während die Ladung auf den Komplementärstrang wechselt. Dies führt zu einer starken Behinderung oder sogar zu einem Abbruch des Elektronentransferprozesses.<sup>[43]</sup>

Gleichzeitig zu den Pulsexperimenten gab es auch erste theoretische Simulationen des Elektronentransfers eines Überschusselektrons in der DNA. Smith und Adamowicz konnten über die ähnlichen Dipolmomente von U und T berechnen, dass die entsprechenden Radikalanionen stabil sein sollten.<sup>[54,55]</sup> Für das Basenpaar (A:T<sup>•-</sup>) konnte sogar gezeigt werden, dass es eine kleinere Energie aufweist als das neutrale Paar, was auf eine größere Stabilität im DNA-Duplex hinweist.

### 2.2.3 Photochemische Studien

Zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers mit photochemischen Methoden wurden photoaktivierbare Elektronendonoren wie Flavin,<sup>[56]</sup> Stilbendiether<sup>[57]</sup> und Pyrenderivate<sup>[58]</sup> eingesetzt, die kovalent mit den jeweiligen Oligonukleotiden verknüpft wurden. Durch photochemische Anregung der in die DNA interkalierten Verbindungen wurde in diesen Experimenten ein Elektron freigesetzt, dessen Transport entlang des Duplexes mit chemischen oder spektroskopischen Methoden verfolgt werden konnte.

Carell und Mitarbeiter entwickelten basierend auf der Kenntnis des Reparaturmechanismus der DNA-Photolyase einen DNA-Assay zur Untersuchung des Elektronentransfers von Überschusselektronen. Als Elektronendonator diente ein Flavinderivat, das im reduzierten Zustand ein Redoxpotential von -2.8 V besitzt und dadurch in der Lage ist, alle vier DNA-Basen zu reduzieren.<sup>[59]</sup> Zusätzlich wurde ein spezielles T=T-Dimer ohne Phosphodiesterbrücke zwischen der 3'- und der 5'-Hydroxygruppe der beiden Ribofuranosid-Einheiten eingebaut (Abb. 2.8).<sup>[60]</sup> Die Cycloreversion des T=T-Dimers wurde nach Lichtanregung durch eine Einelektronenreduktion ausgelöst und bewirkt einen Strangbruch, dessen Produkte mittels HPLC-Analytik zu detektieren waren.



**Abb. 2.8** Chemischer Assay zur Untersuchung der Wanderung von Überschusselektronen in der DNA. Der photoinduzierte ET von einem Flavinderivat führt zur Spaltung des T=T-Dimers.

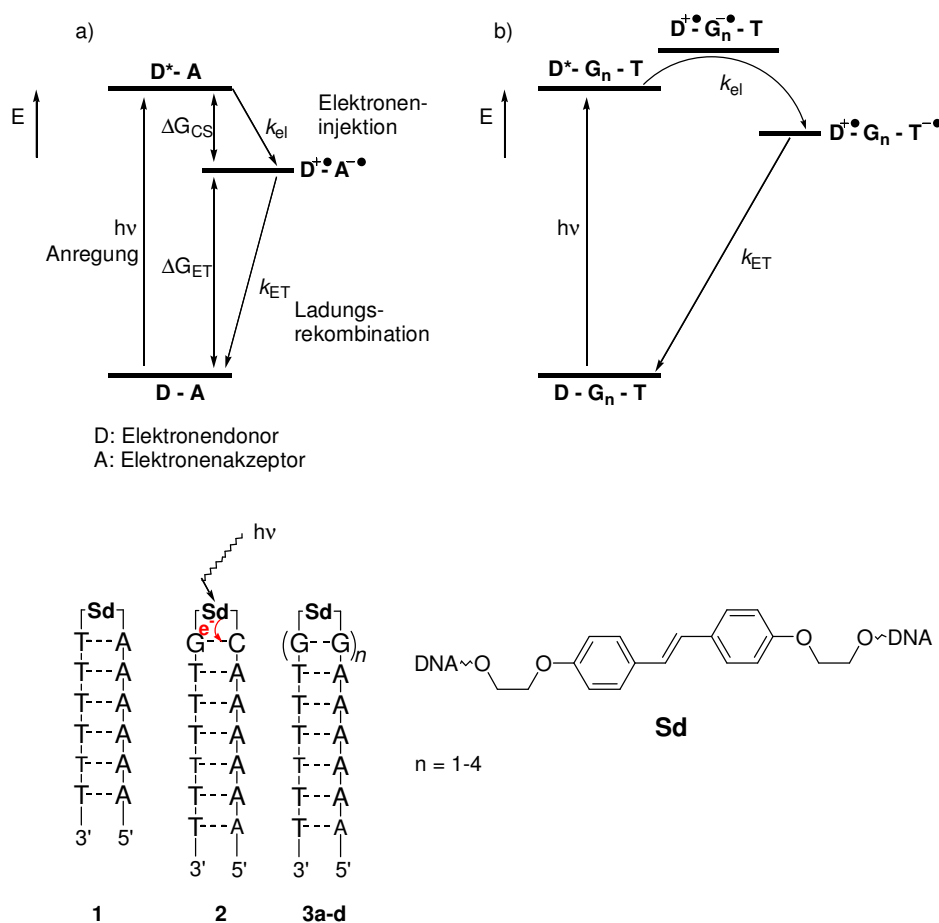
Die Gruppen um Lewis und Wasielewski untersuchen die Energetik und die Kinetik der photoinduzierten Elektroneninjektion in DNA-Haarnadeln, die synthetisch mit Stilbenderivaten als Kopfgruppe versehen sind.<sup>[57]</sup> Mit Hilfe der Potentiale der Nukleobasen sowie des entsprechenden Oxidationspotentials (1.16 V gegen NHE) und der Singulettenergie des Stilbendiethers ( $E_0 = 3.45 \text{ eV}$ ) wurde vorhergesagt, dass die Reduktion von C und T exergonisch, die von A und G endergonisch verlaufen sollte. Die Dynamik der Elektroneninjektion vom Stilbendiether auf die entsprechenden Basen wurde mittels zeitaufgelöster Pikosekunden-Laserspektroskopie untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Injektionsgeschwindigkeit bei T ( $> 2 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ) größer ist als mit C ( $3.3 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$ ) als Elektronenakzeptor. Diese Experimente konnten somit bestätigen, dass T ein geringeres Redoxpotential als C aufweist.

Wagenknecht et al. untersuchten den Elektronentransfer vom lokal angeregten Zustand des Pyrens ( $\text{Py}^*$ ) auf DNA-Basen.<sup>[58]</sup> Hierbei wurde photochemisch ein ladungstrennter Zustand erzeugt, der aus einem Pyrenylradikalkation ( $\text{Py}^{\bullet+}$ ) und dem Radikalanion der entsprechenden Nukleobase besteht. Basierend auf dem Redoxpotential (1.5 V gegen NHE) und der Singulettenergie von Pyren ( $E_0 = 3.25 \text{ eV}$ ) konnte die Triebkraft des Elektronentransfers auf -0.5 bis -0.6 eV bestimmt werden. Die Eigenschaften und die Dynamik des intramolekularen Elektronentransfers wurde durch stationäre Fluoreszenzspektroskopie und zeitaufgelöste, transiente Femtosekunden-Absorptionsspektroskopie charakterisiert. Die unterschiedliche Basizität von C und T konnte dadurch nachgewiesen werden, dass  $\text{C}^{\bullet-}$  in wässriger Lösung im Gegensatz zu  $\text{U}^{\bullet-}$  und  $\text{T}^{\bullet-}$  aufgrund der raschen Protonierung nicht beobachtet wurde.

Ähnliche Experimente führt auch die Gruppe um Netzel durch, die die Löscheffizienz der photoangeregten Pyren-Emission untersuchen.<sup>[58de,e]</sup> Durch Fluoreszenzspektroskopie und Messungen der Lebensdauer der angeregten Zustände war es möglich, einen Elektronentransfer von  $\text{Py}^*$  auf C und T nachzuweisen. Der weitere Elektronentransfer von den Radikalanionen zu einem geeigneten Akzeptor ist in solchen Systemen problematisch, da die Möglichkeit des Rückelektronentransfers besteht, was die Reduktion des Pyrenylradikalkations ( $\text{Py}^{\bullet+}$ ) zum Pyren bewirkt und die Effizienz des ET deutlich senkt.

## 2.2.4 Geschwindigkeit der Elektroneninjektion

Ausgehend vom Singulettzustand des Elektronendonors Stilbendiether ( $^1\text{Sd}^*$ ) untersuchte Lewis die Pikosekundendynamik der Elektroneninjektion in verschiedene Basenpaare von synthetischen DNA-Haarnadeln.<sup>[57b]</sup> Thermodynamik und Kinetik sind in Schema 2.2 dargestellt.



**Schema 2.2** Elektroneninjektion in DNA-Haarnadeln mit einem Stilbenderivat als Kopfgruppe und Ladungsdonor. a) A ist die Akzeptornukleobase direkt neben dem Donor. b) T ist der Akzeptor für die Injektion in (G:G)-Sequenzen.



Die freie Energie für die Elektroneninjektion  $\Delta G_{el}$  konnte durch die Singulett-Energie  $E_S$  und das Oxidationspotential  $E_{Ox}$  des Donors sowie durch das Redoxpotential  $E_{Red}$  der Akzeptornukleobase und die freie Energie der Ladungsrekombination bestimmt werden:

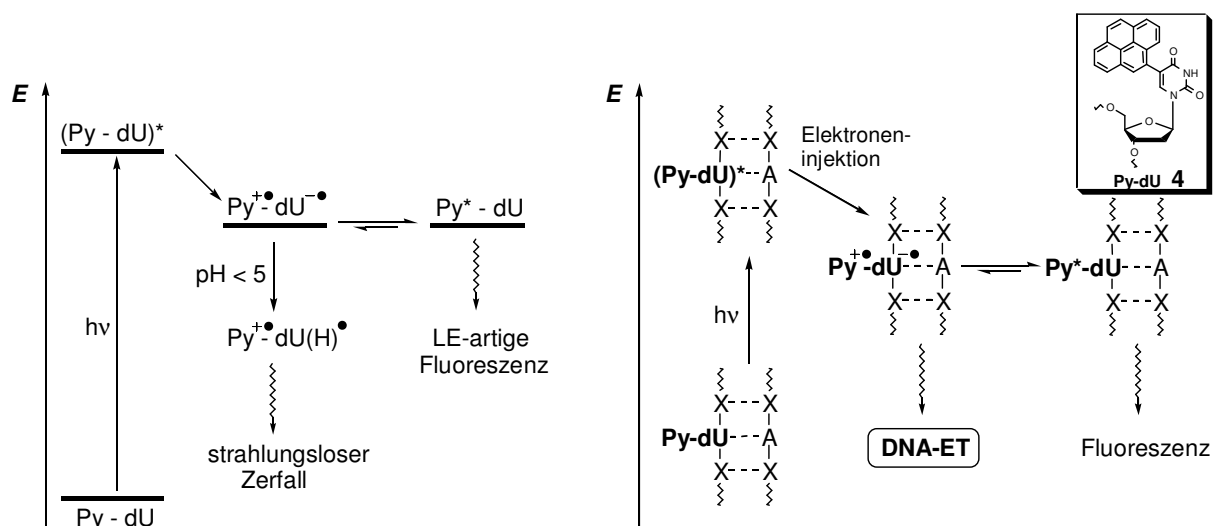
$$\Delta G_{el} = - (E_S + E_{Ox}) + E_{Red} + C$$

C: solvensabhängige  
Coulomb-Anziehungsenergie

Die Experimente zeigten, dass die Geschwindigkeit ( $k_{el}$ ) der Elektroneninjektion für (A:T)-Basenpaare größer ist als für (G:C)-Basenpaare. Zur Untersuchung der Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers wurden zwischen Donor und Akzeptor mehrere (G:G)-Basenpaare eingeschoben. Da die Photoreduktion von G endergonisch ist (+0.5 eV), sollten diese zusätzlichen Paare als Brücke dienen, die nicht am ET-Prozess teilnimmt. Bei einem und zwei dazwischenliegenden (G:G)-Paaren fand ET statt, jedoch nicht bei drei oder vier. Die Geschwindigkeiten des ET waren mit  $k_1 = 5 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$  und  $k_2 = 4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$  um den Faktor 25 geringer als die Werte für die Lochinjektion.<sup>[36]</sup> Die kleineren Geschwindigkeiten gehen eventuell auf die schwächeren Donor-Brücke-Akzeptor-Wechselwirkungen zurück. Da aber schon bei drei zusätzlichen Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor kein Elektronentransfer mehr stattfand, gelangten Lewis et al. zu der Aussage, dass die Injektion eines Überschusselektrons auf kurze Distanzen beschränkt sein muss.

### 2.2.5 Spektroskopische Detektion der Ladungsinjektion

Wagenknecht et al. entwickelten ein Modellsystem zur pH-abhängigen spektroskopischen Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers. Hierfür wurde das Pyrenderivat **4** hergestellt, in welchem die Pyreneinheit kovalent an die 5-Position eines 2'-Desoxyuridin gebunden ist (Schema 2.3).<sup>[58a]</sup> Photochemische Anregung der Pyreneinheit bei 340 nm führt zu einem intramolekularen Elektronentransfer, wobei ein Elektron von der Pyrenhälfte auf die Nukleobase übertragen wird, und dadurch das entsprechende Uracil-Radikalanion und das Pyrenyl-Radikalkation entstehen ( $\text{Py}^{\bullet+}\text{dU}^{\bullet-}$ ). Unter Berücksichtigung der Reduktionspotentiale für das  $\text{Py}^{\bullet+}/\text{Py}$ -Redoxpaar ( $E_{red} = 1.52 \text{ V}$  gegen NHE) und das  $\text{dU}/\text{dU}^{\bullet-}$  Redoxpaar ( $E_{red} = 1.2 \text{ V}$  gegen NHE) ist die Triebkraft dieses Prozesses  $\Delta G = - 0.5 \text{ eV}$ .<sup>[43,61]</sup>



**Schema 2.3** Pyren-modifizierte Nucleoside als Modelle für spektroskopische Untersuchungen zum Elektronentransport in der DNA.

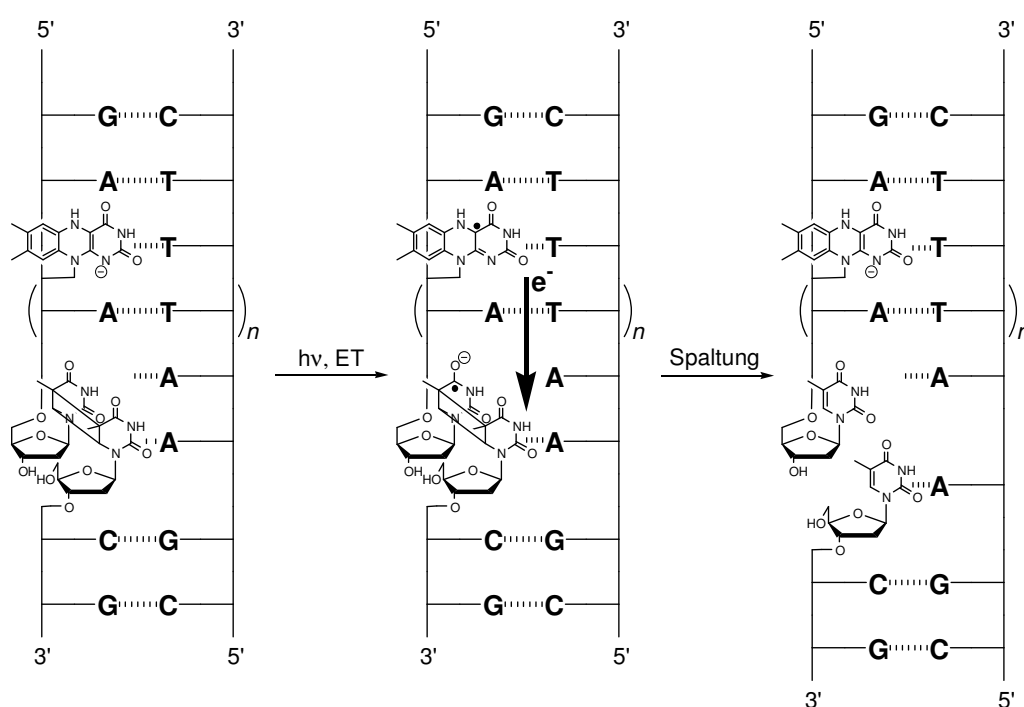
Die nach der Anregung des Nucleosids gebildeten Produkte wurden durch transiente Absorptionsspektroskopie bei pH 4 und pH 8 charakterisiert. Dabei konnten sowohl das Pyrenyl-Radikalkation  $\text{Py}^{\bullet+}$  als auch der angeregte Zustand des Pyrens  $\text{Py}^*$  detektiert werden. Der unmittelbar nach der Photoanregung gebildete ladungstrennte Zustand ( $\text{Py}^{\bullet+}\text{dU}^{\bullet-}$ ) ist nicht fluoreszent und steht im Gleichgewicht mit der fluoreszierenden lokal angeregten Form LE ( $\text{Py}^*-\text{dU}$ ), die bei  $\text{pH} > 5$  vorliegt, da andernfalls die Protonierung des Radikalanions  $\text{dU}^{\bullet-}$  stattfindet. Wurde das photoaktive Pyrenderivat  $\text{Py}-\text{dU}$  in einen DNA-Duplex mit verschiedener Basenumgebung eingebaut, so konnte eine deutliche Löschung der Exciplex-Emission beobachtet werden, wenn  $\text{Py}-\text{dU}$  von zwei Thyminbasen umgeben war. Bei A, C und G trat dieser Effekt nicht auf. Diese Löschung kann aber nur dann eintreten, wenn ein Elektronentransfer vom Uracil-Radikalanion zur benachbarten Base stattfindet. Die Versuche wiesen für T folglich die besten Akzeptoreigenschaften nach. Durch weitere Experimente wurde festgestellt, dass der Elektronentransfer bevorzugt zur Nucleobase in 5'-Richtung erfolgt, was die Folge der unsymmetrischen Lage der Pyrenylgruppe in der Großen Furche sein könnte.

## 2.2.6 Chemische Detektion des reduktiven Elektronentransfers

DNA-Photolyasen benutzen Lichtenergie, um die Reparatur der hochmutagenen UV-induzierten Cyclobutan-Pyrimidindimere, welche die Hauptphotoschäden in der DNA

darstellen, auszulösen.<sup>[62,63]</sup> Die Grundlage dieser Reparaturreaktion, die den Zelltod bei einer großen Anzahl von Pflanzen verhindert, ist ein lichtinduzierter Elektronentransfer von einem reduzierten und deprotonierten Flavin-Coenzym zur DNA-Schädigung.<sup>[64,65]</sup> Der Dimer-Schaden geht daraufhin eine spontane Cycloreversion ein und bildet die entsprechenden Monomere.<sup>[66]</sup>

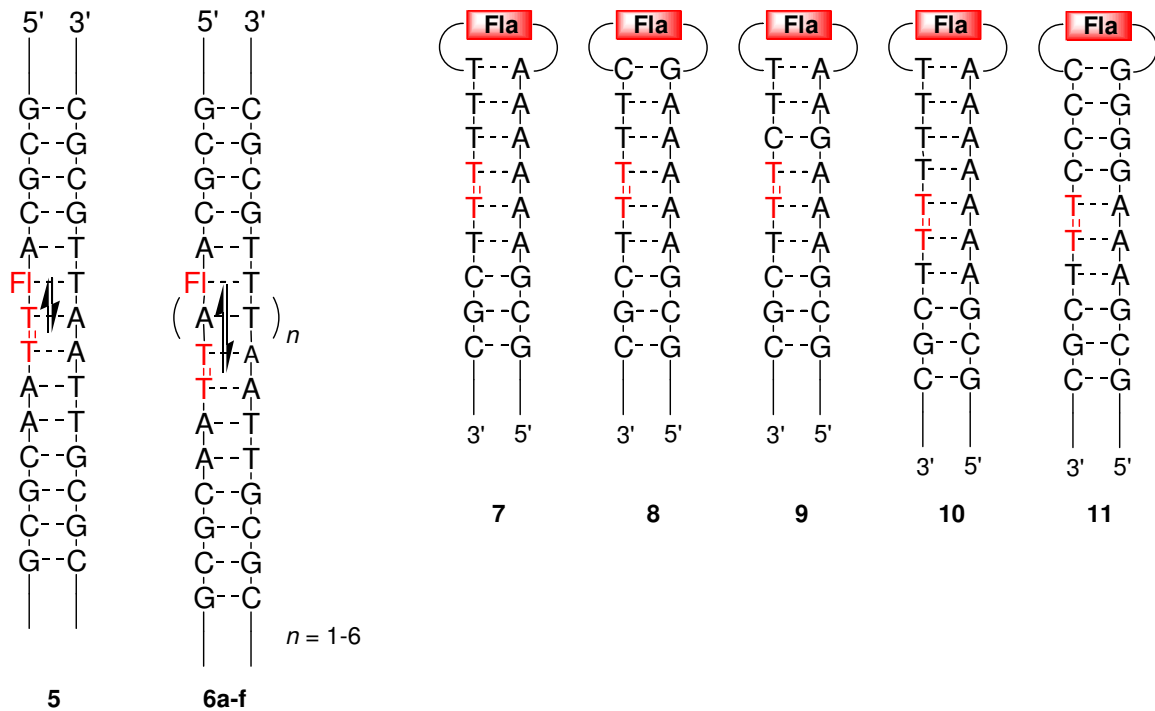
Um den reduktiven Elektronentransfer vom Flavin zum T=T-Dimer im DNA-Basenstapel zu untersuchen, wurden von Carell et al. Oligonukleotide synthetisiert, die nebeneinander den Flavinbaustein als Elektronendonator sowie ein spezielles T=T-Dimer ohne Phosphodiesterbrücke zwischen der 3'- und der 5'-Hydroxygruppe der beiden Ribofuranosid-Einheiten enthielten (Schema 2.4).



**Schema 2.4** DNA-Duplex mit einem reduzierten Flavin als Elektroneninjektor und einem Dimer als Elektronenakzeptor. Photoanregung initiiert die Injektion und den Transfer der negativen Ladung (ET) zum Dimer.

Aufgrund dieser strukturellen Besonderheiten des Dimers erfolgt nach der Reparaturreaktion ein Strangbruch, der mit chromatographischen Methoden detektierbar ist. Die Bestrahlung wurde in wässrigem Puffer bei pH 7.5 durchgeführt, wobei durch Zugabe von Natriumdithionit gesichert wurde, dass das Flavin im reduzierten und deprotonierten Zustand vorlag. Während der Bestrahlung bei 360 nm mit monochromatischem Licht wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und mit RP-HPLC analysiert. Die Analyse zeigte, dass die Dimer-Schädigung sauber repariert wurde. Beim Einbau eines zusätzlichen (A:T)-Basenpaares (**6a**) zwischen Flavin und Dimer sank die Ausbeute der Photoprodukte nur von 35% auf 20%, obwohl die Distanz des Elektronentransfers von 11 auf 17

Einzelbindungen ansteigt (Abb 2.9).<sup>[56a]</sup> Dieser geringe Unterschied ist umso erstaunlicher, wenn man vergleichbare Experimente vom oxidativen Lochtransfer herbeizieht. Der Einbau eines zusätzlichen (A:T)-Basenpaares führt in diesem Fall zu einem Geschwindigkeitsverlust um den Faktor 1000.



**Abb. 2.9** Oligonukleotide und DNA-Haarnadeln mit Flavin- und Dimer-Modifikation bei zunehmender Entfernung.

Um die Distanzabhängigkeit des reduktiven Elektronentransfers zu untersuchen, erfolgten weitere Experimente mit den Oligonukleotiden **6b-f**, in denen zusätzliche (A:T)-Basenpaare zwischen Flavin und Dimer vorhanden waren (Abb. 2.9). Die Spaltungsausbeuten sanken dabei von  $2.2 \% \text{ min}^{-1}$  bei drei (A:T)-Paaren über  $1.8 \% \text{ min}^{-1}$  und  $1.0 \% \text{ min}^{-1}$  bis zu  $0.8 \% \text{ min}^{-1}$  bei sechs (A:T)-Paaren, was einem Ausbeuteverlust von 30% pro zusätzlichem Basenpaar entspricht.<sup>[56b]</sup> Carell versuchte diese Ergebnisse mit den für den Lochtransport bekannten Superaustausch- und Hopping-Mechanismen in Einklang zu bringen. Würde ein einstufiger Tunnelprozess zugrunde gelegt werden, der durch die Marcus-Gleichung beschrieben wird, so erhielte man einen  $\beta$ -Wert von  $0.11 \text{ \AA}^{-1}$ , der sehr klein ist und für eine geringe Distanzabhängigkeit spricht. Man folgerte daher, dass ein Tunnelprozess sehr unwahrscheinlich sei. Wird hingegen ein Hopping-Mechanismus mit T als diskretem Ladungsträger vorausgesetzt, kann folgende Gleichung angewendet werden.

$$\ln k_{\text{ET}} = -\eta \cdot \ln(N)$$

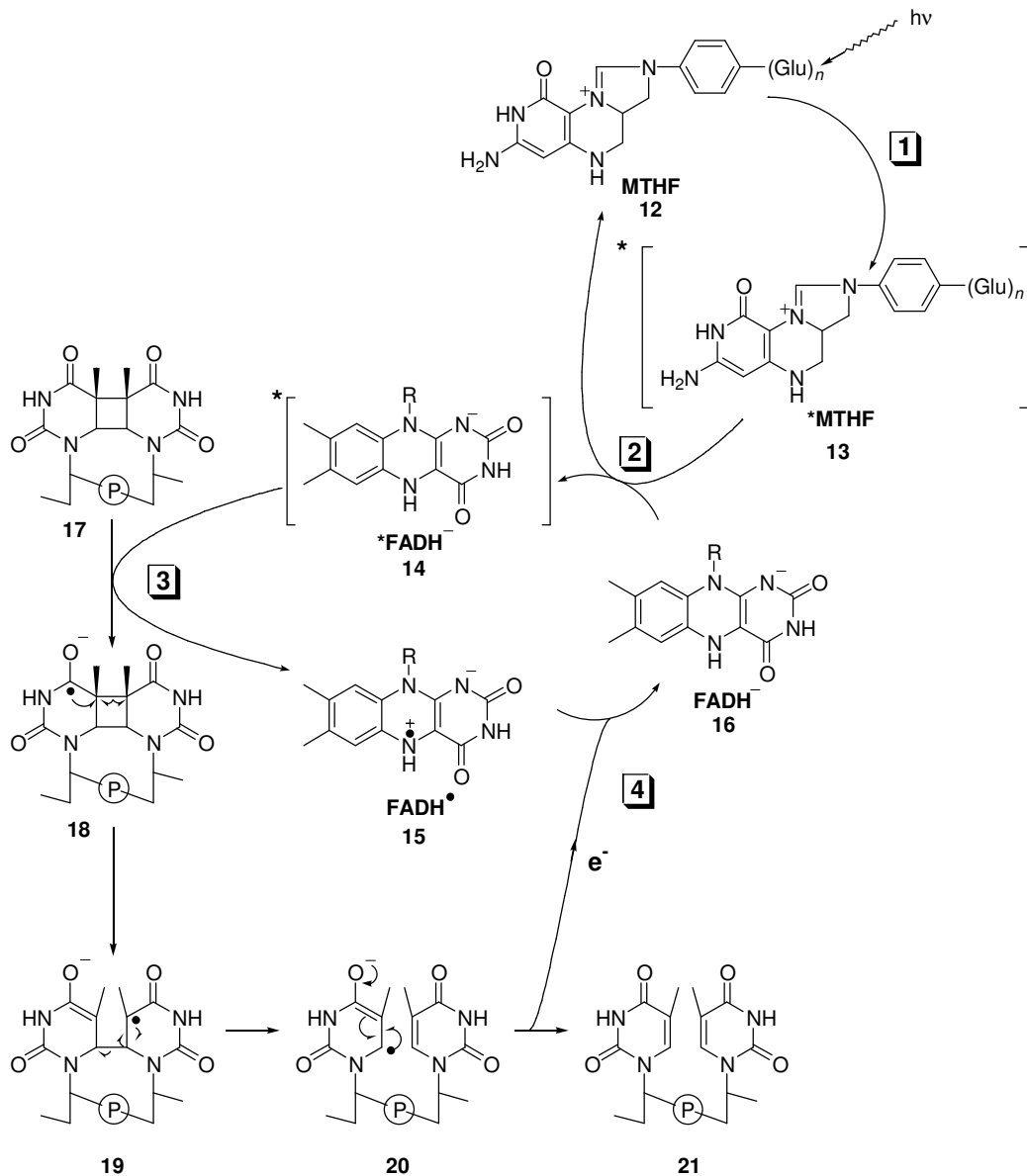
N: Anzahl der Hopping-Schritte

$\eta$ : Konstante

Im Idealfall einer unvoreingenommenen Zufallsbewegung (Hopping) nimmt  $\eta$  den Wert 2 an im Gegensatz zur Zufallsbewegung in Akzeptorrichtung ( $1 \leq \eta \leq 2$ ) oder in Donorrichtung ( $\eta \geq 2$ ). Carell erreichte mit diesen Experimenten einen Wert von  $\eta = 1.95$ . Dieses Ergebnis und der kleine  $\beta$ -Wert deuteten darauf hin, dass der Elektronentransfer vom Flavin zum T=T-Dimer über thermisch aktivierte Hopping-Schritte erfolgt, was auch durch thermodynamische Überlegungen unterstützt wird. Die freie Energie für die einzelnen ET-Schritte kann von der Singulett-Energie des Flavins ( $E_S = -2.8$  V gegen NHE) und des Redoxpotentials von T ( $E_{\text{red}} = -2.1$  V gegen NHE) sowie des T-Dimers ( $E_{\text{red}} = -2.2$  V gegen NHE) abgeschätzt werden. Demnach sollte ein ET-Prozess vom Flavin zu einem T exergonisch, der ET vom T zum T=T-Dimer thermoneutral sein.<sup>[56b,67]</sup> In neueren Arbeiten hat die Gruppe um Carell auch die Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers analysiert.<sup>[68]</sup> In den ersten Experimenten trat ausschließlich T als intermediärer Ladungsträger auf. Da C ein ähnliches Redoxpotential besitzt und in Radiolyseexperimenten als Elektronenfalle erwähnt wurde, sollte durch den Einbau von (G:C)-Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor Aufschluss über deren Verhalten als Relaisstation erhalten werden. Hierzu wurden Versuche mit den Haarnadel-Oligonukleotiden **7-11** analog zu Lewis et al. gemacht, da sie aufgrund der hohen und konzentrationsunabhängigen Schmelzpunkte eine Analyse des ET über kurze Distanzen erlauben. Die Aussage dieser Versuchsreihe war, dass die Spaltausbeute nicht von der Sequenz abhängig ist. Taucht man ein oder gar mehrere (A:T)-Basenpaare gegen (G:C), so bleibt die Ausbeute gleich. Dies ändert sich auch bei größeren Distanzen nicht.

### 2.2.7 Überschusselektronentransfer in der Natur

Die Reduktion von Nucleobasen ist biologisch wichtig, da durch derartige Elektronentransferprozesse DNA-Schädigungen, die zum Zelltod eines Organismus führen können, repariert werden.<sup>[62,69]</sup> Die Elektroneninjektion in die DNA wird von den DNA-Photolyasen herbeigeführt. Dieses Protein wird für die effiziente Reparatur von UV-induzierten DNA-Schädigungen benötigt.<sup>[65]</sup> UV-Strahlung führt innerhalb der DNA zur Bildung zahlreicher Cyclobutan-Derivate als Photoprodukte, die mutagen und für den Zelltod verantwortlich sind.<sup>[70]</sup> Ein solcher Dimerschaden tötet Zellen durch die Blockade der Replikation und der Transkription. Zellen schützen sich gegen diesen Effekt dadurch, indem sie die Photoprodukte entweder entfernen oder durch Photoreaktivierung reparieren.



**Schema 2.5** Reaktionsmechanismus der Photolyase: **1.** Absorption eines Photons durch das zweite Chromophor (MTHF). **2.** Energietransfer. **3.** Elektronentransfer und Cycloreversion. **4.** Rückelektroentransfer und Regenerierung des katalytisch aktiven Flavins.

Die Reparatur (Spaltung) der Schädigungen erfolgt durch eine Elektroneninjektion von einem lichtangeregten, reduzierten und deprotonierten Flavin-Coenzym (\*FADH<sup>-</sup>) innerhalb des Proteins (Schema 2.5).<sup>[62]</sup> Der Cyclobutanring wird reduziert und das Dimer wird in zwei Monomere gespalten. Aus wissenschaftlicher Sicht war die Tatsache interessant, dass der Photolyase-Mechanismus ausgenutzt werden kann, um Überschusselektroentransferprozesse in der DNA zu verfolgen. Die Einelektron-Reduktion eines T=T-Dimers und aller anderen Nucleobasen durch photoangeregtes \*FADH<sup>-</sup> ist ein thermodynamisch günstiger Prozess, da das Reduktionspotential von \*FADH<sup>-</sup> ausreichend ist, um alle Nucleobasen zu reduzieren.<sup>[71-73]</sup> Photolyasen sind monomere Proteine mit stöchiometrischen Anteilen von zwei nicht

kovalenten Chromophoren/Cofaktoren. Einer dieser Cofaktoren ist FADH<sup>-</sup>, der andere entweder Methylentetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-5-deazariboflavin (8-HDF).<sup>[74]</sup> Bei der Reparaturreaktion bindet das Enzym das DNA-Substrat in einer lichtunabhängigen Reaktion. Das zweite Chromophor des gebundenen Enzyms absorbiert daraufhin ein Photon im sichtbaren Bereich (350 - 450 nm) und transferiert durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen Energie zum FADH<sup>-</sup>, welches ein Elektron zum Dimerschaden überträgt. Die Substraterkennung ist vom DNA-Rückgrat abhängig und verläuft somit struktur- und nicht sequenzspezifisch.<sup>[75,76]</sup> Kinetisch betrachtet agiert die Photolyase als einfaches Michaelis-Menten-Enzym, mit der Ausnahme, dass die Katalyse durch Licht eingeleitet wird.

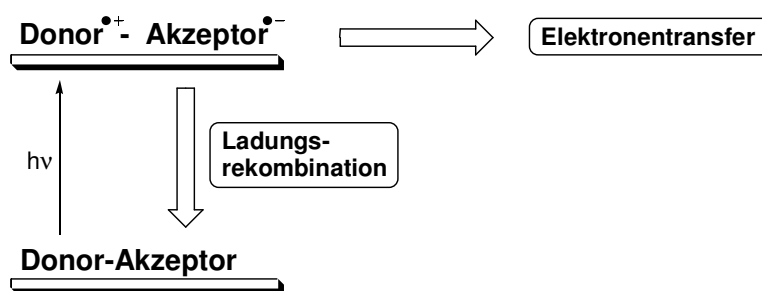
$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{k_M + [S]} \quad k_M : \text{Michaelis-Menten-Kontante}$$

Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt eine Sättigungskinetik, wobei die Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  und der Substratkonzentration  $[s]$  graphisch eine Hyperbel darstellt, die asymptotisch dem Grenzwert  $v_{\max}$  zustrebt.

Bei der Spaltung des Dimerschadens handelt es sich um eine lichtinduzierte  $(\pi_s^2 + \pi_s^2)$ -Cycloreversion. Das aktivierende Licht (300-500 nm) ist energetisch aber nicht ausreichend, um die angeregten Zustände (Singulett oder Triplett) des Dimers, die bekanntermaßen zu einer hohen Ausbeute an Pyrimidin-Monomeren führen, zu besetzen.<sup>[65]</sup> Daher kommt es zu einem Elektronentransfer von der photoangeregten Photolyase (<sup>\*</sup>FADH<sup>-</sup>) zum Dimer, welches eine konzertierte aber nicht synchrone Spaltung durchläuft. Das resultierende Pyrimidin-Anion wird schließlich von FADH<sup>0</sup> oxidiert womit der Reparaturprozess beendet ist.

### 3 Aufgabenstellung

Die bisherigen Arbeiten zum Elektronentransfer eines Überschusselektrons in DNA brachten wichtige Erkenntnisse in Bezug auf Effizienz, Geschwindigkeit und Reichweite des Ladungstransports. Lewis konnte mit seinem Injektor-Donor-System Aussagen über die Injektionsgeschwindigkeit des Elektrons in DNA machen, da er ein ähnliches Modell wie zur Untersuchung des Lochtransfers verwendete und über direkte Vergleichswerte verfügte.<sup>[26,57]</sup> Carell zeigte mit seinem der Natur nachgebildeten System, dass der reduktive Elektronentransfer weniger abhängig von der Basensequenz ist als der oxidative Lochtransfer.<sup>[56]</sup> Ein Nachteil der bislang entwickelten Modelle war der Schritt der Elektroneninjektion. Sowohl bei den Stilbenderivaten von Lewis<sup>[57]</sup> als auch bei den mit Pyren modifizierten Nukleotiden von Wagenknecht<sup>[58]</sup> kommt es unmittelbar nach der photochemischen Anregung zu einem ladungstrennten Zustand (Abb. 3.1).

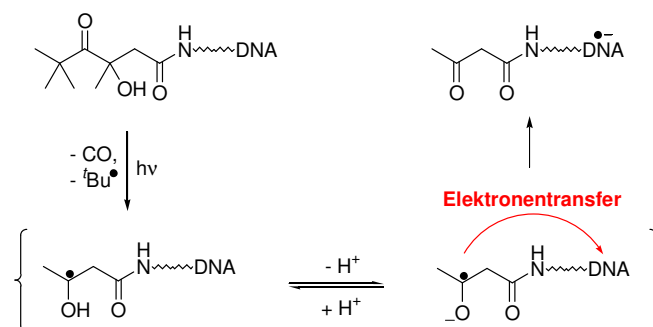


**Abb. 3.1** Konkurrenz von Elektronentransfer und Ladungsrekombination im ladungstrennten Zustand.

Ausgehend von diesem Zustand kann das Überschusselektron einerseits auf die benachbarte Nukleobase übertragen werden und von dort aus durch die DNA wandern, andererseits kann das Elektron auch wieder auf das Donorsystem zurückfallen. Es kommt somit zu einem Rückelektronentransfer, der die Effizienz des Injektionsschritts deutlich herabsetzt und eine Untersuchung des Ladungstransports in der DNA erschwert und über größere Distanzen nahezu unmöglich macht. Bei den von Carell verwendeten Flavinderivaten als Elektronendonoren tritt dieser Effekt nicht auf.<sup>[56]</sup> Das Flavin wird aber wie beim Reparaturprozess der Photolyase ständig im reduzierten, nicht protonierten Zustand gehalten, so dass eine undefinierte Menge an Elektronen durch die DNA transportiert wird. Die anschließende Reparatur des DNA-Schadens als Detektion gibt zwar die Effizienz des Elektronentransfers wieder, sagt aber nichts über den Effekt eines einzelnen Elektrons aus. Ziel der Arbeit war es nun, ein Elektroneninjektionssystem zu entwickeln, welches eine ortsselektive Ein-Elektronen-Reduktion einer benachbarten Nukleobase bewirkt, ohne dass es

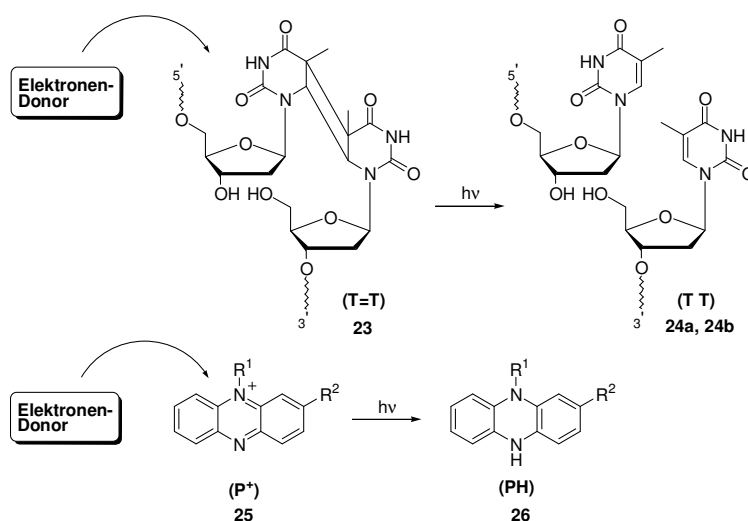


zum Rückelektronentransport kommt. Grundlage des Systems sollten vorangegangene Arbeiten in der Gruppe Giese zur Photochemie von Pivaloyl-Gruppen sein.<sup>[27]</sup> Durch Photoanregung können Ketylradikale generiert werden, deren Reduktionskraft es ermöglicht, ein Elektron auf die DNA zu übertragen (Abb. 3.1).



**Schema 3.1** Darstellung des Elektronentransfers ausgehend vom Ketylradikalanion.

Dieses System sollte in die DNA eingebaut werden und es sollten Untersuchungen zur Ladungswanderung eines einzelnen Elektrons durchgeführt werden. Als Detektorsystem bot sich das Thyminindimer als DNA-Schaden an, da dessen Reparaturprozess über eine Ein-Elektronenreduktion geschieht und analytisch einfach zu verfolgen ist. Dabei sollte untersucht werden, ob eine Richtungsbevorzugung des Elektronentransfer vorliegt und ob die Art des Injektionssystems einen Effekt auf die Abhängigkeit der Basensequenz oder Effizienz des Ladungstransports hat.



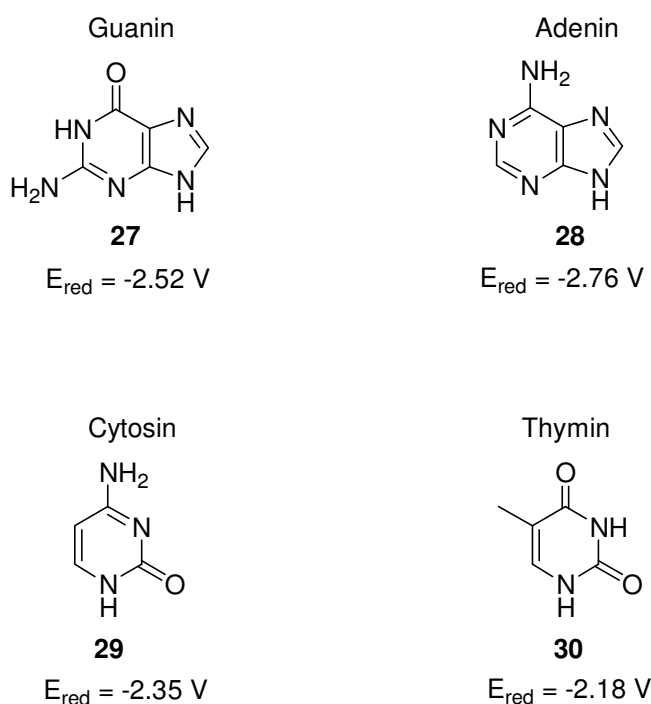
**Abb. 3.2** T=T-Dimer und Phenazin-Derivate als Elektronenakzeptoren

Alternativ zur chemischen Analyse des Elektronentransfers sollten auch spektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Phenazinderivate, die ein kleines Redoxpotential aufweisen ( $E_{\text{red}} \geq -0.8$  V), sollten für diese Experimente herangezogen werden.

## 4 Elektroneninjektion in DNA

### 4.1 Prinzip der selektiven Elektronenfreisetzung

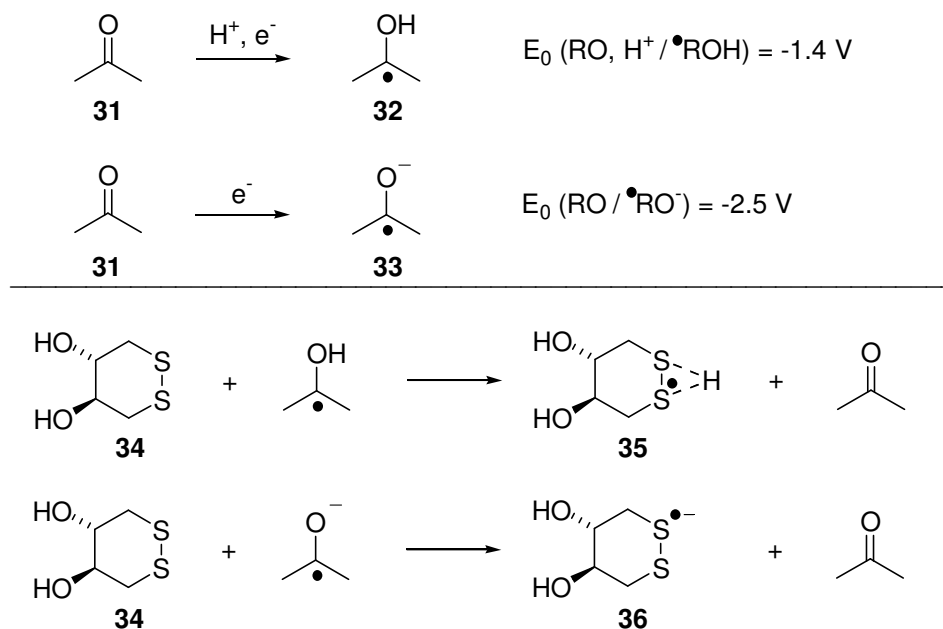
Im Gegensatz zum oxidativen Lochtransfer wird bei der Ladungsinjektion eines Überschusselektrons die Nukleobase nicht oxidiert sondern reduziert. Vergleicht man die Reduktionspotentiale der vier DNA-Basen, so fällt auf, dass die Pyrimidinderivate Cytosin und Thymin die geringsten Werte aufweisen (Abbildung 4.1).<sup>[32,33]</sup> Durch Radiolyse-Experimente wurde auch bestätigt, dass diese beiden Nukleobasen als Ladungsträger beim reduktiven Elektronentransfer durch die DNA fungieren.<sup>[47-50]</sup> Die Elektroneninjektion in DNA muss demnach über die am leichtesten zu reduzierende Base Thymin erfolgen. Soll ein Elektron auf Thymin übertragen werden, so muss die Reduktionskraft des Elektronendonorsystem ausreichen ( $\leq E_{\text{red}} [\text{T}]$ ) um T zu reduzieren.



**Abb. 4.1** Reduktionspotentiale der vier Nukleobasen.

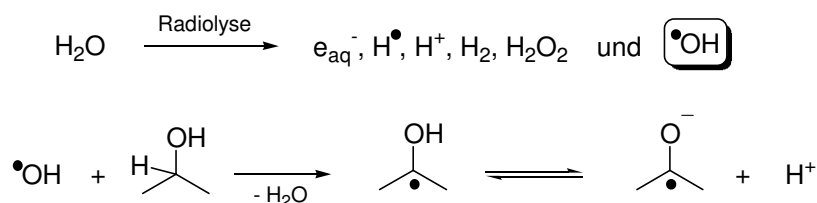
Da die Ladungsinjektion an einer definierten Stelle stattfinden sollte, bot es sich an, die Nukleobase Thymin mit einer Donoreinheit so zu modifizieren, dass eine Elektronenübertragung nach entsprechender Anregung erfolgen kann. Es ist bekannt, dass Ketylradikale und insbesondere Ketylradikalanionen eine große Reduktionskraft besitzen ( $E_{\text{red}}$

$\leq -1.4$  V), was durch die Ein-Elektronenreduktion von 4,5-Dihydroxy-1,2-dithian (ox-DDT) **34** zum entsprechenden Radikal **35** bzw. Radikalanion **36** ( $E_{\text{red}} [\text{ox-DDT}] = -1.6$  V) gezeigt werden konnte (Schema 4.1).<sup>[77-79]</sup>



**Schema 4.1** Ein-Elektronen-Reduktion von ox-DDT mit Ketylradikalen.

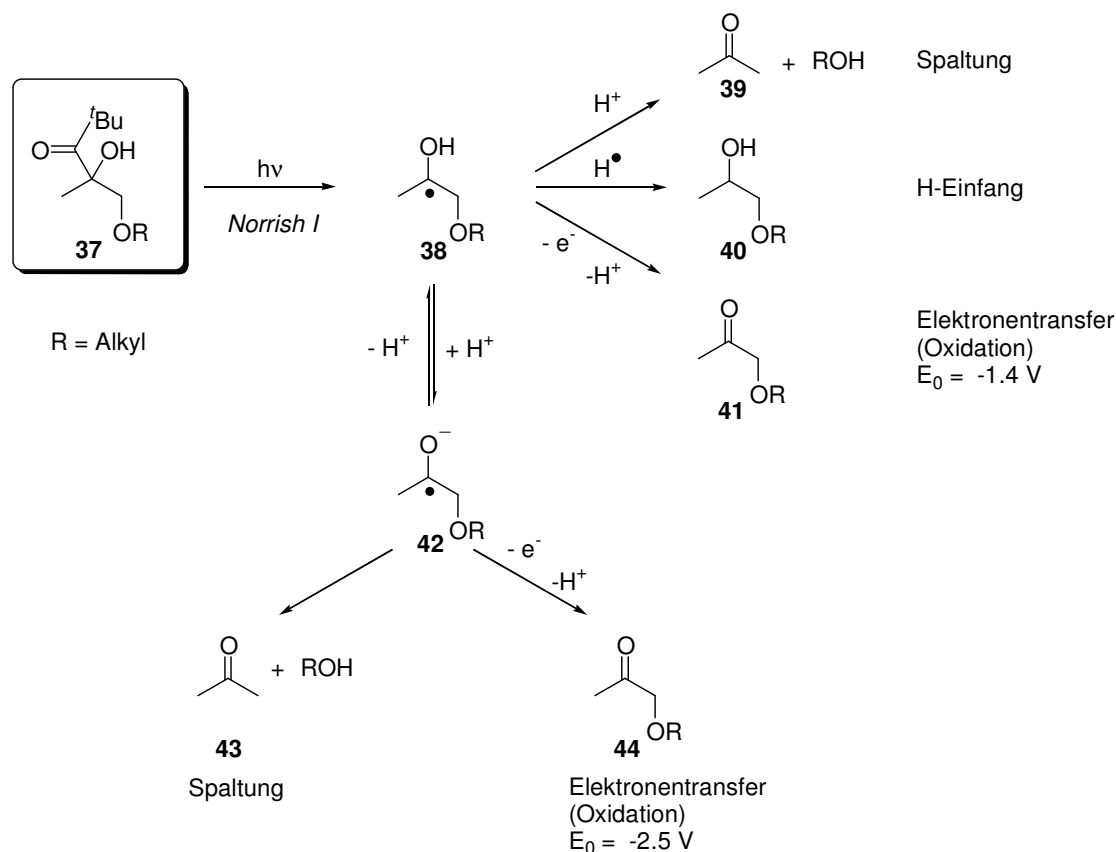
Durch die Nachbarschaft des Radikalzentrums zur Hydroxylgruppe des Primärradikals **32** erhöht sich dessen Acidität um ca. 5  $\text{pK}_s$ -Einheiten, was eine Deprotonierung erleichtert. Physikalische Messungen mit dem *iso*-Propanolystem zeigten, dass der  $\text{pK}_s$ -Wert des sekundären kohlenstoffzentrierten Radikals mit 12.1 deutlich kleiner ist als der des *iso*-Propanols ( $\text{pK}_s$  17.0).<sup>[77]</sup> Die dazugehörigen Redoxpotentiale (Schema 4.1) sind ebenfalls stark pH-abhängig. Das Ketylradikalanion ( $E_0 = -2.5$  V) weist eine deutlich höhere Reduktionskraft auf als das neutrale Ketylradikal ( $E_0 = -1.4$  V).<sup>[77]</sup> Es liegt also je nach Medium immer ein Gleichgewicht zwischen neutralem Radikal und Radikalanion vor. Durch die Generierung eines solchen Ketylradikalanions in Nachbarschaft der Nukleobase Thymin ( $E_{\text{red}} = -2.18$  V) wäre es möglich, ein Elektron auf selbige zu übertragen und sie zu reduzieren, da die Triebkraft für die Reduktion mit  $0.32 \text{ V} = 31 \text{ kJ mol}^{-1}$  ausreichend groß ist.



**Schema 4.2** Generierung von Ketylradikalen mittels  $\gamma$ -Radiolyse.

Ketylradikale entstehen im Allgemeinen, wenn Ketone kathodisch oder mit Alkali- bzw. Erdalkalimetallen in flüssigem Ammoniak oder Etherlösungen reduziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der  $\gamma$ -Radiolyse von wässrigen Lösungen, die den entsprechenden Alkohol enthalten (Schema 4.2).<sup>[80,81]</sup>

In der organischen Synthese sind Radikalanionen durch photochemische Spaltungsreaktionen mit Ketonen darstellbar, wobei die Radikale **38** und **42** intermediär entstehen.<sup>[82,83]</sup>



**Schema 4.3** Photochemie der Pivaloylgruppe und mögliche Reaktionswege.

Wird Verbindung **37** bei einer Wellenlänge  $\lambda \leq 340$  nm bestrahlt, so entsteht nach der *Norrish I* Spaltungsreaktion zunächst das Hydroxyradikal **38**, welches drei Reaktionsmöglichkeiten hat:<sup>[84]</sup>

1. Säurekatalysierte C-O Bindungsspaltung, die zum Keton **39** und zum Alkohol führt.
2. H-Einfang von einem geeigneten Donor oder vom Lösungsmittel.
3. Oxidation der Hydroxygruppe zum entsprechenden Keton **41** (Elektronentransfer)

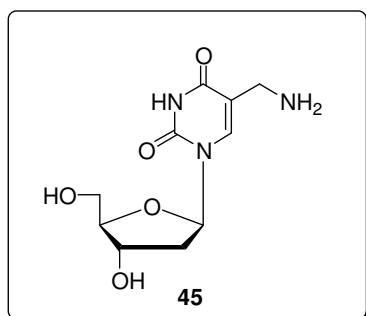
Aufgrund der weiter oben beschriebenen erhöhten Acidität der Hydroxygruppe des Primärradikals **38** steht diese Zwischenstufe im Gleichgewicht mit der anionischen Form **42**,

die neben einer Spaltungsreaktion ebenfalls über die Möglichkeit einer Elektronentransferreaktion verfügt, wobei die Reduktionskraft im Vergleich zu **38** wesentlich höher ist.

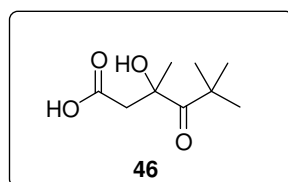
## 4.2 Injektorsystem

In der Gruppe Giese wurden schon über einen längeren Zeitraum pivaloylmodifizierte Verbindungen als Ausgangspunkt für photochemische Untersuchungen benutzt.<sup>[27]</sup> So konnte gezeigt werden, dass aus 4'-pivaloylmodifizierten Nukleotiden durch Photolyse selektiv 4'-Radikale erzeugt werden können.<sup>[85]</sup> Ein anschließender spontaner heterocyclischer C,O-Bindungsbruch führt zu einem Radikalkation, das Ausgangspunkt für den Transport von positiver Ladung durch den DNA-Basenstapel ist. Ferner wurden basierend auf der Photoaktivität der Pivaloylgruppe photolabile Linker zur Spaltung von Carbonsäureestern entwickelt.<sup>[82]</sup> Die Generierung des Ketylradikals bzw. des Ketylradikalanions erfolgt durch eine *Norrish-Typ-I* Photospaltung mit UV-Licht im Bereich von 300 - 340 nm (Schema 4.3). Dadurch wird bei der photochemisch angeregten Carbonylverbindung primär eine Bindung zwischen dem Carbonylkohlenstoff und einem  $\alpha$ -Kohlenstoff gespalten. Es entsteht ein Acylradikal, das sich durch CO-Abspaltung stabilisiert. Die hohe Quantenausbeute von  $\Phi = 0.56$  ist für die Verwendung der *tert*-Butylketon-Einheit sehr wichtig, da somit der kleine Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{\max} = 30$  ausgeglichen wird und hohe Spaltausbeuten erzielt werden können.

Die photoaktive Einheit, die als Elektronendonor fungiert, musste folglich eine Pivaloyleinheit mit einer zusätzlichen funktionellen Gruppe enthalten, über die die Bindung zur Nukleobase erfolgte. Thymidin wurde mit einer Aminogruppe funktionalisiert, so dass die Verknüpfung der beiden Einheiten über eine Amid-Bindung realisiert werden konnte (Abb. 4.2).



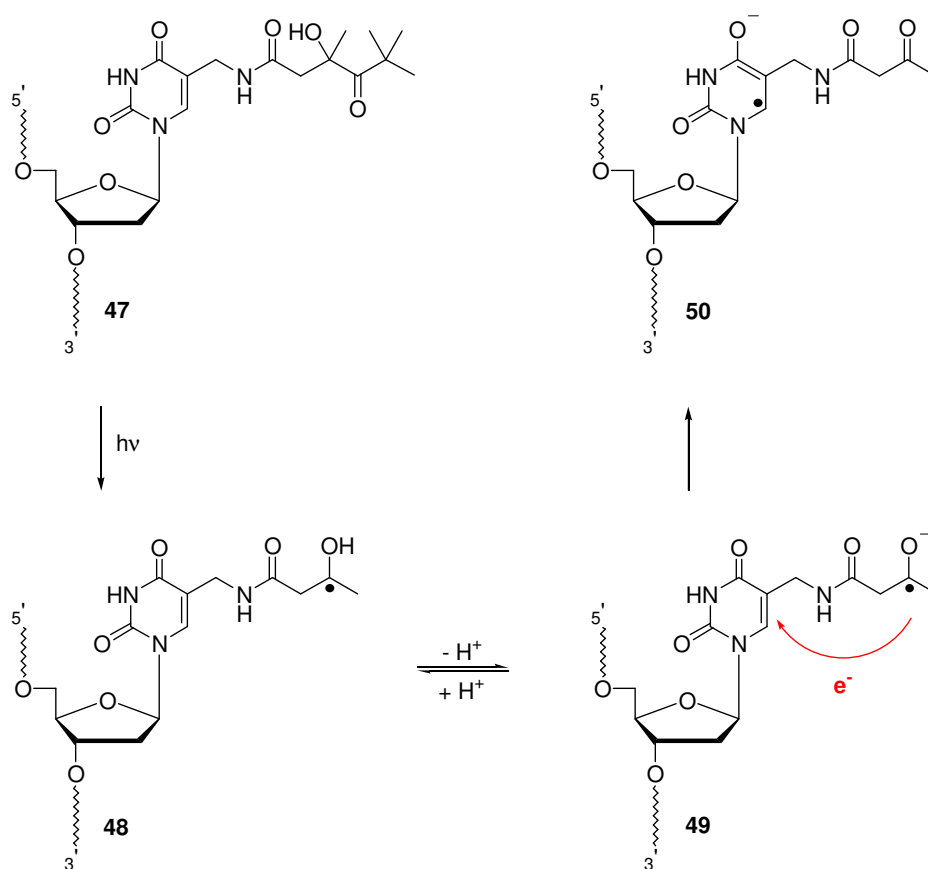
Modifiziertes Thymidin  
als Elektronenakzeptor



Elektronendonor-Einheit

**Abb. 4.2** Thymidin und Pivaloyl-Gruppe als Bestandteile des Elektronen-Injektorsystems.

Um die Strecke für den Ladungstransport vom entstehenden Ketylradikal/Ketylradikalanion zur Nukleobase so kurz wie möglich zu machen, sollte die photoaktive Gruppe nicht wie beim Ausgangsbaustein für den oxidativen Lochtransfer an die Furanose, sondern direkt an die 5-Position des Pyrimidins gekuppelt werden. Eine Amid-Bindung wurde einer Ester-Bindung vorgezogen, weil sie eine größere Stabilität gegenüber den Abspaltungsreagenzien (ges. Ammoniak-Lösung) vom Trägermaterial beim automatisierten Einbau in den DNA-Strang aufweist. Der Elektronentransfer vom Radikalzentrum zum Thymin sollte über fünf Einfachbindungen stattfinden. Um diese Entfernung so klein wie möglich zu halten und um Störungen der in die große Furche hinausragenden Seitengruppe mit dem DNA-Rückgrat zu vermeiden, wurde nur eine Methylenheit zwischen Radikalzentrum und Nukleobase eingeschoben. Nach photochemischer Anregung des Injektorsystems **47** entsteht in der *Norrish I* Spaltungsreaktion intermediär das Ketylradikal **48**, das aufgrund der erhöhten Acidität mit dem Ketylradikalanion **49** im Gleichgewicht steht.<sup>[77]</sup> Die Reduktionskraft dieses Radikalanions ist schließlich ausreichend, um das benachbarte Thymin zu reduzieren (Schema 4.4). Das so entstandene Thymin-Radikalanion **50** ist Ausgangspunkt und intermediärer Ladungsträger für den Elektronentransfer eines Überschusselektrons in DNA.



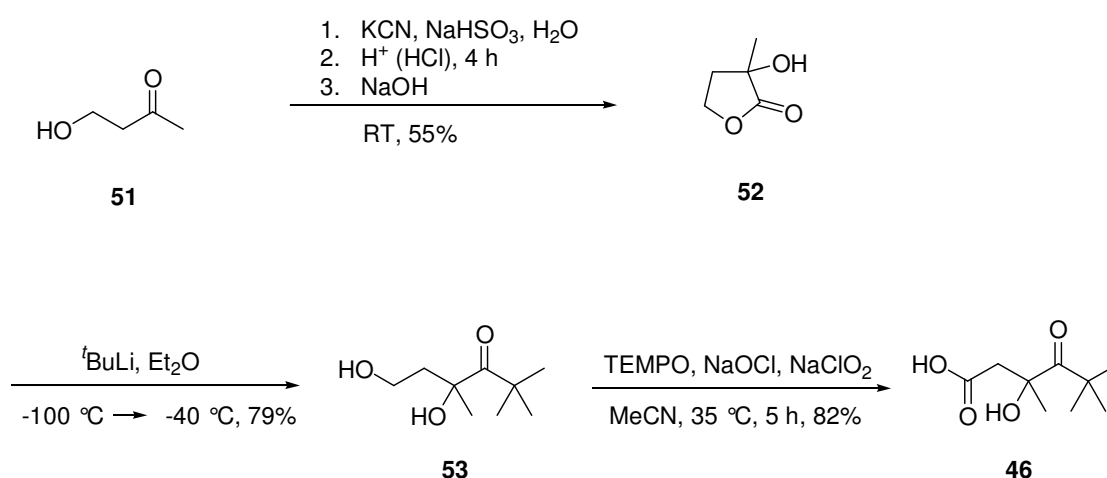
**Schema 4.4** Elektronentransfer von der Donor-Einheit auf die Nukleobase.

Das Injektorsystem wäre auf diese Art einfach und effizient aufgebaut. Es wäre keine aufwendige Schutzgruppentechnik notwendig, da die Kupplung der beiden Einheiten nicht an der Desoxyribose, sondern an der Nukleobase selbst stattfindet. Aus demselben Grund sollte die Reaktionssequenz weniger Stufen enthalten als bei Modifikationen am Zucker, so dass eine höhere Gesamtausbeute zu erwarten ist. Die Vorteile dieser Art von Elektroneninjektion gegenüber vergleichbaren Systemen wären die folgenden:

- Ortsselektive Injektion an einer definierten Stelle des DNA-Duplex. Dadurch können Effekte durch Veränderungen in unmittelbarer Nähe (z.B. Basensequenz) des Injektionssystems gezielt untersucht werden.
- Die Ladungsgenerierung erfolgt in unmittelbarer Nähe der Nukleobase und nicht wie bei anderen System an der Desoxyribose (DNA-Rückgrat).
- Durch die irreversible Oxidation des Ketylradikalanions zum Keton wird ein Rückelektronentransfer verhindert. Die Elektronenübertagung auf die Nukleobase findet somit quantitativ statt.
- Es findet eine Ein-Elektronen-Reduktion statt. Somit kann der Transfer eines einzelnen Elektrons beobachtet werden im Gegensatz zu anderen Systemen, bei denen eine undefinierte Anzahl von Elektronen übertragen wird.
- Durch die Ein-Elektronen-Reduktion ist es möglich, intermediäre Zwischenstufen beim ET, wie das Thymyl-Radikal, mit spektroskopischen Methoden sichtbar zu machen.
- Der Elektronentransferprozess kann im Hinblick auf die Katalyse-Funktion eines Elektrons untersucht werden.

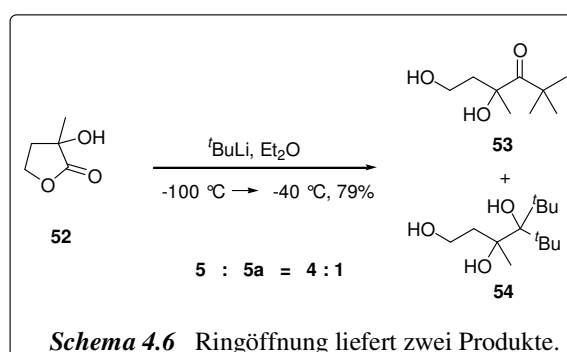
### 4.3 Synthese des Injektorsystems

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben setzt sich das für die Studien zum reduktiven Elektronentransfer in DNA entwickelte Injektorsystem aus zwei Einheiten zusammen, dem aminomodifizierten Thymidin-Derivat und der Elektronendonator-Einheit mit der Pivaloylgruppe. Die Synthese der beiden Einheiten wurde von Barbara Carl entwickelt und ist in ihrer Dissertationsarbeit detailliert beschrieben.<sup>[86]</sup> 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure als Donoreinheit konnte ausgehend von 4-Hydroxy-2-butanon in drei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 36% synthetisiert werden (Schema 4.5).



Schema 4.5 Synthese der 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure

Im ersten Schritt wurde das Keton **51** mit Kaliumcyanid in ein Cyanhydrin umgewandelt, das nach Hydrolyse und anschließender Lactonisierung **52** in 55% Ausbeute lieferte.<sup>[87]</sup> Die Einführung der Pivaloylgruppe gelang durch reduktive Ringöffnung mit *tert*-Butyllithium. Dabei entstand neben Keton **53** auch eine mit zwei *tert*-Butyl-Gruppen substituierte Trihydroxy-Verbindung **54**.<sup>[88]</sup> Die Reinigung erfolgte über Kugelrohrdestillation bei 100 °C und lieferte das Dihydroxyketon **53** in 79%



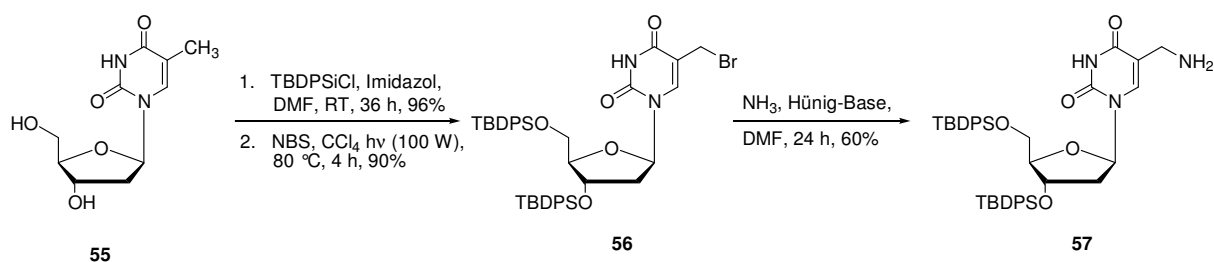
Schema 4.6 Ringöffnung liefert zwei Produkte.

Ausbeute. Die folgende Oxidation des Ketons zur Carbonsäure ließ sich nicht mit den gängigen Methoden bewerkstelligen. Weder Chrom(VI)- noch Mangan-Reagenzien noch die Dess-Martin-Methode führten zum gewünschten Produkt. Schließlich gelang die Oxidation



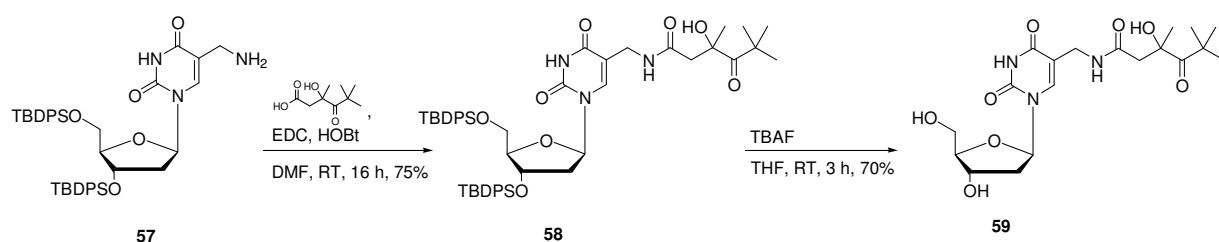
mit Natriumhypochlorit, Natriumchlorit und katalytischen Mengen TEMPO und lieferte in 82% Ausbeute die Carbonsäure **46**.<sup>[88]</sup>

Für die Modifikation des Thymidins wurden zunächst die Hydroxygruppen an 3'- und 5'-Position mit Silyl-Gruppen geschützt. Die Bromierung an der 5-Methylgruppe wurde unter Einsatz von *N*-Bromsuccinimid in Tetrachlorkohlenstoff durchgeführt. Nach vierstündiger Bestrahlung (80 W) erhielt man das bromierte Thymidin **56** in 90% Ausbeute.<sup>[90]</sup>



**Schema 4.7** Synthese des Aminothymidins **57**.

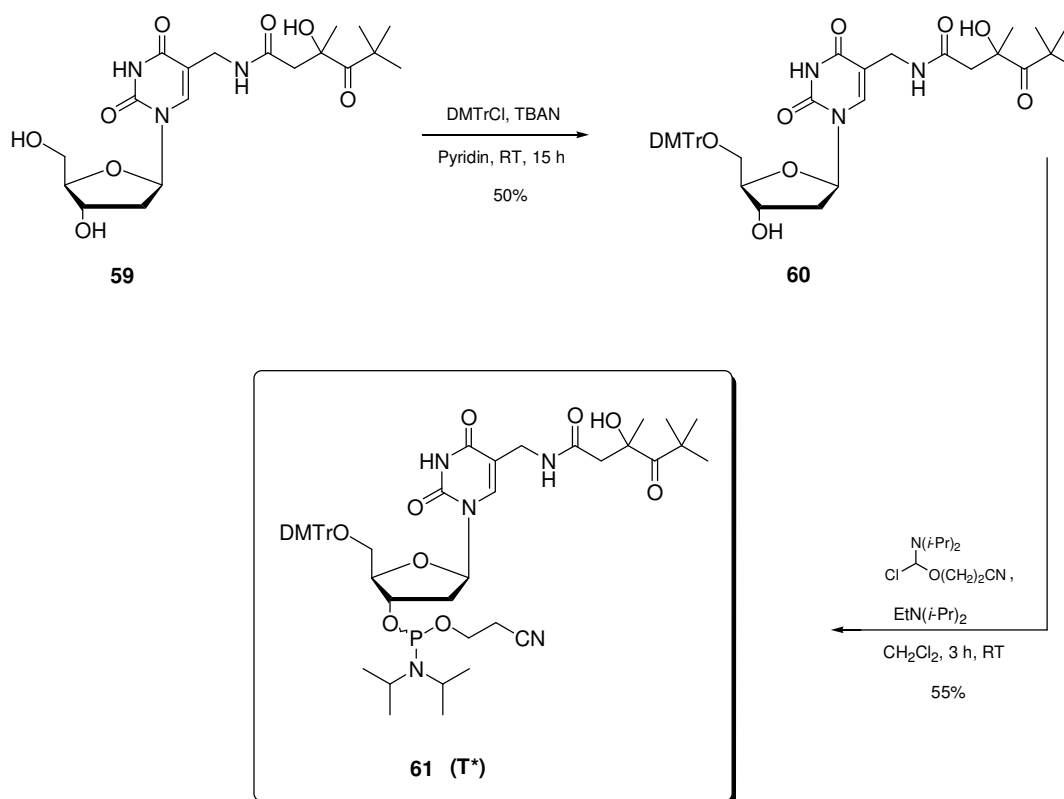
Die darauf folgende Umwandlung in eine Aminogruppe wurde mit Ammoniak und Diisopropylethylamin (Hünigbase) in DMF erreicht. Die Reaktion fand unter Druck in einem Young-Gefäß statt und ergab das Aminothymidin **57** in 60% Ausbeute, wobei das Produkt als Diastereomerenmisch anfiel.<sup>[91]</sup> Die Kupplung von **57** und **46** erfolgte mit EDC und HOBT und führte zu 75% des Kupplungsproduktes **58**. Nach Entfernung der Silyl-Schutzgruppen mit TBAF wurde Verbindung **59** mit 60%iger Ausbeute erhalten (Schema 4.8).



**Schema 4.8** Synthese des modifizierten Thymidin-Derivats **59**.

Für den Einbau des modifizierten Thymidins **59** in verschiedene Oligonukleotide mittels eines DNA-Synthesizers mussten noch zwei Modifikationen vorgenommen werden (Schema 4.9). Einerseits war es erforderlich, die 5'-Hydroxylfunktion als 4,4'-Dimethoxytritylether zu schützen, und andererseits musste an der 3'-Hydroxylgruppe ein Phosphoramidit eingeführt werden. Die Tritylschutzgruppe ließ sich nicht wie bei anderen Thymidinsynthesen<sup>[92]</sup> unter

Verwendung von DMAP als Katalysator einführen. Als geeigneter Aktivator erwies sich hingegen Tetrabutylammoniumnitrat, das in Verbindung mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid in 50% Ausbeute zum gewünschten tritylierten Produkt **60** führte.<sup>[93]</sup> Bei dieser Reaktion war die Menge an zugesetztem Tritylchlorid und Tetrabutylammoniumnitrat zu beachten. Wurden nur 1.0 - 1.7 Äquivalente des Chlorids und ein Äquivalent des Aktivators verwendet, so kam es zu keiner Umsetzung der Edukte. Verwendete man dagegen mehr als 2.0 Äquivalente des Tritylchlorids so wurde neben der 5'-Hydroxygruppe auch die 3'-Hydroxygruppe geschützt. Die Phosphitylierung gelang nach einer Standardmethode<sup>[94]</sup> mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und Hünigbase in einer Ausbeute von 55% und führte zum gewünschten Monomer **61 (T\*)**, welches sich für den Einbau in Oligonukleotide mittels automatisierter Festphasensynthese<sup>[95,96]</sup> eignete.



Schema 4.9 Synthese des Monomers **61**.

Die Synthese des einbaufertigen Monomers erfolgte über neun Stufen in 5% Gesamtausbeute ausgehend von Keton **51**. Als schwierig erwies sich der Aufbau der photoaktiven Einheit an der Seitenkette Insbesondere die Oxidation zur Carbonsäure ließ sich nicht mit den gängigen Methoden realisieren, so dass auf ein bisher kaum angewendetes Verfahren ausgewichen werden musste.<sup>[88]</sup>

## 5 Modelle zur Untersuchung der Elektroneninjektion

### 5.1 Einleitung

Um zu untersuchen, ob ein Elektronentransferprozess von der Pivaloyl-Einheit enthaltenden Seitengruppe auf Thymin stattfindet, wurden Photolyseexperimente mit mehreren Modellverbindungen durchgeführt. Hierzu wurde die photoaktive Pivaloylgruppe an unterschiedliche Stellen der Nucleobasen Thymin, Guanosin und Adenosin gekuppelt (Abb. 5.1).

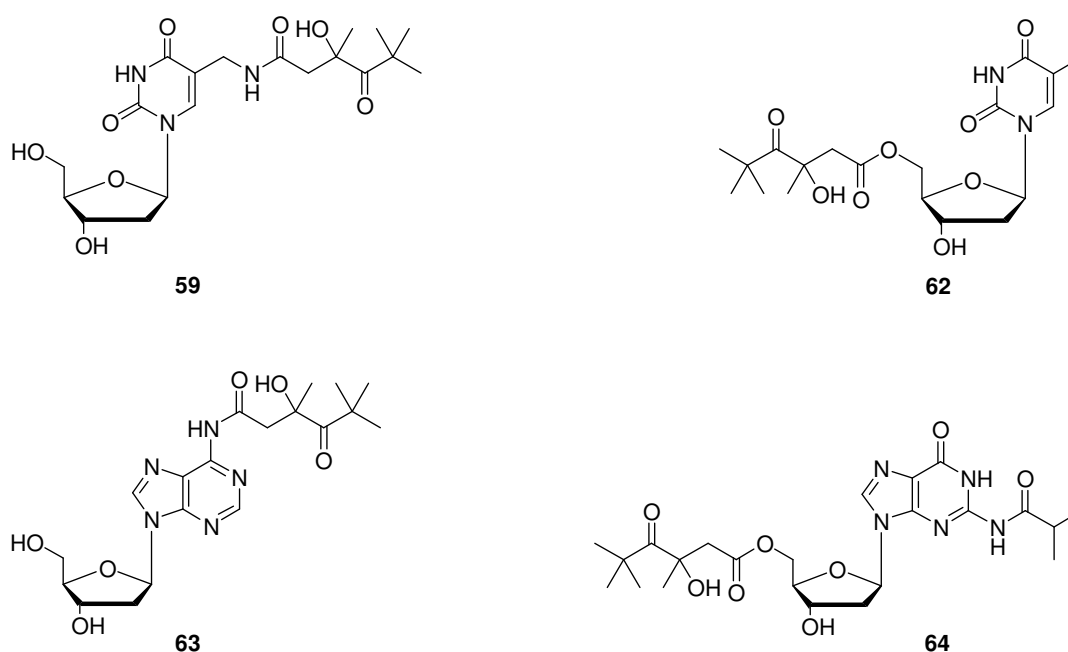
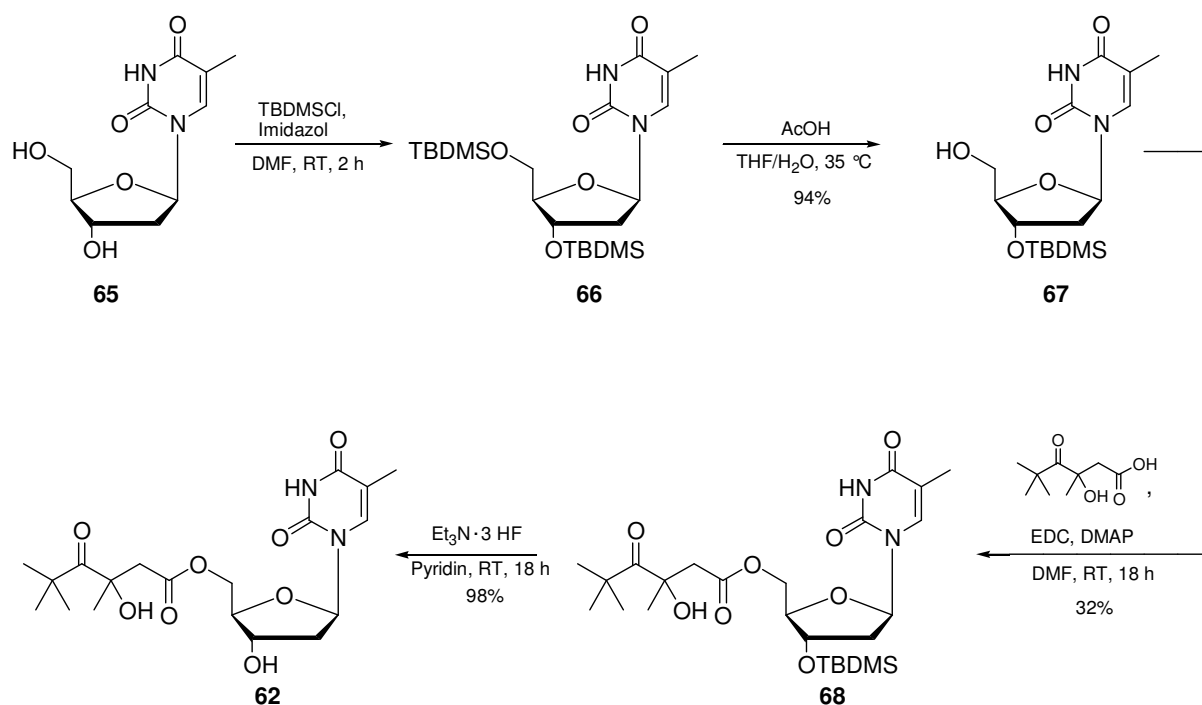


Abb. 5.1 Modellverbindungen zur Untersuchung der Effizienz der Elektroneninjektion.

Der Vergleich der einzelnen Modelle sollte über die Fähigkeit des photochemisch generierten Radikalanions, verschiedene Nucleobasen zu reduzieren, aufklären. Für den Fall des Thymins wurde einerseits die für den DNA-Einbau synthetisierte Modifikation **59** verwendet, andererseits wurde die photoaktive *tert*-Butyl-Keton-Einheit an die 5'-Position der Desoxyribose (**62**) angebracht. Zum Vergleich wurden jeweils eine Guanosin- und eine Adenosin-Modifikation synthetisiert. Beim Guanosinderivat wurde die Pivaloylgruppe an die 5'-Position des Zuckers gekuppelt (**64**), beim Adeninderivat wurde sie über die Aminofunktionalität der Nucleobase verknüpft (**63**).

## 5.2 Synthese von 5'-[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl]-thymidin

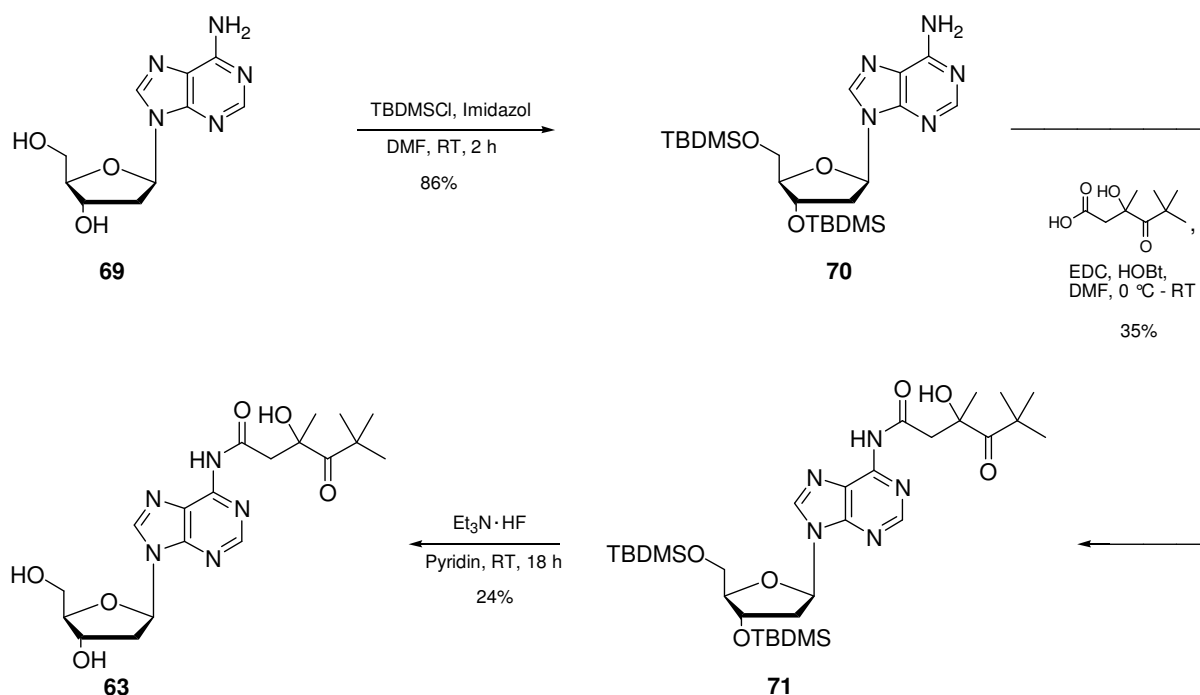
Die 5'-substituierte Verbindung **62** wurde ausgehend von 2-Desoxythymidin **65** in vier Schritten hergestellt (Schema 5.1). Zunächst wurden die beiden Hydroxygruppen an 3'-und 5'-Position der Desoxyribose mit *tert*-Butyldimethylsilylgruppen geschützt, wobei die Schutzgruppe an 5'-Position mit Essigsäure anschließend wieder abgespalten wurde.<sup>[97]</sup> Das 3'-geschützte Derivat **67** wurde mit 94% Ausbeute erhalten. Im folgenden Schritt wurde das Thymidinderivat mit 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure unter Verwendung von EDC und DMAP gekuppelt, und man gelangte mit 32% Ausbeute zu Verbindung **68**, deren Silylschutzgruppe an 3'-Position mit Triethylamin-tris-hydrofluorid abgespalten wurde und das Photoedukt **62** mit einer Ausbeute von 98% lieferte. Wie bei Verbindung **59** erhielt man ein Diastereomerenmisch, auf dessen Trennung verzichtet wurde, da das Stereozentrum nach der *Norrish I* Spaltung in der intermediären Zwischenstufe nicht mehr vorhanden ist.



**Schema 5.1** Synthese des 5'-modifizierten Thymidin-Derivats **62** als Modellsystem für Photolyse-Experimente.

### 5.3 Synthese von 6-[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amido]-adenosin

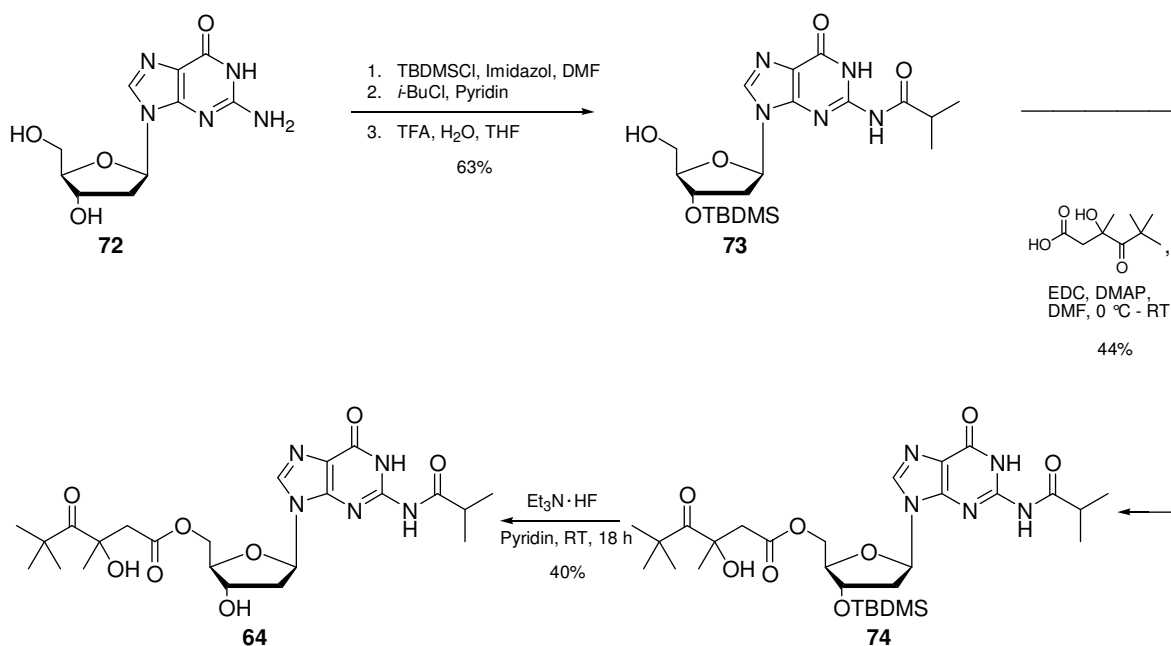
Als weiteres Referenzsystem wurde zunächst ähnlich dem Thymidin-Modell **59** ein Adenosin-Derivat hergestellt. Bei dieser Modifikation sollte sich die Pivaloylguppe ähnlich nahe an der Nucleobase befinden und wurde daher direkt am Purin über die Aminogruppe angebracht. Die Synthese der Referenzverbindung gelang in drei Schritten. Die Schützung der 3'- und 5'-Hydroxygruppen erfolgte mit Silylgruppen in 86% Ausbeute. Die anschließende Kupplung mit 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure unter Verwendung von EDC und HOBT erfolgte mit einer mäßigen Ausbeute von 35%. Die geringe Aktivität der Aminogruppe war dafür verantwortlich, dass rund 70% des Edukts überhaupt nicht umgesetzt wurden. Die Abspaltung der Silylschutzgruppen lieferte Photolyseedukt **63** in 24% Ausbeute (Schema 5.2). Für die photochemischen Untersuchungen wurde das Produkt über RP-HPLC gereinigt.



**Schema 5.2** Synthese des modifizierten Adenosin-Derivats **63** als Modellsystem für Photolyse-Experimente.

## 5.4 Synthese der Guanosin-Modifikation (*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-5-(2-isobutyrylamino-6-oxo-1,6-dihydro-purin-9-yl)-tetrahydro-furan-2-yl-methylester **64**

Als Vergleichssystem für das 5'-modifizierte Thymidin wurde die photoaktive Gruppe ebenso an die 5'-Position eines Guanosin-Derivates geknüpft. Um für die Kupplung der Pivaloyl-Einheit an die 5'-Position des Guanosins eine geeignete Vorstufe zu erhalten, wurden in einem ersten Schritt nach einer Methode von Ogilvie<sup>[98]</sup> die 3'- und die 5'-Hydroxygruppen von 2'-Desoxyguanin **72** mit TBDMSCl silyliert. Nach der Schützung der freien Aminogruppe an der Nukleobase mittels Isobuttersäurechlorid folgte die selektive Abspaltung der primären Silylschutzgruppe an 5'-Position unter Verwendung von Trifluoressigsäure in THF. Diese Reaktionsfolge lieferte geschütztes Nucleosid **73** in 63% Ausbeute über alle drei Stufen. Die Veresterung mit der Pivaloyleinheit wurde standardmäßig mit EDC und DMAP in 44% Ausbeute erreicht. Die niedrige Ausbeute kam aufgrund einer intramolekularen Umesterung zustande, die als Konkurrenzreaktion zur eigentlichen Veresterungsreaktion stattfand. Dabei wanderte die Aminoschutzgruppe an die 5'-Position und verhinderte so eine Kupplung mit der 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure. Nach der Entschützung mit Triethylamin-tris-hydrofluorid erhielt man das modifizierte Guanosinderivat **64** in 40% Ausbeute. Auf die Entschützung der Aminoschutzgruppe wurde verzichtet, da das freie Amin weder eine qualitative noch eine quantitative analytische Auswertung mittels RP-HPLC aufgrund der verbreiterten Signale zuließ.



**Schema 5.3** Synthese des modifizierten Guasosin-Derivats **64** als Modellsystem für Photolyse-Experimente.

## 5.5 Synthese der Photolyseprodukte

### 5.5.1 Einleitung

Der in Kapitel 4.1 beschriebene Reaktionsweg von *Norrish I* Spaltungen bei *tert*-Butylketonen (Schema 4.3) erlaubt neben der Möglichkeit des Elektronentransfers auch den H-Einfang. Bei der Bestrahlung der erwähnten Modellverbindungen sind folglich zwei Produkte möglich (Abb. 5.2). Die Referenzverbindungen für die bei der Bestrahlung entstehenden Produkte wurden unabhängig synthetisiert. Sie wurden für die Charakterisierung der nach der Photolyse der Modellverbindung entstandenen Produkte benötigt. Durch Koinjektion konnte ermittelt werden, ob es sich um die entsprechenden Verbindungen handelte. Sie wurden über die gleiche Syntheseroute hergestellt wie die Photoedukte.

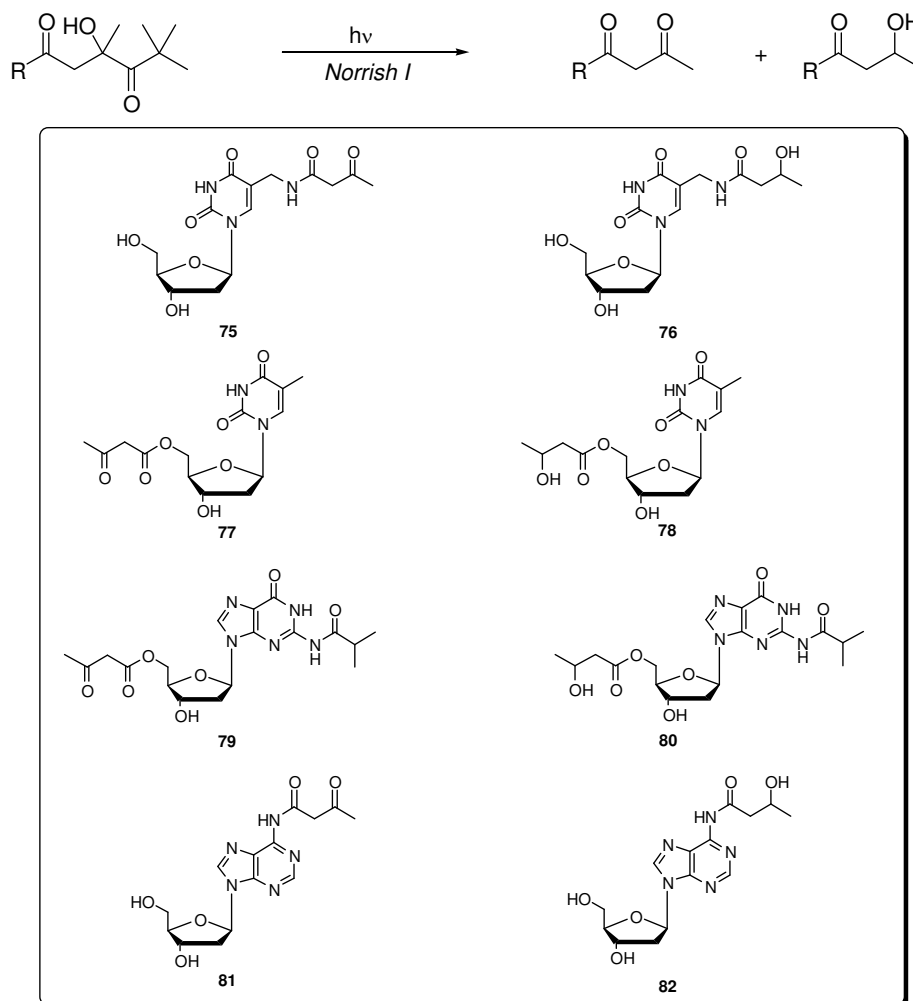


Abb. 5.2: Erwartete Produkte nach Photolyse der Modellverbindungen.

Die für die Synthese der Ketoprodukte benötigte Acetessigsäure wurde durch Entschützen des entsprechenden kommerziell erhältlichen *tert*-Butylesters mit Trifluoressigsäure hergestellt (Abb. 5.2). Aufgrund seiner stark hygroskopischen Eigenschaften wurde Acetessigsäure bei jeder Synthese der einzelnen Referenzverbindungen frisch hergestellt und eingesetzt. Für die Hydroxy-Referenzverbindung wurde die käufliche (*S*)-3-Hydroxybuttersäure verwendet. Auf die Synthese der potentiellen Photoprodukte **81** und **82** des Adenosin-Derivats **63** wurde aufgrund der geringen Nukleophilie des Stickstoffs der Purin-Aminogruppe verzichtet. Bereits die Synthese des Photoedukts **63** gelang nur mit sehr schlechter Ausbeute, und das Rohprodukt musste mehrfach mittels RP-HPLC gereinigt werden. Die Charakterisierung dieser Photoprodukte erfolgte über ESI-MS.

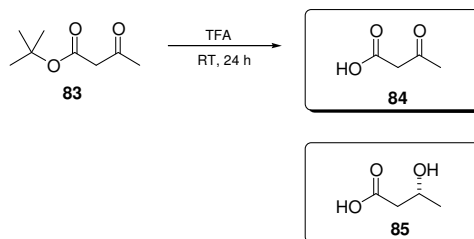
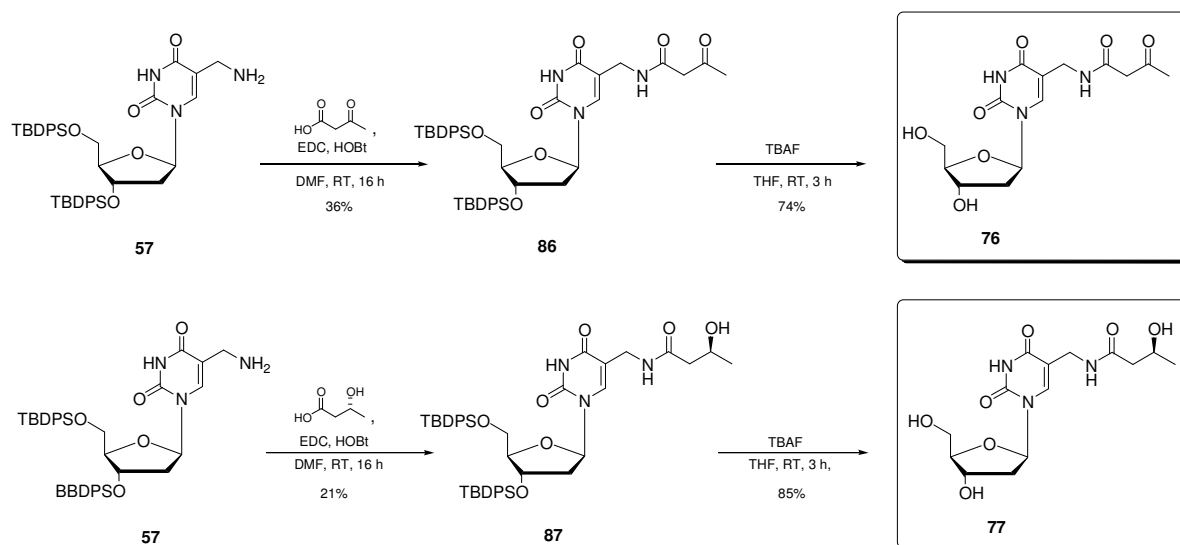


Abb. 5.2 Kupplungsbausteine für die Photolyse-Referenzverbindungen.

### 5.5.2 Synthese der T\*-Referenzverbindungen

Die Kupplungen der Acetessigsäure und der (*S*)-3-Hydroxybuttersäure an das Aminothymidin waren mit 36% und 21% weit weniger effizient als die Verknüpfung mit der 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure. Nach Entschützung der Silylgruppen erhielt man die entsprechenden Referenzverbindungen **76** und **77** in 74% bzw. 85% Ausbeute (Schema 5.1).

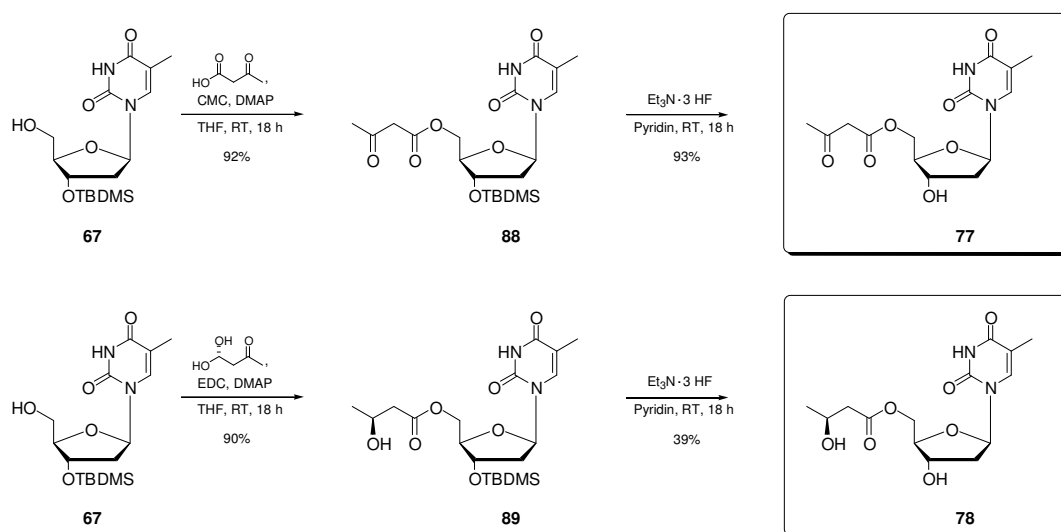


Schema 5.1 Synthese der Referenzverbindungen **76** und **77** für die Photolyse von **59**.



### 5.5.3 Synthese der 5'-Thymidin-Referenzverbindungen

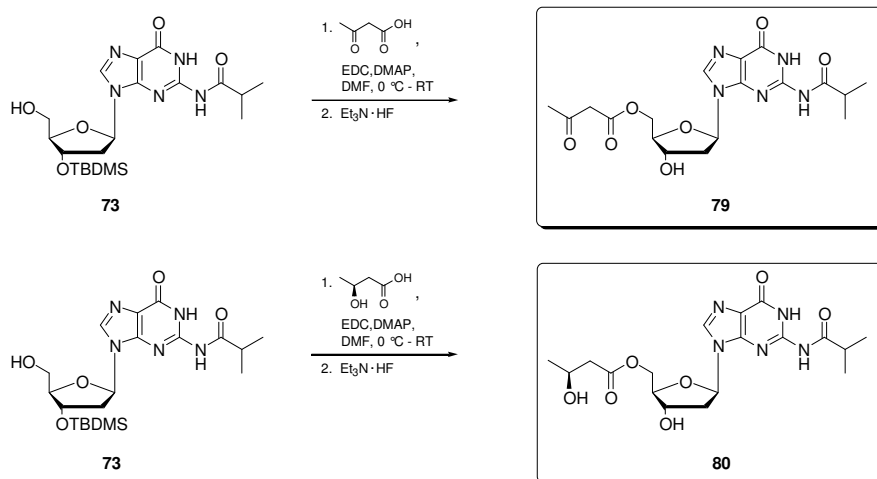
Im Unterschied zu den Kupplungen mit 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure und (*S*)-3-Hydroxybuttersäure, die mit EDC und DMAP erfolgreich durchgeführt wurden, führte diese Methode für den Fall der Acetessigsäure zu keiner Umsetzung. Unter Verwendung von CMC als Aktivierungsreagens verlief die Veresterung mit einer sehr guten Ausbeute von 92% (Schema 5.2), die ähnlich hoch war wie die Ausbeute für die Kupplung des Hydroxyderivats (90%). Die Schutzgruppenabspaltungen lieferten die Verbindungen **77** und **78** mit Ausbeuten von 93% und 39%.



**Schema 5.2** Synthese der Referenzverbindungen **77** und **78** für die Photolyse von **62**.

### 5.5.4 Synthese der Guanosin-Referenzverbindungen

Die Kupplungen der Säuren mit dem Guanosin-Derivat **73** wurden mit EDC und DMAP durchgeführt. Auf eine Reinigung und Charakterisierung der 3'-silylgeschützten Modifikation wurde verzichtet. Das Rohprodukt wurde sofort mit Triethylamin-tris-hydrofluorid entschützt was in 38%gen bzw. 33%gen Ausbeuten über beide Schritte zu den Verbindungen **79** und **80** führte (Schema 5.3).

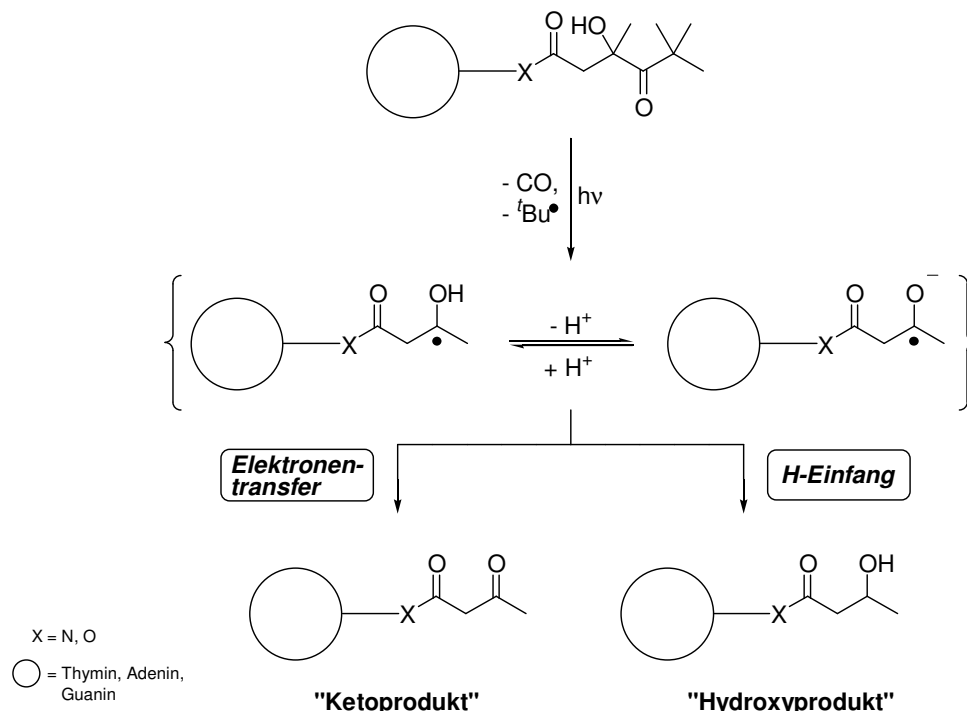


**Schema 5.3** Synthese der Referenzverbindungen **79** und **80** für die Photolyse von **64**.

## 6 Photolyseexperimente

### 6.1 Einleitung

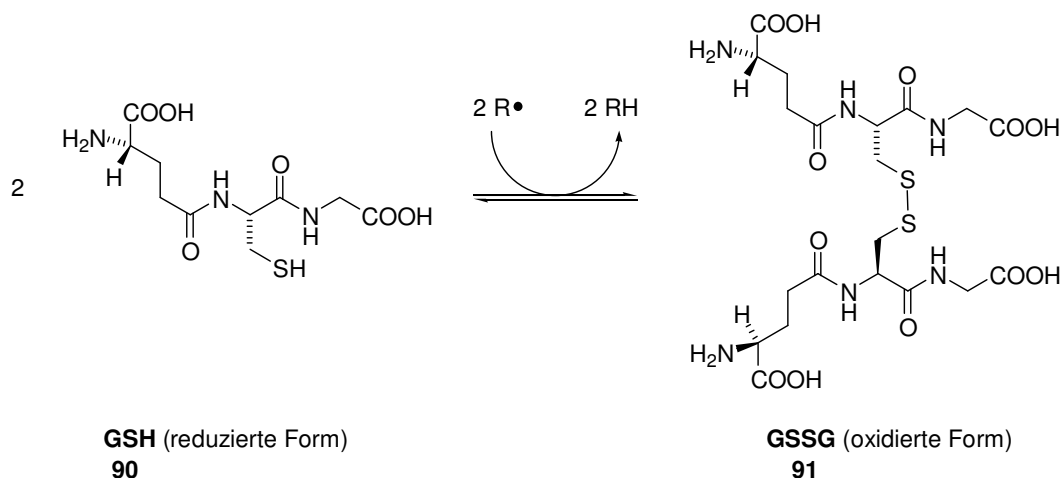
Die Photolysen der modifizierten Nucleoside sollten Aufschluss sowohl über die Donorfähigkeiten des Pivaloylsystems als auch über die Akzeptoreigenschaften der entsprechenden Nucleobase geben. Das nach *Norrish I* entstandene Ketylradikalanion sollte mit seinem Reduktionspotential ( $E_{\text{red}} = -2.5 \text{ V}$ ) in der Lage sein, Thymin als benachbarte Nucleobase ( $E_{\text{red}} = -2.18 \text{ V}$ ) zu reduzieren. Werden hingegen Guanin ( $E_{\text{red}} = -2.52 \text{ V}$ ) oder Adenin ( $E_{\text{red}} = -2.76 \text{ V}$ ) als Akzeptor verwendet, so sollte die Elektronenübertragung erschwert oder gar unterbunden werden. Die Deprotonierung des intermediären Neutralradikals, die aufgrund der erhöhten Acidität der Hydroxygruppe bevorzugt erfolgt, wird durch die benachbarte Carbonylgruppe unterstützt. Das so freigesetzte Proton wird möglicherweise vom umgebenden Wasser aufgenommen. Der Elektronentransferprozess von der Pivaloyleinheit auf die Nucleobase ist folglich mit einem Protonentransfer gekoppelt (Abb. 6.1).<sup>[99]</sup>



**Abb. 6.1:** Entstehung der Photolyse-Produkte nach Bestrahlung der pivaloyl-modifizierten Nucleoside .

Die Entstehung der intermediären Radikale und Radikalanionen sollte durch Abfangen mit einem H-Donor verifiziert werden. Dies wurde unter Einsatz von L-Glutathion **GSH**, einem

Tripeptid, das in den Zellen von Säugetieren in Konzentrationen von bis zu 10 mM vorkommt,<sup>[100,101]</sup> realisiert. Die reduzierte Form des H-Donors reagiert mit Radikalen unter Bildung eines Glutathion-Dimers **GSSG** (Schema 6.1).



*Schema 6.1* Reaktion des H-Donors L-Glutathion mit Radikalen.

Die H-Übertragungsgeschwindigkeit  $k_H$  dieser Verbindung ist für die Reaktion mit  $\alpha,\beta$ -dimethoxy-substituierten tertiären Kohlenstoffradikalen bestimmt worden. Extrapoliert auf Wasser bei 30 °C wurde ein Wert von  $1.0 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  erhalten.<sup>[102]</sup> Der H-Einfang steht in Konkurrenz zur Elektronenübertragung auf die Nukleobase (Abb. 6.1). Aus dem Verhältnis der durch diese Prozesse entstandenen Produkte für den Elektronentransfer (Ketoprodukt) und den H-Einfang (Hydroxyprodukt) wurden Erkenntnisse in Bezug auf die Effizienz und die Geschwindigkeit der Elektroneninjektion in die verschiedenen Nukleobasen erhalten.

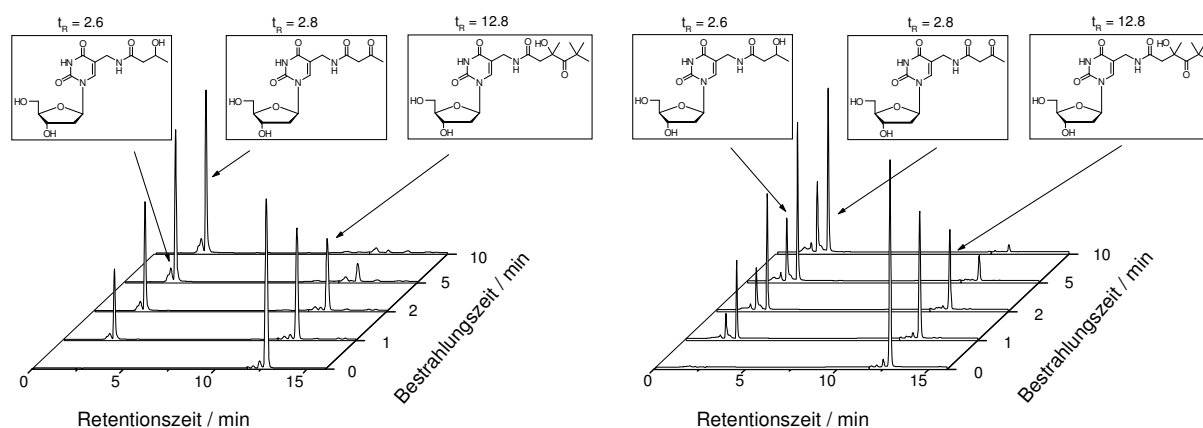
## 6.2 Photolyse des 5-modifizierten Thymidins 59 (T\*)

Aufgrund von Löslichkeitsproblemen wurden die Photolysen nicht wie bei den Oligonukleotidexperimenten im wässrigen Puffersystem (pH 7.0), sondern in einer Mischung aus Wasser und Methanol durchgeführt. Als Bestrahlungsprodukte entstanden die Keto-Modifikation **75** und die Hydroxy-Modifikation **76**, die in den angegebenen Ausbeuten mittels HPLC ermittelt werden konnten (Tabelle 6.1). Die Bestrahlungen fanden jeweils im gleichen Maßstab ohne Zusatz von H-Donor sowie mit 5 bzw. 50 Äquivalenten H-Donor bei einer Wellenlänge von 320 nm statt.

Lösungsmittel	Wellenlänge	L-Glutathion	75 / 76	Ausbeute
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	-	9 : 1	75%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	5 eq	3 : 1	72%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	50 eq	2 : 1	70%

**Tabelle 6.1:** Beobachtete Produktverteilung bei der Photolyse von **59** mit und ohne Zusatz eines H-Donors.

Die Umsetzung zu den Produkten erfolgte in sehr guten Ausbeuten, was im Hinblick auf die Effizienz der Elektroneninjektion wichtig war. Würde bereits der Injektionsschritt in geringen Ausbeuten verlaufen, so hätte dies Konsequenzen für den weiteren Transport eines Elektrons in der DNA, der sehr viel schwieriger zu detektieren wäre. Das Verhältnis von Elektronentransferprodukt **75** zu H-Abstraktionsprodukt **76** änderte sich bei den Experimenten von 9 : 1 ohne H-Donor auf 2 : 1 mit 50 Äquivalenten H-Donor. Selbst bei einem 50-fachen Überschuss von L-Glutathion wird also immer noch doppelt so viel "Ketoprodukt" **75** wie "Hydroxyprodukt" **76** gebildet, was im Falle des Thymins auf einen effizienten Elektronentransferprozess hindeutet.



**Abb. 6.2** Chromatogramme der Photolysereaktion von Verbindung **59** ohne bzw. mit 5 eq H-Donor.

Wider Erwarten ergibt sich kaum eine Änderung des Produktverhältnisses, wenn die Konzentration des H-Donors um das zehnfache erhöht wird. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Elektronenübertragung auf Thymin mit sehr großer Geschwindigkeit und die H-Abstraktion

aufgrund der geringeren Geschwindigkeit benachteiligt erfolgt. Da die Geschwindigkeit des H-Einfangs mit  $1.0 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  bekannt ist, muss der Elektronentransfer auf die Nukleobase wesentlich schneller ablaufen. Das Auftreten des Einfangproduktes **76** bei der Bestrahlung ohne H-Donor lässt sich durch den Anteil an Methanol, das selbst über geringe H-Donoreigenschaften verfügt, im Lösungsmittelgemisch erklären.

### 6.3 Photolyse des 5'-modifizierten Thymidins **62**

Bei der Photolyse des 5'-modifizierten Thymidins erhielt man die Produkte **77** und **78** ebenfalls in sehr guten Ausbeuten (Tabelle 6.2). Im Vergleich zum 5-modifizierten Thymidin nahm das Verhältnis von "Ketoprodukt" **77** zu "Hydroxyprodukt" **78** von 9 : 1 auf 3 : 1 ab.

Lösungsmittel	Wellenlänge	L-Glutathion	77 / 78	Ausbeute
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	-	3 : 1	65%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	5 eq	1 : 5	80%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	50 eq	1 : 10	82%

**Tabelle 6.2:** Beobachtete Produktverteilung bei der Photolyse von **62** mit und ohne Zusatz eines H-Donors.

Die strukturellen Unterschiede dieser beiden Verbindungen führen dazu, dass eine Elektronenübertragung vom Pivaloylsystem auf Thymin bei Verbindung **59** über fünf Einfachbindungen auftritt, während das Überschusselektron in Verbindung **62** acht Einfachbindungen bewältigen muss. Diese Distanzerweiterung ist der Grund für den geringeren Anteil am Elektronentransferprodukt. Die Gesamtgeschwindigkeit des Elektronentransports nimmt mit der größer werdenden Distanz ab, so dass die H-Einfang-Reaktion an Bedeutung gewinnt. Dieser Effekt wird noch deutlicher bei der Zugabe des H-Donors. Bereits bei fünf Äquivalenten kehrt sich das Verhältnis von Elektronentransfer und H-Einfang um. Bei 50 Äquivalenten H-Donor erhält man bei einem Verhältnis von 1 : 10 fast

ausschließlich H-Einfang. Vergleicht man diesen Wert mit dem des 5-modifizierten Thymidins (2 : 1), so wird der Distanzeinfluss ersichtlich. Die Ausbeute des Elektronentransfers im Vergleich zum H-Einfang verringert sich um das 20-fache.

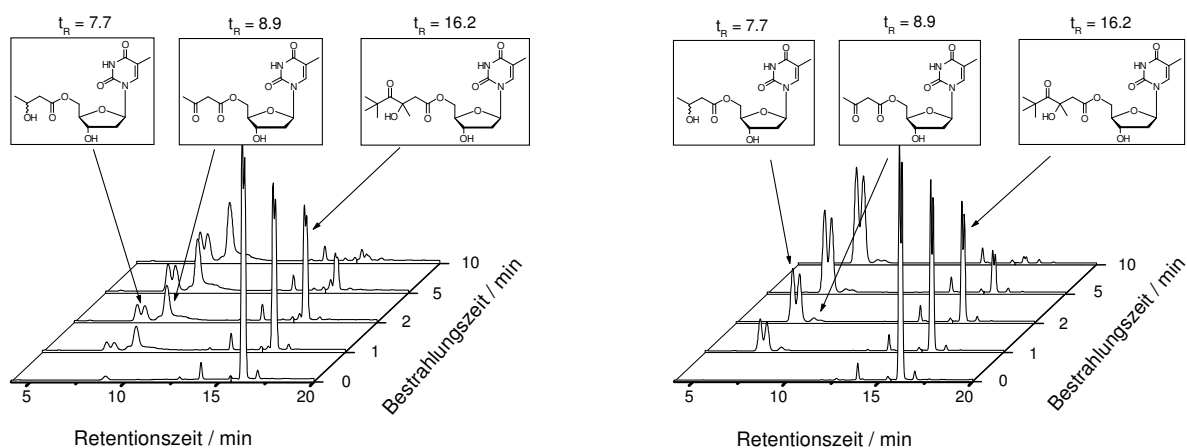
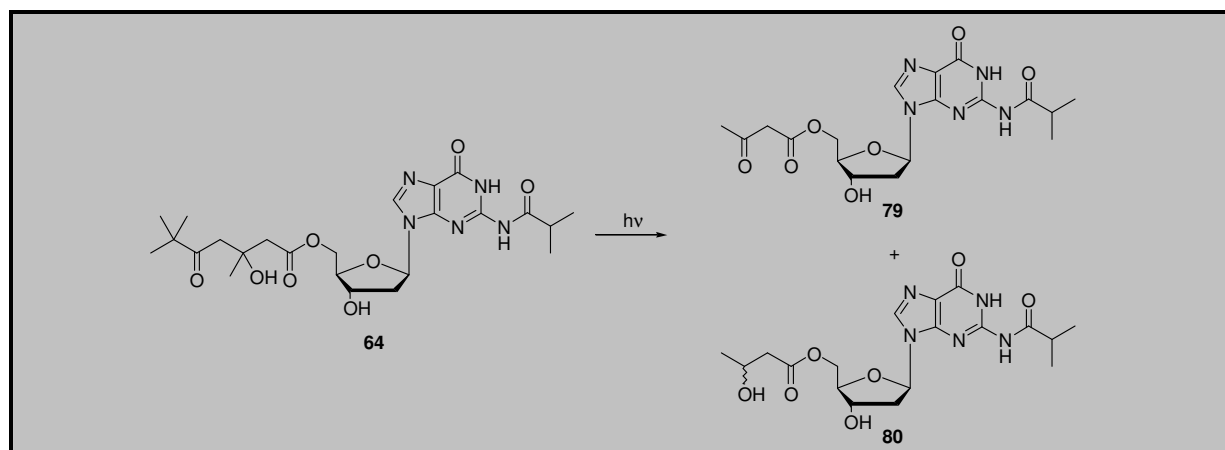


Abb. 6.3 Chromatogramme der Photolysereaktion von Verbindung **62** ohne bzw. mit 5 eq H-Donor.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Oxidation zum "Ketoprodukt" **77** und somit eine Elektronenübertragung trotz einer um 60% längeren Distanz und 50-fachen Überschusses an H-Donor stattfindet. Ferner zeigt sich durch dieses Vergleichsexperiment, dass die photoaktive Gruppe direkt an die Nucleobase wirksamer ist. Der Elektronentransport ist bei dieser strukturellen Anordnung begünstigt.

#### 6.4 Photolyse des 5'-modifizierten Guanosins **64**

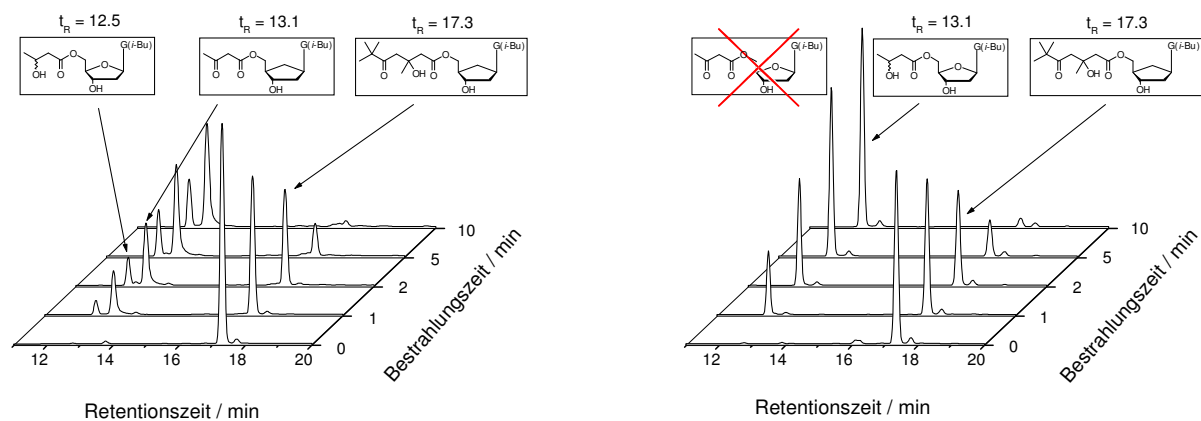
Die Photolyse des Guanosin-Derivates **64** sollte im Vergleich zum Thymidin Aufschluss über die Akzeptoreigenschaften der jeweiligen Nucleobase geben. Bei einem wesentlich negativeren Redoxpotential ( $E_{\text{red}}(\text{G}) = -2.52 \text{ V}$  ;  $E_{\text{red}}(\text{T}) = -2.18 \text{ V}$ ) sollte die Elektronenübertragung gegenüber dem H-Einfang in diesem Fall benachteiligt sein. Ohne Zugabe von H-Donor kommt es zu einer ähnlichen Produktverteilung wie beim Thymidin-Derivat. Der Elektronentransfer steht trotz der großen Entfernung und des stark negativen Redoxpotentials mit dem H-Einfang, der durch Methanol im Lösungsmittel begünstigt wird, in Konkurrenz, und es wird doppelt so viel Elektronentransferprodukt **79** wie H-Einfangprodukt **80** gebildet (Tab. 6.3).



Lösungsmittel	Wellenlänge	L-Glutathion	79 / 80	Ausbeute
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	-	2 : 1	94%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	5 eq	nur <b>80</b>	91%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	50 eq	nur <b>80</b>	89%

**Tabelle 6.3:** Beobachtete Produktverteilung bei der Photolyse von **64** mit und ohne Zusatz eines H-Donors.

Wird dieselbe Photolyse mit L-Glutathion als H-Donor durchgeführt, so entsteht kein "Ketoprodukt" **79** mehr, es kann nur noch "Hydroxyprodukt" **80** detektiert werden. Bei Zugabe des H-Donors erfolgt also ausschließlich H-Einfang und kein Elektronentransfer mehr.



**Abb. 6.4** Chromatogramme der Photolysereaktion von Verbindung **64** ohne bzw. mit 5 eq H-Donor.

Im Vergleich zum Thymidinderivat, bei dem selbst bei 50 Äquivalenten H-Donor noch Elektronentransfer-Produkt **77** zu detektieren ist, spielt das Redoxpotential die entscheidende Rolle. Die Geschwindigkeit der Elektronenübertragung auf Guanin ist aufgrund der zu geringen Reduktionskraft des Ketylradikalanions nicht ausreichend, um den H-Einfang teilweise zu unterdrücken. Damit konnte die Vermutung belegt werden, nach der eine



Elektronenübertragung vom Pivaloylsystem auf Guanin im Vergleich zu Thymin erschwert ablaufen bzw. unter Zugabe eines H-Donors ganz unterbunden werden sollte.

## 6.5 Photolyse des Amino-modifizierten Adenosins 63

Um einen direkten Vergleich des Injektorsystems **59** mit einem weniger guten Elektronenakzeptor zu erhalten, wurden entsprechende Experimente mit Verbindung **63** gemacht. Das Pivaloylsystem befindet sich in dieser Adenosin-Modifikation über eine Amid-Bindung verknüpft ähnlich dicht an der Nukleobase wie im Thymidin-Derivat. Der Weg der Elektronenübertragung auf die Base führt über vier Einfachbindungen und ist damit um eine Bindung kürzer als in Verbindung **59**. Allerdings ist das Redoxpotential von Adenin ( $E_{\text{red}} = -2.76$  V) deutlich negativer als von Thymin. Der H-Einfang sollte bei diesem System daher begünstigt sein.

Lösungsmittel	Wellenlänge	L-Glutathion	81 / 82	Ausbeute
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	-	1 : 1	90%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	5 eq	nur <b>82</b>	85%

**Tabelle 6.4:** Beobachtete Produktverteilung bei der Photolyse von **63** mit und ohne Zusatz eines H-Donors.

Ohne Zusatz von H-Donor erhält man ein äquivalentes Verhältnis von "Ketoprodukt" **81** und "Hydroxyprodukt" **82**. Obwohl die Distanz um eine Einfachbindung kürzer ist erhält man keine Selektivität bezüglich des Elektronentransfers wie beim Thymidin-Derivat. Analog zum Guanosin-Derivat ist die Reduktionskraft des *tert*-Butylketons nicht ausreichend, um diesen Prozess zu begünstigen. Noch deutlicher wird dieser Effekt nach Zugabe von H-Donor. Während beim Thyminderivat selbst bei 50 Äquivalenten der Elektronentransfer bevorzugt stattfindet, erfolgt beim Adenosinderivat schon bei fünf Äquivalenten H-Donor nur noch H-Einfang.

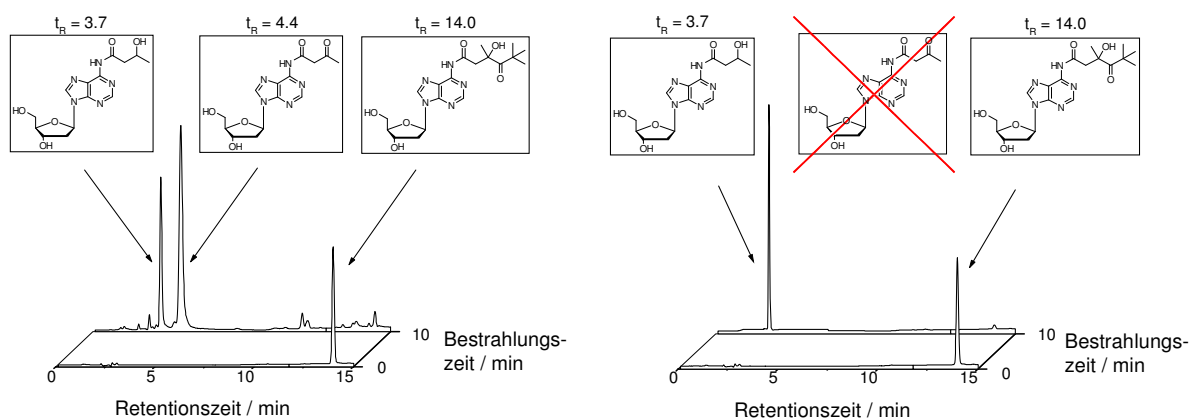


Abb. 6.5 Chromatogramme der Photolysereaktion von Verbindung **63** ohne bzw. mit 5 eq H-Donor.

## 6.6 Zusammenfassung

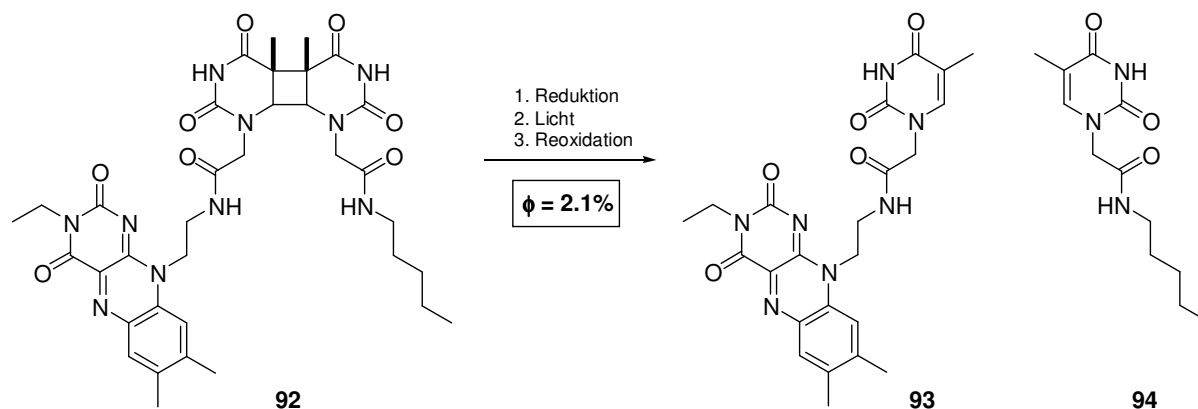
Die Photolyseexperimente zeigen, dass Thymin wesentlich bessere Elektronenakzeptoreigenschaften besitzt als Guanin oder Adenin. Während im Thymidinderivat der Elektronentransfer auch bei sehr hoher Konzentration eines H-Donors bevorzugt gegenüber der H-Einfang-Reaktion erfolgt, führen diese Bedingungen bei den Derivaten des Guanosins und des Adenosins einzig zum H-Einfang. Barbara Carl beschreibt in ihrer Dissertation Experimente mit ähnlichen Systemen.<sup>[86]</sup> Die Ergebnisse stimmen mit den hier genannten überein. In diesen Modellverbindungen erfolgte ebenfalls nur ein Elektronentransfer auf Thymin.

Weiterhin konnte ein Distanzeffekt für die Elektronenübertragung beobachtet werden. Der Transport über fünf Einfachbindungen im Injektorsystem **59** tritt im Vergleich zum H-Einfang in allen Experimenten bevorzugt auf, hingegen dominiert der H-Einfang beim 5'-modifizierten Thymidin **62** aufgrund der geringeren Gesamtgeschwindigkeit des Elektronentransports über acht Einfachbindungen. Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers von der Pivaloyleinheit auf Thymin – dem eigentlichen Injektionsschritt – ist aufgrund der erhaltenen Werte schneller als die H-Übertragungsgeschwindigkeit ( $k_H = 1.0 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ ) von L-Glutathion. Da aber selbst bei einem 50-fachen Überschuss an H-Donor doppelt soviel Elektronentransferprodukt wie H-Einfangprodukt entsteht, muss die Injektionsgeschwindigkeit um ein Vielfaches höher liegen als dieser Wert und dürfte sich wie im System  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}^\bullet / (\text{CH}_3)_2\text{CO}$  im Bereich von  $1.5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$  befinden.

## 7 Thymindimer als Elektronenakzeptor

### 7.1 Einleitung

Die Detektion des Elektronentransfers erforderte ein System mit guten Elektronenakzeptoreigenschaften sowie einer einfachen Analytik. Uridin- und Thymindimere mit *cis,syn*- und *trans,syn*-Struktur sind DNA-Schäden, die durch eine von UV-Licht ausgelösten  $[2\pi+2\pi]$  Cycloaddition von zwei benachbarten Pyrimidinen entstehen.<sup>[103]</sup> Diese Photoprodukte sind mutagene Schädigungen, die sowohl den Zelltod als auch die Degeneration von gesunden Zellen in Tumorzellen bewirken können. DNA-Photolyasen sind flavinabhängige Reparaturenzyme, die Cyclobutan-Dimere im Genom vieler Organismen effizient reparieren. Carell und Mitarbeiter berichteten von Thymindimer und Flavin enthaltenden Modellverbindungen, bei denen es nach photochemischer Anregung des Flavins zur partiellen Spaltung des Dimers kommt (Schema 7.1).<sup>[104]</sup>

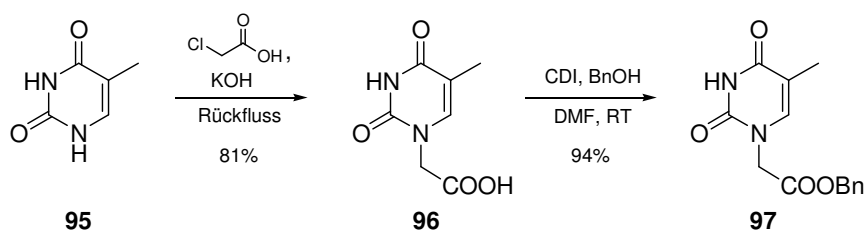


**Schema 7.1** Lichtinduzierte Spaltungsreaktion der Cyclobutan-Modellverbindung **92**.

Der entscheidende Schritt dieser Reparaturreaktion ist ein lichtinduzierter, intramolekularer Elektronentransfer vom Flavin zum Dimer, welches anschließend eine spontane Cycloreversion unterläuft. Die Quantenausbeute für die Spaltung eines Thymindimers konnte mit 2.1% bestimmt werden.<sup>[104c]</sup> Analog zu den Experimenten von Carell sollten photochemische Untersuchungen mit einer Modellverbindung erfolgen, die als Elektronendonator die photoaktive Pivaloyleinheit und als Elektronenakzeptor ein Thymindimer enthält.<sup>[104c]</sup>

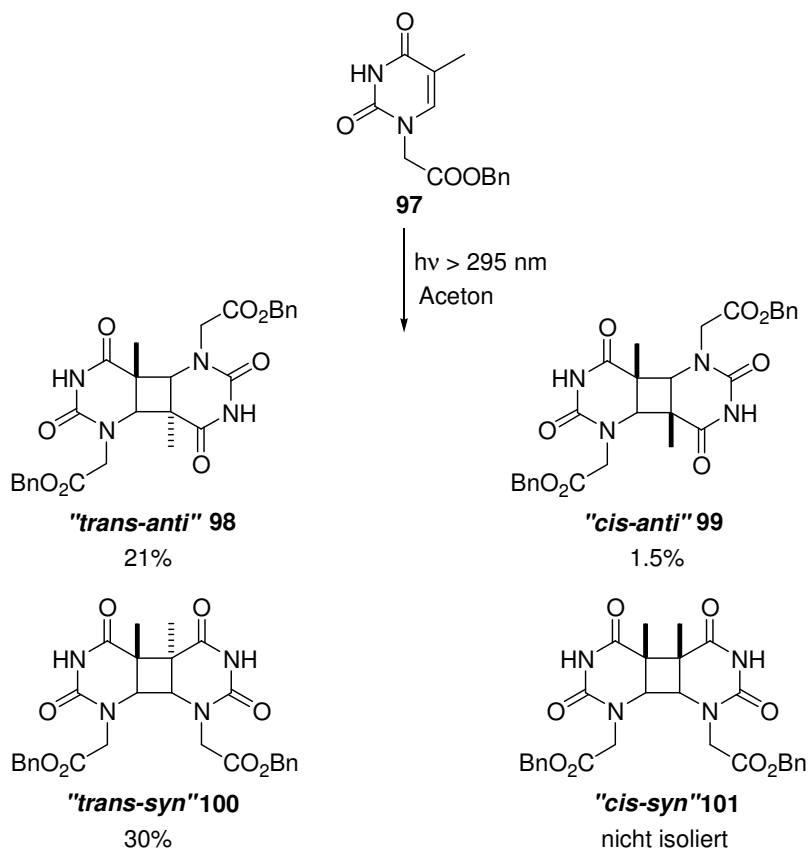
## 7.2 Synthese der Modellverbindung

Die Synthese der Modellverbindung **103** wurde mit der *trans,syn*-Thymindimerdisäure **102** sowie dem 4,6-Dihydroxy-2,2,4-trimethyl-hexan-3-on **53** durchgeführt. Ausgehend von Thymin wurde Säure **96** mit Chloressigsäure in wässriger Lösung unter Rückfluss in 81% Ausbeute hergestellt. Die anschließende Veresterung mit Benzylalkohol lieferte das Benzylester-geschützte Thyminderivat in 94% Ausbeute.<sup>[104c]</sup>



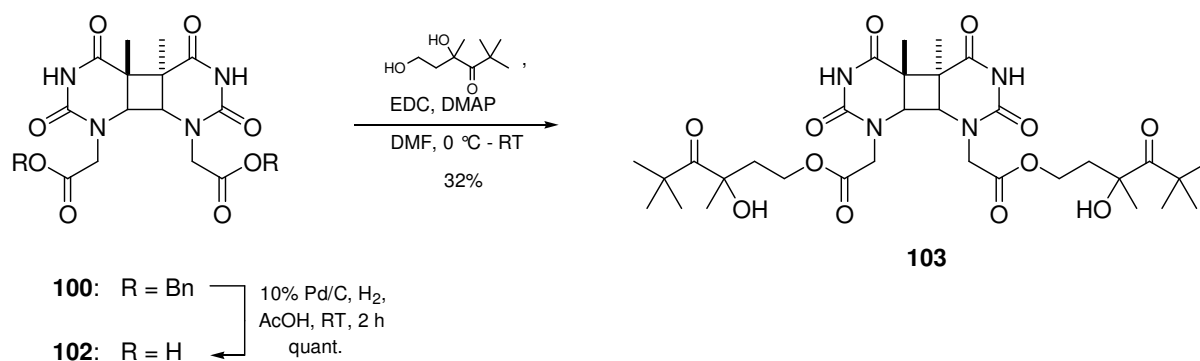
Schema 7.2 Synthese des benzyl-geschützten Photoedukts **97**.

Der Schlüsselschritt der Synthese bestand in der Photodimerisierung des Thyminderivats. Hierfür wurde eine Suspension von Verbindung **97** in Aceton in einem Pyrex-Gefäß unter Argon mit einer Mitteldruck-Quecksilberdampfampe ( $\lambda > 295$  nm) bestrahlt.



Schema 7.3 Mögliche Photoprodukte bei der Photodimerisierung von **97**.

Im Verlauf der Photolyse ging das Thyminderivat **97** langsam in Lösung, während ein Gemisch von zwei der drei gebildeten Isomere, dem *cis-transoid-cis,anti*-Diester **98**, welcher in Aceton unlöslich ist, sowie dem *cis-transoid-cis,syn*-Diester **100** ausgefällt wurde. Die Bestrahlung wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt, und nach drei Stunden konnten drei neue Produkte identifiziert werden. Das Gemisch der beiden ausgefallenen Isomere **98** und **100** wurde abfiltriert. Die Trennung dieser beiden Isomere erfolgte durch eine Festflüssig-Extraktion unter kontinuierlichem Rückfluss in einer Soxhlet-Apparatur. Das nach der Bestrahlung erhaltene Filtrat wurde eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt. Neben weiteren Mengen der *cis-transoid-cis,syn*- und *cis-transoid-cis,anti*-Isomere wurde der *cis-cisoid,cis-anti*-Diester **99** in 1.5% Ausbeute isoliert. Die *cis-cisoid-cis,syn*-Verbindung **101** konnte nicht isoliert werden. Aufgrund der unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften haben die vier Isomere unterschiedliche Reduktionspotentiale, die im Bereich von -2.20 V bis -2.60 V liegen. Verschiedene Experimente zeigten, dass die Spaltung des *cis-syn*-Dimers mit höherer Geschwindigkeit und Ausbeute abläuft als die Spaltung des *trans-syn*-Dimers.<sup>[104]</sup> Die Öffnung des Cyclobutanringes in der *trans-anti*-Verbindung verläuft nur in geringem Maße während die *cis-anti*-Verbindung überhaupt nicht spaltet. Da das *cis-syn*-Dimer nicht isoliert werden konnte, wurde das *trans-syn*-Dimer für die weitere Umsetzung verwendet. Die Abspaltung der Benzylgruppen erfolgte unter Wasserstoffatmosphäre mit Palladium/Kohle in Essigsäure und führte in quantitativer Ausbeute zu Dicarbonsäure **102** (Schema 7.4).

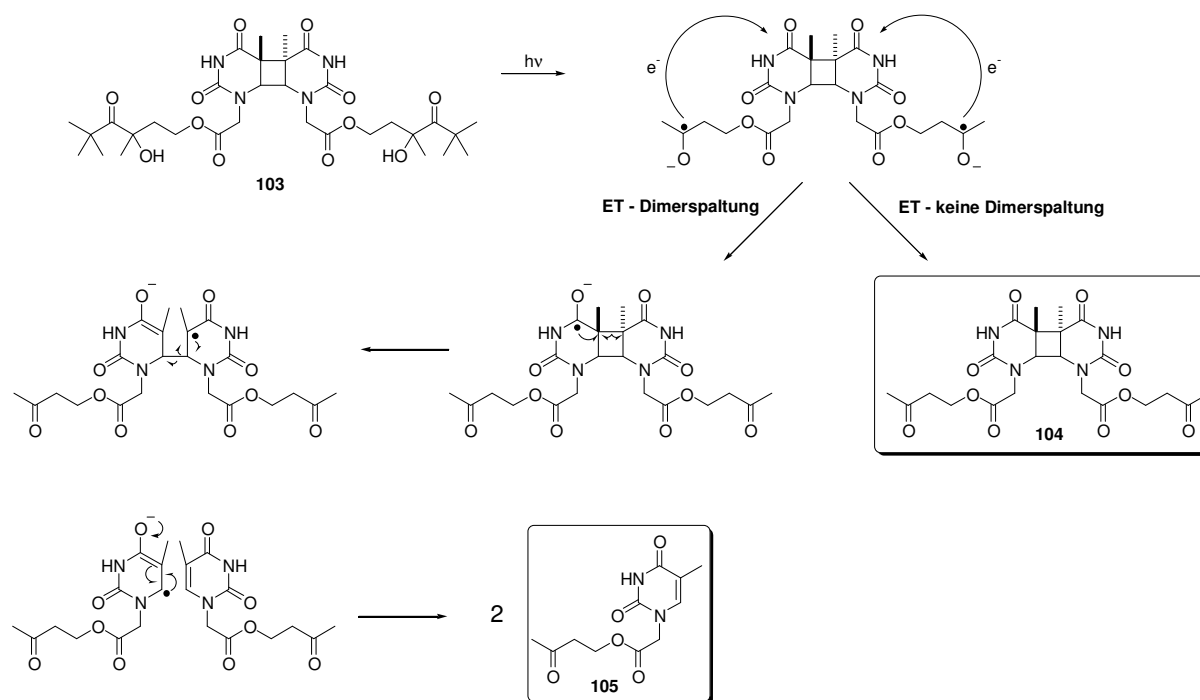


**Schema 7.4** Herstellung der *trans-syn* Modellverbindung **103**.

Die abschließende Veresterung wurde mit EDC und DMAP unter Verwendung des Diols **53** erreicht und man gelangte in 32% Ausbeute zur Modellverbindung **103**.

### 7.3 Photolyse der Modellverbindung 103

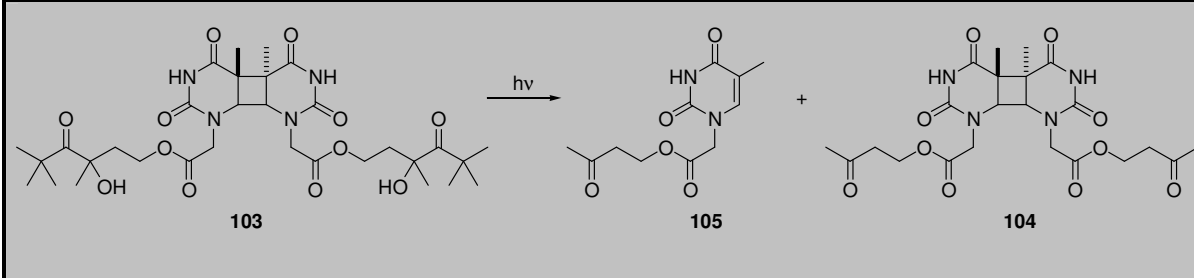
Die photochemische Untersuchung des Dimers **103** sollte sowohl Hinweise über die Reduktionskraft des Injektorsystems als auch über die Eignung des Thymindimers als Detektionssystem für den Elektronentransfer in DNA liefern. Bei einer partiellen Spaltung des Dimers und der damit verbundenen Elektronenübertragung nach photochemischer Anregung der Pivaloyleinheit wäre der Einsatz des Cyclobutan-Thymindimers als Elektronenakzeptor eine ausgezeichnete Option aufgrund der einfachen analytischen Detektionsmethoden. Nach der Lichtanregung und der Bildung des intermediären Radikalanions kann die Produktbildung auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen (Schema 7.5). Zum einen kann eine Elektronenübertragung vom Ketylradikalanion auf das Thymindimer stattfinden, ohne dass es zur Cycloreversion kommt. Dieser Prozess kann aufgrund des negativeren Redoxpotentials im Vergleich zum Thymin-Monomer eintreten. Das freiwerdende Elektron wird an das Lösungsmittel abgegeben und Verbindung **104** wird gebildet.



Schema 7.5 Produktbildung bei der Photolyse der Modellverbindung **103**.

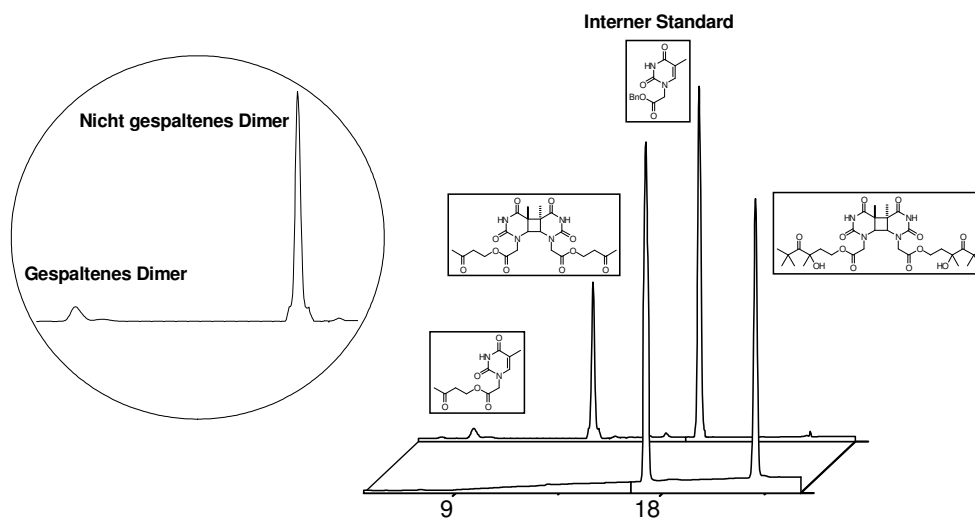
Andererseits kann es nach der Elektronenübertragung auf das Dimer zu einer Spaltungsreaktion kommen. Bei ausreichender Reduktionskraft erfolgt eine partielle Cycloreversion, die zu Verbindung **105** führt.

Die Bestrahlung wurde in Methanol bei 320 nm durchgeführt. Die Produktverteilung nach zehnmütiger Photolyse ist in Tabelle 7.1 dargestellt. Als Kontrollexperimente wurden Photolysen mit *trans,syn*- und *cis,syn*-Thymindimeren ohne photoaktive Gruppe ausgeführt. In diesen Fällen kam es zu keiner Spaltungsreaktion.

			
<b>Lösungsmittel</b>	<b>Wellenlänge</b>	<b>105 / 104</b>	<b>Ausbeute</b>
MeOH	320 nm	1 : 30	65%

**Tabelle 7.1:** Produktverteilung bei der Photolyse von **103**.

Bei einer Gesamtausbeute von 65% liegt das Verhältnis von ungespaltenem Dimer **104** zu gespaltenem Monomer **105** bei 30 : 1. Effektiv bedeutet dies, dass die Ausbeute der Cycloreversion bei 2.5% liegt. Dieser Wert muss unter zwei besonderen Gesichtspunkten interpretiert werden. Für das Photolyseexperiment wurde das *trans,syn*-Dimer verwendet. Dieses Isomer besitzt ein negatives Redoxpotential als das *cis,syn*-Dimer ( $E_{\text{red}} = -2.21$  V).<sup>[104c]</sup> Spaltungsexperimente mit Elektronendonoren zeigten auch, dass das *cis,syn*-Isomer wesentlich leichter und schneller gespalten wird. In verschiedenen Untersuchungen wurde ein Faktor zwischen zwei und vier ermittelt. Die Spaltausbeute für eine *cis,syn*-Modellverbindung dürfte daher bei 10-12% liegen.



**Abb. 7.1** Chromatogramm der Photolysereaktion von Thymindimer-Modifikation **103**.

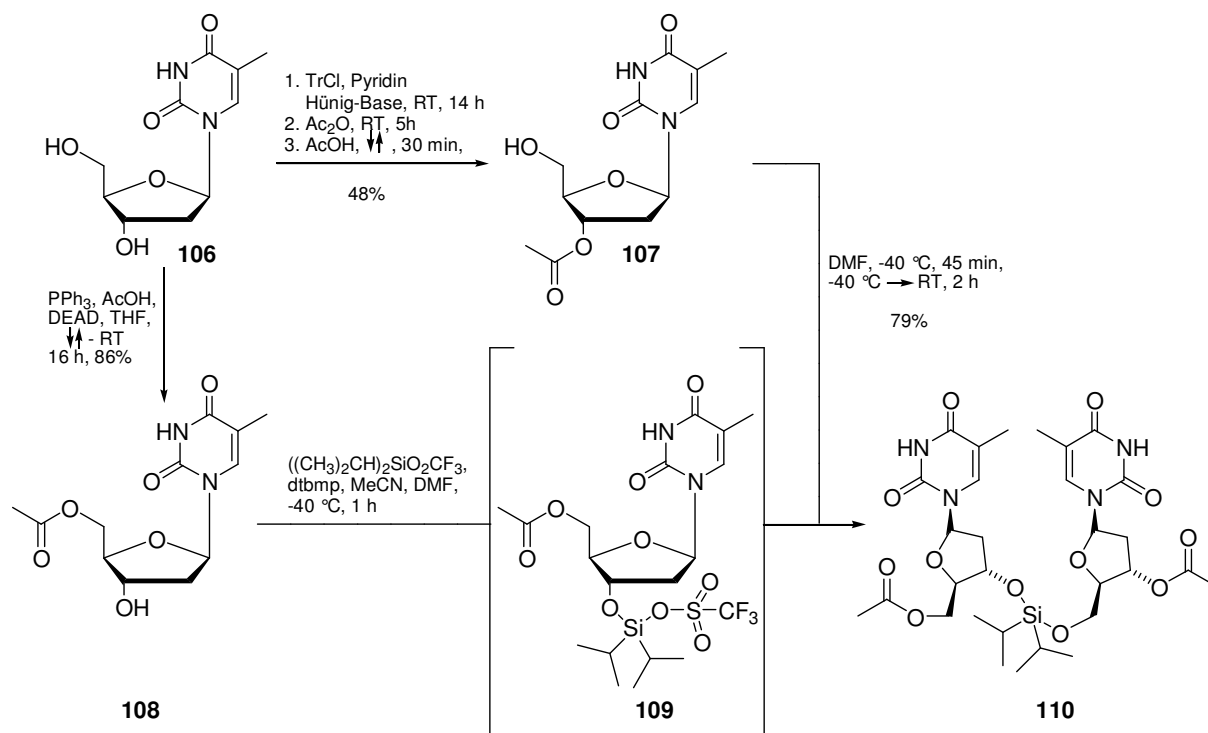
Desweiteren wird in diesem Modellsystem nur ein Elektron injiziert. Die Spaltung des Cyclobutanrings ist folglich das Ergebnis von einem einzigen Injektionsschritt und nicht von mehreren wie bei den Experimenten von Carell et al. mit regenerierbaren Photoinjektoren.<sup>[104b]</sup> Bei diesen Untersuchungen wird das Flavin als Elektronendonator permanent im reduzierten, deprotonierten Zustand gehalten, so dass eine große Anzahl von Elektronenübertragungen möglich ist, was zu einer erhöhten Ausbeute führt. Aus diesem Grund sollte die Spaltausbeute von 2.5% im Modellsystem **103** mit entsprechenden Quantenausbeuten verglichen werden. Carell und Mitarbeiter ermittelten eine Quantenausbeute von  $\Phi = 2.1\%$  für ein *cis,syn*-Thymindimer, das an ein Flavinderivat gekuppelt ist. Für das entsprechende *trans,syn*-Isomer wurde ein Wert von  $\Phi = 0.3\%$  bestimmt.<sup>[104c]</sup> Das *trans,syn*-Isomer ist somit zehnmal stabiler gegenüber einer Spaltungsreaktion als das *cis,syn*-Isomer. Ähnliche Unterschiede bezüglich der Quantenausbeute wurden auch in Uracil-Systemen mit unterschiedlicher Stereochemie erhalten. Verglichen mit diesen Werten ist die direkte Spaltausbeute von 2.1% bei der *trans,syn*-Modellverbindung **103** beachtlich, und sie zeigt, dass die *tert*-Butyl-Keton-Einheit nach Lichtanregung in der Lage ist, nicht nur die Nukleobase Thymin sondern auch das Thymindimer zu reduzieren und dieses als Folge der Reduktion zu spalten. Die photochemische Untersuchung demonstriert daher sowohl die ausgeprägten Elektronendonorfähigkeiten des Pivaloyl-Injektorsystems als auch die Tauglichkeit des Thymindimers als Elektronenakzeptor. Die Kombination beider Systeme eröffnet somit die Möglichkeit der selektiven Elektroneninjektion in DNA und die chemische Detektion des Elektronentransfers im DNA-Duplex über die Cycloreversion des Pyrimidin-Dimers.

## 7.4 Synthese des Thymidindimer-Bausteins<sup>[105]</sup>

Für Elektronentransferexperimente im DNA-Duplex benötigte man ein modifiziertes Nukleosid des Thymidindimers als Detektionssystem. Diese spezielle Modifikation wurde von Carell und Mitarbeitern entwickelt. Obwohl bereits eine Vielzahl an Thymidindimer-Festphasensynthese-Bausteinen existierte, bot sich die Synthese einer neuen Modifikation an, da diese über besondere Eigenschaften verfügen sollte. Bei allen bisher dargestellten Cyclobutan-Thymidin-Dimeren, die für den Einbau in die DNA konzipiert wurden, waren die Zuckereinheiten entweder über eine Phosphat- oder eine Acetalgruppe verbunden. Das besondere an dieser neuen Verbindung war, dass das Cyclobutan-Thymidindimer im

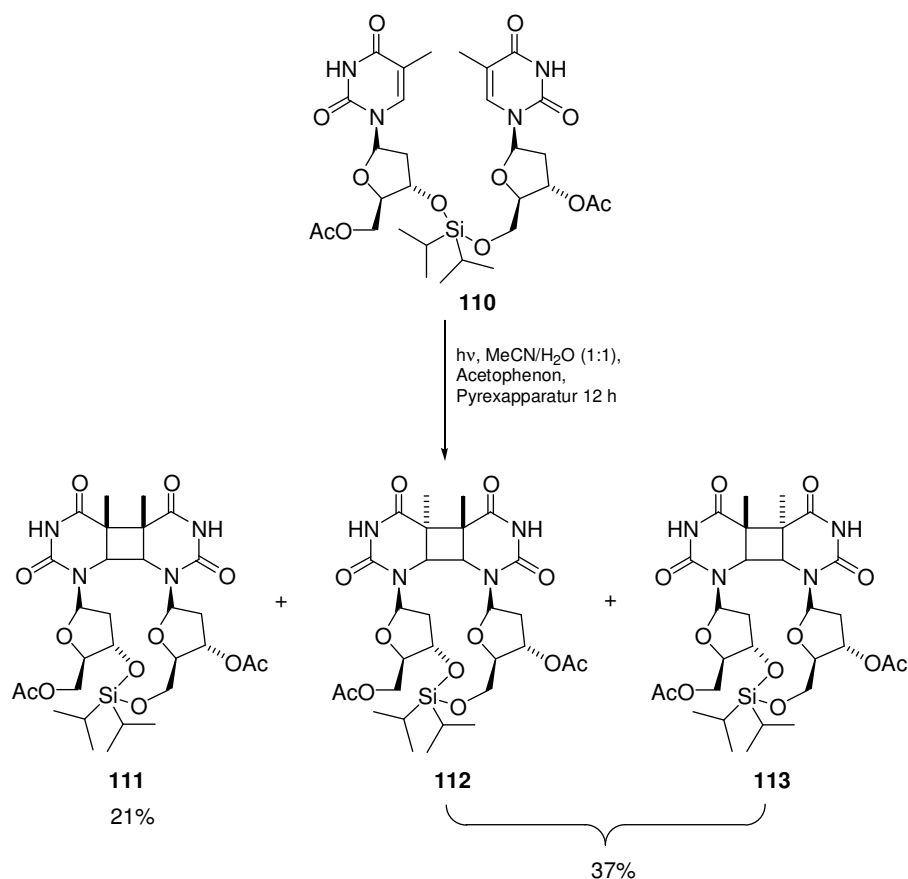


Oligonukleotid nicht über die Zuckereinheiten verknüpft war. Dies sollte zu einer einfacheren Analytik des Elektronentransferprozesses in DNA beitragen. Zur Darstellung dieser Dimere wurden verknüpfte Dinukleotide wie **110** belichtet (Schema 7.5). Ausgehend von 2'-Desoxythymidin wurde zunächst eine modifizierte *Mitsunobu-Reaktion* nach He und Bischofberger durchgeführt, die zum 5'-Acetylthymidin **108** führte.<sup>[106]</sup>



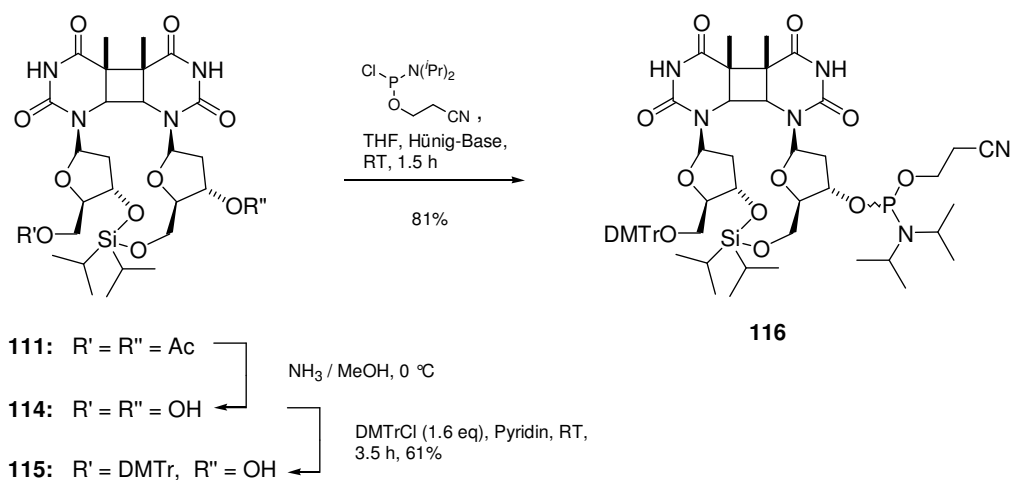
Schema. 7.5 Darstellung des silylverknüpften Thymidinnukleotids **110**.

Für die Kupplung zu **110** war auch 3'-Acetylthymidin **107** nötig, welches aus 2'-Desoxythymidin durch Umsetzung mit Tritylchlorid und Essigsäureanhydrid sowie anschließendem Erhitzen in Essigsäure erhalten werden konnte. Die Kupplung erfolgte durch langsames Zutropfen von 5'-Acetylthymidin in DMF bei -40 °C zu Diisopropylbis(trifluoromethansulfonat) in Acetonitril, wobei dieses Intermediat nicht isoliert wurde. Durch Belichtung mit einer Hg-Mitteldruck-Lampe von **110** wurden neben dem *cis,syn*-Dimer **111** auch die *trans,syn*-Isomere **112** und **113** hergestellt (Schema 7.6). Im Gegensatz zur Bestrahlung des modifizierten Thymin Monomers war das *cis,syn*-Dimer in diesem Falle mit 21% das Hauptprodukt. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen gelang mit einer Lösung von Ammoniak in trockenem Methanol (über 4 Å Molsieb) bei 0 °C. In wässrigem Ammoniak war das *cis,syn*-Dimer nur kurze Zeit stabil und die Acetylgruppen wurden nur teilweise abgespalten. Ferner kam es unter diesen Bedingungen zur partiellen Abspaltung der Silylgruppe.



**Schema. 7.6** Belichtung von **110** mit den drei gebildeten Isomeren.

Die anschließende Dimethoxytritylierung bereitete ähnliche Probleme wie die Tritylierung des modifizierten Thymidins (Kapitel 4.3). Bei 1.5 Äquivalenten Dimethoxytritylchlorid kam es zu einer ungenügenden Umsetzung, und bereits 1.7 Äquivalente führten zu einer doppelten Tritylierung an 3'- und 5'-Position. Die abschließende Synthese des Phosphoramidits gelang nach Standardmethoden und lieferte den Baustein **116** für die DNA-Festphasensynthese.



**Schema. 7.7** Darstellung des Phosphoramidits **116** als Baustein für die DNA-Festphasensynthese.

## 8 Thymidin-Radikalanion als intermediärer Ladungsträger

### 8.1 Laserspektroskopische Untersuchungen

Die ersten Radiolyse-Experimente postulierten bereits einen reduktiven Elektronentransport über die Basen Thymin und Cytosin. Aufgrund der erhöhten Elektronenakzeptoreigenschaften und des weniger negativen Redoxpotentials sollten sie als intermediäre Ladungsträger wie Relaisstationen für die Überschusselektronen fungieren. Während dieses Hopping-Prozesses entstehen demnach Thymidin-Radikalanionen. Diese Intermediate konnten bisher nur in Radiolyseexperimenten mittels spektroskopischer Methoden sichtbar gemacht werden. Visscher und Mitarbeiter erhielten ein Absorptionsspektrum nach Angriff hydratisierter Elektronen auf eine Mischung aus Thymidin-5'-monophosphat (TMP) und Adenin-5'-monophosphat (AMP) durch  $\gamma$ -Puls-Radiolyse.<sup>[107]</sup> Dabei kam es zu einem Elektronentransfer von der Purinbase auf die Pyrimidinbase was in der Bildung eines Pyrimidin-Radikalanions resultierte.

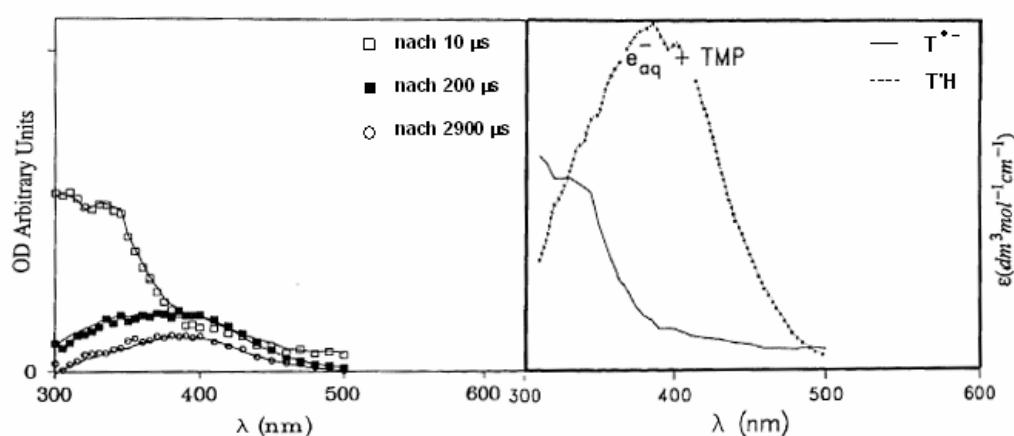
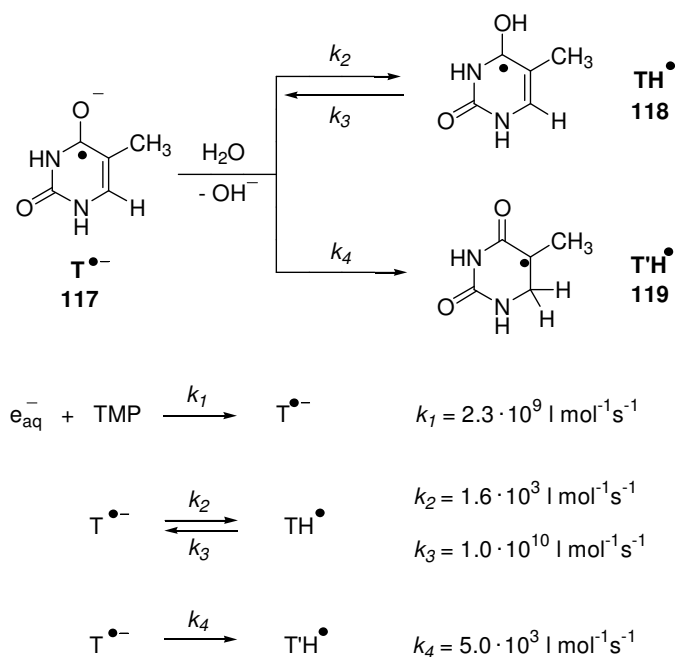


Abb. 8.1 Absorptionsspektrum des T-Radikalanions nach Puls-Radiolyse.

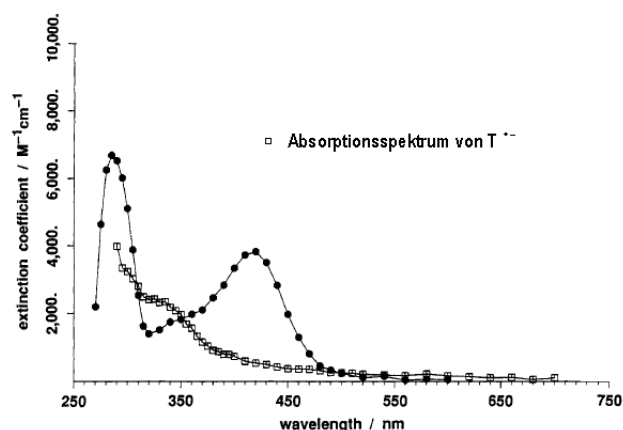
Das Spektrum des Thymin-Radikalanions weist bis auf den starken Abfall zwischen 300 und 400 nm keine charakteristischen Banden auf. Der Elektronentransferprozess bei der Elektroneninjektion in Thymin erfolgt nach einer Reaktion pseudoerster Ordnung, die von einer Zerfallsreaktion zweiter Ordnung für die Thyminradikale begleitet wird. Bei Mischungen von Adenin- und Thymidinmodifikationen wurde ein bimolekularer Elektronentransferprozess mit der Pyrimidineinheit als ultimativem Elektronenakzeptor gefunden.

Mit Hilfe kinetischer Modelle konnten nach Auswertung der Spektren die Geschwindigkeiten der verschiedenen Prozesse ermittelt werden (Schema 8.1). Für die Geschwindigkeitskonstanten ist der pH-Wert von großer Bedeutung, so dass eine Protonierung des Radikalanions zu den neutralen Radikalen **TH<sup>•</sup>** und **T'H<sup>•</sup>** führen kann.



**Schema 8.1** Geschwindigkeitskonstanten bei der Bildung des Thymin-Radikalanions und den Folgeprozessen.

Die Radiolyseexperimente von Steenken et al. lieferten ebenfalls ein Absorptionsspektrum des Thymidin-Radikalanions (Abb. 8.2).<sup>[43]</sup> Die Abnahme der Absorption im Bereich von 300-350 nm wird dem Elektronenangriff auf die starke Absorptionsbande des ursprünglichen



**Abb. 8.2** Absorptionsspektrum des T-Radikalanions nach Puls-Radiolyse.

Pyrimidins zugeschrieben. Bei der Bildung des Radikals nimmt die Absorption aufgrund der verloren gegangenen Aromatizität ab, so dass  $\lambda_{\text{max}}$  der Elektronenaddukte unter 300 nm liegt. Es wurde beobachtet, dass die Absorption im Bereich zwischen 300 und 350 nm weiter abnimmt, wenn der pH-Wert von 10 auf 5 erniedrigt wird.

Dies hängt mit einem Gleichgewicht zwischen Protonierung und

Deprotonierung (vgl. Schema 8.1) zusammen. Die abnehmende Elektronendichte im protonierten **TH<sup>•</sup>**-Radikal **118** verursacht auch die Abnahme der Absorption. Die Bildung des

Thymidin-Radikalanions erfolgte durch diese Experimente unselektiv durch Radiolyse. Bisher ist es noch nicht gelungen, ein ortsselektiv generiertes Thymidin-Radikalanion als intermediären Ladungsträger nachzuweisen.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit laserspektroskopische Untersuchungen mit dem Elektroneninjektorsystem **59** durchgeführt, um Hinweise für die Existenz eines Radikalanions unmittelbar nach photochemischer Anregung zu bekommen. Hierfür wurde mit dem Laser bei 308 nm in eine 30  $\mu\text{M}$  Lösung von **59** in Methanol eingestrahlt. Obwohl in einem Reaktionsprozess erster Ordnung ein Radikal gebildet wurde, ließ das Absorptionsspektrum keinerlei Interpretation über die Art der neu gebildeten Spezies zu (Abb. 8.3).

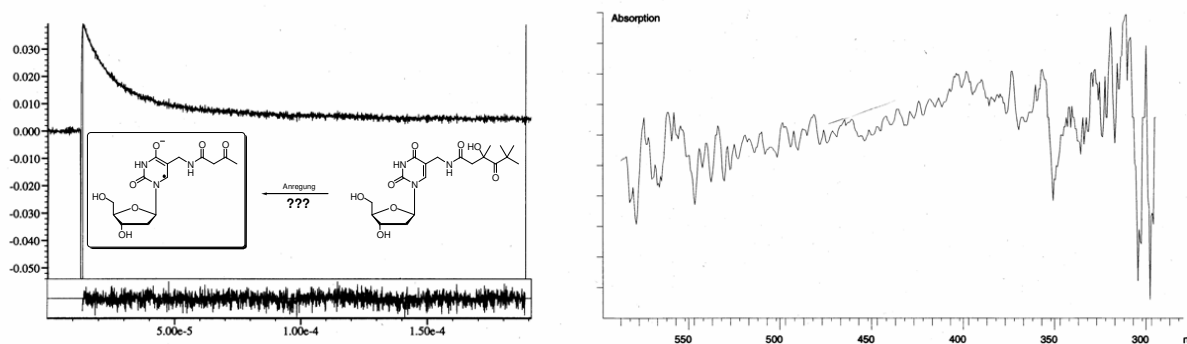


Abb. 8.3 Bildung einer neuen reaktiven Spezies und aufgenommenes Absorptionsspektrum nach Laserpuls.

Der Grund liegt in der starken Absorption des ursprünglichen Pyrimidins. Das Hauptmaximum befindet sich zwar bei  $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ , jedoch ist die Absorption bei 308 nm

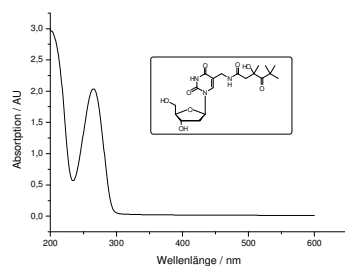


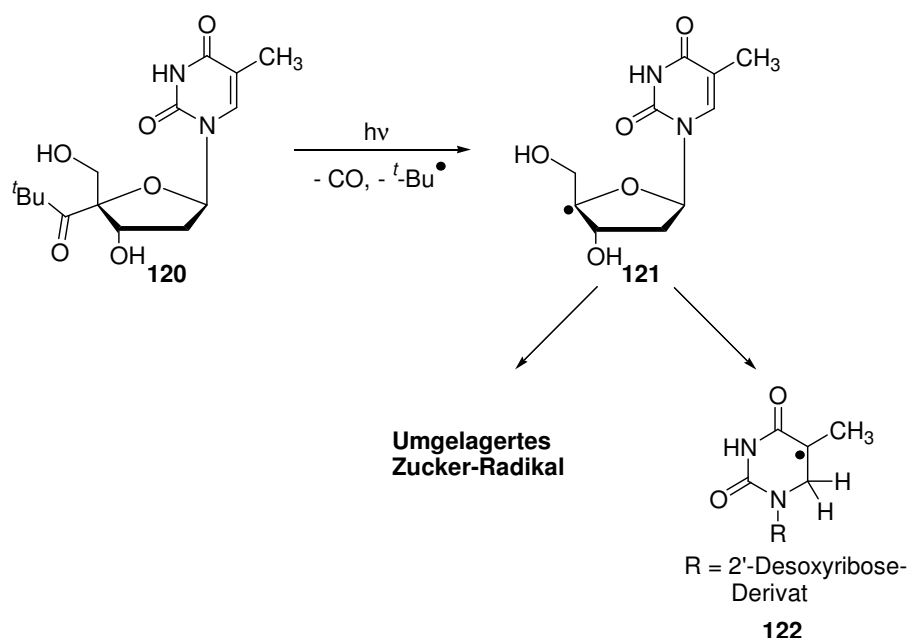
Abb. 8.4 UV-Spektrum von **59**.

immer noch stärker als die des Pivaloylsystems als photoaktive Gruppe. Der Extinktionskoeffizient des Ketons liegt bei einem Wert von  $\epsilon = 30$  und ist damit um den Faktor 3000 kleiner als derjenige des Pyrimidins. Eine Einstrahlung bei einer Wellenlänge in einem Bereich über 330 nm, in dem die Absorption des Pyrimidins nur noch sehr klein ist, würde die *Norrish*-Spaltungsreaktion unterbinden, die nur bei Wellenlängen  $\lambda < 330 \text{ nm}$  gute Ausbeute liefert. Die

Untersuchungen lieferten zwar Hinweise für das Vorliegen eines intermediären Radikals, letztendlich war die Detektion des Thymidin-Radikalanions mit dieser Methode nicht möglich.

## 8.2 ESR-spektroskopische Untersuchungen

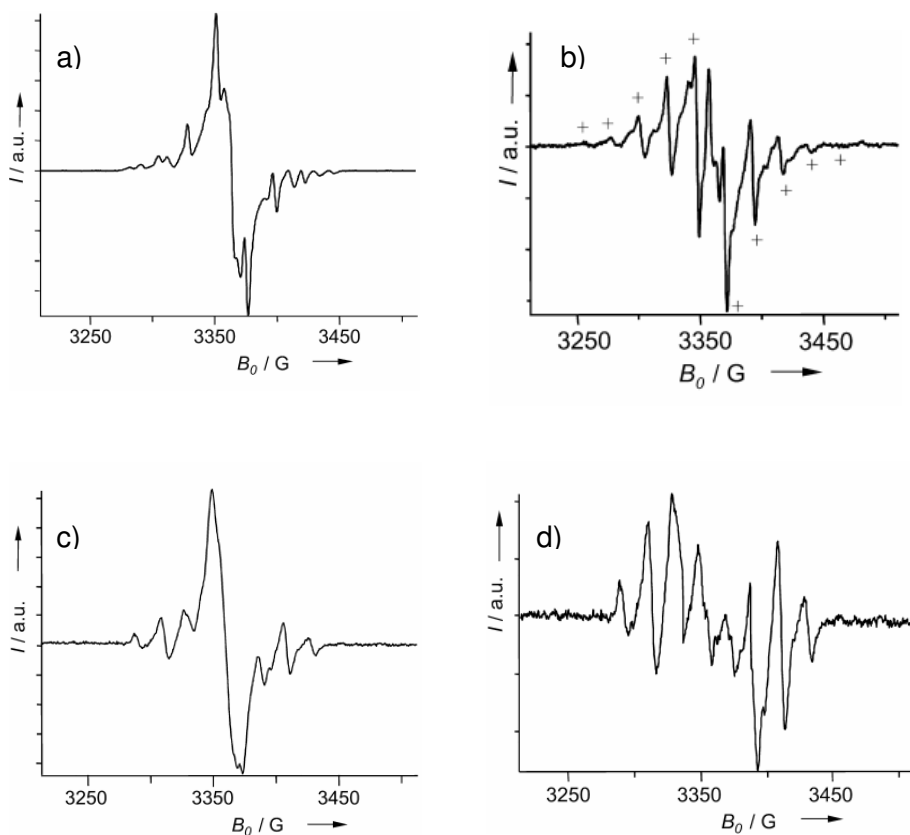
Obwohl bereits einige spektroskopische Untersuchungen zur selektiven Ladungsinjektion eines Überschusselektrons in DNA durchgeführt wurden,<sup>[108]</sup> konnten bisher nur die Folge- oder Endprodukte der Ladungsübertragung detektiert werden, nicht aber die postulierten Intermediate. Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz war es O. Schiemann zum ersten Mal möglich, das neutrale Thymyl-Radikal **122** durch selektive Ladungsinjektion nachzuweisen.<sup>[109]</sup> UV-Bestrahlung des 4'-Pivaloyl-substituierten Thymidins **120** führt zur homolytischen C-C-Bindungsspaltung an der 4'-Position und anschließend zu einem protonengekoppelten Elektronentransfer vom zunächst gebildeten Kohlenhydrat-Radikal **121** auf die Thymin-Nukleobase (Schema 8.2).



**Schema 8.2** Generierung des 4'-Radikals **121** und anschließende Bildung des Thymyl-Radikals **122** und eines umgelagerten Zucker-Radikals.

Die Experimente wurden mit 20 mM Lösungen des Thymidin-Derivates **120** in Acetonitril bei 77 K mit einem 320 nm Filter durchgeführt. Nach 200 s Photolyse konnte ein 165-G breites ESR-Spektrum erhalten werden, das sich aus mehreren Radikalspezies zusammensetzte und von dem das bekannte 10-Linien-Spektrum des *tert*-Butyl-Radikals mit einer Aufspaltung von 22.7 G herausgefiltert werden konnte (Abb. 8.5).<sup>[110]</sup> Um das Signal des überlagerten, wasserempfindlichen *tert*-Butyl-Radikals zu unterdrücken, erfolgten die Messungen auch in Wasser bei 80 K und bei 4 K. Bei der höheren Temperatur wurde ein 8-Linien-Spektrum mit einer Aufspaltung von 20.4 G erhalten. Bei 4 K wurde ein Spektrum erhalten, in welchem nur noch der intensive Zentralbereich vorhanden war und das nach Subtraktion vom

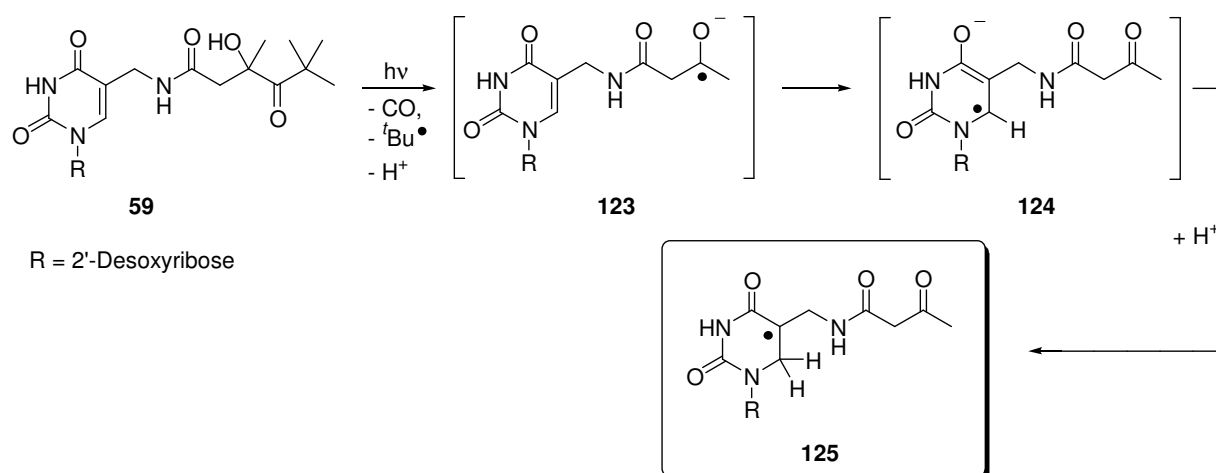
Zentralbereich des Spektrums bei 80 K das sogenannte "Oktett-Fingerabdruck"-Spektrum des Thymyl-Radikals lieferte.<sup>[111]</sup>



**Abb. 8.5** a) ESR-Spektrum einer 20 mM Lösung von **120** in MeCN bei 77 K. b) 10-Linien-Spektrum des *tert*-Butyl-Radikals. c) ESR-Spektrum der Photolyse-Produkte von **120** in Wasser bei 80 K. d) 8-Linien-Spektrum des Thymyl-Radikals.

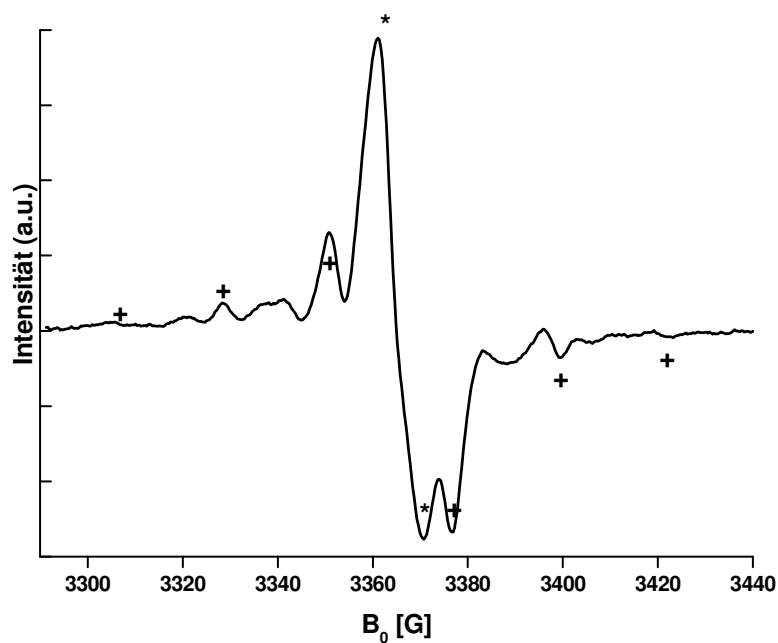
Die Zuordnung des 8-Linienspektrums für das Thymylradikal wurde durch die Löschung des Oktetts bei Zugabe eines Elektronenfängers wie  $K_3[Fe(CN)_6]$  unterstützt, der die Bildung von Thymin-Radikalanionen oder Thymyl-Radikalen unterbindet. Diese Experimente zeigten, dass durch photochemische Anregung eines mit einer Pivaloyl-Gruppe modifizierten Thymidin-Derivats intermediär ein Thymin-Radikalanion entsteht, das nach Protonierung Thymyl-Radikal **122** liefert. Die Frage, ob beim Injektionssystem **59**, in welchem die Pivaloyl-Gruppe direkt an der Nukleobase sitzt, nach Photolyse ebenfalls das Thymidin-Radikalanion gebildet wird und somit ein Nachweis für die Elektroneninjektion in die Nukleobase Thymin erhalten wird, sollte durch entsprechende ESR-Untersuchungen beantwortet werden.

Hierfür wurde eine 20 mM Probe von **59** in Acetonitril bei 80 K unter Verwendung eines 320 nm Filters bestrahlt und man erhielt das in Abb. 8.6 dargestellte ESR-Spektrum.<sup>[99]</sup>



**Schema 8.3** Generierung des Thymidin-Radikalanions **124** und anschließende Bildung des Thymyl-Radikals **125**.

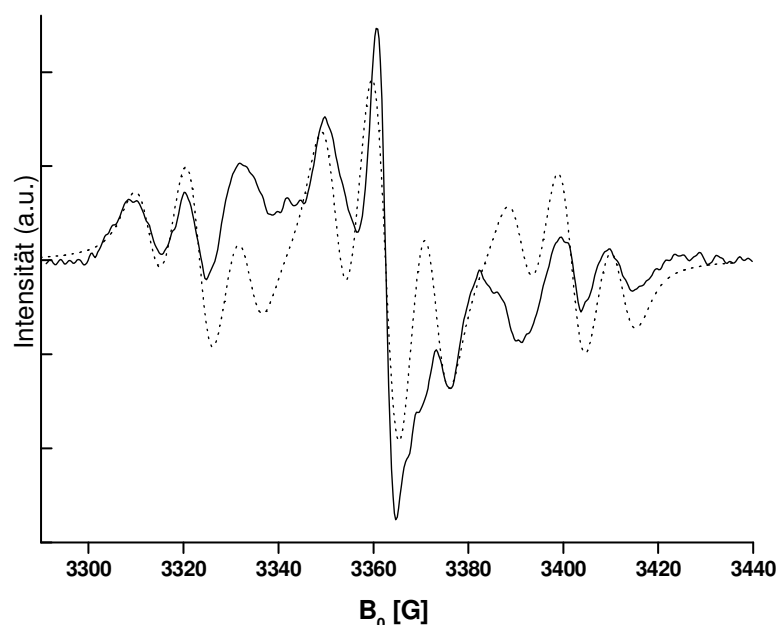
Basierend auf der Analyse des ESR-Spektrums des 4'-Pivaloylsubstituierten Thymidins konnte der Zentralbereich des Spektrums, der mit einem Stern (\*) markiert ist, dem Primäradikal **123** zugeordnet werden. Die mit einem (+) markierten Linien sind auf die Existenz eines *tert*-Butyl-Radikals zurückzuführen. Beide Radikale werden durch die *Norrish I* Spaltungsreaktion von **59** gebildet.



**Abb 8.6** ESR-Spektrum von **59** in MeCN nach Bestrahlung bei 77 K. Die mit (\*) markierte Linie repräsentiert das Primäradikal **123**, die mit (+) gekennzeichneten Linien charakterisieren das *tert*-Butyl-Radikal.



Nach Simulation der Spektren beider Spezies und anschließender Subtraktion vom Spektrum in Abb. 8.6 wurde ein ESR-Spektrum erhalten, welches sich überwiegend mit einem experimentell erhaltenen Spektrum (Abb. 8.7) deckt, das nach zweiwöchiger Messung der Verbindung **59** bei 77 K erhalten wurde. So konnte demonstriert werden, dass sowohl das *tert*-Butyl-Radikal als auch das Kohlenhydrat-Radikal Bestandteil des Spektrums in Abb. 8.6 sind und mit der Zeit zerfallen. Das experimentell erhaltenene Spektrum in Abb. 8.7 zeigt nicht das typische Oktettmuster des Thymyl-Radikals wie es im Falle des 4'-Pivaloylmodifizierten Thymidin beobachtet wurde, was durch die unterschiedliche Struktur der jeweiligen Radikale erklärt werden kann. Das Oktettmuster des üblicherweise beobachteten Thymyl-Radikals entsteht durch Hyperfeinkopplungen der Wasserstoffatome an der C-6 Position und der 5-Methylgruppe. Da in Verbindung **59** eines der Wasserstoffatome der Methylgruppe durch Stickstoff ersetzt ist, sollte das ESR-Spektrum ein anderes Muster besitzen. Unter der Voraussetzung von zwei äquivalenten Wasserstoffkernen und einem Stickstoffkern konnte ein Spektrum simuliert werden, das exakt dem experimentell beobachteten entsprach. Die Hyperfeinkopplungen von 39.2 G für die Wasserstoffatome an C-6 Position und 10.5 G für die Methylgruppe waren nahezu identisch mit den Werten eines unsubstituierten Thymyl-Radikals in gefrorener Lösung.<sup>[112]</sup>



**Abb 8.7** ESR-Spektrum von **59** in MeCN nach zwei Wochen bei 77 K. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Simulation mit zwei Wasserstoff- und einem Stickstoffatom.

Um nachzuweisen, dass es sich bei der Bildung der Thymyl-Radikals um einen intramolekularen Prozess handelt, wurde ein Kontrollexperiment mit unmodifiziertem

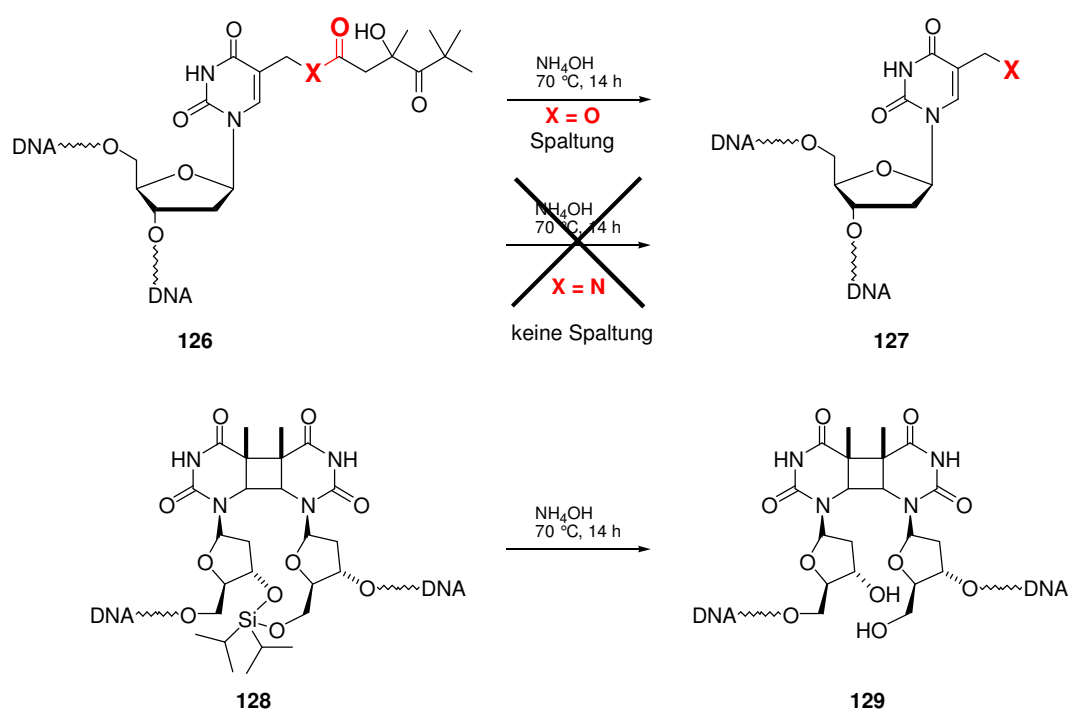
Thymin in Gegenwart von Di-*tert*-butylketon durchgeführt. Dabei entstanden lediglich *tert*-Butyl-Radikale. Auch bei alleiniger Photolyse von Thymin wurde kein Signal erhalten, so dass eine Radikalgenerierung als Folge von direkter UV-Schädigung ausgeschlossen werden konnte. Die Beobachtung des Thymyl-Radikals konnte dementsprechend auf einen protonengekoppelten Elektronentransfer des intermediär gebildeten Radikalanions **123** auf die Thymin-Nukleobase zurückgeführt werden. Durch diese Experimente war es möglich, das beim Elektronentransfer durch die DNA postulierte Intermediat mit ESR-spektroskopischen Methoden "sichtbar" zu machen. Dies gelang zum erstenmal für die Elektroneninjektion eines einzelnen Elektrons an einer definierten Stelle. Somit konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass das Elektroneninjektorsystem **59** nach photochemischer Anregung in der Lage ist, ein Elektron auf die Nukleobase Thymin zu übertragen.

## 9 Ladungstransfer in DNA

### 9.1 Die Modifikationen T\* und T-Dimer im DNA-Duplex

#### 9.1.1 Einleitung

Zur Untersuchung des Transports eines Überschuss-Elektrons im DNA-Duplex wurden verschiedene Stränge, die sowohl ein modifiziertes Thymidin als Elektroneninjektor als auch ein modifiziertes Thymidindimer als Elektronenakzeptor enthielten, hergestellt. Die zwei DNA-Bausteine mussten hierfür bestimmte Anforderungen erfüllen, da die chemischen Reaktionen während der Festphasensynthese unmittelbaren Einfluss auf die Phosphoramidite ausüben.



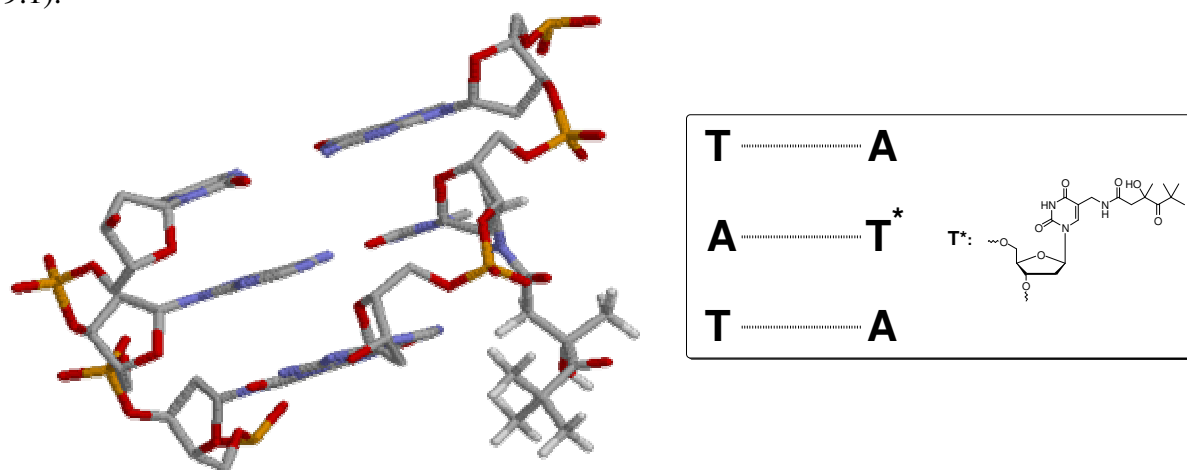
**Schema 9.1** Einfluss der Ammoniak-vermittelten Abspaltung des Oligonukleotids vom Träger. Die Amidgruppe übersteht diese Bedingungen im Gegensatz zur Estergruppe. Beim Thymidindimer führt die Entfernung der Silylschutzgruppe zum "offenen" Dimer.

Nach der Synthese wird das Oligonukleotid vom Träger abgespalten. Dies geschieht in wässriger Ammoniak-Lösung. Eine Esterbindung würde unter diesen Bedingungen gespalten werden. Aus diesem Grund wurde im Injektorsystem **126** die Seitenkette über eine Amidbindung an die Nukleobase verknüpft. Die Bedingungen für die Festphasenentschützung

haben darüber hinaus einen wichtigen Effekt auf die Thymidindimer-Modifikation. Die verbrückende Silyl-Einheit wird gespalten, so dass einzig der Cyclobutanring das Dimer zusammenhält.<sup>[105]</sup> Für die Analyse des Elektronentransfers ist diese Tatsache von großer Bedeutung, da die spontane Cycloreversion nach erfolgtem Transport des Elektrons auf das Thymidindimer zu zwei Thymidinen und damit zum Strangbruch führt. Durch das unterschiedliche Laufverhalten der geschädigten und ungeschädigten Oligonukleotide auf Umkehrphasen-HPLC ist eine direkte Aussage über die Quantität der gespaltenen Stränge und damit über die Effizienz des Elektronentransfers möglich.

### 9.1.2 Strukturelle Merkmale der T\*- und CPD-enthaltenden Oligonukleotide

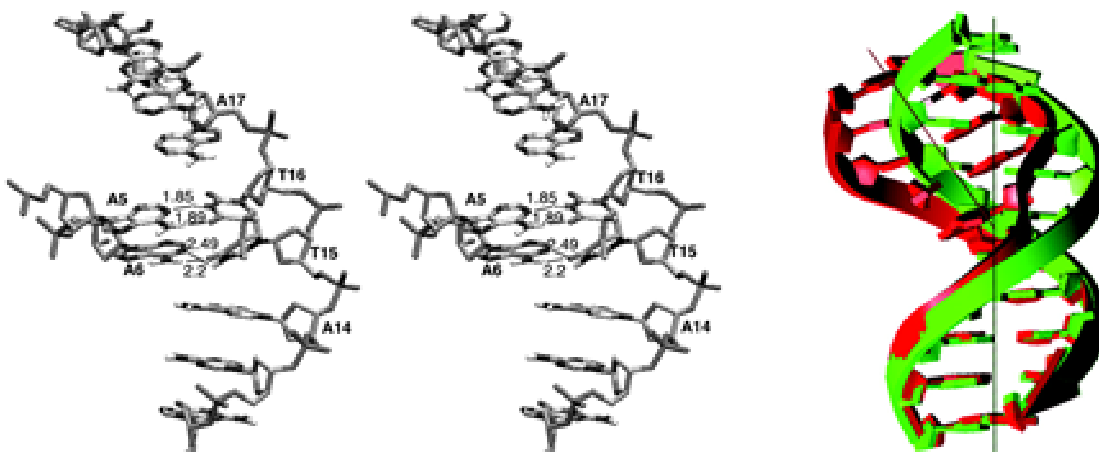
Sowohl das Thymidindimer-Derivat (CPD) als auch die Thymidinmodifikation T\* haben aufgrund ihrer sterischen Eigenschaften Einfluss auf die Struktur des entsprechenden Oligonukleotids. Die räumlich anspruchsvolle Seitenkette im Injektorbaustein steht weit ab vom Strang und könnte je nach Orientierung mit dem Rückgrat interagieren. Rechnungen konnten Aufschluss über die Ausrichtung und Position dieser Moleküleinheit geben (Abb. 9.1).



**Abb 9.1** Simulation für die Umgebung der modifizierten Base T\*. Die Seitenkette ragt in die major groove und es erfolgt keine sterische Hinderung des DNA-Rückgrats.

Die Simulationen für den entscheidenden Ausschnitt des Oligonukleotids zeigten eine sehr hohe Flexibilität der Seitenkette. Es wurde aber deutlich, dass es zu keinen Interaktionen oder sterischen Hinderungen der Pivaloylgruppe mit dem DNA-Rückgrat kommt. Die Seitenkette ragt in die große Furche (major groove) hinein, deren Platzangebot für die Fluktuationen der flexiblen Gruppe ausreichend ist, so dass die T\*-Modifikation keine Verzerrung in der Helix

hervorrufen. Die Lage und die strukturelle Umgebung des Thymidindimers (CPD) sind von besonderer Bedeutung für den Transport des Überschusselektrons. So kann beispielsweise die Verdrehung des Grundgerüsts durch die größere Spannung des Dimers im Vergleich zum Monomer in einer Richtung größer sein als in der anderen. Dies spielt für die Aufnahme des Elektrons und für das Design der für Elektronentransferexperimente zu synthetisierenden Oligonukleotide eine große Rolle. Die Kristallstrukturaufnahme eines CPD enthaltenden DNA-Stranges zeigt eine Verdrehung der helikalen Achse um  $30^\circ$  in Richtung der großen Furche (Abb. 9.2).<sup>[113]</sup>



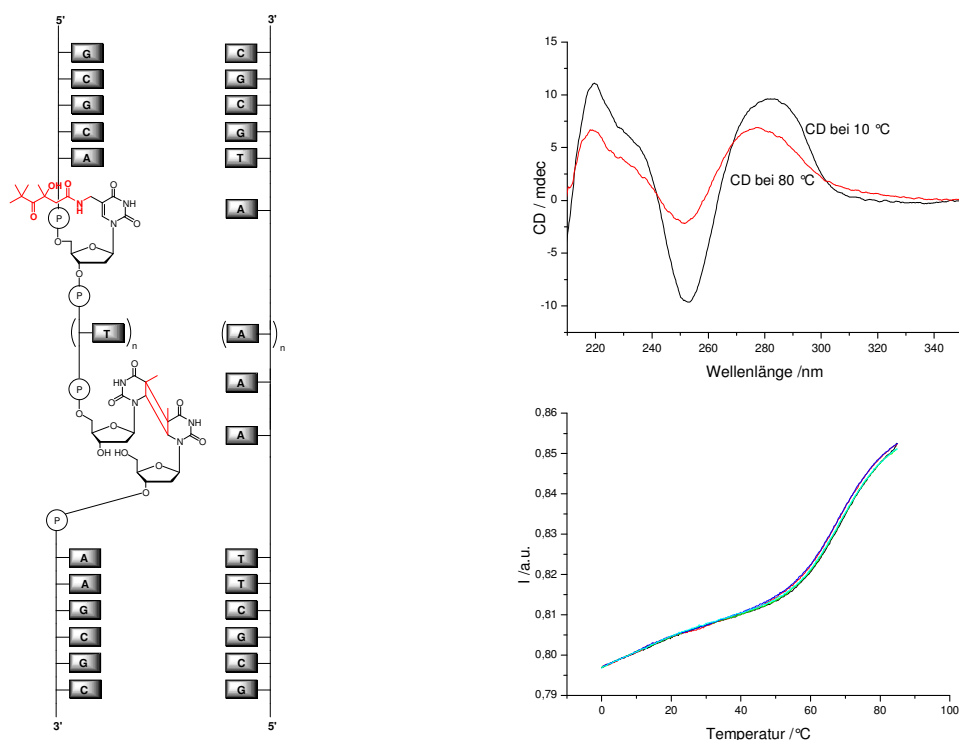
**Abb 9.2** Stereoansicht der detaillierten Umgebung der CPD-Stelle. Der Ausschnitt zeigt einen Teil der großen Furche. Das DNA-Rückgrat zeigt eine geknickte Struktur. Rechts ist der Knick der von CPD-enthaltender DNA (rot) im Vergleich zu regulärer B-DNA (grün) dargestellt.

Der Strang behält jedoch eine kontinuierliche basengestapelte und rechtshändige helikale Struktur, die sich in drei Segmente einteilen lässt: Die zentrale CPD-Einheit sowie zwei regelmäßige Teile ober- und unterhalb davon. Von besonderem Interesse sind die unterschiedlichen Deformationen an der 3'- und der 5'-Seite der Schädigung. Der Drehungswinkel des an 5'-Position benachbarten Basenpaares ist mit  $27^\circ$  sehr klein verglichen mit den üblichen  $36^\circ$ , was auf eine stark veränderte Konformation in dieser Region im Vergleich zu regelmäßiger B-DNA hindeutet. Dies wird auch durch die relativ schwache Wasserstoffbrückenbindung zum komplementären Adenin unterstrichen. Der Abstand der beiden Basen ist im 5'-Bereich um 35% größer als im 3'-Bereich. Eine Ursache dafür ist die Faltung des Dimers um  $20^\circ$  in die 5'-Richtung. In der 3'-Region zeigt das benachbarte Basenpaar einen der B-DNA ähnlichen Drehungswinkel von  $37.1^\circ$ , so dass dieser Bereich nicht von einer Konformationsänderung betroffen ist. Ein "Abschnüreffekt" sorgt aber sowohl an der 3'- als auch an der 5'-Seite der CPD-Schädigung für eine deutliche Aufweitung der großen und der kleinen Furche. Die strukturellen Änderungen an der Helix, die durch das

Thymidindimer hervorgerufen werden, sind von außerordentlicher Wichtigkeit für die Interpretation einiger Elektronentransferexperimente in Kapitel 9.3. Die unterschiedlichen Konformationen an den jeweiligen Enden der Schädigung könnten einen Einfluss darauf haben, dass ein Überschusselektron bevorzugt über die 3'-Seite auf ein Thymidindimer übertragen wird und somit ein Richtungseffekt für den Elektronentransport vorliegt.

### 9.1.3 Stabilität der Oligonukleotide

Der Einbau eines Thymidindimers in Oligonukleotide führt im Allgemeinen zu einer Destabilisierung und somit auch zur Herabsetzung des Schmelzpunktes im Vergleich zu einem analogen ungeschädigten Strang.<sup>[56]</sup> Dieser Effekt ist relativ gering, so dass die Schmelzpunkte meist nur 3-5 °C unter den Vergleichssträngen liegen. Der Effekt einer zweiten Modifikation, des 5-modifizierten Thymidin-Derivates, war bisher unklar. Zur Überprüfung, dass die hergestellten Stränge die Struktur regelmäßiger B-DNA aufweisen, wurden CD-Spektren aufgenommen. Diese zeigten ein lokales Maximum bei 280 nm und ein Minimum bei 250 nm, was in Übereinstimmung mit der Bildung der B-DNA-Struktur in Lösung ist (Abb. 9.3).

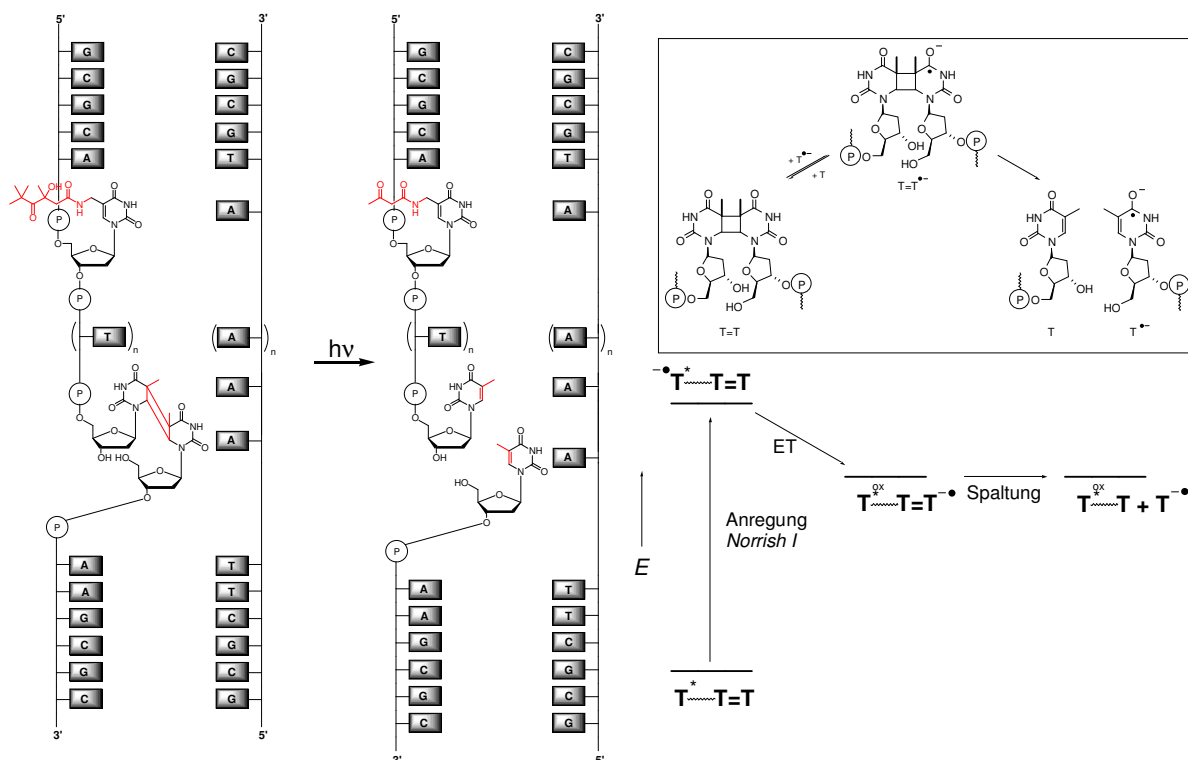


**Abb 9.3** Allgemeine Sequenz der hergestellten Oligonukleotide. Sowohl die CD-Spektren als auch die Schmelzkurven bei 260 nm bestätigen die regelmäßige Struktur einer B-DNA.

Zur weiteren Bestätigung, dass die T\* und Dimer enthaltenden Oligonukleotide stabile Doppelstränge ausbilden, wurden die Schmelzkurven bei verschiedenen Wellenlängen gemessen, wobei ein normales Schmelzverhalten ohne Hysterese zwischen der Aufheiz- und Abkühlkurve beobachtet werden konnte. Erstaunlicherweise waren die Schmelzpunkte für alle synthetisierten Duplexe sehr hoch und lagen im Bereich von 58 - 68 °C. Bei allen modifizierten Oligonukleotiden waren die Schmelztemperaturen höher als bei den analogen unmodifizierten Strängen. In manchen Fällen betrug der Unterschied bis zu 4 °C. Die T\*-Modifikation trägt somit maßgeblich zur Stabilisation der Oligonukleotide bei und übertrifft dabei noch den stabilitätsmindernden Effekt des Thymidindimers.

## 9.2 Das Konzept des reduktiven Elektronentransports

Neue Studien in den letzten Jahren konnten belegen, dass nicht nur positive sondern auch negative Ladung über längere Distanzen im DNA-Duplex wandern kann.<sup>[56-60]</sup> Einen Einblick in den Mechanismus des reduktiven Elektronentransports sollte mit dem entwickelten Injektorsystem aufgrund der ortsselektiven Freisetzung eines Elektrons gewonnen werden (Abb 9.4).



**Abb 9.4** Chemische Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA. Photochemische Anregung des Injektorsystems führt zur Übertragung eines Elektrons auf ein Thymidindimer.

Durch die Bestrahlung von T\*-modifizierten DNA-Strängen wird eine negative Ladung in Form eines Thymyl-Radikalanions generiert, was durch ESR-Experimente nachgewiesen werden konnte. Das Reduktionspotential des durch *Norrish I* Spaltung entstehenden Radikalanions ( $E_{\text{red}} = -2.50 \text{ V}$ ) ist ausreichend für die Reduktion der benachbarten Thymin-Nukleobase ( $E_{\text{red}} = -2.18 \text{ V}$ ). Ausgehend von diesem Radikalanion wandert das Überschuss-Elektron in Hopping-Schritten über eine bestimmte Anzahl von Thymin-Basen, die als intermediäre Ladungsträger fungieren, zum finalen Elektronenakzeptor, einem Thymidindimer. Der abschließende Reduktionsprozess, die Übertragung vom letzten Thymin auf das Dimer, ist leicht endergonisch bis thermoneutral, da sich die Redoxpotentiale des Thymins und des *cis,syn*-Thymindimers ( $E_{\text{red}} = -2.21 \text{ V}$ ) nur geringfügig unterscheiden.<sup>[72]</sup> Nach Elektronenaufnahme unterliegt dieses Molekül einer spontanen Cycloreversion wobei es zur Strangspaltung kommt.

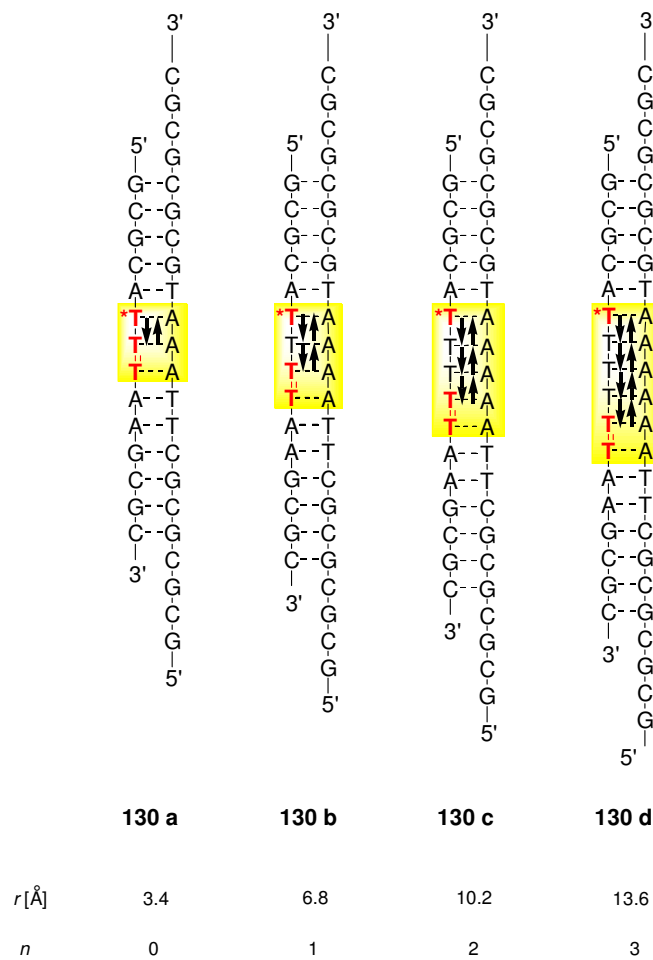
## 9.3 Ladungstransferexperimente

### 9.3.1 Distanzabhängigkeit

Zur Untersuchung des Transports eines Überschusselektrons im DNA-Duplex über unterschiedliche Distanzen wurden die in Abb. 9.5 dargestellten Doppelstränge **130 a-d** synthetisiert. Bei der Festphasensynthese wurde die T\*-Modifikation nicht im üblicherweise benutzten Acetonitril als Lösungsmittel eingebaut, da die Ausbeute in diesem Fall gering war. Bei der Verwendung von Methylenchlorid hingegen verlief die Synthese in guten Ausbeuten. Die Komplementärstränge wurden aus analytischen Gründen sowohl auf der 3'- als auch auf der 5'-Seite um jeweils drei bis vier Basen verlängert. Die Trennung und Auswertung der HPLC-Spektren wurden somit erleichtert. Die Retentionszeit eines Stranges mit beiden Modifikationen ist aufgrund der Existenz einer *tert*-Butylgruppe im T\* bis zu 10 min höher als bei unmodifizierten Strängen. Nach Abspaltung dieser Gruppe verringert sich die Laufzeit auf der Säule dementsprechend und würde mit der eines gleichlangen Gegenstranges übereinstimmen. Da dieser aber als interner Standard benötigt wurde, wurde er um jeweils vier Basen an beiden Enden verlängert. Im Strang **130 a** waren Ladungsdonor und Ladungsakzeptor unmittelbar benachbart. In den anderen Strängen erhöhte sich die Anzahl der dazwischenliegenden (A:T)-Basenpaare von eins bis drei. Die Distanz, die das Elektron während des Elektronentransfers zurücklegen musste, wuchs dadurch bis auf 13.6 Å an.



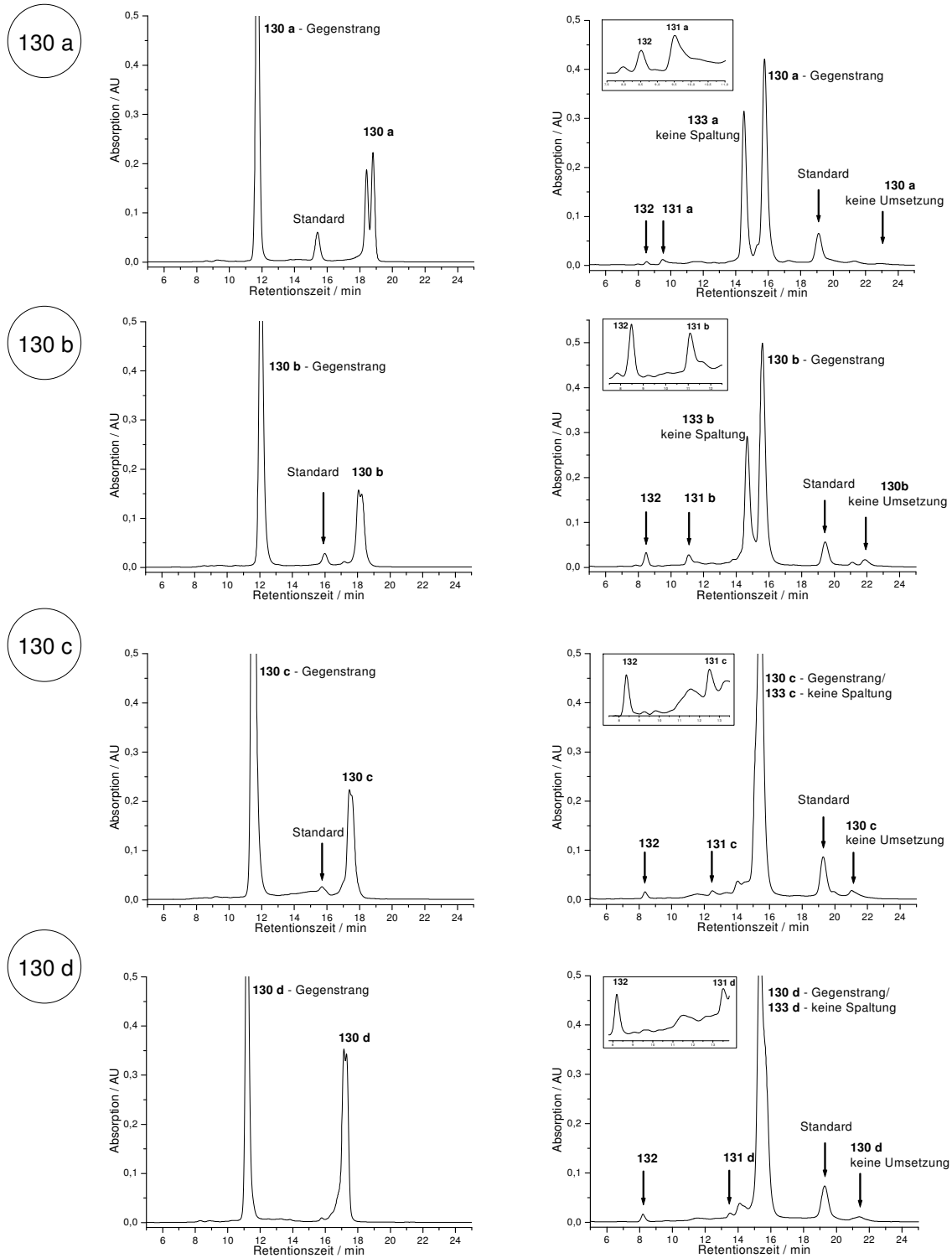
Zwischen Injektor und Detektor lagen Thymin-Basen im gleichen Strang, um zu verhindern, dass das Elektron während des Transfers den Strang wechseln muss und somit die Ausbeute des Prozesses verringert wird.



**Abb 9.5** Oligonukleotide **130 a-d** mit den Modifikationen T\* und Thymidindimer in unterschiedlicher Entfernung.

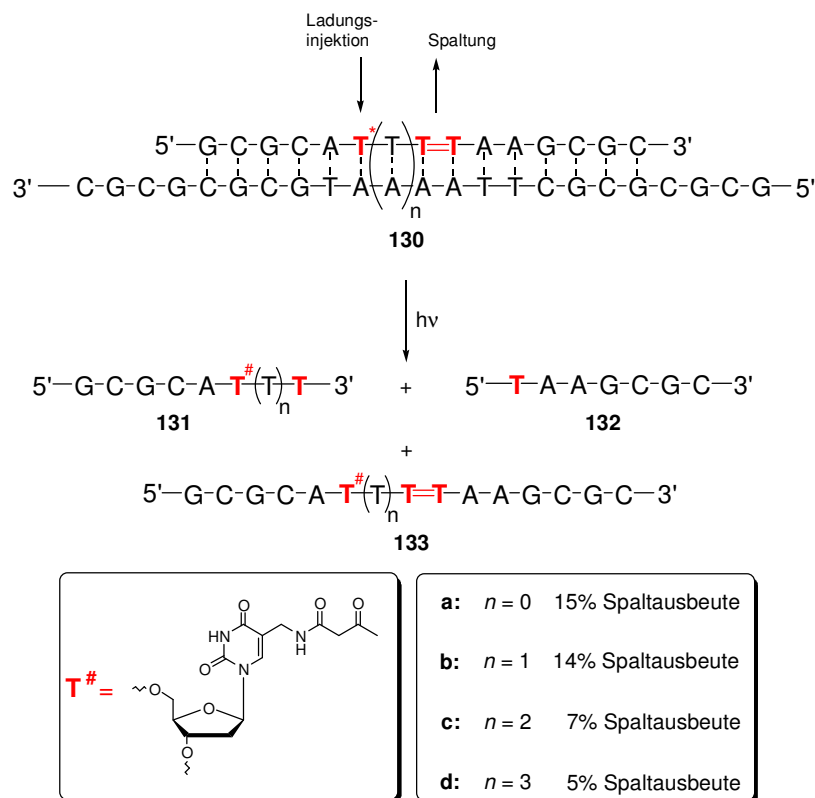
Für die Photolyse wurden die Doppelstränge in 250  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer (20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl,  $c_{\text{DNA}} = 4 \mu\text{M}$ , pH 7) gelöst. Nach Entgasen mit Argon wurden die Proben zehn Minuten unter Verwendung eines 320 nm Steilkantenfilters bei 15 °C bestrahlt. Nach erfolgter Photolyse wurde das entstandene Gemisch mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. Die jeweiligen Chromatogramme vor und nach Bestrahlung sind in Abb. 9.6 dargestellt. In allen Fällen konnte eine saubere, partielle photoinduzierte Spaltung des modifizierten Stranges ( $t_{\text{R}} > 17 \text{ min}$ ) in die beiden Fragmente **131** und **132** ( $t_{\text{R}} < 13 \text{ min}$ ) beobachtet werden. Das Hauptprodukt der Photolyse war in allen Experimenten Oligonukleotid **133**, dessen Entstehung durch die geringere Reduktionsfähigkeit des Thymidindimers im Vergleich zum Monomer erklärt werden kann. Nach erfolgter *Norrish I* Spaltung wird das Überschusselektron zwar auf das benachbarte Thymin übertragen und

damit in die DNA injiziert, jedoch wird nur ein Teil der Ladung auf das T-Dimer transferiert. Da die Übertragung vom Thymidin-Radikalanion auf das T-Dimer leicht endergonisch ist, verbleibt der größte Teil der Ladung auf dem letzten intermediären Ladungsträger und wird an die Umgebung abgegeben, so dass Strang **133**, der noch immer den Dimerschaden enthält, gebildet wird.



**Abb 9.6** HPLC-Chromatogramme der Oligonukleotide **130 a-d** vor und nach Bestrahlung. Die den Ladungstransfer nachweisenden Strang-Buchstücke sind hervorgehoben.

Die Spaltausbeute betrug 15% wenn die T\*-Modifikation und das Thymidindimer direkt benachbart waren. Sie sank von 14 über 7 zu 5% wenn die Anzahl  $n$  der (A:T) $_n$ -Basenpaare zwischen dem Injektor- und dem Akzeptorsystem von eins auf drei zunahm (Abb. 9.7). Diese Abnahme der Elektronentransferausbeute ist typisch für eine aus mehreren Hopping-Schritten bestehende Reaktion, in der das Überschusselektron zwischen benachbarten Thymin-Basen hüpft und steht im Einklang mit den Ergebnissen früherer Experimente.<sup>[58c]</sup> Erstaunlich ist die geringe Unterschied der Ausbeute für die Fälle  $n = 0$  und  $n = 1$ . Man würde für den ersten Fall eine höhere Effizienz erwarten. Die geringe Differenz kann eventuell durch Interaktion der T\*-Modifikation mit dem Thymidindimer erklärt werden. Die bereits in Kapitel 9.1.2 erwähnte strukturelle Deformation des Dimers an der 5'-Seite könnte durch Wechselwirkungen mit der Seitenkette des unmittelbar benachbarten T\* zu einer noch größeren Verzerrung des Stranges führen und somit die Elektronenaufnahme erschweren.



**Abb 9.7** Effizienz der Spaltung des Thymidindimers in den DNA Doppelsträngen **130a-d**.

Die qualitative Analyse und Identifikation der Photolyseprodukte erfolgte durch Koinjektion der unabhängig synthetisierten Oligonukleotide. Die Retentionszeiten der entsprechenden Stränge stimmten jeweils überein. Zusätzlich konnten die Spaltprodukte durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie zugeordnet werden. Diese Analysenmethode bot den Vorteil, dass kleinere Bruchstücke bessere Flugeigenschaften im Spektrometer aufwiesen und somit

eindeutig charakterisierbar waren. Als Beispiel für die MALDI-ToF-Analyse ist in Abb. 9.8 ein Massenspektrum von Doppelstrang **130 b** vor und nach der Photolyse dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die neu gebildeten Fragmente **131 b** und **132**, die infolge des Elektronentransports vom T\* auf das Thymidindimer entstanden sind.

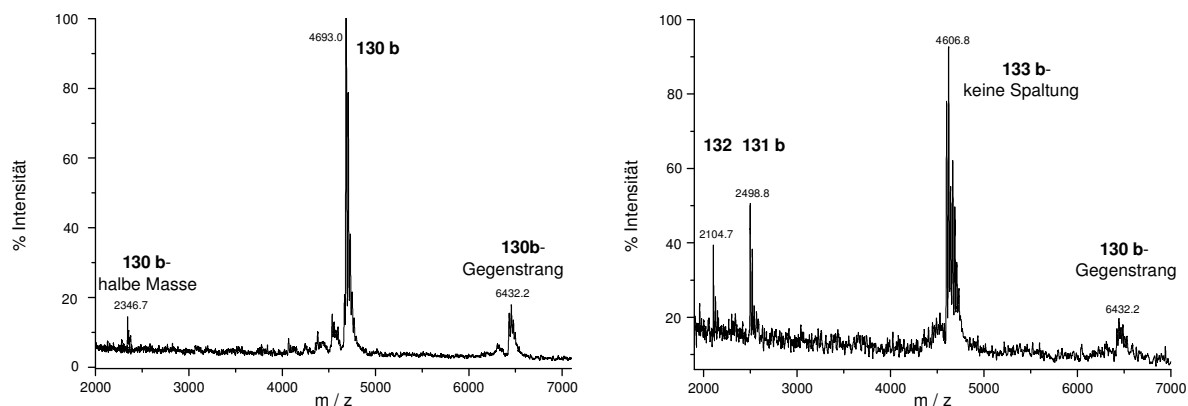


Abb 9.8 Massenspektrum des DNA-Doppelstranges **130b** vor und nach der Bestrahlung.

Um sicher zu gehen, dass die Strangspaltung durch eine intramolekulare Elektronenübertragung zustande kam, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Die Photolyse eines Thymidindimer enthaltenden Oligonukleotids ohne T\*-Modifikation führte zu keiner Strangspaltung. Ebenso wurde ein T\*-enthaltendes Oligonukleotid, das anstelle des Dimerschadens zwei Thyminе enthielt, bestrahlt. Auch in diesem Fall kam es zu keiner Strangspaltung. Im dritten Kontrollexperiment wurde der Lösung eines Dimer enthaltenden Oligonukleotids eine Lösung des T\*-Monomers hinzugefügt. Es erfolgte wiederum kein Strangbruch, so dass auch ein intermolekularer Prozess ausgeschlossen werden konnte.

Beim Vergleich der absoluten Ausbeuten mit früheren Experimenten müssen, wie beim Monomer-Experiment, die unterschiedlichen Bedingungen beachtet werden. Carell et al. erzielten mit dem Flavin-Dimer-System eine Spaltausbeute von 35% nach zehnmütiger Bestrahlung, wenn das Flavin und das Dimer im Strang benachbart waren.<sup>[56a]</sup> Dies entspricht ungefähr der doppelten Ausbeute verglichen mit den hier beschriebenen Experimenten. Die Strangspaltung wird hierbei jedoch durch die Injektion eines einzelnen Elektrons erzielt. Aufgrund des kontinuierlichen Elektronenflusses vom im permanent reduzierten Zustand befindlichen Flavin in Richtung des Thymidindimers sind die beiden Werte für die Ausbeute daher nur bedingt vergleichbar. Vielmehr muss die in dieser Arbeit erhaltene Ausbeute des Strangbruchs der Quantenausbeute aus den von Carell durchgeführten Untersuchungen gegenüber gestellt werden. Diese wurde mit 0.4% ermittelt und ist somit um den Faktor 30

kleiner als die mit dem T\* erzielten Strangbruch. Diese Daten belegen, dass es sich bei dem neu entwickelten Injektorsystem um ein effizientes Instrument zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers in DNA handelt.

### 9.3.2 Superaustausch oder Hopping ?

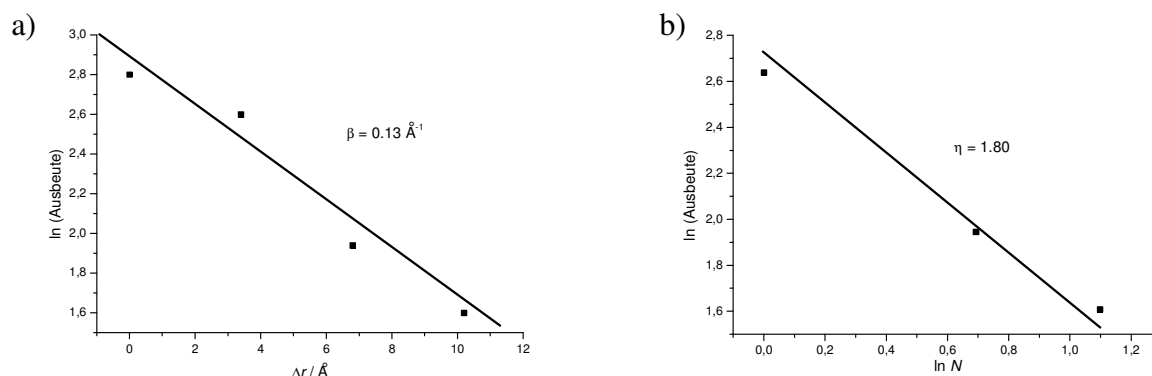
Die geringe Abnahme der Spaltausbeute lässt auf einen mehrstufigen Hopping-Mechanismus und nicht auf einen einstufigen Superaustausch-Mechanismus des Elektronentransfers schließen, was durch die zugrunde liegenden Gleichungen bestätigt werden konnte. Unter der Annahme eines direkten Transfers des Elektrons vom Donor zum Akzeptor durch Superaustausch würde die Distanzabhängigkeit der Geschwindigkeit des Ladungstransfers  $k_{CT}$  durch Gleichung 9.1 beschrieben werden.

$$k_{CT} = A \cdot e^{-\beta \Delta r} \quad (Gl. 9.1)$$

Für den Fall des mehrstufigen Elektronen-Hoppings mit Thyminen als intermediäre Ladungsträger würde die Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers durch Gleichung 9.2 beschrieben werden, wobei  $N$  die Anzahl der Hopping-Schritte ist und  $\eta$  einen Proportionalitätsfaktor darstellt, der im Idealfall einer Zufallsbewegung den Wert  $\eta = 2$  annimmt.

$$\ln(k_{CT}) = -\eta \cdot \ln(N) \quad (Gl. 9.2)$$

Die beobachteten Spaltausbeuten als  $\ln$  (Ausbeute pro 10 min) wurden sowohl gegen die Distanz  $\Delta r$  als auch gegen  $\ln(N)$  aufgetragen (Abb 9.9). Die Daten belegen, dass der reduktive Elektronentransfer über unterschiedlich große Distanzen mit ähnlicher Effizienz erfolgt. Beim ersten Diagramm wurde ein  $\beta$ -Wert von  $0.13 \text{ \AA}^{-1}$  erhalten, woraus ein Hopping-Mechanismus gefolgert werden kann, da ein  $\beta$ -Wert in dieser Größenordnung eine geringe Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers repräsentiert. Dies wird durch das zweite Diagramm bestätigt, aus dem ein schlüssiger  $\eta$ -Wert von 1.80 ermittelt wurde, der dem Idealwert von  $\eta = 2$  sehr nahe kommt.



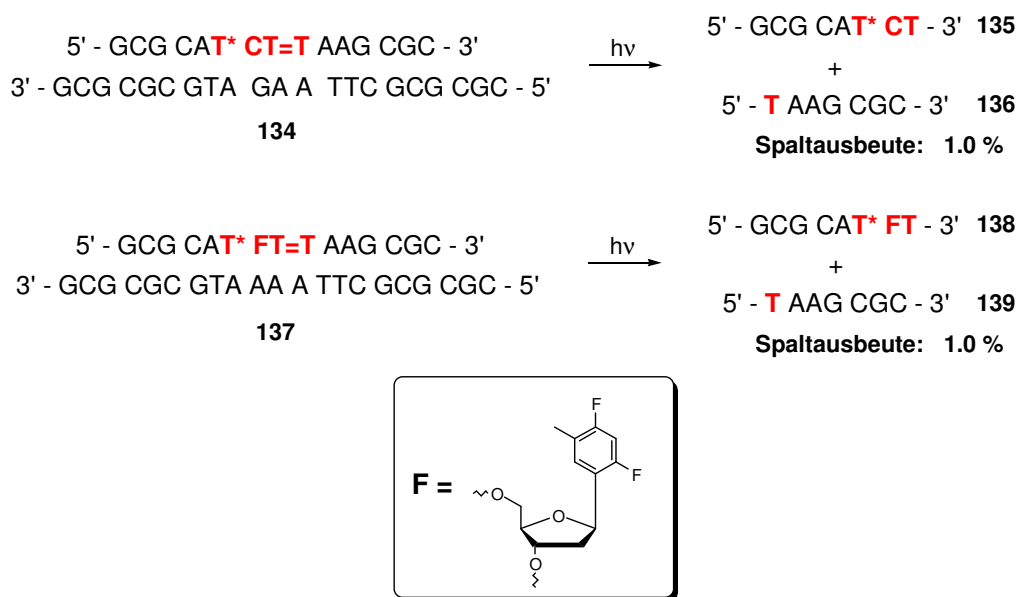
**Abb 9.9** a) Auftragung von  $\ln$  (Ausbeute Strangbruch) gegen die Distanz zwischen Injektor und Detektor. b) Auftragung von  $\ln$  (Ausbeute Strangbruch) gegen die Anzahl der Hoppingschritte  $N$ .

Die Abnahme der Ausbeute des Elektronentransfers um den Faktor drei ist folglich sehr klein unter Kenntnisnahme der Distanzerweiterung auf  $13.6 \text{ \AA}$ . Der Weg des Elektrons verlängert sich pro zusätzlichem (A:T)-Basenpaar um sechs Einfachbindungen und steigt so von 18 auf 36. Für den Fall des oxidativen Lochtransfers verringert sich die Reaktionsausbeute bei einem zusätzlichen (A:T)-Basenpaar zwischen dem "Elektronenloch" und dem nächsten Guanin um den Faktor 10.<sup>[114]</sup> Dieser Vergleich deutet darauf hin, dass Thymin ein wesentlich besserer Akzeptor für negative Ladungen ist als beispielsweise Adenin für positive Ladungen. Aus diesem Grund ist auch der Wirkungsgrad des reduktiven Elektronentransfers in solchen Sequenzen besser als der des oxidativen.

### 9.3.3 Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers

Der Transport eines Überschusselektrons vom Injektor zum Akzeptor verläuft sehr effizient unter Verwendung von dazwischen liegenden (A:T)-Basenpaaren mit Thyminen als intermediären Ladungsträgern. Der Effekt einer Sequenzänderung führte bei den Elektronentransfer-Studien je nach System allerdings zu unterschiedlichen Beobachtungen. Während Radiolyseexperimente einen weniger effizienten Elektronentransfer über (G:C)-Basenpaare nachwiesen,<sup>[47-49]</sup> konnten photochemische Untersuchungen diesen Trend nicht bestätigen.<sup>[68]</sup> Die Sequenzabhängigkeit des Transferprozesses sollte in dem in dieser Arbeit beschriebenen Donor-Akzeptor-System durch den Einbau sowohl eines (G:C)- als auch eines (A:F)-Basenpaares untersucht werden. **F** stellt hierbei eine von Kool et al. entwickelte künstliche Nukleobase dar, die Difluortoluy-Modifikation.<sup>[115]</sup> Difluortoluol **F** ist ein Isoster

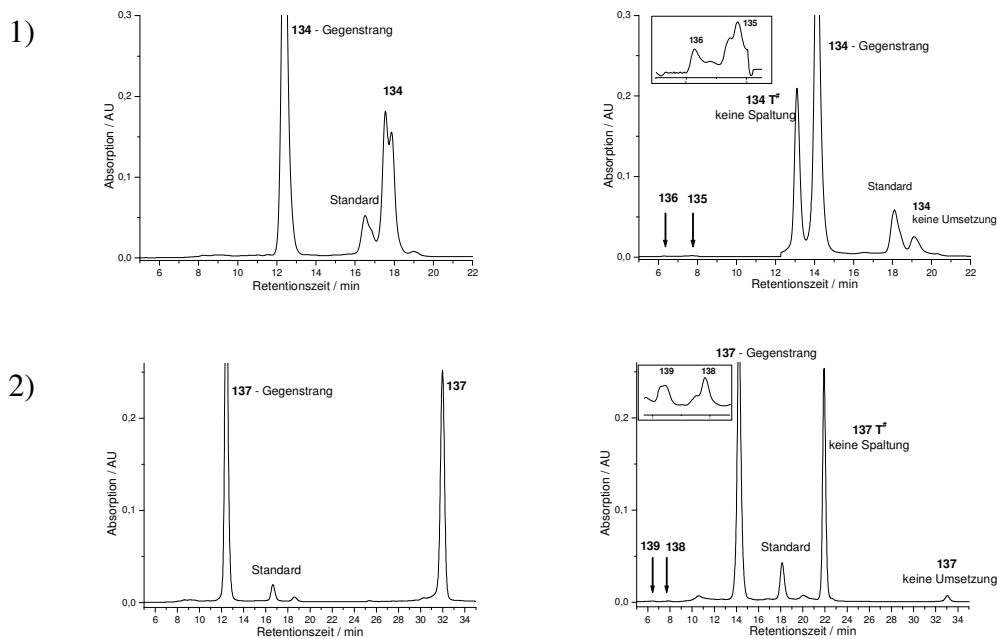
zur Nukleobase Thymin, da die Anzahl der Atome, die Gesamtzahl der Elektronen und somit die Elektronenkonfiguration und Gesamtladung übereinstimmen. **F** bildet mit Adenin als Gegenbase eine B-Helix aus und beeinträchtigt die Konformation in dem für den Elektronentransfer relevanten Bereich nicht.<sup>[116]</sup> Im Gegensatz zu Thymin weist **F** jedoch keine Elektronenakzeptoreigenschaften auf und kann daher nicht als intermediärer Ladungsträger auftreten. Für die Analyse wurden die in Abb. 9.10 dargestellten Oligonukleotide synthetisiert.



**Abb 9.10** Oligonukleotide zur Untersuchung der Sequenzabhängigkeit der Elektronentransfers.

Die Photolysen der Oligonukleotide erbrachten plausible Ergebnisse. Die Spaltausbeuten betragen bei beiden Strängen nur 1% und waren bei der Analyse mittels HPLC an der Nachweisgrenze (Abb 9.11). Mit Hilfe der MALDI-ToF-Spektrometrie konnten die gebildeten Strangbruchfragmente identifiziert werden. Das entsprechende Oligonukleotid mit einem (A:T)-Basenpaar zwischen Donor und Akzeptor lieferte eine Spaltausbeute von 14%. Die Effizienz des Elektronentransfers war somit in diesen DNA-Doppelsträngen wesentlich schlechter, was die Hypothese der Radiolyseexperimente, dass T als primärer Ladungsträger auftritt, unterstrich.<sup>[47]</sup> Der Grund dürfte im Wesentlichen an der erleichterten Protonierung des Cytosin-Radikalanions  $\text{C}^{\bullet-}$  im Vergleich zu  $\text{T}^{\bullet-}$  liegen. Die im Kapitel 2.2.2 beschriebenen Arbeiten von Steenken et al. belegen, dass  $\text{C}^{\bullet-}$  mit einem  $\text{pK}_a > 13$  zehnmal schneller protoniert wird als  $\text{T}^{\bullet-}$  einen  $\text{pK}_a$ -Wert von 7.1.<sup>[43]</sup> Die Stabilisierung des so erhaltenen  $(\text{C}[\text{H}]^{\bullet}: \text{G}^-)$ -Basenpaarung führt zu einer Trennung von Ladung und Spin, was dazu führt, dass die negative Ladung auf den Komplementärstrang wechselt, das Radikal aber auf

dem Originalstrang zurückbleibt. Dieser Effekt sorgt für eine Behinderung des Ladungstransfers und erklärt die geringe Spaltausbeute. Die geringe Ausbeute für den Fall des (A:F)-Basenpaares ist das Resultat eines Superaustausches. Da Difluortoluol nicht als Ladungsträger agieren kann, muss das Elektron auf direktem Wege vom Injektor zum Detektor ohne Hopping-Schritt tunneln. Die Gesamtdistanz von  $6.8 \text{ \AA}$  wird somit in einem Schritt zurückgelegt und folglich nimmt die Effizienz des Prozesses ab.



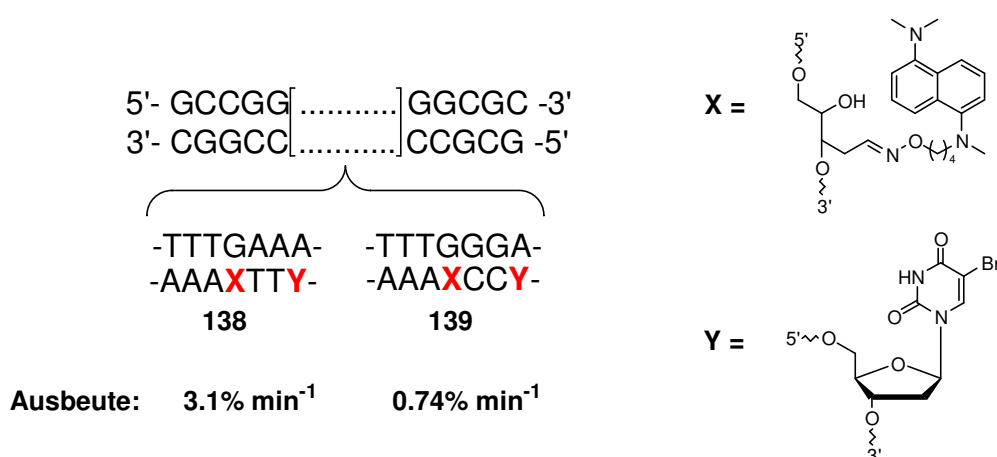
**Abb 9.11** HPLC-Chromatogramme der Oligonukleotide **134** (1) und **137** (2) vor und nach Bestrahlung.

Die Reduzierung der Spaltausbeute von 15% (ohne Basenpaar) auf 1% (mit (A:F)-Basenpaar) steht im Einklang mit der zehnfachen Abnahme der Elektronentransferausbeute pro zusätzlichem Basenpaar bei einem Superaustauschmechanismus. Die in diesem Kapitel erläuterten Experimente ließen auf einen Wert von  $\beta > 0.9$  schließen, was eine starke Distanzabhängigkeit bedeutet und typisch für diesen einstufigen Mechanismus ist. Die Versuche konnten zeigen, dass die Wahl der Ladungsträger für den Elektronentransfer und damit die Sequenz entscheidend ist für die Effizienz des Ladungstransports. Ein Überschusselektron, das vom T\*-Injektorsystem in der DNA freigesetzt wird, kann längere Distanzen nur über (A:T)-Sequenzen nicht aber über (G:C)-Sequenzen zurücklegen.



### 9.3.4 Der Einfluss des Injektorsystems

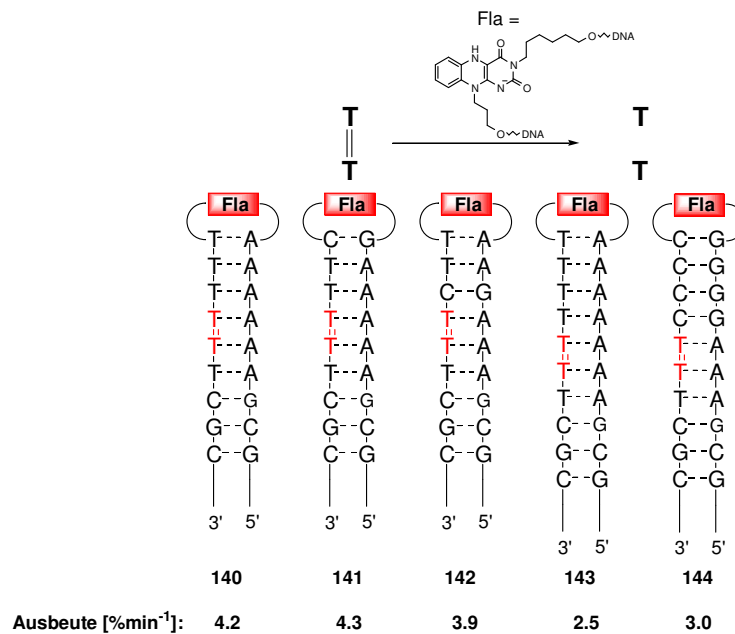
Die im Kapitel 9.3.3 beschriebenen Experimente bestätigten die Ergebnisse der Radiolyseexperimente, wonach der Ladungstransfer über (G:C)-Sequenzen deutlich eingeschränkt ist.<sup>[47-50]</sup> Rokita et al. untersuchten den Transport eines Überschusselektrons mit einem Naphthalinderivat als Elektroneninjektor und 5-Brom-2'-desoxyuridin als Elektronenakzeptor und beobachteten ebenfalls eine abnehmende Effizienz des Elektronentransfers über (G:C)-Sequenzen.<sup>[117,118]</sup> Die Elektronenübertragung wird in dieser experimentellen Anordnung photochemisch ausgelöst. Die anschließende Reduktion des Bromuracils führt zu einer H-Abstraktion und zur Zersetzung des 5'-Nachbarn. Die Folge des Prozesses ist eine Strangspaltung an dieser Stelle (Abb 9.12).



**Abb 9.12** Experimentelle Anordnung zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers durch DNA von Rokita und Mitarbeitern.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen die Arbeiten von Carell et al., in denen keine Sequenzabhängigkeit festgestellt wurde.<sup>[68]</sup> Die Ausbeuten änderten sich nur geringfügig bei Ersatz eines (A:T)-Basenpaares durch ein (G:C)-Basenpaar. Die Effizienz war sogar bei einer längeren (G:C)-Sequenz etwas höher als bei der entsprechenden (A:T)-Sequenz. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind sehr wahrscheinlich auf die Art der Elektroneninjektion zurückzuführen. Durch die T\*-Modifikation wird die Ladung selektiv an einem definierten Thymin innerhalb des DNA-Duplexes freigesetzt. Der Ausgangspunkt für den Ladungstransfer ist daher das Thymidin-Radikalanion ( $E_{\text{red}} = -2.18 \text{ V}$ ). Die jeweiligen Reduktionen von Thyminbasen auf dem Weg zum Elektronenakzeptor (Hopping) sind thermoneutrale Prozesse, die effizient ablaufen. Wird jedoch ein Thymin in unmittelbarer Nachbarschaft durch ein Cytosin ( $E_{\text{red}} = -2.35 \text{ V}$ ) ersetzt, so ist die Reduktion dieser Base ein leicht endothermer Prozess, der ungleich schwieriger abläuft und folglich zu einem weniger

effizienten Ladungstransfer führt. Im Gegensatz zu dieser selektiven Elektronenfreisetzung sind die Injektoreinheiten in den von Rokita und Carell beschriebenen Systemen in die DNA interkaliert. Das Naphthalin-Derivat weist eine hohe Reduktionskraft ( $E_{\text{red}} = -2.80 \text{ V}$ ) auf.<sup>[117]</sup> Da das Elektron nicht selektiv in einer Base freigesetzt wird, ist weder die Reduktion eines Thymins noch eines Cytosins ein Problem, da beide Prozesse exergonisch ablaufen. Wird in diesem System ein Cytosin reduziert, so sind die darauf folgenden Hoppingschritte über Cytosin-Basen thermoneutral und die Abgabe des Elektrons auf Bromuracil ( $E_{\text{red}} [\text{BrU}] < E_{\text{red}} [\text{T}]$ ) wiederum exotherm. Der Gesamtprozess der Elektronenübertragung über (G:C)-Sequenzen ist in diesem System energetisch günstiger als im T\*-System. Dies drückt sich auch in der Effizienz des Elektronentransfers aus, die verglichen mit (A:T)-Sequenzen nur um den Faktor 4 abnimmt (T\*-System: Faktor 10). Diese Abnahme beruht auf der Stabilisierung des (C[H]<sup>•</sup>:G<sup>-</sup>)-Basenpaares, welche den Ladungstransfer einschränkt.



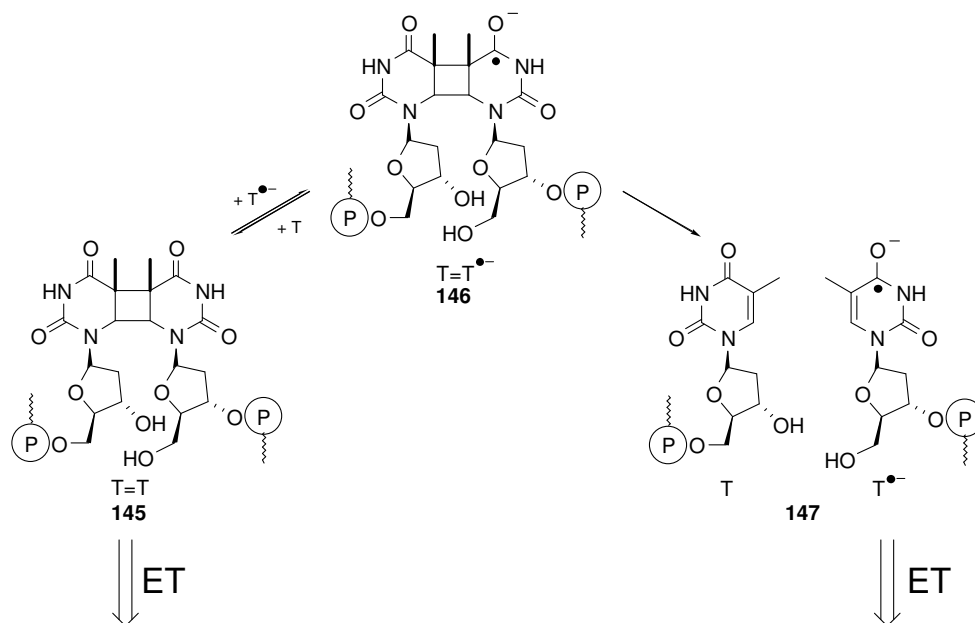
**Abb 9.13** DNA-Haarnadeln mit einem Flavin-Donor und Dimer-Akzeptor zur Untersuchung der Sequenzabhängigkeit des Ladungstransfers.

In den von Carell et al. untersuchten DNA-Haarnadeln fungiert eine interkalierte Flavin-Einheit mit einer ähnlich hohen Reduktionskraft ( $E_{\text{red}} = -2.80 \text{ V}$ )<sup>[56b,68]</sup> wie das Naphthalenderivat als Elektronendonator (Abb. 9.13). Der Gesamtprozess für die Elektronenübertragung über (G:C)-Sequenzen ist daher energetisch ebenso günstig wie in der Anordnung von Rokita. Der experimentelle Befund, dass keine Sequenzabhängigkeit vorliegt, steht im Widerspruch zu den Daten über die Behinderung des Ladungstransfers durch die Protonierung des Cytosins. Dies kann eventuell durch den konstanten Elektronenfluss erklärt werden. Flavin wird während des kompletten Vorgangs im reduzierten Zustand gehalten, so

dass eine undefinierte Anzahl an Elektronen vom Donor durch die DNA wandert. Selbst wenn eine Protonenübertragung von Guanin auf ein Cytosin erfolgt, kann ein nachfolgendes Elektron für die erneute Reduktion der Nukleobase sorgen. Auf diese Weise gelangt die negative Ladung mit der selben Effizienz zum Akzeptor wie in (A:T)-Sequenzen. Die Art und Lage des Elektroneninjektors spielt demnach eine große Rolle bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse, so dass die Sequenzabhängigkeit je nach Wahl des Donorsystems verschieden ist.

### 9.3.5 Das Überschusselektron als Katalysator

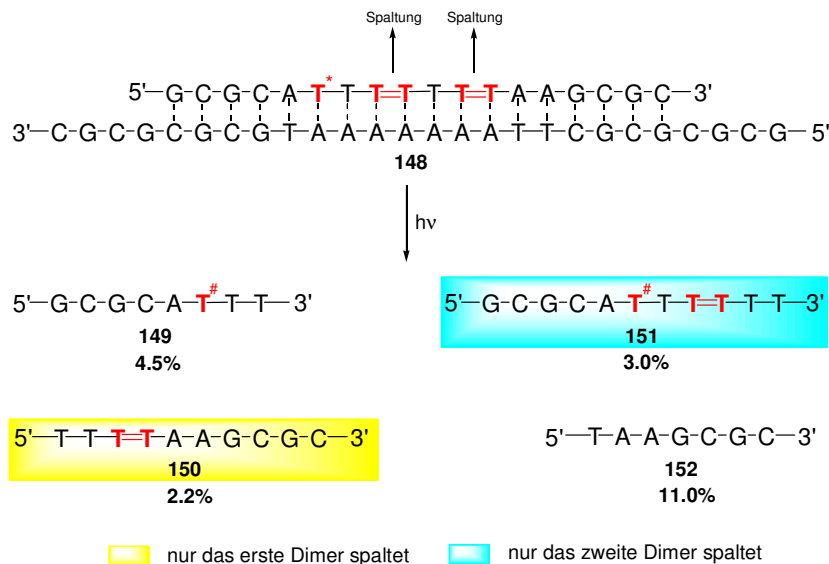
Bei der Wanderung eines Überschusselektrons vom Injektor  $T^*$  zum Detektor Thyimidindimer kommt es zu einer Cycloreversion des Cyclobutans. Gemäß dem Spaltungsmechanismus wird die negative Ladung dabei jedoch nicht zerstört (Schema 9.2). Das Elektron hat demzufolge die Möglichkeit, weiter im DNA-Strang zu wandern.



**Schema 9.2** Konkurrenz zwischen Spaltung und Elektronentransfer für das Thymidin-Radikalanion.

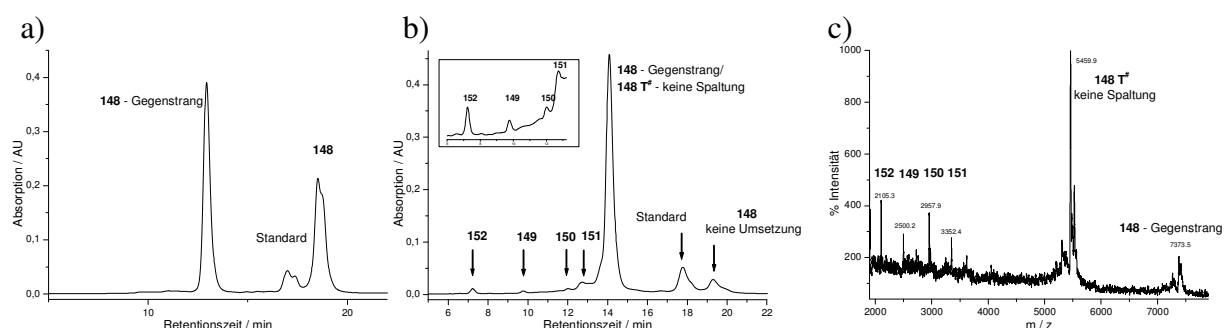
Ein zweites, in größerer Entfernung vom Injektor befindliches Thyimidindimer, könnte auf diese Weise durch das gleiche Elektron gespalten werden. Um zu untersuchen, inwieweit der Dimer-Spaltprozess mit der Wanderung des Überschusselektrons konkurriert, wurde Doppelstrang **148** hergestellt, der zwei Thyimidimere enthielt, die durch ein (A:T)-Basenpaar voneinander getrennt waren. Die Photolyse des Oligonukleotids resultierte tatsächlich in der Spaltung sowohl des ersten als auch des zweiten Thyimidimers, wobei die

kürzeren Stränge **149** und **152** gebildet wurden. Die Spaltausbeute am weiter entfernten Dimer war mit 11% erstaunlicherweise mehr als doppelt so hoch wie beim nahe gelegenen Dimer (4.5%). Ferner wurden auch noch die beiden Fragmente **150** (2.2%) und **151** (3.0%) gebildet. **150** entsteht, wenn nur das erste Dimer gespalten wird und das zweite intakt bleibt. Im Gegensatz dazu entsteht **151** nur dann, wenn das Elektron das erste Dimer überspringt und nur an der entfernten Schädigung eine Cycloreversion auslöst (Abb. 9.14).



**Abb 9.14** Spaltung zweier unterschiedlich weit vom Injektorsystem entfernter Thymidin-dimere nach Photolyse von Doppelstrang **148**.

Die neu gebildeten Fragmente konnten eindeutig mittels Massenspektrometrie und HPLC durch Koinjektion charakterisiert werden. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte durch die Mittelwertbildung von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, da die zwei längeren Bruchstücke aufgrund ähnlichen Laufverhaltens teilweise nur schlecht vom ungeschädigten Oligonukleotid getrennt werden konnten (Abb. 9.15).



**Abb 9.15** HPLC-Chromatogramm vor (a) und nach (b) Photolyse des Doppelstranges **148**. Im Massenspektrogramm (c) sind die Signale der neu gebildeten Fragmente zu erkennen.

Die Spaltung von zwei Thymidinindimern dokumentiert die katalytischen Fähigkeiten des Überschusselektrons. Trifft das Elektron auf das erste Dimer, so spaltet es dieses und setzt

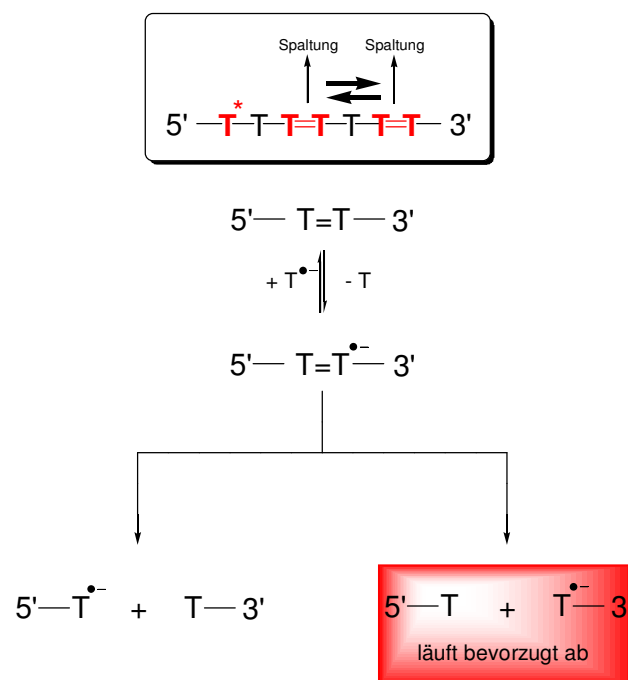
seine Reise unverbraucht fort bis zum nächsten Cyclobutandimer. Die Effizienz des Elektronentransferprozesses bzw. der Dimerspaltung nimmt dabei vom ersten zum zweiten Dimer nicht ab, wie die Spaltausbeuten belegen. Dieses Phänomen wird im folgenden Kapitel erläutert. Die elektronenkatalysierte Reparatur von DNA-Schädigungen ist eine weitere Demonstration der universellen Einsetzbarkeit des T\*-Injektorsystems. Nur auf diese Weise kann ein einzelnes Elektron freigesetzt werden und dessen Weg im DNA-Duplex verfolgt werden.

### 9.3.6 Geschwindigkeit und Richtungseffekt des Elektronentransfers

Die Bildung der Fragmente **150** und **151** sowie die Spaltausbeuten der erhaltenen Stränge lassen darauf schließen, dass bei der Spaltung eines Thymidindimers nicht nur ein Prozess abläuft. Unter der Annahme, dass ein Elektron auf seinem katalytischen Weg durch die DNA alle Dimere gleichmäßig spaltet, müssten die entsprechenden Ausbeuten der gespaltenen kürzeren Fragmente konstant bleiben. Wandert das Überschusselektron im Doppelstrang **148** zum entfernten Dimer nur, wenn es das erste gespalten hat, so müsste das Verhältnis der Spaltausbeuten der Fragmente **151 / 149** 1:1 betragen. Das beobachtete Verhältnis von 2.4:1 deutete jedoch auf einen weiteren Prozess hin, bei dem ein Elektronentransfer zum zweiten Dimer stattfindet, ohne dass das erste Dimer auf dem Weg dorthin gespalten wurde. Die Existenz des Spaltproduktes **151** (3.0%), in dem das erste Dimer intakt ist, belegte diese Beobachtung. Die Beschreibung des Mechanismus der katalytischen Spaltung von Thymidindimeren durch ein Überschusselektron muss aus diesem Grunde erweitert werden. Trifft ein Elektron auf ein Thymidindimer so wird intermediär ein Dimer-Radikalanion generiert. Ausgehend von dieser Zwischenstufe muss es nicht zwangsläufig zur Cycloreversion und damit zur Spaltung des Dimers kommen. Das Elektron kann alternativ das Thymidindimer als weiteren Ladungsträger auf dem Weg zum nächstgelegenen Elektronenakzeptor verwenden. Diese Beobachtungen zeigen, dass sich die Geschwindigkeit des Elektronentransfers (**146** → **145**) in der gleichen Größenordnung wie die Spaltgeschwindigkeit des Thymidindimers (**146** → **147**) befindet und daher die Übergangszustände des Elektronentransfers und des Ladungsdetektionsprozesses am Dimer auf dem gleichen energetischen Niveau liegen. Da die Spaltgeschwindigkeit des Thymidindimers mit  $k_{\text{split}} = 10^8 - 10^9 \text{ s}^{-1}$  [71,119,120] bekannt ist, muss die Geschwindigkeit des reduktiven Elektronentransfers mindestens ebenso hoch sein. Sie ist damit höher als die

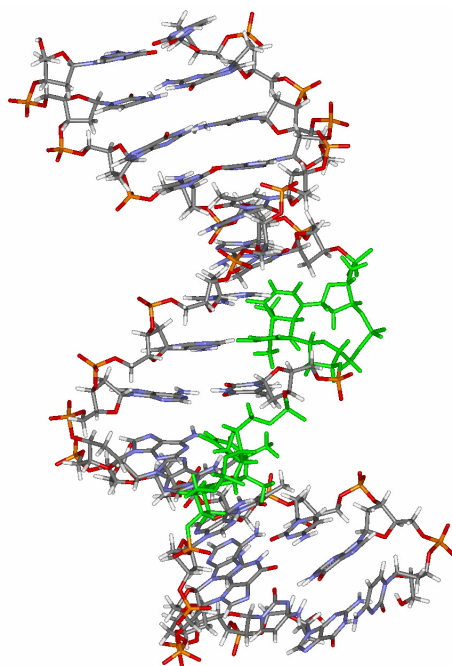
Geschwindigkeit von positiver Ladung während des Hoppings ( $k_{\text{hop}} = 10^6 - 10^8 \text{ s}^{-1}$ )<sup>[26]</sup> zwischen Guaninbasen im oxidativen Lochtransfer. Eine genauere Bestimmung des Elektronentransfers über den Wert von  $10^9 \text{ s}^{-1}$  hinaus ist mit diesem Detektionssystem nicht möglich, da die Dimerspaltung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der limitierende Faktor ist.

Die Bildung der Spaltprodukte nach Photolyse von Doppelstrang **148** erlaubte eine Interpretation des Mechanismus und eine Abschätzung der Geschwindigkeit des Elektronentransfers. Das Produktverhältnis ließ zudem eine Interpretation über die Richtung des Elektronentransfers zu. Wie aus Abb. 9.14 ersichtlich, ist die Spaltausbeute für das weiter entfernte Dimer höher als für das näher gelegene. Dies trifft sowohl für den Fall zu, wenn beide T-Dimere gespalten werden (**152 / 149 = 2.4:1**), als auch wenn nur eines der beiden Dimere gespalten wird (**151 / 150 = 1.5:1**). Bei der Spaltung des Dimers kann das Elektron entweder auf das 3'-T oder das 5'-T übergehen, d.h. beim weiter entfernten Dimer kann die Ladung wieder zurück in Richtung des ersten Dimers wandern und dort für eine Spaltung sorgen. Das Elektron bewegt sich auf diese Weise zwischen den beiden Dimerschäden hin und her (Abb. 9.16). Aufgrund der erhaltenen Ausbeuten, die eine bevorzugte Spaltung des weiter entfernten Dimers bestätigen, kann darauf geschlossen werden, dass das Elektron bevorzugt auf das 3'-T übertragen wird.



**Abb 9.16** Konkurrenzreaktion von zwei T-Dimeren um ein Elektron. Bei der Spaltung eines Dimers wird das Elektron bevorzugt auf das Thymin in 3'-Richtung übertragen.

Diese Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen, die aus der Kristallstruktur eines Thymidindimer enthaltenden Oligonukleotids gewonnen wurden.<sup>[113]</sup> Die stärkere Aufweitung und Deformation an der 5'-Seite des Dimers führen dazu, dass das Elektron die 3'-Seite vorzieht. Eine Simulation eines DNA-Doppelstranges mit zwei Dimerschädigungen bestätigt diese Vermutungen.<sup>[113b]</sup> Durch das zweite Dimer kommt es zu einer Verdrehung des Stranges um fast 90° und zu einer noch stärkeren Konformationsänderung an der 5'-Seite (Abb. 9.17). Bei einer Konkurrenzreaktion der zwei Dimere um das Elektron wäre jeweils die 3'-Seite begünstigt.



**Abb 9.17** Ausschnitt eines DNA-Doppelstranges mit zwei Thymidindimeren. Die Verdrehung des Stranges beträgt 90°.

Aus den so erhaltenen Daten lässt sich ein Richtungseffekt ableiten, der den Transfer eines Überschusselektrons im T\*/T-Dimer-System in die 3'-Richtung favorisiert. Ein entsprechendes Design von Oligonukleotiden würde diesen Erkenntnissen zufolge neue Möglichkeiten zur Untersuchung des Ladungstransports eröffnen. So könnte ein mit mehreren Dimerschäden modifizierter DNA-Duplex durch die Katalyse eines einzelnen Elektrons effizient repariert werden, falls dieses vom Injektor nach Freisetzung bevorzugt in eine Richtung wandert.

## 9.4 Zusammenfassung

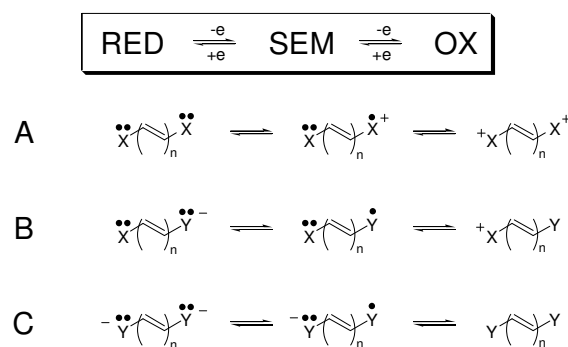
In DNA-Doppelsträngen wurde der Ladungstransport von einem ortsspezifisch generierten Thymidin-Radikalanion zu einem Thymidindimer untersucht. Die Experimente zeigten, dass ein Überschusselektron effizient über Thymin-Basen als intermediäre Ladungsträger zum Elektronenakzeptor wandern kann. Die geringe Abnahme der Spaltausbeute von 15 auf 5% über mehrere (A:T)-Basenpaare steht im Einklang mit einem mehrstufigen Hopping-Mechanismus. Die Sequenz ist von entscheidender Bedeutung für die Effizienz des Ladungstransports. Bei der Substitution eines (A:T)-Basenpaares durch ein (G:C)-Basenpaar nimmt die Spaltausbeute aufgrund der Protonierung des Cytosins und ungünstigeren energetischen Bedingungen ( $E_{\text{red}} [\text{Cytosin}] < E_{\text{red}} [\text{Thymin}]$ ) drastisch ab. Ebenso verhält es sich bei einer künstlichen Nukleobase ohne Akzeptoreigenschaften. Der dadurch bedingte einstufige Superaustausch vom Donor direkt auf den Akzeptor führt auch zu einer Senkung der Spaltausbeute. Die katalytischen Fähigkeiten eines Überschusselektrons konnten durch die Spaltung von zwei Dimerschäden demonstriert werden. Aufgrund der unterschiedlich großen Spaltausbeuten an den Dimeren konnte ein Richtungseffekt festgestellt werden. Das Elektron bevorzugt bei seiner Wanderung durch den DNA-Duplex die 3'-Richtung, was an der strukturellen Deformation am 5'-Ende des Dimer-Detektionssystems liegt, wodurch die Elektronenaufnahme an dieser Seite erschwert wird. Durch die Konkurrenz des Elektronentransfers mit der Spaltung des Thymidindimers, die den limitierenden Faktor darstellt, konnte die Mindestgeschwindigkeit des Ladungstransports von  $10^8$ - $10^9 \text{ s}^{-1}$  abgeschätzt werden. Das hier beschriebene System mit der T\*-Modifikation als Elektronendonator und dem Thymidindimer als Elektronenakzeptor hat sich als nützliches Werkzeug erwiesen, dessen größter Vorteil die selektive Freisetzung eines Elektrons ist. Dadurch konnte die Wirkung eines einzelnen in die DNA injizierten Elektrons untersucht werden, das in der Funktion eines Katalysators mehrere DNA-Schäden effizient reparieren kann.



## 10 Phenazinium-Derivate als alternative Elektronenakzeptoren

### 10.1 Einleitung

Zusätzlich zur chemischen Detektion des Elektronentransfers über die Spaltung des DNA-Strangs bot sich die spektroskopische Detektion mit speziellen Redoxsystemen an. Für eine große Anzahl an Verbindungen konnte bereits ein aus mehreren Schritten bestehender Elektronentransfer demonstriert werden. Die sog. *Weitz*-Verbindungen unterliegen entweder einem Ein- oder Zwei-Elektronenprozess mit der Semichinon-Stufe (SEM) als dazwischenliegender Oxidationsstufe (Schema 10.1).<sup>[121]</sup>



**Schema 10.1** Prinzip der *Weitz*-Redoxsysteme, wobei X und Y Bestandteile von cyclischen  $\pi$ -Systemen sind.

Allgemeine Struktur				
R <sup>1</sup> / R <sup>2</sup>		A	B	C
		Me / Me	Me / -	- / -
153		2.8 x 10 <sup>7</sup>	2.5 x 10 <sup>12</sup>	3.7 x 10 <sup>11</sup>
154		8.0 x 10 <sup>13</sup>	3.7 x 10 <sup>15</sup>	3.7 x 10 <sup>14</sup>
155		2.4 x 10 <sup>12</sup>	4.1 x 10 <sup>21</sup>	1.6 x 10 <sup>15</sup>

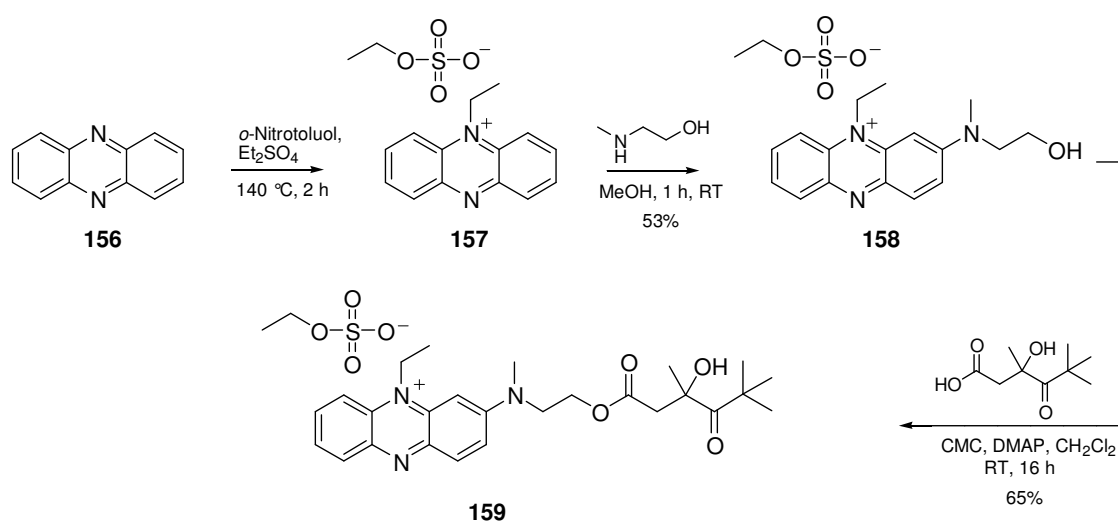
**Tabelle 10.1:** Vergleich der Semichinon-Bildungskonstanten  $K_{SEM}$  iso- $\pi$ -elektronischer Redoxsysteme in DMF gegen Ag/AgCl.

Speziell bei den Phenazinium-Verbindungen **155** ist die SEM-Stufe nach Einelektronenreduktion sehr stabil. Insbesondere bei nur einem Stickstoff-Substituenten (**155 B**) ist die thermodynamische Stabilität der mittleren Oxidationsstufe SEM sehr ausgeprägt. Aus diesem Grund wurden Phenazinium-Verbindungen herangezogen, um spektroskopische Untersuchungen durchzuführen. Von Vorteil sind die geringen Redoxpotentiale dieser Heterocyclen, die im Bereich von -0.3 bis -1.0 V liegen und somit eine Reduktion dieser Verbindungen durch das Ketylradikalanion ( $E_{red} = -2.50$  V) des Injektionssystems ermöglichen.<sup>[122]</sup>

## 10.2 Experimente mit dem Phenaziniumsystem

### 10.2.1 Synthese des Redoxindikators

Um das Phenazinderivat, das als Elektronenakzeptor fungieren sollte, mit der Pivaloylgruppe als Elektronendonator zu verknüpfen, wurde eine Seitenkette an den Heterocyclus angebracht, die mit einer Hydroxygruppe als Funktionalität ausgestattet, über die die Verknüpfung mit der Injektorgruppe stattfinden sollte (Schema 10.2).<sup>[123]</sup>

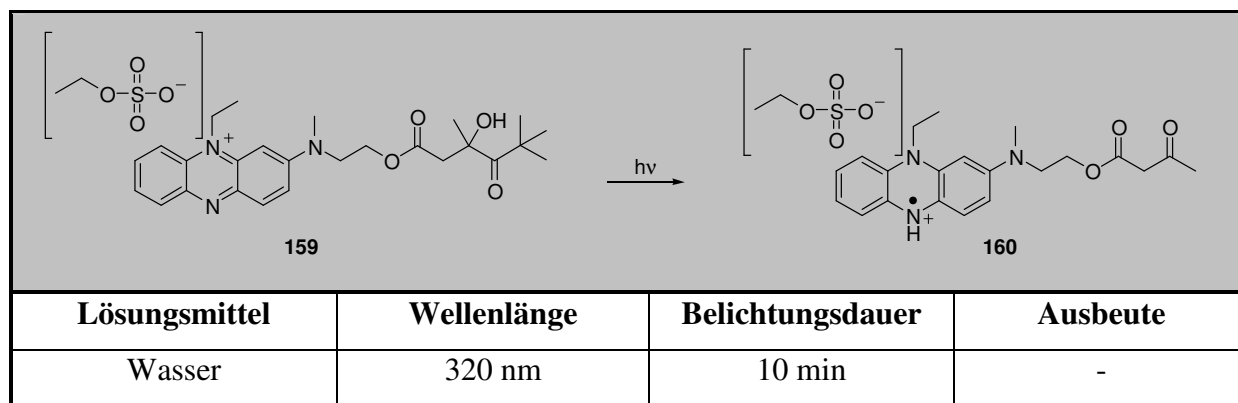


**Schema 10.2** Synthese eines Modellsystems mit der Phenazinium-Einheit als Elektronenakzeptor und der Pivaloyleinheit in der Seitenkette als Elektronendonator.

Die Synthese begann ausgehend von Phenazin, das mit Diethylsulfat in Nitrotoluol zum einfach *N*-substituierten Phenazinium-Salz **157** umgesetzt wurde. Die anschließende Umsetzung mit 2-(*N*-Methylamino)ethanol führte in 53% Ausbeute über beide Stufen zum Phenaziniumderivat **158**, das in Wasser oder Methanol gelöst eine charakteristische violette Farbe besitzt. Die Kupplung mit 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure gelang mit Standardmethoden in 65% Ausbeute. Mit photochemischen Experimenten und anschließender HPLC- sowie UV-spektroskopischer Analytik sollte untersucht werden, ob sich dieses Redoxsystem als Elektronenakzeptor eignet.

### 10.2.2 Photolyse von Verbindung 159

Für die Photolyse-Experimente wurde eine 5 mM Lösung des Phenazinium-Salzes **159** in Wasser unter den üblichen Bedingungen bestrahlt.

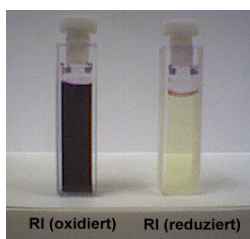


**Tabelle 10.2:** Durch ESI-MS charakterisiertes Produkt nach der Photolyse von **159**.

Bereits mit dem bloßen Auge konnte ein Farbunterschied festgestellt werden (Abb. 10.1). Die Entfärbung des Redoxindikators **158** mit Natriumdithionit führte zwar zur vollständigen Entfärbung der Lösung, wurde jedoch mit einem großem Überschuss an Reduktionsmittel (50 eq) erreicht, so dass nicht nur eine Einelektronenreduktion sondern eine Zweielektronenreduktion zum Dihydrophenazin erfolgte (Schema 10.3). Die HPLC-Analyse brachte keinen Aufschluss über das gebildete Produkt der Bestrahlung. Aufgrund der Ein-

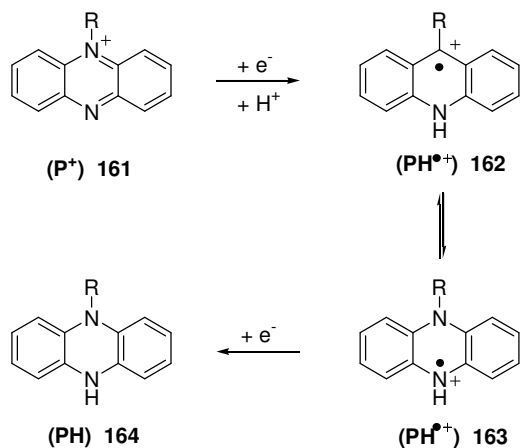


**Abb 10.1** Verbindung **159** vor und nach fünfminütiger Bestrahlung. Zum Vergleich eine Aufnahme des Redoxindikators **158** in Wasser gelöst und nach Reduktion mit Natriumdithionit.

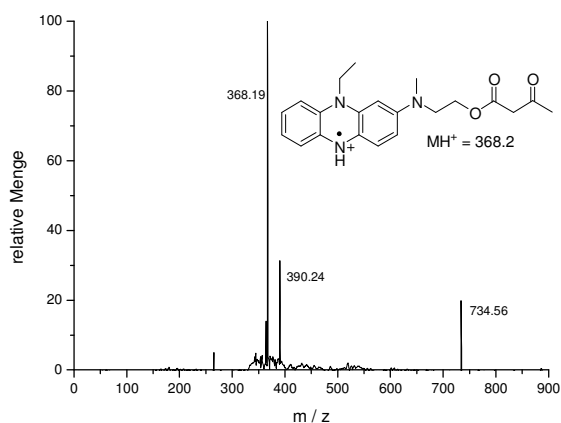


Elektronen-Reduktion des Phenaziniums wird die Aromatizität des Heterocyclus aufgehoben. Dies hat zu Folge, dass die entstehende Verbindung nicht mehr genügend absorbiert, um mittels HPLC beobachtet werden zu können. Nach Einengen der Lösung konnte durch ESI-Massenspektrometrie eine Masse von 367.2 Da nachgewiesen werden. Der Reduktionsmechanismus der Weitz-

Verbindungen verläuft von der Phenazinoxidationsstufe (P) über die Phenazylnradikal-Oxidationsstufe ( $\text{PH}^{\bullet+}$ ) bis zum Dihydrophenazin als Endprodukt (Schema 10.3).<sup>[121]</sup> Da durch die *Norrish I* Spaltungsreaktion nur ein Elektron zur Verfügung steht, bleibt die Reduktion auf der SEM-Stufe ( $\text{PH}^{\bullet+}$ ) stehen. Die gefundene Masse entspricht dabei dem Phenazylnradikal **160** (Abb. 10.2).

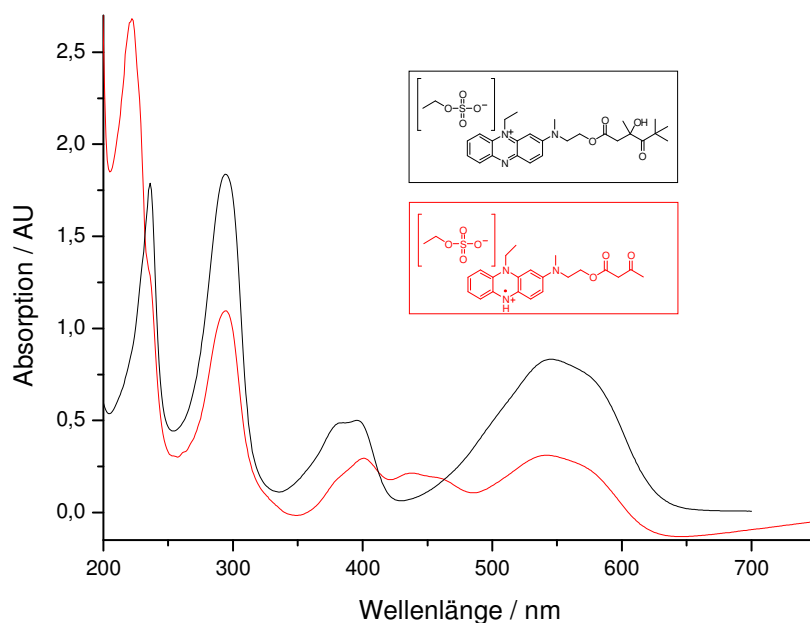


**Schema 10.3** Reduktionsmechanismus von Phenazinium-Verbindungen über die SEM-Stufe bis zum Dihydrophenazin.



**Abb 10.2** ESI-Massenspektrum der Rückstandslösung nach Bestrahlung von Verbindung **159**. Das beobachtete Signal repräsentiert das Phenazyradikal **160**.

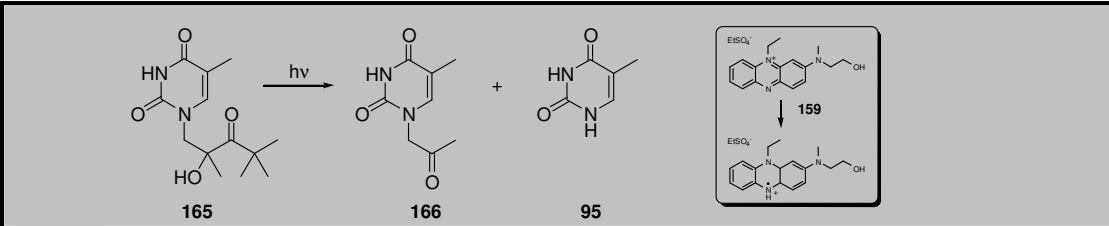
Die UV-Messungen bestätigten die Existenz einer neuen Verbindung. Besonders im Bereich von 350-600 nm sind die Absorptionsbanden nicht mehr so ausgeprägt wie in der Ausgangsverbindung **159** (Abb. 10.3). Der Elektronentransfer vom Pivaloylsystem auf die Phenazin-Einheit führt folglich zur Abnahme der UV-Absorption, was als Kriterium für die Effizienz des Elektronentransfers gesehen werden kann.



**Abb 10.3** UV-Spektrum der Phenazinium-Verbindung **159** vor (schwarz) und nach (rot) Bestrahlung bei 320 nm.

### 10.3 Zusammenfassung und Ausblick

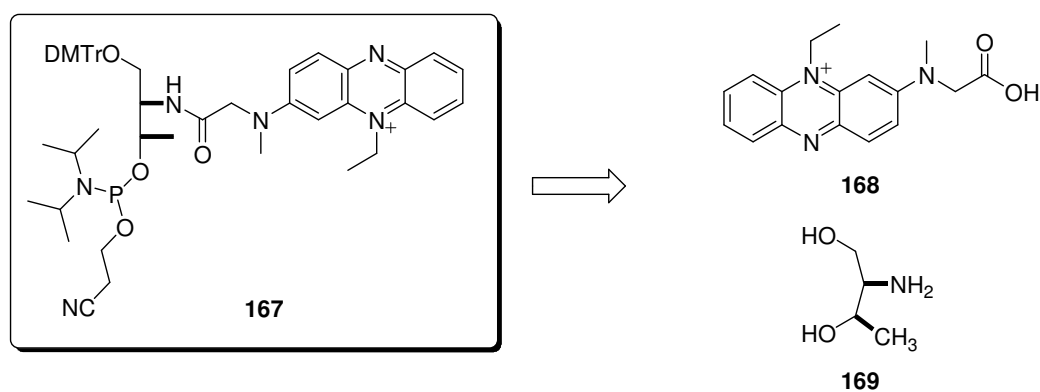
Phenazinium-Salze als Zweielektronen-Redoxsysteme mit einer sehr stabilen mittleren Oxidationstufe (SEM) können zur Detektion von Elektronenübertragungen verwendet werden. Die Fähigkeiten der Phenaziniumsalze als Elektronenakzeptoren konnte durch Photolyseexperimente bestätigt werden. So konnte bei der Bestrahlung eines von B. Carl synthetisierten Modellsystems<sup>[86]</sup> für die Elektroneninjektion (**165**) das Verhältnis von Elektronentransferprodukt **166** zu Eliminierungsprodukt **165** in allen Fällen gesteigert werden (Tabelle 10.3, Spalte 3 links). Durch den Zusatz von **158** (1 eq) und die damit verbundene Anwesenheit eines Akzeptors wurde das Produktverhältnis zu Gunsten des Ketons verschoben (Tabelle 10.3, Spalte 3 rechts).

				
Lösungsmittel	Wellenlänge	Belichtungszeit	166 / 95	Ausbeute
Phosphatpuffer (pH 9)	305 nm	20 min	1 : 1 (1 : 36)	-
Phosphatpuffer (pH 7)	305 nm	20 min	3 : 1 (1 : 25)	82%
Citratpuffer (pH 4)	305 nm	20 min	5 : 1 (3 : 1)	-

**Tabelle 10.3:** Änderung des Produktverhältnis bei der Bestrahlung des Modellsystems **165** nach Zusatz des Phenazinium-Salzes **158**.

Nach der photochemisch erzeugten Freisetzung des Überschusselektrons wird dieses vom Phenazinium-Salz **158** aufgenommen. Das Phenazinium-Derivat wird daraufhin reduziert, und es kommt zur Bildung eines Phenazyldradikals. Die Abnahme der Absorption im relevanten Bereich (350-600 nm) des UV-Spektrums kann als Maß für die Ausbeute des Elektronentransfers herangezogen werden.

Für den Einbau eines solchen Systems in den DNA-Duplex würde ein Baustein nach der Art von Verbindung **167** benötigt werden, der nach der Methode von Tanaka et al. mit einem L-Threoninol-Grundgerüst realisiert werden könnte (Schema 10.4).<sup>[124]</sup> Auf diese Weise könnten Elektronentransferexperimente mit einem alternativen Akzeptorsystem durchgeführt werden. Die Detektion über UV-Spektroskopie würde eine Aussage über die Effizienz des Elektronentransfers aufgrund der Absorptionsabnahme erlauben.



**Schema 10.4** Baustein eines Phenazinium-Derivats für den Einbau in den DNA Duplex

Durch die Verwendung eines zweiten Detektionssystems hätte man Vergleichsmöglichkeiten über die Transferausbeuten für den jeweiligen Akzeptor. Auf diese Weise könnte eine Aussage über die Vor- und Nachteile sowie den Einfluss des Detektors auf den Gesamtprozess des Elektronentransfers analog der in Kapitel 9.3.4 diskutierten Ergebnisse für unterschiedliche Injektoren gemacht werden. So spielt das Redoxpotential des Elektronenakzeptors eine große Rolle und aufgrund der energetisch begünstigten Elektronenübertragung auf ein Phenazinium-Derivat im Vergleich zum Thymidindimer, kann eine andere eventuell höhere Ausbeute für den Transport eines Überschusselektrons erwartet werden.

# **Experimenteller Teil**

# 1 Vorbemerkungen

## 1.1 Physikalische Daten

### *Schmelzpunkte*

Büchi 530. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

### *Elementaranalysen*

Leco CHN-900, Leco RO-478. Die Analysen wurden von Herrn W. Kirsch am Institut für Organische Chemie der Universität Basel durchgeführt. Die Werte wurden in Massenprozenten angegeben.

### *Massenspektrometrie*

Doppelfokussierende Massenspektrometer VG70-250 und Finnigan MAT 312. Die Analysen wurden von Herrn H. Nadig am Institut für Organische Chemie der Universität Basel durchgeführt. Ionenerzeugung erfolgte durch Elektronenstoßionisation (EI) oder Fast Atom Bombardement (FAB) mit Xenonatomen. Die Werte wurden in atomaren Masseneinheiten pro Ladung ( $m/z$ ) angegeben.

Oktapoliges Massenspektrometer Finnigan MAT LCQ. Die Analysenproben wurden in Lösung direkt injiziert. Ionenerzeugung erfolgte durch Elektronenstoßionisation (LCQ, Elektrospray-Massenspektrometrie). Die Werte wurden in atomaren Masseneinheiten pro Ladung ( $m/z$ , Intensität) angegeben.

MALDI-ToF-Massenspektrometrie: Voyager Elite, Biospectrometry Research Station der Firma Vestec. Flugrohr 2 m;  $N_2$ -Laser (337 nm, 3 ns Pulsdauer, 0.2 mJ/Puls, Akkumulierung von 10-100 Pulsen); Beschleunigungsspannung 25 kV, Negativ-Ionen-Modus. Zur Massenkalisierung wurden synthetisierte Oligonukleotide als externe Standards verwendet.

### *IR-Spektroskopie*

Perkin-Elmer-1600-Series FT-IR. Die Banden sind in  $cm^{-1}$  angegeben. Es wurden jeweils vier Einzelspektren überlagert und ein Hintergrundspektrum abgezogen. Die Proben wurden als KBr-Presslinge oder als Film gemessen.

### *UV/VIS-Spektroskopie und UV-Schmelzkurven*

Perkin-Elmer UV/VIS-Spektrometer Lambda 2 mit PTP-6-Temperaturregler.



Die Wellenlängen  $\lambda$  der Absorptionsmaxima sind in nm angegeben, die Extinktionskoeffizienten in  $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### *Kernresonanzspektroskopie*

$^1\text{H}$ -NMR-Spektren: Bruker DPX-400 (400 MHz), Bruker DRX-500 (500 MHz)

$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren: Bruker DPX-400 (101.0 MHz), Bruker DRX-500 (125.8 MHz)

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren: Bruker DPX-400 (162.0 MHz)

Die Messung erfolgte in deuterierten Lösungsmitteln mit Tetramethylsilan als internem Standard ( $\delta_{\text{TMS}} = 0.0$  ppm). Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm, Kopplungskonstanten  $J$  in Hertz (Hz) angegeben. Sämtliche Spektren sind nach erster Ordnung interpretiert. In Fällen von aufgespaltenen Signalen mit definierter Multiplizität bezieht sich  $\delta$  auf das arithmetische Mittel der Signallinien. Die Signalmuster wurden folgendermaßen beschrieben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multipllett), b (breit), ar (aromatisch).

Bei der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie wurden die relativen Lagen der Signale mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung ermittelt, während die Multiplizitäten der einzelnen Linien aus DEPT $^{135}$ -Spektren bestimmt wurden. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die folgende Lösungsmittelsignale:  $\delta = 77.0$  (Chloroform- $d_1$ ),  $\delta = 49.9$  (Methanol- $d_4$ ), und  $\delta = 39.5$  (Dimethylsulfoxid- $d_6$ ). Zur Signalkennzeichnung wurden folgende Abkürzungen verwendet:  $\text{C}_p$  (primäres C-Atom),  $\text{C}_s$  (sekundäres C-Atom),  $\text{C}_t$  (tertiäres C-Atom),  $\text{C}_q$  (quartäres C-Atom),  $\text{C}_{\text{ar}}$  (aromatisches C-Atom).

Bei der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie sind die chemischen Verschiebungen  $\delta$  in ppm bezogen auf ortho-Phosphorsäure ( $\delta = 0.0$  ppm) als externe Referenz in Chloroform- $d_1$  als Lösungsmittel angegeben. Die Signale wurden als d (Dublett) oder t (Triplett) bezeichnet.

## **1.2 Chromatographische Methoden**

### *Dünnschichtchromatographie*

Es wurden Kieselgel Si 60 F $_{254}$  Aluminiumfolien mit einer Schichtdicke von 0.2 mm der Firma Merck verwendet. Die Laufmittelgemische sind beim jeweiligen Versuch angegeben. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe (254 nm) und durch Anfärben mit Cerammoniumsulfat-Lösung (10 g, Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat, 25 g Ammonium-

heptamolybdat-Tetrahydrat, 100 ml konz. Schwefelsäure und 900 ml Wasser). Alternativ wurden eine Permanganatlösung (3 g Kaliumpermanganat, 5 ml 5%ige Natronlauge, 20 g Kaliumcarbonat und 300 ml Wasser) sowie eine Ninhydrinlösung (0.2 g Ninhydrin in 100 ml Ethanol) eingesetzt.

#### *Säulenchromatographie*

Chromatographische Reinigungen wurden unter Nutzung einer Aquariummembranpumpe unter erhöhtem Druck (~ 1.5 bar) an Kieselgel C 560 KV (35-70 µm) der Firma Uetikon und an Kieselgel 60 (40-63 µm) Merck durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, und die angegebenen Lösungsmittelverhältnisse bei Gemischen beziehen sich auf Volumenanteile.

#### *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)*

Waters Alliance 2690 Separation Module mit einem 996 Photodiode Array Detector oder einem 2680 Dual Mode Detector, Hewlett-Packard 1050 Series.

Es wurden Merck LiChroCART<sup>®</sup> 250-4 Säulen (LiChrospher 100 RP-18e, 250 x 4 mm, 5 µm) verwendet. Der Fluss betrug 1 ml/min. Die Gradientenprogramme sind bei den entsprechenden Versuchen angegeben. Die Zuordnung der Reaktionsprodukte erfolgte entweder durch Vergleich der Retentionszeiten von Referenzverbindungen und anschließender Koinjektion oder durch Elektrospray- oder MALDI-ToF-Massenspektrometrie der gesammelten und lyophilisierten Produkte. Die HPLC-Ausbeuten wurden mit den ermittelnden Flächenfaktoren bezogen auf einen internen Standard bestimmt.

### **1.3 Sonstige Apparaturen und Geräte**

#### *Lyophilisator und Zentrifugen*

Speed Vac Plus der Firma Savant, Zentrifuge 5415 C der Firma Eppendorf.

#### *DNA-Synthesizer*

Expedite 8909 der Firma Perseptive Biosystems.

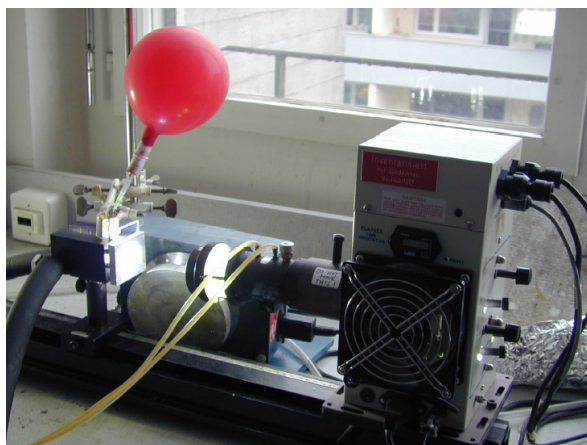
#### *Photolyseapparaturen*

Lichtquelle 1: Heraeus TQ-150 (150W), Quecksilbermitteldruckstrahler mit Pyrexkühlmantel.



Die Apparatur zur präparativen Photochemie besteht aus einem Tauchrohr aus Pyrexglas mit einer Lichtabgrenzung unter 300 nm sowie einem Kühlrohr aus Pyrexglas.

Lichtquelle 2: Bestrahlungsstand der Firma Oriel, Modell 68810, mit einer Quecksilberkurzbogenlampe von Osram (HBO 500 W/2) und Fokussierlinse sowie einem Wasserfilter und thermostatisierbarem Küvettenhalter. Es wurden Langpassfilter WG 320 der Firma Schott (2 mm x 50 mm x 50 mm) verwendet. Bei der angegebenen Wellenlänge beträgt die Lichtdurchlässigkeit ca. 50%. Für die Bestrahlungen wurden Präzisions-Küvetten der Firma Hellma aus Quarzglas SUPRASIL<sup>®</sup> (10.0 mm) oder Polymethylmethacrylat-Küvetten der Firma Semadeni verwendet.



## 1.4 Lösungsmittel und Reagenzien

Diethylether und THF wurden nach Standardvorschriften über Natrium oder Natriumhydrid frisch absolutiert. Die weiteren absoluten Lösungsmittel wurden von der Firma Fluka Chemie AG bezogen und ohne zusätzliche Reinigung direkt eingesetzt. Die übrigen Lösungsmittel und Reagenzien für chemische Umsetzungen wurden von Aldrich, Acros Organics, Fluka Chemie AG, Lancaster, Riedel-de Haën und J. T. Baker bezogen und ebenfalls direkt

eingesetzt. Die Chemikalien zur DNA-Synthese wurden von der Firma Glen-Research bezogen.

## 1.5 Produktreinigung und Aufarbeitung

Soweit nicht anders angegeben wurden Reaktionslösungen und Filtrate am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei 40 °C Badtemperatur eingengt und im Ölpumpenvakuum (0.1 mbar) von flüchtigen Verbindungen befreit.

## 1.6 Charakterisierung der Verbindungen

Verbindungen, die bereits literaturbekannt und charakterisiert sind, wurden im allgemeinen mit  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  sowie MS-Daten beschrieben. Sofern nicht anders beschrieben wurden chirale Verbindungen in racemischer Form erhalten. Die Wasserstoffatome in den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren werden mit den gleichen Nummern versehen wie die entsprechenden Kohlenstoffatome. Werden für geminale Wasserstoffatome zwei getrennte Signale im Spektrum beobachtet, so wird das tieffeldverschobene mit einem "a" und das hochfeldverschobene mit einem "b" als Index gekennzeichnet. Bei Aromaten wurden die Bezeichnungen *ipso*, *ortho*, *meta*, und *para* verwendet.

## 2 Allgemeine Arbeitsmethoden

### 2.1 Quantifizierung von Oligonukleotiden durch UV-Absorption

Die Absorptionen von wässrigen Oligonukleotidlösungen wurden in Quarzküvetten der Firma Hellma mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 260 nm gemessen und entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz quantifiziert. Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden aus Inkrementwerten<sup>[125]</sup> berechnet.

## 2.2 Doppelstrangbildung

Die Lösung mit den beiden Einzelsträngen im jeweiligen Puffer wurde 5 min bei 85 °C erhitzt und über einen Zeitraum von 60 min auf Raumtemperatur abgekühlt.

## 2.3 Photolysen der Oligonukleotide

Die Bestrahlungen der Einzelstrang- und Doppelstrangproben wurden in 1.5 ml Polymethylmethacrylat-Küvetten der Firma Semadeni durchgeführt. Die Lösungen wurden vor Bestrahlung 10 min mit Argon (59) gespült. Während der Bestrahlung wurde ein Argonstrom über den Probenraum geleitet. Die Küvettenhalterung wurde auf 15 °C thermostatisiert, um eine Erwärmung der Lösung während der Bestrahlung zu verhindern. Alle Bestrahlungen wurden unter Nutzung eines 320 nm-Steilkantenfilters durchgeführt.

## 2.4 Massenbestimmung mittels MALDI-ToF-MS

Zur Aufnahme eines MALDI-ToF-Massenspektrums aus einer gepufferten Lösung wurden 10 µl davon mittels Dialyse (Membranfilter der Firma Millipore, 0.025µm Porengröße) entsalzt. Zur Vermessung wurde die entsalzte Analytlösung (1 µl) mit Matrix-Lösung (0.5 M 2,4-Dihydroxyacetophenon und 0.3 M Ammoniumtartrat in Wasser/Acetonitril 3:1; 1 µl) auf dem Probeneller vermischt und an der Luft kristallisiert. Zur Massenkalisierung wurden synthetisierte Oligonukleotide als externe Standards verwendet. Die Signale entsprechen dem unfragmentierten einfach deprotonierten Molekülion  $[M-H]^-$ . Alle Angaben erfolgen in atomaren Masseneinheiten pro Elementarladung (m/z).

### 3 Oligonukleotide

#### 3.1 Oligonukleotidsynthesen

Oligonukleotide wurden an Festphasen (CPG, Porengröße 500 Å) der Firma Glen-Research im 1.0 µmol- oder 0.2 µmol-Maßstab synthetisiert. Es wurden 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite verwendet und der Synthesizer im Standardmodus betrieben. Die Phosphoramidite waren in Acetonitril gelöst. Für das modifizierte Nukleotid **T\*** wurde abs. Methylenchlorid als Lösungsmittel verwendet. Die Kupplungszeiten für die modifizierten Nukleotide **T\*** und **T=T** wurden von 96 s auf 15 min bzw. auf 10 min verlängert. Die Synthesen wurden im Trityl-Off-Modus durchgeführt. Die Festphasen wurden anschließend getrocknet und in 1 ml 32%iger Ammoniak-Lösung bei 55 °C in Safe-Twist-Gefäßen (1.7 ml) der Firma Eppendorf über Nacht inkubiert. Nach Lyophilisierung wurde das entschützte und abgespaltene Oligonukleotid mit Wasser extrahiert.

Das rohe Oligonukleotidgemisch wurde mit RP-HPLC gereinigt. Dabei wurde folgendes Gradientenprogramm verwendet:

Eluent A: 0.1 M TEAA, 1% Acetonitril, pH 7.0

Eluent B: Acetonitril

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	% A	% B
0.0	1.0	94.0	6.0
40.0	1.0	80.0	20.0
45.0	1.0	0.0	100.0
50.0	1.0	94.0	6.0
55.0	1.0	94.0	6.0

Die nicht tritylierten Oligonukleotide eluierten bei ca. 9% Acetonitril (d. h. 10 - 12 min Retentionszeit). Oligonukleotide mit dem modifizierten Nukleotid **T\*** eluierten bei 13% Acetonitril (d. h. 18 - 20 min Retentionszeit). Die höhere

Retentionszeit ist auf die *tert*-Butylgruppe an der Seitenkette zurückzuführen. Die Reinheit der Oligonukleotide wurde durch MALDI-ToF-MS überprüft. Unmodifizierte Oligonukleotide wurden von der Firmen Microsynth AG und Qiagen AG in PAGE- oder HPLC-Qualität bezogen. Alle gelieferten DNA-Proben wurden zusätzlich mit RP18-HPLC gereinigt und die Identität durch MALDI-ToF-MS überprüft.

### 3.2 Bestimmung der Schmelzpunkte

Die Messungen wurden bei 260 nm mit einem Temperaturgradienten von 1 °C/min durchgeführt. Angegebene Schmelzpunkte sind Mittelwerte aus Aufheiz- und Abkühlkurve. Zur besseren Stabilisierung wurden Gegenstränge verwendet, die am 3'- und am 5'-Ende jeweils um 3-4 Nukleobasen verlängert sind. Das modifizierte Oligonukleotid (1.0 nmol) und der Gegenstrang (1.2 nmol) wurden in Phosphatpuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7.0, 100 mM NaCl, 1000 µl) hybridisiert und anschließend vermessen.

#### Oligonukleotide zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers

5'-GC GCA T*T=T AAG CGC-3' 3'-CGC GCG CGT A A A TTC GCG CGC G-5'	<b>130 a</b> 67.0 °C
5'-GCG CAT* TT=T AAG CGC-3' 3'-GCG CGC GTA AA A TTC GCG CGC-5'	<b>130 b</b> 67.8 °C
5'-G CGC AT*T TT=T AAG CGC-3' 3'-G CGC GCG TA A AA A TTC GCG CGC-5'	<b>130 c</b> 64.6 °C
5'-GC GCA T*TT TT=T AAG CGC-3' 3'-GC GCG CGT A AA AA A TTC GCG CGC-5'	<b>130 d</b> 63.8 °C
5'-GCG CAT* CT=T AAG CGC-3' 3'-GCG CGC GTA GA A TTC GCG CGC-5'	<b>134</b> 66.9 °C
5'-GCG CAT* FT=T AAG CGC-3' 3'-GCG CGC GTA AA A TTC GCG CGC-5'	<b>137</b> 61.6 °C
5'-GCG CAT* TT=T TT=T AAG CGC-3' 3'-GCG CGC GTA AA A AA A TTC GCG CGC-5'	<b>149</b> 66.5 °C

#### Referenz-Oligonukleotide für die HPLC-Analyse

5'-GC GCA TT=T AAG CGC-3' 3'-CG CGT AA A TTC GCG-5'	<b>130 e</b> 59.3 °C
5'-GCG CAT <sup>#</sup> T-3'	<b>131 a</b>
5'-TAA GCG C-3'	<b>132</b>

## 4 Quantifizierung der Photolyseprodukte mittels HPLC

### Bestimmung der Ausbeuten bei den Oligonukleotidphotolysen

Zur Auswertung der Photolysenprodukte wurden die Verhältnisse der gewichteten Peakflächen zwischen Gegenstrang und Eduktstrang vor und nach Bestrahlung der Proben bestimmt. Der Gegenstrang diente dabei als interner Standard. Durch den Vergleich dieser beiden Verhältnisse konnte der Umsatz der Reaktion nach Gleichung 1 bestimmt werden.<sup>[126]</sup>

$$(1) \quad \text{Umsatz}[\%] = 100 \cdot \left[ 1 - \frac{(\text{GS/ES})_{\text{vor Bestrahlung}}}{(\text{GS/ES})_{\text{nach Bestrahlung}}} \right]$$

GS: Peakfläche Gegenstrang  
ES: Peakfläche Eduktstrang

Die Ausbeute der Photoprodukte wurde durch Gleichung 2 bestimmt.

$$(2) \quad \text{PS}[\text{Ausbeute}] = \frac{\text{PS}[\text{Flächen - \%}] \cdot \text{GS}[\text{Stoffmenge}] \cdot \text{GS}[\text{EK}]}{\text{GS}[\text{Flächen - \%}] \cdot \text{PS}[\text{EK}]}$$

EK: Extinktionskoeffizient  
PS: Produktstrang

Die Ausbeuten der einzelnen Bestrahlungsprodukte wurden durch das arithmetische Mittel mehrerer HPLC-Injektionen bestimmt und sind in Prozent angegeben.

### Bestimmung der Ausbeuten anhand von relativen Flächenfaktoren $F_x$

Anders als bei den Bestrahlungen von Oligonukleotiden wurden die Ausbeuten der Photolysenprodukte bei Monomerexperimenten mit den entsprechenden Flächenfaktoren  $F_x$ , bezogen auf den zugesetzten Standard, bestimmt. Nach präziser Einwaage der Verbindung **X** und des Standards wurden die aus dem HPLC-Chromatogramm erhaltenen integrierten Flächen in Prozenten nach Gleichung 3 mit den Einwaagen verrechnet, wobei man die Flächenfaktoren  $F_x$  der Verbindung **X** relativ zum Standard erhielt.

$$(3) \quad F_x = \frac{\text{Verbindung X}[\text{Einwaage}] \cdot \text{Standard}[\text{Flächen - \%}]}{\text{Standard}[\text{Einwaage}] \cdot \text{Verbindung X}[\text{Flächen - \%}]}$$

Die verwendeten Flächenfaktoren  $F_x$  wurden durch das arithmetische Mittel mehrerer Einwaagen und wiederholter HPLC-Injektionen der Verbindung **X** mit dem entsprechenden Standard bestimmt. Die Bestimmung der Ausbeuten der Produkte **X** nach den Photolysen wurden basierend auf Gleichung 4 nach Umformen anhand des Ausdrucks 2 durchgeführt.

$$(4) \quad \text{Verbindung X}[\text{Ausbeute}] = F_x \cdot \frac{\text{Standard}[\text{Einwaage}] \cdot \text{Verbindung X}[\text{Flächen - \%}]}{\text{Standard}[\text{Flächen - \%}]}$$

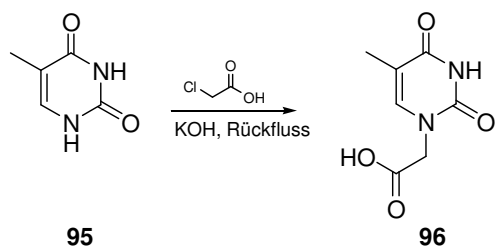
Die angegebenen Ausbeuten der Verbindung **X** wurden durch das arithmetische Mittel mehrerer HPLC-Injektionen ermittelt und sind in Prozent angegeben.



## 5 Synthese der beschriebenen Verbindungen

### 5.1 Synthese der Thymindimere

#### 5.1.1 1,2,3,4-Tetrahydro-5-methyl-2,4-dioxypyrimidin-1-essigsäure (**96**)<sup>[104]</sup>



Thymin (10.0 g, 79.3 mmol) wurde in Wasser (150 ml) suspendiert. 50 ml einer wässrigen KOH-Lösung (3.6 M) wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde so lange gerührt bis eine klare Lösung erhalten wurde (15 min). Nach Zugabe von Chloressigsäure (15 g, 159.0 mmol) wurde das Reaktionsgemisch unter Rückfluss erhitzt. Nach 90 min waren noch 60% des Eduktes vorhanden, so dass weitere 5 g Chloressigsäure zugegeben wurden. Nach 3 h wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit konz. HCl angesäuert bis pH 1 erreicht wurde. Über Nacht kristallisierte das Produkt bei 4 °C aus. Das kristalline Produkt wurde abfiltriert und im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Es wurden 11.7 g (81%) des farblosen Feststoffs **96** erhalten.

C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (184.05).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

11.35 (s, NH), 7.61 (d, *J* = 7.9, 1 H, 6-H), 5.60 (d, *J* = 7.9, 1 H, 5-H), 5.20 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>COOH), 1.76 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

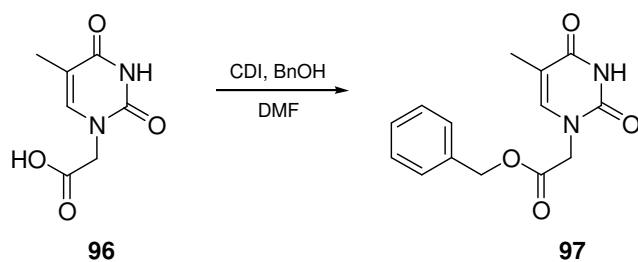
214.4 (C<sub>q</sub>, 1 C, COOH), 164.4 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 150.6 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2), 140.9 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-6), 109.3 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 64.3 (C<sub>s</sub>, 1 C, CH<sub>2</sub>COOH), 11.9 (C<sub>p</sub>, 1 C, CH<sub>3</sub>).

MS (FAB, m/z):

185 (MH<sup>+</sup>, 100).

Schmelzpunkt: 283 °C.

### 5.1.2 Benzyl-1,2,3,4-tetrahydro-5-methyl-2,4-dioxypyrimidin-1-acetat (**97**)<sup>[104]</sup>



Säure **96** (6.5 g, 35 mmol) und 1,1'-Carbonylbis[1*H*]-diimidazol (7.8 g, 48 mmol) wurden in 60 ml abs. DMF gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 min wurde Benzylalkohol zugegeben (5.2 g, 49 mmol), und die Reaktionsmischung wurde 35 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des Benzylalkohols färbte sich die Lösung leicht violett. Die Lösung wurde anschließend im Vakuum eingedunstet und der Rückstand in Wasser (40 ml) suspendiert und abfiltriert. Nach Umkristallisation aus MeOH wurde **97** als farbloser Feststoff erhalten (9.1 g, 94%), der im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet wurde.

C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (274.10)

R<sub>f</sub> (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) = 0.65

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

11.41 (s, 1H, NH), 7.65 (d, *J* = 7.9, 1 H, 6-H), 7.41 (s, 5 H, ar.), 5.63 (d, *J* = 7.9, 1 H, 5-H), 5.19 (s, 2 H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.62 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>COOPh), 1.74 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

169.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, COOBn), 164.2 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 150.6 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2), 140.9 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-6), 135.5 (C<sub>t</sub>, 1 C, C<sub>ipso</sub>), 128.8 (C<sub>t</sub>, 2 C, C<sub>ar.</sub>), 128.5 (C<sub>t</sub>, 1 C, C<sub>ar.</sub>), 128.1 (C<sub>t</sub>, 2 C, C<sub>ar.</sub>), 109.3 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 64.3 (C<sub>s</sub>, 1 C, CH<sub>2</sub>COOPh), 48.8 (C<sub>s</sub>, 1 C, OCH<sub>2</sub>Ph), 11.9 (C<sub>p</sub>, 1 C, CH<sub>3</sub>).

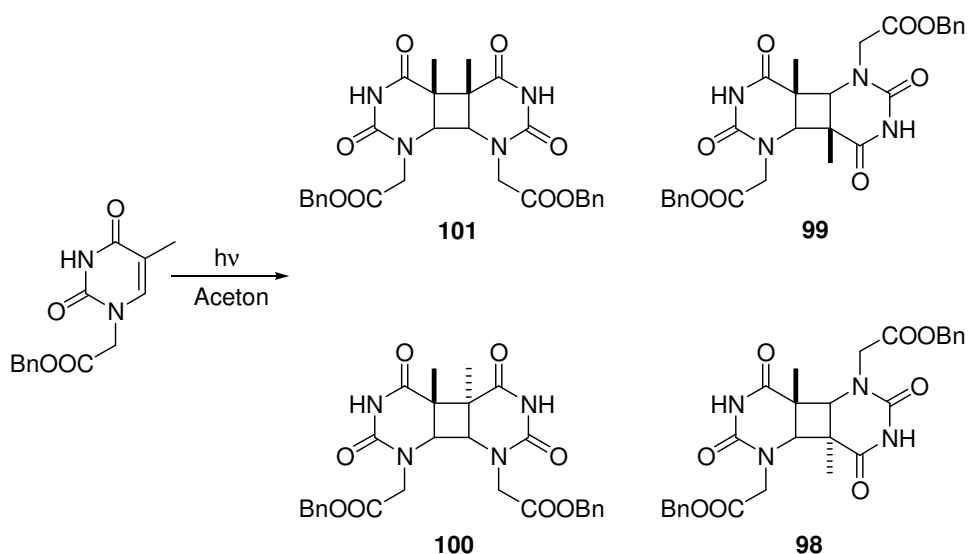
MS (FAB, *m/z*):

275 (MH<sup>+</sup>, 32), 167 (18), 91 (100), 41 (9), 28 (12).

IR (KBr, ν /cm<sup>-1</sup>):

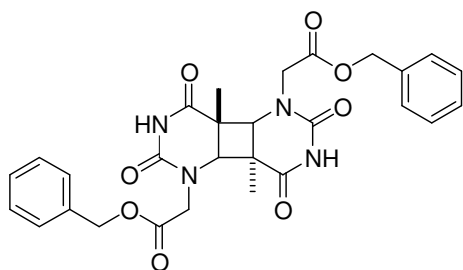
3422, 3156, 3111, 3031, 2878, 2827, 1733, 1717, 1682, 1468, 1428, 1384, 1347, 1254, 1231, 1205, 1103, 948, 886, 806, 761, 580, 550, 493, 428.

Schmelzpunkt: 177 °C.

5.1.3 Photodimerisierung von Benzylester **97**<sup>[104]</sup>


Benzylester **97** (2.0 g, 7.3 mmol) wurde in abs. Aceton (200 ml) gelöst und die Lösung wurde zunächst 15 min mit Argon im Ultraschallbad und danach weitere 15 min außerhalb des Bades entgast. Die Lösung wurde anschließend in das Photochemie-Reaktionsgefäß Heraeus TQ-150 überführt und unter Argon 3 h mit einem Quecksilbermitteldruckstrahler bestrahlt. Die Reaktion wurde mittels DC kontrolliert und es konnten neben dem Edukt mehrere Produkte festgestellt werden. Zwei Isomere waren unlöslich und kristallisierten während der Reaktion aus. Das Gemisch wurde nach der Bestrahlung abfiltriert und lieferte hauptsächlich das *cis-transoid-cis,anti*-Isomer **98** sowie das *cis-transoid-cis,syn*-Isomer **100**. Die Trennung dieser beiden Isomere erfolgte durch Festflüssig-Extraktion unter kontinuierlichem Rückfluss in einer Soxhlet-Apparatur. Aceton diente als Lösungsmittel, wobei das *cis-transoid-cis,syn*-Isomer **100** in Lösung ging und durch Einengen im Vakuum erhalten werden konnte (600 mg, 30%). Der Rückstand wurde abfiltriert und lieferte das *cis-transoid-cis,anti*-Isomer **98** (420 mg, 21%). Das nach der Bestrahlung erhaltene Filtrat wurde eingengt und das Gemisch durch Säulenchromatographie an Kieselgel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 35:1 \rightarrow 20:1$ ) getrennt. Man erhielt verbleibende Mengen an *cis-transoid-cis,anti*-Isomer **98** und *cis-transoid-cis,syn*-Isomer **100** sowie das *cis-cisoid,cis-anti*-Isomer **99** (30 mg, 1.5%). Das *cis-cisoid,cis-syn*-Isomer **101** konnte nicht isoliert werden.

**5.1.3.1 Dibenzyl-*cis*-[4a]-*transoid*-[4a,4b]-*cis*-[4b]-dodecahydro-9,11-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2-*d*:3,4-*d'*]dipyrimidin-1,5-diacetat (98)**



$C_{28}H_{28}N_4O_8$  (548.19)

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $(CD_3)_2SO$ ,  $\delta/ppm$ ):

10.78 (s, 2 H, NH), 7.37 (s, 10H, ar.), 5.18 (d,  $J = 12.4$ , 2 H,  $OCH_2Bn$ ), 5.13 (d,  $J = 12.4$ , 2 H,  $OCH_2Bn$ ), 4.44 (d,  $J = 17.5$ , 2 H,  $CH_2COBn$ ), 3.95 (s, 2 H, 6-H), 3.61 (d,  $J = 17.5$ , 2 H,  $CH_2COBn$ ), 1.25 (s, 6 H,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (101 MHz,  $(CD_3)_2SO$ ,  $\delta/ppm$ ):

172.6 ( $C_q$ , 2 C,  $COOBn$ ), 168.0 ( $C_q$ , 2 C, C-4), 151.4 ( $C_q$ , 2 C, C-2), 135.5 ( $C_q$ , 2 C,  $C_{ipso}$ ), 128.3 ( $C_t$ , 2 C,  $C_{ar.}$ ), 128.1 ( $C_t$ , 2 C,  $C_{ar.}$ ), 127.9 ( $C_t$ , 4 C,  $C_{ar.}$ ), 66.2 ( $C_s$ , 2 C,  $\underline{C}H_2COOBn$ ), 61.3 ( $C_s$ , 2 C,  $O\underline{C}H_2Bn$ ), 47.1 ( $C_t$ , 2 C, C-6), 44.6 ( $C_q$ , 1 C, C-5), 17.9 ( $C_p$ , 2 C,  $CH_3$ ).

MS (FAB,  $m/z$ ):

549 ( $MH^+$ , 14), 338 (34).

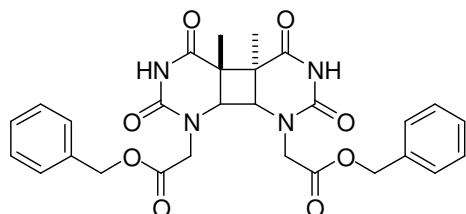
IR (KBr,  $\nu/cm^{-1}$ ):

3429, 3233, 3067, 1744, 1711, 1683, 1473, 1389, 1356, 1283, 1256, 1224, 982, 756, 735.

$R_f$  ( $CHCl_3/MeOH$  10:1) = 0.73.

Schmelzpunkt: 242 °C.

**5.1.3.2 Dibenzyl-*cis*-[4*a*]-transoid-[4*a*,4*b*]-*cis*-[4*b*]-dodecahydro-11,12-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2-*d*:3,4-*d'*]dipyrimidin-1,8-diacetat (100)**



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

10.65 (s, 2 H, NH), 7.35 (m, 10 H, ar.), 5.15 (d,  $J = 12.4$ , 2 H,  $\text{OCH}_2\text{Bn}$ ), 5.11 (d,  $J = 12.4$ , 2 H,  $\text{OCH}_2\text{Bn}$ ), 4.25 (d,  $J = 17.5$ , 2 H,  $\text{CH}_2\text{COBn}$ ), 4.09 (d,  $J = 17.5$ , 2 H,  $\text{CH}_2\text{COBn}$ ), 3.98 (s, 2 H, 6'-H), 1.23 (s, 6 H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

170.7 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{COOBn}$ ), 169.2 ( $\text{C}_q$ , 2 C, C-4), 151.3 ( $\text{C}_q$ , 2 C, C-2), 135.5 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_{\text{ipso}}$ ), 128.3 ( $\text{C}_t$ , 2 C,  $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 128.1 ( $\text{C}_t$ , 2 C,  $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 127.9 ( $\text{C}_t$ , 4 C,  $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 66.1 ( $\text{C}_s$ , 2 C,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COOBn}$ ), 63.2 ( $\text{C}_s$ , 2 C,  $\underline{\text{O}}\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 48.1 ( $\text{C}_t$ , 2 C, C-6), 45.7 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-5), 20.9 ( $\text{C}_p$ , 2 C,  $\text{CH}_3$ ).

MS (FAB,  $m/z$ ):

549 ( $\text{MH}^+$ , 70), 338 (55).

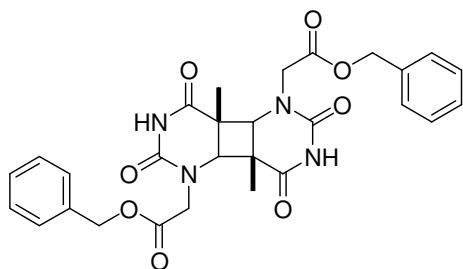
IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ):

3430, 3178, 3065, 2856, 1745, 1700, 1687, 1478, 1388, 1378, 1358, 1283, 1208, 959, 754, 698.

$R_f$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10:1) = 0.58.

Schmelzpunkt: 201 °C.

**5.1.3.3 Dibenzyl-*cis*-[4a]-*cisoid*-[4a,4b]-*cis*-[4b]-dodecahydro-9,11-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2-*d*:3,4-*d'*]dipyrimidin-1,5-diacetat (99)**



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

10.57 (s, 2 H, NH), 7.39 (s, 10 H, arom.), 5.19 (d, *J* = 12.4, 2 H, OCH<sub>2</sub>Bn), 5.14 (d, *J* = 12.4, 2 H, OCH<sub>2</sub>Bn), 4.48 (d, *J* = 17.5, 2 H, CH<sub>2</sub>COBn), 3.84 (d, *J* = 17.5, 2 H, CH<sub>2</sub>COBn), 3.74 (s, 2 H, 6'-H), 1.43 (s, 6 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

170.6 (C<sub>q</sub>, 2 C, COOBn), 168.6 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-4), 151.0 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-2), 135.6 (C<sub>q</sub>, 2 C, C<sub>ipso</sub>), 128.2 (C<sub>t</sub>, 2 C, C<sub>ar</sub>), 128.1 (C<sub>t</sub>, 2 C, C<sub>ar</sub>), 127.9 (C<sub>t</sub>, 4 C, C<sub>ar</sub>), 66.1 (C<sub>s</sub>, 2 C, CH<sub>2</sub>COOBn), 61.5 (C<sub>s</sub>, 2 C, OCH<sub>2</sub>Bn), 47.9 (C<sub>t</sub>, 2 C, C-6), 47.6 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 20.7 (C<sub>p</sub>, 2 C, CH<sub>3</sub>).

MS (FAB, *m/z*):

549 (MH<sup>+</sup>, 90), 491 (8), 338 (42).

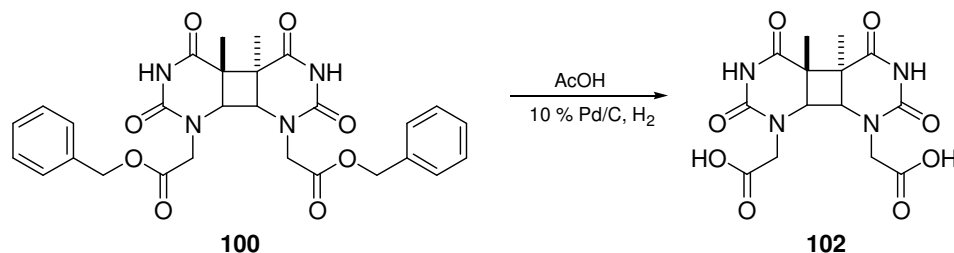
IR (KBr, ν /cm<sup>-1</sup>):

3433, 3078, 2967, 1744, 1710, 1633, 1475, 1389, 1356, 1300, 1244, 1194, 961, 756, 700.

R<sub>f</sub> (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) = 0.53

Schmelzpunkt: 213 °C.

**5.1.4** *cis*-[4*a*]-*transoid*-[4*a*,4*b*]-*cis*-[4*b*]-Dodecahydro-11,12-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2-*d*:3,4-*d'*]dipyrimidin-1,8-diessigsäure (**102**)<sup>[104]</sup>



Diester **100** (870 mg, 1.59 mmol) wurde im ausgeglühten Kolben vorgelegt. Dieser wurde zunächst evakuiert und anschließend mit Argon gespült. Im Argongegenstrom wurde der Diester in Essigsäure (20 ml) gelöst und mit Palladium auf Kohle (10%, 29 mg) versetzt. Der Kolben wurde mehrmals evakuiert und mit Wasserstoff gespült. Unter Wasserstoff-Atmosphäre wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und der Celite-Filterkuchen zweimal mit heißer Essigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum eingedunstet. Nach Zugabe von Diethylether (10 ml) fiel das Produkt aus und wurde mit Aceton gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum erhielt man **102** als farblosen Feststoff (580 mg, quant.).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

10.55 (s, 2 H, NH), 4.04 (d, *J* = 17.6, 2 H, CH<sub>2</sub>COOH), 3.97 (d, *J* = 17.6, 2 H, CH<sub>2</sub>COOH), 3.89 (s, 2 H, 6'-H), 1.27 (s, 6 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

170.8 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-2'), 170.3 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-4), 151.3 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-2), 63.7 (C<sub>s</sub>, 2 C, C-1'), 48.4 (C<sub>t</sub>, 2 C, C-6), 45.6 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 20.9 C<sub>p</sub>, 2 C, 5-CH<sub>3</sub>).

MS (FAB, *m/z*):

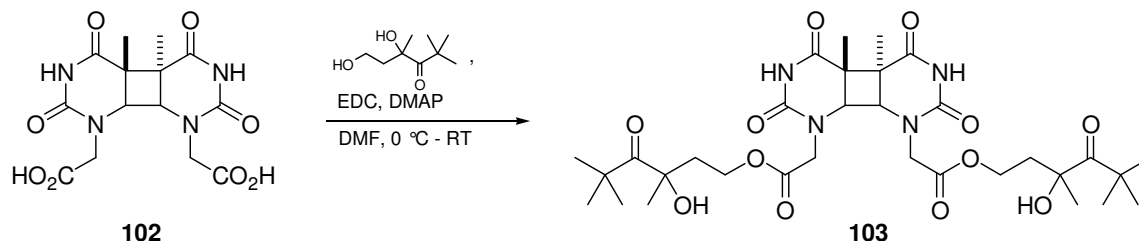
369 (MH<sup>+</sup>, 20), 338 (100), 273 (24), 165 (30).

IR (KBr, ν /cm<sup>-1</sup>):

3600, 3400, 3231, 3067, 2867, 1761, 1693, 1483, 1385, 1302, 1239, 1160, 883, 822, 759.

Schmelzpunkt: 241 °C.

**5.1.5 Di-(3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl)-cis-[4a]-transoid-[4a,4b]-cis-[4b]-dodecahydro-11,12-dimethyl-2,4,6,8-tetraoxocyclobuta[1,2-d:3,4-d']-dipyrimidin-1,8-diessigsäure (103)**



*trans-syn* Di-Säure **102** (100 mg, 0.25 mmol), EDC (73 mg, 0.38 mmol, 1.5 eq) und DMAP (21 mg, 0.15 mmol, 0.6 eq) wurden unter Argon in 5 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung des Diols **53** (175 mg, 1.00 mmol, 4.0 eq) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0 °C innerhalb 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf RT erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, und der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 40:1). Man erhielt 54 mg (0.08 mmol, 32%) des farblosen Feststoffes **103**. Das Produkt wurde über RP-HPLC gereinigt.

C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> (680.74).

R<sub>f</sub> (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) = 0.29.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ/ppm):

4.35 - 4.22 (m, 4 H, 4'-H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>), 4.20 - 4.09 (m, 4 H, 1'-H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>), 4.08 - 4.00 (m, 2 H, 6-H), 2.30 - 2.25 (m, 2 H, 5'-H<sub>a</sub>), 1.84 - 1.80 (m, 2 H, 5'-H<sub>b</sub>), 1.43 (s, 6 H, 6''-CH<sub>3</sub>), 1.35 (s, 6 H, 5-CH<sub>3</sub>), 1.28 (s, 18 H, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ/ppm):

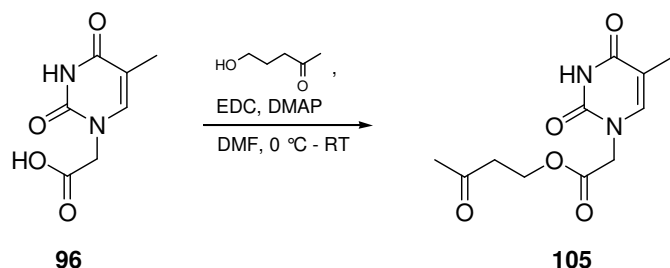
219.2 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-7'), 170.1 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-2'), 164.1 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-4), 151.3 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-2), 80.3 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-6'), 65.1 (C<sub>s</sub>, 2 C, C-4'), 62.1 (C<sub>s</sub>, 2 C, C-1'), 49.2 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-5), 46.9 (C<sub>t</sub>, 2 C, C-6), 45.1 (C<sub>s</sub>, 2 C, C-5'), 40.4 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-8'), 28.0 (C<sub>p</sub>, 2 C, 7'-CH<sub>3</sub>), 26.4 (C<sub>p</sub>, 6 C, <sup>t</sup>Bu), 20.7 (C<sub>p</sub>, 2 C, 5-CH<sub>3</sub>).

MS (LCQ, m/z):

703 (MNa<sup>+</sup>, 100), 679 (M<sup>-</sup>, 100).



### 5.1.6 (3-Oxo-butanoyl)-1,2,3,4-tetrahydro-5-methyl-2,4-dioxypyrimidin-1-acetat (105)



Säure **96** (204 mg, 1.11 mmol), EDC (220 mg, 1.67 mmol, 1.5 eq) und DMAP (92 mg, 0.87 mmol, 0.6 eq) wurden unter Argon in 5 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung frisch destilliertes 5-Hydroxy-2-pentanon (220 mg, 2.44 mmol, 2.8 eq) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0 °C innerhalb 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, und der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20 : 1). Man erhielt 22 mg (0.09 mmol, 8%) eines farblosen Feststoffes. C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (254.24).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1) = 0.26.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

11.37 (s, 1 H, NH), 7.48 (d, *J* = 1.2, 1 H, 6-H), 4.43 (t, *J* = 6.1, 2 H, 1'-H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>), 4.26 (t, *J* = 6.1, 2 H, 5'-H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>), 2.80 - 2.77 (m, 2 H, 4'-H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>), 2.11 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.75 (d, *J* = 1.2, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ/ppm):

219.3 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-6'), 170.4 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2'), 164.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 151.2 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2), 140.1 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-6), 108.7 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 65.6 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-4'), 64.6 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-1'), 45.2 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-1'), 29.4 (C<sub>p</sub>, 1 C, 6'-CH<sub>3</sub>), 12.3 (C<sub>p</sub>, 1 C, 5-CH<sub>3</sub>).

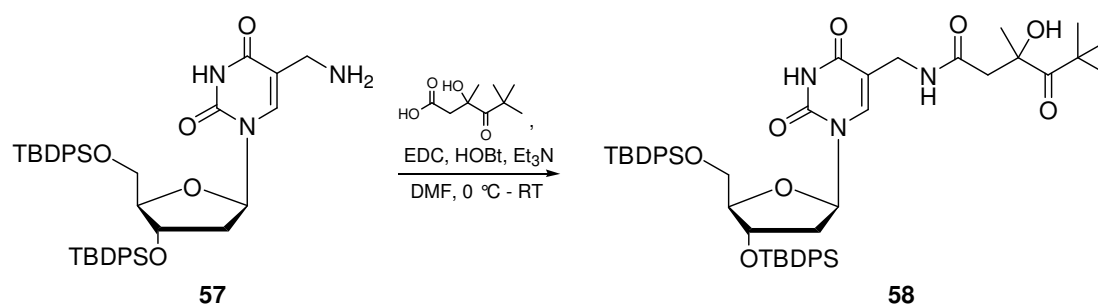
MS (LCQ, m/z):

255 (M<sup>+</sup>, 100), 253 (M<sup>-</sup>, 100).

## 5.2 Synthese des modifizierten Thymidin-Derivates T\*

Die Synthese wurde von Barbara Carl entwickelt und ausgearbeitet.<sup>[86]</sup> Es werden die relevanten Verbindungen aufgeführt, die für diese Arbeit von Bedeutung sind.

### 5.2.1 3',5'-Di-O-(tert-butyldiphenyl)silyl- $\alpha$ -(3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino)-thymidin (**58**)



Aminothymidin **57** (270 mg, 0.37 mmol), 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure **46** (69 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq), HOBT (59 mg, 0.44 mmol, 1.2 eq), EDC (78 mg, 0.41 mmol, 1.1 eq) und Triethylamin (37 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) wurden bei 0 °C in 8 ml abs. DMF gelöst und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und das Rohprodukt von den Reagenzien mittels Säulenfiltration abgetrennt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1). Das Rohprodukt wurde anschließend chromatographisch an Kieselgel (Hexan/EE = 3:1 → 2:1) gereinigt, und man erhielt 234 mg (0.26 mmol, 70%) des Produktes **58** als farblosen Schaum.

C<sub>51</sub>H<sub>65</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub> (904.25).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1) = 0.18.

Elementaranalyse x 2 H<sub>2</sub>O:

ber.: C 65.11, H 7.34, N 4.47, O 14.15; gef.: C 64.80, H 7.03, N 4.36, O nicht gemessen wegen Si.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ /ppm):

8.25, 8.24 (2 s, je 1 H, NH), 7.62 - 7.27 (m, je 21 H, 6-H, H<sub>ar</sub>), 6.40 - 6.33 (m, je 1 H, 1'-H), 4.49 - 4.44 (m, je 1 H, 3'-H), 4.02 (m, je 1 H, 4'-H), 3.73 - 3.62 (m, je 3 H, 5'-H<sub>a</sub> und 1''-H), 3.37 - 3.32 (m, je 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.73, 2.70 (2 d, je 1 H, *J* = 14.7 bzw. 14.8, 4''-H<sub>a</sub>), 2.39 - 2.32

(m, je 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.15, 2.14 (2 d, je 1 H, *J* = 14.7 bzw. 14.7, 4''-H<sub>b</sub>), 1.97 - 1.86 (m, je 1 H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.29, 1.27 (2 s, je 3 H, 5''-CH<sub>3</sub>), 1.22, 1.21 (2 s, je 9 H, 5''-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.07, 0.92 (2 s, je 9 H, <sup>t</sup>Bu von TBDPS).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

219.65, 219.62 (2 C<sub>q</sub>, je 1 C, C-6''), 172.95, 172.87 (2 C<sub>q</sub>, je 1 C, C-3''), 164.33 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-4), 150.64 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-2), 139.04 (C<sub>t</sub>, 2 C, C-6), 136.13, 135.83, 130.35, 128.28 (2 x 24 C, C<sub>ar</sub>), 111.28 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-5), 88.46, 88.40 (2 C<sub>t</sub>, je 1 C, C-4'), 86.16, 86.02 (2 C<sub>t</sub>, je 1 C, C-1'), 81.47 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-5''), 74.35, 74.26 (2 C<sub>t</sub>, je 1 C, C-4'), 64.41, 64.32 (2 C<sub>s</sub>, je 1 C, C-5'), 45.34, 45.32 (2 C<sub>q</sub>, je 1 C, C-7''), 41.53 (C<sub>s</sub>, 2 C, C-2'), 36.67, 36.60 (2 C<sub>s</sub>, je 1 C, C-1''), 27.64, 27.60 (2 C<sub>p</sub>, je 1 C, 7''-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.31, 27.28 (C<sub>p</sub>, je 6 C, <sup>t</sup>Bu von TBDPS), 19.59, 19.41 (C<sub>q</sub>, je 1 C, <sup>t</sup>Bu von TBDPS).

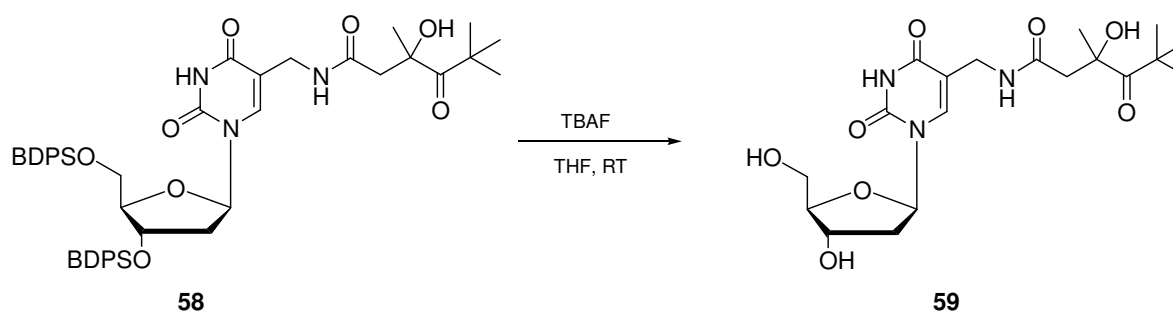
IR (KBr, ν/cm<sup>-1</sup>):

3338, 3198, 3071, 2932, 2858, 1960, 1890, 1830, 1692, 1589, 1522, 1472, 1428, 1391, 1363, 1322, 1276, 1195, 1113, 1032, 999, 969, 823, 796, 7740, 701, 612, 507, 488, 420.

MS (FAB, m/z):

904 (MH<sup>+</sup>, 5), 818 (4), 312 (21), 269 (9), 239 (11), 226 (25), 197 (33), 135 (100), 57 (<sup>t</sup>Bu, 18).

### 5.2.2 α-[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**59**)



Nukleosid **58** (750 mg, 0.82 mmol) wurde unter Argon in 10 ml abs. THF gelöst. Nach Zugabe einer 1 M TBAF-Lösung (2.18 ml, 2.18 mmol, 2.6 eq) wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend bei RT im Vakuum entfernt und der

Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1). Man erhielt 237 mg (0.56 mmol, 68%) eines farblosen Schaums.

C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> (427.45).

Elementaranalyse x 0.25 H<sub>2</sub>O:

ber.: C 52.83, H 6.83, N 9.72, O 29.94; gef.: C 51.70, H 6.87, N 9.22, O -.

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1) = 0.15.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

7.92, 7.89 (2 s, je 1 H, 6-H), 6.27, 6.26 (2 t, *J* = 6.8 bzw. 6.8, je 1 H, 1'-H), 4.41 - 4.37 (m, je 1 H, 3'-H), 4.03 - 3.97 (m, je 2 H, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 3.93 - 3.90 (m, je 1 H, 4'-H), 3.81 - 3.71 (m, je 2 H, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 2.89, 2.88 (2 d, *J* = 14.8 bzw. 14.7, je 1 H, 4''-H<sub>a</sub>), 2.35, 2.34 (2 d, *J* = 14.8 bzw. 14.7, je 1 H, 4''-H<sub>b</sub>), 2.28 - 2.18 (m, je 2 H, 2'-H), 1.34, 1.33 (2 s, je 3 H, 5''-CH<sub>3</sub>), 1.26, 1.25 (2 s, je 9 H, <sup>t</sup>Bu).

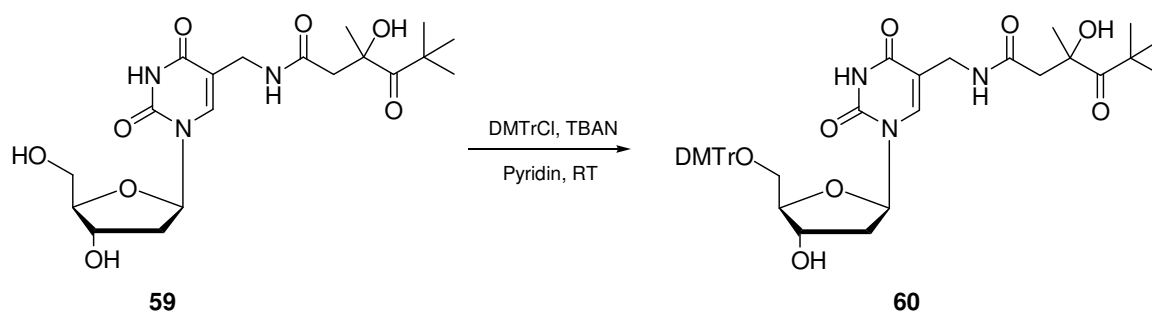
<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

220.07, 220.02 (2 C<sub>q</sub>, je 1 C, C-3''), 174.01, 173.98 (2 C<sub>q</sub>, je 1 C, C-6''), 165.40, 165.18 (2 C<sub>q</sub>, je 1 C, C-4), 152.14 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-2), 140.00, 139.90 (2 C<sub>t</sub>, je 1 C, C-6), 112.10, 112.03 (2 C<sub>q</sub>, je 1 C, C-5), 88.97 (C<sub>t</sub>, 2 C, C-4'), 86.58, 86.56 (2 C<sub>t</sub>, je 1 C, C-1'), 81.89, 81.88 (2 C<sub>q</sub>, je 1 C, C-5''), 72.36, 72.28 (C<sub>t</sub>, je 1 C, C-3'), 63.00, 62.93 (2 C<sub>s</sub>, je 1 C, C-5'), 46.99, 46.92 (2 C<sub>s</sub>, je 1 C, C-4''), 46.00 (C<sub>q</sub>, 2 C, C-7''), 41.26, 41.20 (2 C<sub>s</sub>, je 1 C, C-2'), 36.84, 36.76 (2 C<sub>s</sub>, je 1 C, C-1''), 27.94 (C<sub>p</sub>, 2 C, 5''-CH<sub>3</sub>), 27.83, 27.80 (2 C<sub>p</sub>, je 3 C, <sup>t</sup>Bu).

MS (FAB, m/z):

428 (MH<sup>+</sup>, 32), 312 (25), 226 (27), 186 (100), 117 (30), 57 (<sup>t</sup>Bu, 28), 43 (22).

### 5.2.3 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- $\alpha$ -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amino]-thymidin (**60**)



Das entschützte Nucleosid **59** (200 mg, 0.47 mmol) wurde dreimal mit je 8 ml abs. Pyridin koevaporiert und anschließend 60 min im Hochvakuum getrocknet. Danach wurde das Nucleosid unter Argon in 20 ml abs. Pyridin gelöst und Dimethoxytritylchlorid (316 mg, 0.93 mmol, 2.0 eq) sowie Tetrabutylammoniumnitrat (215 mg, 0.76 mmol, 1.5 eq) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 15 h bei RT gerührt und mit 5 ml MeOH gequenchet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert und im Hochvakuum getrocknet. Nach Aufnahme des Feststoffs in 35 ml Methylenchlorid wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$  30:1:0.03  $\rightarrow$  20:1:0.02). Man erhielt 175 mg (0.24 mmol, 50%) des farblosen Schaums **60**.

$\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{10}$  (729.82).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1) = 0.15.

Elementaranalyse x 0.25  $\text{H}_2\text{O}$ :

ber.: C 65.83, H 6.49, N 5.76, O 21.92; gef.: C 65.43, H 6.46, N 5.71, O nicht gemessen.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

7.73, 7.72 (2 b s, je 1 H, 6-H), 7.43 - 6.86 (m, 2 x 13 H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.25 (m, 2 x 1 H, 1''-H), 4.44 (m, 2 x 1 H, 3''-H), 3.99 (m, 2 x 1 H, 4''-H), 3.78 (2s, je 3 H, ar- $\text{OCH}_3$ ), 3.63 (A von AB,  $J = 14.6$ , 2 x 1H, 1''- $\text{H}_a$ ), 3.59 (B von AB,  $J = 14.6$ , 2 x 1 H, 1''- $\text{H}_a$ ), 3.36 (m, 2 x 2 H, 5''-H), 2.72 (2d,  $J = 14.7$ , 2 x 1 H, 4''- $\text{H}_a$ ), 2.31 (m, 2 x 2 H, 2''-H), 2.18 (2 d,  $J = 14.7$ , 2 x 1 H, 4''- $\text{H}_b$ ), 1.28, 1.27 (2s, 2 x 3 H, 5''- $\text{CH}_3$ ), 1.22 (s, 2 x 9 H,  $^t\text{Bu}$ ).

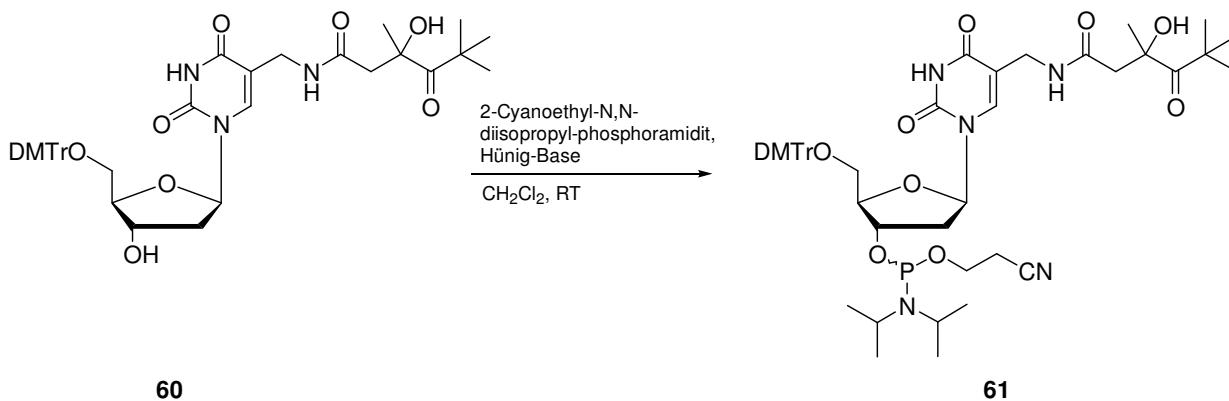
$^{13}\text{C}$ -NMR (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

219.95, 219.85 (2  $\text{C}_q$ , je 1 C, C-6"), 173.80, 173.70 (2  $\text{C}_q$ , je 1 C, C-3"), 165.10 ( $\text{C}_q$ , 2 C, C-4), 160.20 ( $\text{C}_q$ , 4 C,  $\underline{\text{C}}_{\text{ar-O}^{\text{Me}}}$ ), 152.10 ( $\text{C}_q$ , 2 C, C-2), 146.20 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $^{\text{ipso}}\text{C}_{\text{Phenyl}}$ ), 140.60, 140.40 (2  $\text{C}_t$ , je 1 C, C-6), 136.90 ( $\text{C}_q$ , 4 C,  $^{\text{ipso}}\text{C}_{\text{ar}}$ ), 131.40, 129.40, 128.90, 128.00, 114.20 ( $\text{C}_t$ , 13 C,  $\text{C}_{\text{Phenyl, ar}}$ ), 111.86, 111.81 ( $\text{C}_q$ , je 1 C, C-5), 87.90 ( $\text{C}_q$ , 2 C, 5'- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C}\underline{\text{R}}_3$ ), 87.70 ( $\text{C}_t$ , 2 C, C-4"), 86.60 ( $\text{C}_t$ , 2 C, C-1'), 82.00, 81.90 (2  $\text{C}_q$ , je 1 C, C-5"), 72.50, 72.40 (2  $\text{C}_q$ , je 1 C, C-3"), 65.00 ( $\text{C}_s$ , 2 C, C-5'), 55.70 ( $\text{C}_p$ , 4C, ar-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 48.40 ( $\text{C}_s$ , 2 C, C-4"), 48.00 ( $\text{C}_q$ , 2 C, C-7"), 41.20 ( $\text{C}_s$ , 2 C, C-2'), 37.00, 36.90 (2  $\text{C}_s$ , je 1 C, C-1"), 27.87, 27.84 (2  $\text{C}_p$ , je 1 C, 5''- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 27.80, 27.74 (2  $\text{C}_p$ , je 3 C,  $^t\text{Bu}$ ).

MS (FAB + KCl, m/z):

769 ( $\text{MK}^+$ , 2), 303 (80), 242 (100), 154 (57), 136 (41), 102 (81), 39 (34).

#### 5.2.4 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- $\alpha$ -[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl amino]-thymidin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl-(*R,S*)-phosphoramidit (61)



Trityliertes Nucleosid **60** (100 mg, 0.14 mmol) wurde dreimal mit je 5 ml abs. Acetonitril ko-evaporiert und 60 min im HV getrocknet. Das Nucleosid wurde unter Argon in 5 ml abs. Methylenchlorid gelöst und mit Hünig-Base (98 mg, 0.75 mmol, 5.5 eq) sowie 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit (81 mg, 0.34 mmol, 2.5 eq) versetzt. Nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml MeOH gequenchet. Es wurde mit 25 ml Methylenchlorid verdünnt und zweimal mit je 25 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel

gereinigt (EE/Hexan/NEt<sub>3</sub> 1:1:0.02). Man erhielt 72 mg (0.08 mmol, 55%) des farblosen Schaums **61**.

C<sub>49</sub>H<sub>64</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P (930.03).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1) = 0.21 (Diastereomer **a**, 0.16 (Diastereomer **b**).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

7.64 (2 s, 1 H, NH), 7.42 - 7.40 (m, 2 H, *o*-H von Ph), 7.34 - 7.21 (m, 7H, 2 x *m*-H, *o*-H von Ph, *o*-H von PhOMe), 6.84 - 6.82 (m, 4 H, *m*-H von Ph), 6.28 - 6.26 (m, 1 H, 1'-H), 4.62 - 4.57 (m, 1 H, 3'-H), 4.12 - 4.11 (m, 1 H, 4'-H), 3.78 (s, 6 H, 2 x OCH<sub>3</sub>), 3.82 - 3.28 (m, 8 H, 1''-H<sub>a</sub> 1''-H<sub>b</sub>, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, N[CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], -POCH<sub>2</sub>-), 2.69 - 2.60 (m, 3 H, -CH<sub>2</sub>CN, 4''-H<sub>a</sub>), 2.55 - 2.51 (m, 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.31 - 2.25 (m, 1 H, 2'-H<sub>b</sub>), 2.12 (m, 1 H, 4''-H<sub>b</sub>), 1.30 - 1.22 (m, 24 H, N[CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 5''-CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

219.5 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-6''), 173.4 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-3''), 159.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 136.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-6), 130.6, 128.6, 128.4, 128.1, 127.5 (18 C, C<sub>ar</sub>), 113.5 (C<sub>q</sub>, 1 C, CN), 111.32 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 87.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, 5'-CR<sub>3</sub>), 86.1 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-4'), 85.7 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-1'), 81.3 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5''), 78.0 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-3'), 65.1 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-5'), 58.6 (C<sub>s</sub>, 1 C, -POCH<sub>2</sub>-), 51.6 (C<sub>p</sub>, 2 C, OCH<sub>3</sub>), 46.2 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-4''), 45.8 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-7''), 43.6 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-2'), 37.1 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-1''), 27.65 (C<sub>p</sub>, 3 C, <sup>t</sup>Bu), 24.1 (C<sub>p</sub>, 1 C, 5''-CH<sub>3</sub>), 23.3 (C<sub>p</sub>, 4 C, -N(<sup>i</sup>Pr)<sub>2</sub>), 20.5 (C<sub>s</sub>, 1 C, -CH<sub>2</sub>CN).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

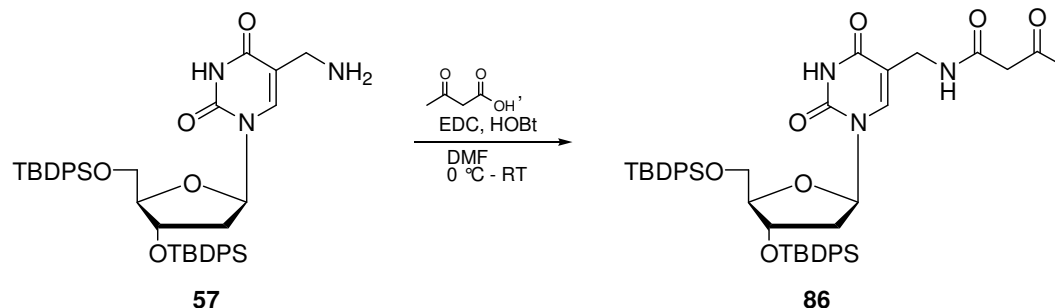
145.8 (Diastereomer **a**, 145.7 (Diastereomer **b**).

MS (LCQ, m/z):

952 (MNa<sup>+</sup>, 100), 303 (23), 929 (M<sup>+</sup>, 100).

## 5.3 Synthese der Referenzverbindungen

### 5.3.1 3',5'-Di-O-(*tert*-butyldiphenyl)silyl- $\alpha$ -(3-oxo-butanoyl-amino)-thymidin (**86**)



Aminothymidin **57** (500 mg, 0.68 mmol), EDC (170 mg, 0.89 mmol, 1.3 eq) und HOBT (110 mg, 0.82 mmol, 1.2 eq) wurden unter Argon in 5 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von Acetessigsäure (115 mg, 1.10 mmol, 1.6 eq) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0 °C innerhalb 10 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde in 20 ml Methylenchlorid aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel gereinigt (EE/Hexan 1:1). Man erhielt 200 mg (0.24 mmol, 36%) des farblosen Schaums **86**.

$\text{C}_{46}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}_2$  (817.32).

$R_f$  (EE/Hexan 1:2) = 0.51.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

8.30 (b s, 1 H, NH), 7.73 (s, 1 H, 6-H), 7.63 - 7.24 (m, 20 H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.44 (dd,  $J = 8.8, 5.2$ , 1 H, 1' -H), 4.51 (dt,  $J = 5.3, 1.2$ , 1 H, 3'-H), 4.43 (b d,  $J = 12.0$ , 1 H, 1''- $\text{H}_a$ ), 4.40 (b d,  $J = 12.0$ , 1 H, 1''- $\text{H}_b$ ), 4.01 (m, 1 H, 4'-H), 3.72 (dd,  $J = 11.7, 2.5$ , 1 H, 5'- $\text{H}_a$ ), 3.33 (dd,  $J = 11.7, 3.0$ , 1 H, 5'- $\text{H}_b$ ), 3.28 (s, 2 H, 4''-H), 2.41 (ddd,  $J = 12.9, 5.2, 1.1$ , 1 H, 2'  $\text{H}_a$ ), 2.41 (ddd,  $J = 12.9, 5.2, 1.1$ , 1 H, 2'- $\text{H}_a$ ), 2.17 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.96 (ddd,  $J = 13.2, 8.8, 5.7$ , 1 H, 2'- $\text{H}_b$ ), 1.08 (s, 9 H,  $^t\text{Bu}$  von TBDPS), 0.92 (s, 9 H,  $^t\text{Bu}$  von TBDPS).



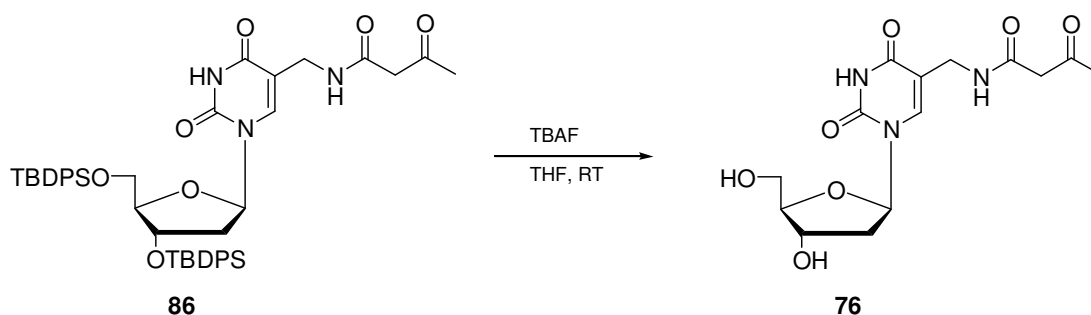
$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

200.6 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-5"), 167.0 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-3"), 162.2 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-4), 150.1 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-2), 141.2 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-6), 136.2, 136.1, 130.4, 128.3 (24 C,  $\text{C}_{ar.}$ ), 109.2 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-5), 88.5 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-4"), 86.0 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-1'), 74.4 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-3'), 64.4 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-5'), 60.1 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-1"), 50.1 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-4"), 41.9 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-2'), 30.4 ( $\text{C}_p$ , 1 C, C-6"), 27.28 ( $\text{C}_p$ , 6 C,  $^t\text{Bu}$ ), 19.5, 19.4 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $^t\text{Bu}$ ).

MS (FAB,  $m/z$ ):

819 ( $\text{MH}^+$ , 0.5), 269 (12), 197 (27), 135 (100).

### 5.3.2 $\alpha$ -(3-Oxo-butanoyl-amino)-thymidin (**76**)



Nukleosid **86** (150 mg, 0.18 mmol) wurde unter Argon in 10 ml abs. THF gelöst. Nach Zugabe einer 1 M TBAF-Lösung (1.79 ml, 1.79 mmol, 2.6 eq) wurde 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend bei RT im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1). Man erhielt 46 mg (0.14 mmol, 74%) des Produkts **76** als farbloses Öl.

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$  (341.32).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  15:1) = 0.17.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

7.93 (s, 1 H, 6-H), 6.28 (t,  $J = 6.6$ , 1'-H), 4.38 - 4.41 (m, 1 H, 3'-H), 4.07 - 4.05 (m, 2 H, 1''- $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_b$ ), 3.92 - 3.90 (m, 1 H, 4'-H), 3.79 - 3.71 (m, 2 H, 5'- $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_b$ ), 3.35 - 3.33 (m, 1 H, 4''- $\text{H}_a$ ), 3.31 - 3.29 (m, 1 H, 4''- $\text{H}_b$ ), 2.27 - 2.24 (m, 2 H, 2'- $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_b$ ), 2.21 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ).

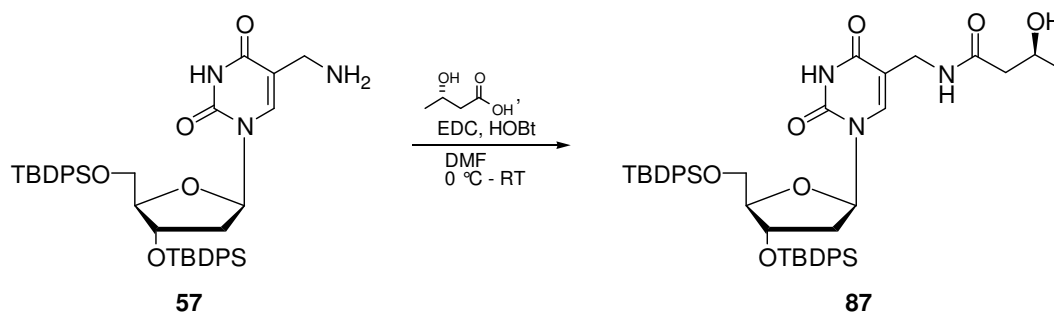
$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

204.1 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-5"), 169.4 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-3"), 164.1 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-4), 151.2 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-2), 137.5 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-6), 111.0 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-5), 87.0 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-4'), 85.4 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-1'), 71.3 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-3'), 62.0 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-5'), 58.6 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-4"), 40.1 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-2'), 36.0 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-1"), 29.31 ( $\text{C}_p$ , 1 C,  $\text{CH}_3$ ).

MS (FAB,  $m/z$ ):

342 ( $\text{MH}^+$ , 4), 186 (100), 117 (42).

### 5.3.3 3',5'-Di-O-(*tert*-butyldimethyl)silyl- $\alpha$ -(3-oxo-5-hydroxy-butanyl-amino)-thymidin (87)



Aminothymidin **57** (500 mg, 0.68 mmol), EDC (170 mg, 0.89 mmol) und HOBT (110 mg, 0.82 mmol) wurden in 8 ml abs. DMF bei 0 °C gelöst. Nach 15 min wurde eine Lösung von (*S*)-2-Hydroxy-buttersäure (114 mg, 1.09 mmol) in 5 ml abs. DMF über einen Zeitraum von 10 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde in 20 ml Methylenchlorid aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  30:1). Man erhielt 115 mg (0.14 mmol, 21 %) des farblosen Öls **87**.

$\text{C}_{46}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}_2$  (819.37).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1) = 0.52.

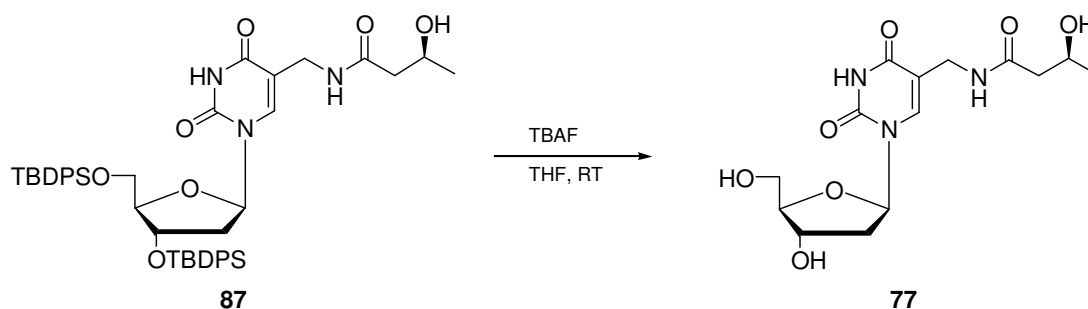
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

8.42 (b s, 1 H, NH), 7.61 (s, 1 H, 6-H), 7.59 - 7.26 (m, 20 H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.40 (dd,  $J = 8.8, 5.2$ , 1 H, 1' -H), 4.49 (m, 1 H, 3'-H), 4.06 (m, 1 H, 5''-H), 4.02 (m, 1 H, 4'-H), 3.77 (m, 2 H, 1''- $\text{H}_a$ , 1''- $\text{H}_b$ ), 3.71 (dd,  $J = 11.6, 2.4$ , 1 H, 5'- $\text{H}_a$ ), 3.33 (dd,  $J = 11.7, 2.9$ , 1 H, 5'- $\text{H}_b$ ), 3.28 (s, 2 H, 4''-H), 2.41 (m, 1 H, 2'  $\text{H}_a$ ), 2.41 (m, 1 H, 2'- $\text{H}_a$ ), 2.17 (m, 2 H, 4''- $\text{H}_a$ , 4''- $\text{H}_b$ ), 1.96 (m, 1 H, 2'- $\text{H}_b$ ), 1.15 (d,  $J = 6.0$ , 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.04 (s, 9 H,  $^t\text{Bu}$  von BDPS), 0.93 (s, 9 H,  $^t\text{Bu}$  von BDPS).

MS (FAB,  $m/z$ ):

820 ( $\text{MH}^+$ , 8), 506 (3), 269(10), 228 (71), 197 (30), 135 (100).

#### 5.3.4 $\alpha$ -(3-Oxo-5-hydroxy-butanoyl-amino)-thymidin (**77**)



Das geschützte Nukleosid **87** (115 mg, 0.14 mmol) wurde unter Argon in 10 ml abs. THF gelöst. Nach Zugabe einer 1 M TBAF-Lösung (0.39 ml, 0.39 mmol, 2.6 eq) wurde 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend bei RT im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  15:1  $\rightarrow$  10:1). Man erhielt 50 mg (0.12 mmol, 85%) des Produkts **77** als farblosen Schaum.

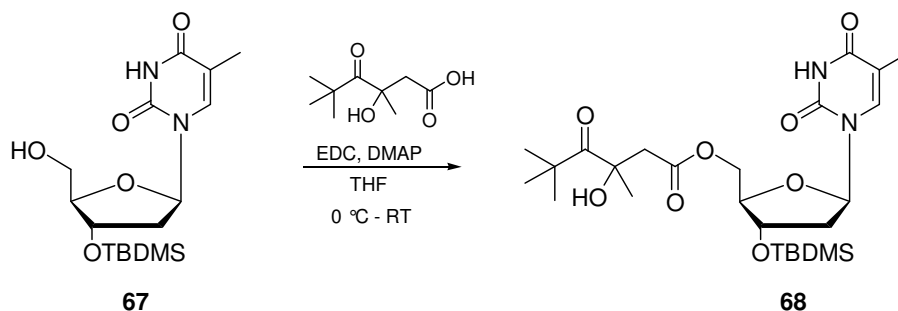
$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7$  (343.14).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1) = 0.11.

$^1\text{H-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

7.92 (b s, 1 H, NH), 7.77 (s, 1 H, 6-H), 6.40 (t,  $J = 6.6$ , 1 H, 1' -H), 4.50 (m, 1 H, 3'-H), 4.15 (m, 1 H, 5''-H), 4.04 (m, 1 H, 4'-H), 3.88 (m, 2 H, 1''- $\text{H}_a$ , 1''- $\text{H}_b$ ), 3.73 (m, 2 H, 5'- $\text{H}_a$ , 5'- $\text{H}_b$ ), 2.32 (m, 1 H, 2'  $\text{H}_a$ ), 2.18 (m, 3 H, 2'  $\text{H}_a$ , 4''- $\text{H}_a$ , 4''- $\text{H}_b$ ), 1.18 (d,  $J = 6.0$ , 3 H,  $\text{CH}_3$ ).

### 5.3.5 3'-*O*-(*tert*-Butyldimethyl)silyl-5'[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl]-thymidin (**68**)



3'-TBDMS-geschütztes Thymidin **67** (360 mg, 1.06 mmol), EDC (251 mg, 1.31 mmol, 1.3 eq) und DMAP (84 mg, 0.61 mmol, 0.6 eq) wurden unter Argon in 5 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (200 mg, 1.06 mmol, 1.0 eq) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0 °C innerhalb 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde in 20 ml Methylenchlorid aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (Hexan/Essigester 1:2). Es wurden 165 mg (0.32 mmol, 30%) des farblosen Schaums **68** erhalten.

$C_{25}H_{42}N_2O_8Si$  (526.27).

$R_f$  (Hexan/Essigester 1:2) = 0.21.

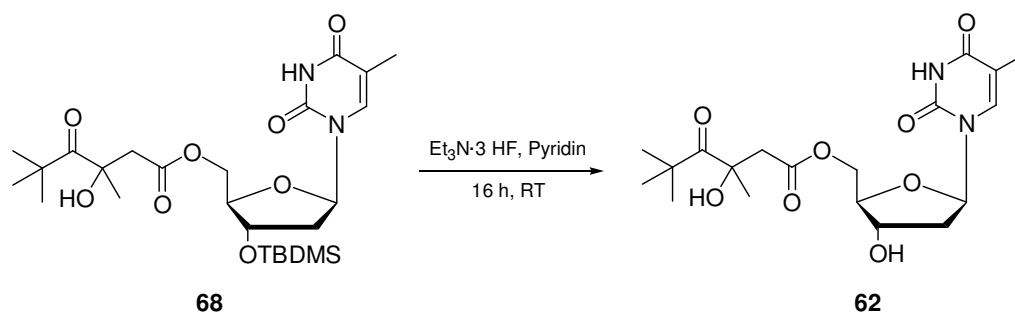
$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ /ppm):

8.81 (s, 1 H, NH), 7.30 (s, 1 H, 6-H), 6.28 (t,  $J = 6.8$ , 1 H, 1'-H), 4.44 (dd,  $J = 12.2$ , 3.8, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 4.31 (m, 1 H, 3'-H), 4.22 (dt,  $J = 12.3$ , 3.5, 1 H, 4'-H), 4.04 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.17 (A von AB,  $J = 16.7$ , 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 2.51 (B von AB,  $J = 16.5$ , 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 2.28 (m, 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.12 (m, 1 H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.95 (s, 3 H, 5-CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 3 H, 4''-CH<sub>3</sub>), 1.31 (s, 9 H, 5''-<sup>t</sup>Bu), 0.89 (s, 9 H, <sup>t</sup>Bu von TBDMS), 0.09 (s, 3 H, CH<sub>3</sub> von TBDMS), 0.08 (s, 3 H, CH<sub>3</sub> von TBDMS).

MS (LCQ, m/z):

527 ( $M^+$ , 100), 525 ( $M^-$ , 100).

### 5.3.6 5'-[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl]-thymidin (**62**)



Das TBDMS-geschützte Nucleosid **68** (65 mg, 0.12 mmol) wurde in 2 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin-trihydrofluorid (41  $\mu$ l, 0.25 mmol) wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1). Man erhielt 50 mg (0.12 mmol, 98%) des Produkts **62** als farblosen Schaum.

$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8$  (412.18).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1) = 0.09.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

9.18, 9.12 (2 s, 2 x 1 H, NH), 7.32, 7.28 (2 d,  $J = 1.0$ , 2 x 1 H, 6-H), 6.30, 6.28 (2 t,  $J = 6.8$ , 2 x 1 H, 1'-H), 4.56 (dd,  $J = 12.1, 4.0$ , 1 H, 5'-H<sub>a</sub> von Diastereomer 1), 4.40 (m, 2 x 1 H + 1 H, 3'-H, 5'-H<sub>a</sub> von Diastereomer 2), 4.29, 2.23 (2 dd,  $J = 12.1, 4.0$ , 2 x 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 4.14, 4.06 (2 q,  $J = 4.0$ , 2 x 1 H, 4'-H), 3.17 (A von AB,  $J = 13.4$ , 2 x 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 2.55, 2.52 (B von AB,  $J = 16.5$ , 2 x 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 2.45 (m, 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.20 (m, 1 H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.96, 1.94 (2 d,  $J = 1.2$ , 2 x 3 H, 5-CH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 2 x 3 H, 4''-CH<sub>3</sub>), 1.31 (2 s, 2 x 9 H, 5''-<sup>t</sup>Bu).

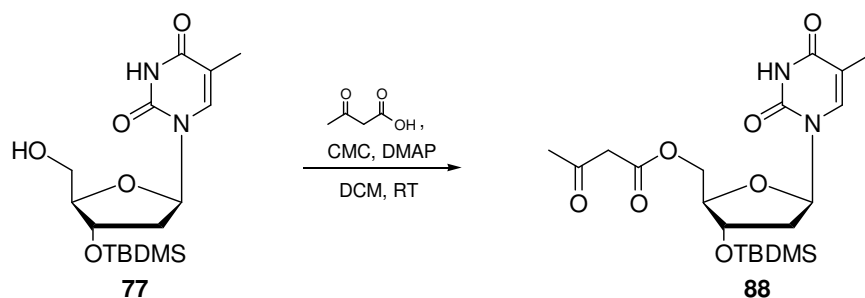
$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

220.1, 219.8 (2 x C<sub>q</sub>, 2 x 1 C, C-5''), 173.7, 173.1 (2 x C<sub>q</sub>, 2 x 1 C, C-1''), 164.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 150.8 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2), 135.8 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-6), 111.8 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 85.6 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-1'), 84.2 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-3'), 80.9 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-3''), 71.9 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-4'), 64.5 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-5'), 53.8 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-6''), 45.3 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-2''), 40.5 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-2'), 28.1 (C<sub>p</sub>, je 3 C, <sup>t</sup>Bu), 26.9 (C<sub>p</sub>, 3 C, 3''-CH<sub>3</sub>), 12.9 (C<sub>p</sub>, 3 C, 5-CH<sub>3</sub>).

MS (LCQ, m/z):

413 ( $\text{M}^+$ , 100), 411 ( $\text{M}$ , 100).

### 5.3.7 3'-O-(tert-Butyldimethyl)silyl-5'-[3-oxo-butanoyl]- thymidin (**88**)



3'-TBDMS-geschütztes Thymidin **77** (300 mg, 0.84 mmol), CMC (662 mg, 1.68 mmol) und DMAP (22 mg, 0.17 mmol) wurden unter Argon in 5 ml abs. Methylenchlorid gelöst. Eine Lösung von Acetessigsäure (172 mg, 1.68 mmol) in 3 ml abs. Methylenchlorid wurde innerhalb 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde in 30 ml Essigester aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Essigsäure und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (Hexan/Essigester 1:2). Es wurden 340 mg (0.77 mmol, 92%) des farblosen Schaums **88** erhalten.

$C_{20}H_{32}N_2O_7Si$  (440.20).

$R_f$  (Essigester/Hexan 2 : 1) = 0.39.

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ /ppm):

8.66 (s, 1 H, NH), 7.24 (d,  $J = 1.2$ , 1 H, 6-H), 6.25 (t,  $J = 6.8$ , 1 H, 1'-H), 4.44 - 4.29 (m, 3 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H<sub>a</sub>), 4.04 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.53 (s, 2 H, 3''-H<sub>a</sub>, 3''-H<sub>b</sub>), 2.31 (m, 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.28 (s, 3 H, 5''-CH<sub>3</sub>), 2.12 (m, 1 H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.94 (d,  $J = 1.3$ , 3 H, 5-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9 H, <sup>t</sup>Bu), 0.09, 0.08 (2 s, je 3 H, CH<sub>3</sub> von TBDMS).

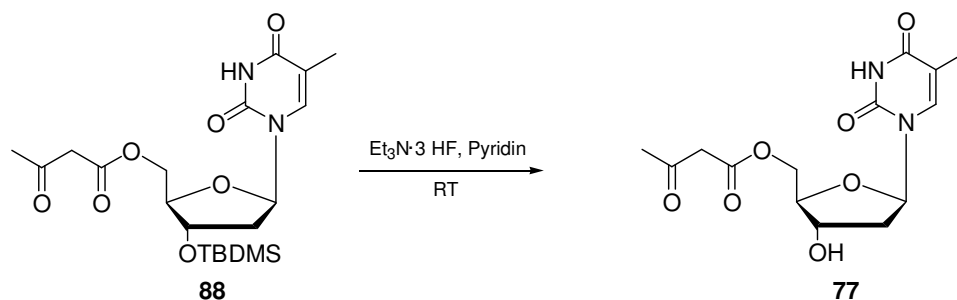
$^{13}C$ -NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ /ppm):

200.3 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4''), 166.9 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2''), 163.9 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 150.5 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2), 135.9 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-6), 111.6 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 85.6 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-4'), 84.7 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-1'), 71.9 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-3'), 64.2 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-5'), 50.3 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-3''), 41.0 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-2'), 30.7 (C<sub>p</sub>, 3 C, 5''-CH<sub>3</sub>), 26.1 (C<sub>p</sub>, 9 C, <sup>t</sup>Bu), 12.9 (C<sub>p</sub>, 1 C, 5-CH<sub>3</sub>), -4.3, -4.5 (2 x C<sub>p</sub>, je 3 C, CH<sub>3</sub> von TBDMS).

MS (LCQ, m/z):

441 ( $M^+$ , 100), 439 ( $M^-$ , 100).

### 5.3.8 5'-[3-Oxo-butanoyl]- thymidin (**77**)



Das TBDMS-geschütztes Nucleosid **88** (300 mg, 0.68 mmol) wurde in 8 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin-trihydrofluorid (243  $\mu$ l, 1.5 mmol) wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum eingedunstet. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1). Man erhielt 207 mg (0.63 mmol, 93%) des Produkts **77** als farblosen Schaum.

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7$  (326.11).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1) = 0.10.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

11.29 (s, 1 H, NH), 7.40 (s, 1 H, 6-H), 6.18 (t,  $J = 6.6$ , 1 H, 1'-H), 5.39 (m, 1 H, 3'-H), 4.25 (m, 2 H, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 3.92 (m, 1 H, 4'-H), 3.66 (s, 2 H, 3'-H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>), 2.20 (m, 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.18 (s, 3 H, 4''-CH<sub>3</sub>), 2.08 (m, 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 1.79 (s, 3 H, 5-CH<sub>3</sub>).

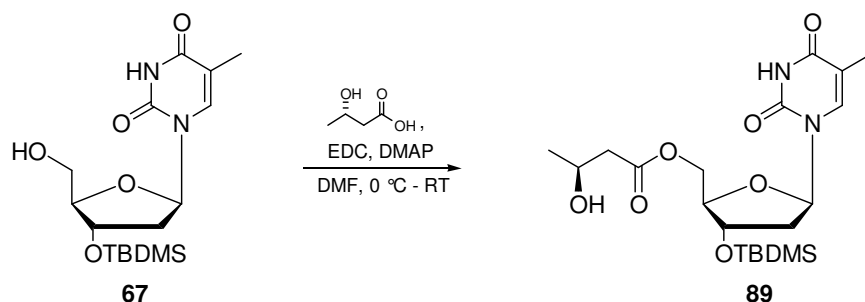
$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

202.4 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-4''), 167.9 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-2''), 164.5 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-4), 151.3 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-2), 136.7 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-6), 110.7 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-5), 84.6 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-1'), 84.4 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-3'), 71.1 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-4'), 65.4 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-5'), 50.4 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-3''), 39.8 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-2'), 30.9 ( $\text{C}_p$ , 3 C, 4''-CH<sub>3</sub>), 12.6 ( $\text{C}_p$ , 1 C, 5-CH<sub>3</sub>).

MS (LCQ, m/z):

327 ( $M^+$ , 100), 325 ( $M^-$ , 100).

### 5.3.9 3'-O-(*tert*-Butyldimethyl)silyl-5'-(3-hydroxy-butanoyl)-thymidin (**89**)



Das geschützte Thymidin **67** (400 mg, 1.12 mmol), EDC (279 mg, 1.46 mmol) und DMAP (93 mg, 0.67 mmol) wurden in 10 ml abs. DMF bei 0 °C gelöst. Nach 15 min wurde eine Lösung von (*S*)-2-Hydroxy-buttersäure (187 mg, 1.79 mmol) in 5 ml abs. DMF über einen Zeitraum von 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde in 20 ml Methylenchlorid aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (Hexan/Essigester 1:1 → 1:2). Man erhielt 446 mg (1.0 mmol, 90 %) des farblosen Schaums **89**.

$C_{20}H_{34}N_2O_7Si$  (442.21).

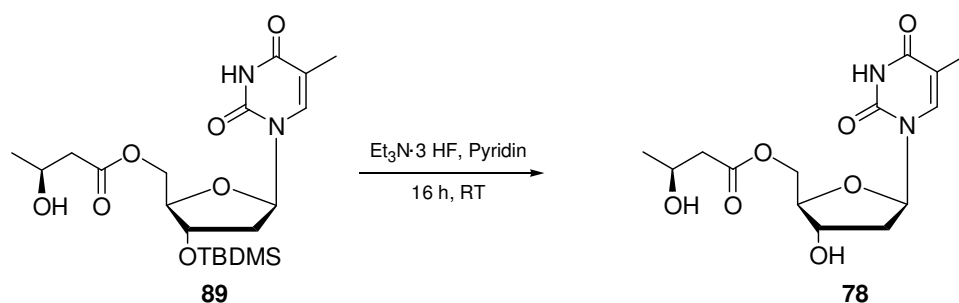
$R_f$  (Essigester/Hexan 2:1) = 0.54.

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ /ppm):

8.60 (s, 1 H, NH), 7.35 (d,  $J = 1.3$ , 1 H, 6-H), 6.12 (t,  $J = 6.6$ , 1 H, 1'-H), 4.49 (m, 1 H, 3'-H), 4.32 (m, 2 H, 4'-H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.92 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.76 (m, 1 H, 4''-H), 2.50 (m, 2 H, 3''-H<sub>a</sub>, 3''-H<sub>b</sub>), 2.35 (m, 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.20 (m, 2'-H<sub>b</sub>), 1.90 (d,  $J = 1.0$ , 3 H, 5-CH<sub>3</sub>), 1.25 (d,  $J = 6.2$ , 3 H, 4''-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9 H, <sup>t</sup>Bu), 0.08 (s, 6 H, 2 x CH<sub>3</sub> von TBDMS).



### 5.3.10 5'-(3-Hydroxy-butanoyl)-thymidin (78)



Das TBDMS-geschützte Nukleosid **89** (446 mg, 1.00 mmol) wurde in 5 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin-tris-hydrofluorid (362  $\mu\text{l}$ , 2.01 mmol) wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum eingedunstet. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1  $\rightarrow$  10:1). Man erhielt 125 mg (0.39 mmol, 39%) des Produkts **78** als farblosen Schaum.

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$  (328.13).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1) = 0.28.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

11.17 (s, 1 H, NH), 7.50 (s, 1 H, 6-H), 6.26 (t,  $J = 6.4$ , 1 H, 1'-H), 4.40 (m, 2 H, 3'-H, 5'-H<sub>a</sub>), 4.28 (m, 1 H, 4'-H), 4.19 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 4.06 (m, 1 H, 4''-H), 2.48 (s, 2 H, 3''-H<sub>a</sub>, 3''-H<sub>b</sub>), 2.40 (m, 1 H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.27 (m, 1 H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.90 (s, 3 H, 4''-CH<sub>3</sub>), 1.23 (s, 3 H, 5-CH<sub>3</sub>).

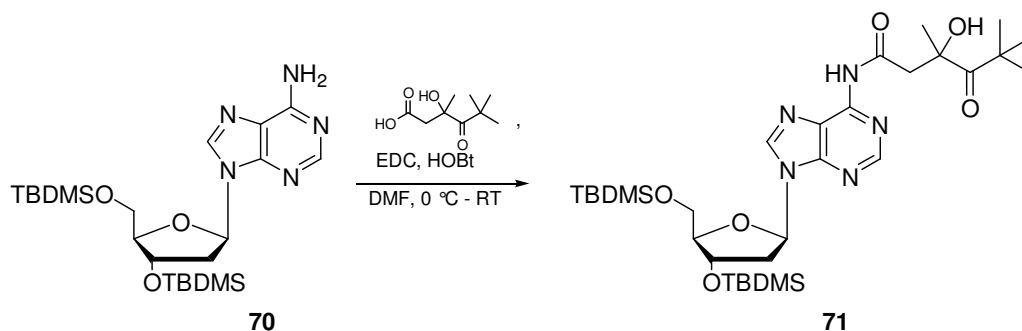
$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

171.9 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2''), 165.3 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 151.3 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2), 136.7 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-6), 110.8 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-5), 85.6 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-1'), 84.7 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-3'), 71.3 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-4'), 64.5 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-5'), 64.0 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-4''), 44.0 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-3''), 39.6 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-2'), 22.4 (C<sub>p</sub>, 3 C, 4''-CH<sub>3</sub>), 11.6 (C<sub>p</sub>, 1 C, 5-CH<sub>3</sub>).

MS (LCQ,  $m/z$ ):

329 ( $\text{M}^+$ , 100), 327 ( $\text{M}^-$ , 100).

**5.3.11 3',5'-Di-O-(*tert*-butyldimethyl)silyl-6-[(*R,S*)-3-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amido]-adenosin (**71**)**

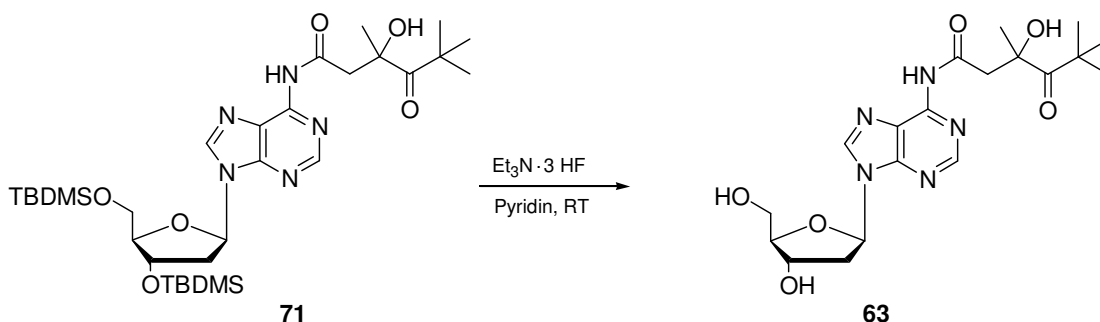


Nukleosid **70** (145 mg, 0.30 mmol), EDC (75 mg, 0.39 mmol, 1.3 eq) und HOBT (50 mg, 0.36 mmol, 1.2 eq) wurden unter Argon in 5 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (115 mg, 1.10 mmol, 1.6 eq) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0 °C innerhalb 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt, der Rückstand wurde in 20 ml Methylenchlorid aufgenommen. Es wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1). Man erhielt 64 mg (0.10 mmol, 35%) des farblosen Öls **71**, das sofort weiter umgesetzt wurde.

C<sub>31</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub> (649.97).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1) = 0.18.

### 5.3.12 6-[(*R,S*)-3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexanoyl-amido]-adenosin (**63**)



Das geschützte Nukleosid **71** (64 mg, 0.10 mmol) wurde unter Argon in 5 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 90  $\mu$ l Triethylamin-tris-hydrofluorid (0.49 mmol, 5.0 eq) wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1). Man erhielt 10 mg (0.24 mmol, 25%) des farblosen Öls **63**. Die Reinigung des Produktes erfolgte mittels RP-HPLC.  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_6$  (421.45).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  4:1) = 0.69.

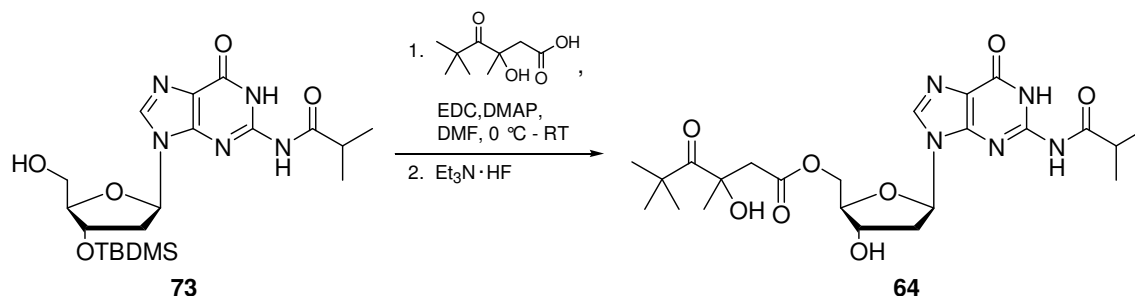
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

8.61 (s, 1 H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 8.59 (d,  $J = 2.0$ , 1 H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.52 (t,  $J = 6.6$ , 1 H, 1'-H), 4.60 - 4.58 (m, 1 H, 3'-H), 4.06 - 4.04 (m, 1 H, 4'-H), 3.84 (dd,  $J = 12.1, 3.3$ , 1 H, 5'- $\text{H}_a$ ), 3.75 (dd,  $J = 12.0, 3.2$ , 1 H, 5'- $\text{H}_b$ ), 3.36 (d,  $J = 17.0$ , 1 H, 2''- $\text{H}_a$ ), 2.81 (d,  $J = 17.0$ , 1 H, 2''- $\text{H}_b$ ), 2.49 - 2.45 (m, 2 H, 2'- $\text{H}_a$ , 2'- $\text{H}_b$ ), 1.45 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.31 (s, 9 H,  $^t\text{Bu}$ ).

MS (LCQ,  $m/z$ ):

420 ( $M^+$ , 100), 841 ( $2 M^+$ , 40).

**5.3.13 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-3-hydroxy-5-(2-isobutrylamino-6-oxo-1,6-dihydro-purin-9-yl)-tetrahydro-furan-2-ylmethylester (64)**



Das geschützte Guanosin-Derivat **73** (316 mg, 0.70 mmol), EDC (174 mg, 0.91 mmol) und DMAP (58 mg, 0.42 mmol) wurden unter Argon in 5 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure (100 mg, 0.53 mmol) in 3 ml abs. DMF wurde bei 0 °C innerhalb 10 min zutropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt. Das Rohprodukt wurde unter Argon in 5 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 40 µl Triethylamin-tris-hydrofluorid (0.25 mmol) wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1). Man erhielt 45 mg (0.24 mmol, 14%) des farblosen Öls **64**.

C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> (507.23)

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1) = 0.14.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ/ppm):

8.10 (s, 1 H, 6-H), 6.29 (t, *J* = 6.4, 1 H, 1'-H), 4.50 (m, 1 H, 3'-H), 4.27 (m, 2 H, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 4.10 (m, 1 H, 4'-H), 3.00 (d, *J* = 17.1, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 2.75 - 2.70 (m, 2 H, 2'-H<sub>a</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.44 - 2.48 (m, 2 H, 2'-H<sub>b</sub>, 3''-H<sub>b</sub>), 1.32 (s, 3 H, 4''-CH<sub>3</sub>), 1.22 (s, 9 H, <sup>t</sup>Bu), 1.19, 1.18 (2 s, 6 H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ/ppm):

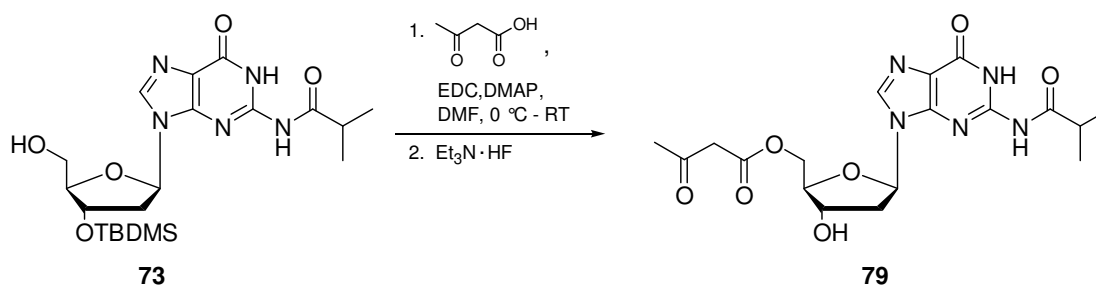
208.2, 208.0 (2 x C<sub>q</sub>, 2 x 1 C, C-5''), 180.3 (C<sub>q</sub>, NHCOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 171.4, 171.1 (2 x C<sub>q</sub>, 2 x 1 C, C-2''), 169.4 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-8), 156.4 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2), 148.8 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 138.0 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-6), 120.5 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-7), 84.5 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-4'), 84.3 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-1'), 79.9 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4''), 71.4 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-3'), 63.6 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-5'), 45.7 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-3''), 44.7 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-6''), 39.4 (C<sub>s</sub>, 1 C,

C-2'), 35.5 (C<sub>t</sub>, 1 C, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.8 (C<sub>p</sub>, 1 C, 4''-CH<sub>3</sub>), 26.4 (C<sub>p</sub>, je 3 C, <sup>t</sup>Bu), 18.0 (C<sub>p</sub>, 2 C, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (LCQ, m/z):

1037 (2 MNa<sup>+</sup>, 100), 530 (MNa<sup>+</sup>, 40).

### 5.3.14 3-Oxo-butansäure-3-hydroxy-5-(2-isobutyrylamino-6-oxo-1,6-dihydro-purin-9-yl)-tetrahydro-furan-2-ylmethylester (79)



Das geschützte Guanosin-Derivat **73** (500 mg, 1.11 mmol), EDC (275 mg, 1.44 mmol) und DMAP (92 mg, 0.66 mmol) wurden unter Argon in 8 ml abs. DMF gelöst. Eine Lösung von Acetessigsäure (181 mg, 1.77 mmol) in 5 ml abs. DMF wurde bei 0 °C innerhalb 10 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt. Das Rohprodukt wurde unter Argon in 5 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Triethylamin-tris-hydrofluorid (0.56 mmol) wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1). Man erhielt 174 mg (0.24 mmol, 38%) des farblosen Öls **79**.

C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (421.16)

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1) = 0.11.

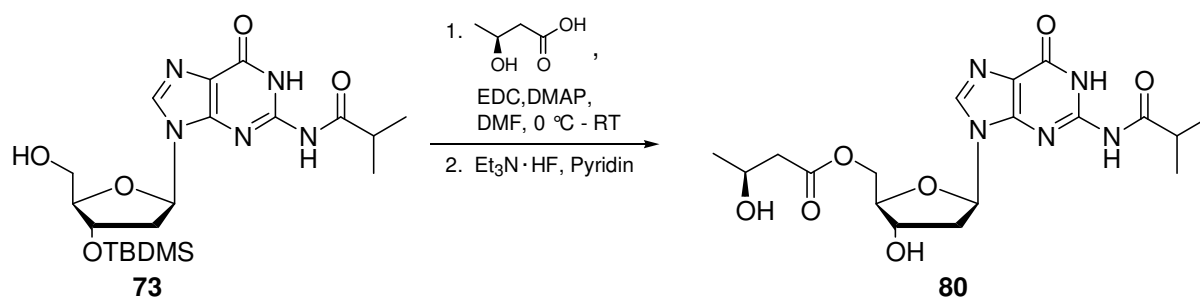
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ/ppm):

8.09 (s, 1 H, 6-H), 6.34 (t, *J* = 6.2, 1 H, 1'-H), 4.55 (m, 1 H, 3'-H), 4.40 - 4.32 (m, 2 H, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 4.15 (m, 1 H, 4'-H), 3.56 (m, 2 H, 3''-H<sub>a</sub>, 3''-H<sub>b</sub>), 2.80 - 2.70 (m, 2 H, 2'-H<sub>a</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.48 - 2.42 (m, 1 H, 2'-H<sub>b</sub>), 2.20 (s, 3 H, 4''-CH<sub>3</sub>), 1.24, 1.22 (2 s, 6 H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

206.4 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-4''), 180.7 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 171.8 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-2''), 169.9 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-8), 158.3 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-2), 149.4 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-4), 138.5 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-6), 124.2 ( $\text{C}_q$ , 1 C, C-7), 85.0 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-4'), 84.8 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-1'), 71.2 ( $\text{C}_t$ , 1 C, C-3'), 64.5 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-5'), 45.7 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-2''), 39.4 ( $\text{C}_s$ , 1 C, C-2'), 36.0 ( $\text{C}_t$ , 1 C,  $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.2 ( $\text{C}_p$ , 1 C, 4''- $\text{CH}_3$ ), 18.3, 18.2 (2 x  $\text{C}_p$ , 2 C,  $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ).

### 5.3.15 3-Hydroxy-butansäure-5-(2-isobutrylamino-6-oxo-1,6-dihydro-purin-9-yl)-tetrahydro-furan-2-ylmethylester (**80**)



Das geschützte Guanosin **73** (500 mg, 1.11 mmol), EDC (275 mg, 1.44 mmol) und DMAP (92 mg, 0.66 mmol) wurden in 10 ml abs. DMF bei 0 °C gelöst. Nach 15 min wurde eine Lösung von (*S*)-2-Hydroxy-buttersäure (185 mg, 1.77 mmol) in 5 ml abs. DMF über einen Zeitraum von 10 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel anschließend entfernt. Das Rohprodukt wurde unter Argon in 5 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 138  $\mu\text{l}$  Triethylamin-tris-hydrofluorid (0.77 mmol) wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1). Man erhielt 150 mg (0.24 mmol, 33%) des farblosen Öls **80**.

$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_7$  (423.18).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1) = 0.10.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

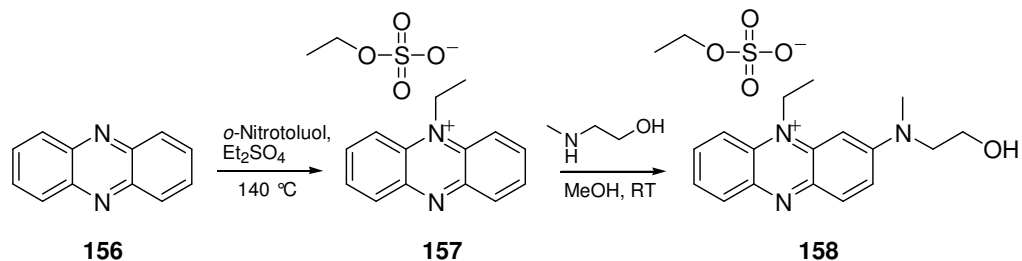
8.11 (s, 1 H, 6-H), 6.32 (t,  $J = 6.3$ , 1 H, 1'-H), 4.55 (m, 1 H, 3'-H), 4.33 (m, 1 H, 4'-H), 4.15 (m, 2 H, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 4.00 (m, 1 H, 4''-H), 2.80 - 2.70 (m, 2 H, 2'-H<sub>a</sub>,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.48 - 2.41 (m, 2 H, 2'-H<sub>b</sub>, 3''-H<sub>a</sub>, 3''-H<sub>b</sub>), 1.27 (s, 3 H, 4''-CH<sub>3</sub>), 1.24, 1.22 (2 s, 6 H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):

180.8 (C<sub>q</sub>,  $\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 171.8 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2''), 169.9 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-8), 158.3 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-2), 149.4 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-4), 138.5 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-6), 120.5 (C<sub>q</sub>, 1 C, C-7), 88.3 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-4'), 85.1 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-1'), 71.4 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-3'), 66.6 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-5'), 64.5 (C<sub>t</sub>, 1 C, C-4''), 46.9 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-3''), 40.7 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-2'), 36.0 (C<sub>t</sub>, 1 C,  $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.2 (C<sub>p</sub>, 1 C, 4''-CH<sub>3</sub>), 18.9, 18.4 (2 x C<sub>p</sub>, 2 C,  $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ).

## 5.4 Synthese des Phenazinderivats<sup>[123]</sup>

### 5.4.1 2-[(*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methyl)amino]-9-ethylphenazinium-ethylsulfat (**158**)



Phenazin **156** (900 mg, 5.0 mmol) wurde bei 140 °C in 5 ml frisch destilliertem *o*-Nitrotoluol gelöst. Nach Zugabe von Diethylsulfat (1.96 ml, 15.0 mmol) wurde die Mischung 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Die von gelb nach grün umgeschlagene Lösung wurde anschließend im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 25 ml Diethylether versetzt. Das Phenaziniumsalz **157** fiel als grüngelber Feststoff aus, der abfiltriert und mit Diethylether gewaschen wurde. Das Salz wurde in 5 ml Methanol gelöst und mit 2-(*N*-methylamino)ethanol versetzt. Es erfolgte ein Farbumschlag von grün nach violett. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und danach am Rotationsverdampfer eingengt. Der violette Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 95:5 → 9:1 → 4:1) und man erhielt das Produkt **158** als dunkelvioletten Feststoff (850 mg, 53%). C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S (407.15).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.12.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

8.24 (m, 2 H, H<sub>ar</sub>), 8.06 - 7.91 (m, 4 H, H<sub>ar</sub>), 7.73 (m, 1 H, H<sub>ar</sub>), 7.42, 6.78 (2 x b s, 1 H, 1-H), 5.08 (m, 2 H, 9-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.96 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>), 4.15 - 3.98 (m, 6 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH und CH<sub>2</sub> von EtSO<sub>4</sub>), 1.69 (t, *J* = 7.3, 3 H, 9-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.28 (t, *J* = 7.2, 3 H, CH<sub>3</sub> von EtSO<sub>4</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

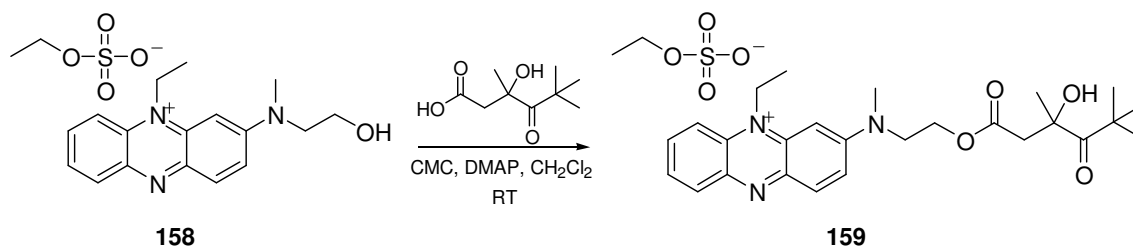
159.6, 146.3, 140.5, 137.3, 135.6, 133.4, 132.7, 128.9, 127.4, 126.5, 117.5, 92.1 (C<sub>q</sub>, C<sub>t</sub>, 12 C, C<sub>ar</sub>), 65.2 (C<sub>s</sub>, 1 C, CH<sub>2</sub> von EtSO<sub>4</sub>), 61.1 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-2), 57.1 (C<sub>s</sub>, 1 C, C-1), 45.0 (C<sub>p</sub>, 1 C, 9-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 41.5 (C<sub>p</sub>, 1 C, NCH<sub>3</sub>), 15.7 (C<sub>p</sub>, CH<sub>3</sub> von EtSO<sub>4</sub>), 12.5 (C<sub>p</sub>, 1 C, 9-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

MS (FAB, *m/z*):

282 (M<sup>-</sup>-EtOSO<sub>3</sub>H), 35), 307 (20), 253 (15), 154 (100).



### 5.4.2 3-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-oxo-hexansäure-2-[(10-ethyl-phenazinium-ethylsulfat-2-yl)-methyl-amino]ethylester (159)



Das Phenaziniumsalz **158** (518 mg, 1.27 mmol), CMC (660 mg, 1.59 mmol) und DMAP (16 mg, 0.13 mmol) wurden in 5 ml abs. Methylenchlorid gelöst. Eine Lösung von 3-Hydroxy-3,5,5-4-oxo-hexansäure (120 mg, 0.64 mmol) in 3 ml abs. Methylenchlorid wurden über einen Zeitraum von 5 min zugetropft. Das Gemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Methylenchlorid (60 ml) verdünnt und je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1). Man erhielt 238 mg (0.41 mmol, 65%) des violetten Feststoffs **159**.

C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (577.25)

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.28.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):

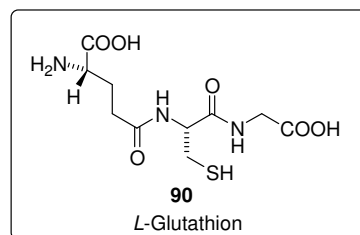
8.30 (m, 2 H, H<sub>ar</sub>), 8.08 (m, 4 H, H<sub>ar</sub>), 7.80 (m, 1 H, H<sub>ar</sub>), 5.30 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>), 5.25 (m, 2 H, 9-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.14 - 3.72 (m, 6 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH und CH<sub>2</sub> von EtSO<sub>4</sub>), 3.08 (A von AB, J = 16.4), 2.49 (B von AB, J = 16.4) 1.74 (t, J = 7.3, 3 H, 9-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.63 (s, 3 H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.30 (t, J = 7.2, 3 H, CH<sub>3</sub> von EtSO<sub>4</sub>), 1.24 (s, 9 H, <sup>t</sup>Bu).

MS (FAB, m/z):

452 (M[-EtOSO<sub>3</sub>H]), 100), 354 (42), 315 (20), 253 (15), 169 (18), 101 (23).

## 6 Photolysen der Modellverbindungen mit HPLC Analytik

In einem typischen Experiment wurde das Photoedukt (ca. 2 mg) im angegebenen Lösungsmittel (3.0 ml) in einer UV-Quarzglas-Küvette vorgelegt. Die Lösung wurde mit einem Standard versetzt. Die Probe wurde anschließend entgast und verschlossen. Die Bestrahlung erfolgte bei 15 °C unter Argon mit einem Steilkantenfilter der angegebenen Wellenlänge. Der Photolyseprozess wurden Proben (ca. 10 µl) in regelmäßigen Abständen bis zum Ende der Belichtung nach 20 min entnommen. Die erhaltenen Photolyselösungen wurden anschließend per HPLC analysiert. Dies geschah qualitativ durch Koinjektion der unabhängig synthetisierten Referenzsubstanzen oder durch ESI-Massenspektrometrie und quantitativ mit den erhaltenen Flächenfaktoren bezüglich des Standards. Für die Radikalabfangexperimente wurde der H-Donor *L*-Glutathion zugesetzt. Das Gradientenprogramm für die HPLC-Analytik war, falls nicht anders angegeben, wie folgt:



Eluent A: Wasser (nanopur)

Eluent B: Acetonitril

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	% A	% B
0.0	1.0	90.0	10.0
5.0	1.0	90.0	10.0
30.0	1.0	10.0	90.0
35.0	1.0	90.0	10.0
38.0	1.0	90.0	10.0

### 6.1 Bestrahlung der Verbindung 59

Lösungsmittel	Wellenlänge	<i>L</i> -Glutathion	75 / 76	Ausbeute
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	-	9 : 1	75%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	5 eq	3 : 1	72%
H <sub>2</sub> O / MeOH = 4 : 1	320 nm	50 eq	2 : 1	70%

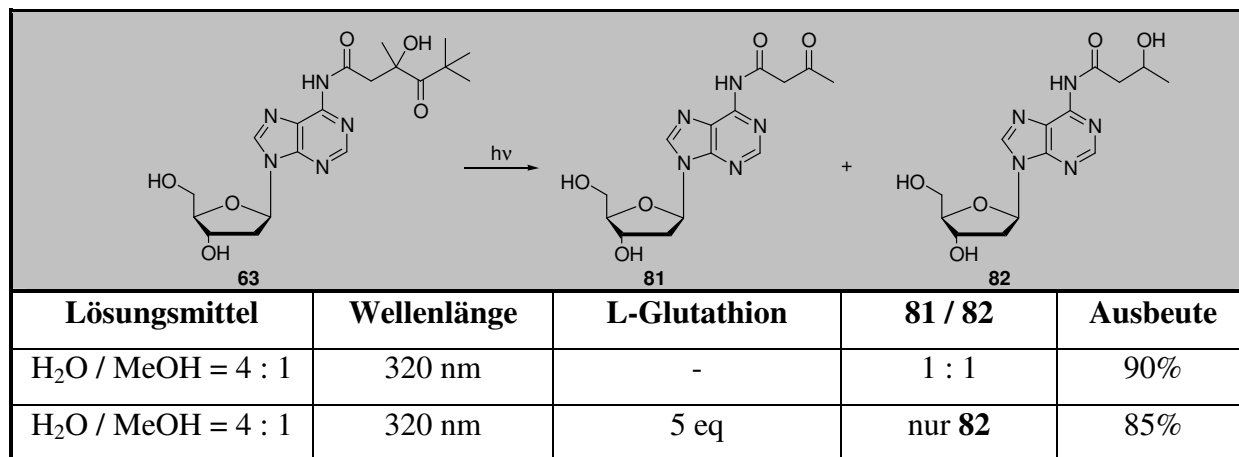
Folgende Retentionszeiten wurden ermittelt:

Photoedukt **59**: 12.8 min

Photoprodukt **75**: 2.8 min

Photoprodukt **76**: 2.6 min

## 6.2 Bestrahlung der Verbindung 63



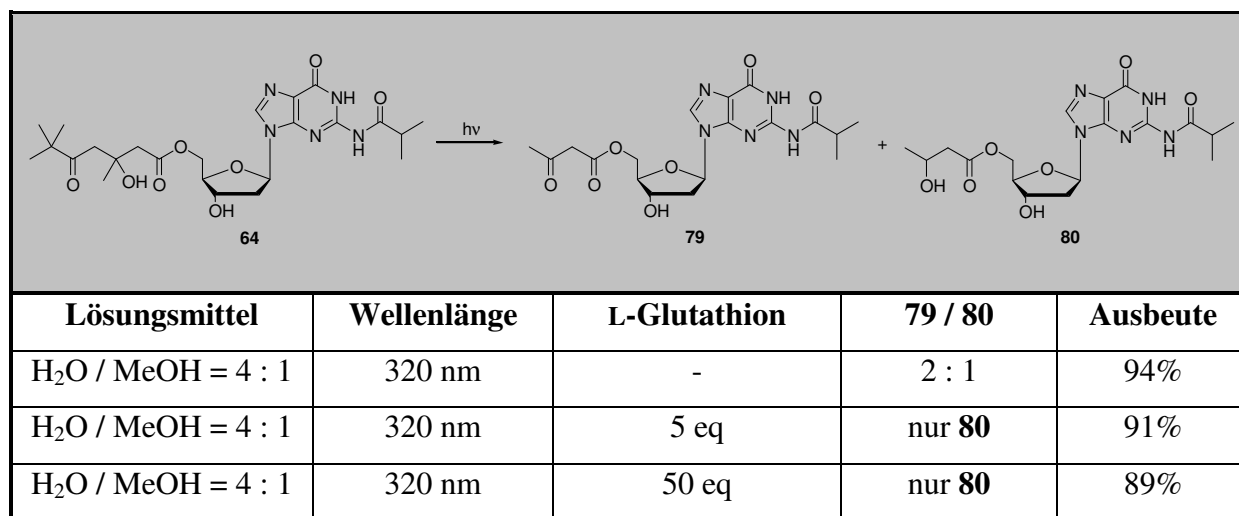
Folgende Retentionszeiten wurden ermittelt:

Photoedukt **63**: 14.0 min

Photoprodukt **81**: 4.4 min

Photoprodukt **82**: 3.7 min

## 6.3 Bestrahlung der Verbindung 64



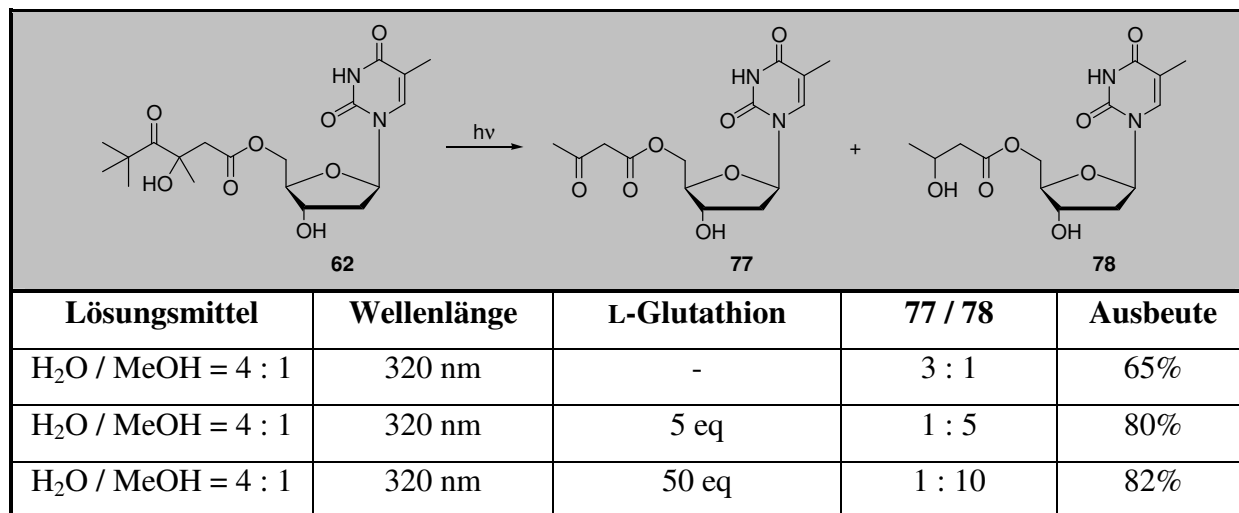
Folgende Retentionszeiten wurden ermittelt:

Photoedukt **64**: 17.3 min

Photoprodukt **79**: 13.1 min

Photoprodukt **80**: 12.5 min

## 6.4 Bestrahlung der Verbindung 62



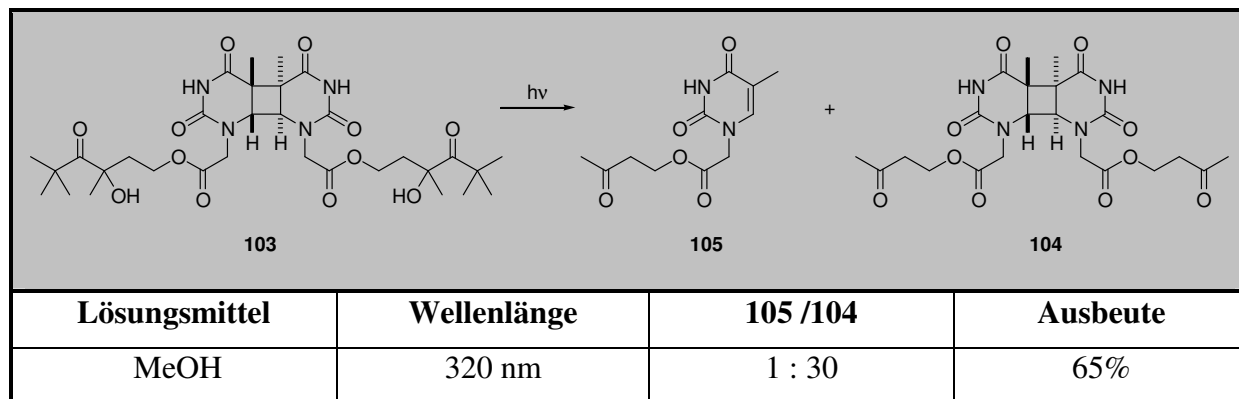
Folgende Retentionszeiten wurden ermittelt:

Photoedukt **62**: 16.2 min

Photoprodukt **77**: 8.9 min

Photoprodukt **78**: 7.7 min

## 6.5 Bestrahlung der Verbindung 103



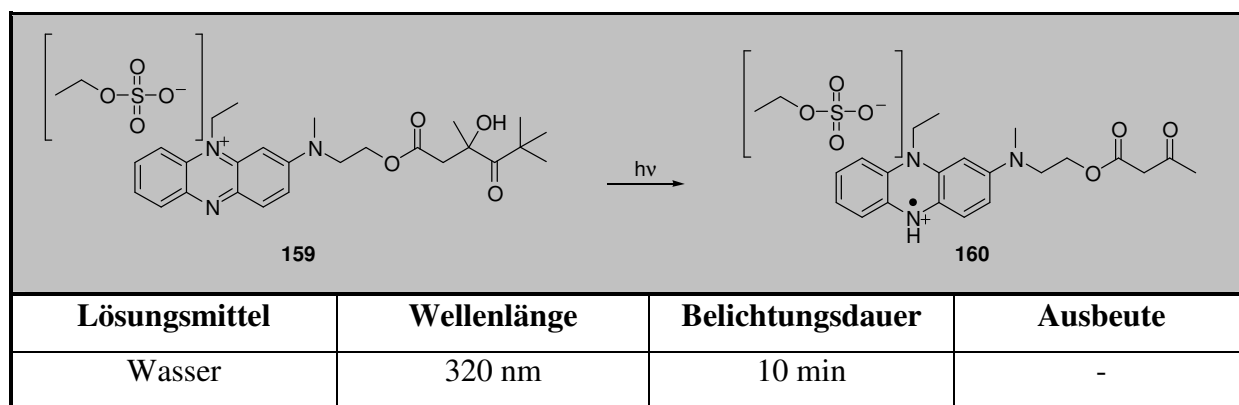
Folgende Retentionszeiten wurden ermittelt:

Photoedukt **103**: 22.0 min

Photoprodukt **105**: 7.5 min

Photoprodukt **104**: 12.7 min

## 6.6 Bestrahlung der Verbindung 159



Für die HPLC-Analytik wurde folgendes Laufmittelgemisch verwendet:

Eluent A: 0.1 M TEAA, 1% Acetonitril, pH 7.0

Eluent B: Acetonitril

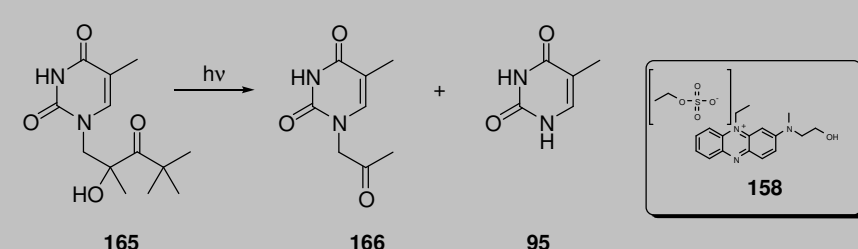
Folgende Retentionszeiten wurden ermittelt:

Photoedukt **159**: 19.2 min

Photoprodukt **160**: kein Signal detektierbar

## 6.7 Bestrahlung der Verbindung 165

Es wurde untersucht, wie sich das Produktverhältnis von **166** und **95** bei Zusatz von 1 eq des Elektronenakzeptors **159** verändert. In Klammern sind die Produktverhältnisse bei Bestrahlung ohne Zusatz des Phenazinderivates als Elektronenakzeptor.

				
Lösungsmittel	Wellenlänge	Belichtungszeit	166 / 95	Ausbeute
Phosphatpuffer (pH 9)	305 nm	20 min	1 : 1 (1 : 36)	-
Phosphatpuffer (pH 7)	305 nm	20 min	3 : 1 (1 : 25)	82%
Citratpuffer (pH 4)	305 nm	20 min	5 : 1 (3 : 1)	-

Für die HPLC-Analytik wurde folgendes Laufmittelgemisch verwendet:

Eluent A: 0.1 M TEAA, 1% Acetonitril, pH 7.0

Eluent B: Acetonitril

Folgende Retentionszeiten wurden ermittelt:

Photoedukt **165**: 15.8 min

Photoprodukt **166**: 3.7 min

Photoprodukt **95**: 2.8 min



Oligonukleotide		Retentionszeit / min
<b>130 a</b>	5'-GC GCA T* <sup>#</sup> T=T AAG CGC-3'	16.7
<b>133 a</b>	5'-GC GCA T <sup>#</sup> T=T AAG CGC-3'	12.8
<b>131 a</b>	5'-GC GCA T <sup>#</sup> T-3'	6.6
<b>132</b>	5'-T AAG CGC-3'	6.0
<b>130 b</b>	5'-GCG CAT* TT=T AAG CGC-3'	16.9
<b>133 b</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> TT=T AAG CGC-3'	14.6
<b>131 b</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> TT-3'	11.0
<b>132</b>	5'-T AAG CGC-3'	8.4
<b>130 c</b>	5'-G CGC AT* <sup>#</sup> T TT=T AAG CGC-3'	17.5
<b>133 c</b>	5'-G CGC AT <sup>#</sup> T TT=T AAG CGC-3'	15.4
<b>131 c</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> T TT-3'	12.5
<b>132</b>	5'-T AAG CGC-3'	8.3
<b>130 d</b>	5'-GC GCA T* <sup>#</sup> TT TT=T AAG CGC-3'	17.1
<b>133 d</b>	5'-GC GCA T <sup>#</sup> TT TT=T AAG CGC-3'	15.4
<b>131 d</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> T TT T-3'	13.5
<b>132</b>	5'-T AAG CGC-3'	8.2
<b>134</b>	5'-GCG CAT* CT=T AAG CGC-3'	17.5
<b>134 b</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> CT=T AAG CGC-3'	13.1
<b>135</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> CT-3'	8.3
<b>136</b>	5'-T AAG CGC-3'	7.7
<b>137</b>	5'-GCG CAT* FT=T AAG CGC-3'	31.9
<b>137 b</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> FT=T AAG CGC-3'	20.6
<b>138</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> FT-3'	7.8
<b>139</b>	5'-T AAG CGC-3'	6.4
<b>148</b>	5'-GCG CAT* TT=T TT=T AAG CGC-3'	18.5
<b>148 b</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> TT=T TT=T AAG CGC-3'	14.1
<b>149</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> TT-3'	7.5
<b>150</b>	5'-T TT=T AAG CGC-3'	12.7
<b>151</b>	5'-GCG CAT <sup>#</sup> TT=T TT-3'	12.0
<b>152</b>	5'-T AAG CGC-3'	5.4

HPLC-Retentionszeiten der Oligonukleotid-Photolyseprodukte. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei Chromatogrammen.



## Literaturverzeichnis

1. a) G. M. Blackburn, M. J. Gait, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford, **1996**; b) Z. Shabarova, A. Bogdanov, *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, VCH, Weinheim, **1994**.
2. S. M. Hecht, Ed. *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, Oxford University Press, **1996**.
3. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox in *Prinzipien der Biochemie*, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1994**.
4. a) J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737 und 964; b) J. D. Watson, *Die Doppelhelix*, Rowohlt Verlag, Reinbeck, **1997**.
5. a) F. H. Crick, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 425; b) M. H. F. Wilkins, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 429; c) J. D. Watson, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 439.
6. a) R. H. Sarma, *Nucleic Acid Geometry and Dynamics*, Pergamon Press, N. Y., **1980**; b) W. Saenger in *Principles of Nucleic Acid Structure* (Ed.: C. R. Cantor), Springer-Verlag, N. Y., **1984**.
7. H. Rozenberg, D. Rabinovich, F. Frolow, R. S. Hedge, Z. Shakked, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 15194.
8. C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109.
9. B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1171.
10. J. Cadet, P. Vigny in *Bioorganic Photochemistry*, Vol. 1 (Ed.: H. Morrison), John Wiley & Sons, N. Y., **1990**, 1.
11. a) G. Kraft, M. Kramer, *Adv. Radiation Viol.* **1993**, 17, 1; b) P. O'Neill, E. M. Fieldew, *Adv. Radiation Viol.* **1993**, 17, 53.
12. E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Seide, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, **1995**.
13. D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, 58, 411.
14. E. Tuite in *Organic and Inorganic Photochemistry*, Vol. 2 (Eds.: V. Ramamurthy, K. S. Schanze), Marcel Dekker, N. Y., **1998**, 55.
15. a) E. D. A. Stemp, J. K. Barton in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 33 (Eds.: A. Sigel, H. Sigel), Marcel Dekker, N. Y. **1996**, 325-365. b) R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2714; c) K. E. Erkkila, D. T. Odom, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2777.

16. A. Kirsch-De Mesmaeker, J.-P. Lecomte, J. M. Kelly, *Topics Curr. Chem.* **1996**, 177, 25.
17. a) B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 51; b) B. Giese, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2002**, 6, 612.
18. G. Taubes, *Science* **1997**, 275, 1420.
19. D. N. Beratan, S. Priyadarshi, S. M. Risser, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 3.
20. M. W. Grinstaff, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 3629.
21. M. Ratner, *Nature* **1999**, 397, 480.
22. M. E. Nuñez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 85.
23. a) Y. Kann, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11607; b) G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 253.
24. B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 631.
25. M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R. E. Holmlin, J. K. Barton, A. Hörmann, E. J. C. Olson, A. Harriman, *Science* **1993**, 262, 1025.
26. a) F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, *Science* **1997**, 277, 673; b) F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, 406, 51.
27. a) B. Giese, X. Beyrich-Graf, P. Erdmann, L. Giraud, P. Imwinkelried, S. N. Müller, U. Schwitter, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6146; b) B. Giese, X. Beyrich-Graf, P. Erdmann, M. Petretta, U. Schwitter, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 367.
28. N. C. Yang, E. D. Feit, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 504.
29. R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 265.
30. G. L. Closs, J. R. Miller, *Science* **1988**, 240, 440.
31. J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12759.
32. S. Steenken, S. V. Jovanovich, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 617.
33. C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 5541.
34. B. Giese, M. Spichty, *Chem. Phys. Chem.* **2000**, 1, 195.
35. B. Giese, S. Wessely, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 3490.
36. F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 150.
37. F. D. Lewis, X. Zuo, J. Liu, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4568.
38. Y. A. Berlin, L. Burin, M. A. Ratner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 260.
39. F. C. Grozema, Y. A. Berlin, L. D. A. Siebbeles, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122,

- 10903.
40. P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikan, Y. Z. Kan, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8353.
41. B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318.
42. T. T. Williams, D. T. Odom, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9048.
43. S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701.
44. a) S. S. Wesolowski, M. L. Leininger, P. N. Pentchev, H. F. Schaefer III, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4023; b) X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 1596.
45. A. A. Voityuk, M.-E. Michel Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *342*, 231.
46. S. Steenken, *Free Radical Res. Commun.* **1992**, *16*, 349.
47. a) Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1460; b) A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1128; c) Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10406; d) Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6942.
48. Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2755.
49. X. Li, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10115.
50. R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 4827.
51. M. G. Debijs, M. T. Milano, W. A. Bernhard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2752.
52. K. Kawai, T. Rimura, K. Kawabata, S. Tojo, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12838.
53. D. J. Deeble, S. Das, C. von Sonntag, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5784.
54. D. Smith, L. Adamowicz in *Theoretical Prospect of Negative Ions* (Ed.: J. Kaicher), Research Singpost, **2002**.
55. I. Al-Jihad, J. Smets, L. Adamowicz, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 2994.
56. a) A. Schwögler, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3918; b) C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 1763; c) C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3281.
57. a) F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, R. L. Letsinger, R. Sanishvili, A. Joachimak, V. Tereshko, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9905;

- b) F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280.
58. a) N. Amman, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2878; b) N. Amman, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4877; c) H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 2454; d) C. D. Mitchell, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 125; e) C. E. Kerr, C. D. Mitchell, J. Headrick, B. E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1637.
59. A. Schwögler, T. Carell, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1415.
60. L. M. Kundu, L. T. Burgdorf, O. Kleiner, A. Batschauer, T. Carell, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1053.
61. T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865.
62. A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2.
63. T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2491.
64. J. S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76.
65. P. F. Heelis, P. F. Hartmann, S. D. Rose, *J. Chem. Soc. Chem. Rev.* **1995**, 289.
66. T. Carell, R. Epple, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1245.
67. C. Behrens, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 1632.
68. S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1302.
69. G. B. Sancar, M. S. Jorns, G. Payne, D. J. Fluke, C. S. Rupert, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2001**, 491.
70. Y. F. Li, S.-T. Kim, A. Sancar, *Biochemistry* **1993**, *31*, 786.
71. S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7313.
72. M. P. Scannell, D. J. Fenick, S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1971.
73. M. P. Scannell, G. Prakash, D. E. Falvey, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4332.
74. a) A. Sancar, G. B. Sancar, *J. Mol. Biol.* **1984**, *172*, 223; b) A. Sancar, G. B. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *57*, 29.
75. P. F. Heelis, P. F. Hartmann, S. D. Rose, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 1053.
76. a) S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J.-S. Taylor, A. Sancar, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7065; b) S. T. Kim, A. Sancar, C. Essenmacher, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8023.
77. M. S. Akhlaq, C. P. Murthy, S. Steenken, C. von Sonntag, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 4331.

78. H. A. Schwarz, R. W. Dodson, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 409.
79. P. Wardmann, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18*, 1637.
80. M. Faraggi, J. L. Repath, Y. Tal, *Radiat. Res.* **1975**, *64*, 464.
81. M. Z. Hoffman, E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7950.
82. a) S. Peukert, B. Giese, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9045; S. Peukert, *Dissertation 1998*, Universität Basel.
83. R. Glatthar, *Dissertation 2000*, Universität Basel.
84. a) C. H. Bamford, R. G. W. Norrish, *J. Chem. Soc.* **1935**, 1504; b) N. C. Yang, E. D. Feit, P. G. Him-Hui, N. J. Turro, J. C. Dalton, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *90*, 6974; c) N. J. Turro, A. L. Buchachenko, V. F. Tarasov, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 69; d) H. Fischer, H. Paul, *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 200; e) H. Fischer, H. Paul, *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 1575; f) W. Adam, W. Fragale, D. Klapstein, W. M. Nau, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12578;
85. E. Meggers, A. Dussy, T. Schäfer, B. Giese, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 485.
86. B. Carl, *Dissertation 2004*, Universität Basel.
87. C. J. Cavallito, T. H. Huskell, *J. Org. Chem.* **1946**, 2332.
88. X. Creary, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5568.
89. M. Zhao, J. Li, E. Mano, Z. Song, D. M. Tschaen, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2564.
90. J. Matulic-Adamic, K. A. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36 (4)*, 1554.
91. R. Schönleber, *Dissertation 2003*, Universität Basel.
92. A. Marx, P. Erdmann, M. Senn, S. Körner, T. Jungo, M. Petretta, P. Imwinkelried, A. Dussy, K. J. Kulicke, L. Macko, M. Zehnder, B. Giese, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1980.
93. M. P. Reddy, J. B. Rampol, S. L. Beaucage, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 23.
94. N. D. Sinha, J. Biern, J. McManus, H. Köster, *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12*, 4539.
95. F. Eckstein, *Oligonucleotide Synthesis: A practical approach*, (Ed.: M. J. Gait), IRL Press, Oxford, **1984**.
96. F. Eckstein, *Oligonucleotide and analogues: A practical approach*, (Ed.: M. J. Gait), IRL Press, Oxford, **1991**.
97. U. Schwitter, *Dissertation 1997*, Universität Basel.
98. K. K. Ogilvie, *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3799.
99. B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1884-1887; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848.

100. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward, C. von Sonntag in *Oxygen Radicals in Biology and Medicine* (Ed.: K. D. Held), N. Y., **1988**.
101. P. C. Jocelyn in *Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, N. Y., **1972**.
102. C. Tronche, F. N. Martinez, J. H. Corner, M. Newcomb, M. Senn, B. Giese, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5845.
103. a) R. B. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **1968**, 7, 643; b) E. Fahr, *Angew. Chem.* **1969**, 81, 581; c) G. M. Blackburn, R. J. H. Davies, *J. Chem. Soc. C* **1966**, 2239.
104. a) T. Carell, R. Epple, V. Gramlich, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 2191; b) R. Epple, E.-U. Wallenborn, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7440; c) J. Butenandt, R. Epple, E.-U. Wallenborn, A. P. M. Eker, V. Gramlich, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 62.
105. L. T. Burgdorf, *Dissertation* **2001**, Marburg.
106. G.-X. He, N. Bischofberger, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6991.
107. K. J. Visscher, H. J. W. Spoelder, H. Loman, A. Hummel, M. L. Hom, *Int. J. Radiat. Biol.* **1988**, 54, 787.
108. a) K. Hildenbrand, G. Behrens, D. Schulte-Frohlinde, J. N. Herak, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1989**, 2, 283; b) S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503; c) D. J. Deeble, M. N. Schuchmann, S. Steenken, C. von Sonntag, *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 818; d) B. Weiland, J. Hüttermann, *Int. J. Radiat. Biol.* **1998**, 64, 341.
109. O. Schiemann, F. Feresin, T. Carl, B. Giese, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 270.
110. P. B. Ayscough, C. Thomson, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, 58, 1477.
111. P. M. Cullis, J. D. McClymont, M. E. Malone, A. M. Mather, I. D. Potmore, M. C. Sweeny, M. C. R. Symons, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 1695.
112. B. Pruden, W. Snipes, W. Gordy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, 53, 917.
113. a) H. Park, K. Zhang, Y. Ren, S. Nadji, N. Sinha, J.-S. Taylor C. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 15965; b) O. Wiest, *unveröffentlichte Ergebnisse* **2003**, University of Notre Dame.
114. E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12950.
115. a) B. A. Schweitzer, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1863; b) S. Moran, R. X.-F. Ren, S. Rumney IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2056.
116. E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1046.
117. T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11480.
118. T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1839.
119. T. Langenbacher, X. Zhao, G. Bieser, P. F. Heelis, A. Sancar, M. E. Michel-Beyerle,

- J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10532.
120. A. W. McFarlane, R. J. Stanley, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8558.
121. S. Hünig, H. Berneth, *Topics Curr. Chem* **1980**, *92*, 1.
122. A. Hulanicki, S. Glab, *Pure & Appl. Chem.* **1978**, *50*, 463.
123. a) N. Puri, E. Zamaratski, C. Sund, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10409; b) E. Zamaratski, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8183.
124. K. Fukui, K. Tanaka, M. Fujitsuka, A. Watanabe, O. Ito, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1999**, *50*, 18.
125. W. D. Cantor, M. M. Warshaw, *Biopolymers* **1970**, *9*, 1059.
126. M. Senn, *Dissertation* **1996**, Universität Basel.

Dipl. Chem. Thomas Carl

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die Dissertation "Chemie auf Distanz: Reduktiver Elektronentransport in DNA" selbständig nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Basel, den 31. März 2004

(Thomas Carl)



An meiner Ausbildung waren folgende Dozenten beteiligt:

**Universität Stuttgart:** G. Becker, J. Weidlein, H. Deiseroth, M. Schmidt, T. Schleidt, E. Roduner, K. Müller, H. Bertagnolli, F. Zabel, W. Oppermann, K. Bredereck, F. Effenberger, V. Jäger, J. Pietruszka, J. Podlech, B. Föhlisch, J. Weitkamp, H.-J. Werner, H. Stoll.

**University of Reading:** L. Harwood, H. M. I. Osborn.

**Universität Basel:** B. Giese.

# Curriculum Vitae

Thomas Carl  
Geburtsdatum und -ort: 2. Februar 1974 in Tübingen  
Familienstatus: verheiratet mit Barbara Carl

---

## Ausbildung

<b>Grundschule, Nagold-Gündringen</b>	<b>1980-1984</b>
<b>Otto-Hahn-Gymnasium, Nagold</b>	<b>1984-1993</b>
<b>Universität Stuttgart</b> Studiengang Diplom-Chemie	<b>1993-1999</b>
<b>Bundeswehr</b> Grundwehrdienst bei der Luftwaffe in der Fernmelde-Einheit an den Standorten Roth und Meßstetten.	<b>1994-1995</b>
<b>University of Reading, Großbritannien</b> Forschungsaufenthalt im Rahmen des Erasmus-Austauschprogramms europäischer Universitäten in der Gruppe von Dr. Helen M. I. Osborn mit dem Thema "Synthesis and Reactivity of Carbohydrate Derived Cyclic Sulfamidates and Aziridines".	<b>1998</b>
<b>Universität Stuttgart, Deutschland</b> Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie unter Anleitung von Prof. Volker Jäger mit dem Thema "Synthese neuer Analoga der <i>meso</i> - $\alpha,\epsilon$ -Diaminopimelinsäure".	<b>1999</b>
<b>Universität Basel, Schweiz</b> Dissertation am Institut für Organische Chemie in der Gruppe von Prof. Bernd Giese auf dem Gebiet des "Reduktiven Elektronentransfers durch DNA".	<b>2000-2004</b>

## Anstellungen

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart.	<b>1999</b>
---	-------------

## Stipendien

Erasmus-Stipendium der Europäischen Union.	<b>1998</b>
Kekulé-Stipendiat des Verbandes der Chemischen Industrie.	<b>2000</b>
Stipendium des Schweizerischen Nationalfonds.	<b>2003</b>