

UV-induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere in DNA hervorgerufen durch „natürliche“ Photosensibilisatoren

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION
von

M. Sc. Maren Schrödter

1. Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
 2. Referent: Prof. Dr. Joachim Podlech
- Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2024



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe. Weiterhin versichere ich, dass die elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt und die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut gesichert ist.

Karlsruhe, den

Maren Schrödter

*Meiner Familie
Und meinen Freunden*

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2021 bis Oktober 2024 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht durchgeführt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Wagenknecht für die Unterstützung in der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Die Freiheit eigene Ideen auszuprobieren in Kombination mit wissenschaftlichem Austausch haben mir viel beigebracht und mich zu einer besseren Wissenschaftlerin gemacht.

Maßgeblich an meinem Wachstum als Chemikerin beteiligt, war ebenso der gesamte Arbeitskreis, dem ich ebenfalls meinen Dank aussprechen möchte. Die Diskussionen mit euch haben mich vorangebracht und waren für meine Forschung unabdinglich. Vielen Dank für eure Hilfe in kleinen und großen Belangen!

Auch möchte ich mich bei Claudia Sommer und Ariane Baumgart bedanken, ohne die ich alle bürokratischen und organisatorischen Schwierigkeiten nicht gemeistert hätte. Danke für eure Empathie und eure stets freundliche Art.

Zusätzlich möchte ich mich bei der analytischen Abteilung des KIT bedanken. Vielen Dank an Annette Hochgesand für die Messung meiner MALDI-Proben und die teils etwas komplizierten Bestellvorgänge, an Lara Hirsch für die Messung der ESI und LC-MS-Proben und Dr. Andreas Rapp für die Betreuung des NMR-Gerätes und sein offenes Ohr und die Expertise bei jeglichen Computer-Problemen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Vertiefer Lukas Frey und meinen HiWis Cindy Konstandin und Charlotte Waldhelm bedanken. Danke, dass ihr euch so unermüdlich mit mir durch meine Forschung durchgebissen habt.

Noch ein besonderer Dank gilt Dr. Julian Gebhard, Dr. Nicola Seul und Inka Marten für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ohne euch wären meine literarischen Ergüsse nur halb so gut geworden.

Danke an alle meine Freunde aus dem Studium, die mit mir gelitten, gelacht, gelernt und allerlei Unfug getrieben haben. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an meinen Schutzengel Franzi. Bei allen weiteren Freunden

Danksagung

möchte ich mich ebenfalls bedanken, dafür dass ich ihr immer da wart, um mir den Rücken zu stärken. Obwohl wir mittlerweile sehr weit entfernt wohnen, war nie ein Weg zu weit, um einander zu helfen. Durch euch alle konnte ich so einige Schwierigkeiten überwinden und über mich hinauswachsen.

Schlussendlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne euren Rückhalt, wäre ich niemals so weit gekommen. Danke an meine Eltern für euer Vertrauen, eure Liebe und eure Unterstützung. Danke an meinen Bruder für deine stets aufmunternden Worte und die seelisch-moralische Unterstützung egal was gerade los war. Auch möchte ich mich bei meinem Freund bedanken, der mich mit viel Liebe, Empathie und Geduld bei allem unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	V
I. Einleitung.....	1
II. Theoretischer Hintergrund.....	5
1. Photochemie	5
1.1 Photochemische Definitionen.....	5
1.2 Photokatalysatoren und Photosensibilisatoren	9
1.3 Mögliche Energietransferprozesse	11
1.4 BEER-LAMBERT-Gesetz	14
1.5 Laser-Flash-Photolyse	15
2. DNA.....	16
2.1 Genetische Informationen.....	16
2.2 DNA-Schäden durch UV-Licht.....	19
2.3 Phosphoramidit-Synthese.....	25
3. Biomoleküle als Photosensibilisatoren	28
3.1 DNA-Modifikationen.....	28
3.2 Melanin-Derivate	31
III. Themenstellung	33
IV. Synthese.....	35
1. Formyl-2'-desoxyuracil (fdU).....	36
2. 5-Methyl-Pyrimidon (Pyo)	39
3. Pheomelaninmonomer-Derivat (Pheo)	42
V. Belichtungsexperimente	47
1. Methodik.....	47
1.1 Design der Oligonukleotide	47

Inhaltsverzeichnis

1.2	Belichtungsexperimente	49
1.3	Analyse der Belichtungsproben.....	52
2.	Formyl-Modifikationen.....	56
2.1	Formyl-2'-desoxyuridin	57
2.2	Formyl-2'-desoxycytidin.....	65
2.3	Enzymexperimente mit fdU und fdC.....	72
3.	Pyo-Modifikation.....	76
3.1	Belichtungsexperimente	76
3.2	Spektroskopische Untersuchungen.....	82
4.	Pheomelaninmonomer-Derivat.....	89
VI.	Zusammenfassung und Ausblick.....	93
VII.	Experimentalteil	99
1.	Materialien.....	99
1.1	Schutzgaschemie.....	99
1.2	Lösungsmittel und Reagenzien	99
1.3	Dünnschichtchromatographie (DC)	99
1.4	Säulenchromatographie.....	100
2.	Geräte.....	101
2.1	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	101
2.2	Massenspektrometrie (ESI).....	101
2.3	UV/ Vis Absorptionsspektroskopie	102
2.4	Fluoreszenzspektroskopie und Phosphoreszenzmessung.....	102
2.5	Laser-Flash-Photolyse	103
2.6	Belichtungsexperimente	103
3.	Oligonukleotide.....	105
3.1	Festphasensynthese	105
3.2	Aufreinigung.....	111

3.3	Analyse.....	112
3.4	Massenspektrometrie	113
3.5	Konzentrationsbestimmung.....	113
3.6	Hybridisierung.....	114
3.7	Übersicht der charakterisierten Oligonukleotide.....	115
3.8	PAGE-Analyse.....	116
4.	Synthesevorschriften.....	118
4.1	Formyl-2'-desoxyuridin Photosensibilisator.....	118
4.2	Pyo Photosensibilisator	126
4.3	Pheomelanin Photosensibilisator	128
VIII.	Ergänzende Analytik.....	139
IX.	Abkürzungsverzeichnis	143
X.	Abbildungsverzeichnis	149
XI.	Tabellenverzeichnis	161
XII.	Literaturverzeichnis.....	162
XIII.	Appendix.....	170
1.	Publikationen.....	170
2.	Konferenzen	170
XIV.	Unterstützende Informationen.....	171
1.	Verbindungen	171
1.1	Formyl-2'-desoxyuridin Photosensibilisator.....	171
1.2	Pyo Photosensibilisator	186
1.3	Pheomelanin Photosensibilisator	189
2.	Extinktionskoeffizient Pheo	208
3.	Charakterisierung der Oligonukleotide.....	209
3.1	Formyl-Modifikationen	209
3.2	5-Methyl-Pyrimidon (Pyo).....	215

Inhaltsverzeichnis

3.3 Pheomelaninmonomer-Derivat (Pheo)	217
4. HPLC-Analyse	219
4.1 Negativproben	219
4.2 Formyl-Modifikationen	220
4.3 Pyo	226
4.4 Pheo	227
5. LC-ESI-MS Analysen	228
5.1 Formylmodifikationen	228
5.2 5-Methyl-Pyrimidon (Pyo)	233
6. PAGE-Analyse	236
7. Schmelztemparaturanalyse	239
7.1 Formyl-Modifikationen	239
7.2 5-Methyl-Pyrimidon (Pyo)	240
7.3 Pheomelaninmonomer-Derivate (Pheo)	241

I. Einleitung

In der öffentlichen Wahrnehmung wird bei dem Wort „Mutation“ oft an fantastische Geschichten über Superhelden gedacht, die mit ihren durch Genmutationen neu errungenen Kräften die Welt retten. So wird in Comicbüchern von Spinnenbissen oder radioaktiver Strahlung gesprochen, die das menschliche Erbgut einzelner Personen gezielt verändern und diese stärker machen kann (Abbildung 1).



Abbildung 1: Fiktiver genmutierter Superheld mit DNA-Doppelhelix, die Bildrechte liegen bei M. Schrödter.

Die Begegnung mit Mutationen in klinischem Kontext ist weit weniger positiv. Veränderungen im genetischen Material führen in der Realität zu zahlreichen Krankheiten, die das tägliche Leben schwer beeinträchtigen oder gar zum Tod führen können. Wissenschaft und Medizin arbeiten seit Generationen zusammen, um diesem Leiden ein Ende zu bereiten. Dabei gilt es die Entstehung von Mutationen genauer zu ergründen und auf Basis dessen neue Therapeutika für die jeweiligen Krankheitsbilder zu entwerfen. Vor allem die Behandlung verschiedener Krebsarten ist dabei ein zentrales Bestreben der Neuzeit.

Eine dieser Krebsarten wird allerdings durch uns Menschen mit dem Klimawandel weiter befeuert – Hautkrebs. Dieser kommt bei immer mehr Menschen aufgrund der intensiveren Sonneneinstrahlung und längerer Lichtexposition vor.^[1] So sind weltweit Millionen von Menschen von verschiedenen Hautkrebsarten betroffen, Zehntausende von ihnen sterben jährlich an ihren Folgen.^[2] Diese Zahlen steigen Jahr für Jahr stetig an und werden mittlerweile als weltweite Epidemie bezeichnet.^[3]

„Sabotage is the act of destroying something in secret“ WINSTON CHURCHILL

Indem wir den Klimawandel weiter befeuern, sabotieren wir uns und unsere genetische Integrität unbewusst selbst. Das Aufdecken der physikalischen, chemischen und biologischen Mechanismen hinter der genetischen Veränderung durch Sonneneinstrahlung kann dem allerdings Einhalt gebieten. Das Wissen über photophysikalische Prozesse, die Schäden der DNA hervorrufen, eröffnet die Möglichkeit, diese effektiver zu behandeln. Dazu soll diese Arbeit ihren Beitrag leisten.

Trotz eines recht hohen Verständnisses über die chemische Konversion der Nukleinbasen in Zusammenhang mit elektromagnetischer Strahlung, bleiben einige Prozesse der Schadensbildung weiterhin im Dunkeln. Unter anderem ist die Rolle von Molekülen, die Energie außerhalb des Absorptionsspektrums von DNA aufnehmen und an die DNA-Basen weitergeben können, um Schäden hervorzurufen, nicht vollständig aufgeklärt. In den letzten Jahren fiel zum Beispiel auf, dass in gealterter Sonnencreme akkumuiertes Benzophenon als Photosensibilisator dazu in der Lage ist, DNA-Schäden in signifikanter Menge hervorzurufen.^[4] Darüber hinaus wird vermutet, dass auch einige zell-interne, also endogene, Moleküle dazu befähigt sind, Energie auf die DNA zu übertragen und so UV-Schäden auszulösen.^[5] Diese endogenen Moleküle wären demnach als „natürliche“ Photosensibilisatoren für Schäden im genetischen Material verantwortlich. Welche Moleküle uns genau als „natürliche“ Photosensibilisatoren sabotieren und wie das passiert, gilt es näher zu beleuchten.

Der häufigste lichtinduzierte DNA-Schaden ist das in Abbildung 2 dargestellte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD).^[6]

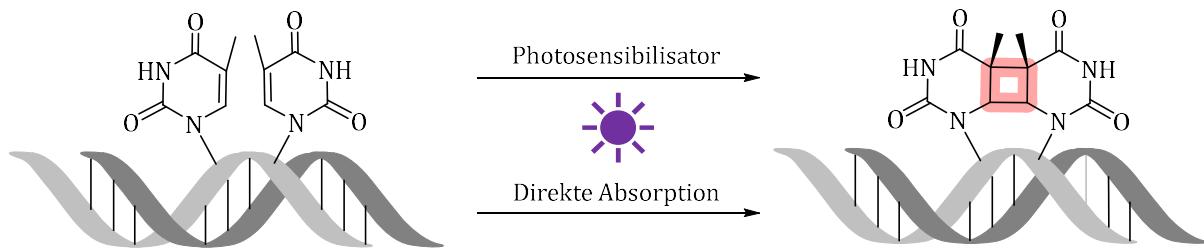


Abbildung 2: Entstehung eines CPD-Schadens durch direkte Absorption oder über die Energieübertragung durch einen Photosensibilisator nach der Bestrahlung mit UV-Strahlung.^[7]

Dieser Schaden kann sowohl durch die Absorption von Licht im Absorptionsspektrum der DNA beobachtet werden als auch durch die Bestrahlung mit Licht im UV-A-Bereich. Letzteres wird vor allem durch Photosensibilisatoren ausgelöst.

Durch seine Häufigkeit und Mutagenität wurden CPD-Schäden in dieser Arbeit im Speziellen untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf CPD-Schäden zwischen zwei benachbarten Thymidin-Basen, da diese 90% der Photoschäden in DNA ausmachen.^[7] Ihre Entstehung durch „natürliche“ endogene Photosensibilisatoren und die zugrunde liegenden photophysikalischen Prozesse sollten in dieser Arbeit näher untersucht werden. Vor allem durch epigenetische Modifikationen und Schäden verschiedener Art veränderte DNA-Basen und Moleküle, die bei zellulären Abbauprozessen nach der Bestrahlung mit Licht entstehen, wurden dafür in Betracht gezogen. Es sollten demnach vor allem endogene Photosensibilisatoren untersucht werden, die selbst in Zusammenhang mit Umwelteinflüssen wie der Lichteinstrahlung auf menschliche Hautzellen stehen.

II. Theoretischer Hintergrund

1. Photochemie

1.1 Photochemische Definitionen

Das Leben auf der Erde wurde maßgeblich durch die Photosynthese, also die Umwandlung von CO₂ und Wasser in Sauerstoff und Kohlenhydrate durch Licht, ermöglicht. Dies ist eines der bekanntesten Beispiele für die Umwandlung von Materie mittels Lichtenergie und bleibt für das Leben auf unserem Planeten von zentraler Bedeutung.^[8] Mittlerweile sind einige chemische Reaktionen bekannt, die auf der Absorption von Licht fußen. Reaktionen, die dieses Prinzip umfassen, werden als photochemische Reaktionen und ihre Disziplin als Photochemie bezeichnet. Als Pionier dieser gilt der italienische Chemiker GIACOMO CIAMICIAN, der die Sonne bereits Anfang des 20. Jahrhunderts auf seinem Balkon als Energiequelle für chemische Reaktionen nutzte.^[9]

Der grundlegende Unterschied zwischen thermisch und photochemisch ablaufenden Reaktionen ist die photochemische Anregung der beteiligten Moleküle durch Licht. Statt chemische Reaktionen aus dem energetischen Grundzustand durch Wärme als Energiequelle ablaufen zu lassen, wird durch Lichtabsorption in ein höheres Niveau ein oder mehrere Reaktionspartner angehoben. Das ermöglicht Reaktionsabläufe, die durch wärmegetriebene Reaktionen nicht erreichbar sind.

Die bei der photochemischen Anregung von Molekülen möglichen photophysikalischen Prozesse können in einem JABLONSKI-Diagramm zusammengefasst werden (Abbildung 3).^[10] Die dabei ablaufenden Prozesse werden als strahlend bezeichnet, wenn sie die Freisetzung eines Photons zur Folge haben, und als strahlungslos, wenn die Energie stattdessen in Form von Wärme an die Lösungsmittelumgebung abgegeben wird.

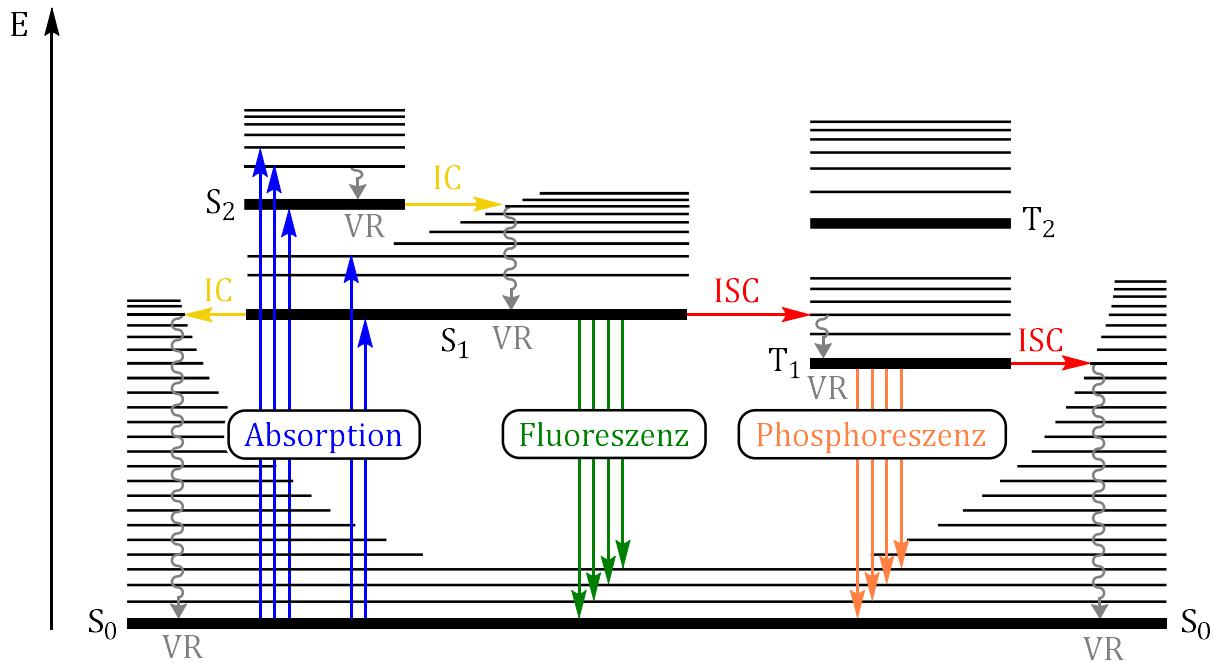


Abbildung 3: JABLONSKI-Diagramm mit der Darstellung der photophysikalischen Prozesse aus dem energetischen Grundzustand (S_0) in die angeregten Singulett- (S_1 und S_2) sowie Triplet-Zustände (T_1 und T_2): Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Innere Umwandlung (Internal Conversion IC), Vibronische Relaxation (VR), Intersystem Crossing (Intersystem Crossing ISC).

Die Absorption eines Photons hebt Elektronen vom energetischen Grundzustand (S_0) in energetisch höher liegende angeregte Singulett-Zustände an (z.B. S_1 und S_2). Die vorliegenden photochemischen Prozesse sind dabei deutlich schneller als die Bewegung des Atomkerns. Daher kann mit Hilfe der BORN-OPPENHEIMER-Näherung angenommen werden, dass sich der Kern währenddessen nicht bewegt. Dies wird durch das FRANCK-CONDON Prinzip zusammengefasst, welches besagt, dass Absorption und Emission ausschließlich vertikal und damit entkoppelt von der Bewegung des Kerns ablaufen.^[11] Dabei sind die Übergänge am wahrscheinlichsten, deren Vibrationswellenfunktionen am stärksten überlappen. Da angeregte Kerne allerdings durch ihren höheren Anteil an antibindendem Charakter leicht zu größeren Kernkoordinaten verschoben sind, ist die Wahrscheinlichkeit deutlich höher, dass vom niedrigsten Schwingungsniveau des Grundzustandes in höhere Niveaus des angeregten Zustands angeregt wird.^[12] Die wahrscheinlichste Anregung kann spektroskopisch als Absorptionsbande mit der höchsten Intensität ermittelt werden (Abbildung 4). Weniger wahrscheinliche sind ebenfalls als Banden sichtbar. Diese Banden überlappen allerdings durch homogene und inhomogene Verbreiterung. Die homogene Verbreiterung ist dabei auf die statistische Besetzung mehrerer vibronischer Zustände bei Raumtemperatur zurückzuführen. Die inhomogene Verbreiterung ist das Resultat von Lösungsmitteleinflüssen, die Änderungen

der elektronischen Übergänge zur Folge haben. Beides erschwert eine genaue Zuordnung verschiedener Anregungsübergänge.^[10]

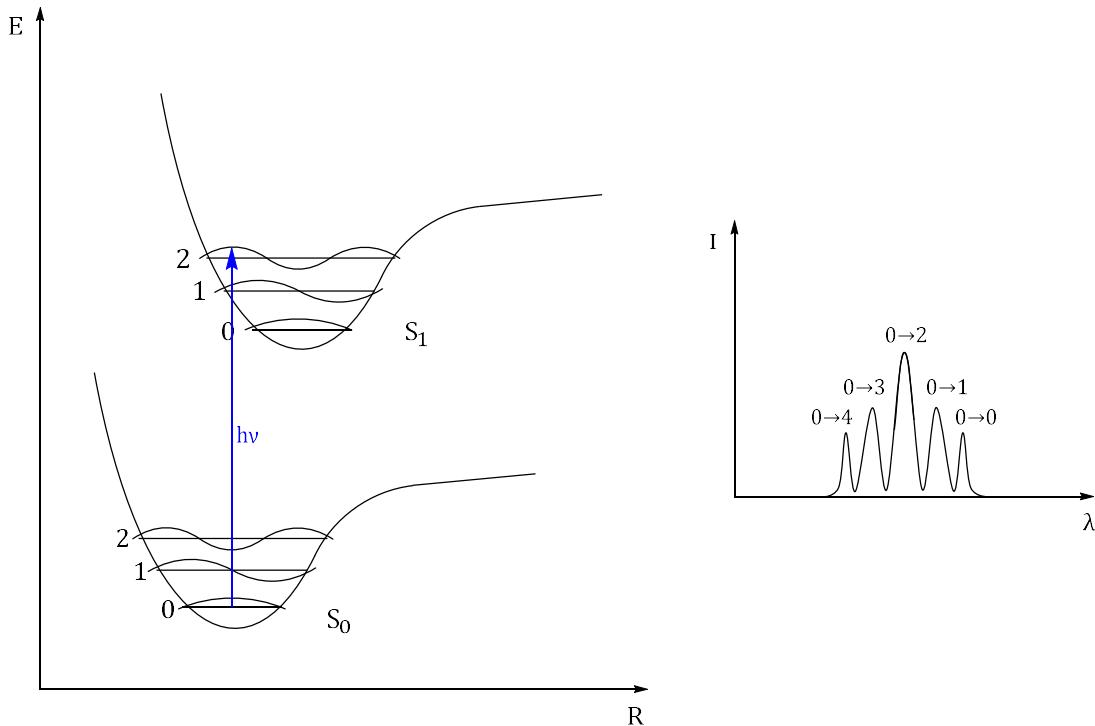


Abbildung 4: Morsepotential des Grundzustandes und angeregten Zustandes eines fiktiven Moleküls mit den Vibrationswellenfunktionen der Niveaus 0-2 und der Absorption (blau) des wahrscheinlichsten Überganges (links) sowie möglicher Absorptionsbanden der verschiedenen Übergänge in einem Absorptionsspektrum (rechts).

Aus den verschiedenen Niveaus der angeregten Singulett-Zustände (z.B. S₁ oder S₂) kommt es entweder zur Inneren Umwandlung (*internal conversion, IC*), in der ein isoenergetischer, strahlungsloser Übergang in den S₀ Zustand erfolgt, oder zu einer Relaxation in das jeweils unterste Energieniveau mittels Schwingungsrelaxation (*vibronische Relaxation, VR*). Entsprechend der Regel von KASHA können strahlende Prozesse erst vom untersten Energieniveau der angeregten Zustände erfolgen.^[13] Übergänge aus dem angeregten Singulett-Zustand erfolgen durch das Abgeben eines Photons zum Erreichen des energetischen Grundzustandes, was als Fluoreszenz bezeichnet wird. Die Fluoreszenzwellenlänge ist durch die Verschiebung des Kerns des angeregten Zustandes unabhängig von der Absorptionswellenlänge. Der Unterschied zwischen Absorptionsmaximum und Emissionsmaximum wird als STOKES Verschiebung angegeben.^[14] Der Schnittpunkt der Absorptions- und Emissionsspektren gibt Aufschluss über die Energiedifferenz von Grundzustand und angeregtem Zustand. Dieser kommt zu Stande, da bei Raumtemperatur durch die BOLTZMANN-Verteilung auch zu einem geringen Anteil höhere Schwingungsniveaus besetzt sind, die weniger Energie für die Anregung in den S₁ Zustand benötigen.

Theoretischer Hintergrund

Es gibt noch eine weitere Möglichkeit für den Übergang vom S₁-Zustand zurück in den S₀-Zustand. Hier wird durch Interkombination (*intersystem crossing*, ISC) in einer Spin-verbotenen Umkehr der Multiplizität der Triplet-Energiezustand erreicht und von diesem ausgehend ein Photon abgegeben, um in den S₀-Zustand zu gelangen. Dieser Prozess wird als Phosphoreszenz bezeichnet und ist mit einer Dauer bis zu mehreren Millisekunden ($10^{-6} - 10^{-3}$ s) der langsamste strahlende Prozess.^[15]

Da alle beschriebenen Prozesse, außer die Phosphoreszenz, in einem ähnlich schnellen Zeitraum ablaufen (IC: $10^{-12} - 10^{-6}$ s; Fluoreszenz: $10^{-9} - 10^{-7}$ s, ISC: $10^{-12} - 10^{-6}$ s), konkurrieren sie miteinander.^[15] Welcher Prozess schlussendlich wie stark ausgeprägt auftritt, ist von der energetischen Situation des Moleküls abhängig. Zum Beispiel funktioniert der strahlungslose Übergang des IC am besten, je geringer der Energieunterschied zwischen dem angeregten Zustand und Grundzustand ist. Wie viel Energie über den ISC in den Triplet-Zustand übergeht, ist unter anderem durch die möglichen Energieübergänge ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$) und ihre jeweiligen Wahrscheinlichkeiten begrenzt. Nach EL-SAYED sind ISC deutlich wahrscheinlicher, wenn sie eine Veränderung des Orbitaltyps zur Folge haben (z.B. Übergänge von ${}^1\pi$ in das 3n Orbital).^[16]

Genutzt werden die beschriebenen Prozesse unter anderem für organische lichtemittierende Dioden (OLEDs) oder zur Bildgebung in chemischen oder biologischen Systemen wie Zellen.^[17] Bei letzterem werden vor allem fluoreszente Marker, also Fluorophore, für die Detektion von Zellorganellen oder speziellen Molekülen wie Proteinen, DNA oder RNA genutzt. Auch in dieser Arbeit wurde ein Fluoreszenzmarker verwendet, um die durch UV-Licht veränderte DNA sichtbar zu machen und DNA-Schäden eindeutiger quantifizieren zu können.

1.2 Photokatalysatoren und Photosensibilisatoren

Um photochemische Prozesse gezielt und effektiv einsetzen zu können, wurden seit den ersten photochemischen Reaktionen Anfang des 20. Jahrhunderts zahlreiche Verbesserungen vorgenommen. Statt das breite Absorptionsspektrum der Sonne als Energiequelle zu nutzen, werden mittlerweile Licht emittierende Dioden (LEDs) spezifischer Wellenlängen verwendet. Da die verwendeten Wellenlängen auf das Nötigste begrenzt und auf die jeweilige Reaktion zugeschnitten werden, können höhere Umsätze erreicht und Nebenreaktionen minimiert werden. Außerdem werden sich Moleküle zu Nutze gemacht, die die Absorptionsenergie aufnehmen und auf andere Moleküle übertragen können, welche bei den verwendeten Wellenlängen nicht selbst angeregt würden. Hierbei gibt es die grundsätzliche Unterscheidung zwischen Elektronentransfer (*single electron transfer*, SET) und Energietransfer (EnT) (Abbildung 5).

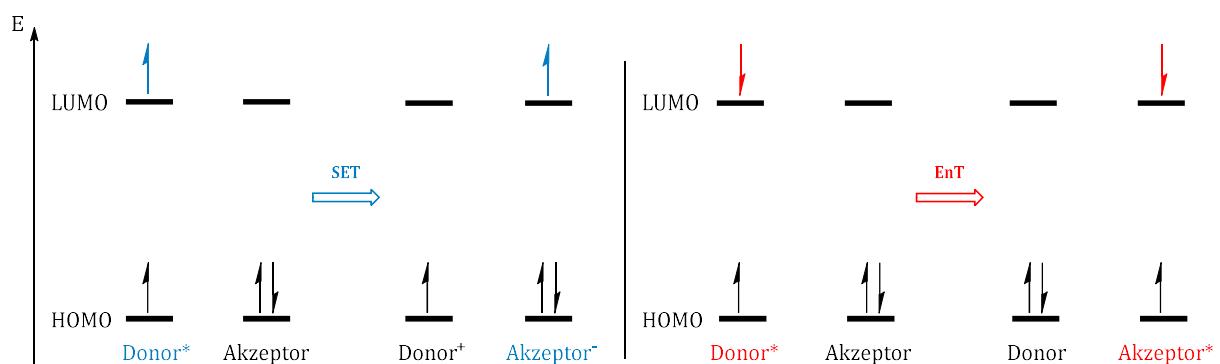


Abbildung 5: Schematische Darstellung des *Single Electron Transfer* (SET) Prozess, bei dem ein Elektron von einem angeregten Donormolekül auf den Akzeptor übertragen wird (links) und schematischer Energietransfer (EnT) bei dem das angeregte Donormolekül die Anregungsenergie auf den Akzeptor überträgt (rechts).

Photoredoxkatalysatoren geben im angeregten Zustand Elektronen an Substrate weiter oder nehmen Elektronen von ihnen auf, um diese zu oxidieren oder reduzieren und so reaktiv gegenüber ihrem Reaktionspartner zu machen. Der Photokatalysator wird nach dem grundlegenden Prinzip der Katalyse nach der Anregung und Elektronenabgabe in seinen ursprünglichen Zustand rücküberführt und geht demnach unverändert aus der Reaktion hervor.^[18] Er verändert dabei nicht die Thermodynamik der Reaktion sondern setzt lediglich die kinetische Aktivierungsbarriere in beide Richtungen herab, was eine deutliche Beschleunigung der jeweiligen Hin- und Rückreaktion zur Folge hat. Ein Beispiel für durch Licht ausgelöste Elektronentransferprozesse ist erneut die Photosynthese. Das Chlorophyll ist dabei der Chromophor und sorgt mit der Absorption von Licht in Kombination der beteiligten Enzyme dafür, dass Elektronen an NADP⁺ übertragen werden. Dieses ist im Anschluss in einer Dunkelreaktion (CALVIN-Zyklus) an

Theoretischer Hintergrund

der Synthese von Kohlenhydraten beteiligt. So wird CO₂ mit Lichtenergie reduziert und in Gegenwart von Wasser in Kohlenhydrate umgewandelt.^[19]

Im Gegensatz zum SET werden in EnT Prozessen keine Elektronen, sondern nur Energie übertragen. Moleküle, die zu so etwas fähig sind, werden als Photosensibilisatoren bezeichnet. Sie werden durch Absorption in einen angeregten Zustand gebracht und regen anschließend Moleküle an, die sich in räumlicher Nähe befinden, wodurch sie selbst in den Grundzustand zurückkehren.^[20] So können Moleküle in den angeregten Zustand gelangen, ohne dass die dafür notwendige Absorptionsenergie aufgebracht werden muss. Das hat weniger Nebenreaktionen zur Folge, da energetisch kontrollierbar ist, welche Moleküle angeregt werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde dieses Prinzip näher untersucht, indem durch Photosensibilisatoren selektiv Nukleoside der DNA angeregt wurden, statt durch Einstrahlung höherer Energie alle Nukleobasen gleichermaßen anzuregen.

1.3 Mögliche Energietransferprozesse

Energietransferprozesse können über verschiedene Mechanismen ablaufen, die jeweils ihre eigenen Anforderungen und Limitierungen aufweisen. Die wohl bekanntesten Energietransferprozesse werden durch den DEXTER- und FÖRSTER-Energietransfer beschrieben.

Der DEXTER Energietransfer beschreibt die Übertragung von Energie durch Triplett-Triplett Überlappung zweier Moleküle.^[21] Die Energieübertragung funktioniert dabei nur, wenn sich die Moleküle in räumlicher Nähe befinden, das heißt unter 1 nm voneinander entfernt sind. Dann ist es möglich, dass sich die Triplett-Wellenfunktionen des Photosensibilisators (Donor) und Akzeptormoleküls überlappen und der Energietransfer stattfinden kann. Der Gesamtspin beider Moleküle bleibt dabei erhalten.

Die Geschwindigkeitskonstante der Energieübertragung k_{ET} ist somit konstant zur Überlappung der Triplett-Wellenfunktionen J , dem Abstand der Wellenfunktionen r und dem VAN DER WAAL-Radius L .^[22] Daher nimmt die Energieübertragung mit steigendem Abstand des Donors vom Akzeptor exponentiell ab.

$$k_{ET} \propto J * e^{-\frac{2r}{L}}$$

Formel 1: Exponentielle Abhängigkeit des DEXTER-Energietransfers der Geschwindigkeitskonstante k_{ET} mit der Triplett-Wellenfunktion J , dem Abstand der Wellenfunktionen r und dem VAN DER WAAL-Radius L .^[22]

Dem gegenüber steht der FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer (FRET), dessen grundlegender Unterschied der Singulett-Singulett Transfer im Vergleich zum Triplett-Triplett-Transfer des DEXTER-EnT ist. Der Übergang findet daher unter Erhalt des Spins statt. Die räumliche Nähe von unter 1 nm ist hierbei auch nicht mehr erforderlich, da die Energieübertragung nicht mehr von der Überlappung der Triplett-Orbitale abhängt. Stattdessen liegt eine Dipol-Dipol Wechselwirkung vor, die bis zu einem Abstand von etwa 10 nm des Donors vom Akzeptor auftritt.^[23] Genauer tritt eine Änderung des Donor-Dipols auf, sobald dieser angeregt wird. Dieser veränderte Dipol überträgt anschließend seine Energie an einen räumlich nahen Dipol, welcher somit als Akzeptor fungiert. Da der Akzeptor nicht zwingendermaßen die Anregungsenergie durch Emission von Licht freisetzen muss, wird der FRET auch zu den Fluoreszenzlöschungsprozessen (*quenching*) gezählt. Die Fluoreszenzlöschung bezieht sich auf den Donor (F_D), der weniger Fluoreszenz zeigt, sobald ein Akzeptor in räumlicher Nähe zu finden ist (F_{DA}). Die Effizienz der Energieübertragung lässt sich daher durch die Abnahme der Fluoreszenz des

Donors berechnen und ist abhängig von der Entfernung des Donors vom Akzeptor (r) und vom FÖRSTER Radius (R_0), der Abstand bei dem 50% der Fluoreszenz des Donors durch den Akzeptor gelöscht wird.^[24]

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{1}{1 + (\frac{r}{R_0})^6}$$

Formel 2: FÖRSTER Energietransfer-Effizienz (E) berechnet durch das Verhältnis der Fluoreszenz des Akzeptors (F_{DA}) zu der des Donors (F_D) und umgekehrt proportional zur sechsten Potenz der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor (r) und Förster Radius (R_0).^[24]

Wie in der Energiefunktion bereits zu erkennen ist, zeigt sich bei einem FRET keine exponentielle Verminderung der übertragenen Energie mit steigender räumlicher Entfernung. Stattdessen ist die Energieübertragung proportional zur sechsten Potenz des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor. Wird der Radius, in dem die Dipol-Dipol Wechselwirkung und damit der Energietransfer möglich sind, überschritten, fällt die Energieübertragung rapide ab.

Ein weiteres Konzept der Energieübertragung abseits des DEXTER- und FÖRSTER-Energietransfers ist der sogenannte Energy-Hopping-Mechanismus (*energy hopping* engl. das Hüpfen von Energie). Es bezeichnet eine Energieübertragung, die über eine Hürde hinweg stattfindet. Die Energieübertragung dieser Hüpfsschritte findet jeweils über DEXTER-Energietransfers statt. In DNA wurde dieses Prinzip vorerst auf die Übertragung von Elektronen durch Guanosin angewendet.^[25] Dabei wird beschrieben, dass Guanosin als Donor Elektronen abgeben und über intervenierende Basen-Paare übertragen kann. Später wurde das gleiche Prinzip auch auf Triplett-Energietransfer-Prozesse übertragen.^[26] Es wird unterschieden zwischen einem DEXTER-Transfer auf ein direkt benachbartes Molekül in einem einzigen Schritt und einem über mehrere Schritte verlaufenden Hüpfen. Wird die Energie auch über längere Wege als 1 nm über einen Triplett-Triplett-EnT übertragen, tritt der Energy-Hopping-Mechanismus auf. Bei diesem hüpf die Anregungsenergie über Basen niedriger Triplett-Energie, in DNA in der Regel Thymidin, bis sie an einem Ort ankommt, an dem die Energie in einer chemischen Reaktion umgewandelt werden kann oder ein strahlungsloser Energietransfer in den Grundzustand erfolgt. Dieses Hüpfen kann prinzipiell sowohl innerhalb des gleichen DNA-Stranges auftreten (*intrastrand hopping*), als auch zwischen zwei hybridisierten DNA-Strängen (*interstrand hopping*) (Abbildung 6). Ersteres ist allerdings energetisch bevorzugt. Wie gut der Hüpfmechanismus vonstatten gehen kann, ist von der Geschwindigkeit der Energieübertragung innerhalb eines Stranges, zwischen zwei

hybridisierten Strängen und der Geschwindigkeit strahlungsloser Prozesse zum Erreichen des energetischen Grundzustandes abhängig.^[26]

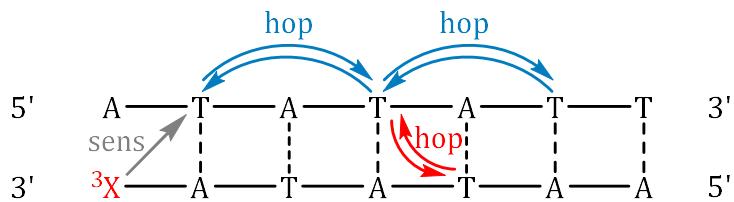


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Energy-Hopping-Mechanismus zwischen zwei Strängen (rot) und innerhalb desselben Stranges (blau), ausgelöst durch die Anregung eines Thymidins durch einen Triplet-Photosensibilisator (sens, grau) in einem Oligonukleotid.

Quantenmechanische und spektroskopische Untersuchungen zeigen außerdem, dass angeregte Zustände in DNA-Duplexen stabilisiert werden und somit langlebiger sind als bei einzelnen Nukleosiden.^[27] Für Singulett-Zustände wird von einer delokalisierten Verteilung der Anregungsenergie über mehrere Basen gesprochen. Das hat zur Folge, dass Energie von Basenstapeln statt von einzelnen Basen aufgenommen wird und nicht durch ultraschnelle IC oder VR Prozesse im Femtosekunden-Bereich in den Grundzustand zurückgelangt.^[28] Die Triplet-Energie ist stark auf einzelnen Nukleobasen lokalisiert. Es muss demnach zu einer Übertragung der Triplet-Energie durch einzelne Nukleobasen über intervenierende Basen hinweg kommen, was den Energy-Hopping-Prozess zur Folge hat.^[27a]

1.4 BEER-LAMBERT-Gesetz

Um quantitative Aussagen über die Absorption eines Stoffes treffen zu können, wird das BEER-LAMBERT-Gesetz angewendet. Es betrachtet die Intensität der eingestrahlten Strahlung auf die betreffende Substanz in Lösung (I_0) im Vergleich zur Intensität der transmittierten Strahlung (I_1). Dieses Verhältnis ist abhängig von der Konzentration der Lösung (c), der Schichtdicke der Küvette (d) und dem Extinktionskoeffizienten der Substanz. Unter Verwendung des dekadischen Logarithmus der Intensitäten und des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten (ε_λ) ergibt sich daraus folgende Gleichung.^[29]

$$\log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_\lambda * c * d$$

Formel 3: LAMBERT-BEER-Gesetz über den Zusammenhang zwischen Absorbanz (I_0/I_1), dem Extinktionskoeffizienten ε_λ , der Konzentration c und der Schichtdicke der Küvette d .^[29b]

Das Verhältnis aus einfallender und transmittierter Strahlung ergibt die Absorbanz (auch als Extinktion oder optische Dichte bezeichnet). Der Extinktionskoeffizient ist abhängig von der betrachteten Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes.^[30]

In dieser Arbeit wurde dieses Prinzip verwendet, um die Konzentrationen der hergestellten Oligonukleotide in Lösung über ihre Absorbanz zu bestimmen.

1.5 Laser-Flash-Photolyse

Die sogenannte Laser-Flash-Photolyse ist eine Variante der Aufnahme von transienten Absorptionsspektren. Dafür werden Moleküle mit einem starken Laserpuls angeregt und die spektroskopischen Eigenschaften des angeregten Zustandes mit einem zweiten Laserpuls untersucht (Abbildung 7). Diese Messungen lassen Rückschlüsse auf die angeregten Zustände und Übergänge bei verschiedenen Wellenlängen zu. Ebenfalls messbar sind die Lebenszeiten der jeweiligen transienten Spezies, sowie eine genauere Untersuchung von photochemischen Reaktionen und photoinduzierten Elektronentransferprozessen.^[31]

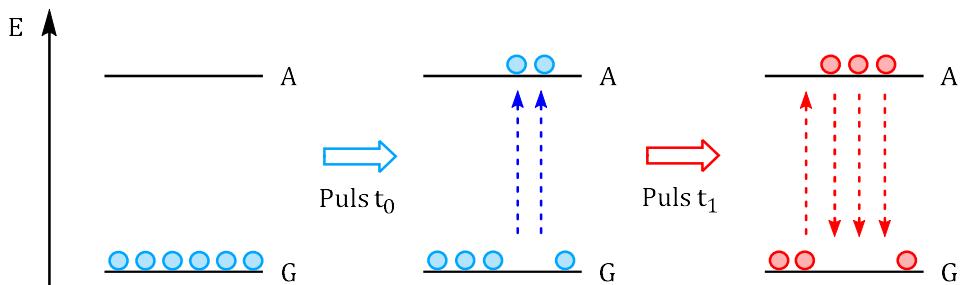


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufes einer Laser-Flash Photolyse mit der Anregung der Moleküle vom Grundzustand (G) in angeregte Zustände (A), und einem zweitem Laserpuls zur Messung der Relaxation in den Grundzustand nach definierter Zeit (t_1).

Die zeitliche Auflösung der jeweiligen Prozesse hängt jeweils von der Dauer der Laserpulse auf die Probe ab. Bei der Nutzung ultrakurzer Laserpulse (im Femtosekunden-Bereich) können sowohl die Propagation neuer angeregter Zustände als auch die Relaxation in guter Auflösung genau verfolgt werden. Die Verwendung weniger kurzer Laserpulse im Nano- bis Microsekunden-Bereich erlaubt nur noch die Beobachtung langsamerer Prozesse. So sind zum Beispiel nur noch relaxierende Übergänge von langlebigeren Triplett-Übergängen klar zu beobachten. Es können allerdings noch immer Aussagen über die Lebenszeit einiger photophysikalischer Prozesse gemacht und Interaktionen mit Reaktionspartnern durch Emissionslöschungsexperimente getestet werden.

Gemessen wird jeweils die Differenz der Optischen Dichte (ΔOD), die die Veränderung der Absorbanz zum Zeitpunkt t_n vom Zeitpunkt t_0 beschreibt.

In dieser Arbeit wurde die Laser-Flash-Photolyse verwendet, um die photophysikalischen Prozesse unter Nutzung eines Photosensibilisators in Oligonukleotiden näher aufzuklären.

2. DNA

2.1 Genetische Informationen

Die Entdeckung des Erbguts reicht nicht allzu weit zurück. So erschien es dem Mönch GREGOR MENDEL im 19. Jahrhundert wahrscheinlich recht trivial, verschiedene Erbsenpflanzen miteinander zu kreuzen und zu notieren, welche Eigenschaften wie ausgeprägt in den gekreuzten Sorten vorhanden waren. Für das Verständnis von genetischen Informationen im Erbgut waren diese Beobachtungen allerdings ein Schlüsselpunkt.^[32] Parallel stellte CHARLES DARWIN seine Theorie der natürlichen Selektion auf, nach der sich die Ausprägung verschiedener Merkmale von Tierarten auf die Umstände des jeweiligen Lebensraumes anpasste. Die Veränderung des genetischen Erbgutes sicherte somit das Überleben der jeweiligen Spezies.^[33]

Sowohl DARWIN als auch MENDEL gelten als Vorreiter der heutigen Genetik. Erst etwa hundert Jahre später gelang es, die molekularen Grundbausteine hinter der Ausprägung genetischer Merkmale aufzuklären. Das Röntgenbild einer DNA-Doppelhelix von ROSALIND FRANKLIN führte nach Theorien von drei ineinander gewundenen Strängen mit außen liegenden Basen und innen liegenden Phosphatresten zu der Struktur, mit der wir DNA heute noch beschreiben.^[34] FRANCIS CRICK und JAMES WATSON beschrieben 1953 die Struktur der B-DNA mit einer Doppelhelix, in der die DNA-Basen innen miteinander wechselwirken und durch Zucker-Phosphatbrücken außen miteinander verbunden sind.^[35] Die DNA-Basen werden unterteilt in die Purine, Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidine, Thymin (T) und Cytosin (C) (Abbildung 8). Durch die Beobachtung, dass sich in verschiedenen Organismen immer ungefähr gleich viele Cytosin wie Guanin sowie Adenin wie Thymin Basen befinden, wurde geschlussfolgert, dass nicht alle Nukleinbasen gleichermaßen miteinander wechselwirken.^[36] Stattdessen findet die stabilste und damit bevorzugte Basenpaarung zwischen Adenin und Thymin sowie zwischen Guanin und Cytosin statt. Diese Basenpaare werden daher als WATSON-CRICK Basenpaare bezeichnet. Sie wechselwirken über Wasserstoffbrücken, sowie VAN DER WAALS Kräfte und über die π -Elektronen der übereinander gestapelten Basen, was zu einer stabilen Doppelhelix führt.

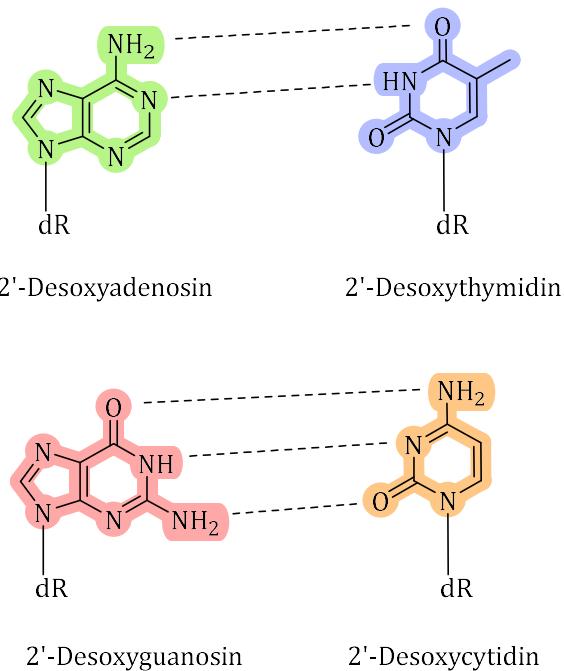


Abbildung 8: DNA-Basen, links Purine 2'-Desoxy-adenosin (dA) und 2'-Desoxy-guanosin (dG), rechts Pyrimidine Thymidin (dT) und 2'-Desoxy-cytidin (dC) mit als abgekürztem Zucker (dR, Desoxyribose) und ihre Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken nach der WATSON-CRICK Basenpaarung.

Ende der 1950er Jahre wurde herausgefunden, dass es nicht nur die durch WATSON und CRICK geprägte Basenpaarung in der von ihnen vorgestellten Konfiguration gibt. Stattdessen stieß KARST HOOGSTEEN bei seiner kristallographischen Untersuchung zweier methylierter DNA-Basen, 1-Methylthymidin und 9-Methyladenin, auf eine Veränderung der räumlichen Anordnung der Basen. Diese veränderte Basenpaarung wird als HOOGSTEEN-Basenpaarung bezeichnet (Abbildung 9). Hierfür muss die DNA-Doppelhelix mit HOOGSTEEN-Basenpaarung allerdings enger „zusammenrücken“ und wird so rund 2.5 Å schmäler.^[37]

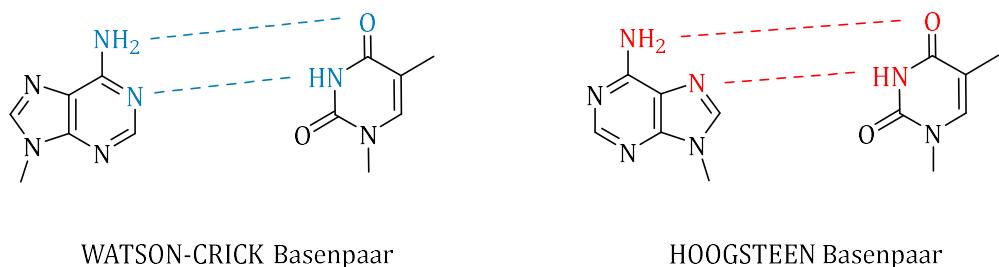


Abbildung 9: Unterschiedliche DNA-Basenpaarungen am Beispiel von 9-Methyladenin und 1-Methylthymidin.

Abgesehen von der Paarung der DNA-Basen gibt es weitere Merkmale, die im Aufbau der DNA variieren. Wird die DNA-Doppelhelix Stressfaktoren wie zum Beispiel Trockenheit, oder einem veränderten pH-Wert ausgesetzt oder es kommt zu Fehlpaarungen und starken Verdrehungen, verändert sich ihre Struktur. Die grundlegende Unterteilung einer

Theoretischer Hintergrund

DNA-Helix folgt daher ihrer jeweiligen Struktur, wobei die durch WATSON und CRICK vorgeschlagene B-Struktur für native DNA am relevantesten ist.

Die B-Form der DNA zeigt eine rechtsgängige Drehung zweier entgegengesetzt miteinander verwundenen Helices mit zehn Nukleotiden pro Windung, was einem Abstand von 3.4 nm entspricht. Die sich durch die Windung der Helix ergebenen Furchen werden als große und kleine Furche bezeichnet und sind 2.2 nm und 1.2 nm lang. Außerdem folgt die Zuckerkonformation der 2'endo Form.^[35, 38]

Der überwiegende Teil der DNA befindet sich bei Eukaryoten im Zellkern. Dort sind etwa 3 Milliarden Basenpaare in Doppelhelices miteinander verbunden und in menschlichen Zellen um Histone gewickelt, wodurch sich insgesamt 46 Chromosomen ergeben.^[39] Damit befindet sich unsere gesamte genetische Information in jeder einzelnen Zelle unseres Körpers. Ihre Anpassungsfähigkeit zeigt, wie stabil die Doppelhelixstruktur ist, um unseren genetischen Code zu schützen. Hinzu kommen noch unzählige Korrektur- und Reparaturenzyme, die dafür sorgen sollen, dass das Erbgut möglichst fehlerlos bleibt.

2.2 DNA-Schäden durch UV-Licht

Obwohl die DNA ein vergleichbar stabiles Biomolekül ist, kann es zu Fehlern in ihrer Struktur oder ihrer Basenabfolge kommen. Diese Fehler können sowohl durch exogene Einflüsse wie die Exposition mit hochenergetischer Strahlung oder Chemikalien ausgelöst werden oder durch endogene Prozesse innerhalb der Zelle. Diese können reaktive Spezies zur Folge haben, welche in den Zellkern und damit zur DNA gelangen können. Mit etwa 10 Millionen Zellen, die sich pro Sekunde teilen, und etwa einem Drittel von ihnen, die von Fehlern betroffen sind, ergibt sich eine große Anzahl an Mängeln im Erbgut.^[40] Wenn die Fehler an einzelnen Basen durch den Körper nicht erkannt und behoben werden können, entstehen während der Zellteilung Strangbrüche oder es kommt zu Fehlern der Basensequenz während der Replikation. Letzteres sind zufällige Mutationen, die zwar im besten Fall mit der potentiellen Anpassung an unsere Umwelteinflüsse unser Überleben sichern, an der falschen Stelle allerdings auf lange Sicht Krankheiten wie Krebs auslösen können.^[41]

Ein besonderes Augenmerk gilt im Zuge dieser Arbeit DNA-Schäden, die durch die Exposition mit ultravioletter (UV) Strahlung hervorgerufen werden. UV-Strahlung ist deutlich energiereicher als die durch unsere Augen wahrnehmbare Strahlung (Vis-Bereich, Abbildung 10). Sie wird unterteilt in UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) und UV-C (100-280 nm), wobei nur UV-A- und UV-B-Licht in der Diskussion um UV-Schäden in DNA relevant sind. Dies liegt daran, dass UV-C-Licht vollständig von der Ozonschicht absorbiert wird und damit nicht auf unsere Haut gelangen kann.^[42]

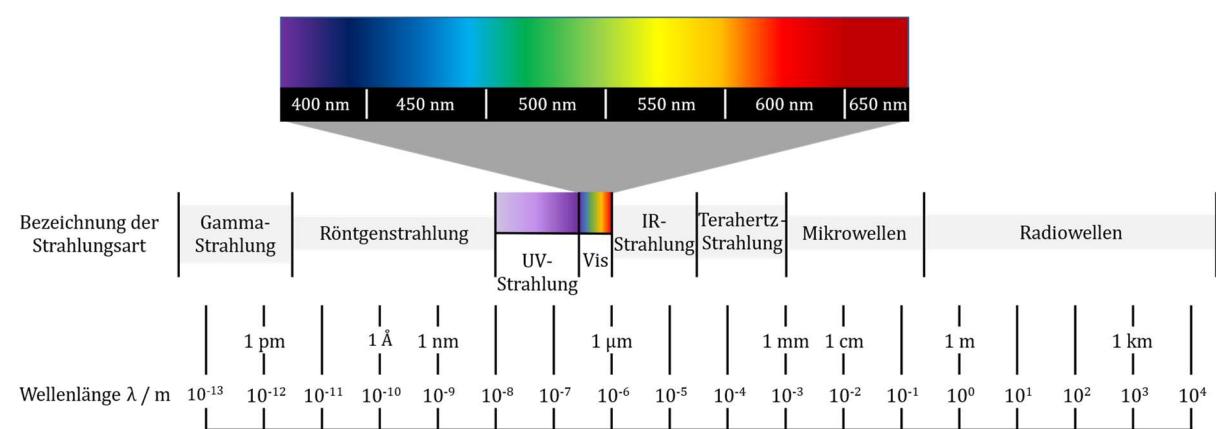


Abbildung 10: Elektromagnetisches Spektrum, hervorgehobenes sichtbares Spektrum (VIS, regenbogenfarben) und UV-Spektrum (violettblau)^[43]

Assoziiert sind mit UV-Schäden vor allem verschiedene Formen von Hautkrebs, zum Beispiel Basalzellkarzinome, Plattenepithelzellkarzinome aber auch maligne Melanome

(schwarzer Hautkrebs), sowie andere Krebsarten wie das Non-HODGKINS-Lymphom.^[44] Chemisch liegt die Ursache dieser Krebsarten an lichtinduzierten Reaktionen der DNA-Basen, die in der Replikation zu Mutationen führen.

2.2.1 Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies

Eine häufige Art von Reaktionen im Zusammenhang mit DNA-Schäden sind Reaktionen mit Sauerstoff. Normalerweise sind Sauerstoffmoleküle in der Luft nicht gefährlich für Lebewesen, ganz im Gegenteil brauchen wir Menschen Sauerstoff zum Überleben. Dass Sauerstoff in Lebewesen nicht besonders reaktiv ist, liegt an der Triplet Konfiguration der Außen elektronen. In einem Sauerstoffmolekül (O_2) befinden sich zwei einzelne Elektronen desselben Spins in zwei unterschiedlichen Orbitalen. Demnach ist eine Spinumkehr zur Reaktion mit anderen Molekülen notwendig, was allerdings quantenmechanisch verboten und damit ein sehr langsamer Prozess ist. Wird allerdings durch den Einfluss von Photosensibilisatoren oder Enzymen im Körper Triplet- in Singulett-Sauerstoff umgewandelt, kommt es zu einer drastischen Erhöhung der Reaktivität mit umliegenden Molekülen.^[45] Das wird innerhalb einer Zelle als oxidativer Stress bezeichnet und durch Enzyme befeuert, die ihrerseits reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) herstellen. Ein Beispiel für Enzyme, die ROS herstellen, sind Oxidasen wie NOX oder NO-Synthasen (NOS). Ein weiterer Auslöser für ROS sind freie Metall-Ionen wie Fe^{2+} , die durch eine FENTON-Reaktion H_2O_2 in $HO\cdot$ -Radikale umwandeln (Abbildung 11).^[46] Dem entgegen wirken verschiedene Enzyme, die Zellen vor dem Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies beschützen.^[47]

Die entstandenen Sauerstoff-Radikale sind sehr klein, weswegen sie die Membran zum Zellkern passieren und dort mit DNA-Basen reagieren können. $HO\cdot$ -Radikale addieren zum Beispiel an die Doppelbindungen der Pyrimidine und die Methylgruppe von Thymidin oder Abstrahieren H-Atome der Zuckermoleküle, was zu Strangbrücken führt.^[48] An Purinen reagieren Sauerstoffradikale vor allem an den Positionen C4, C5 und C8.^[48b] Eine der bekanntesten Reaktionen ist dabei die Oxidation von Guanin zu 8-Oxo-2'-deoxyguanosin (8-oxo-dG) oder die Formamidopyrimidin-Modifizierung (Fapy-dG). Vor allem 8-oxo-dG ist bekannt für Folge-Mutationen von G:C→A:T.^[49]

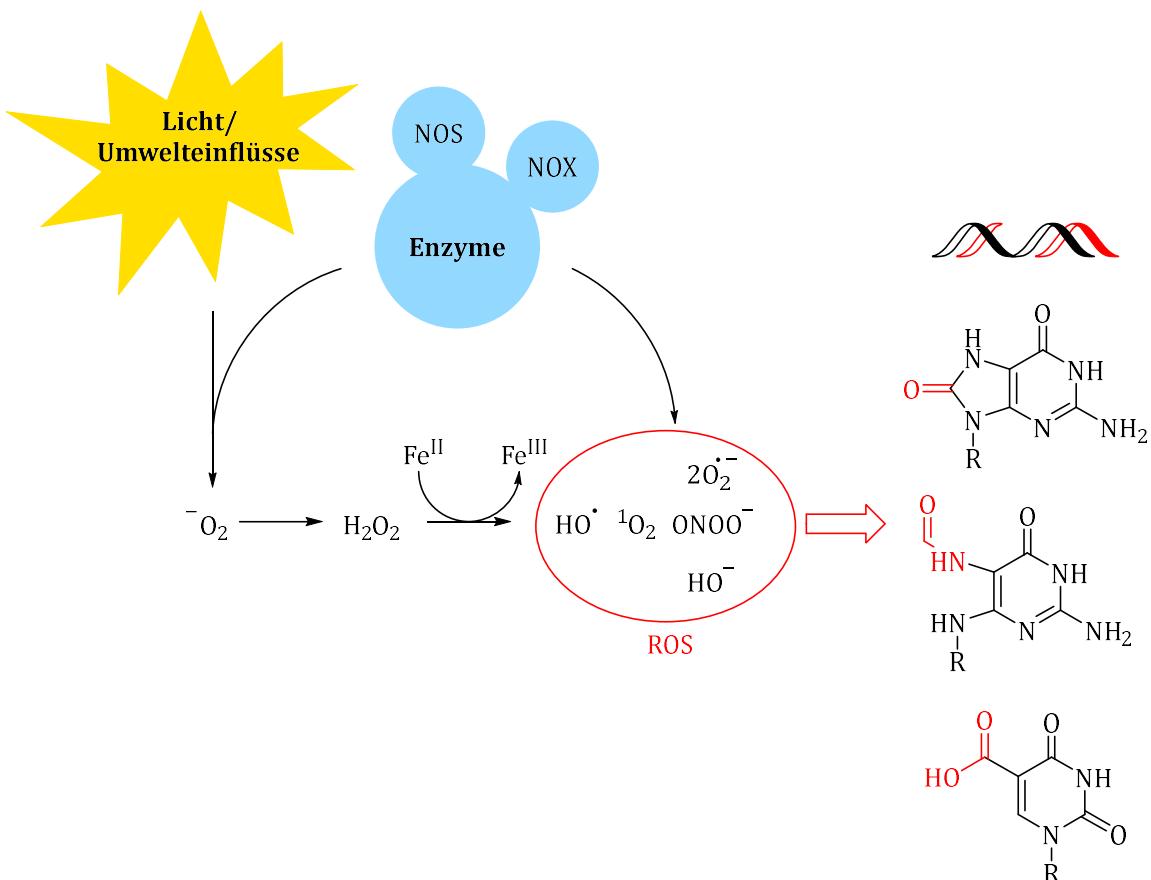


Abbildung 11: Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Enzyme und FENTON Reaktion und Beispiele für oxidative DNA-Schäden: Strangbrüche (oben), 8-oxo-dG (Mitte oben), Fapy (Mitte unten) und Carboxythymidin (unten)^[46a, 50]

2.2.2 Direkte Photoreaktionen an Nukleinsäuren

Abgesehen von DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies können DNA-Basen UV-Licht auch direkt absorbieren, was zu photochemischen Reaktionen und dadurch zu Schäden im Erbgut führt. Direkte Photoreaktionen finden vorzugsweise mit Pyrimidinen statt. Die drei wichtigsten DNA-Photoprodukte sind Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs), (6-4)-Photoläsionen und DEWAR-Isomere (Abbildung 12).

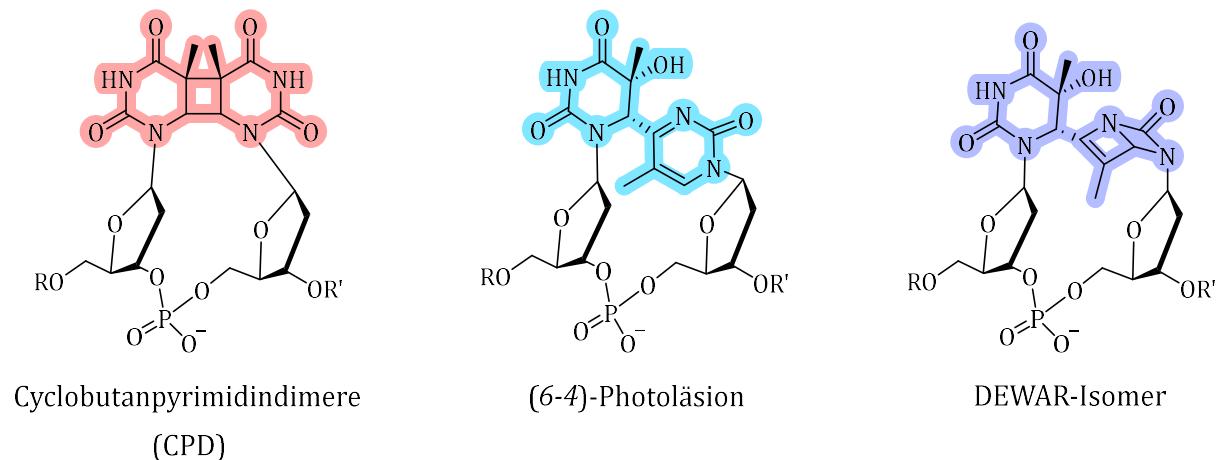


Abbildung 12: Produkte nach Anregung mit UV-Licht von Nukleosiden am Beispiel von zwei Thymidin-Basen: CPD-Schäden (links, rot), (6-4)-Photoläsionen (mittig, hellblau) und DEWAR Isomeren (rechts, dunkelblau)

CPDs werden mit Abstand am häufigsten gebildet.^[51] Sie wurden bereits 1958 von ROB BEUKERS isoliert, nachdem dieser eine gefrorene Thymidin-Lösung mit UV-Licht bestrahlt hatte.^[52] Die Bildung dieses DNA-Schadens erfolgt in einer photoinduzierten [2+2]-Cycloaddition zwischen der Doppelbindung an C5 und C6 zweier benachbarter Pyrimidin-Basen (Abbildung 13).^[53]

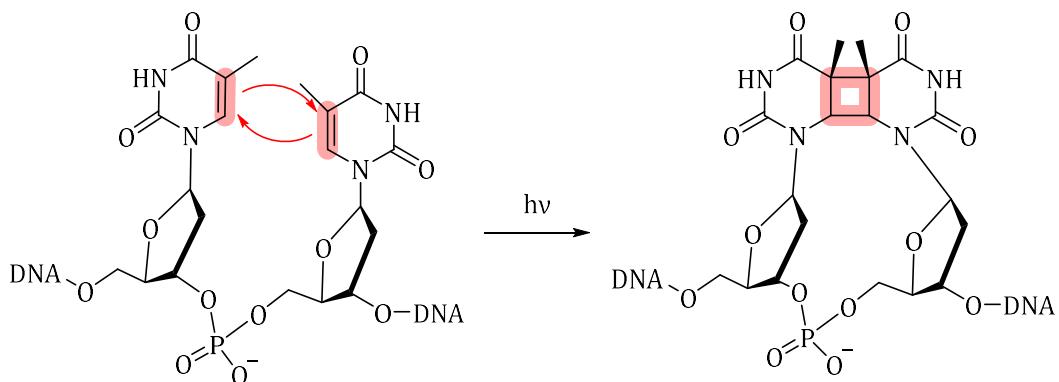


Abbildung 13: Reaktionsschema zur Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPD) gezeigt in der *cis-syn* Form, die sich in natürlicher DNA bevorzugt bildet.

Durch die räumliche Ordnung innerhalb der DNA-Doppelhelix kommt es vorzugsweise zur Bildung eines *cis-syn*-Produktes, in kürzeren DNA-Strängen können allerdings auch *trans-syn*-Produkte entstehen. Wie gut die [2+2]-Cycloaddition funktioniert, hängt dabei von den verwendeten DNA-Basen ab. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt in der Folge TT>>TC>CT>>>CC ab, wobei zwischen zwei benachbarten dC Basen annähernd keine CPD-Schäden mehr zu beobachten sind. Außerdem ist bekannt, dass auch methylierte Cytosin-Basen zur CPD-Bildung befähigt sind.^[54] Abgesehen von der Bildung der CPD-Schäden durch direkte Absorption von UV-B Licht, ist bekannt, dass sie auch durch Bestrahlung mit UV-A Licht in signifikanten Mengen entstehen können. Das funktioniert

über die Absorption von UV-Licht durch ganze Basenstapel oder durch Photosensibilisatoren, die ihre absorbierte Energie auf Pyrimidine übertragen und so CPDs hervorrufen. Am besten funktioniert auch dies durch die Energieübertragung auf Thymidin, da dieses die niedrigsten Anregungsenergien aufweist. Vor allem die für die Triplett-Triplett-Energieübertragung erforderliche niedrige Triplett-Energie wird durch die Einflüsse umliegender Basen in einem vollständigen DNA-Strang weiter herabgesetzt. So liegt die Triplett Energie des Thymidin-Monophosphates bei $E_T = 310 \text{ kJ/mol}$, wird in einem DNA-Strang jedoch herabgesetzt auf etwa $E_T = 270 \text{ kJ/mol}$.^[55] Das setzt die Hürde für Energiedonoren herab und macht Energieübertragungen deutlich wahrscheinlicher. Die Formation eines CPD-Schadens erfolgt nach dem Erhalt der notwendigen Energie innerhalb von etwa einer Pikosekunde.^[56] Ist Cytosin an der Bildung des CPD beteiligt, kann es anschließend durch eine Hydrolyse zur Desaminierung der Base kommen, was C→U-Mutationen und in der Replikation anschließend G→A-Mutationen zur Folge hat.^[57] Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass CPDs trotz ihrer Häufigkeit nicht in einem linearen Reaktionsverlauf entstehen. Stattdessen wird der Schaden durch die DNA selbst zum Teil repariert. Hierfür übertragen benachbarte durch Licht angeregte Guanine Elektronen auf den CPD-Schaden, der sich somit wieder öffnen kann. Das führt zu einem abgeflachten Reaktionsverlauf, der eine Sättigungsgrenze anstrebt.^[58] Zur Reparatur dieses Schadens sind ebenfalls einzelne Enzyme befähigt, wie zum Beispiel die T4-Endonuclease V spezieller Bakteriophagen oder die Nuklein-Exzisions-Reparatur (NER) im Menschen.^[59] In anderen Lebewesen, zum Beispiel Beuteltieren oder verschiedenen Bakterien, sind in Photolyasen Flavine beteiligt, welche ein Elektron auf DNA-Schäden übertragen und diese somit öffnen können.^[60]

Etwa um ein Achtfaches seltener sind (6-4)-Photoläsionen in DNA.^[51] Sie werden unter Einstrahlung von UV-B- und UV-C-Licht in einer PATERNÒ-BÜCHI-Reaktion gebildet. Dabei reagiert die Doppelbindung an der C5-C6-Position eines Pyrimidins mit der Carbonylfunktion eines benachbarten Thymidins oder der Aminofunktion eines Cytidins. In einer [2+2]-Cycloaddition wird ein Oxetan- oder Azetidin-Intermediat gebildet bevor sich der Vierring schließlich durch Hitze oder Protonierung zur (6-4)-Photoläsion öffnet (Abbildung 14).^[61] Das neu entstandene Chromophor der (6-4)-Photoläsion weist eine neue rotverschobene Absorptionsschulter auf.^[62] Bei weiterer Exposition mit UV-A-Licht werden daher (6-4)-Schäden in DEWAR-Isomere umgewandelt.^[63]

Theoretischer Hintergrund

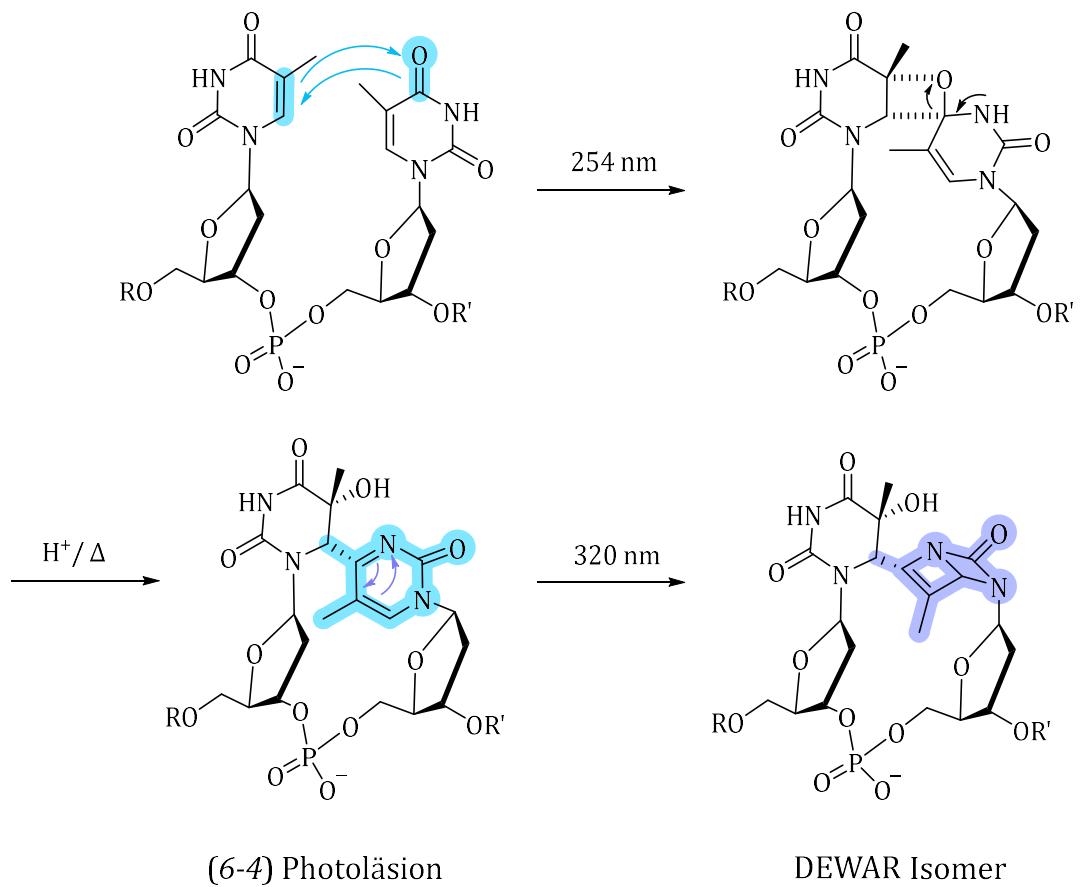


Abbildung 14: Reaktionsweg zweier benachbarter Thymidine zur (6-4)-Photoläsion und anschließende Isomerisierung in das DEWAR-Isomer

Der (6-4)-Schaden gilt als deutlich mutagener im Vergleich zu CPD-Schäden, da es vermehrt zu Desaminierungen kommt, was zu C \rightarrow T-Mutationen führt.^[64] Am häufigsten gebildet werden T(6-4)C-Photoschäden, deutlich seltener T(6-4)T-Photoschäden und noch seltener andere Kombinationen der (6-4)-Photoläsion.^[65]

2.3 Phosphoramidit-Synthese

Die DNA-Synthese in Lebewesen ist ein komplexer Prozess, an dem unzählige Enzyme verschiedener Funktion beteiligt sind. Dabei wird vorzugsweise auf die Replikation eines bereits vorhandenen Stranges zurückgegriffen, statt bei jeder Zellteilung erneut ganze Doppelstränge aus einzelnen Nukleotiden zu synthetisieren. In der Zelle funktioniert die Replikation von 5' nach 3' bei der die DNA-Polymerase die zum Elternstrang passenden komplementären 2'-Desoxynukleotide aneinanderknüpft, wodurch der neue Strang entsteht.^[66]

Bei der Untersuchung verschiedener zellulärer Prozesse an der die DNA beteiligt ist, ist es allerdings oft notwendig, kürzere DNA-Stränge definierter Länge und Basenabfolge zu verwenden. Sobald kürzere Oligonukleotid-Stränge untersucht werden, ist es daher einfacher, mit einer chemischen Methode DNA zu synthetisieren, als zu versuchen, die gewünschte Basenabfolge aus einem vollständigen Genom zu isolieren. Zusätzlich ist es so möglich, eine oder mehrere Basen an definierten Positionen zu verändern und sie sich für verschiedenste Anwendungen in Technologie und Medizin zu Nutze zu machen.^[67]

Für die chemische Synthese einzelner Oligonukleotide ist es notwendig, eine verlässliche Reaktionsabfolge mit hohem Umsatz und möglichst wenigen Nebenreaktionen zu finden. Kleinste Ausbeuteeinbrüche führen bei der Verknüpfung von Dutzenden Nukleotiden zu erheblichen Einbußen. Sollte zum Beispiel versucht werden, ein Polynukleotid aus 100 Einzelbausteinen zu synthetisieren mit einer Ausbeute von 99% pro Schritt, können trotzdem nur maximal 37% Ausbeute des vollständigen Stranges erreicht werden.^[68] Durchgesetzt hat sich daher vor allem die sogenannte Phosphoramidit-Synthese. Sie weist hohe Ausbeuten bei kurzen Reaktionszeiten und wenige Nebenreaktionen auf.

In dieser Syntheseroute werden Phosphoramidit-modifizierte 2'-Desoxynukleoside oder Nukleosidmodifikationen verwendet. Diese sind an der 5'-Position durch eine säurelabile Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMT) und sowohl an der jeweiligen Nukleinbase als auch am Phosphor durch basenlabile Schutzgruppen geschützt (Abbildung 15).^[69]

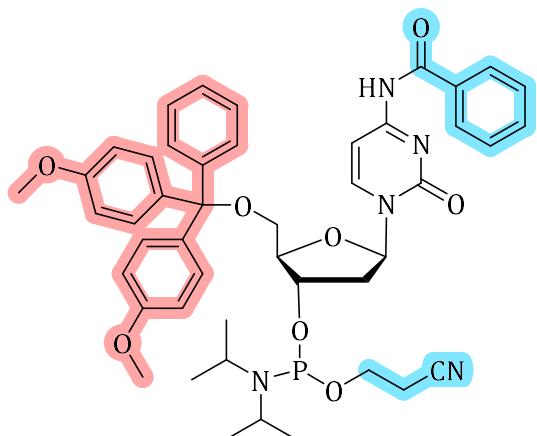


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines Phosphoramidit-Bausteins zur DNA-Synthese, beispielhaft mit 2'-Desoxycytidin als Base, mit DMT-Schutzgruppe (rot), basenlabiler Schutzgruppe an der Phosphoramiditspezies (blau) und basenlabiler Schutzgruppe (Für dC Benzoyl) an der Base (blau).^[70]

Der erste Synthesebaustein ist ein an eine feste Phase angebrachtes Nukleotid. Verwendet werden dafür in der Regel kleine Glaskugeln mit definierter Porengröße, das sogenannte *controlled pore glass* (CPG).^[71] Dabei ist es möglich, den Zucker am 5' Ende an das CPG anzubringen oder am 3'-Ende. Die Synthese vom 3'- zum 5'-Ende wird allerdings deutlich häufiger verwendet, so auch in dieser Arbeit. Im Folgenden werden die einzelnen Syntheseschritte näher erläutert.

Im ersten Schritt wird die am Zucker befindliche DMT-Schutzgruppe mit einer Säure, z.B. Trifluoracetat (TFA), entfernt (Abbildung 16 Entschüttung). Die Phosphorspezies des nächsten Phosphoramidit-Bausteins wird durch einen Aktivator wie Tetrazol aktiviert, um seine Reaktivität zu erhöhen (Abbildung 16 Aktivierung). Anschließend erfolgt die Kondensation der Bausteine zwischen der Phosphorspezies und der freien OH-Gruppe des ersten Bausteins. Um die Bildung vieler kleinerer Abbruchstränge zu verhindern, werden nicht reagierte OH-Gruppen daraufhin acetyliert, wodurch sie nicht mit dem nächsten Baustein reagieren können. Dieser Reaktionsschritt wird als *Capping* (engl. bedecken) bezeichnet (Abbildung 16 *Capping*). Das Phosphat-Rückgrat liegt in nativer DNA in einer Oxidationsstufe von P^V vor. Daher folgt ein Oxidationsschritt, der die Phosphorspezies von P^{III} nach P^V oxidiert (Abbildung 16 Oxidation). Der Grund für die Nutzung von P^{III} ist die schnellere Reaktionsgeschwindigkeit. Die aktivierte P^{III}-Spezies reagiert innerhalb von maximal 30 s, während die schnellsten Reaktionen mit P^V etwa 30 min dauern und deutlich niedrigere Ausbeuten aufweisen.^[72] Mit diesem Schritt ist der erste Zyklus der Oligonukleotidsynthese abgeschlossen und die nächste DMT-Schutzgruppe kann unter sauren Bedingungen entfernt werden. Alle Syntheseschritte können automatisiert mit einem Oligonukleotid-Synthesizer durchgeführt werden. Die

feste Phase befinden sich dafür in einer kleinen Säule und alle nötigen Reagenzien und Lösungsmittel werden nacheinander durch die Säule gepumpt.^[73] Als erste Einschätzung, wie erfolgreich die Kupplung der einzelnen Phosphoramidite war, kann die Absorption der abgespaltenen DMT-Schutzgruppe gemessen werden. Das entstehende Tritylkation hat eine charakteristische Absorption bei 504 nm, deren Intensität indiziert, wie viel des Phosphoramidits an das vorherige gekuppelt hat.^[74] Eine finale Ausbeutebestimmung des vollständigen DNA-Stranges ist allerdings erst nach der Synthese möglich.

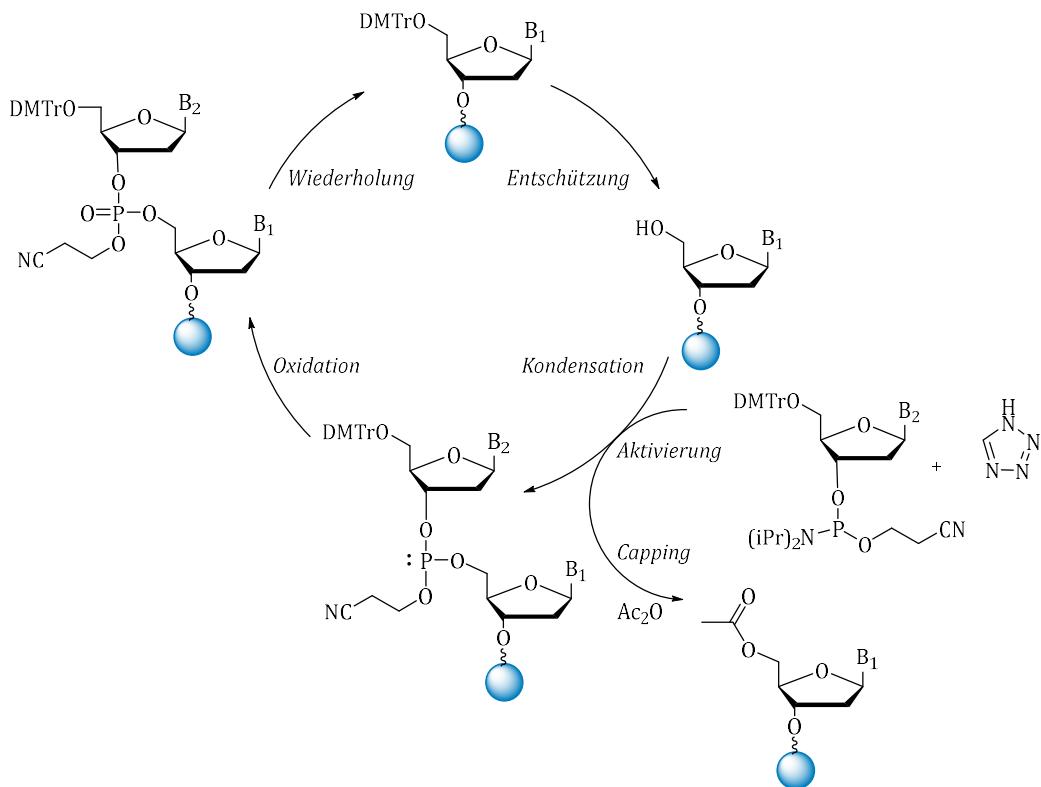


Abbildung 16: Reaktionszyklus einer Phosphoramiditsynthese beispielhaft an dem ersten an CPG angebrachten Nukleosid mit Base 1 (B₁)^[75]

Nach der vollständigen Oligonukleotidsynthese wird die DNA basisch von der festen Phase abgespalten. Im gleichen Schritt werden die Schutzgruppen an den natürlichen Nukleosiden entfernt. Anschließend erfolgt die Aufreinigung des Oligonukleotids, bei der Schutzgruppen, sowie entstandene Abbruchstränge entfernt werden.

Mit der Phosphoramidit-Synthese ist es möglich, Oligonukleotide von einer Länge bis zu 40 Basen zu synthetisieren. Diese Limitierung ergibt sich sowohl aus den beschriebenen Ausbeuteeinbußen, als auch aus der verwendeten Säure, die über längere Zeit immer öfter zu Depurinierungen oder anderen Nebenreaktionen führt.^[76]

3. Biomoleküle als Photosensibilisatoren

Abgesehen von den bereits erwähnten Ursachen für DNA-Schäden, gibt es noch eine weitere Art und Weise, wie das Erbgut beschädigt werden kann. Der Hintergrund dessen wirkt fast wie eine Selbst-Sabotage des Körpers, denn der Antrieb hinter dieser Art von Photoreaktionen befindet sich bereits in unseren Zellen. Einige endogene Moleküle sind dazu befähigt, als Photosensibilisatoren Energie aufzunehmen und an umliegende Moleküle abzugeben.^[5] Befinden sich diese Moleküle in räumlicher Nähe zur DNA, kann eine Energieübertragung auf die DNA-Basen stattfinden, was zu den bereits besprochenen DNA-Schäden führt, ohne dass der Körper Licht im Absorptionsspektrum der Nukleoside ausgesetzt war. Außerdem kann es durch endogene Photosensibilisatoren zur vermehrten Produktion von ROS kommen, was zusätzlich oxidativen Stress auslöst.^[77]

Vollkommen zerstörerisch sind endogene Photosensibilisatoren allerdings nicht. Ganz im Gegenteil sind sie teilweise an der Biosynthese von Vitamin D und Hormonen beteiligt, was für unser Überleben durchaus wichtig ist.^[78]

3.1 DNA-Modifikationen

Als DNA-Modifikation werden Veränderungen in der Grundstruktur einer oder mehrerer aufeinander folgenden Nukleotide im genetischen Material bezeichnet. Diese können zum Beispiel zur Regulation der Genabschnitte dienen oder das Resultat von Schäden an den Nukleinbasen sein.^[79]

Ein Beispiel für DNA-Modifikationen sind epigenetische Marker. Das sind DNA-Basen, die vom Körper post-replikativ modifiziert werden, um spezifische Genabschnitte zu aktivieren bzw. desaktivieren. Sie enthalten somit Informationen, um die Synthese verschiedener Proteine zu steuern und die Zelle auf wechselnde Umwelteinflüsse anzupassen. Ein Beispiel für die DNA-Modifizierung als epigenetische Marker sind Methylierungen an DNA Basen.^[80] Ein sehr gut untersuchter epigenetischer Marker ist das an Position 5 methylierte 2'-Desoxycytidin (mdC). Die Methylierung erfolgt dabei nach der DNA-Replikation durch Methyltransferasen. Es ist an der Genregulation und der strukturellen Organisation der DNA beteiligt. Um Gene reversibel an bzw. abzuschalten, kann die Methyl-Modifikation durch Enzyme wieder entfernt werden. Die

Demethylierung dieses Markers hat allerdings noch einige weitere Modifikationen zur Folge. Da die Methylgruppe eine sehr stabile Gruppe ist, kann diese nicht auf direktem Wege demethyliert werden. Stattdessen kommen TET-Enzyme (*Ten-Eleven-Translocation*) zum Einsatz, welche die Methylgruppe oxidieren, um mit der vollständigen Umwandlung in die Säuregruppe eine bessere Abgangsgruppe zu schaffen. Während diesem Vorgang entstehen zusätzlich noch andere Modifikationen, und zwar 5-Hydroxymethyl-2'-desoxycytosin (hmdC), 5-Formyl-2'-desoxycytosin (fdC) und 5-Carboxy-2'-desoxycytosin (cadC) (Abbildung 17).^[81]

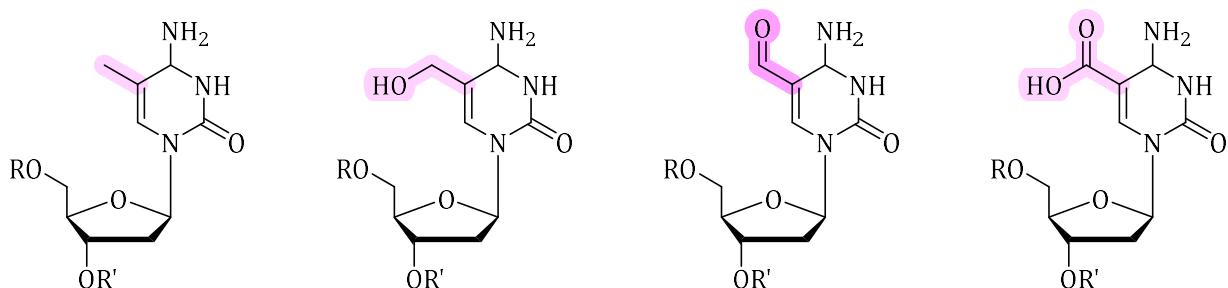


Abbildung 17: Übersicht der modifizierten 2'-Desoxycytosine: 5-Methyl-2'-desoxycytosin (mdC), 5-Hydroxymethyl-2'-desoxycytosin (hmdC), 5-Formyl-2'-desoxycytosin (fdC) und 5-Carboxy-2'-desoxycytosin (cadC) mit hervorgehobener Modifizierung.

Diese epigenetischen Modifikationen stehen im Verdacht, mit schweren Erkrankungen wie Alzheimer zusammenzuhängen.^[82] Darüber hinaus gibt es aber auch Studien, die vor allem 5-Formyl-2'-desoxycytosin Eigenschaften eines Photosensibilisators nachweisen.^[83] Nähere Beschreibungen dazu folgen im Analyse-Teil dieser Arbeit.

Eine weitere Form der DNA-Modifikation ist die Entstehung von DNA-Schäden. Auch diese verändern die Struktur und damit die Eigenschaften einzelner DNA-Basen, sodass manche von ihnen potenziell zu Photosensibilisatoren werden können. Somit entstünde eine Lawine von Schäden, ursprünglich ausgelöst durch einzelne DNA-Schäden. Beispielsweise wurde dem mit 5-Formyl-2'-desoxycytosin strukturell recht nah verwandten Oxidationsschaden 5-Formyl-2'-desoxyuracil (fdU) ebenfalls Photosensibilisatorpotential nachgewiesen (Abbildung 18).^[83] 5-Formyl-2'-desoxyuracil ist dabei lediglich ein Intermediat bei der Oxidation von Thymidin zu 5-Carboxy-2'-desoxyuracil.^[84] Weiterhin wurde durch MIRANDA *et al.* Anfang der 2010er Jahre die Theorie aufgestellt, dass der in einem (6-4)-Schaden entstandene Chromophor nicht photochemisch harmlos ist, sondern selbst als Photosensibilisator weitere Schäden verursacht.^[85]

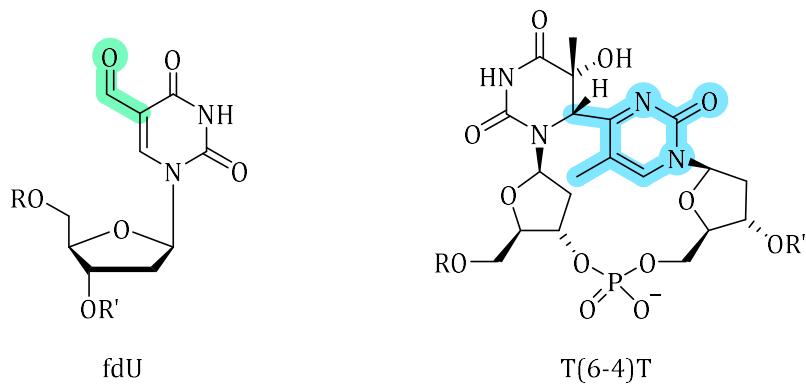


Abbildung 18: Mögliche Photosensibilisatoren, der oxidative Schaden 5-Formyl-2'-desoxyuracil (fdU) und die (6-4)-Photoläsion, hier beispielhaft als T(6-4)T-Schaden dargestellt.

Um Triplet-Energie auf DNA-Basen übertragen zu können, muss der jeweilige Photosensibilisator außerhalb des direkten Absorptionsbereiches der DNA-Basen absorbieren und eine höhere Triplet-Energie aufweisen. Die niedrigste Hürde bildet hierfür, wie bereits besprochen, Thymidin mit Triplet-Energien zwischen 270-310 kJ/mol je nach den umliegenden Basen.^[55] Diese Hürde wird schon durch manche dieser DNA-Modifikationen übertroffen. Die räumliche Nähe zueinander gepaart mit hoher Triplet-Energie und durch Modifikationen veränderte Absorptionseigenschaften schafft somit Hotspots an DNA-Schäden in bestimmten Bereichen der DNA.

3.2 Melanin-Derivate

Unweigerlich an der Einstrahlung von Licht in menschlicher Haut beteiligt ist Melanin. Das ist ein zu diesem Zeitpunkt strukturell nicht vollständig aufgeklärtes Polymer, welches in den Melanozyten unserer Haut als Schutzschild vor UV-Strahlung fungiert. Bekannt ist, dass es aus den Monomeren Pheomelanin und Eumelanin besteht, wobei die Zusammensetzung der Einheiten variieren kann (Abbildung 19).[86]

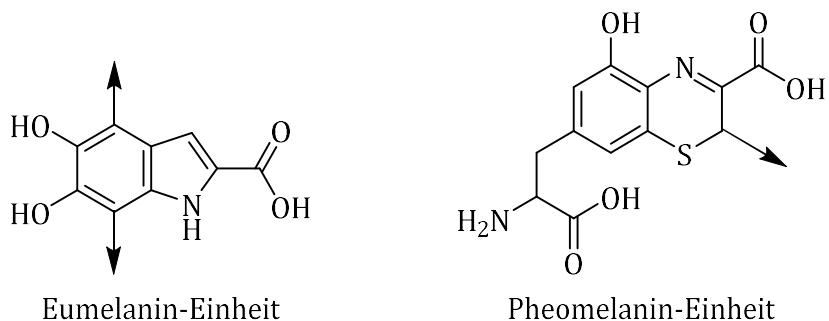


Abbildung 19: Zwei Monomereinheiten: Eumelanin (5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure, DHICA) und Pheomelanin (Benzothiazin-Einheit aus der Cyclisierung von 5-Cysteinyl-Dopamin) mit angezeigten Verknüpfungspunkten zu weiteren Monomeren^[87]

Pheomelanin ist ein oranges Pigment, das in hohen Konzentrationen in Menschen mit heller Haut und blonden bis roten Haaren vorkommt. Dagegen ist Eumelanin braun bis schwarz und kommt in erhöhter Konzentration in dunklen Haut- und Haartypen vor. Der jeweilige Anteil an Eumelanin und Pheomelanin lässt Rückschlüsse auf die Effektivität des Schutzes vor UV-Strahlung zu. Menschen mit hohem Pheomelanin-Anteil sind deutlich häufiger von Hautkrebs betroffen, als Menschen mit hohem Eumelanin-Anteil.^[88] Diese Beobachtung hat zu näheren Untersuchungen der Pigmente geführt. Melanin mit hohem Pheomelanin-Anteil wurde so mit der erhöhten Produktion von reaktivem Singulett-Sauerstoff in Verbindung gebracht.^[89] Andere Studien legen nahe, dass sich das in Pheomelanin vorhandene Benzothiazin unter Einstrahlung von UV-A Licht in eine Benzothiazol-Einheit umwandeln kann. Diese könnte nach dem Abbau des Polymers in seine Monomere die Membran zum Zellkern passieren und dort als Photosensibilisator fungieren. Ähnliches wird auch mit Eumelanin-Einheiten beobachtet, die sich während der Photodegradation allerdings vorzugsweise in Pyrrol-Derivate umwandeln und somit kein besonders breites Absorptionsspektrum mehr aufweisen (Abbildung 20). Dieser Vorgang steht nicht im Zusammenhang mit einer Photosensibilisierung durch die Pyrrol-Derivate, sondern weist auf die Generierung von Singulett-Sauerstoff hin.^[90]

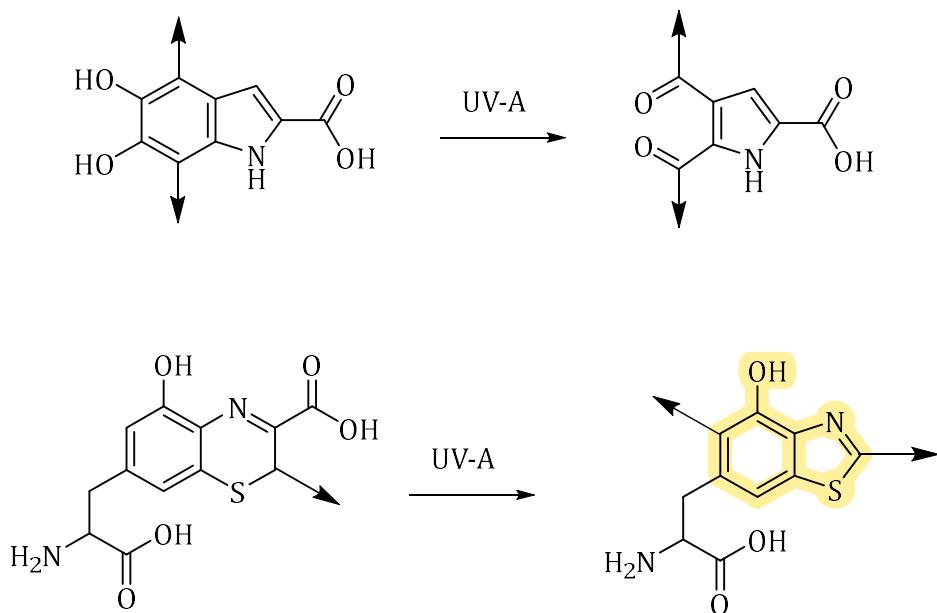


Abbildung 20: Photodegradations-Produkte von Eumelanin (DHICA Umwandlung zu Pyrrol-Derivat, oben) und Pheomelanin (Umwandlung Benzothiazin-Derivat in Benzothiazol-Derivat, unten), gelb markiert die Benzothiazol Spezies als möglicher Photosensibilisator.^[90]

Ein letzter photochemischer Prozess in Melanin ist die sogenannte „Chemiexcitation“. Dieser Prozess beschreibt die Generierung von UV-Schäden wie CPDs in der Dunkelheit. Die Einstrahlung von UV-Licht hat demnach die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies Peroxynitrit zur Folge, welches als starkes Oxidationsmittel Melanin-Bausteine angreift. Besonders bei Eumelanin-Bausteinen, wie der 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (DHICA) wurde festgestellt, dass ihre Oxidation zu einer chemisch in den Triplet-Zustand gebrachten Spezies führt. Die derart angeregte Spezies kann ihre Energie über einen Triplet-Triplet-Energietransfer auf die DNA-Basen übertragen und so Schäden verursachen.^[50, 91]

III. Themenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener DNA-Modifikationen und endogener Chromophore als Photosensibilisatoren in Oligonukleotiden im Hinblick auf die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD). In Betracht gezogen wurden Modifikationen bzw. Chromophore mit einer höheren Triplet-Energie als Thymidin und ausreichend hoher Population des Triplet-Zustandes sowie Absorption im UV-A-Bereich. Es sollte festgestellt werden, ob die in Frage kommenden „natürlichen“ Photosensibilisatoren in einem Oligonukleotid tatsächlich Energie auf ein Thymidin-Paar übertragen und so zur Schadensbildung führen. Als mögliche Photosensibilisatoren untersucht wurden die mit Formyl-Gruppen modifizierten Nukleoside 5-Formyl-2'-desoxycytidin (fdC) und 5-Formyl-2'-desoxyuracil (fdU) sowie das Chromophor der (6-4)-Photoläsion, 5-Methyl-2-pyrimidon (Pyo), und das Methoxybenzothiazol-Derivat des Pheomelaninmonomers (Pheo) (Abbildung 21).

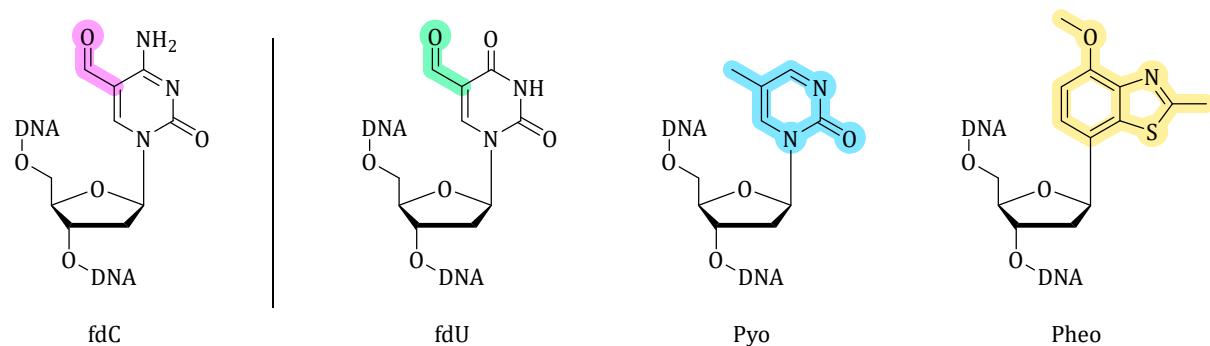


Abbildung 21: Die in dieser Arbeit untersuchten möglichen Photosensibilisatoren Formyl-2'-desoxycytidin (fdC), Formyl-2'-desoxyuracil (fdU), 1-(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methyl-2-pyrimidon (Pyo) und das 2'-Desoxyribofuranosid-modifizierte Pheomelanin-Benzothiazol-Derivat (Pheo).

Ebenfalls untersucht werden sollten die zugrunde liegenden photophysikalischen Prozesse der Energieübertragung. Insbesondere sollten Mechanismen beleuchtet werden, die Energieübertragungen über längere Strecken innerhalb des Erbgutes auslösen. Diese können dazu führen, dass ein Photosensibilisator Schäden in weiter Entfernung zu seinem Ursprung auslöst. Für die Untersuchung dieser Effekte wurden Oligonukleotide variierender Längen mit bis zu 10 A-T-Basenpaaren zwischen dem Photosensibilisator und der Schadensstelle verwendet.

Das 2'-Desoxynukleotid fdC entsteht bei der epigenetischen Auslöschung von methylmodifizierten 2'-Desoxycytidinen, während fdU das Resultat eines oxidativen

Themenstellung

Schadens ist.^[81a, 84b] Pyo repräsentiert den Chromophor des (6-4)-Photoschadens und damit eine mögliche Kettenreaktion für die Entstehung von CPD-Schäden durch einen anderen UV-Schaden.^[85a] Dagegen wird für Pheomelanin angenommen, dass seine photochemisch veränderten Abbauprodukte in den Zellkern gelangen und dort als Photosensibilisator DNA-Schäden hervorrufen können.^[90]

Die Untersuchung dieser möglichen Photosensibilisatoren sollte in einer ternären DNA-Architektur, in der das Phosphatrückgrat an der einzigen Stelle zweier benachbarter Thymidine fehlte, erfolgen. Die Verlängerung des Stranges durch die CPD-Bildung sollte dabei Aufschluss über die Energieübertragung durch den Photosensibilisator geben und durch eine Fluoreszenzmarkierung innerhalb einer Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC, engl. *reversed phase high performance liquid chromatography*) oder einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE-Analyse) quantitativ untersucht werden. Die Entfernung zwischen Photosensibilisator und Schadensstelle sollte durch die intervenierenden A-T-Basen variiert werden, um CPD-Schäden in größeren Entfernungen zum Photosensibilisator untersuchen zu können.

IV. Synthese

Um die jeweiligen Photosensibilisatoren an einer definierten Stelle in ein Oligonukleotid einzubringen, wurde die Phosphoramidit-Synthese verwendet. Dafür wurde Thymidin modifiziert oder die Photosensibilisatoren als Basensurrogate an 2'-Desoxyribonukleoside angebracht, bevor diese in die DMT-geschützten Phosphoramidite umgewandelt wurden (Abbildung 22).

Um fdC als Photosensibilisator zu untersuchen, konnten vollständige DNA-Stränge kommerziell erworben werden. Diese Modifikation musste daher nicht synthetisch als Phosphoramidit-Baustein hergestellt werden.

Die Synthese des fdU-Phosphoramidits erfolgte unter Verwendung einer Schutzgruppe am Aldehyd, da dieses ohne Schützung innerhalb der Oligonukleotidsynthese während der Oxidation der Phosphor-Spezies in das Carboxylat umgewandelt wird. Als Schutzgruppe wurde das Ethan-1,2 diyl-acetat verwendet. Die Freisetzung der Formyl-Gruppe erfolgte nach der Oligonukleotidsynthese.

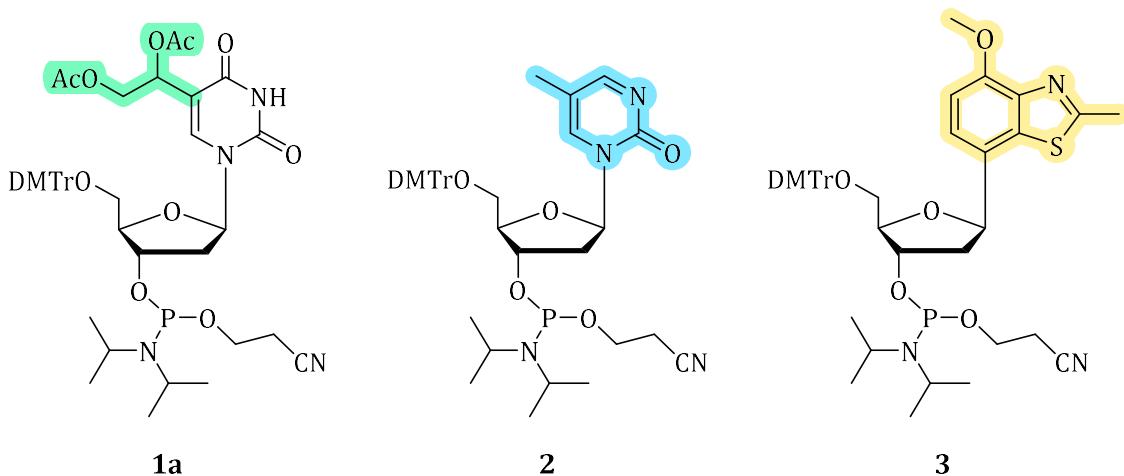


Abbildung 22: Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten Phosphoramidite für fdU **1a**, Pyo **2** und Pheo **3**.

1. Formyl-2'-desoxyuracil (fdU)

Für die Synthese des geschützten fdU-Phosphoramidits **1a** wurde eine durch die Gruppe von SUGIYAMA entwickelte Syntheseroute verwendet. [92] Diese wurde ursprünglich entwickelt, um DNA-Protein-Reaktionen zwischen Formyl-2'-desoxyuracil und Lysin zu untersuchen. Ausgehend von einem *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS) geschützten 5-Iod-thymidin **5**, wird zunächst eine Vinylgruppe angeknüpft und diese anschließend dihydroxyliert und acetyliert. Daraufhin kann die DMT-Schutzgruppe am 5'-OH und das Phosphoramidit an der 3'-OH-Gruppe angebracht werden (Abbildung 23).

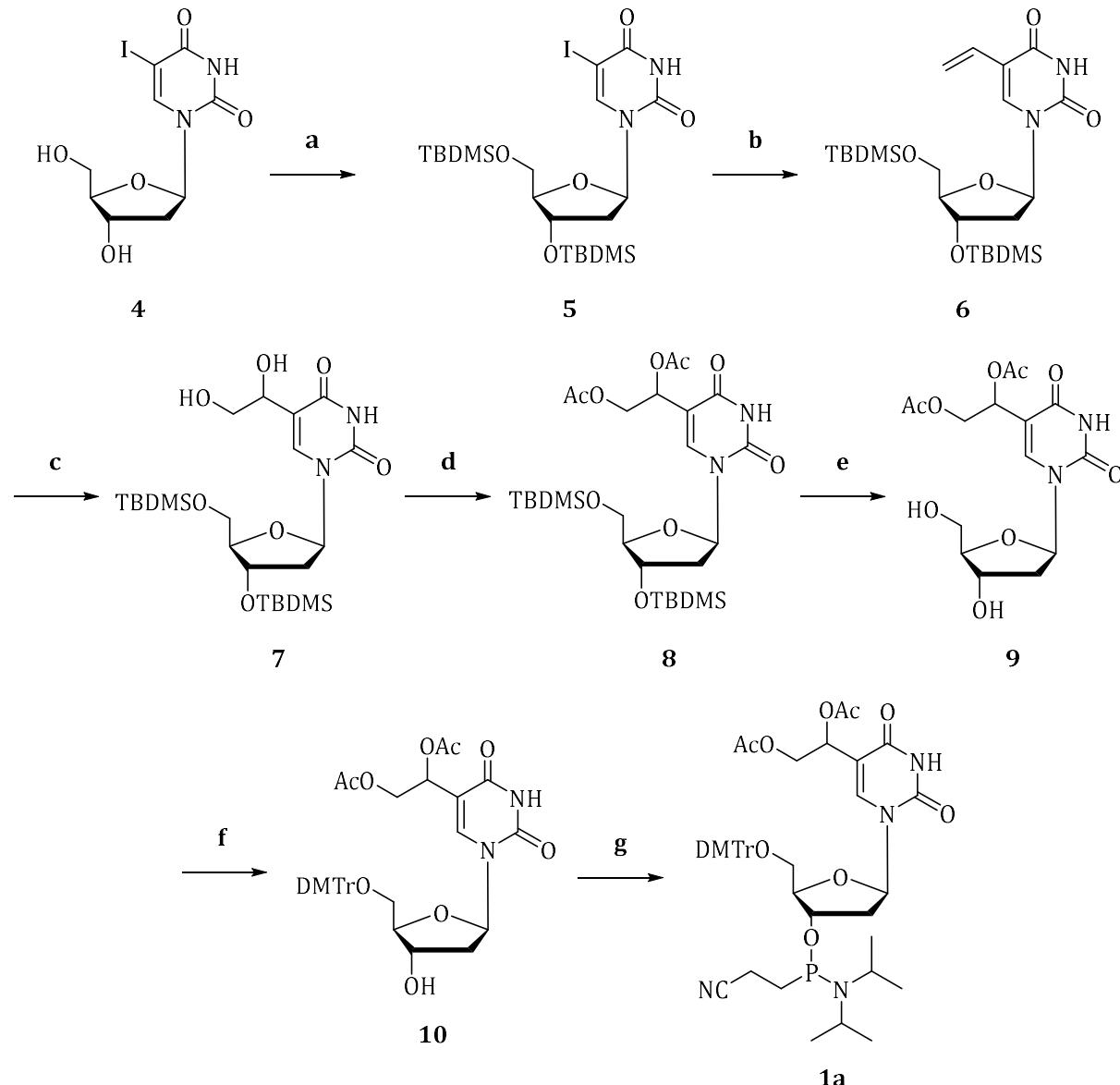


Abbildung 23: Synthese des geschützten fdU-Phosphoramidits **1a** nach SUGIYAMA: a) TBDS-Cl, Imidazol, DMF, RT, 12 h, 91 %; b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , Vinylacetat, Et_3N , DMF, 70 °C, 16 h, 67 %; c) NMO, OsO_4 , Aceton/ $\text{H}_2\text{O}/t\text{BuOH}$ 4:1:1, 22 °C, 22 h, 87 %; d) Ac_2O , Pyridin, RT; 22 h, 85 %; e) TBAF (1 M in THF), HOAc, THF, RT, 16 h; f) DMT-Cl, Pyridin, RT, 16 h; g) $(\text{CNEt})\text{P}(\text{N}(i\text{Pr})_2)_2$, 4,5-Dicyanoimidazol, DCM, RT, 5 h, 98 %.

Nach literaturbekannter Vorschrift wurde das geschützte 5-Iod-thymidin **5** aus käuflich erworbenem **5-Iod-thymidin (4)** und TBDMS-Cl hergestellt. Anschließend wurde **5** abweichend von der Synthese von SUGIYAMA, in einer HECK-Reaktion mit Palladium(II)-acetat (PdOAc_2) als Katalysator und Triphenylphosphin (PPh_3) als Ligand mit Vinylacetat umgesetzt. Das Kupplungsprodukt **6** wurde in einer Ausbeute von 67 % erhalten.^[93] Anschließend wurde die Vinyl-Gruppe von **6** mit *N*-Methylmorpholin-*N*-Oxid (NMO) und katalytischen Mengen Osmiumtetroxid (OsO_4) oxidativ in 87 % Ausbeute zu **7** dihydroxyliert.

Die Alkohol-Gruppen wurden durch die Reaktion mit Essigsäureanhydrid in Ausbeuten von 85 % mit basenlabilen Acetyl-Schutzgruppen versehen (**8**). Im darauffolgenden Schritt wurden die TBDMS-Gruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) entfernt (**9**), wobei die TBAF-Salze nicht vollständig abgetrennt werden konnten, weder durch das Ausfällen der Salze mit THF noch durch die säulenchromatographische Aufreinigung. Da die darauffolgende Schützung des Zuckers durch die TBAF-Salze nicht gehemmt wird, wurde Molekül **9** mit leichten TBAF-Verunreinigungen weiterverwendet. Die Verunreinigung konnte im nächsten Syntheseschritt abgetrennt werden. Durch die Überlagerung der Salze mit den Produkt-Signalen in der NMR-Analyse konnte in diesem Reaktionsschritt keine finale Ausbeute bestimmt werden.

Als nächstes wurde mit Dimethoxytritylchlorid (DMT-Cl) in Pyridin eine DMT-Schutzgruppe an der 5'-Hydroxygruppe von **9** angefügt. Pyridin fungiert in diesem Fall sowohl als Lösungsmittel als auch als Base, um die während der Reaktion entstehende Salzsäure abzufangen. Die Ausbeute betrug 50 % über die letzten zwei Schritte, was auf die Reste der TBAF-Salze zurückzuführen ist. Durch geringere sterische Hinderung ist die 5'-OH-Gruppe für die DMT-Schutzgruppe als Reaktionspartner bevorzugt. Bei einem zu hohen Überschuss an DMT-Cl kommt es allerdings ebenfalls zur Reaktion mit der 3'-OH-Gruppe. Um den Zucker nicht an beiden Hydroxygruppen zu schützen, wurde daher davon abgesehen, einen höheren Überschuss an DMT-Cl zu verwenden. Auch das kann zu geringeren Ausbeuten geführt haben.

Schlussendlich folgte die Anknüpfung des Phosphoramidits an der 3'-Position zum Zielmolekül **1a** für die nachfolgende Oligonukleotidsynthese. Verwendet wurde dafür ein mit Cyanoethyl-Schutzgruppe geschütztes Tetraisopropylphosphoramidit, welches mit

4,5 Dicyanoimidazol aktiviert wurde, um an die 3'-OH-Gruppe von **10** anzuknüpfen. Die Ausbeute betrug 98 %.

Um nach der Inkorporation von **1a** in das Oligonukleotid **1b** das Formyl-Produkt **1** zu gewinnen, mussten nach der DNA-Synthese die Acetyl-Schutzgruppen basisch entfernt und das entstandene Diol **1c** oxidiert werden (Abbildung 24).

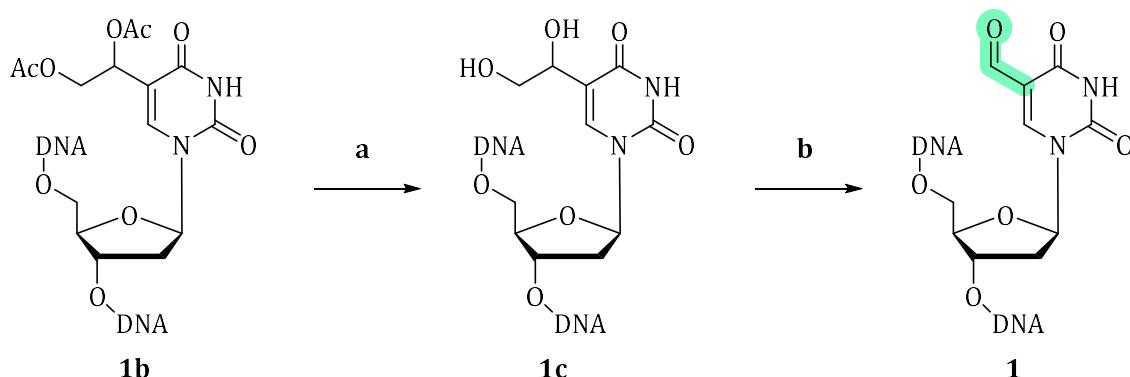


Abbildung 24: Post-DNA-synthetische Umwandlung von **1b** in Formyl-2'-desoxyuracil: a) NaOH, MeOH/ H₂O (4:1), RT, 17 h; b) NaIO₄, H₂O, 4 °C, 30 min.^[94]

Dazu wurde eine 0.4 M Natriumhydroxid-Lösung in einem Wasser/ Methanol Gemisch statt der sonst üblichen Entschützung mit wässriger Ammoniaklösung verwendet. Dieses Vorgehen verhindert eine bekannte Nebenreaktion, in der das Ammoniak an der sekundären Acetat-Gruppe angreifen könnte und es unter Ausschluss von Essigsäure zur Amidbildung käme. Das würde die Freisetzung der Formyl-Funktion erschweren.^[95]

Nach der Entschützung wurde das Diol **1c** mit Natriumperiodat zur Formyl-Funktion oxidiert (**1**).^[95] Direkt nach der Oxidation wurde die Reaktionslösung über eine GlenPak™ Säule entsalzt, was die Oxidation der natürlichen DNA-Basen durch Natriumperiodat-Reste verhindert und überschüssige Salze entfernt. Für die Umwandlung der Schutzgruppe in die Formyl-Funktion wurde das Protokoll der Firma GLEN RESEARCH für die Entschützung der chemisch ähnlichen fdC-Modifikation verwendet.^[94-95]

2. 5-Methyl-Pyrimidon (Pyo)

Um zu untersuchen, ob ein (6-4)-Photoschaden als Photosensibilisator weitere CPD-Schäden verursacht, wurde das Chromophor des Schadens, 5-Methyl-Pyrimidon (Pyo), verwendet.

Das vereinfacht die Synthese der DNA-Stränge. Um tatsächlich einen (6-4)-Schaden in DNA untersuchen zu können, müsste ein Dinukleotid photochemisch zu einem (6-4)-Schaden umgesetzt und anschließend in einer Phosphoramidit-Synthese in einen DNA-Strang eingebracht werden. [62a, 96] Das Phosphat-Rückgrat zwischen den beiden Nukleosiden erschwert die Synthese eines Dinukleotid-Phosphoramidites und die anschließende DNA-Synthese allerdings. Alternativ müsste ein vollständiger DNA-Strang mit UV-Strahlung hoher Energie (254 nm) belichtet und das den (6-4)-Schaden enthaltene Produkt von dem Eduktstrang und den durch die Strahlung hoher Energie umgewandelten Nebenproduktsträngen getrennt werden. [97] Das ist ebenfalls ein schwieriges Unterfangen, da der Unterschied zwischen Edukt und Produkt nur durch das Auftauchen der neuen Absorptionsbande des Schadens bei 325 nm oder 314 nm mit niedriger Extinktion nachweisbar ist. Die Massen der jeweiligen Stränge sind identisch und die Überlagerung der Signale der einzelnen Basen erschwert die Zuordnung durch NMR-Spektroskopie. Zusätzlich ist die Ausbeute der (6-4)-Photoläsion in keinem Fall besonders hoch. Diese liegt für den T(6-4)C-Schaden bei maximal 16% und ist für T(6-4)T-Schäden etwa drei Mal geringer. [62a, 96]

Die Synthese des DMT-geschützten Pyo-2'-Desoxynukleosids **11** erfolgte durch die Gruppe von LHIAUBET-VALLET an der Universitat Politècnica de València nach einem von ihnen entwickelten Syntheseschema.^[85a] Als Ausgangsverbindung dient ein mit einer MARKIEWICZ-Schutzgruppe versehenes Thymidin. Die Carbonylgruppe an der Position 4 wird durch Triazol aktiviert und durch die Substitution mit Hydrazin *in situ* mit der Reduktion und thermischer Abspaltung von Stickstoff vollständig entfernt. Die anschließende Entschützung der OH-Schutzgruppen mit Fluorid führt zur Freisetzung des Pyo-2'-Desoxynukleosids, welches daraufhin an der 5'-Position des Zuckers DMT-geschützt wird (Abbildung 25).

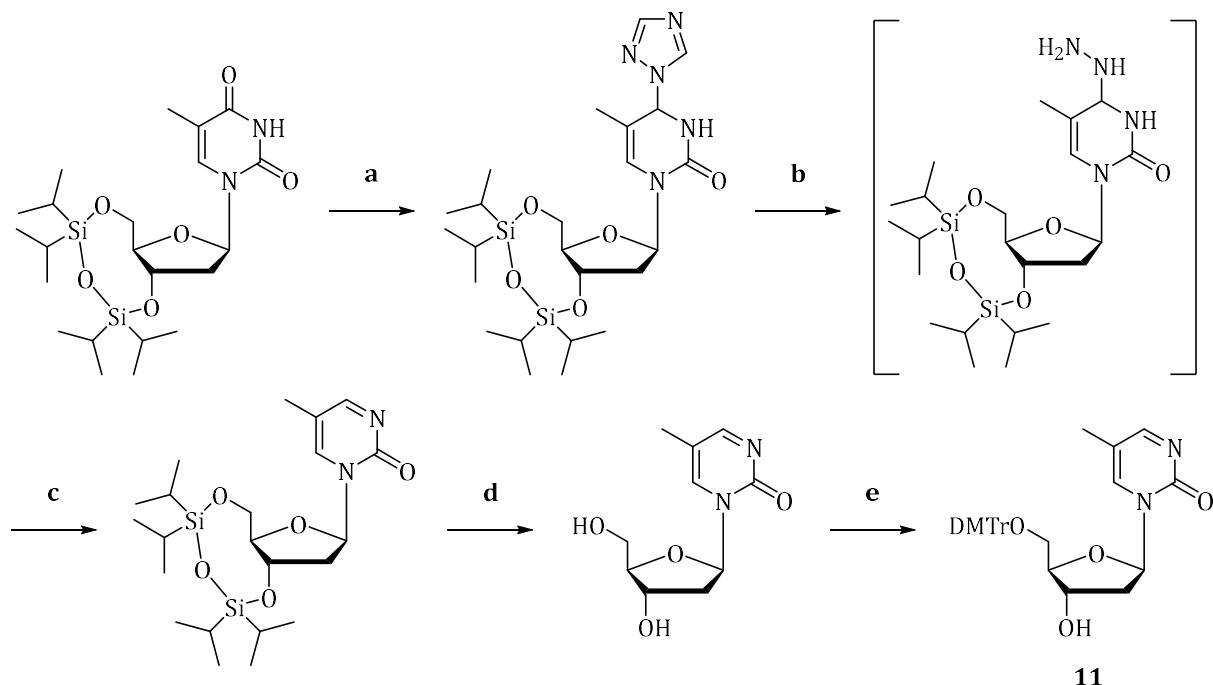


Abbildung 25: Syntheseroute des DMT-geschützten Pyo-Nukleosids **11** nach LHIAUBET-VALLET: a) POCl₃, 1,2,4-Triazol, Et₃N, MeCN, 0 °C, 4 h; b) Hydrazin, Dioxan, 0 °C nach RT, 90 min; c) Ag₂O, Dioxan, 101 °C, 4 h; d) Et₃N·3HF, THF, 4 h, RT, e) DMTr-Cl, Pyridin, RT, 16 h.^[85a]

Mit dem DMT-geschützten Pyo-Nukleosid **11** wurde das Phosphoramidit **2** für die Oligonukleotidsynthese hergestellt. Hierfür wurde das zuvor in der fdU-Phosphoramidit Synthese genutzte Protokoll mit Cyanoethyltetrisopropylphosphoramidit und 4,5 Dicyanoimidazol als Aktivator verwendet (Abbildung 26).^[92]

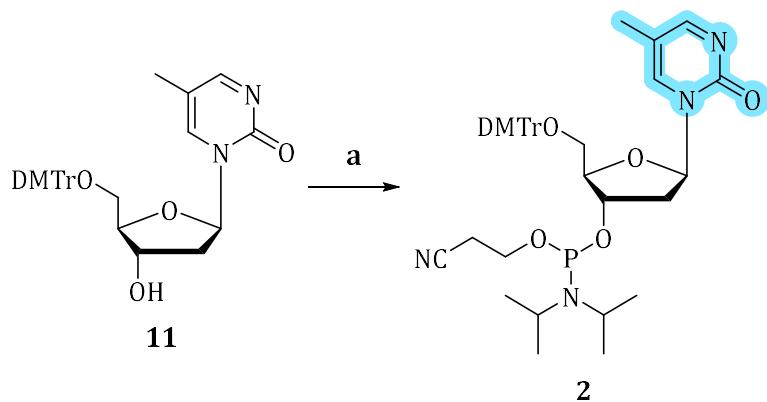


Abbildung 26: Synthese des Pyo-Phosphoramidites **2**: a) (CNEt)P(N(iPr)₂)₂, 4,5-Dicyanoimidazol, DCM, RT., 5 h, 80 %

Die Ausbeute betrug 80 %, allerdings befanden sich trotz mehrerer Aufreinigungsschritte noch Verunreinigungen im Produkt, die keiner bekannten Spezies zugeordnet werden und damit nicht aus der Gesamtmasse herausgerechnet werden konnten. Die Oligonukleotidsynthese erfolgte mit dem leicht verunreinigten Produkt.

Das entstandene Phosphoramidit konnte direkt in der Oligonukleotidsynthese eingesetzt werden. Im Zuge dessen wurde die Konzentration der Reaktionslösung von 0.1 M auf 0.2 M (in MeCN) erhöht, um eine ausreichende Reaktivität zu gewährleisten.

3. Pheomelaninmonomer-Derivat (Pheo)

Da das Derivat des Pheomelaninmonomers als einziger in dieser Arbeit untersuchter Photosensibilisator keine direkte Modifikation an einer DNA-Base ist, wurde es als künstliches Basensurrogat hergestellt und analog zu den anderen Basen als Phosphoramidit in DNA eingebracht. Die ähnliche chemische Struktur der in dieser Arbeit untersuchten Photosensibilisatoren erlaubt eine gute Vergleichbarkeit untereinander, spiegelt jedoch in diesem Fall nicht die Situation in nativer DNA wider. Das Einbringen des Pheomelaninmonomer-Derivates als Basensurrogat birgt den Vorteil, eine mögliche Energieübertragung genauer untersuchen zu können, da so gewährleistet wird, dass sich der Photosensibilisator in einer definierten räumlichen Nähe zu den reagierenden Basen befindet. Aussagen über die Art der Energieübertragung sind so deutlich fundierter.

Es wurde ein methoxyliertes Pheomelaninmonomer-Derivat gewählt, da für den Pheomelanin-Baustein mit freier OH-Gruppe bereits bekannt ist, dass es Radikale und reaktive Sauerstoffspezies bildet, die in der DNA zu Strangbrüchen und oxidativen Schäden führen können.^[98] Um allein die Photosensibilatoreigenschaften des Moleküls im Hinblick auf die CPD-Bildung untersuchen zu können, sind diese Nebenreaktionen hinderlich. Außerdem wird mit einer Methoxygruppe die DNA-Synthese erleichtert, da keine Schützung und Entschützung einer zusätzlichen freien OH-Gruppe notwendig ist.

Für die Synthese des Pheomelaninmonomer-Derivats **3** wurde als Ausgangsverbindung käuflich erworbene **4-Methoxy-1,3-benzothiazol-2-amin (12)** verwendet. Die Amin-Funktion wurde dafür brom- und anschließend methylsubstituiert. Daraufhin konnte der Benzolring brommodifiziert und ein TBDMS-geschütztes Glykal angeknüpft werden. Die Entschützung der OH-Gruppen und Reduktion der entstandenen Carbonyl-Funktion an der 3'-Position führte zu Nukleosid **16**, welches analog zu den vorherigen Synthesen an der 5'-OH-Gruppe DMT-geschützt und an der 3'-OH-Gruppe mit einer Phosphoramidit-Spezies versehen wurde (Abbildung 27).

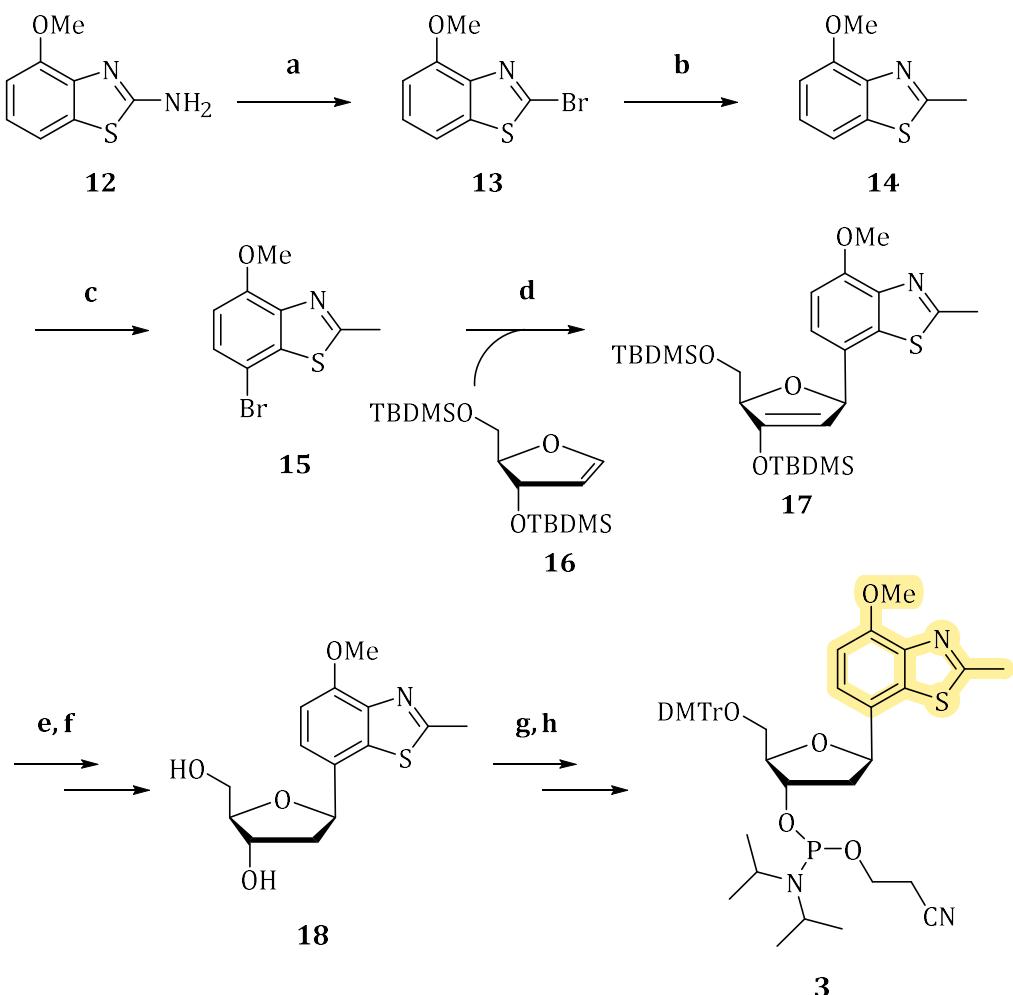


Abbildung 27: Synthese für das Phosphoramidit des Pheomelaninmonomer-Derivats (Pho) **3**: a) BrN(*n*Bu)₄, CuBr₂, *p*-TsOH, *t*BuONO, MeCN, RT, 1 h, 90 %; b) secBuLi, MeI, THF, -78 °C, 2 h, 75 %; c) NBS, MeCN, RT, 16 h, 99 %; d) Glykal **16**, Pd[dppf]Cl₂, DIPEA, MeCN, 85 °C, 96 h, 44 %; e) Et₃N·3HF, THF, 0 °C, 16 h, 99 %; f) NaBH(OAc)₃, EE/ MeCN 1:1, RT, 40 min, 60 %; g) DMT-Cl, Pyrimidin, RT, 16 h, 52 %; h) (CNEth)PN(*i*Pr)₂Cl, DIPEA, DCM, RT, 5 h, 68 %.

Die Amin-Gruppe von **12** wurde in einer SANDMEYER-Reaktion durch Brom substituiert. Dafür wurde **12** zunächst mit *tert*-Butylnitrit (*t*BuONO) und *para*-Toluolsulfonsäure (*p*TsOH) diazotiert. Das diazotierte Benzothiazol wurde unter Abspaltung von Stickstoff anschließend mit Tetrabutylammoniumbromid (BrN(*n*Bu)₄) und katalytischen Mengen Kupfer(II)bromid (CuBr₂) bromiert. Dadurch wurde 4-Methoxy-1,3-benzothiazol-2-bromid (**13**) in Ausbeuten von 90 % hergestellt.^[99] Anschließend wurde die Brom-Funktion mit *sec*-Butyllithium (secBuLi) lithiiert und mit Methyliodid (MeI) unter Entstehung von Lithiumiodid methyliert. Das Zielmolekül **14** wurde in einer Ausbeute von 75 % erhalten.^[100] Dieses wurde mit Hilfe von *N*-Bromsuccinimid (NBS) am Benzolring bromiert.^[100b] Diese Bromierung findet aufgrund der *ortho*-*para* dirigierenden Methoxygruppe und der sterischen Hinderung an der *ortho*-Position

selektiv und quantitativ an der *para*-Position statt, wodurch **15** in quantitativen Ausbeuten erhalten wurde.

Mit einer in der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT etablierten HECK-Reaktion unter Nutzung eines TBDMS-geschützten Glykals **16** wurde das bromierte Benzothiazol-Derivat **15** weiter umgesetzt.^[101] Die sterisch anspruchsvollen TBDMS-Gruppen auf der „Unterseite“ des Moleküls sorgen dabei in der Reaktion zu einem ausschließlich β -substituiertem Produkt. Die Verwendung des β -Isomers ist wichtig, da die Konfiguration des modifizierten Nukleosids so gut wie möglich an die der natürlichen Nukleoside angepasst werden muss, um eine möglichst natürliche Konfiguration der modifizierten DNA zu garantieren. Bei der Anpassung der Bedingungen der HECK-Reaktion wurden verschiedene Katalysatoren und Liganden getestet sowie die Base, Temperatur und Dauer der Reaktion variiert. Die höchsten Ausbeuten wurden mit der Nutzung des Diphenylphosphino-ferrocen-modifizierten Palladiumkatalysators ($\text{Pd}[\text{dppf}]\text{Cl}_2$) erzielt. Dieser hat außerdem den Vorteil, ohne Zusatz weiterer Liganden auszukommen, wodurch nach der Reaktion weniger Reaktanden abgetrennt werden müssen.^[102] Die Verwendung von Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base und einer Temperatur von 85 °C über 96 h Reaktionszeit führte zu einer maximalen korrigierten Ausbeute von etwa 44 %, was im Bereich der Ausbeuten anderer literaturbekannter HECK-Reaktionen dieser Art liegt.^[101, 103] Das Produkt **17** wies weitere Signale im ^1H -NMR Spektrum auf, die eindeutig dem debromierten Benzothiazol-Derivat **14** als Nebenprodukt zugeordnet werden konnten. Dieses war durch Stapelungsinteraktionen (engl. *Stacking*) mit dem Aromaten von **17** experimentell nicht abtrennbar, weswegen es für die Ausbeutebestimmung rechnerisch abgezogen und erst im nächsten Schritt abgetrennt wurde.

Anschließend folgten die quantitative Entschützung der TBDMS-Gruppen von **17** mit dem Fluorid-Reagenz $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ und die Reduktion des dabei entstehenden Ketons mit Natriumtriacetoxyborhydrat ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$), wodurch **18** mit 60 % Ausbeute über zwei Stufen erhalten wurde.^[101, 103] Diese Reaktion läuft ebenfalls stereoselektiv ab, da das Bor an die 5'-OH-Gruppe koordiniert und die Hydrierung somit nur von der „Oberseite“ des Moleküls stattfindet. Dadurch wird die Konfiguration des 2'-Desoxyribofuranosids zurückerhalten.

Analog zu den ersten beiden beschriebenen Photosensibilisator-Synthesen wurde das Nukleosid **18** im nächsten Schritt an der 5'-OH-Gruppe des Zuckers DMT-geschützt, was

mit DMT-Cl über Nacht in einer Ausbeute von 52 % stattfand, bevor das Phosphoramidit am 3'-OH angefügt wurde. Erneut wurde aufgrund der möglichen doppelten Schützung des Zuckers auf den Einsatz größerer Mengen an DMT-Cl für die Umsetzung verzichtet.^[101]

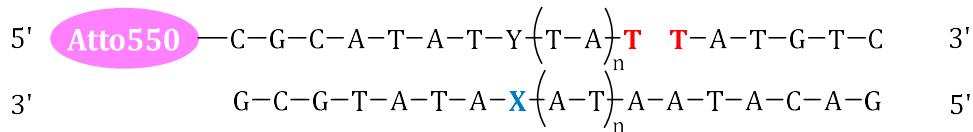
Das Nukleosid **19** wurde dabei, anders als zuvor, mit einem Phosphoramiditchlorid umgesetzt, was zur Abspaltung von HCl führt.^[101] Letzteres wird mit einem Überschuss von DIPEA als Base abgefangen. Die Aufreinigung des Rohproduktes wird in dieser Reaktionsführung erleichtert, da keine Extraktion zur Abtrennung des Imidazol-Derivats erfolgen muss. Dies gelingt allerdings nur, wenn das Basensurrogat gegenüber der während des Reaktionsverlaufs gebildeten starken Säure stabil ist. Das Phosphoramidit **3** konnte in einer Ausbeute von 68 % erhalten werden. Es konnte ohne weitere Schritte für die Oligonukleotidsynthese verwendet werden.

V. Belichtungsexperimente

1. Methodik

1.1 Design der Oligonukleotide

Zur Untersuchung der möglichen Photosensibilisatoren wurden diese an definierter Stelle in Oligonukleotide unterschiedlicher Länge eingebaut. Hybridisiert wurden die jeweiligen Oligonukleotide mit zwei kommerziell erworbenen Gegensträngen. Der längere Gegenstrang war mit einem Atto550-Fluoreszenzmarker versehen, um bei späteren Analysen eine Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen. Der kürzere Gegenstrang wies in allen DNA-Hybridien eine Länge von sechs Basen (6-mer) auf. Die Stelle, an der beide Gegenstränge kein Phosphatrückgrat aufweisen, ist die einzige Stelle innerhalb dieser DNA-Architektur, in der zwei Pyrimidine, genauer zwei Thymidine, direkt benachbart sind und damit die einzige Stelle, an der CPD-Schäden entstehen können (Abbildung 28).



X = Photosensibilisator
Y = jeweilige Gegenbase
n = 0 bis 5

Abbildung 28: Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Architektur mit variierender Anzahl an A-T Basenpaaren zwischen dem Photosensibilisator **X** (blau) und der designierten Schadensstelle **T T** (rot).

Da CPD-Schäden in nativer DNA am häufigsten zwischen benachbarten Thymidinen auftreten, demonstrieren diese in der verwendeten DNA-Architektur den maximal möglichen Schaden, der durch die eingesetzten Photosensibilisatoren verursacht wird.^[51] Wird ein CPD-Schaden durch die Energieübertragung der verwendeten Photosensibilisatoren gebildet, wird der fluoreszenzmarkierte Strang um die sechs Basen des 6-mers verlängert. Diese Verlängerung ist anschließend durch RP-HPLC oder in einer PAGE analysierbar.

Aus vorherigen Arbeiten der WAGENKNECHT Gruppe ist bekannt, dass die durch den Photosensibilisator übertragene Energie auch über mehrere A-T-Paare übertragen

Belichtungsexperimente

werden kann, bis sie an anderer Stelle in der DNA CPD-Schäden hervorruft.^[104] Auch dieses Phänomen wurde in Bezug auf die in dieser Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren untersucht. Um Aussagen über die Distanzabhängigkeit der Energieübertragung des Photosensibilisators auf die DNA-Basen treffen zu können, wurden außerdem A-T-Basen in variierender Anzahl zwischen den Photosensibilisator und die Schadensstelle eingebaut. So wurde der Abstand bis auf maximal 10 A-T-Basenpaare ($n = 5$) erhöht, was einer Entfernung von etwa 37.4 Å entspricht.

Der Atto550-Fluoreszenzmarker wurde auf Grund seiner hohen UV-Stabilität verwendet. Mit einem Absorptionsmaximum bei 554 nm wird er wenig durch UV-Licht angeregt und kann daher nicht selbst mit der DNA reagieren.^[105] Während der Belichtungsexperimente kann es allerdings zu *Photobleaching*-Prozessen (engl. Bleichen durch Licht) kommen, wodurch die Fluoreszenzstärke des Markers abnimmt. Diese können durch die verwendeten Photosensibilisatoren beeinflusst werden, passieren allerdings in der Regel unabhängig von den photochemischen Prozessen der CPD-Bildung.

Die C-G-Basenpaare am Anfang und Ende der DNA-Architektur tragen zur Stabilisierung bei, da die Basenpaarung mit C und G deutlich stärker ist als die A-T Basenpaarung.^[106]

1.2 Belichtungsexperimente

Die synthetisierten und mit käuflich erworbenen Strängen hybridisierten ternären DNA-Hybide wurden in einer Konzentration von $2.5 \mu\text{M}$ in 1 mL einer wässrigen Kochsalz-Phosphatpuffer-Lösung ($c(\text{NaCl}) = 250 \text{ mM}$; $c(\text{NaP}_i) = 10 \text{ mM}$) belichtet. Um in den darauffolgenden RP-HPLC-Analysen die Peaks zweifelsfrei den Edukt- und Produktsträngen zuordnen zu können, wurden die Proben zusätzlich mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS) analysiert. Die Lösungen der DNA-Hybride wiesen dafür eine abweichende DNA-Konzentration von $5 \mu\text{M}$ auf. Dies hatte allerdings keinen Einfluss auf die prozentuale CPD-Bildung in den DNA-Architekturen.

Für die Belichtung der DNA-Lösungen wurden Fluoreszenzküvetten mit Septumverschluss verwendet, die vorher mehrfach entgast und mit Argon-Atmosphäre gefüllt wurden. Um oxidative Schäden durch im Wasser gelösten Sauerstoff zu verhindern, wurden die DNA-Lösungen außerdem mindestens 10 min mit Argon durchströmt. Während der Belichtungen wurden die Küvetten durch Kühlblöcke auf 10°C temperiert, um die DNA-Stränge möglichst vollständig hybridisiert untersuchen zu können. Grundlage für die Wahl der Belichtungstemperatur war die Schmelztemparaturanalyse der verwendeten DNA-Hybride. Sie zeigt zwei verschiedene Schmelztemperaturen, da bei niedrigen Temperaturen (T_{m1}) der kürzere Gegenstrang (6-mer) dehybridisiert und bei höheren Temperaturen (T_{m2}) der längere (Abbildung 29).

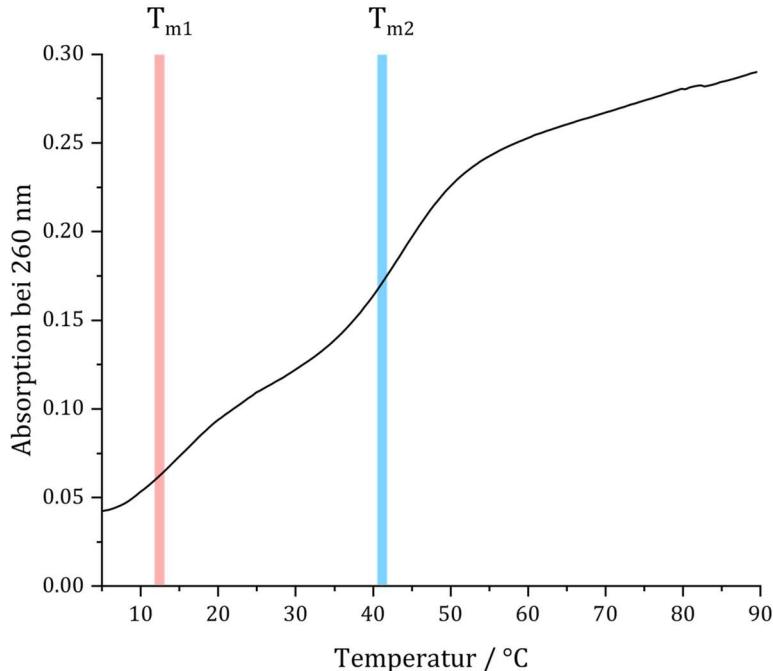


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Schmelztemperaturanalyse der DNA-Hybride mit zwei unterschiedlichen Schmelztemperaturen, T_{m1} (rot) für den kurzen Gegenstrang und T_{m2} (blau) für den langen Gegenstrang.

In allen DNA-Hybriden lag die Schmelztemperatur des 6-mers bei 11-15 °C. Diese Temperatur muss demnach unterschritten werden, um zu gewährleisten, dass die Stränge während der Belichtung vollständig hybridisiert sind. Eine Belichtung bei tieferen Temperaturen als 10 °C führt allerdings zur Bildung von Kondenswasser an den Glasküvetten, was die Transmission des eingestrahlten UV-Lichtes durch die DNA-Lösung vermindert. Da die Temperatur von 10 °C jedoch der Schmelztemperatur des 6-mers sehr nahe ist, kann davon ausgegangen werden, dass der kürzere Gegenstrang während der Belichtungen zu einem gewissen Anteil unhybridisiert vorliegt. Die Nutzung desselben kurzen Gegenstranges für alle DNA-Hybride sorgt allerdings dafür, dass diese Ungenauigkeit für alle Proben gleich ist.

Für die Belichtungen wurden Wellenlängen verwendet, die so weit wie möglich außerhalb der direkten Absorption der DNA-Basen bei 260 nm liegen und trotzdem mit der Absorption der implementierten Photosensibilisatoren überlappen. So weisen Formyl-2'-desoxyuridin und Formyl-2'-desoxycytidin Absorptionsschultern bei 325 nm bzw. 314 nm auf, weswegen eine 325 nm LED bzw. eine 310 nm LED verwendet wurden.^[83] Pyo weist eine Absorptionsschulter mit einem Maximum bei 320 nm auf und die

Absorption von Pheo reicht bis 330 nm.^[85a] In beiden Fällen wurden 325 nm LEDs für die Anregung verwendet.

Die Leistung aller LEDs wurde vor den Belichtungen jeweils mit einem Leistungsmesser nachgemessen. Die 310 nm LED wurde dabei jeweils auf etwa $60 \pm 5 \mu\text{W}$ eingestellt, während die Leistung der 325 nm LEDs bei 1.1-1.3 mW lag.

Während der Belichtung wurden nach definierten Zeitabständen Proben der DNA-Lösungen entnommen, um den Verlauf der Schadensbildung verfolgen zu können. Für möglichst präzise Aussagen über den Reaktionsverlauf wurden in den ersten 30 min alle 10 min Proben entnommen und danach alle 30 min bis zu einem Endpunkt von 6 h. Die Belichtungen wurden pro DNA-Hybrid mindestens drei Mal reproduziert. Trotz der gewählten Wellenlängen außerhalb des direkten Absorptionsspektrums von DNA kann es bei der Belichtung mit diesen noch zu Hintergrundreaktionen der DNA-Basen kommen. Um die CPD-Bildung durch die direkte Absorption der Nukleoside von der durch die Photosensibilisatoren ausgelösten CPD-Bildung trennen zu können, wurden ebenfalls Negativproben belichtet und analysiert. Die dafür verwendeten DNA-Hybride wiesen an der Stelle des Photosensibilisators Thymin oder Cytosin auf (Abbildung 30).

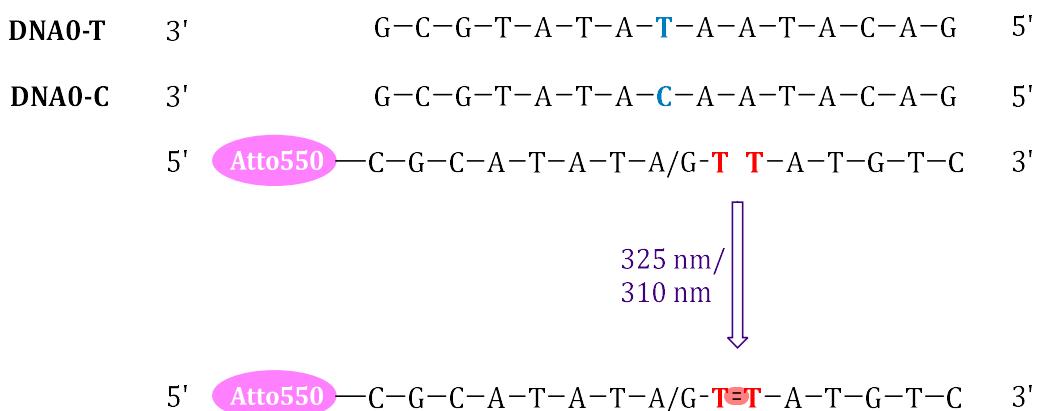


Abbildung 30: DNA0-T und DNA0-C mit jeweiligen Gegensträngen als Negativproben für die Bildung von CPD-Schäden bei Belichtung mit den in dieser Arbeit verwendeten LEDs bei 325 nm und 310 nm

Ohne die Anwesenheit eines Photosensibilisators kam es zu CPD-Ausbeuten von 3-4 %. Es wird angenommen, dass diese Ausbeuten für alle Oligonukleotidlängen in etwa gleich sind, da die Länge der DNA-Hybride nichts an der Hintergrundreaktion des einzelnen T-T-Basenpaars ändert. Sie wurden in der Untersuchung der Photosensibilisatoren jeweils von der Ausbeute abgezogen.

1.3 Analyse der Belichtungsproben

Analysiert wurden die Belichtungsproben anschließend mittels RP-HPLC und PAGE. Die wässrigen Salz-DNA-Lösungen wurden direkt in die HPLC injiziert und bei 60 °C mit einem Gradienten aus Acetonitril in wässriger Ammoniumacetat-Lösung (NH₄OAc) aufgetrennt (3→80 % Acetonitril in 50 min). Die hohe Temperatur sorgt dafür, dass die Stränge dehybridisiert vorliegen, während die Ammoniumacetat-Lösung die Auftrennung der Stränge erleichtert und durch seine Flüchtigkeit die Messung mittels LC-ESI-MS erlaubt. In der RP-HPLC wurden Chromatogramme der DNA bei der Absorption von 260 nm und 290 nm, sowie des jeweiligen Photosensibilisators bei 310 nm (fdC), 320 nm (Pyo) und 325 nm (fdU, Pheo) aufgezeichnet. Zusätzlich wurde in den Chromatogrammen die Fluoreszenz bei 576 nm des Atto-Markers unter Anregung mit 554 nm gemessen. In den Fluoreszenzchromatogrammen sind lediglich der Atto-markierte kürzere Gegenstrang und der durch die CPD-Bildung verlängerte Gegenstrang zu sehen. Durch die generell höhere Sensitivität der Fluoreszenz wurden diese Chromatogramme zur Berechnung der CPD-Bildung verwendet.

Die mit Atto550 markierten Edukt- und Produktstränge sind in den Chromatogrammen mit bis zu drei Peaks sichtbar. Grund dafür sind die möglichen Isomeren des Atto-Farbstoffs. Diese verändern die Elutionszeiten der Stränge. Die genaue Anzahl der Peaks ist dabei abhängig von der Isomerenzusammensetzung in den DNA-Strängen (Abbildung 31).[101, 105]

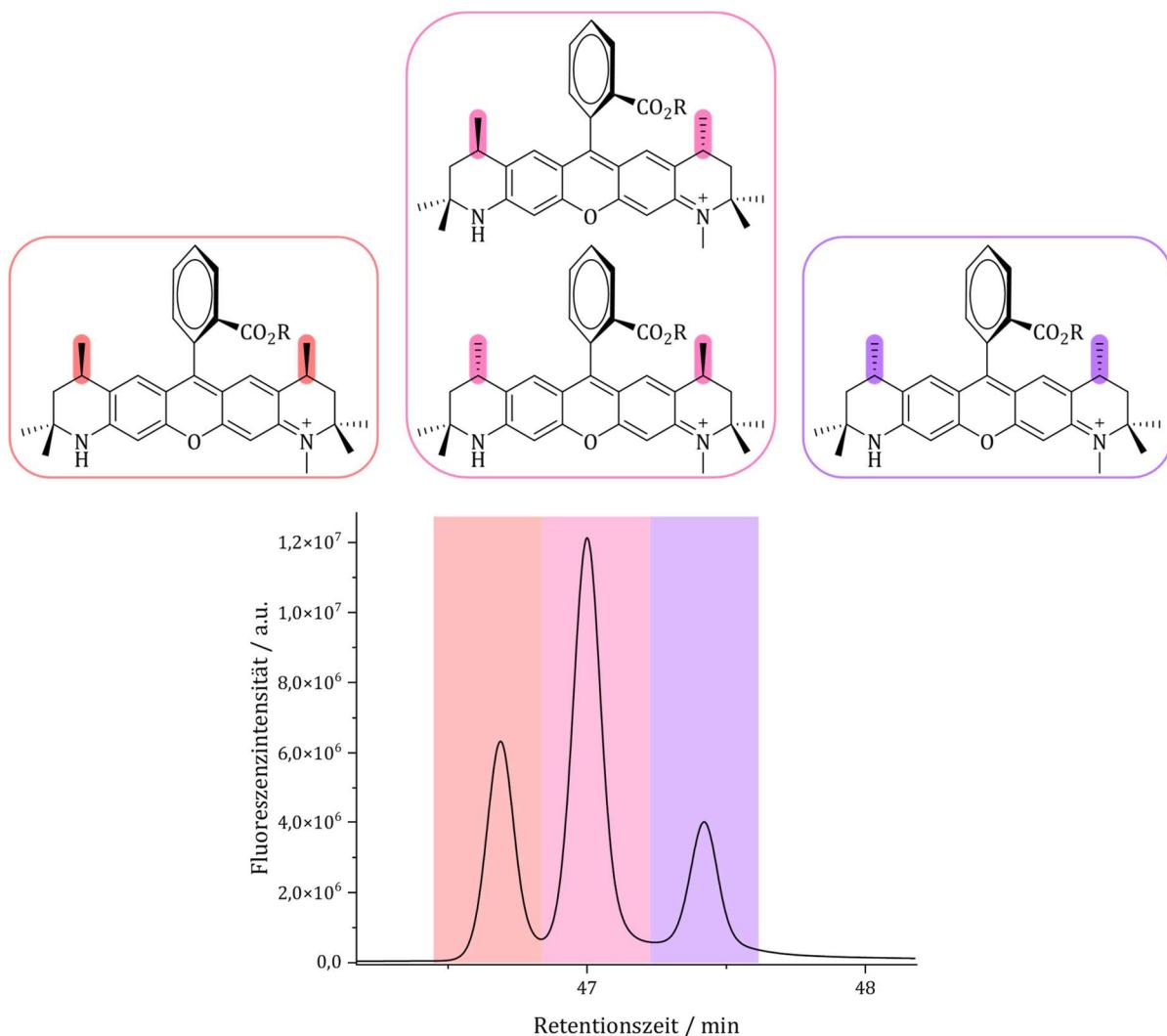


Abbildung 31: Mutmaßliche Verschiebung der Retentionszeiten durch die Isomerenzusammensetzung von Atto550 in Zusammenhang der Elutionszeit auf der RP-HPLC als drei sichtbare Peaks.

Die verminderte Polarität der Atto-markierten Stränge bewirkte außerdem, dass die verlängerten CPD-Stränge bei etwas kürzeren Retentionszeiten im RP-HPLC-Spektrum zu finden waren als der zugehörige Eduktstrang. Dagegen befand sich der kurze, stark polare 6-mer Gegenstrang in der Absorptionsanalyse bei kürzeren Retentionszeiten als der längere Photosensibilisatorstrang (Abbildung 32).

Belichtungsexperimente

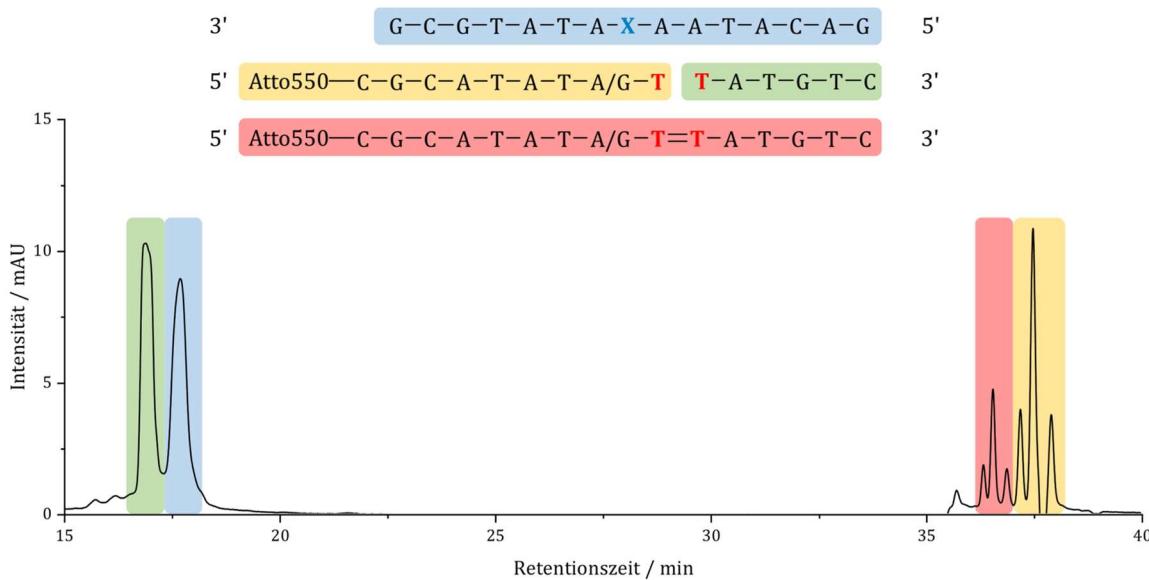


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Absorptionsanalyse bei 260 nm durch RP-HPLC nach 6 h Belichtung mit den jeweiligen zugeordneten DNA-Strängen, beispielhaft mit **DNA0-fdC**: Der Photosensibilisatorstrang (blau), der Atto-markierte Eduktstrang (gelb), der 6-mer Gegenstrang (grün) und der verlängerte Produktstrang (rot).

Die genaue Zuordnung der Peaks in der RP-HPLC erfolgte durch LC-ESI-MS-Analysen unter Verwendung desselben HPLC-Protokolls. Auch hier ist für alle drei Peaks der Atto-markierten Stränge jeweils dieselbe Masse zu finden. Die Massen der DNA-Stränge wurden jeweils unter Verwendung der Mehrfachladungen der Oligonukleotide zugeordnet ($[M^{2+}]$; $[M^{3+}]$; $[M^{4+}]$). Für die Ausbeutebestimmung des CPD-Schadens wurden die Peakflächen der Edukt- und Produkt-Peaks im Fluoreszenzchromatogramm prozentual im Verhältnis zueinander ausgerechnet. Traten zusätzliche Peaks im Chromatogramm auf, wurden die Verhältnisse aller vorhandene Spezies zueinander errechnet.

Da die Trennung der Atto-markierten Edukt- und Produkt-Stränge bei steigender Oligonukleotidlänge abnimmt, wurden für schwer trennbare, lange Oligonukleotide zusätzlich Polyacrylamid-Gele angefertigt, um die durch die Chromatogramme berechneten CPD-Ausbeuten zu validieren. Dies erfolgte unter Verwendung eines in der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT etablierten Protokolls unter denaturierenden Bedingungen.^[101, 104b] Da sich mit der Verlängerung des fluoreszenzmarkierten Stranges durch die Bildung von CPD-Schäden die elektrophoretischen Eigenschaften verändern, verkürzt sich die Lauflänge des Produktstranges durch das Gel (Abbildung 33).



Abbildung 33: Schematische Darstellung einer PAGE-Analyse der DNA-Hybride bei drei verschiedenen Belichtungszeiten: Eduktstrang ohne Belichtung (links), Eduktstrang hoher Konzentration und Produktstrang bei verkürzter Gellauflänge zu Zeitpunkt t_1 (mitte), Produktstrang hoher Konzentration bei verkürzter Gellauflänge und Eduktstrang zu Zeitpunkt t_2 (rechts).

Auch in diesem Fall wurde im Anschluss die Fluoreszenzstärke des Markers in den Gelbanden detektiert, um eine quantitative Aussage über die Produktmenge zu erhalten. Die Fluoreszenzstärke der Edukt- und Produkt-Banden wurde analog zur RP-HPLC Analyse ins Verhältnis gesetzt, um eine quantitative Aussage zu erhalten. Die Isomerenzusammensetzung hatte in diesem Fall keinen Einfluss auf die elektrophoretischen Eigenschaften der Stränge und damit auch keinen Einfluss auf die Anzahl der Gelbanden.

2. Formyl-Modifikationen

Die Formylgruppe als kleinste photosensibilisierende Modifikation wurde in drei verschiedenen DNA-Hybriden unterschiedlicher Länge untersucht. Die Anzahl n der A-T-Basen zwischen dem Photosensibilisator und der Schadensstelle wurden dabei von 0 bis maximal 5 variiert, was 0 bis 10 Basenpaaren entspricht. Mit dem synthetisierten fdU-Phosphoramidit **1a** wurden demnach sechs Oligonukleotide hergestellt und mit ihren jeweiligen Gegensträngen zu **DNA_n-fdU** hybridisiert.

Die fdC-Stränge wurden käuflich erworben und mit Strängen der natürlichen Gegenbase Guanosin hybridisiert. Guanosin ist allerdings für Elektronentransferprozesse bekannt, die zur Spaltung der CPD-Schäden führen.^[58a, 107] Um diesen Effekt in die Untersuchung des Photosensibilisators mit einzubeziehen, wurden zusätzlich Gegenstränge mit der fehlgepaarten (engl. *mismatch*) Base Adenosin gegenüber von fdC verwendet. Die verwendeten DNA-Hybride sind in Abbildung 34 dargestellt.

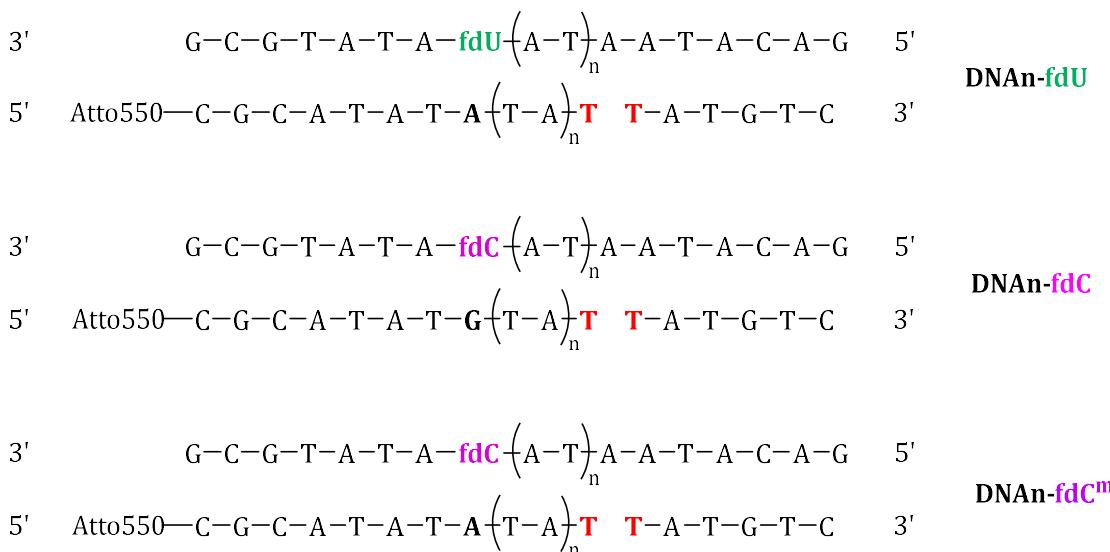


Abbildung 34: Verwendete DNA-Hybride der Photosensibilisatoren Formyl-2'-desoxyuracil (fdU) und Formyl-2'-desoxycytidin (fdC) mit den natürlichen Basenpaarungen in **DNA_n-fdU** und **DNA_n-fdC**, sowie der Fehlpaarung in **DNA_n-fdC^m**. Der Buchstabe n gibt die Anzahl der A-T-Basen an und variiert von 0 bis 5.

Teile dieses Kapitels und die zugehörigen unterstützenden Informationen wurden bereits veröffentlicht in „Natural Epigenetic DNA Modifications Cause Remote DNA Photodamage“, M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, 146, 20742-20749.^[108]

2.1 Formyl-2'-desoxyuridin

In der Betrachtung von fdU als Photosensibilisator wurde basierend auf einer Publikation von LHIAUBET-VALLET davon ausgegangen, dass die Energieübertragung auf die DNA-Basen sehr effektiv ist und es daher zur Bildung vieler CPD-Schäden kommt. Die Gruppe hatte die Triplet-Energie von fdU spektroskopisch ermittelt. Diese beträgt etwa 304 kJ/mol und ist damit höher als die Triplet-Energie benachbarter Thymine in einer DNA-Doppelhelix, was eine zentrale Voraussetzung für die Triplet-Triplet-Energieübertragung ist. Außerdem wurde in RP-HPLC-Experimenten festgestellt, dass fdU eine Lösung aus zwei über einen Propyl-Rest verbundenen Thymidinen innerhalb einer Stunde vollständig zu CPD-Schäden umsetzen konnte. fdC zeigte sich in Fluoreszenzlöschungs-Experimenten mit Thymidin und Photodegradations-Experimenten der zwei verbundenen Thymidine zwar auch dazu in der Lage, einen Triplet-Triplet-Energietransfer auf ein Thymidin-Paar auszulösen, war dabei allerdings um ein Vielfaches ineffizienter als fdU.^[83, 109]

Umso überraschender war daher das Ergebnis nach den Analysen der Belichtungen der fdU-DNA-Hybride bei 325 nm. Die CPD-Bildung ist zwar deutlich sichtbar, sie zeigt allerdings nur Ausbeuten von 7.6 % für **DNA0-fdU** und 8 % für **DNA1-fdU**. Mit zunehmendem Abstand zwischen Photosensibilisator und Schadenseite fällt sie sehr schnell ab auf 3 % für **DNA2-fdU** und 2 % in den Hybriden **DNA3-fdU** und **DNA4-fdU**. In einem Hybrid mit 10 intervenierenden Basen, **DNA5-fdU**, ist keine CPD-Bildung mehr zu beobachten (Abbildung 35 b).

Ebenfalls sichtbar ist, dass sich die CPD-Ausbeute an eine Sättigungsgrenze annähert. Das ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Reparaturmechanismus der Guanosine im CPD-Strang zurückzuführen. Sie öffnen die CPD-Schäden zu einem gewissen Teil wieder, wodurch im Laufe der Belichtungszeit ein Gleichgewicht aus sich bildenden und reparierten Schäden entsteht (Abbildung 35 a).^[58a, 107]

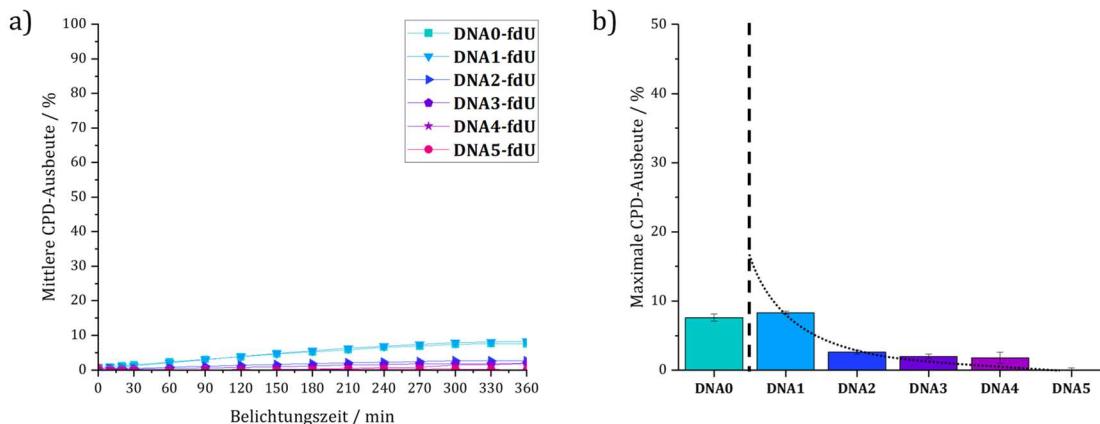


Abbildung 35: a) CPD-Ausbeute der fdU-DNA-Hybride **DNA*n*-fdU** im Verlauf über 6 h Belichtungszeit, b) Die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride nach 6 h Belichtungszeit. Mit angepasstem Verlauf der Maximalausbeuten und in deutscher Übersetzung mit Genehmigung übernommen aus der Publikation von M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, *Journal of the American Chemical Society* 2024, Copyright 2024 American Chemical Society.

Im Vergleich der Maximalausbeuten der unterschiedlich langen DNA-Hybride fällt ein stark exponentieller Abfall der CPD-Schäden mit steigendem Abstand zwischen Photosensibilisator und Schadensort auf. Das deutet auf einen DEXTER-Energietransfer von fdU auf das T-T-Paar über die intervenierenden A-T-Basen hin. Dies scheint jedoch nicht für **DNA0-fdU** zu gelten, da dieses in einem DEXTER-Energietransfer durch die direkte Nachbarschaft zwischen fdU und der Schadensseite und die damit einhergehende bessere Orbitalüberlappung deutlich höhere Ausbeuten zeigen sollte. Bei Anwendung des DEXTER-Modells auf **DNA1-fdU** bis **DNA5-fdU** kann die Distanzabhängigkeit der Energieübertragung β durch einen exponentiellen Fit in Abhängigkeit der Basenabstände r berechnet werden.

$$y = \exp(-\beta * r)$$

Formel 4: Exponentieller Fit zur Berechnung der Distanzabhängigkeit β des DEXTER-Energietransfers.

Diese beträgt für **DNA1-fdU** bis **DNA5-fdU** etwa $\beta = 0.05 \text{ \AA}$ und ist damit verhältnismäßig klein. Das spiegelt die experimentell sichtbare starke Abflachung der CPD-Ausbeute mit steigender Anzahl an intervenierenden A-T-Paaren innerhalb von 37.4 \AA wider. Im Vergleich dazu wurden in Arbeiten mit artifiziellen Nukleosiden als Photosensibilisatoren in DNA Distanzabhängigkeiten von 0.1 - 0.3 \AA für Benzophenon und Methoxybenzophenon gemessen.^[104a] Die sehr kleine Distanzabhängigkeit von 0.05 \AA ist dagegen vergleichbar mit Xanthin als artifizieller Photosensibilisator, welcher allerdings deutlich höhere CPD-Ausbeuten erzeugt.^[101]

Mit einer Triplet-Energie von 304 kJ/mol sollte fdU dazu in der Lage sein, Triplet-Energie auf ein umliegendes in einem DNA-Hybrid befindlichen Thymidin-Paar ($E_T = 270 \text{ kJ/mol}$) zu übertragen. Auch die in der Literatur spektroskopisch sichtbare Energieübertragung auf einen Fluoreszenzlöscher lässt vermuten, dass eine Energieübertragung von fdU auf umliegende Thymidin-Basen effektiv ist.^[83] Die direkteste Energieübertragung in **DNA0-fdU** scheint jedoch nicht ungehindert statt zu finden und losgelöst von dem DEXTER-Energietransfer der weiteren DNA-Hybride einem anderen Mechanismus zu folgen. Über längere Distanzen mit mehr als acht intervenierenden Basenpaaren, also über 30 Å, ist sie nicht mehr möglich. Dies zeigt, dass fdU nur sehr lokal CPD-Schäden auslöst. Trotzdem bleibt die Frage, warum die höchsten CPD-Schäden knapp unter 10% liegen, obwohl spektroskopisch und quantenmechanisch eine gute Energieübertragung von fdU auf das T-T-Basenpaar stattfinden sollte.

Um dem auf den Grund zu gehen, wurden die bei 260 nm aufgenommenen Chromatogramme genauer analysiert. Hier wird ersichtlich, dass der Peak des fdU-Stranges bei einer Retentionszeit von 13.2 min mit steigender Belichtungszeit abnimmt und bei einer leicht verkürzten Retentionszeit von 12.5 min ein neuer Peak entsteht (Abbildung 36).

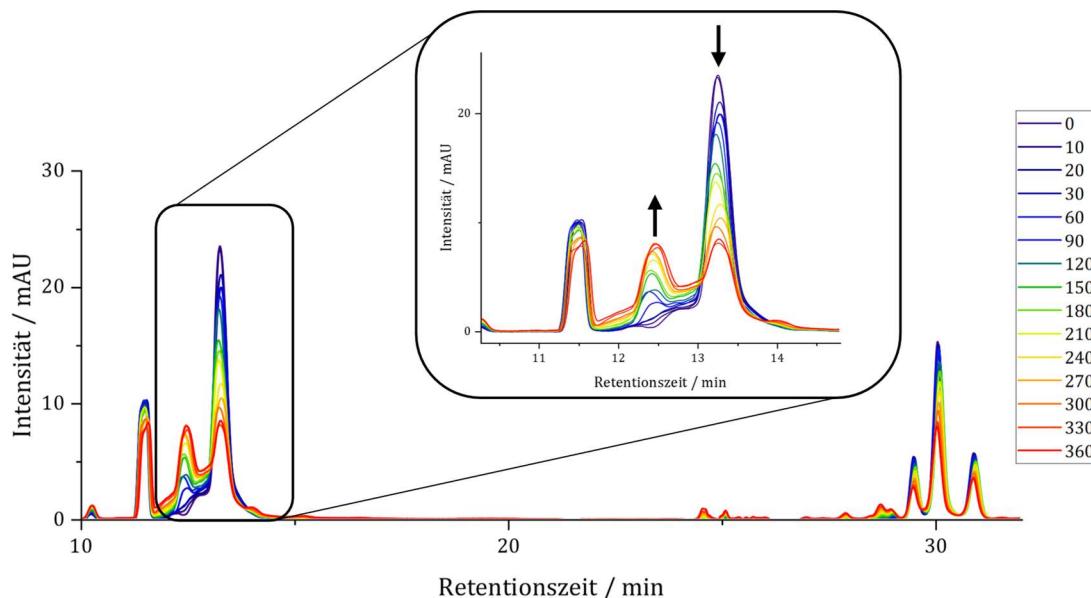


Abbildung 36: Die RP-HPLC Analysen nach Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (6 h) mit der Absorption bei 260 nm der fdU-DNA-Hybride beispielhaft mit **DNA3-fdU**: bei 11.5 min 6-mer Strang, 12.5 min umgewandelter fdU Strang, 13.2 min fdU-Strang, 29 min Atto-markierter CPD-Produktstrang, 30 min Atto-markierter Eduktstrang.

In den Chromatogrammen bei 325 nm ist trotz sehr niedriger Intensität sichtbar, dass die Absorption des Photosensibilisators mit steigender Belichtungszeit abnimmt (Abbildung

A 1). Das weist auf die photochemische Umwandlung des fdU-Stranges während der Belichtung hin. Die Formyl-Modifikation wird offensichtlich unter UV-Licht in eine andere Modifikation umgewandelt statt als Photosensibilisator seine Triplet-Energie auf das T-T-Basenpaar zu übertragen. Durch den intermediären Charakter von Formyl-2'-desoxyuridin in natürlicher DNA liegt die Vermutung nahe, dass fdU nicht photostabil ist und in wässriger Lösung photochemisch zur Carbonsäure oxidiert wird. In der Publikation von LHIAUBET-VALLET wurde diese Oxidation nicht beobachtet. In ihrer Untersuchung des Photosensibilisators wurde ein Gemisch aus Acetonitril/ Wasser (1:1) verwendet und statt eines vollständigen DNA-Stranges nur ein Propyl-verbrücktes Thymidin-Dinukleosid.^[83, 109] Sowohl Lösungsmittelleffekte als auch das fehlende Phosphatrückgrat könnten eine Erklärung für die Unterschiede in den jeweiligen Experimenten liefern. Demnach wäre ein großer Einfluss des Phosphatrückgrates auf die Stabilität von fdU möglich. Unter Verwendung eines fdU-Nukleosids scheint es durch eine hohe Interne Konversion (ISC) zu Energietransfer-Prozessen zu kommen, während in einem vollständigen DNA-Strang die Oxidation in die Carbonsäure schneller abläuft. Um die Hypothese der Oxidation von fdU zu belegen, wurden LC-ESI-MS Spektren der fdU-DNA-Hybride angefertigt. Die dem neu entstandenen Peak zugehörigen Massen-Ladungsverhältnisse (m/z) bestätigen dabei die Oxidation zu 5-Carboxy-2'-desoxyuridin (cadU) (Abbildung 37).

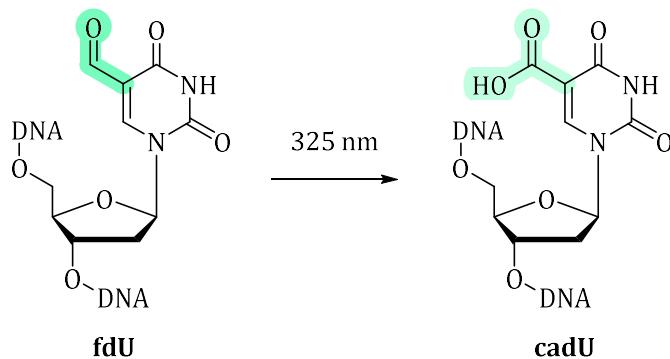


Abbildung 37: Photochemische Umwandlung der Formyl-2'-desoxyuridin-Modifikation(fdU) in die Carbonsäure-Modifikation (cadU) bei der Belichtung mit 325 nm in wässriger Salz-Phosphatpuffer-Lösung.

Die Messungen bei $t = 0$ min, also ohne den Einfluss von UV-Licht, zeigen auch nach längerer Lagerung der Stränge keinen cadU-Peak. Dies bedeutet, dass die Umwandlung nicht im Dunkeln stattfindet und damit eindeutig photochemisch ausgelöst wird.

Für die quantitative Bestimmung der einzelnen Peaks in diesen Absorptionsanalysen hätte ein interner Standard co-injiziert und eine Kalibriergerade der einzelnen

Komponenten gemessen werden müssen. Da dies für die Ausbeutebestimmung der CPDs nicht notwendig war und zur Verzerrung dieser hätte führen können, wurde darauf verzichtet. Im semi-quantitativen Vergleich des fdU-Peaks mit dem neu entstandenen cadU-Peak wird deutlich, dass ersterer nach 6 h etwa zu 50% in die Carbonsäure umgewandelt wurde. Die eingestrahlte Energie wurde demnach zu einem Großteil für die Umwandlung der Formylgruppe in die Carbonsäure verwendet, was die Ausbeuteverluste der CPDs erklärt. Zusätzlich weisen Moleküle mit einer Säuregruppe, wie cadU, einen deutlich niedrigeren Extinktionskoeffizienten und höhere Singulett- und Triplett-Energien ($n \rightarrow \pi^*$) auf. Dies verschlechtert die Effizienz dieser Modifikation als Photosensibilisator entscheidend.^[110]

Da die fdU-DNA-Hybride anders als die fdC-DNA-Hybride mit einer 325 nm LED bestrahlt wurden, erfolgte noch ein Kontrollexperiment, in dem **DNA0-fdU** 6 Stunden mit der 310 nm LED belichtet wurde. Dadurch sollten Ausbeuteunterschiede aufgrund der unterschiedlichen Lichtquellen der chemisch sehr ähnlichen Modifikationen untersucht werden. Die CPD-Ausbeute befand sich mit $5 \pm 1\%$ in einem ähnlichen Bereich wie die bei der Verwendung der 325 nm LED. Die Unterschiede von etwa 3 % können den unterschiedlichen Leistungen der LEDs zugeordnet werden (Abbildung A 2). Die Verwendung der beiden verschiedenen Wellenlängen birgt keine starke Aussagekraft über Unterschiede in den CPD-Ausbeuten der beiden Modifikationen, weswegen das Kontrollexperiment nicht für alle fdU-Stränge wiederholt wurde. Was allerdings deutlich wird, ist der große Einfluss der Leistung der verwendeten Belichtungsquelle.

Ebenfalls untersucht wurde, ob die Bestimmung der CPD-Schäden auch ohne das fehlende Phosphatrückgrat zwischen dem Thymidin-Paar möglich ist. So sollte die Situation in nativer DNA besser nachgestellt werden. Durch das Fehlen des Phosphatrückgrats könnten artifiziell CPD-Schäden verursacht werden, da die Energie so nicht weitergegeben werden kann und somit durch die Bildung von CPD-Schäden „gefangen“ wird (engl. *energy trapping*). Um das zu untersuchen, wurde zunächst ein vollständiger Atto-markierter Gegenstrang verwendet und mit **DNA0-fdU-a**, also dem Photosensibilisatorstrang ohne intervenierende A-T-Basen, hybridisiert (**DNA0-fdU-full**). Im Chromatogramm bei 260 nm ist in diesem Fall bei 12.4 min der Photosensibilisator-Strang zu sehen sowie die Entstehung des cadU-Stranges mit steigender Belichtungszeit bei 11.2 min. Bei höheren Retentionszeiten ist lediglich der

Atto-markierte Gegenstrang bei 29-31 min sichtbar. Im Fluoreszenzchromatogramm der Proben sind keine Signale zu sehen, die auf das CPD-Produkt hinweisen, lediglich der Atto-markierte Gegenstrang ist sichtbar (Abbildung 38).

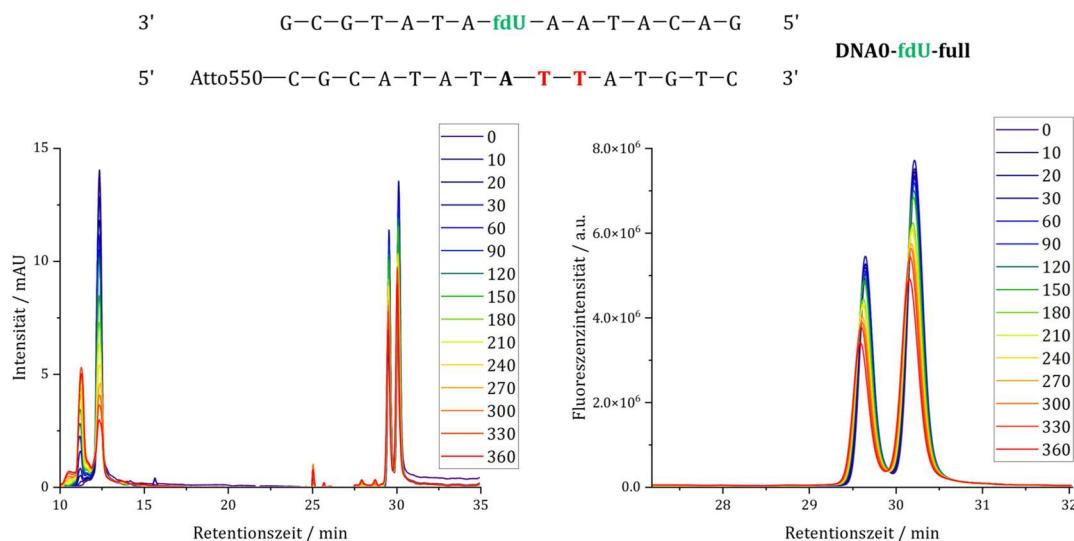


Abbildung 38: **DNA0-fdU-full** im Chromatogramm mit der Absorption bei 260 nm der RP-HPLC von 0 min bis 360 min Belichtungszeit (links): 11.2 min cadU-Strang, 12.4 min fdU-Strang, 29.4-30.5 min Atto-markierter Strang. Im Fluoreszenzchromatogramm (rechts): 29.4-30.5 min Atto-markierter Strang.

Die Detektion des CPD-Stranges wird durch den hohen Anteil an Acetonitril, welcher zur Elution der Atto-markierten Stränge notwendig ist, beeinträchtigt, was zur Überlagerung der Edukt- und Produktpeaks führt. Unter Verwendung der Atto-Modifikation ist es demnach kaum möglich, den CPD-Strang vom Eduktstrang zu trennen und die jeweiligen Ausbeuten zu berechnen.

Da die Umsetzung des Oligonukleotids mit fdU in das Carbonsäure-Derivat bei niedriger Retentionszeit im Chromatogramm deutlich sichtbar ist, wurde anschließend versucht, ebenfalls das CPD-Produkt ohne Atto-Markierung in der RP-HPLC abzutrennen und das Verhältnis zwischen CPD-Strang und Eduktstrang über das Verhältnis der Signale im Chromatogramm bei 260 nm zu bestimmen. Verwendet wurde aufgrund der niedrigen Absorptionsintensität der 2.5 µM DNA-Lösungen hierfür eine 5 µM Lösung des DNA-Hybrides mit vollständigem Gegenstrang ohne Atto-Markierung (**DNA0-fdU-full***). Da der Photosensibilisatorstrang und der Gegenstrang ohne Atto-Markierung die gleiche Länge aufweisen, überlagerten ihre Peaks im Chromatogramm stark. Durch die Umwandlung des fdU-Stranges in cadU ist eine Verminderung der Absorptionsintensität des Signals bei 13.0 min zu beobachten. Bei niedrigeren Retentionszeiten von etwa 11.5 min sind ebenfalls zwei überlagerte Peaks sichtbar. (Abbildung 39).

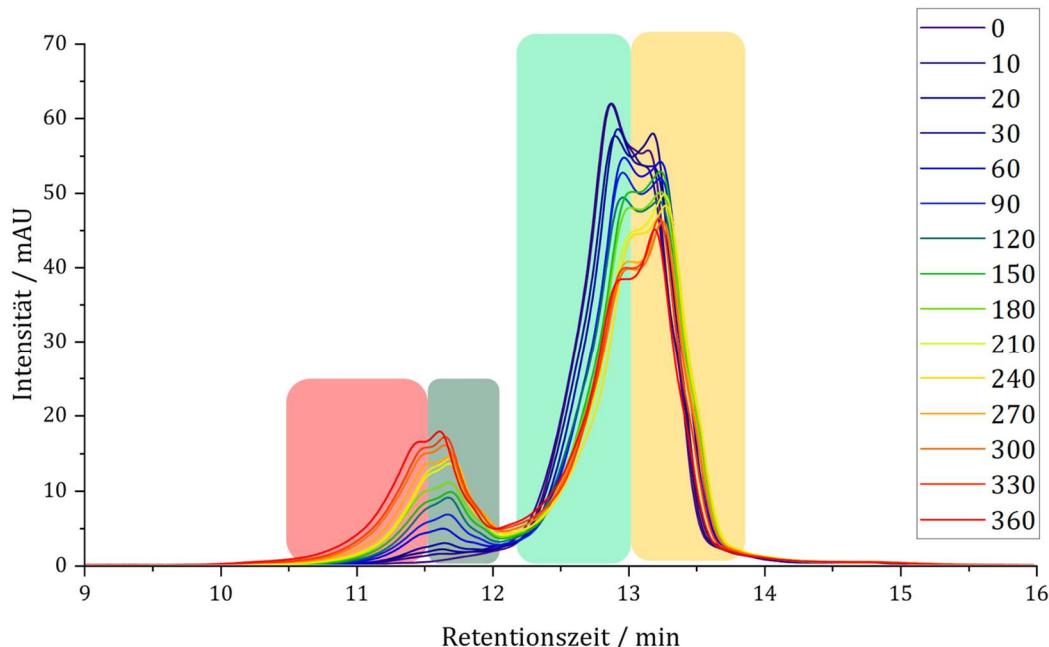
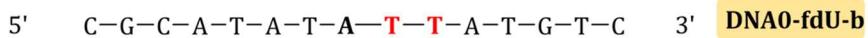


Abbildung 39: **DNA0-fdU-full*** im RP-HPLC Chromatogramm mit der Absorption bei 260 nm von 0 min bis 360 min Belichtungszeit: 11-12 min cadU-Strang und CPD-Strang, 12-14 min fdU-Strang und fdU-Gegenstrang sowie die jeweilige Basenabfolgen der einzelnen Stränge.

Durch die LC-ESI-MS Analyse konnten die Peaks bei geringer Retentionszeit sowohl dem CPD-Strang als auch dem cadU Strang zugeordnet werden (Abbildung SI 76). Die überlagerten Peaks bei etwa 13 min wurden dem fdU-Strang und dem Gegenstrang zugeordnet (Abbildung SI 74-33).

Dadurch wird deutlich, dass CPD-Schäden auch in DNA-Hybridien entstehen, die kein fehlendes Phosphatrückgrat aufweisen. Die CPD-Entstehung ist also nicht von der unnatürlichen Veränderung des Rückgrates der DNA-Hybride abhängig.

Eine chromatographische Abtrennung des Oligonukleotids mit CPD-Schaden zur quantitativen Analyse ist experimentell schwer umsetzbar. Durch die chemische Veränderung des Photosensibilisatorstranges überlagerten die Signale zu sehr, als dass eine getrennte Analyse der beiden Reaktionen möglich war. Zusätzlich ist eine hohe Konzentration an DNA notwendig, um die CPD-Ausbeute durch ihre Absorption bei

Belichtungsexperimente

260 nm zu bestimmen. Die deutlich sensitivere Fluoreszenzanalyse bot schon bei geringerer Konzentration an DNA klarere Ergebnisse mit kleinerem Fehler. Die Fluoreszenzanalyse ist allerdings nur mit der Atto--Markierung des CPD-Stranges möglich und eluiert in der RP-HPLC durch die verminderte Polarität der Stränge nur bei einem hohem Acetonitril-Anteil, was die Überlagerung von Edukt- und Produktstrang ohne die das fehlende Phosphatrückgrat stark begünstigt.

2.2 Formyl-2'-desoxycytidin

Formyl-2'-desoxycytidin liegt mit einer Triplet-Energie von 326 kJ/mol ebenfalls energetisch deutlich höher als die Triplet-Energie der hybridisierten Thymidine.^[111] Dies müsste nach der SANDROS-Gleichung eine Energieübertragung auf die energetisch deutlich niedriger liegenden Thymidine stärker begünstigen, als es für fdU als Photosensibilisator der Fall ist.^[112] Limitiert wird dies allerdings durch einen sehr langsamen ISC in den Triplet-Zustand mit Triplet-Ausbeuten von lediglich 8 %.^[83, 113] Zusätzlich wurde festgestellt, dass fdC enthaltende DNA sehr schnell Triplet-Ladungsübertragungs-Prozesse (engl. *Charge Transfer*) induziert.^[113] Diese Entdeckung erhärtet den Verdacht, dass diese Modifikation als Photosensibilisator auch zu Triplet-Triplet-Energietransfers in der Lage ist. Die epigenetische Modifikation einzelner DNA-Basen hätte demnach einen größeren Einfluss auf die Integrität des Genoms und könnte im Fall von Formyl-2'-desoxycytidin mit UV-A-Licht Schäden im Erbgut induzieren. Zusätzlich ist bekannt, dass sich die Reaktivität von fdU und fdC deutlich voneinander unterscheidet. Genauer ist die Reaktivität von fdU deutlich höher, während fdC die stabilere Modifikation ist.^[114] Die erhöhte Stabilität der fdC-Modifikation konnte in den Belichtungsexperimenten der jeweiligen DNA-Hybride bestätigt werden. In den Chromatogrammen bei 260 nm konnte keine Konversion von fdC in die Carboxylform beobachtet werden, während fdU innerhalb von sechs Stunden etwa zu 50% in die Säuremodifikation umgewandelt wurde. Lediglich die Abnahme des 6-mer Peaks durch die Umwandlung in das CPD-Produkt bei etwa 17.7 min Retentionszeit ist sichtbar sowie eine leichte Verschiebung aller Peaks, die nach mehreren Injektionen und ohne Referenz eines internen Standards eintritt (Abbildung 40).

Belichtungsexperimente

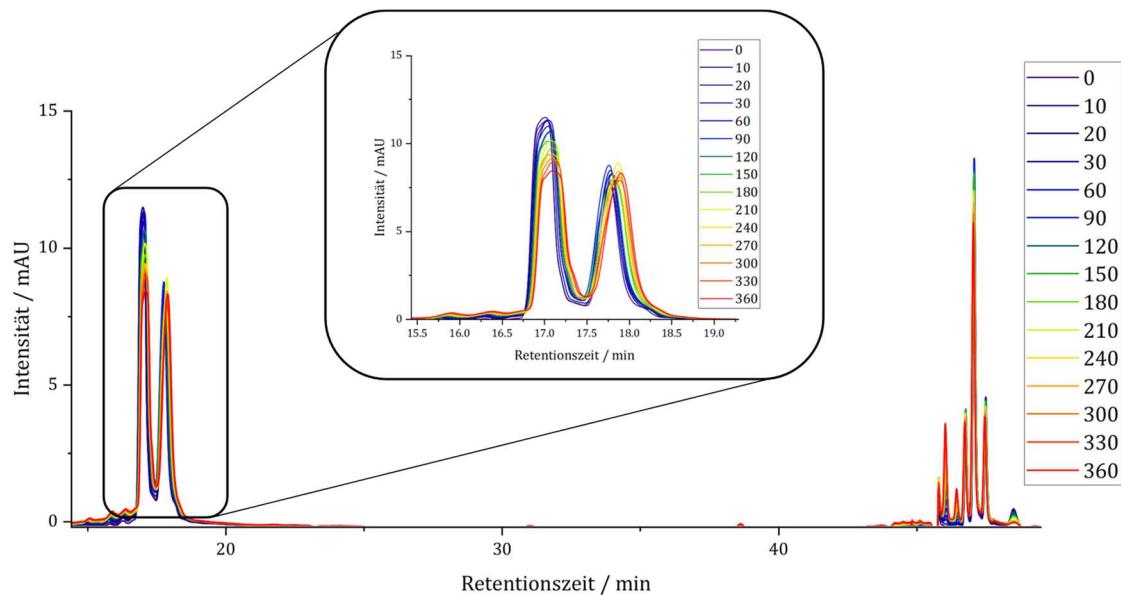


Abbildung 40: RP-HPLC-Analysen nach Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (6 h) mit der Absorptionsmessung bei 260 nm der fdC-DNA-Hybride beispielhaft mit **DNA0-fdC**: bei 17.0 min 6-mer Strang, 17.7 min fdC-Strang, 46.2 min Atto-markierter Produktstrang, 47.2 min Atto-markierter Eduktstrang.

Die Vorhersage eines weniger effizienten Energietransfers verglichen mit fdU, wie sie von LHIAUBET-VALLET vorgeschlagen wurde, bestätigte sich allerdings nicht. Stattdessen ist bei der Belichtung der fdC-Hybride mit 310 nm eine deutlich höhere CPD-Ausbeute messbar. Erneut weist jedoch nicht das DNA-Hybrid die höchste Anzahl an CPD-Schäden auf, in dem Photosensibilisator und Schadensstelle direkt benachbart sind. Analog zu den fdU-Strängen zeigt das DNA-Hybrid **DNA1-fdC** die höchste CPD-Ausbeute, diesmal allerdings mit 37 %. Die DNA ohne A-T-Paare zwischen Photosensibilisator und Schadenseite, **DNA0-fdC**, zeigt CPD-Ausbeuten von etwa 27 %, während die folgenden DNA-Hybriide **DNA2-fdC** bis **DNA5-fdC** sehr ähnliche CPD-Ausbeuten von etwa 14 % aufweisen (Abbildung 41 b).^[113] Der Reparaturmechanismus durch Guanosin ist erneut durch den nicht linearen Verlauf der CPD-Schäden über die 6 Stunden Belichtungszeit sichtbar (Abbildung 41 a).

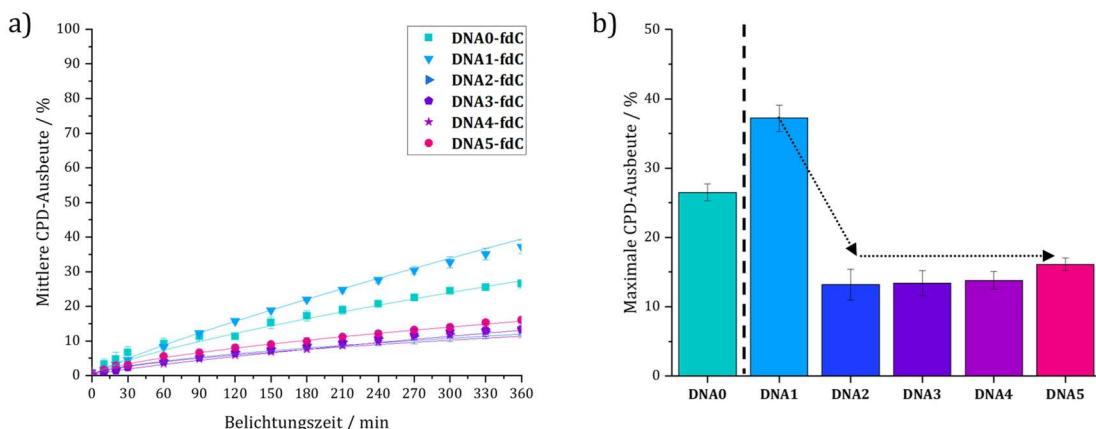


Abbildung 41: a) CPD-Ausbeute der fdC-DNA-Hybride mit dG als Gegenbase **DNA*n*-fdC** im Verlauf über 6 h Belichtungszeit; b) Die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride. Mit angepasstem Verlauf der Maximalausbeuten und in deutscher Übersetzung mit Genehmigung übernommen aus der Publikation von M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, *Journal of the American Chemical Society* 2024., Copyright 2024 American Chemical Society.

Die relativ niedrigen CPD-Ausbeuten gehen mit großer Wahrscheinlichkeit auf die niedrigen ISC-Ausbeuten von fdC zurück. Demnach wird der Triplet-Zustand nicht in hoher Effizienz erreicht, was die Triplet-Triplet-Energieübertragung vermindert. Das Fehlen eines exponentiellen Abfalls der CPD-Ausbeute lässt erkennen, dass es sich in diesem Fall nicht wie bei fdU um einen direkten DEXTER-Energietransfer handelt. Allerdings ist auch kein charakteristisches Verhalten eines Förster Energietransfers zu erkennen. Bei diesem müsste der Energietransfer für einen bestimmten Abstand am größten sein und sowohl mit steigender als auch fallender Anzahl an A-T-Paaren stetig abflachen. Was stattdessen beobachtet werden kann, ist eine sehr effiziente Energieübertragung für **DNA1-fdC** und anschließend eine nahezu identische Energieübertragung für höhere Distanzen von 4 bis 10 intervenierenden Basenpaaren. Daher kann angenommen werden, dass es zu einem effizienten Energy-Hopping-Mechanismus kommt, der ab einem Abstand von 4 A-T-Paaren, **DNA2-fdC**, einsetzt und mindestens bis zu 10 Basen, **DNA5-fdC**, ohne größere Ausbeuteeinbußen funktioniert. Dabei wird anscheinend die Triplet-Energie vom Photosensibilisator direkt auf das Thymidin-Paar in **DNA1-fdC** übertragen. Ab der Distanz von etwa 17 Å des T-T-Paares in **DNA2-fdC** findet die Energieübertragung nicht mehr direkt statt, sondern hüpfst über die intervenierenden A-T-Paare bis zur Schadensstelle. Dieser Energy-Hopping-Mechanismus scheint über längere Distanzen von bis zu 37 Å hinweg hinreichend gut zu funktionieren. Er konkurriert dabei mit den strahlungslosen Übergängen der Thymidine in den Grundzustand mittels Interner Konversion (IC) und vibronischer Relaxation (VR).

Ein Hüpfen der Energie zurück auf den Photosensibilisatorstrang ist ebenfalls eine Konkurrenzreaktion, diese ist allerdings aufgrund der energetischen Situation sehr unwahrscheinlich.^[26-27]

Die leicht erhöhten CPD-Ausbeuten bei **DNA4-fdC** und **DNA5-fdC** sind auf die Überlagerung der Produkt- und Edukt-Peaks im Chromatogramm zurückzuführen. Die CPD-Ausbeute von **DNA-n-fdC** wurde daher zusätzlich noch mittels PAGE-Analyse überprüft. In der PAGE-Analyse ist eine leicht erhöhte Ausbeute für **DNA2-fdC** zu beobachten, **DNA3-fdC** bis **DNA5-fdC** zeigen allerdings sehr ähnliche Ausbeuten. Das stützt die anhand der RP-HPLC-Analysen aufgestellte Theorie des Energy-Hopping-Mechanismus. Die Verzerrung durch die Überlagerung der Peaks ist hier nicht sichtbar, das Ergebnis der konstanten Energieübertragung von etwa 14 % bleibt allerdings das gleiche (Abbildung 42).

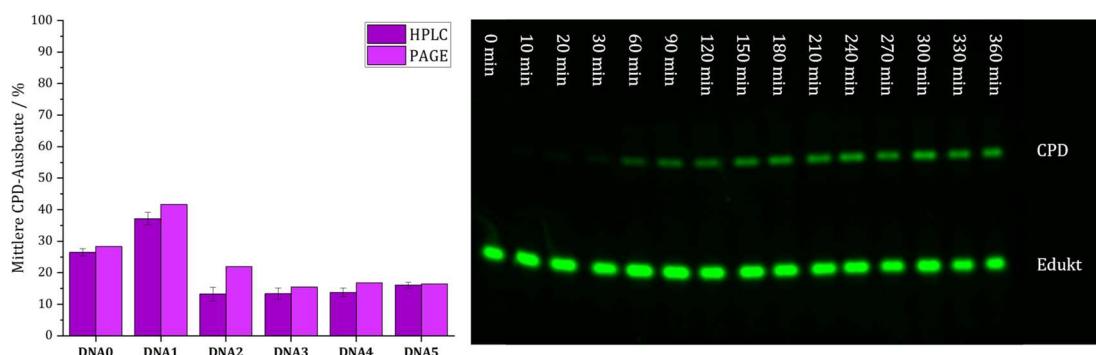


Abbildung 42: Unterschied in der Analyse der CPD-Ausbeuten im Vergleich zwischen analytischer RP-HPLC und PAGE-Analyse (links) und Darstellung der im Polyacrylamid beobachteten elektrophoretischen Mobilität des kürzeren und durch CPD-Bildung verlängerten fluoreszenzmarkierten Stranges am Beispiel von **DNA2-fdC** bei Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (rechts).

Die im Gegensatz zu **DNA1-fdC** verminderte Ausbeute von **DNA0-fdC** von etwa 27 % könnte an der direkten Nähe des T-T-Paars zu Guanosin liegen. Die Elektronenübertragung durch Guanosin auf das beschädigte Thymidin-Paar kann hier ungehindert stattfinden, wodurch die entstandenen CPD-Schäden schneller in den Eduktstrang rückreagieren. Währenddessen muss die Übertragung des Elektrons bei allen anderen DNA-Hybridien über mehrere Basen hinweg stattfinden, was den „Selbstheilungsprozess“ wahrscheinlich verlangsamt. Dieser Reparaturmechanismus kann zwar auch mit Adenosin als benachbarte Base beobachtet werden, allerdings ist dieser deutlich weniger effizient. Erklärt werden kann dies durch das Oxidationspotential

der Nukleobasen. Dieses liegt für Guanosin bei etwa 1.3 V (vs. NHE) im Vergleich zu etwa 2 V (vs. NHE) von Adenosin.^[115] Daher ist die Triebkraft für einen Elektronentransfer von Guanosin auf umliegende Basen relativ hoch. Im Fall eines CPD-Schadens führt das zur Cycloreversion und damit zur „Heilung“ des Schadens (Abbildung 43).^[58b, 116]



Abbildung 43: Schematische Darstellung des Selbst-Reparatur-Mechanismus in der DNA mit Guanosin direkt benachbart zu den beiden T-T Basen.^[58a]

Der Selbstheilungsprozess durch die räumliche Nähe von Guanosin zum entstandenen DNA-Schaden könnte allerdings in allen Strängen der **DNA-n-fdC**-Hybride einen Effekt auf die durch den Photosensibilisator erreichte Ausbeute haben. Das Potential von fdC als Photosensibilisator würde so nicht voll ausgeschöpft werden, da die natürliche Basenpaarung gegen die Bildung von CPD-Schäden wirkt, indem Guanosin diese zu einem gewissen Anteil direkt repariert.

Um diesen Effekt näher zu beleuchten, wurden die DNA-Hybride mit unnatürlicher fdC-A-Basenpaarung, **DNA-n-fdC^m**, ebenfalls mit einer 310 nm LED für maximal 6 h belichtet und mittels RP-HPLC untersucht. Erwartet wurden dabei gesteigerte CPD-Ausbeuten für **DNA0-fdC^m** durch das Ausbleiben des Reparaturmechanismus aufgrund des fehlenden direkt benachbarten Guanosins. Allerdings fällt auf, dass **DNA0-fdC^m** entgegen diesen Erwartungen mit etwa 2 % so gut wie gar keine CPD-Schäden aufweist. Schon bei zwei intervenierenden A-T-Basen, **DNA1-fdC^m**, steigt die CPD-Ausbeute auf 32 %, was etwas schlechter ist als im DNA-Hybrid **DNA1-fdC**, sich allerdings in einem ähnlichen Bereich befindet. Im Vergleich des DNA-Hybrides mit natürlicher Basenpaarung, ist die CPD-Bildung bei **DNA2-fdC^m** allerdings um etwa 10 % höher mit 24 % Ausbeute. Erst danach flacht die Energieübertragung auf etwa 11 % ab, bleibt allerdings sowohl in **DNA3-fdC^m** als auch in **DNA4-fdC^m** und **DNA5-fdC^m** bei diesem Wert (Abbildung 44 b).

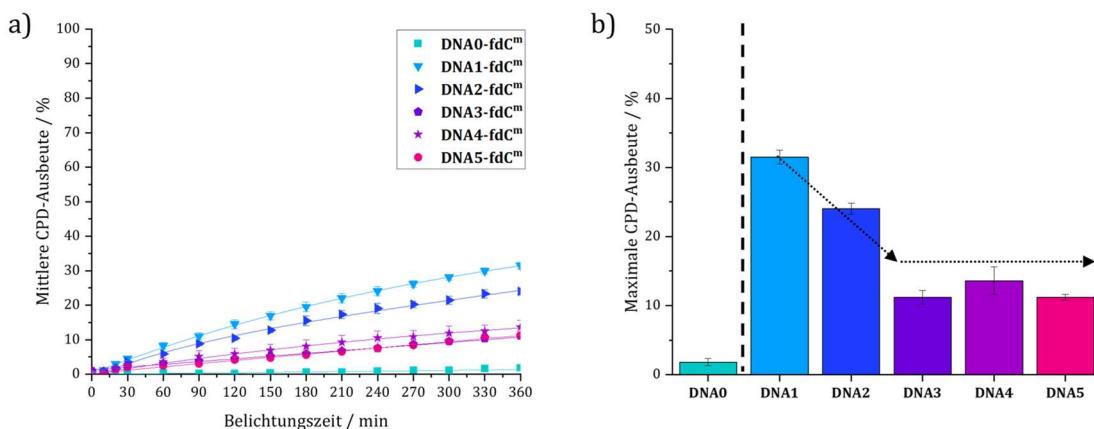


Abbildung 44: a) CPD-Ausbeute der fdC^m-DNA-Hybride mit dA als Gegenbase **DNA_n-fdC^m** im Verlauf über 6 h Belichtungszeit; b) Die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride. Mit angepasstem Verlauf der Maximalausbeuten und in deutscher Übersetzung mit Genehmigung übernommen aus der Publikation von M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, *Journal of the American Chemical Society* 2024, Copyright 2024 American Chemical Society.

Die geringe CPD-Ausbeute bei direkter Nachbarschaft des Photosensibilisators zur Schadenseite in **DNA0-fdC^m** könnte auf eine unvollständige Hybridisierung des Atto-markierten Gegenstranges an der Stelle der Fehlpaarung zurückzuführen sein. Demnach würden die Stränge an der Stelle der Energieübertragung durch den Photosensibilisator nicht gut interagieren, was die Triplet-Triplet-Energieübertragung entscheidend herabsetzt. Unterstützt wird diese Theorie durch die Schmelztemperaturen der jeweiligen DNA-Hybride. Diese sind für **DNA_n-fdC** mit 48-59 °C etwa 10 °C höher als für **DNA_n-fdC^m** mit 39-49 °C (Abbildung SI 90-49). Das zeigt eine deutlich höhere Stabilität der Hybride mit der natürlichen Basenpaarung fdC-G. Die zwischengeschalteten A-T-Paare in den längeren DNA-Hybridnen könnten wie eine Art Klammer funktionieren und den Strang zusammenhalten, was die Energieübertragung in längeren Strängen wieder verbessert. Der abgebildete Schadensverlauf weist erneut auf einen Energy-Hopping-Mechanismus hin, der allerdings durch die Instabilität der DNA-Hybride beeinträchtigt wird und nach der direkten DEXTER-Energieübertragung von **DNA2-fdC^m** mit einem Abstand von etwa 24 Å einsetzt. Eine starke Überlappung des Edukt- und Produktstranges wurde unter Verwendung dieser DNA-Hybride nicht beobachtet, weswegen in diesem Fall keine zusätzliche Analyse durch PAGE erforderlich war.

In den Analysen aller fdC-Hybride wurden zusätzlich zu den CPD-Schäden *Crosslinks* (engl. Vernetzungen) gefunden, die durch die kovalente Verbrückung von einem Strang mit einem Gegenstrang entstehen. Die mit diesen DNA-Hybridnen beobachteten *Crosslinks* weisen eine kürzere Retentionszeit als das CPD-Produkt im Fluoreszenzchromatogramm

auf. Das weist auf eine signifikante Verlängerung des Atto-markierten Stranges hin, obwohl es sich dabei nicht um das CPD-Produkt handelt. In den LC-ESI-MS-Analysen sind zu diesen Peaks spezifische Massen zu finden, die zu einem *Crosslink*-Produkt des langen, Atto-markierten Gegenstranges mit dem Photosensibilisatorstrang passen. Unter welchen Umständen und wie genau *Crosslinks* entstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Ausbeuten lagen bei 1-3 % in den unterschiedlichen fdC-DNA-Hybridien. Die höchsten Ausbeuten waren für die kürzeren DNA-Hybriide **DNA0-2-fdC** und **DNA0-2-fdC^m** zu finden. Bei DNA-Hybridien, in denen die Energie über mehr als vier Basenpaare hinweg transportiert werden muss, konnten keine *Crosslink*-Produkte gefunden werden.

Die CPD-Ausbeuten von maximal 37 % für Formyl-2'-desoxycytidin als Photosensibilisator zeigen, dass auch kleine epigenetische DNA-Modifikationen, wie die Formylierung einer Base, eine signifikante Menge an Schäden auslösen kann. Sie kommen mit 0.2-0.002% in zellulärer DNA nicht besonders häufig vor, können allerdings nachweislich Energie über mindestens zehn Basen hinweg übertragen.^[117] Das führt zur CPD-Bildung sowohl in räumlicher Nähe als auch in weiterer Entfernung zu dem epigenetischen Marker. Für native DNA könnte das eine erhöhte Instabilität des genetischen Materials insbesondere dort bedeuten, wo diese epigenetischen Modifikationen häufiger auftreten. Als Photosensibilisator gelten dabei allerdings nur formylmodifizierte Basen, da diese durch ihre hohe Triplet-Energie und die signifikante Absorption im UV-A-Bereich dazu in der Lage sind, Energie auf umliegende Basen zu übertragen.

2.3 Enzymexperimente mit fdU und fdC

Um zu beweisen, dass die beobachteten Strangverlängerungen tatsächlich auf die Bildung von CPDs zurückzuführen sind, wurden die DNA-Hybride **DNA1-fdU**, **DNA1-fdC** und **DNA1-fdC^m** stellvertretend für alle verwendeten DNA-Hybride in einer enzymatischen Reaktion mit der T4 Endonuklease V umgesetzt.

Dieses Enzym ist dazu in der Lage, Stränge selektiv an der Stelle von CPD-Schäden in DNA zu schneiden und wird häufig in der Analyse der Schäden mit nativer Plasmid-DNA verwendet.^[118] Dabei wird die *supercoil*-Struktur des DNA-Plasmids durch das Schneiden der Stränge geöffnet, was in einer Gelelektrophorese durch unterschiedliche elektrophoretische Interaktionen in der Lauflänge durch das Gel sichtbar wird. An der Reparatur beteiligt sind zwei verschiedene Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Aminogruppe eines Lysins greift an der C1'-Position des Desoxyribofuranosids an, wodurch die Nukleinbase abgespalten wird. Um die Abspaltung der Nukleinbase vom Zucker zu katalysieren, wird vom Säurerest einer zweiten Aminosäure ein Proton übertragen. Das Desoxyribofuranosid öffnet sich währenddessen in die acyclische Form und es kommt durch die deprotonierte Säure der zweiten Aminosäure zu einer β -H-Eliminierung am Zucker, wodurch dieser von der Phosphatfunktion abgespalten wird. Das Resultat ist ein Strangbruch an der Stelle des CPD-Schadens, wodurch die Reparatur der beiden Strangenden durch weitere Enzyme erfolgt und das CPD letztendlich vollständig entfernt wird (Abbildung 45).^[59a]

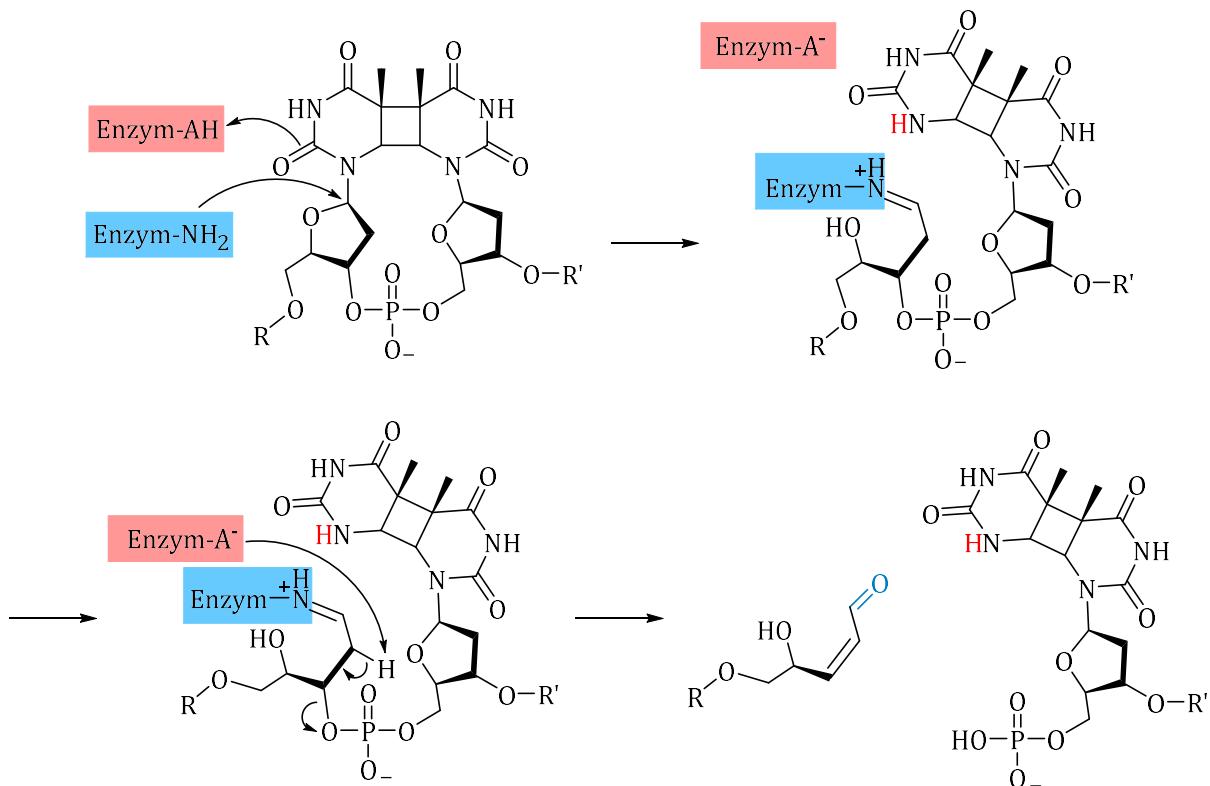


Abbildung 45: Mechanismus der T4 Endonuklease V unter Bildung eines Strangbruches an der Stelle eines CPD-Schadens in DNA.^[59a]

Andere UV-Schäden wie (6-4)-Photoläsionen werden durch dieses Enzym nicht gespalten. Experimentell können Strangbrüche an der Stelle dieser Schäden mit dem Einsatz von heißem Piperidin erzeugt werden. In Lebewesen erfolgt die Entfernung über andere spezifische Enzyme.^[118]

Die DNA-Hybride wurden für die Reaktion mit der Endonuklease gemäß dem Protokoll des Herstellers nach 6 h Belichtung mit der T4 Endonuklease V, rekombinantem Albumin und einem Reaktionspuffer bestehend aus Kochsalzlösung, Dithiothreitol (DTT), Komplexbildner (EDTA) und Phosphatpuffer vermengt.^[119] Die Enzymlösung wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend 10 µL direkt in das gleiche Volumen des PAGE-Ladepuffers gegeben. Der Ladepuffer enthielt unter anderem Bromphenolblau, was zur Dissoziation des Enzyms von der DNA beiträgt und so die Auftrennung im Gel erleichtert. Durch die Bestimmung der Fluoreszenzstärke der Produkt- und Eduktbande im Verhältnis zueinander wurde die Umwandlung des CPD-Schadens durch das Enzym gemessen. Verglichen wurde die Umsetzung mit Kontrollproben, die jeweils 10 µL der für 6 h belichteten DNA-Lösungen und 10 µL Ladepuffer enthielten. Die CPD-Produktbande wird dabei mithilfe des Auftrennens der Stränge durch das Enzym zurück in den

Eduktstrang umgewandelt. Da Enzymreaktionen sehr effizient sind, sollte schon nach etwa 30 min Inkubationszeit keine Produktbande mehr im Gel zu erkennen sein. Das war allerdings für keines der verwendeten DNA-Hybide der Fall. Die CPD-Banden sind sowohl in den Kontrollproben (K) zu erkennen, als auch in den mit Enzym behandelten Proben (+E). Die Fluoreszenzintensität der Banden im Verhältnis zueinander zeigte einen Umsatz der CPD-Schäden durch das Enzym von etwa 50 %. Im Fall von **DNA1-fdC** waren es lediglich 25 % (Abbildung 46).

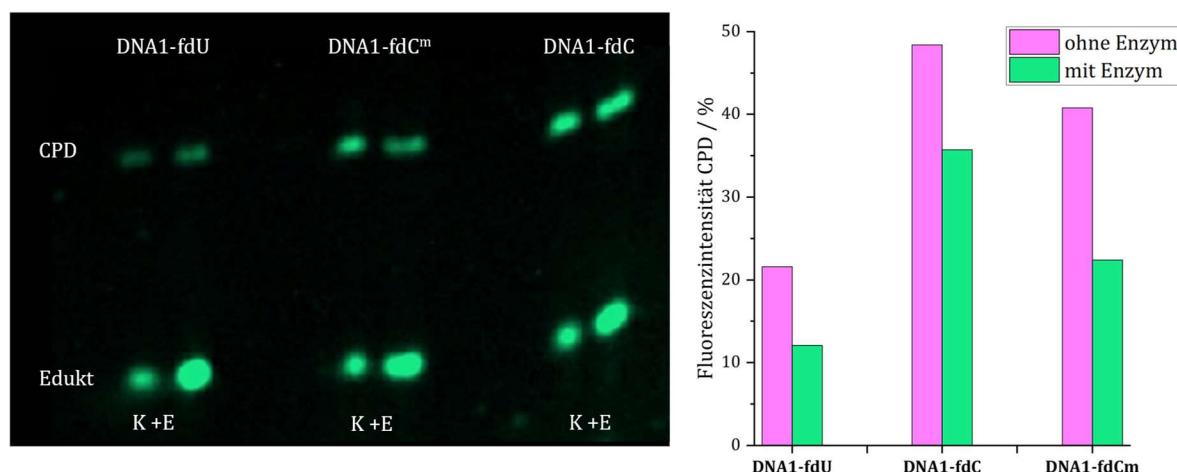


Abbildung 46: Polyacrylamid-Gel von **DNA1-fdU**, **DNA1-fdC^m**, **DNA1-fdC** (links) und Ausbeute der CPD-Schäden nach 6 h Belichtung mit (grün) und ohne Enzym (pink) (rechts).

Um auszuschließen, dass der unvollständige Umsatz der CPD-Schäden nicht durch zu niedrige Inkubationszeit oder zu geringe Enzymkonzentration zustande kam, wurden weitere Kontrollexperimente durchgeführt. Die Proben wurden sowohl mit der doppelten Enzymkonzentration als auch mit einfacher Enzymkonzentration und einstündiger sowie eintägiger Inkubationszeit umgesetzt. Diese Versuche, das Produkt vollständig umzusetzen, schlugen allerdings fehl. Stattdessen konnte in jedem Fall erneut eine Umwandlung von ca. 50 % für **DNA1-fdU** und **DNA1-fdC^m** und eine Umwandlung von etwa 25 % für **DNA1-fdC** beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Bande mit kürzere Gellauflänge trotz der zu hohen Belichtungswellenlänge um einen (6-4)-Photoschaden handelt, wurde nach der Inkubationszeit des Enzyms Piperidin hinzugefügt und eine Stunde auf 90 °C erhitzt. Dies führte erneut nicht zur vollständigen Umsetzung der CPD-Bande. Ein (6-4)-Schaden konnte somit ausgeschlossen werden. Da die ESI-MS-Analysen der Proben jeweils nur die Produkt- und Eduktmassen zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass es nicht

beispielsweise zu einer Umsetzung der DNA-Stränge in Oxidationsprodukte kommt. Stattdessen ist das alles ein Indiz dafür, dass es sich bei der Produktbande tatsächlich um den durch die Bildung von CPD verlängerten Strang handelt. Eine Erklärung, warum dieses Produkt dann nicht von der Endonuklease umgesetzt werden konnte, ist die mögliche Entstehung von *trans-syn* CPDs. Diese entstehen in natürlicher DNA durch die starke Ordnung in der DNA-Doppelhelix nur in sehr geringen Mengen. Bei einem nicht natürlichen kurzen Oligonukleotid mit fehlendem Phosphatrückgrat an der Stelle der Schadensbildung könnte es allerdings zur vermehrten Bildung von CPDs dieser Konfiguration kommen.^[120] Da die T4 Endonuklease V spezifisch für *cis-syn*-CPDs ist, kann diese die entstandenen *trans-syn*-Schäden nicht besonders gut erkennen und setzt sie daher nur in einer Rate von etwa 1% im Vergleich zu *cis-syn*-Schäden um, was zu den beobachteten Resultaten führt.^[121]

Diese Erkenntnis mindert die Aussagekraft hinter den oben beschriebenen Ergebnissen kaum, da das Ausbleiben von *trans-syn*-Schäden in natürlicher DNA nicht bedeutet, dass dort weniger CPDs würden. Die Energie des Photosensibilisators wird vermutlich trotzdem weitergegeben und auf jeden Fall zu etwa 50 % in *cis-syn*-CPDs umgewandelt. Die andere Hälfte der CPD-Schäden würde in natürlicher DNA durch die Ordnung innerhalb der Doppelhelix ebenfalls als *cis-syn*-Produkt entstehen.

3. Pyo-Modifikation

3.1 Belichtungsexperimente

Die zweite DNA-Modifikation, deren photosensibilisierende Eigenschaften im Zuge dieser Arbeit untersucht wurden, ist 5-Methyl-pyrimidon (Pyo). Dieses verursacht im (6-4)-Schaden eine Absorptionsschulter, die zu höheren Wellenlängen verschoben ist und so Licht im UV-A Bereich absorbiert, um die Energie möglicherweise an benachbarte Pyrimidin-Basen abzugeben. Dadurch kommt es mutmaßlich zur Bildung von CPD-Schäden. In T(6-4)T-Schäden befindet sich diese Absorptionsschulter bei 325 nm, in T(6-4)C-Schäden bei 314 nm.^[62a, 96] Das Chromophor selbst hat eine Absorptionsschulter bei 320 nm.

Anfang der 2010er Jahre wurde diese Modifikation bereits von VENDRELL-CRIADO in der Gruppe von LHIAUBET-VALLET und MIRANDA untersucht. Dabei wurde Pyo allerdings nicht im Kontext eines vollständigen DNA-Hybrids betrachtet, sondern als einzelnes Nukleosid. Die spektroskopischen Messungen zeigten dabei eine Triplet-Energie von 291 kJ/mol, was höher ist als die Triplet-Energie von 270 kJ/mol gestapelter Thymidine in DNA. Zusätzlich war die beobachtete Triplet-Lebenszeit von Pyo mit etwa 10 µs sehr lang und es konnten Emissionslösungsprozesse des Triplet-Zustandes unter Zugabe von Thymidin beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass Pyo zu einer Triplet-Triplet-Energieübertragung auf Thymidine befähigt ist und damit als Photosensibilisator wahrscheinlich CPD-Schäden in DNA erzeugen kann.^[85a] Da Pyo das Chromophor der (6-4)-Photoläsion ist, lassen diese Messungen den Schluss zu, dass dieser Photoschaden weitere CPD-Schäden innerhalb der gleichen Lichtexposition auslöst.^[85b] Dem gegenüber steht die Isomerisierung in das DEWAR-Isomer, was bei einer erneuten Belichtung der (6-4)-Photoläsion mit Licht im UV-A-Spektrum passiert. Dieser Prozess wurde während der Laserexperimente mit Pyo von VENDRELL-CRIADO nicht beobachtet, er tritt aber in nativer DNA auf und könnte daher den Einfluss von Pyo und der (6-4)-Läsion als Photosensibilisator deutlich verringern.^[122] Die Isomerisierung verändert die Absorptionseigenschaften und die Singulett und Triplet-Energie des Chromophors. Die Absorptionsschulter bei höheren Wellenlängen verschwindet, wodurch es nicht mehr zu einer signifikanten Aufnahme von Lichtenergie im UV-A-Spektrum kommt und demnach

keine CPDs außerhalb des Bereiches direkter UV-Absorption der DNA entstehen würden. [62b] Die möglichen Reaktionswege eines (6-4)-Photoschadens sind in Abbildung 47 zusammengefasst.

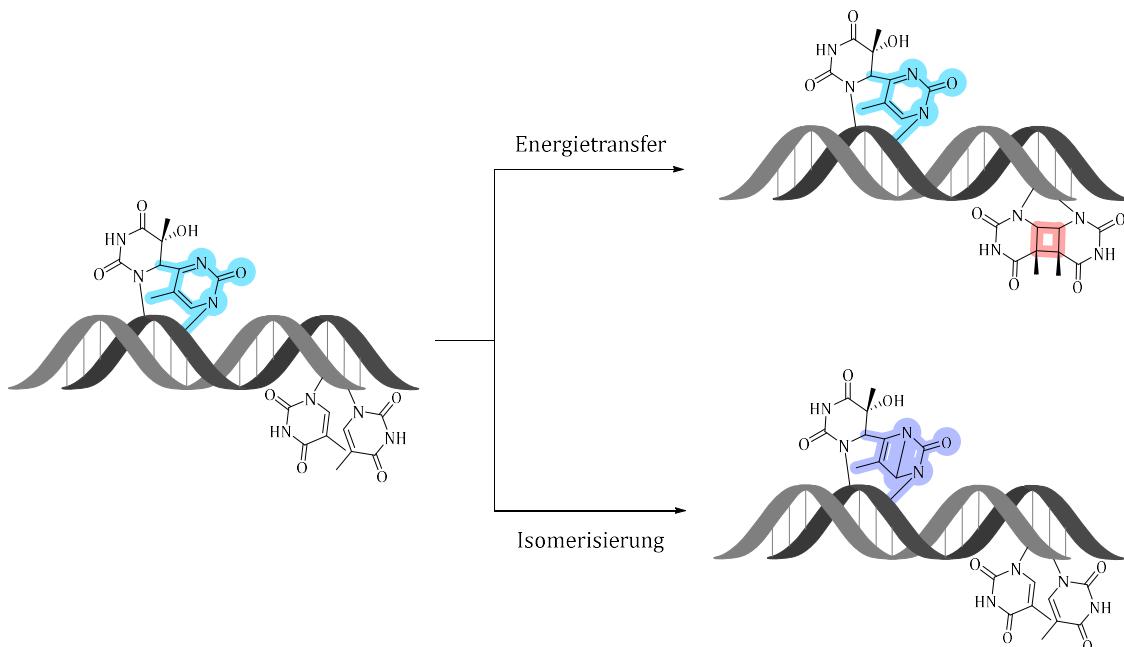


Abbildung 47: Mögliche photochemische Reaktionswege eines (6-4)-Photoschadens, hier beispielhaft T(6-4)T, bei Bestrahlung mit Licht im UV-A Spektrum, oben der Triplet-Triplet-Energietransfer zur CPD Bildung, unten die Isomerisierung in das DEWAR-Isomer.

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von LHIAUBET-VALLET aus Valencia wurde aufbauend auf der Arbeit mit dem Pyo-Nukleosid dessen photochemisches Verhalten in einem Oligonukleotid untersucht. Das synthetisierte Pyo-Phosphoramidit wurde analog zum Vorgehen bei der Untersuchung der Formyl-Modifikationen in einem vollständigen DNA-Strang eingebaut und mit den beiden Gegensträngen zu einem ternären DNA-Doppelstrang hybridisiert. Untersucht wurden zwei DNA-Hybride, eines ohne intervenierende A-T-Paare zwischen Photosensibilisator und Schadensseite und eines mit einem intervenierenden A-T-Paar, was 10.2 Å Entfernung zwischen Photosensibilisator und T-T-Paar entspricht. Als Gegenbase zu Pyo wurde auf Grund der bereits beschriebenen Reparaturprozesse durch Guanosin die Base Adenosin verwendet (Abbildung 48).

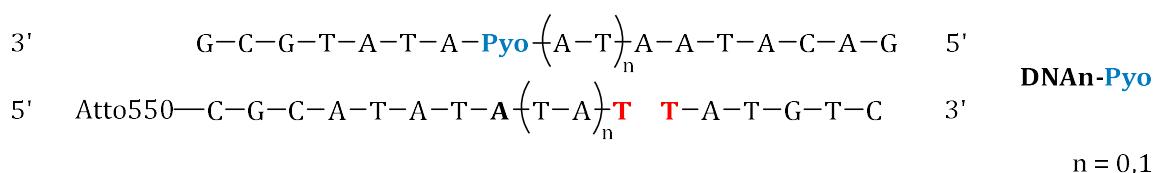


Abbildung 48: Verwendetes DNA-Hybrid mit der Modifikation Pyo als Photosensibilisator, Adenosin als Gegenbase und $n = 0-1$ A-T-Paare (0-4 Basen) zwischen dem Photosensibilisator und der Schadensstelle **DNAn-Pyo**.

Belichtungsexperimente

Die Proben wurden mit einer 325 nm LED für maximal 6 h belichtet und anschließend über analytische RP-HPLC untersucht. In den Analysen ist zu erkennen, dass kaum CPD-Schäden entstehen. Die CPD-Ausbeute des Hybrides **DNA0-Pyo** beträgt lediglich $1 \pm 0.5\%$, die des Hybrides **DNA1-Pyo** liegt bei $2 \pm 1\%$. Diese Werte sind deutlich zu niedrig, um von Pyo als Photosensibilisator für die Bildung von CPD-Schäden sprechen zu können (Abbildung 49).

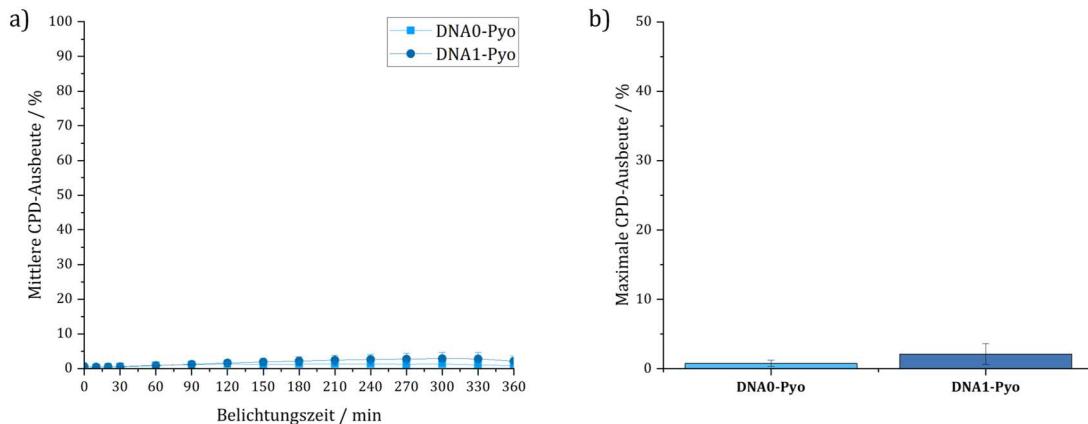


Abbildung 49: a) CPD-Ausbeute der Pyo-DNA-Hybride im Verlauf über 6 h Belichtungszeit; b) Die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride.

Um den Grund für diese Ergebnisse zu erfahren, wurde erneut das Chromatogramm der Absorptionsdetektion bei 260 nm betrachtet. Hier ist erkennbar, dass sich die Absorption des Photosensibilisatorstranges während der Belichtung verändert. Innerhalb von etwa 150 min flacht die Absorption des Pyo-Stranges bei 12.8 min vollständig ab und bei höheren Retentionszeiten von etwa 13.5 min entstehen neue Peaks (Abbildung 50).

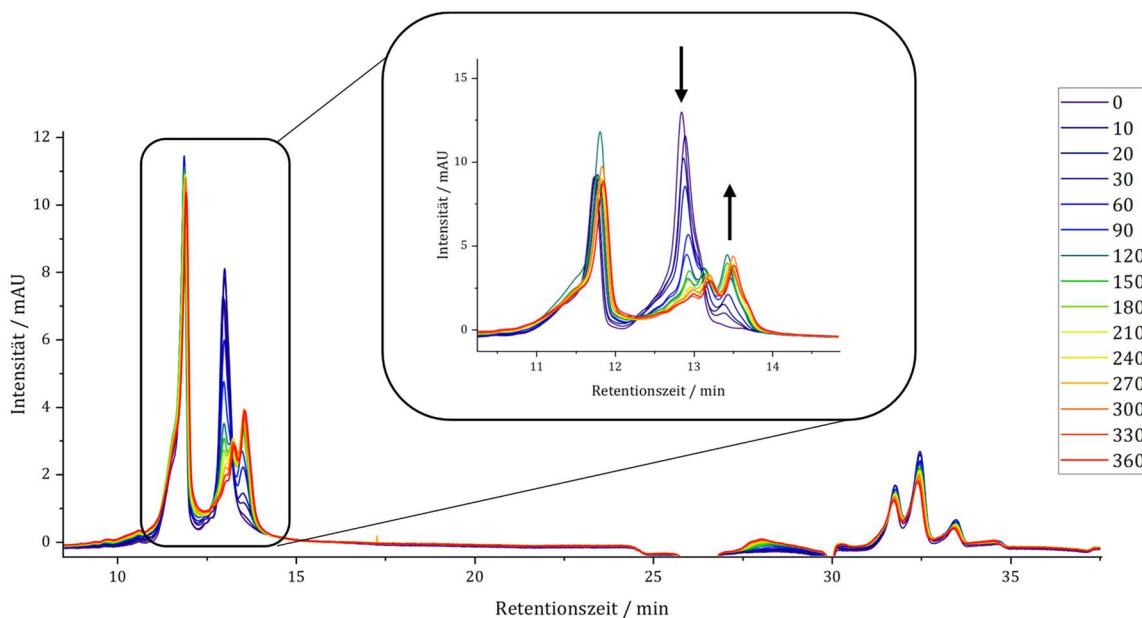


Abbildung 50: RP-HPLC Analysen nach Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (6 h) bei Detektion der Absorption bei 260 nm der Pyo-DNA-Hybride beispielhaft mit **DNA0-Pyo**: Bei 11.7 min 6-mer Strang, 12.8 min Pyo Strang, 13.5 min neues Maximum des umgesetzten Pyo-Stranges, 29 min Crosslinks, 33 min Atto-markierter Gegenstrang.

Ebenfalls auffällig ist das gänzliche Verschwinden der für Pyo charakteristischen Peaks bei der Detektion der Absorption bei 320 nm in den Chromatogrammen innerhalb von 6 h (Abbildung A 7). Die DNA-Hybride wurden daher mittels LC-ESI-MS untersucht. Die dem Pyo-Strang zugehörigen Massen wiesen dabei keine Veränderung auf (Abbildung SI 78). Die verminderte Peakintensität bei der Detektion der Absorption bei 320 nm sowie die leicht unterschiedliche Retentionszeit in allen Chromatogrammen mit der unveränderten Masse des Stranges weisen daher deutlich auf die Isomerisierung der Pyo-Modifikation in das DEWAR-Isomer hin. Diese Umwandlung erfolgt in vollständigen DNA-Strängen deutlich schneller als die Energieübertragung auf ein benachbartes Thymidin-Paar zur Generierung von CPD-Schäden.

Der Hauptunterschied im Vergleich zu den Experimenten von VENDRELL-CRIADO ist die Verwendung eines ternären DNA-Hybrids. Dieses scheint die Eigenschaften von Pyo hin zu einer bevorzugten Isomerisierung in das DEWAR-Isomer zu verändern. In quantenmechanischen Berechnungen konnte bereits gezeigt werden, dass der Schnittpunkt der Energiepotentialflächen, der zur Reaktion in das DEWAR Isomer führt, maßgeblich durch das Phosphatrückgrat beeinflusst ist.^[123] Wird demnach in der Untersuchung von Pyo als Photosensibilisator nur ein Nukleosid ohne Phosphatrückgrat betrachtet, wird der Energietransfer der Isomerisierung vorgezogen. Das spiegelt allerdings nicht die Situation in nativer DNA wider. Zusätzlich hat die Geometrie

innerhalb eines DNA-Stranges auch Auswirkungen auf die Singulett- und Triplet-Energie sowie die jeweiligen Lebenszeiten von Pyo. Daher galt es, diese näher zu untersuchen.

Was in den Chromatogrammen der RP-HPLC zusätzlich auffällt, ist die vergleichsweise hohen Ausbeuten an *Crosslinks* in den Pyo-Hybridn. Diese belaufen sich auf etwa $7 \pm 1\%$ für **DNA0-Pyo** und $8 \pm 1\%$ für **DNA1-Pyo** (Abbildung 51 unten). Im Vergleich dazu waren *Crosslinks* in den formylmodifizierten DNA-Hybridn nur mit maximalen Ausbeuten von 3 % zu sehen. Das *Crosslink* Produkt ist erneut im Chromatogramm bei der Detektion der Fluoreszenz bei 576 nm erkennbar und weist eine kürzere Retentionszeit als das CPD-Produkt und der Atto-markierte Eduktstrang auf. In der LC-ESI-MS-Analyse können die Massen-Ladungsverhältnisse des Peaks einem Produkt zugeordnet werden, das auf die Reaktion des Atto-markierten Stranges mit dem Pyo-Strang hinweist (Abbildung 51 oben, Abbildung SI 81).

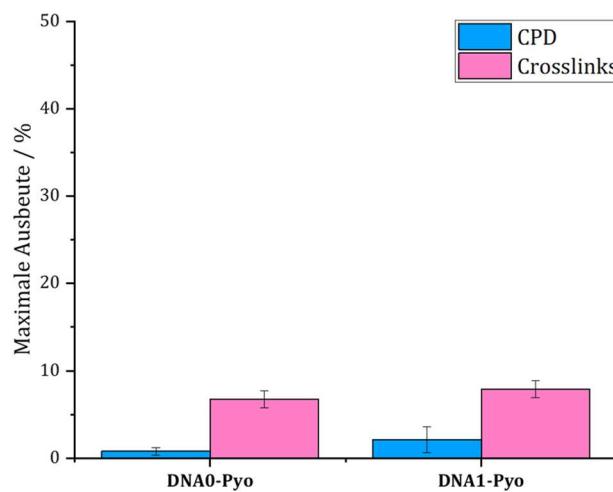
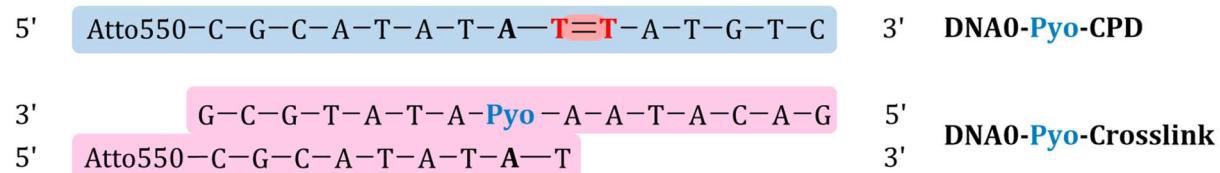


Abbildung 51: Maximale CPD-Ausbeute der DNA-Hybride **DNA0-Pyo** und **DNA1-Pyo** und der korrespondierende CPD-Strang (blau) sowie maximale *Crosslink*-Ausbeute für **DNA0-Pyo** und **DNA1-Pyo** mit vorgeschlagener Zusammensetzung der *Crosslink*-Stränge (pink).

Bei der Untersuchung des Pyo-Nukleosids wurde festgestellt, dass dieses zur Umwandlung von Triplet- in Singulett-Sauerstoff befähigt ist.^[85a] Da die DNA-Pyo-Hybride vorher mit Argon durchströmt wurden, sind ROS-Produkte in diesen Analysen

nicht zu sehen. Die Bildung von Singulett-Sauerstoff und HO-Radikalen könnte allerdings ein Hinweis auf Radikalreaktionen sein, die durch Pyo ausgelöst werden können. Durch eine Radikalreaktion zwischen den beiden langen Oligonukleotiden könnte es auch zur Verknüpfung dieser und den resultierenden hohen Ausbeuten der *Crosslink*-Produkte gekommen sein.

3.2 Spektroskopische Untersuchungen

Um die Resultate aus den Belichtungsexperimenten besser verstehen zu können, wurde das Pyo-Oligonukleotid spektroskopisch näher untersucht. Verwendet wurde dafür **DNA0-Pyo-a**, also das Oligonukleotid ohne zusätzliche A-T-Paare (Abbildung 52 links). Da für die Messungen jeweils andere Geräte verwendet wurden als vor 10 Jahren, wurden die Ergebnisse von VENDRELL-CRIADO ebenfalls reproduziert.^[85a] Abweichend wurde hierfür das DMT-geschützte Nukleosid **11** verwendet (Abbildung 52 rechts).

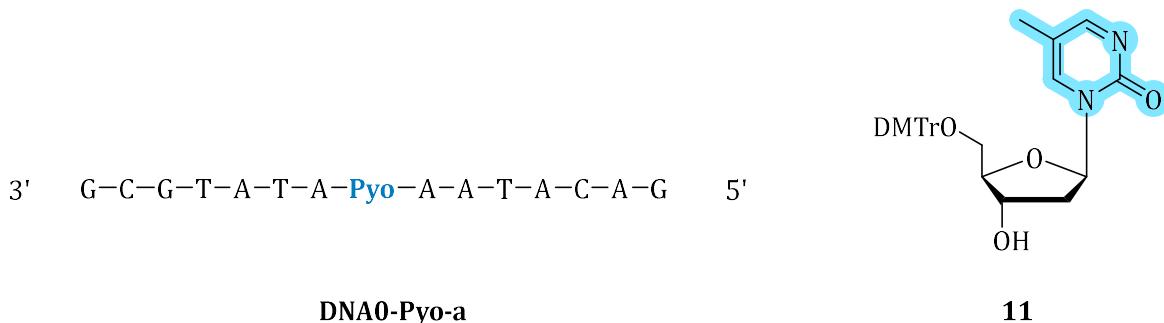


Abbildung 52: Das **DNA0-Pyo-a** Oligonukleotid und das DMT-geschützte Nukleosid **11** für die spektroskopischen Untersuchungen.

Um die Singulett- und Triplett-Energie des in einem Oligonukleotid befindlichen Pyo und des geschützten Nukleosids zu berechnen, wurden Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-Spektren von **DNA0-Pyo-a** und **11** aufgenommen. Das Fluoreszenzspektrum der DNA weist ein Maximum bei 380 nm auf, während das Maximum des geschützten Nukleosids mit 388 nm leicht rotverschoben ist. Die Maxima der Phosphoreszenzspektren sind im Vergleich zur Fluoreszenz deutlich bathochrom verschoben. Für **DNA0-Pyo-a** ist das Maximum bei etwa 457 nm zu finden, für **11** befindet es sich bei 459 nm und weist damit keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 53).

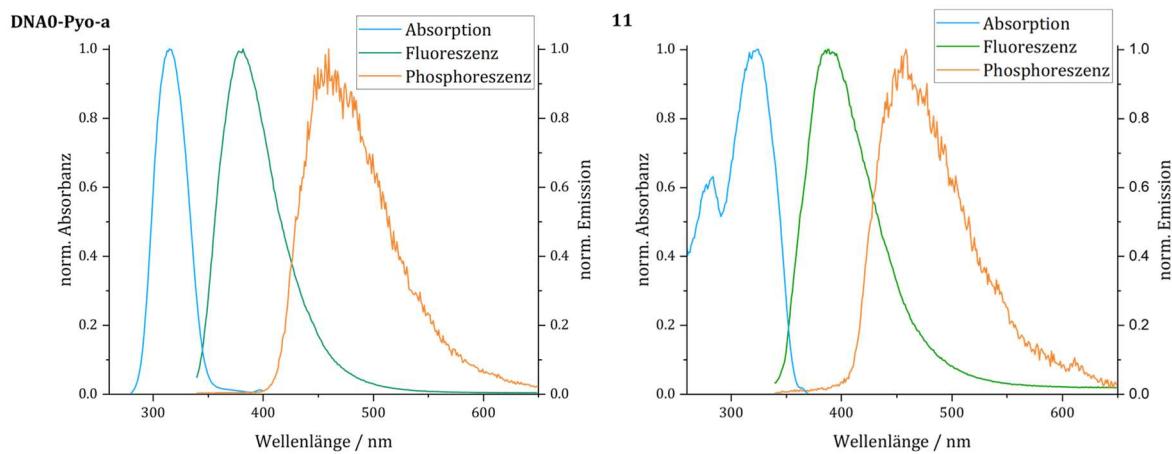


Abbildung 53: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von **DNA0-Pyo-a** (links) und **DMT-Pyo** (rechts), mit einer 43 μM DNA-Lösung und einer 191 μM Lösung von **11** für die Fluoreszenzspektroskopie und einer 214 μM DNA-Lösung sowie einer 200 μM Lösung von **11** in der Phosphoreszenzspektroskopie, jeweils in ddH₂O.

Um aus den gemessenen Emissionsspektren die Singulett-Energie berechnen zu können, wurden außerdem Anregungsspektren des Pyo-Oligonukleotids und Pyo-Nukleosids aufgenommen. Der Schnittpunkt der normierten Anregungs- und Emissionsspektren entspricht in etwa der HOMO-LUMO Lücke, wodurch die Singulett-Energie berechnet werden konnte. Diese beträgt für das im Oligonukleotid befindliche Pyo etwa 339 kJ/mol. Im Vergleich dazu ist die Singulett-Energie des Nukleosids **11** mit 347 kJ/mol etwas höher.

Die Triplet-Energie wurde unter Verwendung der Phosphoreszenzspektren berechnet, welche keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Beide Maxima lagen jeweils bei etwa 460 nm. Die jeweiligen Triplet-Energien zeigten allerdings größere Unterschiede. Mit einer Triplet-Energie von etwa 294 kJ/mol müsste **11** einen Triplet-Triplet-Energietransfer auf ein benachbartes Thymidin-Paar auslösen können. In einem Oligonukleotid wies Pyo allerdings, ähnlich wie die natürlichen DNA-Basen, durch Stapelungsinteraktionen eine verringerte Triplet Energie von 280 kJ/mol auf. Sie ist damit zwar immer noch etwas höher als die Triplet-Energie von in DNA befindlichem Thymidin, allerdings ist die Energieübertragung so deutlich mehr von den umliegenden Basen abhängig. Frühere Studien im Arbeitskreis WAGENKNECHT mit einem Triphenylen ($E_T = 279 \text{ kJ/mol}$) als Photosensibilisator haben ergeben, dass sich die Energiebarriere von 270 kJ/mol für Thymidine wahrscheinlich nur auf direkt benachbarte Thymidin-Paare bezieht. Befinden sich andere Basen wie Adenosin zwischen dem Photosensibilisator und dem Thymidin-Paar, wurde keine Energieübertragung mehr

beobachtet.^[101] Es könnte also angenommen werden, dass dieser Effekt auch bei Pyo als Photosensibilisator auftritt, da dieses eine ähnliche Triplet-Energie aufweist.

Um die Möglichkeiten eines Energietransfers näher zu untersuchen, wurden die Lebenszeiten der Singulett- und Triplet-Zustände gemessen. Die Singulett-Lebenszeit des Pyo-Oligonukleotids befindet sich dabei mit etwa 1.6 ns in einem ähnlichen Bereich wie die des Nukleosids **11** (809 ps). Da bei ersterem der Standard (Ludox) nicht gut genug mit dem gemessenen Spektrum überlagerte, konnte das Lampenspektrum nicht vollständig rechnerisch entfernt werden, was zu einem hohen Fehlerbereich in der Berechnung der Singulett-Lebenszeit von **DNA0-Pyo-a** führt. Durch die hohe Ungenauigkeit kann näherungsweise davon ausgegangen werden, dass die jeweiligen Lebenszeiten ähnlich lang sind (Abbildung 54).

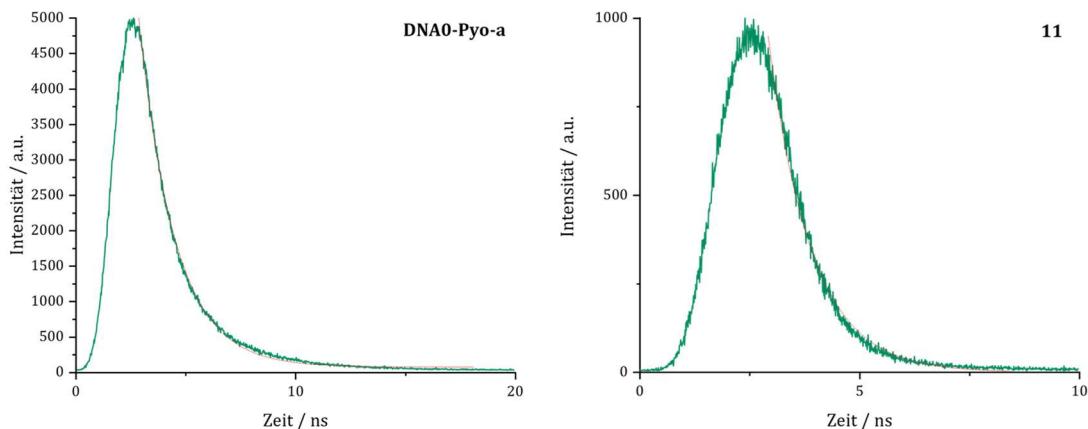


Abbildung 54: Fluoreszenzlebenszeit berechnet durch den exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität über 20 ns, links mit einer 43 µM Lösung von **DNA0-Pyo-a**, rechts mit einer 191 µM Lösung von Nukleosid **11**.

Bei der Messung der transienten Absorptionsspektren von **DNA0-Pyo-a** durch Laser-Flash-Photolyse wurde eine transiente Spezies bei 420 nm nachgewiesen. Diese wurde jeweils unter Stickstoff-Atmosphäre untersucht und anschließend mit Luft bzw. Sauerstoff durchströmt. In der Regel ist dadurch das Verschwinden der Triplet-Spezies zu beobachten, da die Emission durch Sauerstoff gelöscht wird. Für **DNA0-Pyo-a** war diese Emissionslöschung allerdings nach dem Durchströmen mit Luft nicht zu erkennen. Auch nach dem Durchströmen der Lösung mit Sauerstoff für etwa 10 min ist die Emissionslöschung nicht eindeutig sichtbar (Abbildung 55).

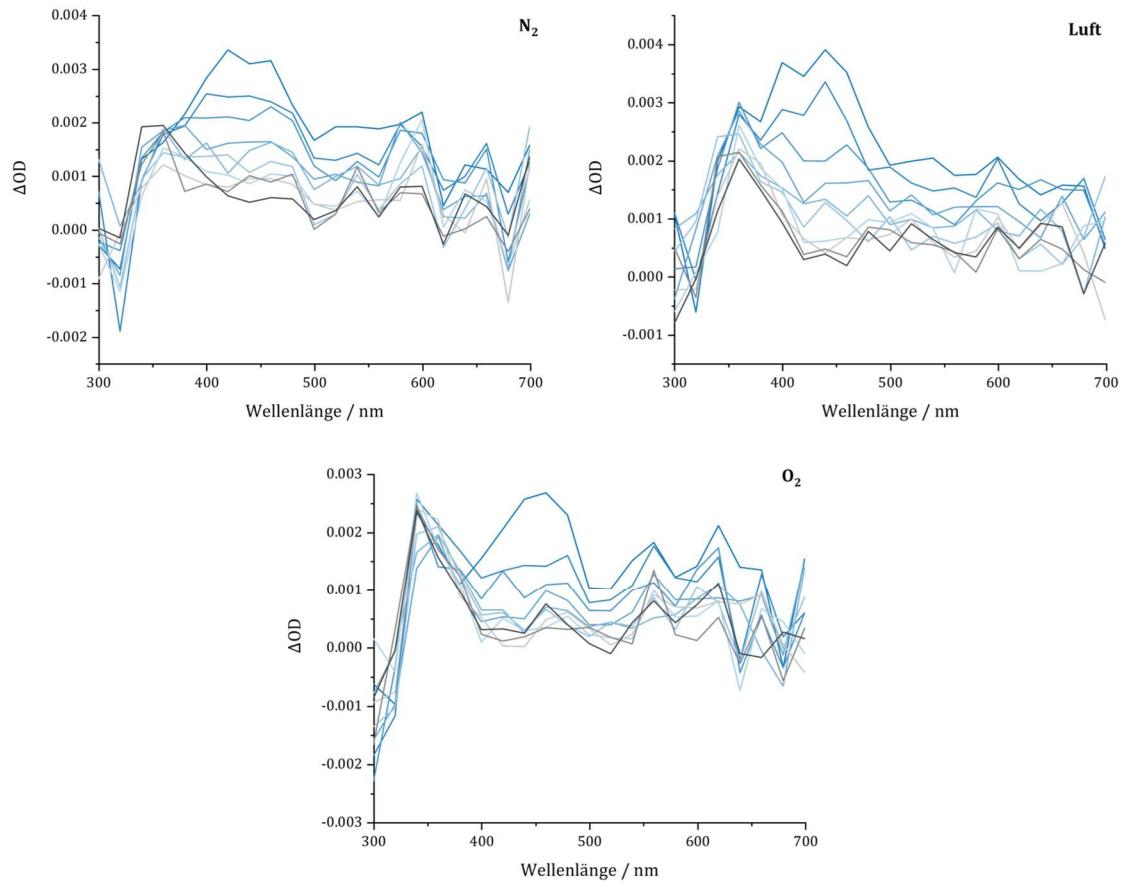


Abbildung 55: Transiente Absorptionsspektren von **DNA0-Pyo-a** unter Stickstoff Atmosphäre (links), Luft (rechts) und Sauerstoff-Atmosphäre (unten) von 0.5 bis 2.3 μ s unter Verwendung einer 420 μ M Lösung.

Die nicht sichtbare Emissionslöschung könnte an einer verkürzten Triplett-Lebenszeit von Pyo innerhalb eines Oligonukleotids liegen. Der Emissionslöschungsprozess wäre demnach nur noch bei der Untersuchung transienter Spezies kürzerer Lebenszeit (fs-ps-Bereich) zu erkennen. Die Messung im μ s-Bereich kann diesen Effekt nicht mehr abbilden.

Bei der Messung von **11** ist ebenfalls eine transiente Spezies bei 420 nm zu erkennen, in diesem Fall tritt allerdings bereits durch das Durchströmen mit Luft für etwa 10 min eine vollständige Emissionslöschung ein (Abbildung 56).

Belichtungsexperimente

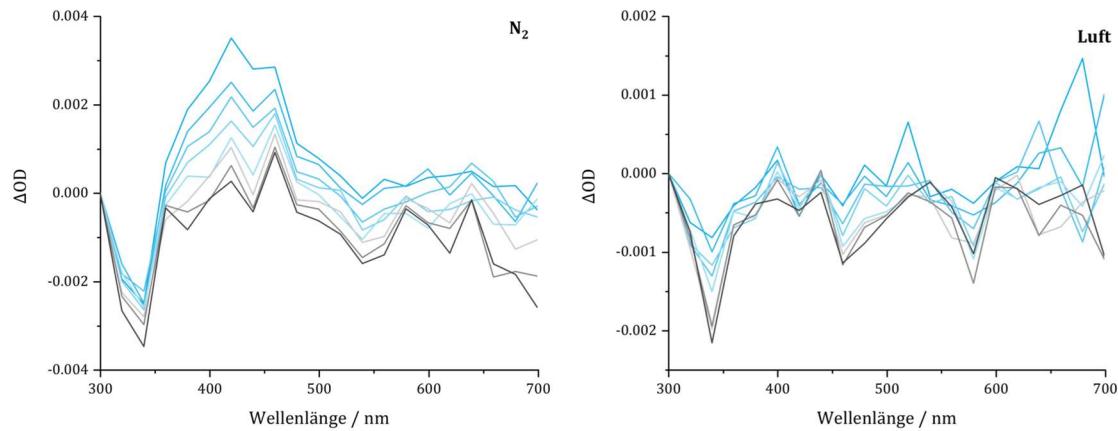


Abbildung 56: Transiente Absorptionsspektren von **11** unter Stickstoff Atmosphäre (links) und Luft (rechts), von 2 bis 10.7 μ s unter Verwendung einer 450 μ M Lösung.

In der anschließend gemessenen Triplett-Lebenszeit waren erneut größere Unterschiede zu erkennen. Das Nukleosid **11** wies mit 21.1 μ s eine relativ lange Triplett-Lebenszeit auf, was für eine hohe Wahrscheinlichkeit des Triplett-Triplett-Energietransfers spricht. Dagegen verringert sich die Triplett-Lebenszeit in einem vollständigen Strang, **DNA0-Pyo-a**, auf etwa 970 ns (Abbildung 57).

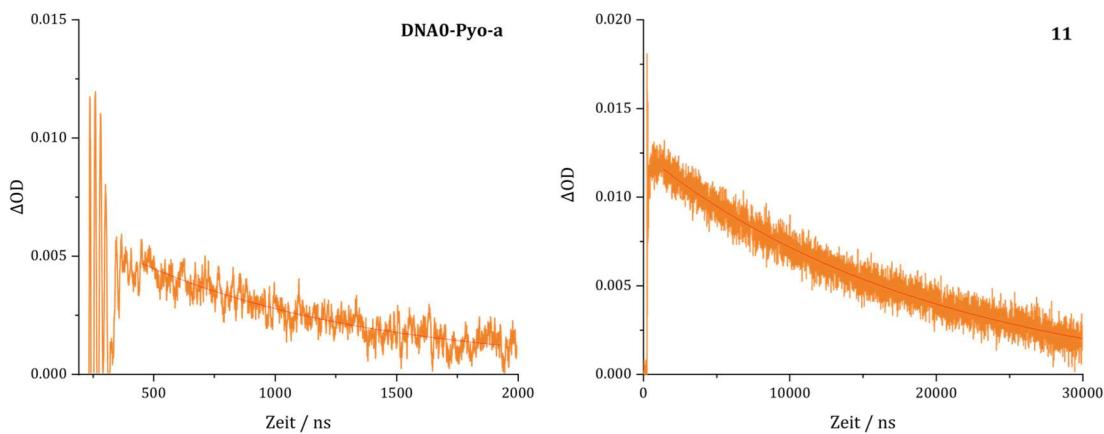


Abbildung 57: Triplett-Lebenszeiten von **DNA0-Pyo-a** zwischen 0.4 bis 2 μ s (links) und **DMT-Pyo** zwischen 0.4 bis 30 μ s (rechts) jeweils bei einer Absorbanz von 420 nm.

Das unterstützt die in den Emissionslöschungsexperimenten aufgestellte These, dass im Fall eines Pyo-Oligonukleotids keine Löschung durch Sauerstoff sichtbar ist, da der Triplett-Zustand deutlich kürzere Lebenszeiten aufweist. Der Triplett-Triplett-Energietransfer ist mit einer verkürzten Lebenszeit zwar noch immer möglich, wird allerdings unwahrscheinlicher, da die transiente Spezies schneller in den Grundzustand zurück gelangt.

Spektroskopisch zeigt sich, dass es einen großen Unterschied macht, ob Pyo als Nukleosid oder als Teil eines vollständigen DNA-Stranges untersucht wird. Die Erniedrigung der Triplett-Energie und die kürzere Triplett-Lebenszeit innerhalb eines Oligonukleotids haben dabei einen großen Einfluss auf das Potential als Photosensibilisator Energie auf Thymidine zu übertragen. Die restlichen DNA-Basen in einem vollständigen Strang setzen durch Basen-Stapelungseffekte die Triplett-Energie von Pyo und daher wahrscheinlich auch die des (6-4)-Photoschadens herab und schützen so gewissermaßen die Integrität der gespeicherten Informationen. Zusätzlich spielt das Phosphatrückgrat der DNA eine wichtige Rolle. Dieses sorgt für die effiziente Umwandlung von Pyo in das DEWAR-Isomer und verhindert damit ebenfalls die Energieübertragung des (6-4)-Photoschaden-Chromophors für die Produktion weiterer CPDs.^[124]

In nativer DNA ist, anders als in den Belichtungsexperimenten mit den in dieser Arbeit besprochenen Oligonukleotiden, keine vollständige Umwandlung von (6-4)-Schäden in das DEWAR-Isomer zu beobachten. Diese Isomerisierung scheint die DNA jedoch entscheidend vor der Produktion von mehr CPDs zu schützen. (6-4)-Photoprodukte werden in nativer DNA etwa 8-mal seltener gebildet als CPDs. Genaue Ausbeuten sind dabei abhängig von der umliegenden Basensequenz.^[61] Die trotz hoher Umsatzeffizienz in DNA deutlich selteneren DEWAR-Isomere sind dadurch zu erklären, dass seltene (6-4)-Photoprodukte von einem Photon geeigneter Wellenlänge (etwa 315 nm) angeregt werden müssen, um in das DEWAR-Isomer umgewandelt werden zu können. Sobald dies der Fall ist, findet die Isomerisierung mit hoher Effizienz innerhalb von etwa 130 ps statt und steigt mit steigender Lichtintensität.^[51]

Die Energieübertragung durch Pyo oder (6-4)-Photoschäden auf Thymidine als Konkurrenzreaktion der Entstehung des DEWAR-Isomers bei der Einstrahlung von UV-A-Licht scheint deutlich weniger effizient zu sein. Triplett-Triplett-Energieübertragungen sind ebenfalls sehr schnelle Prozesse, die häufig innerhalb weniger Pikosekunden ablaufen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigen allerdings, dass diese trotzdem nicht mit der Isomerisierung konkurrieren können. Das mutagene DEWAR-Isomer scheint ausreichend vor Energietransfer-Prozessen zu schützen. In der Betrachtung nativer DNA könnte es allerdings zusätzlich einen Unterschied machen, statt der Modell-Verbindung Pyo einen vollständigen (6-4)-Photoschaden zu untersuchen. Dieser weist eine andere räumliche Geometrie auf, wodurch die photophysikalischen

Belichtungsexperimente

Eigenschaften beeinflusst werden könnten. Trotzdem weisen diese Ergebnisse klar auf die fehlende Eigenschaft des Photoschadens hin, weitere CPD-Schäden zu induzieren. Die Belichtungsexperimente deuten durch die hohe Ausbeute an *Crosslinks* zusätzlich auf sekundäre Elektronentransferprozesse hin, die bei der Bestrahlung des Chromophors der (6-4)-Läsion vonstattengehen, unabhängig von der Photosensibilisierung und der Isomerisierung.

4. Pheomelaninmonomer-Derivat

Die Untersuchung des gewählten Derivates des Pheomelanin-Monomers beruht auf der Beobachtung, dass es bei Menschen mit hohem Pheomelanin-Anteil häufig zu Hautkrebs kommt. Im Vergleich dazu sollen Melanin-Polymerne mit hohem Eumelanin-Anteil insgesamt besser vor der Einstrahlung von UV-Licht schützen.^[89] Verantwortlich gemacht wird dabei neben dem breiteren Absorptionsspektrum von Eumelanin unter anderem die photochemische Umwandlung des Benzothiazins in Pheomelanin zu Benzothiazol (Abbildung 58).

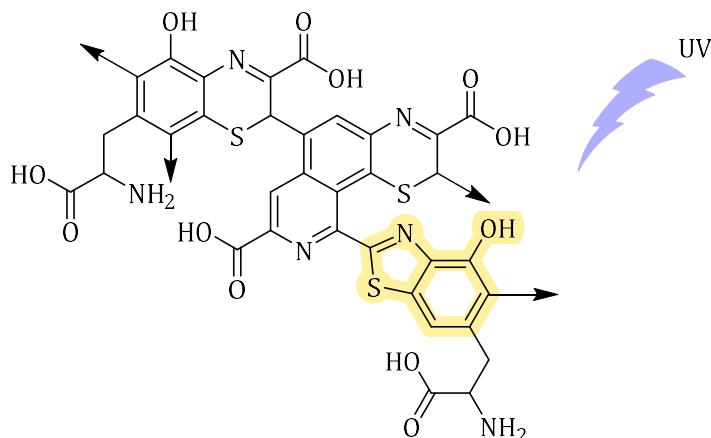


Abbildung 58: Durch UV-A Licht in die Benzothiazol-Form umgewandeltes Pheomelanin in einem Polymer mit Pfeilen als Indikation für die Verknüpfung weiterer Monomere.

Benzothiazol soll nach dem Abbau des Melanin-Polymeres dazu in der Lage sein, die Zellwand zum Zellkern zu passieren und als Photosensibilisator Schäden an der DNA zu verursachen.^[90] Bisher wurden im Zuge dessen vor allem Radikalspezies und reaktive Sauerstoffspezies untersucht, die photochemisch durch das Benzothiazol-Monomer entstehen.^[98] Mit dem Einbau eines Pheomelaninmonomer-Derivates in DNA werden dagegen Untersuchungen über die direkte Energieübertragung von Pheo auf die DNA möglich.

Hierzu wurden analog zu dem Vorgehen mit Pyo zwei DNA-Stränge mit dem modifizierten Pheomelaninmonomer-Derivat Pheo als Photosensibilisator hergestellt und mit der bereits vorgestellten DNA-Architektur untersucht. Erneut wurden für die Belichtungsexperimente ein DNA-Strang ohne A-T-Paare zwischen Photosensibilisator und Schadenseite untersucht und ein DNA-Strang mit einer zwischengeschalteten A-T-Basenabfolge, also mit etwa 10.2 Å Entfernung zwischen Pheo und dem T-T-Paar. Als

Gegenbase wurde erneut Adenosin gewählt, um die direkten CPD-Reparaturprozesse durch Guanosin zu umgehen (Abbildung 59).

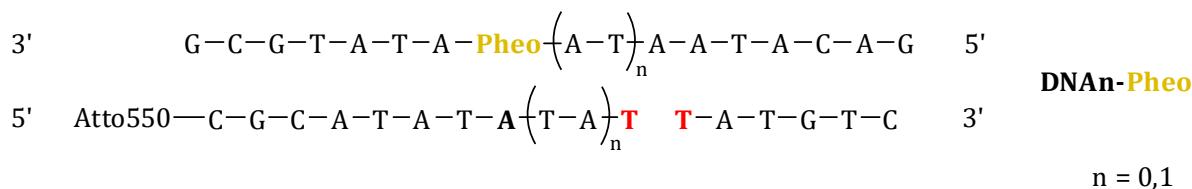


Abbildung 59: Verwendetes DNA-Hybrid mit der Modifikation Pheo als Photosensibilisator, Adenosin als Gegenbase und $n = 0\text{--}1$ A-T-Paar (0-4 Basen) zwischen dem Photosensibilisator und der Schadensstelle **DNA_n-Pheo**.

Das Pheomelaninmonomer-Nukleosid **18** selbst weist eine Absorptionsschulter bei 302 nm auf, welche allerdings bis ca. 330 nm in den UV-A Bereich hineinragt. Daher konnte in diesem Fall eine 325 nm LED für die Belichtungen verwendet werden (Abbildung 60).

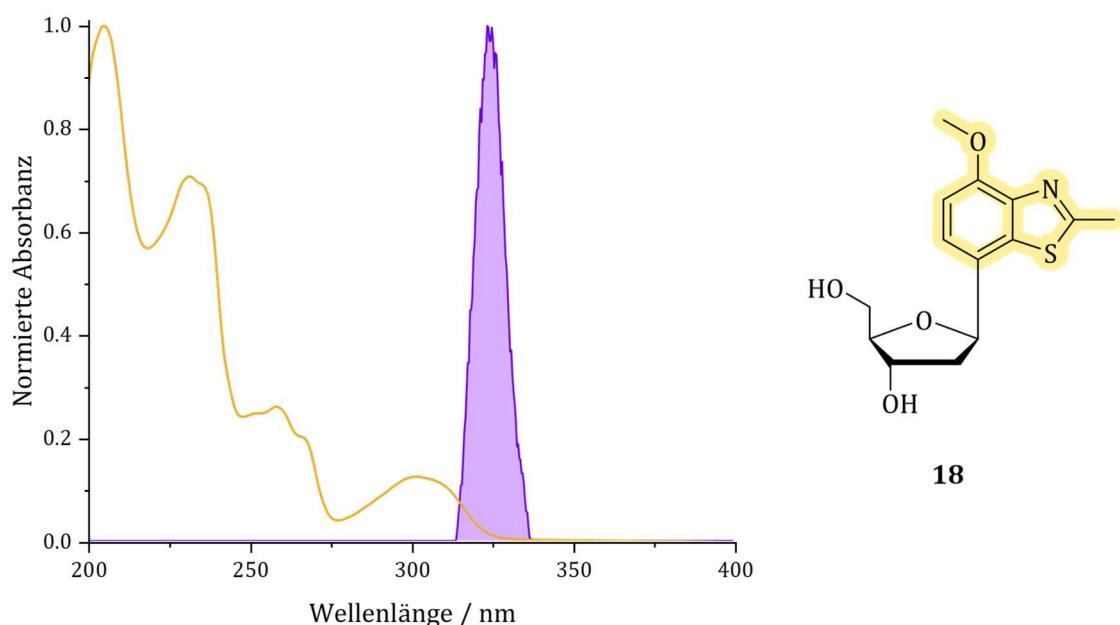


Abbildung 60: Normierte Absorbanz des Nukleosids **18** (gelb, rechts) und die verwendete LED bei 325 nm (lila)

In **DNA0-Pheo** ist in den Chromatogrammen ein sehr starker Anstieg der CPD-Ausbeute auf etwa 30 % innerhalb von 90 min Belichtung zu sehen. Danach stagniert die CPD-Ausbeute allerdings bis nach 240 min Belichtung und fällt nach 6 h auf etwa 27 % ab (Abbildung 61, orange).

Mit einem intervenierenden A-T-Paar in **DNA1-Pheo** kommt es dagegen nicht zu einem rapiden Anstieg an CPD-Schäden innerhalb der ersten 1.5 h. In diesem Fall ist ein gradueller Anstieg zu beobachten, der allerdings über die in **DNA0-Pheo** beobachtete

maximale CPD-Ausbeute von 30 % hinausgeht. Der nichtlineare Verlauf der CPD-Bildung lässt zwar auch hier auf Reparaturprozesse durch Guanosin schließen, ein vollständig eingestelltes Gleichgewicht ist in **DNA1-Pheo** allerdings nicht sichtbar. Stattdessen kommen gegen Ende der Belichtung immer weniger Schäden hinzu. Am Belichtungsende von 6 h sind CPD-Ausbeuten von etwa 46 % zu verzeichnen (Abbildung 61, gelb).

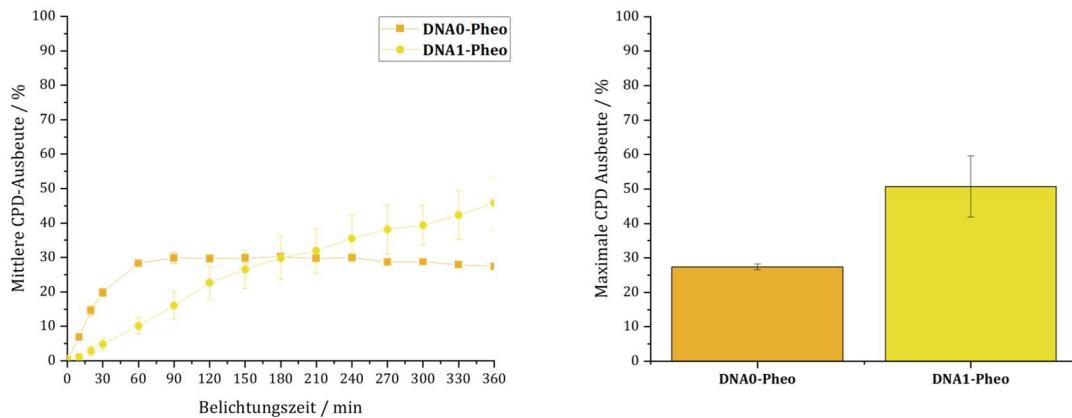


Abbildung 61: CPD-Ausbeuten der Pheo-DNA-Hybride **DNA_n-Pheo** im Verlauf über 6 h Belichtungszeit (links) und die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride (rechts).

Der Verlauf der CPD-Schadensbildung in **DNA0-Pheo** könnte auf den Reparaturprozess durch Guanosin hinweisen, welche, obwohl sie sich nicht in direkter Nachbarschaft zum CPD-Schaden befinden, die Ausbeute deutlich hemmen könnten. Ebenfalls möglich wäre ein Reparaturprozess durch den Photosensibilisator selbst, welcher in direkter Nähe zu dem entstandenen CPD ein Elektron auf den Schaden übertragen könnte. Auch dies würde zur Öffnung des Schadens führen. Zwischen 60 min und 90 min Belichtung stellt sich ein Gleichgewicht zwischen neu entstehenden CPD-Schäden und ihrer Öffnung ein, wobei die Öffnung der Schäden so gut funktioniert, dass die CPD-Schäden bis zum Ende der Belichtung nach 6 Stunden um etwa 3 % reduziert werden können.

Der graduelle Schadensanstieg in **DNA1-Pheo** könnte darauf hinweisen, dass durch die intervenierenden A-T-Basen kein Reparaturprozess durch den Photosensibilisator selbst stattfinden kann oder aber der Reparaturprozess durch Guanosin schlechter funktioniert. Der weniger starke Anstieg der CPD-Ausbeute innerhalb der ersten 90 min zeigt, dass die Energieübertragung in **DNA1-Pheo** weniger effizient ist als in **DNA0-Pheo**. Demnach könnten auch die Reparaturprozesse langsamer sein, was die erhöhten Ausbeuten bei größerem Abstand zwischen Photosensibilisator und Schadenseite erklärt. Um diese

Theorien zu validieren, ist allerdings eine genauere Untersuchung der Art der Energieübertragung durch Pheo nötig.

Ebenfalls auffällig ist erneut die Entstehung von *Crosslink* Produkten. Diese sind analog zu den Beobachtungen der anderen Photosensibilisatoren bei kürzeren Retentionszeiten als das CPD-Produkt und der Atto-markierte Eduktstrang zu finden. In den **DNA0-Pheo**-Hybriden entstehen sie mit einer maximalen Ausbeute von etwa 7.5 %, für **DNA1-Pheo** belaufen sich die maximalen Ausbeuten auf etwa 5 % (Abbildung A 8). Damit lassen sich diese Verbindungen in größeren Mengen nachweisen als in den formylmodifizierten DNA-Hybriden, jedoch nicht so häufig wie in den Pyo-DNA-Hybriden. Zusätzlich zu den *Crosslink* Produkten ist auch eine stärkere Fluoreszenzbleichung des Atto-Farbstoffes zu beobachten. Beides könnte auf sekundäre photophysikalische Prozesse hinweisen, die über die Energieübertragung als Photosensibilisator hinaus gehen. Es könnte trotz der verwendeten Methoxy-Gruppe statt der natürlichen Hydroxid-Funktion zur Bildung von Radikalen gekommen sein. Diese Radikale könnten der Auslöser sowohl für die beobachtete *Crosslink* Bildung als auch für die Fluoreszenzbleichungsprozesse sein.

Die Analyse der Belichtungsexperimente mittels RP-HPLC bestätigt die Vermutung, dass Benzothiazol-Einheiten, wie sie in Pheomelanin vorkommen, als Photosensibilisator Energie auf DNA-Basen übertragen. Für eine genauere Analyse über die zugrundeliegenden Energietransferprozesse ist es allerdings erforderlich, noch weitere DNA-Hybride mit steigender Anzahl an A-T-Paaren zwischen dem Photosensibilisator und der Schadenseite zu untersuchen. Erst dann ist eine Aussage über mögliche DEXTER-, FÖRSTER- und Energy-Hopping-Energietransferprozesse möglich.

Die beschriebenen Experimente liefern einen Grundstein für die weitere Untersuchung von Benzothiazol-Derivaten als Photosensibilisatoren und weisen auf das photochemische Potential von Pheomelanin in der Diskussion um Hautkrebs in Menschen mit heller Haut hin.

VI. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier unterschiedliche Nukleoside synthetisch in DNA-Stränge eingefügt. Anschließend wurden sie belichtet und analysiert, um zu untersuchen, ob sie als „natürliche“ Photosensibilisatoren Energie an DNA-Basen übertragen und so CPD-Schäden auslösen können. Bei den untersuchten Photosensibilisatoren handelt es sich um die epigenetische Modifikation fdC, den oxidativen Schaden fdU, das Chromophor des (6-4)-Photoschadens, Pyo, und ein Derivat des Benzothiazol-Bausteins in Pheomelanin, Pheo (Abbildung 62 oben). Verwendet wurde für die Analyse eine DNA-Architektur mit fehlendem Phosphatrückgrat zwischen zwei benachbarten Thymidinen, wodurch es bei der Bildung von CPDs zu einer Strangverlängerung um sechs Basen kommt. Diese konnte anschließend durch RP-HPLC und PAGE analysiert werden. Die verwendeten DNA-Stränge sind in Abbildung 62 aufgelistet.

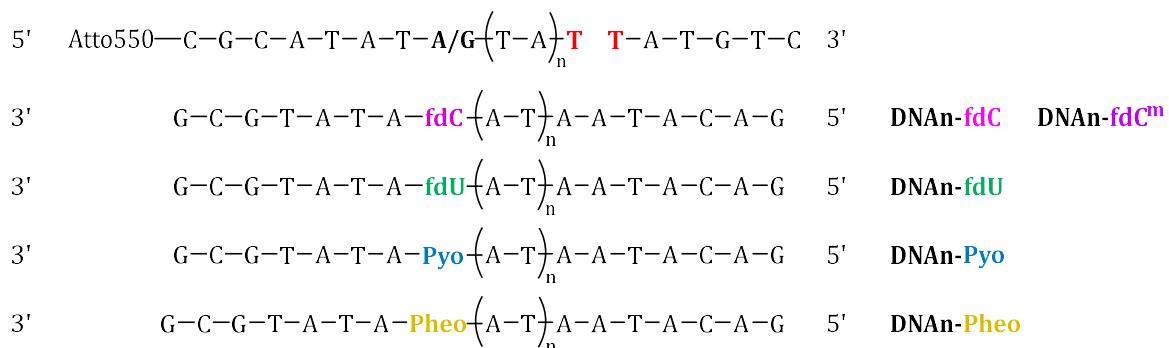
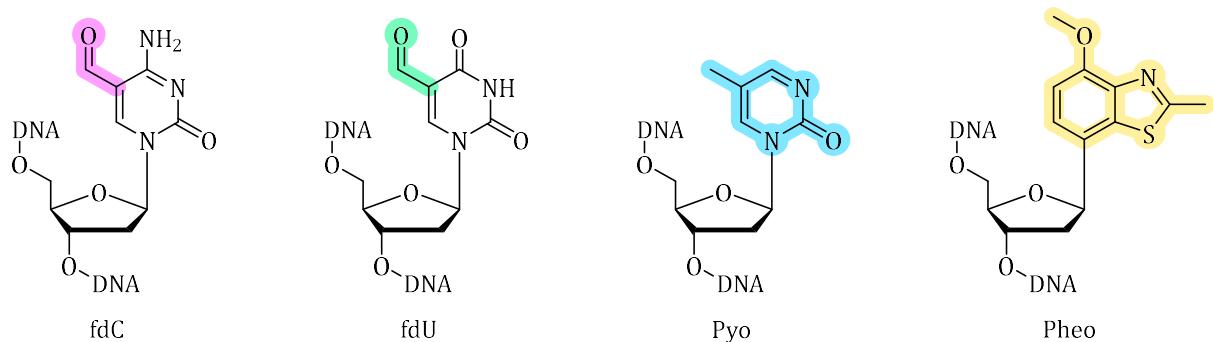


Abbildung 62: Die in dieser Arbeit verwendeten modifizierten Nukleoside und die jeweiligen Oligonukleotide **DNA****An-X** mit den beiden Gegensträngen der ternären DNA-Architektur, die Anzahl der A-T-Basen n wurden in **DNA****An-fdU**, **DNA****An-fdC** und **DNA****An-fdC^m** von 0 bis 5 und in **DNA****An-Pyo** und **DNA****An-Pheo** von 0 bis 1 variiert.

Die formylmodifizierten Nukleoside fdC und fdU können jeweils als Photosensibilisatoren Energie an umliegende T-T-Basenpaare übertragen. Dieser Energietransfer ist allerdings für fdC deutlich effizienter, da fdU nicht photostabil ist und unter Bestrahlung mit UV-A-Licht in die Säurefunktion cadU umgewandelt wird, was die Produktion von CPD-Schäden hemmt. Die maximalen CPD-Ausbeuten belaufen sich daher für fdU auf etwa 8 %, wobei statt der DNA-Hybride mit direkter Nachbarschaft des Photosensibilisators zur Schadensstelle **DNA1-fdU** die höchsten Schäden aufweist (Abbildung 63, türkis). Der nach **DNA1-fdU** folgende exponentielle Abfall der Energieübertragung weist auf einen DEXTER-Energietransfer hin und ist mit einer Distanzabhängigkeit von etwa 0.05 Å lokal sehr begrenzt. Dieser DEXTER-Energietransfer scheint allerdings nicht in **DNA0-fdU** stattzufinden. Wie die Energieübertragung in diesem Fall abläuft, konnte in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden.

Die Hybride mit fdC als Photosensibilisator wurden in DNA-Hybridien mit Guanosin und Adenosin als Gegenbase untersucht. Beide zeigen deutlich höhere CPD-Ausbeuten als die Hybride mit fdU, allerdings ist auch hier zu beobachten, dass die höchsten Ausbeuten von 37 % und 32 % jeweils bei DNA-Hybridien mit einer A-T-Base zwischen dem Photosensibilisator und der Schadenseite, **DNA1-fdC** und **DNA1-fdC^m**, entstehen. Im Fall der korrekten Basenpaarung in den DNA-Hybridien **DNA_n-fdC** ist das auf den Reparaturmechanismus durch Guanosin in direkter Nachbarschaft zur Schadensstelle zurückzuführen. Dieser öffnet CPD-Schäden durch den Transfer eines Elektrons. In den untersuchten DNA-Hybridien mit fdC-Adenosin Fehlpaarungen, **DNA_n-fdC^m**, ist durch die Instabilität der Hybridisierung an der Stelle des Photosensibilisators in **DNA0-fdC^m** eine deutlich verminderte CPD-Ausbeute von nur 2 % zu beobachten. Die in den folgenden DNA-Hybridien intervenierenden A-T-Paare führen zu einer stabileren Hybridisierung, weswegen **DNA1-fdC^m** mit 32 % nach 6 h eine hohe CPD-Ausbeute zeigt. Die in den fehlgepaarten Hybridien beobachteten Ausbeuten sind jedoch insgesamt geringer als die in den **DNA_n-fdC** Hybridien beobachteten. Abgesehen von den Besonderheiten in den DNA0-Hybridien, kann mit fdC als Photosensibilisator ein Energy-Hopping-Prozess beobachtet werden. In **DNA_n-fdC** bleibt die CPD-Ausbeute ab etwa 10.2 Å mit etwa 14 % über mindestens 10 intervenierende Basen konstant. Dies wurde zusätzlich mittels PAGE-Analyse bestätigt. In **DNA_n-fdC^m** ist dieser Energy-Hopping-Prozess ebenfalls sichtbar, er

setzt allerdings erst nach etwa 17 Å ein und zeigt konstante CPD-Ausbeuten von etwa 11 % über bis zu 10 A-T-Paaren (Abbildung 63, pink und lila).

In einer Kooperation mit der Gruppe von LHIAUBET-VALLET wurde das Chromophor des (6-4)-Photoschadens, Pyo, als Photosensibilisator untersucht. Die Belichtung der DNA-Hybride ohne und mit zwei intervenierenden A-T-Basenpaaren, **DNA0-Pyo** und **DNA1-Pyo**, zeigte, dass dieses in Oligonukleotiden kein Photosensibilisator ist (Abbildung 63, blau). Stattdessen wurde die Umwandlung von Pyo in das DEWAR-Isomer beobachtet. Der spektroskopische Vergleich des DMT-geschützten Pyo-Nukleosids **11** mit dem Pyo-DNA-Strang **DNA0-Pyo-a** zeigte, dass die Triplett-Energie der modifizierten Base in DNA von 293 kJ/mol auf etwa 280 kJ/mol herabgesetzt wird. Die Energieübertragung hängt damit stark von den umliegenden Basen ab. Die verkürzte Triplett-Lebenszeit von 21 µs des Nukleosids **11** auf 970 ns des **DNA0-Pyo-a** Stranges spricht außerdem dafür, dass die Wahrscheinlichkeit einer Energieübertragung sinkt. Sie ist sowohl mit verkürzter Triplett-Lebenszeit als auch herabgesetzter Triplett-Energie zwar theoretisch möglich, konkurriert allerdings mit der 130 ps schnellen Isomerisierung des (6-4)-Schadens in das DEWAR-Isomer. Dieses scheint in vollständigen DNA-Strängen bevorzugt gebildet zu werden. In den belichteten **DNA-Pyo** Strängen sichtbar wurde eine erhöhte Umsetzung des Atto-markierten Gegenstrangs und Photosensibilisator-Stranges in *Crosslinks* von bis zu 8 %.

Als letzte Modifikation wurde die Modell-Verbindung Pheo als Photosensibilisator untersucht. Die maximale CPD-Ausbeute in einem DNA-Hybrid ohne intervenierende Basen zwischen dem Photosensibilisator und der Schadenseite belief sich auf 30 % innerhalb der ersten 1.5 h. Diese Ausbeute wurde danach vermutlich durch den Guanosin-Reparaturprozess oder eine Elektronenübertragung durch Pheo auf etwa 27 % nach 6 h verringert. Die Bildung der CPD-Schäden in **DNA1-Pheo** verlief deutlich langsamer, erreichte allerdings Ausbeuten über 46 % nach 6 h Belichtung (Abbildung 63, gelb). Das weist auf eine langsamere Energieübertragung und weniger effektive Reparaturprozesse hin. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Benzothiazol-Derivate, so wie sie mutmaßlich durch Belichtung und Abbau von Pheomelanin entstehen, als Photosensibilisator dazu in der Lage sind, Energie auf benachbarte Thymidin-Basen zu übertragen und DNA-Schäden auszulösen.

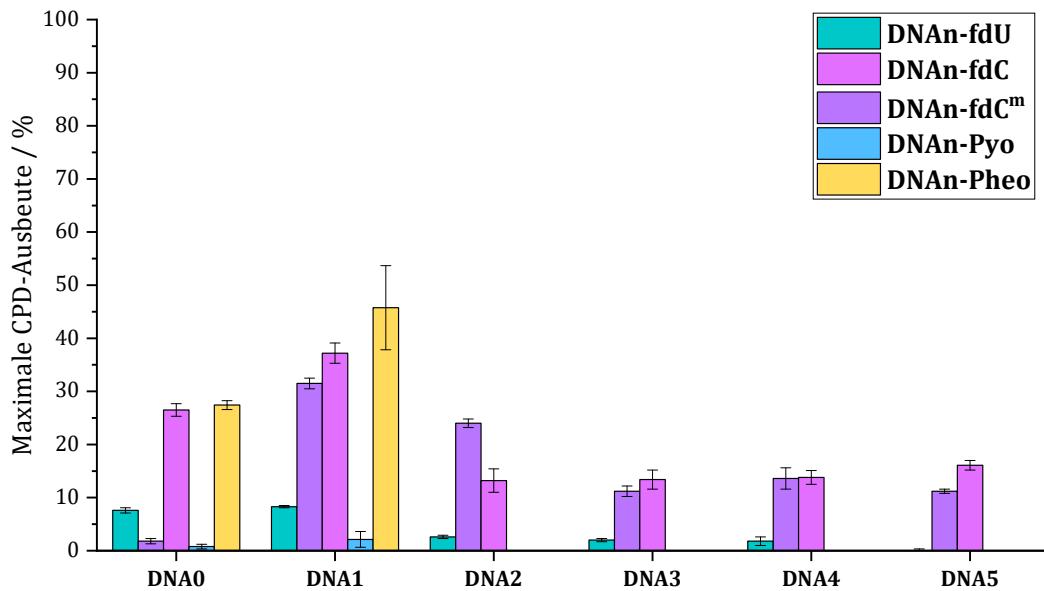


Abbildung 63: Maximale CPD-Ausbeuten in % der verschiedenen „natürlichen“ Photosensibilisatoren in den DNA-Hybriden **DNA-fdU** (Türkis), **DNA-fdC** (Pink), **DNA-fdC^m** (Lila), **DNA-Pyo** (blau) und **DNA-Pheo** (gelb).

Mit den Formyl-modifizierten DNA-Hybriden war es zusätzlich möglich, in Enzymexperimenten mit T4 Endonuklease V nachzuweisen, dass die Verlängerung der fluoreszenzmarkierten Gegenstränge tatsächlich auf die Bildung von CPD-Schäden zurückzuführen ist. Dabei wurde klar, dass es sich vermutlich nicht ausschließlich um die in nativer DNA vorkommende *cis-syn* Konformation der CPD-Schäden handelt. Stattdessen werden in den untersuchten Oligonukleotiden wahrscheinlich zu etwa 50% *trans-syn* Konformere CPDs gebildet, die in nativer DNA aufgrund der hohen strukturellen Ordnung der Doppelhelix kaum zu beobachten sind.

Im Folgenden zu untersuchen ist, in welcher Entfernung der Energy-Hopping-Energietransfer in fdC nicht mehr funktioniert. Zusätzlich sind Zellexperimente notwendig, um Formyl-Modifikationen als Photosensibilisatoren in zellulärer Umgebung näher zu untersuchen. Dies könnte mit der Bestrahlung von fdC oder fdU enthaltenen Zellen und anschließender *Next-Generation-Sequenzierung* erfolgen.

Die Hintergründe der Bildung der *Crosslink*-Nebenprodukte müssen in Zukunft ebenfalls näher beleuchtet werden. Vor allem die Pyo-DNA-Hybride könnten durch ihre hohen *Crosslink*-Ausbeuten eine genauere Analyse dieser Photoprodukte und damit ein besseres Verständnis über sie bieten.

Darüber hinaus sollte die Art der Energieübertragung in den Hybriden **DAn-Pheo** näher untersucht werden. Dafür wäre es hilfreich, mit dem im Zuge dieser Arbeit hergestellten Pheo-Phosphoramidit längere DNA-Stränge herzustellen und so die Distanzabhängigkeit der Energieübertragung zu ergründen. Auch sind für konkretere Aussagen über die energetische Situation des Pheomelanin-Derivates spektroskopische Untersuchungen notwendig, in denen die Triplet-Energie und Triplet-Lebenszeit der Modifikation festgestellt werden können. Ebenso gilt es zu untersuchen, inwiefern Elektronentransferprozesse durch Pheo stattfinden können.

Zusätzlich zu der unnatürlichen Modifikation der DNA durch den kovalenten Einbau eines Pheo-Nukleosids wäre von Interesse, ob Benzothiazol-Derivate in Lösung ebenfalls als Photosensibilisatoren Energie auf DNA-Basen übertragen können. Dies würde die vorgeschlagene Situation in Zellen am akkuratesten widerspiegeln und zu sicheren Aussagen über Pheomelanin als Photosensibilisator für CPD-Schäden führen.

Darüber hinaus sollte aufgeklärt werden, inwiefern Pheomelanin an „dunklen“ photochemischen Prozessen beteiligt ist. Es steht zusätzlich zur direkten Photosensibilisierung im Verdacht, durch „Chemiexcitation“ Energie an DNA-Basen zu übertragen, wenn die Lichtexposition bereits vorbei ist. Auch dies gilt es, in die Diskussion von Pheomelanin als Photosensibilisator mit einzubeziehen.

VII. Experimentalteil

1. Materialien

1.1 Schutzgaschemie

Alle luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden unter Verwendung von Argon (Argon 5.0 Reinheit 99.999%) als Schutzgas durchgeführt. Die dafür verwendeten Glasgeräte wurden mit Hilfe der SCHLENK-Technik mehrfach evakuiert und mit Argon gespült. Für besonders empfindliche Reaktionen wurden die verwendeten Glasgeräte unter Vakuum erhitzt, um Wasser vollständig zu entfernen. Außerdem wurden lediglich entgaste, trockene Lösungsmittel in diesen Reaktionen verwendet.

1.2 Lösungsmittel und Reagenzien

Alle Lösungsmittel und Reagenzien wurden von den Firmen ACROSS ORGANICS, CARL ROTH, EURISOTOP, FISHER SCIENTIFIC, MERCK, TCI und VWR bezogen.

Die verwendete unmodifizierte DNA, sowie Formyl-dC und Atto550-modifizierte DNA-Stränge wurden von METABION erworben.

Für die Synthesen wurden ausschließlich trockene Lösungsmittel genutzt, die unter Schutzgas über Molekularsieb gelagert wurden. Die Aufreinigung erfolgte mit technischen oder HPLC-*grade* Lösungsmitteln. Für alle Analysen wurden ausschließlich HPLC-*grade* Lösungsmittel verwendet. Wasser wurde einer MERK Mili-Q Direct 8 Entsalzungsanlage entnommen.

1.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Als Reaktionskontrolle und zur Analyse der Säulenchromatographie wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Es wurden mit 60 F₂₅₄ Silica beschichtete Aluminiumplatten mit einer Schichtdicke von 0.25 mm der Firma MERCK verwendet. Die

Auswertung erfolgte mittels Anregung bei 254 nm oder 366 nm oder durch die Anfärbung mittels einer Schwefelsäure-Methanol-Tauchlösung.

1.4 Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung der Rohprodukte wurde nach beendeter Reaktion, sofern angegeben, eine Säulenchromatographie durchgeführt. Dafür wurde Kieselgel Typ 60 (Porengröße 60 Å, Partikelgröße 40-63 µM) der Firma MERK verwendet. Um das Rohprodukt auf die stationäre Phase aufzutragen, wurde es entweder in geringen Mengen des angegebenen Lösungsmittelgemisches gelöst und direkt aufgetragen oder in einem anderen Lösungsmittel gelöst, in Kieselgel resorbiert und nach Entfernen des Lösungsmittels auf die Säule aufgetragen. Durch eine Schutzschicht aus Sand wurden mobile von stationärer Phase getrennt. Als mobile Phase wurde das jeweils angegebene Lösungsmittelgemisch verwendet. Zur Aufreinigung wurde mit Hilfe einer Aquariumspumpe Überdruck erzeugt.

2. Geräte

2.1 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die Charakterisierung der synthetisierten Substanzen wurde mittels NMR durchgeführt. Hierfür wurden ein BRUKER Avance 400 Spektrometer (400 MHz ^1H , 101 MHz ^{13}C , 162 MHz ^{31}P) sowie ein BRUKER Avance DRX 500 Spektrometer (500 MHz ^1H , 126 MHz ^{13}C) verwendet. Die Substanzen wurden in 0.4-0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst und in einem Probenröhrchen mit 5 mm Durchmesser relativ zum Referenzsignal von Tetramethylsilan (TMS) gemessen. Die chemische Verschiebung δ wird in *parts per million* (ppm) angegeben und jeweils auf die Signale der unvollständig deuterierten Lösungsmittel kalibriert. Folgende deuterierte Lösungsmittel wurden hierfür verwendet:

CDCl_3 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.26 \text{ ppm}$ $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77.16 \text{ ppm}$

DMSO-d_6 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2.50 \text{ ppm}$ $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39.52 \text{ ppm}$

MeOD-d_4 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 3.31 \text{ ppm}$ $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 49.00 \text{ ppm}$

Die Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Für die Beschreibung der Multiplizität werden folgende Abkürzungen verwendet:

s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentett), m (Multiplett), dd (Dublett vom Dublett), td (Triplet vom Dublett), ddd (Dublett vom Dublett vom Dublett)

2.2 Massenspektrometrie (ESI)

Die zur vollständigen Charakterisierung neuer Verbindungen angefertigten hochauflösenden Massenspektren wurden mit einer Elektronensprayionisationsquelle (ESI) an einem Q Exactive Orbitrap der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC aufgenommen. Die Signale werden im Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) und das Molekülion unprotoniert als $[\text{M}^+]$ oder protoniert als $[\text{M}+\text{H}^+]$ angegeben.

2.3 UV/ Vis Absorptionsspektroskopie

Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 3500 UV/ VIS Spektrometer der Firma AGILENT aufgenommen. Verwendet wurden hierfür Quarzglasküvetten (STARNA) mit einem Durchmesser von 1 cm. Einzelmessungen wurden bei 20°C durchgeführt, Schmelzpunktmessungen erfolgten mit einem Temperaturgradienten von 5-90°C. Einzelmessungen wurden in einem Wellenlängenbereich von 200-800 nm gemessen, während bei Schmelzpunktmessungen die Absorption der DNA-Stränge bei 260 nm in Abhängigkeit der Temperatur gemessen wurde (Kühlrate 1.0 °C/min, Datenintervall 0.5 °C).

2.4 Fluoreszenzspektroskopie und Phosphoreszenzmessung

Für die Messung von stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren wurde ein FLS1000 Spektrofluorometer der Firma EDINBURGH INSTRUMENTS verwendet, ausgestattet mit einem N-DMM Doppellemissions-Monochromator und einem N-G11 PMT-980 Detektor. Die Lichtquelle war eine gepulste LED mit einer Wellenlänge von 320 nm oder eine Xenon-Lampe. Die Kinetik-Messungen wurden durch eine monoexponentielle Zerfallsfunktion gefittet. Zusätzlich wurde eine Dekonvolution durchgeführt, um die Probenmesspunkte von dem Laserpulsprofil zu trennen. Dabei wurde Ludox als Standard verwendet. Alle Fluoreszenzexperimente wurden in Quarzglasküvetten (STARNA) mit einem Durchmesser von 1 cm durchgeführt. Die Fluoreszenzlebenszeit wurde bei einer Belichtungsspaltbreite von 13 gemessen. Die Fluoreszenz wurde unter Anregung bei 320 nm in 1.00 nm Schritten bei 20 °C gemessen. Die Probe wurde dafür auf eine Absorptionsintensität von etwa 0.2 eingestellt. Die Belichtungsspaltbreite betrug jeweils 3 und die Messung wurde einmal wiederholt.

Die Phosphoreszenz wurde bei 77 K nach Anregung einer Probe mit einer Absorptionsintensität von etwa 0.8 mit 320 nm bei einer Belichtungsspaltbreite von jeweils 10 in fünf Wiederholungen gemessen. Die Messung erfolgte dabei mit einem zeitlichen Verzug von etwa 500 µs. Die Messungen wurden in einem Quarzglasröhrchen mit einem Durchmesser von 0.5 mm durchgeführt.

2.5 Laser-Flash-Photolyse

Für die transiente Absorptionsspektroskopie wurde ein Laser-Flash-Photolyse-Aufbau verwendet. Genutzt wurde dafür ein LP980 System der Firma EDINBURGH INSTRUMENTS mit einem parametrischen Oszillatoren (OPO, EKSPLA NT342). Als Laser-Quelle wurde ein THG Nd:YAG Laser (EKSPLA PS5062) verwendet. Die Experimente wurden bei einer Wellenlänge von 320 nm mit einem 5 ns Laser-Puls und einer Energie von 6-9 mJ durchgeführt. In zeitlich aufgelösten Messungen wurde eine pulsierende Xenon Lampe (150 W) mit einem Monochromator (TMS302-A, 150 lines/mm Netzwerk) und einem *Photomultiplier Tube* Modul von HAMAMATSU PHOTONICS verwendet. Alle Experimente wurden in 5 mL Quarzglasküvetten (STARNA) mit einem Durchmesser von 1 cm durchgeführt. Es wurde jeweils bei 20 °C mit Xanthan als Standard gemessen. Vor der Messung der Proben wurden diese jeweils 10 min mit Luft, Stickstoff oder Sauerstoff durchströmt.

2.6 Belichtungsexperimente

Die Belichtung der DNA-Proben fand unter Verwendung eines in der Werkstatt des Instituts für Physikalische Chemie des KIT hergestellten Aufbaus statt. Hierfür wurden mit Kühllementen versehene Lampenschaltkreise verwendet, auf denen sich die jeweiligen lichtemittierenden Dioden (LED) befinden. Es wurden LEDs mit Wellenlängen 310 nm (DUV 310-SD351EV) und 325 nm (DUV 325-SD353EV) verwendet. Diese wurden von ROITHNER LASERTECHNIK bezogen. Für die Belichtung mit 310 nm wurde außerdem ein Dimmer (SYGONIX) verwendet, um das Bleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu minimieren. Mit einem Stromleistungsmesser der Firma THORLABS wurden hierbei $60 \pm 5 \mu\text{W}$ eingestellt. Die Leistung der 325 nm LEDs betrug 1.1-1.3 mW. Zusätzlich zu den LEDs wurden die Reaktionslösungen mit Hilfe eines Kühlblocks, angeschlossen an ein LAUDA ALPHA R8 Thermostat, während der Belichtung konstant auf 10°C gekühlt. Ein angeschlossener Magnetrührer versicherte die konstante Durchmischung der Probe.

Die Belichtung der Proben fand in 3.5 mL Quarzglasküvetten (STARNA) mit Septumschraubverschluss und einem Durchmesser von 1 cm statt. Die DNA-Lösungen

Experimentalteil

wurden hierfür vor der Belichtung mindestens 10 min mit Argon durchströmt, um gelösten Sauerstoff zu entfernen und anschließend mit einer Spritze in die evakuierte Küvette gefüllt. Die Probenentnahme während der Belichtung wurde mit einer HAMILTON Spritze unter Argon-Gegenstrom durchgeführt.

3. Oligonukleotide

3.1 Festphasensynthese

Für die Synthese der Oligonukleotide wurde ein H-6 DNA/RNA Synthesizer der Firma K&A LABORGERÄTE verwendet. Die Synthese erfolgte unter Argon-Atmosphäre und mit *Controlled Pore Glass* (CPG) als feste Phase mit einer Belegung von 1 µmol (500 Å). Die CPG-Säulchen, Reagenzien sowie Phosphoramidite und Lösungsmittel wurden von den Firmen CHEMGENES, GLENRESEARCH und MERK bezogen. Alle Phosphoramidite natürlicher DNA-Nukleotide wurden mit einer Konzentration von 0.067 M, die Photosensibilisator-Phosphoramidite in einer Konzentration von 0.1-0.2 M in Acetonitril gelöst.

3.1.1 Kupplungsprotokolle

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte nach einem Standardkupplungsprotokoll (Tabelle 1), welches für die Photosensibilisatoren angepasst wurde (Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4). Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

ACN	Acetonitril
AMD	jeweiliges Phosphoramidit
COL	CPG-Säule
CP_A	<i>Capping</i> -Reagenz-A
CP-B	<i>Capping</i> -Reagenz-B
GAS	Argon
M_W	Lösungsmittelabfall
OXI	Oxidationslösung
TCA	Trichloressigsäure
TRM	Tritylmonitor
WTH	Wartezeit

Tabelle 1: Kupplungsprotokoll der Standardbasen, sowie Standard-Entschützungs- und Oxidationsmethode.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]
1	4	TCA		COL		

Experimentalteil

2	30	TCA		TRM	ON	
3					ON	
4						15
5	25	TCA		TRM	ON	
6					ON	
7						15
8	25	TCA		TRM	ON	
9					ON	
10						15
11	25	TCA		TRM	ON	
12					ON	
13						15
14	25	TCA		TRM	ON	
15					ON	
16						15
17	30	GAS		TRM		
18	10	ACN		M_W		
19	20	ACN		COL	ON	
20					ON	
21						4
22	30	GAS		COL		
23	2	ACN		M_W		
24	20	ACN		COL	ON	
25					ON	
1	15	GAS		COL		2
2	2	TET		COL	ON	
3					ON	
4						2
1	4	TET		COL	ON	

2	8	AMD	TET	COL		
3					ON	
4						10
5	6	AMD	TET	COL	ON	
6					ON	
7						5
8	10	ACN		M_W		
9	10	GAS		M_W		
1	10	ACN		M_W		50
2	10	ACN		COL	ON	
3					ON	
4	35	GAS		COL		
5	20	GAS		M_W		
1	20	CP_A	CP_B	COL	ON	
2					ON	
3						15
4	3	CP_A	CP_B	COL	ON	
5					ON	
6						15
7	20	GAS		COL		
8	2	ACN		M_W		
9	12	ACN		COL	ON	
10					ON	
11	10	GAS		M_W		2
12	30	GAS		COL		
1	35	OXI		COL	ON	
2					ON	
3	10	ACN		M_W		9
4						9
5		WTH				150
6		WTH				150

Experimentalteil

7	30	GAS		COL		
8	2	ACN		M_W		
9	16	ACN		COL	ON	
10					ON	
11	20					
12	30	GAS		COL		
13	2	ACN		M_W		
14	15	ACN		COL	ON	
15					ON	
16	40					
17	15	ACN		COL	ON	
18					ON	
19	50					
20	10	GAS		M_W		
21	30	GAS		COL		

Tabelle 2: Kupplungsprotokoll des Formyl-dU Phosphoramidits.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]
1	4	TET		COL	ON	
2	4	AMD	TET	COL		
3					ON	
4						99
5						99
6						99
7						99
8	4	AMD	TET	COL	ON	
9					ON	
10						99
11						99

12						99
13						99
14						99
15	20	ACN		M_W		
16	20	GAS		M_W		

Tabelle 3: Kupplungsprotokoll des Pyo-Phosphoramidits

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	<i>S.Col.Ptr.</i>	Totzeit [s]
1	4	TET		COL	ON	
2	6	AMD	TET	COL		
3					ON	
4						99
5						99
6						99
7						99
8	6	AMD	TET	COL	ON	
9					ON	
10						99
11						99
12						99
13						99
14						99
15	10	ACN		M_W		
16	10	GAS		M_W		
17						99
18						99
19						99
20						99
21						99

Experimentalteil

22	4	AMD	TET	COL	ON	
23					ON	
24	20	ACN		M_W		
25	20	ACN		M_W		

Tabelle 4: Kupplungsprotokoll des Pheo-Phosphoramidits.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]
1	4	TET		COL	ON	
2	4	AMD	TET	COL		
3					ON	
4						99
5						99
6						99
7						99
8						99
9						99
10						99
11						99
12	6	AMD	TET	COL	ON	
13					ON	
14						99
15						99
16						99
17						99
18						99
19						99
20						99
21						99
22	4	AMD	TET	COL	ON	

23					ON	
24	20	ACN		M_W		
25	20	ACN		M_W		

3.2 Aufreinigung

3.2.1 Voraufreinigung

Nach der Synthese der Oligonukleotide wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet und die feste Phase in ein EPPENDORF Gefäß überführt. Es wurde 1 mL Ammoniumhydroxidlösung (>25%, FLUKA) hinzugefügt und über Nacht auf 55°C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurde der Ammoniak mittels eines Vakuumkonzentrators, Alpha RVC der Firma CHRIST, 30 min bei 34°C und 100 mbar entfernt. Die überstehende Lösung wurde in ein neues EPPENDORF Gefäß überführt und das CPG mehrmals mit Wasser nachgewaschen.

Im Falle einer DMT-on Synthese wurde im Anschluss eine Voraufreinigung mittels GlenPak™ Purification Cartridges der Firma GLEN RESEARCH durchgeführt. Hierbei wurden Abbruchstränge mittels einer Salzwaschlösung (100 mg/mL NaCl-Lösung mit 5% MeCN) entfernt und die DMT-Schutzgruppe mit Trifluoracetat-Lösung (TFA; 2% in Wasser) abgespalten und entfernt. Säure- und Salzreste wurden mit Wasser entfernt und die Oligonukleotide mit einer Elutionslösung (50% MeCN und 0.5% Ammoniumhydroxid in Wasser) von der Säule in ein neues EPPENDORF Gefäß gespült. Am Vakuumkonzentrator (CHRIST) wurden die Lösungsmittel entfernt (15 h, 25°C, 0.1 mbar).

3.2.2 Semipräparative Aufreinigung

Alle selbst hergestellten Oligonukleotide wurden mit semipräparativer Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie aufgereinigt. Die Trennung erfolgte hierbei mit einer Dionex UltiMate3000™ (Autosampler, Pumpmodul, Säulenofen, Multidiodenarray, RS Fluoreszenzdetektor, Software Chromeleon 7) der Firma THERMO SCIENTIFIC. Es wurde eine präparative Supercosil LC 318 Säule (25 cm x 10 mm, 5 µm) der Firma VDS OPTILAB und eine Laufgeschwindigkeit von 2.5 mL/min mit einem 0.05 M

Experimentalteil

Ammoniumacetatpuffer verwendet. Das Protokoll zur Aufreinigung der Oligonukleotide ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: RP-HPLC Protokoll zur Aufreinigung der modifizierten DNA-Stränge (**DNA_n-fdU**, **DNA_n-Pyo**, **DNA_n-Pheo**).

t [min]	MeCN [%]	NH ₄ OAc [%]	Flussrate [mL/min]
0.000	0	100	2.500
40.000	15	85	2.500
40.001	80	20	2.500
50.000	80.0	20	2.500
50.001	0.0	100	2.500
60.000	0.0	100	2.500

3.3 Analyse

Die Analyse der einzelnen Oligonukleotide sowie der Belichtungsproben erfolgten über analytische RP-HPLC. Verwendet wurde hierfür ebenfalls die Dionex UltiMate3000™ von THERMO SCIENTIFIC. Als Säule wurde eine VDSpher OptiBio Pur 300 S18-SE der Firma VDS OPTILAB gewählt. Die Laufrate betrug 1.00 mL/min mit einem Gradienten aus Acetonitril in 0.05 M Ammoniumacetat-Lösung bei 60°C. Die Gradienten sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: RP-HPLC Analytikprotokoll für die Auftrennung und Untersuchung der belichteten DNA-Hybride (**DNA_n-fdU**, **DNA_n-fdC**, **DNA_n-fdC^m**, **DNA_n-Pyo**, **DNA_n-Pheo**).

t [min]	MeCN [%]	NH ₄ OAc [%]	Flussrate [mL/min]
0.000	3	97	1.000
20.000	13	87	1.000
20.001	30	70	1.000
45.000	40	60	1.000
45.001	80	20	1.000
55.000	80	20	1.000
55.001	0	100	1.000
60.000	0	100	1.000

3.4 Massenspektrometrie

3.4.1 MALDI-TOF

Die Reinheit der Oligonukleotide wurde mit Hilfe von Matrix assistierter Laser Desorption Ionisierung mit Flugzeitbestimmung (MALDI-TOF) gemessen. Verwendet wurde dafür ein SHIMADZU Axima Confidence Spektrometer und eine Matrix aus 3-Hydroxypicolinsäure (ges. Lösung in MeCN/ Wasser 1:1) mit Diammoniumhydrogencitrat (0.44 M in Wasser) 9:1.

3.4.2 LC-ESI-MS

LC-ESI-MS Analysen wurden mit einer UltiMate 3000 Dionex mit nachgeschalteter LTQ Orbitrap Elite ESI-Massenanalyse (THERMO SCIENTIFIC) gemessen. Die Gradienten während der RP-HPLC Läufe wurden auf die Angaben der jeweiligen analytischen Läufe angepasst.

3.5 Konzentrationsbestimmung

3.5.1 Nanodrop

Zur Konzentrationsbestimmung der selbst synthetisierten DNA-Stränge wurde die Absorption der aufgereinigten DNA-Lösungen bei 260 nm und 340 nm gemessen. Hierfür wurde ein ND-1000 Spektrophotometer der Firma NANODROP verwendet. Es wurde der Modus „*Nucleic Acid*“ verwendet. Anschließend wurde das BEER-LAMBERT Gesetz genutzt, um von der gemessenen Absorption auf die DNA-Konzentration schließen zu können.

3.5.2 BEER-LAMBERT

Die Konzentration der DNA-Stränge in Lösung ergibt sich aus dem BEER-LAMBERT-Gesetz unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Oligonukleotids bei 260 nm ε_{260} . Dieser setzt sich zusammen aus dem Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen und ihrer jeweiligen Anzahl im vollständigen Strang:

$$\varepsilon_{260} = (A * \varepsilon_A + T * \varepsilon_T + C * \varepsilon_C + G * \varepsilon_G) * 0.9$$

ε_{260} : molarer Extinktionskoeffizient bei 260 nm

X: Anzahl der Nukleotide (A, T, C, G) im Oligonukleotid

Experimentalteil

Der Extinktionskoeffizient des Nukleosids Pheo wurde durch eine Konzentrationsreihe errechnet (Abbildung SI 34). Die verwendeten Extinktionskoeffizienten aller Nukleoside sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Extinktionskoeffizienten der verwendeten natürlichen und modifizierten Nukleoside.

Nukleotid bzw. Modifikation	ε_{260} [L/mol*cm]
A	15 400
T	8 800
C	7 300
G	11 700
ForU ^[125]	13 400
ForC ^[126]	12 000
Pheo	6 600
Pyo ^[127]	700

3.6 Hybridisierung

Zur Hybridisierung der DNA-Proben wurde das Photosensibilisator-Oligonukleotid zusammen mit zwei Gegensträngen, ein längerer mit Atto550 Fluoreszenzmarkierung und ein kürzerer als Elongationsstrang, in gleichen Äquivalenten in ein EPPENDORF Gefäß gegeben. Die Konzentration der Oligonukleotide betrug hierbei 2.5 µM in Belichtungs- und Schmelzpunktproben oder 5 µM in LC-ESI-MS Proben. Hinzugefügt wurden außerdem 250 mM NaCl-Lösung und 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPi, pH 7). Anschließend wurden die Lösungen 10 min lang auf 95°C erhitzt und anschließend über mehrere Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.7 Übersicht der charakterisierten Oligonukleotide

Tabelle 8: Übersicht der hergestellten DNA-Stränge, ihrer Massen, Extinktionskoeffizienten und Schmelzpunkte.

Name	Sequenz 5'→3'	Masse gesucht m/z	Masse gefunden m/z	ϵ_{260} [L/mol*cm]	Smp. [°C]
DNA0-fdU-a	GAC ATA AXA TAT GCG	4612.0	4613.8	163800	44.0
DNA1-fdU-a	GAC ATA ATA XAT ATG CG	5229.1	5231.7	185600	47.7
DNA2-fdU-a	GAC ATA ATA TAX ATA TGC G	5846.2	5852.9	213400	50.2
DNA3-fdU-a	GAC ATA ATA TAT AXA TAT GCG	6463.3	6467.3	235200	53.2
DNA4-fdU-a	GAC ATA ATA TAT ATA XAT ATG CG	7080.4	7085.3	257000	54.7
DNA5-fdU-a	GAC ATA ATA TAT ATA TAX ATA TGC G	7697.5	7709.0	278700	57.3
DNA0-Pyo-a	GAC ATA AXA TAT GCG	4582.0	4583.7	152300	36.8
DNA1-Pyo-a	GAC ATA ATA XAT ATG CG	5199.1	5205.5	174100	35.0
DNA0-Pheo-a	GAC ATA AXA TAT GCG	4651.1	4657.5	158200	36.0
DNA1-Pheo-a	GAC ATA ATA XAT ATG CG	5268.2	5306.1 [M+K]	180000	32.7

X: Modifiziertes Nukleotid

3.8 PAGE-Analyse

Zur Analyse der belichteten DNA-Stränge mittels denaturierender Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde ein Owl S4S Aluminum-Backed Sequencer der Firma THERMO FISHER verwendet. Die Spannung wurde mittels eines PowerPac HV von BIO-RAD angelegt. Hierbei wurde eine konstante Temperatur von 50°C mit einer maximalen Spannung von 3000 V und einer konstanten Leistung von 50 W gewählt. Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Die Fluoreszenzstärke der Gelbanden, hervorgerufen durch die Atto550 Modifikation des Photosensibilisator-Gegenstranges, wurde anschließend mit einem Azure300 Imager und der AzureSpot Pro Software der Firma BIOZYM quantifiziert. Die Anregungswellenlänge betrug hierbei 524 nm, die Detektionswellenlänge lag bei 572 nm.

Tabelle 9: Zusammensetzung der während der PAGE-Analyse verwendeten Lösungen und Reagenzien.

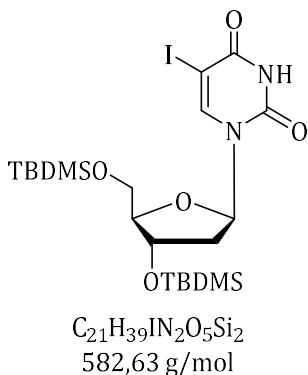
Name	Zusammensetzung
Lade-Puffer	14 mmol/L EDTA 63 mmol/L Tris-Base 63 14 mmol/L EDTA 63 mmol/L Tris-Base 63 mmol/L Borsäure 2.8 % Ficoll 0.07 % Bromphenolblau 0.01 % Xylencyano FF 5 mol/L Harnstoff
10x TBE-Puffer	27 mmol/L EDTA 970 mmol/L Tris-Base 890 mmol/L Borsäure
TBE-Laupfuffer	2.7 mmol/L EDTA 97 mmol/L Tris-Base 89 mmol/L Borsäure
Polyacrylamid-Gellösung (12.5%)	15.6 mL Acrylamid/Bisacrylamid (19/1) 25 g Harnstoff
50 mL Ansatz	

APS-Lösung (10%)	5 mL Wasser 20 µL TEMED 425 µL APS-Lösung 0.10 g APS 900 µL dd H ₂ O
------------------	---

4. Synthesevorschriften

4.1 Formyl-2'-desoxyuridin Photosensibilisator

4.1.1 Verbindung 5



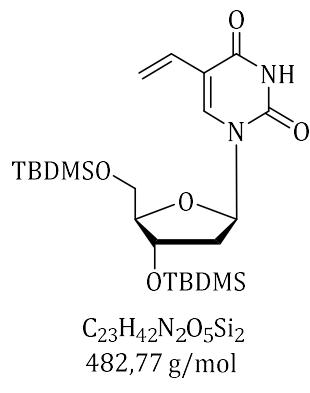
Unter Argon-Atmosphäre wurde zu einer Lösung aus 2.00 g 5-Iod-2'-desoxyuridin (5.64 mmol; 1.00 eq.) in 20 mL DMF erst 1.72 g Imidazol (25.3 mmol; 4.50 eq.) und im Anschluss 1.70 g TBDMS-Cl (11.3 mmol; 2.00 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen, mit Wasser, ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (SiO_2 ; $n\text{Hex}/\text{EE}$ 5:1). Das Produkt 5 wurde in einer Ausbeute von 91% (2.99 g; 5.13 mmol) als weißer Schaum erhalten.^[93]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE} \text{ 5:1}) = 0.29$$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (s, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, CH_{arom}), 6.26 (dd, $J = 8.0, 5.6$ Hz, 1H, C1'H), 4.40 (dt, $J = 5.2, 2.3$ Hz, 1H, C3'H), 3.98 (q, $J = 2.4$ Hz, 1H, C4'H), 3.95 – 3.71 (m, 2H, C5'H₂), 2.31 (ddd, $J = 13.2, 5.8, 2.3$ Hz, 1H, C2'H), 2.06 – 1.94 (m, 1H, C2'H), 1.02 – 0.85 (m, 18H, $t\text{BuSi-CH}_3$), 0.12 (ddd, $J = 28.2, 3.9, 0.7$ Hz, 12H, MeSi-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[93]

4.1.2 Verbindung 6



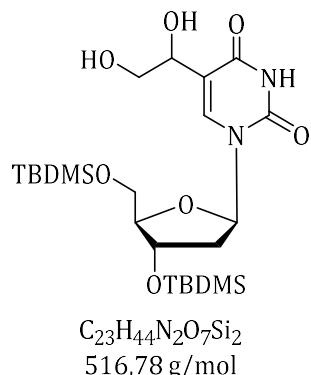
Unter Argon-Atmosphäre wurden 3.00 g **5** (5.12 mmol; 1.00 eq.) in 15 mL DMF gelöst und 24.0 mL Vinylacetat (22.2 g; 258 mmol; 50.0 eq.) hinzugefügt. Es wurden 174 mg Pd(OAc)₂ (0.77 mmol; 0.15 eq.), 270 mg PPh₃ (1.03 mmol; 0.20 eq.) und 1.5 mL Et₃N (1.12 g; 11.1 mmol; 2.15 eq.) in 5 mL DMF gelöst und anschließend in die Vinylacetat-Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 80°C gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Die Lösung wurde in EE aufgenommen und mehrmals mit viel Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde unter verminderterem Druck vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, *n*Hex/ EE 5:1 + 0.1% Et₃N). Das Produkt **6** wurde in einer Ausbeute von 67 % (1.66 g; 3.43 mmol) als gelbes Öl erhalten.^[93]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 5:1) = 0.20$$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (s, 1H, NH), 7.66 (s, 1H, CH_{arom.}), 6.44 – 6.24 (m, 2H, C'1H, vinyl CH), 6.00 (dd, *J* = 17.5, 1.6 Hz, 1H, vinyl CH₂), 5.24 (dd, *J* = 11.4, 1.6 Hz, 1H, vinyl CH₂), 4.41 (dt, *J* = 5.5, 2.5 Hz, 1H, C3'H), 3.97 (q, *J* = 2.7 Hz, 1H, C4'H), 3.89 – 3.73 (m, 2H, C5'H₂), 2.32 (ddd, *J* = 13.1, 5.8, 2.5 Hz, 1H, C2'H₂), 2.08 – 1.96 (m, 1H, C2'H₂), 0.91 (d, *J* = 6.2 Hz, 18H, tBu-Si-CH₃), 0.13 – 0.05 (m, 12H, Me-Si-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[93]

4.1.3 Verbindung 7



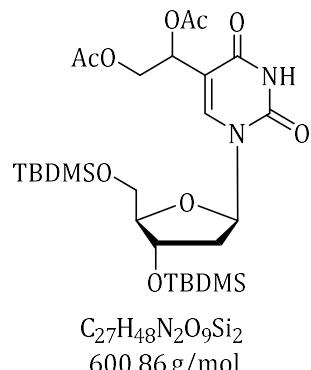
Unter Argon-Atmosphäre wurden 500 mg **6** (1.04 mmol; 1.00 eq.), 305 mg NMO (2.60 mmol, 2.50 eq.) und 5 mg OsO₄ (0.02 mmol; 0.02 eq.) in Aceton: H₂O: tBuOH 4:1:1 gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 22 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung in EE aufgenommen und mit Na₂S₂O₃ (0.1 M) Lösung, Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit EE extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂; DCM → DCM/MeOH 10:1). Das Produkt **7** wurde als bräunlicher Feststoff in einer Ausbeute von 87 % (467 mg; 0.90 mmol) erhalten.^[92]

$$R_f(\text{DCM}/\text{MeOH } 6:1) = 0.77$$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.34 (s, 1H, NH), 7.68 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, CH_{arom.}), 6.38 – 6.15 (m, 1H, C'1H), 4.58 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, ethyl-CH), 4.46 – 4.31 (m, 1H, C'3H), 3.94 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, C'4H), 3.87 – 3.58 (m, 4H, C'5H₂, ethyl-CH₂), 2.37 – 2.18 (m, 1H, C'2H), 2.12 – 1.86 (m, 1H, C'2H), 1.00 – 0.75 (m, 18H, tBu-Si-CH₃), 0.20 – 0.07 (m, 12H, Me-Si-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

4.1.4 Verbindung 8



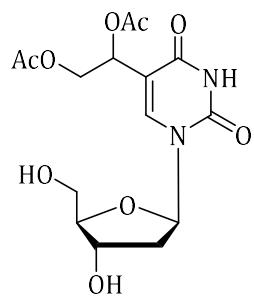
Unter Argon-Atmosphäre wurden 414 mg **7** (0.80 mmol; 1.00 eq.) in 8 mL Pyridin gelöst. Es wurden 0.3 mL Acetanhydrid (327 mg; 0.32 mmol; 4.00 eq.) hinzugeropft und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 2 mL MeOH hinzugefügt und das Lösungsmittel nach kurzem Röhren unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EE und Wasser aufgenommen und mit 0.5 M HCl, NaHCO₃, Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, *n*Hex/ EE 1:1 + 0.1% Et₃N). Das Produkt **8** wurde in einer Ausbeute von 85 % (417 mg; 0.81 mmol) als farbloser Schaum erhalten.^[92]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 1:1) = 0.69$$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (s, 1H, NH), 7.62 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, CH_{arom.}), 6.22 (dt, *J* = 8.0, 6.0 Hz, 1H, C'1H), 5.83 (ddd, *J* = 22.4, 7.1, 4.1 Hz, 1H, ethyl-CH), 4.53 – 4.32 (m, 3H, C'3H, ethyl-CH₂), 3.96 (dtd, *J* = 6.3, 3.9, 2.3 Hz, 1H, C'4H), 3.83 – 3.67 (m, 2H, C'5H), 2.43 – 2.12 (m, 1H, C'2H₂), 2.12 – 1.95 (m, 7H, C'2H₂, (OAc)₂), 0.96 – 0.81 (m, 18H, *t*Bu-Si-CH₃), 0.16 – -0.01 (m, 12H, Me-Si-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

4.1.5 Verbindung 9



$C_{15}H_{20}N_2O_9$
372,33 g/mol

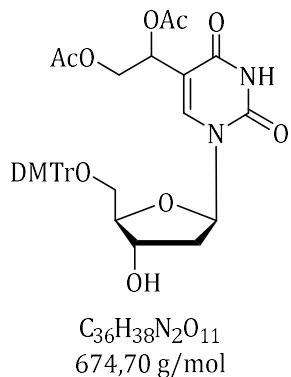
Unter Argon-Atmosphäre wurde 1.05 g **8** (1.74 mmol; 1.00 eq.) in 5 mL THF gelöst und 0.20 mL Essigsäure (209 mg; 3.48 mmol; 2.00 eq.) zugegeben. Zu dieser Lösung wurde langsam 2.2 mL TBAF (1 M in THF; 1.80 g; 6.96 mmol; 4.00 eq.) gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 16 h gerührt. Nach Ende der Reaktion wurde Kieselgel zugegeben. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 ; DCM/ MeOH 9:1). Das Produkt **9** wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.^[92]

R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.54

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (d, J = 5.0 Hz, 1H, CH_{arom.}), 6.23 – 6.13 (t, 1H, C'1H), 5.93 – 5.81 (m, 1H, ethyl-CH), 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 1H, C'3H), 4.41 – 4.31 (m, 2H, ethyl-CH₂), 3.96 (dd, J = 9.8, 3.8 Hz, 1H, C'4H), 3.91 – 3.80 (m, 2H, C'5H), 2.40 (td, J = 13.7, 6.0 Hz, 1H, C'2H), 2.30 – 2.17 (m, 1H, C'2H), 2.10 (d, J = 2.3 Hz, 6H, (OAc)₂).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

4.1.6 Verbindung 10

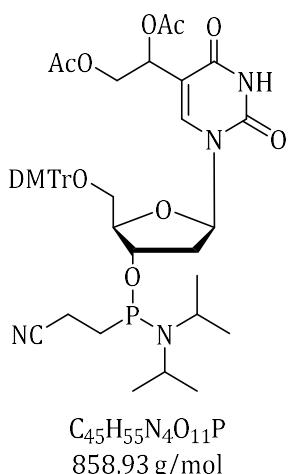


Unter Argon-Atmosphäre wurde 532 mg **9** (1.42 mmol; 1.00 eq.) in 5 mL Pyridin gelöst. 722 mg DMT-Cl (2.13 mmol; 1.50 eq.) wurde hinzugegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , $n\text{Hex}/\text{EE}$ 7:3 → 3:7). Anschließend wurde das Produkt aus Benzol lyophilisiert. Das Produkt **10** wurde in einer Ausbeute von 50 % (479 mg; 0.71 mmol) als gelblicher Feststoff erhalten.^[92]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE} \text{ 3:7}) = 0.17$$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.06 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.59 (d, $J = 43.5$ Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.41 (dd, $J = 7.4, 4.5$ Hz, 2H, CH_{arom.}), 7.36 – 7.18 (m, 6H, CH_{arom.}), 6.88 – 6.79 (m, 4H, CH_{arom.}), 6.22 (dt, $J = 29.1, 6.6$ Hz, 1H, C'1H diastereomer), 5.76 (ddd, $J = 24.3, 6.4, 3.8$ Hz, 1H, ethyl-CH diastereomer), 4.42 (dd, $J = 11.9, 6.3$ Hz, 2H ethyl-CH₂ diastereomer), 4.36 – 4.21 (m, 1H, C'3H diastereomer), 4.00 (dt, $J = 18.5, 4.2$ Hz, 1H, C'4H diastereomer), 3.79 (s, 6H, OMe-DMT), 3.40 (dtd, $J = 19.3, 10.0, 4.7$ Hz, 2H, C'5H₂ diastereomer), 2.51 – 2.37 (m, 1H, C'2H₂ diastereomer), 2.18 (dq, $J = 14.1, 7.4$ Hz, 1H, C'2H₂ diastereomer), 2.01 (d, $J = 24.2$ Hz, 6H, (OAc)₂).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

4.1.7 Verbindung **1a**

Unter Argon-Atmosphäre wurde 178 mg **10** (0.26 mmol, 1.00 eq.) in einem ausgeheizten Kolben in 5 mL DCM gelöst und 0.15 mL 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphoramidit (143 mg, 0.48 mmol, 1.80 eq.) hinzugefügt. Eine Lösung aus 22 mg 4,5 Dicyanoimidazol (0.19 mmol, 0.70 eq.) in 1 mL MeCN wurde hinzugefügt. Die Mischung wurde 5h bei RT gerührt. Nach der Hälfte der Zeit wurde erneut die gleiche Menge 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphoramidit und 4,5 Dicyanoimidazol hinzugefügt. Nach Beenden der Reaktion wurde mit DCM verdünnt und mit 5%iger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*Hex/EE 7:3 → 1:2, +0.1% Et₃N). Anschließend wurde das Produkt aus Benzol lyophilisiert. Das Produkt **1a** wurde als gelblicher Feststoff in einer Ausbeute von 98 % (219 mg; 0.26 mmol) erhalten.^[92]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 1:2) = 0.69$$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (s, 1H, NH), 7.75 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.71 – 7.50 (m, 1H, CH_{arom.}), 7.47 – 7.38 (m, 2H, CH_{arom.}), 7.36 – 7.13 (m, 6H, CH_{arom.}), 6.83 (dd, *J* = 8.9, 5.9, 4.0, 1.6 Hz, 4H, CH_{arom.}), 6.37 – 6.09 (m, 1H, C'1H), 5.83 – 5.69 (m, 1H, ethyl-CH), 4.58 – 4.38 (m, 1H, C'3H), 4.30 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H,), 4.24 – 4.05 (m, 3H, C'4H, ethyl-CH₂), 3.78 (d, *J* = 2.9 Hz, 6H, OMe-DMT), 3.66 – 3.40 (m, 3H, P-OCH₂, C5'H), 3.35 – 3.16 (m, 1H, C5'H), 2.76 (td, *J* = 6.2, 2.0 Hz, 1H, N-CH(CH₃)₂), 2.61 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, N-CH(CH₃)₂), 2.57 – 2.45 (m, 1H, C2'H₂), 2.39 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-CN), 2.17 (tt, *J* = 14.0, 7.4 Hz, 1H, C2'H₂), 2.08 – 1.95 (m, 6H, (OAc)₂), 1.34 – 1.08 (m, 12H, iPrN-CH₃).

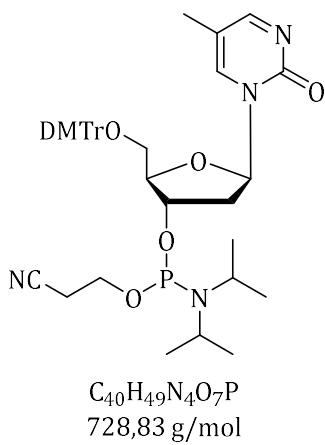
^{31}P NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 148.61, 149.24, 14.18.

MALDI: m/z (berechnet) 815.88 [$\text{M}^+ \text{-Ac}$]; m/z(gefunden) 815.09 [$\text{M}^+ \text{-Ac}$].

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

4.2 Pyo Photosensibilisator

4.2.1 Verbindung 2



Unter Argon-Atmosphäre wurde 180 mg **11** (0.34 mmol; 1.00 eq.) in einem ausgeheizten Kolben in 8 mL DCM gelöst und 195 μ L 2-Cyanoethyl-tetraisopropylphosphoramidit (185 mg; 0.61 mmol; 1.80 eq.) hinzugefügt. Eine Lösung aus 28 mg 4,5 Dicyanoimidazol (0.24 mmol; 0.70 eq) in 0.5 mL MeCN wurde hinzugefügt. Die Mischung wurde 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit DCM verdünnt und mit 5% NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM/ MeOH 9:1). Anschließend wurde mehrmals mit MeCN coevaporiert. Das Produkt **2** wurde als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 80 % (194 mg; 0.27 mmol) erhalten.^[92]

$$R_f(\text{DCM}/\text{MeOH} \ 9:1) = 0.71$$

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.47 – 8.35 (m, 2H, CH_{arom}), 7.43 (ddd, *J* = 7.1, 3.8, 2.1 Hz, 2H, CH_{arom}), 7.31 – 7.20 (m, 6H, CH_{arom}), 6.88 (ddd, *J* = 8.8, 5.7, 2.8 Hz, 4H, CH_{arom}), 6.19 (dt, *J* = 6.6, 4.7 Hz, 1H, C1'H), 4.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, C3'H), 4.29 – 4.24 (m, 1H, C4'H), 4.23 – 4.08 (m, 2H, PO-CH₂), 3.92 – 3.72 (m, 8H, C5'H₂, O-CH₃), 2.87 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, NC-CH₂), 2.72 (dq, *J* = 11.2, 6.4, 5.5 Hz, 3H, C2'H₂, N-CH), 2.52 – 2.40 (m, 1H, C2'H₂), 1.66 (d, *J* = 11.4 Hz, 3H, CH₃), 1.20 (ddt, *J* = 13.7, 6.8, 4.1 Hz, 12H, iPr-CH₃).

2D-NMR (MeOD-*d*₄): COSY

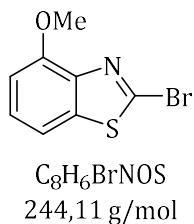
^{31}P NMR (162 MHz, MeOD- d_4) δ 148.67, 148.55, 15.17.

MALDI: m/z (berechnet) = 751.82 [M+Na $^+$]; m/z (gefunden) = 751.85 [M+Na $^+$].

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 729.3412 [M+H $^+$]; m/z (gefunden) = 729.3410 [M+H $^+$].

4.3 Pheomelanin Photosensibilisator

4.3.1 Verbindung 13



Unter Argon-Atmosphäre wurde 1.00 g 2-Amino-4-methoxybenzothiazol (5.55 mmol; 1.00 eq.) in 10 mL Acetonitril gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 25 mg CuBr₂ (0.11 mmol; 0.02 eq.), 1.43 g *p*TsOH*H₂O (8.33 mmol; 1.50 eq.), 3.58 g BrN(*n*Bu)₄ (11.1 mmol; 2.00 eq.) und 1.0 mL *t*BuONO (859 mg; 8.33 mmol; 1.50 eq.) hinzugefügt und 1 h gerührt. Anschließend wurde Wasser hinzugefügt und mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, *n*Hex/EE 10:1). Das Produkt **13** wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 90 % (1.22 g; 4.98 mmol) erhalten.^[99]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 5:1) = 0.50$$

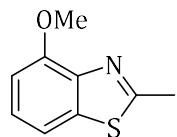
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.62 (d, J = 8.1 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.43 (t, J = 8.1 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.07 (d, J = 8.3 Hz, 1H, CH_{arom.}), 3.94 (s, 3H; O-CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.41, 141.83, 138.41, 136.98, 127.13, 113.58, 108.20, 55.91.

2D-NMR (DMSO-*d*₆): COSY, HSQC, HMBC

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[99]

4.3.2 Verbindung **14**



C_9H_9NOS
179,24 g/mol

Unter Argon-Atmosphäre wurde 200 mg **13** (0.82 mmol; 1.00 eq.) in 3 mL THF gelöst. Die Lösung wurde auf -78°C gekühlt, 10min gerührt und 1.17 mL *sec*BuLi (1.4 M in Hex.; 105 mg; 1.64 mmol; 2.00 eq.) wurde langsam hinzugefügt. Anschließend wurde für 1 h bei -78°C gerührt. Dann wurde 0.26 mL Methyliodid (582 mg; 4.10 mmol; 5.00 eq.) hinzugetropft und für 2h gerührt, während die Reaktionslösung auf Raumtemperatur aufgewärmt wurde.

Wasser wurde hinzugefügt, dann mit DCM extrahiert und mit ges. $NaHCO_3$ Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , 6:1 → 2:1 *n*Hex/EE). Das Produkt **14** wurde als gelblicher Feststoff in einer Ausbeute von 75 % (110 mg; 0.61 mmol) erhalten.^[100]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 5:1) = 0.20$$

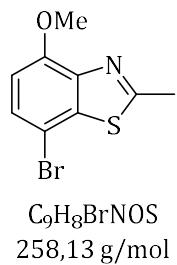
1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.55 (d, J = 9.1 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.32 (t, J = 8.0 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.00 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH_{arom.}), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 2.76 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 164.79, 152.60, 142.81, 136.78, 125.78, 113.67, 107.45, 55.78, 19.70.

2D-NMR ($DMSO-d_6$): COSY, HSQC, HMBC

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 180.0478 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 180.0474 [M+H⁺].

4.3.3 Verbindung 15



Unter Argon-Atmosphäre wurden 93 mg **14** (0.51 mmol; 1.00 eq.) und 92 mg NBS (0.52 mmol; 1.00 eq.) in 3 mL MeCN gelöst. Die Lösung wurde 48h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , n Hex/EE 5:1). Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 99 % (132 mg; 0.51 mmol) als beiger Feststoff erhalten. [100b]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 5:1) = 0.14$$

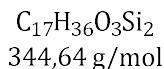
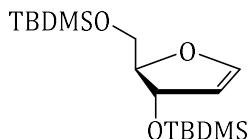
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CH_{arom.}), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CH_{arom.}), 4.01 (s, 3H, O-CH₃), 2.84 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 166.13, 152.29, 142.90, 139.72, 128.09, 108.22, 104.05, 56.25, 20.30.

2D-NMR ($CDCl_3$): COSY, HSQC, HMBC

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 259.9562 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 259.9553 [M+H⁺].

4.3.4 Verbindung 16



Unter Argon-Atmosphäre wurde 0.43 mL Acetylchlorid (471 mg; 6.00 mmol; 0.40 eq.) in 30 mL eiskaltes Methanol getropft und 10min gerührt. 2.00 g 2'-Desoxyribose (15.0 mmol; 1.00 eq.) wurde zugegeben und 2 h bei 0°C gerührt. Es wurde festes NaHCO₃ hinzugefügt und 30 min gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Filtrat eingeengt. Das Rohprodukt wurde in EE aufgenommen und erneut filtriert, daraufhin wurde das Lösungsmittel entfernt.

Das entstandene gelbe Öl wurde unter Argon-Atmosphäre in DCM gelöst und bei 0°C 2.76 g Imidazol (40.5 mmol; 2.70 eq.) zugegeben. 5.65 g TBDMS-Cl (37.5 mmol; 2.50 eq.) wurde hinzugefügt, die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Es wurde über Celite gefiltert und mehrmals mit DCM nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt.

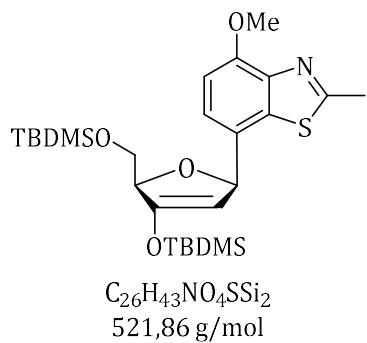
Der Rückstand wurde unter Argon in DCM gelöst und bei 0°C 10.8 mL Lutidin (9.97 g; 93.0 mmol; 6.20 eq.) und 8.5 mL TMS-OTf (10.34 g; 46.5 mmol; 3.10 eq.) zugegeben. Es wurde 30min gerührt und anschließend mit DCM verdünnt und mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM +0,1 % Et₃N). Das Produkt wurde als gelbes, viskoses Öl in einer Ausbeute von 31 % (1.60 g; 4.65 mmol) erhalten.^[128]

$$R_f(\text{DCM}) = 0.80$$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.47 (dd, J = 2.7, 1.0 Hz, 1H, C1'H), 5.01 (t, J = 2.6 Hz, 1H, C2'H), 4.86 (td, J = 2.7, 1.0 Hz, 1H, C3'H), 4.29 (td, J = 6.0, 2.8 Hz, 1H, C4'H), 3.69 (dd, J = 10.7, 5.7 Hz, 1H, C5'H₂), 3.56 – 3.47 (m, 1H, C5'H₂), 0.93 – 0.82 (m, 18H, tBu-Si-CH₃), 0.15 – 0.03 (m, 12H, Me-Si-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[128]

4.3.5 Verbindung 17

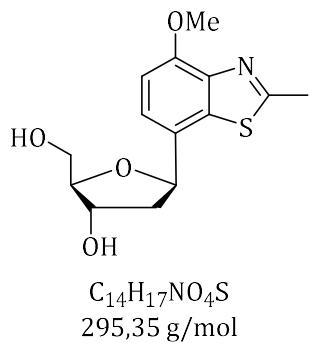


In einem ausgeheizten Vial wurden 800 mg **16** (2.32 mmol; 2.00 eq.), 300 mg **15** (1.16 mmol; 1.00 eq.) und 0.4 mL DIPEA (322 mg; 2.49 mmol; 2.15 eq.) unter Argon-Atmosphäre in 10 mL MeCN gelöst und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde 10 min mit Argon durchströmt, dann wurde 127 mg [Pd(dppf)Cl₂] (0.17 mmol; 0.15 eq.) hinzugefügt und für 96 h bei 85 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, *n*Hex:EE 6:1, +0.1 % Et₃N). Das Produkt wurde als Gemisch mit **14** als brauner Feststoff in einer Ausbeute von 44 % (270 mg; 0.52 mmol) erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.^[101, 103]

$$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 2:1) = 0.21$$

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom.}) 6.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom.}), 5.88 (dd, *J* = 3.8, 1.6 Hz, 1H, C1'H), 5.02 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, C2'H), 4.59 (ddt, *J* = 5.9, 4.3, 2.1 Hz, 1H, C4'H), 4.00 (s, 3H, O-CH₃), 3.90 (dd, *J* = 11.3, 2.3 Hz, 1H, C5'H₂), 3.81 (dd, *J* = 11.3, 5.3 Hz, 1H, C5'H₂), 2.80 (s, 3H, CH₃), 0.90 (d, *J* = 93.4 Hz, 18H, *t*Bu-Si-CH₃), -0.07 (d, *J* = 17.9 Hz, 12H, Me-Si-CH₃).

4.3.6 Verbindung 18



- 1) Unter Argon-Atmosphäre wurde 267 mg **17** (0.51 mmol; 1.00 eq) in 3 mL THF gelöst, 0.7 mL Et₃N·3HF (4.10 mmol; 8.00 eq.) hinzugefügt und 15 min bei 0°C gerührt. Dann wurde auf Raumtemperatur erhitzt und erneut 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, 6:1 nHex/ EE → 5:1 EE/MeOH). Erneut wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt.
- 2) Der Rückstand wurde in 5 mL EE/ MeCN (1:1) gelöst, auf 0°C gekühlt und 163 mg NaBH(OAc)₃ (0.77 mmol; 1.50 eq.) hinzugefügt. Es wurde erst 5 min bei 0°C, dann 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 10 mL EtOH/Wasser (1:1) hinzugefügt. Die Mischung wurde im Vakuum konzentriert, bis kein organisches Lösungsmittel mehr vorhanden war. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Im Anschluss wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM → DCM/MeOH 5:1). Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 60 % (91 mg; 0.31 mmol) als glasiger gelber Feststoff erhalten.^[101, 103]

R_f (nHex/EE 2:1) = 0.26

R_f (DCM/MeOH 5:1) = 0.74

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.97 (dd, J = 8.3, 3.0 Hz, 1H, CH_{arom}), 5.25 (td, J = 10.2, 5.8 Hz, 1H, C1'H), 4.32 (dt, J = 6.3, 2.2 Hz, 1H, C3'H), 3.99 (s, 4H, C4'H, O-CH₃), 3.82 – 3.68 (m, 2H, C5'H₂), 2.80 (d, J = 2.6 Hz, 3H, CH₃), 2.20 (ddd, J = 13.1, 5.5, 1.8 Hz, 1H, C2'H₂), 2.14 – 1.96 (m, 1H, C2'H₂).

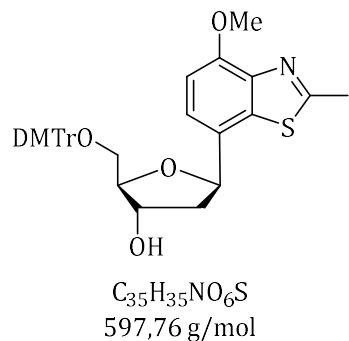
Experimentalteil

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 168.86, 153.53, 144.44, 134.53, 129.32, 128.53, 124.42, 107.95, 89.53, 80.60, 74.23, 64.00, 56.39, 42.79, 19.30.

2D-NMR (MeOD-*d*₄): COSY, HSQC, HMBC

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 296.0951 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 296.0941 [M+H⁺].

4.3.7 Verbindung 19



Unter Argon-Atmosphäre wurde 50 mg **18** (0.17 mmol; 1.00 eq.) in Pyridin gelöst, 86 mg DMT-Cl (0.25 mmol; 1.50 eq.) wurde hinzugegeben und für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , DCM → DCM + 5 % MeOH, + 0,1 % Et₃N). Das Produkt wurde als gelblicher Feststoff in einer Ausbeute von 52 % (53 mg; 0.09 mmol) erhalten.^[101]

$$R_f(\text{DCM}/\text{MeOH } 95:5) = 0.66$$

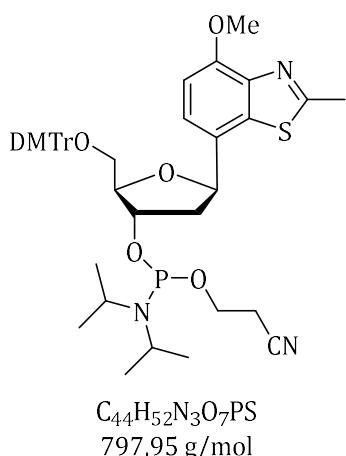
¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.49 – 7.41 (m, 2H, CH_{arom}), 7.37 – 7.28 (m, 7H, CH_{arom}), 7.29 – 7.05 (m, 5H, CH_{arom}), 6.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.84 – 6.76 (m, 5H, CH_{arom}), 5.29 (dd, *J* = 10.1, 5.7 Hz, 1H, C1'H), 4.35 (dt, *J* = 5.4, 2.3 Hz, 1H, C3'H), 4.12 (td, *J* = 4.8, 2.8 Hz, 1H, C4'H), 3.98 (s, 3H, O-CH₃), 3.76 (d, *J* = 4.7 Hz, 8H, C5'H₂, O-CH₃), 2.71 (s, 3H, CH₃), 2.25 – 2.06 (m, 2H, C2'H₂).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 168.91, 160.11, 153.53, 146.45, 144.50, 137.27, 134.55, 131.42, 130.45, 129.46, 129.36, 129.32, 128.72, 127.78, 124.45, 114.02, 107.88, 88.22, 87.52, 80.59, 74.45, 65.56, 56.40, 55.69, 42.63, 19.33.

2D-NMR (MeOD-*d*₄): COSY, HSQC, HMBC

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 598.2258 [M H⁺]; m/z (gefunden) = 598.2245 [M+H⁺].

4.3.8 Verbindung 3



Unter Argon-Atmosphäre wurde 181 mg **19** (0.30 mmol, 1.00 eq.) in 5 mL DCM gelöst, 0.2 mL DIPEA (137 mg; 1.06 mmol; 3.50 eq.) wurde hinzugefügt und 10 min bei RT gerührt. 110 µL 2-Cyano-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (108 mg; 0.46 mmol; 1.50 eq.) wurde hinzugegeben und für 4.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Hälfte der Zeit wurde die gleiche Menge DIPEA und Phosphoramidit hinzugefügt. Das Lösungsmittel wurde nach Beenden der Reaktion unter verminderterem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , DCM → DCM/Aceton 10:1; +0,1 % Et₃N). Das Produkt wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurde in einer Ausbeute von 68 % (165 mg; 0.21 mmol) als gelblicher Feststoff erhalten.^[101]

R_f (DCM/MeOH 95:5) = 0.74

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.52 – 7.43 (m, 2H, CH_{arom}), 7.39 – 7.18 (m, 8H, CH_{arom}), 7.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.84 (ddd, *J* = 8.8, 5.9, 2.9 Hz, 5H, CH_{arom}), 5.30 (dd, *J* = 10.0, 5.6 Hz, 1H, C1'H), 4.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, C3'H), 4.28 – 4.17 (m, 1H, C4'H), 4.00 (s, 3H, O-CH₃), 3.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 8H, iPr-CH, O-CH₃), 3.73 – 3.57 (m, 2H, PO-CH₂), 3.38 (dd, *J* = 16.0, 4.9 Hz, 2H, C5'H₂), 2.72 (d, *J* = 5.4 Hz, 3H, CH₃), 2.59 (dt, *J* = 10.6, 6.0 Hz, 2H, CN-CH₂), 2.47 – 2.30 (m, 2H, C2'H₂), 1.39 – 1.07 (m, 12H, iPr CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD-*d*₄) δ 148.16, 148.04.

2D-NMR (MeOD-*d*₄): COSY

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 798.3336 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 798.3311 [M+H⁺].

VIII. Ergänzende Analytik

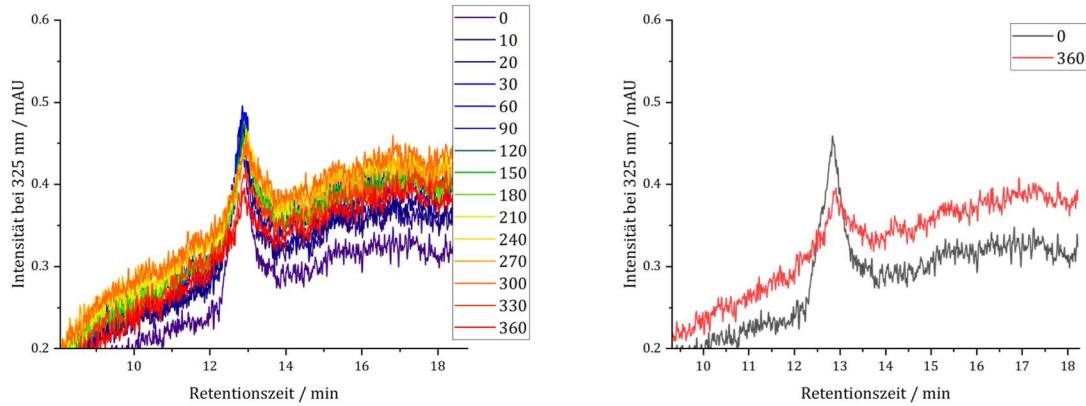


Abbildung A 1: Die RP-HPLC Analysen nach Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (6 h) mit der Absorption bei 325 nm beispielhaft mit DNA0-fdU-full: bei 12.5 min die abnehmende Absorption der fdU Modifikation durch die Umwandlung in cadU, links im vollständigen Verlauf über 6 h, rechts im Vergleich die Absorption zum Zeitpunkt 0 und nach 360 min.

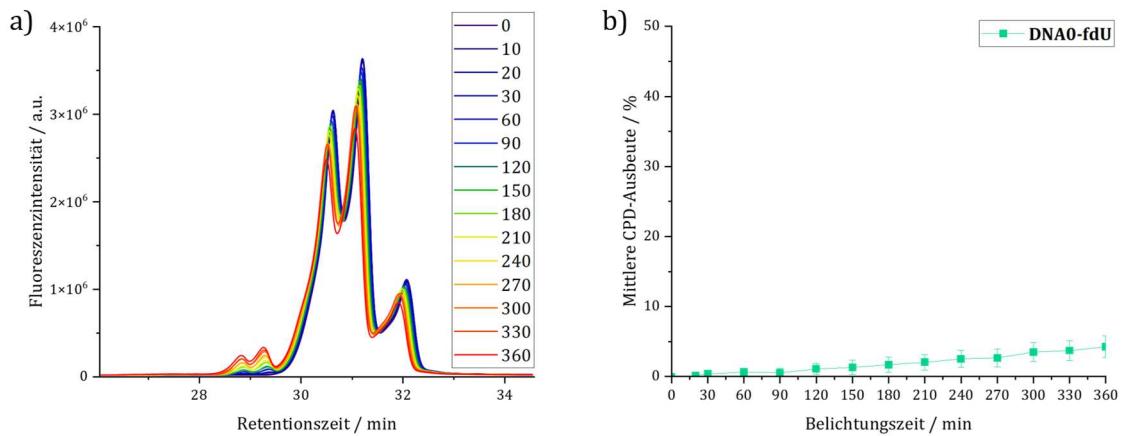


Abbildung A 2: RP-HPLC Chromatogramm bei der Fluoreszenz bei 576 nm von **DNA0-fdU** nach der Belichtung mit 310 nm über 6 h (360 min) a) Fluoreszenzintensität in den Chromatogrammen bei der Messung der Belichtungsproben von 0-360 min, b) Mittlerer CPD-Verlauf über 6 h (360 min).

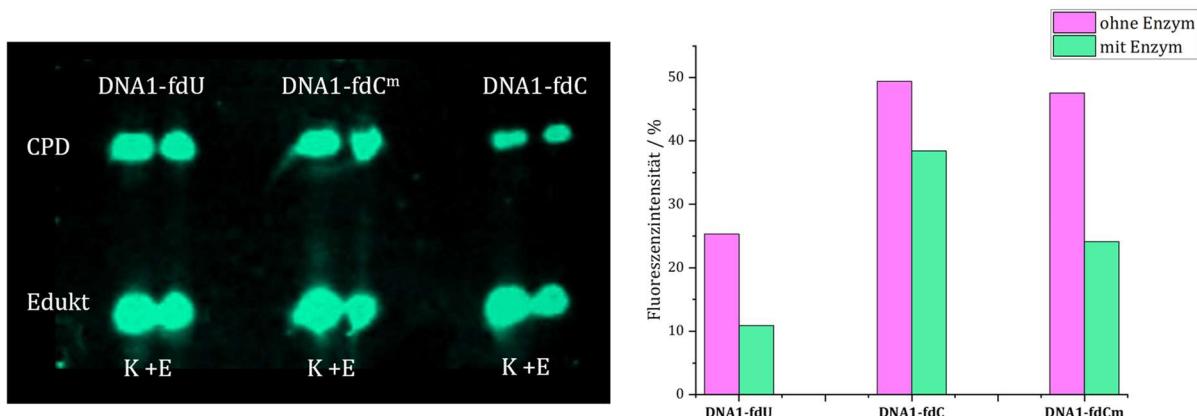


Abbildung A 3: PAGE-Analyse der Enzymexperimente mit **DNA1-fdU**, **DNA1-fdC** und **DNA1-fdC^m** nach 1 h Inkubationszeit und Fluoreszenzintensität der CPD-Banden (rechts).

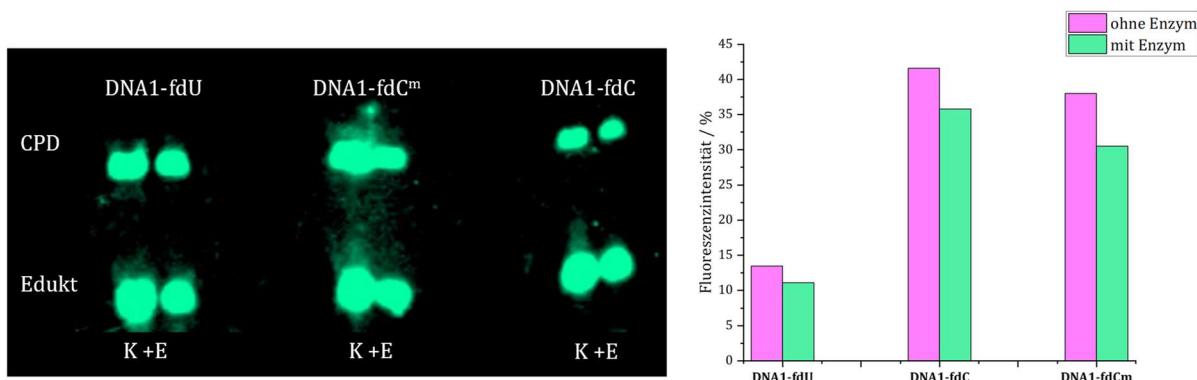


Abbildung A 4: PAGE-Analyse der Enzymexperimente mit **DNA1-fdU**, **DNA1-fdC** und **DNA1-fdC^m** nach 24 h Inkubationszeit und Fluoreszenzintensität der CPD-Banden (rechts).

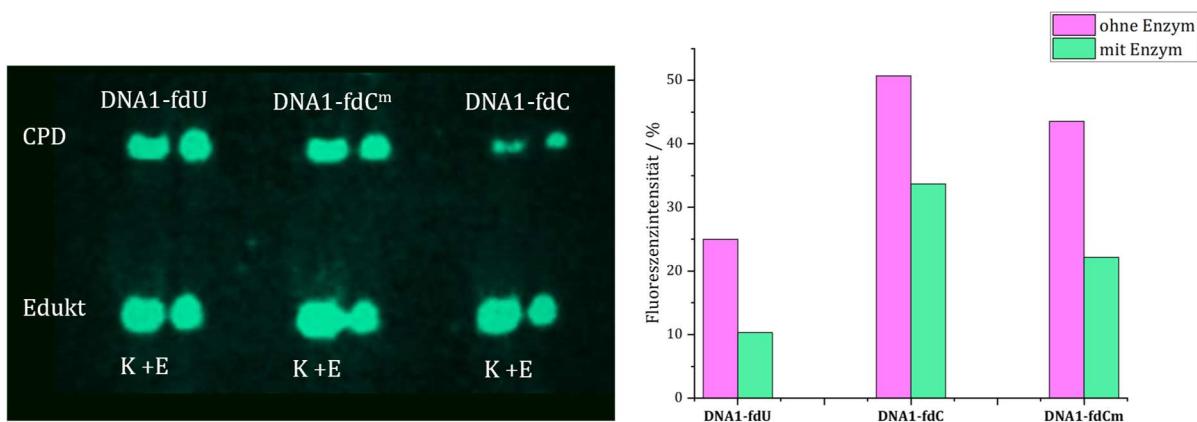


Abbildung A 5: PAGE-Analyse der Enzymexperimente mit **DNA1-fdU**, **DNA1-fdC** und **DNA1-fdC^m** nach 30 min Inkubationszeit bei doppelter Enzymkonzentration und Fluoreszenzintensität der CPD-Banden (rechts).

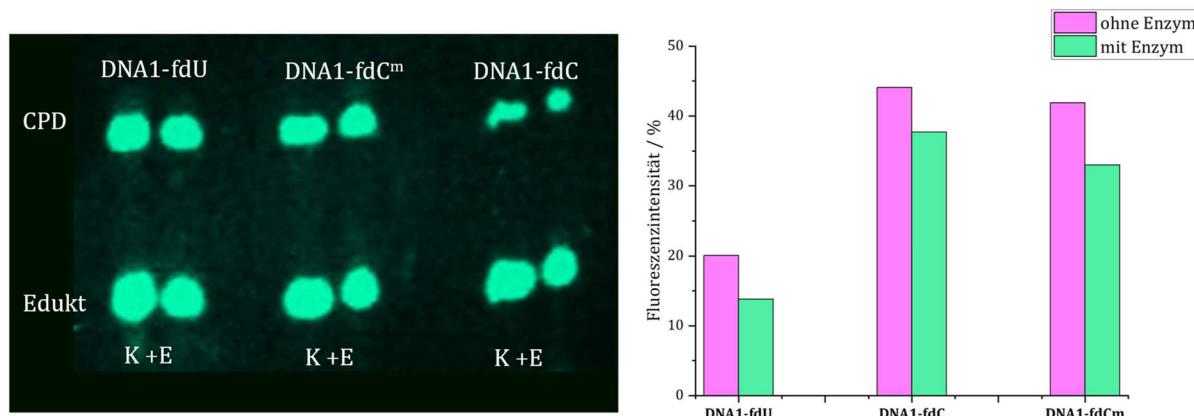


Abbildung A 6: PAGE-Analyse der Enzymexperimente mit **DNA1-fdU**, **DNA1-fdC** und **DNA1-fdC^m** nach 30 min Inkubationszeit und Behandlung mit heißem Piperidin für 1 h und Fluoreszenzintensität der CPD-Banden (rechts).

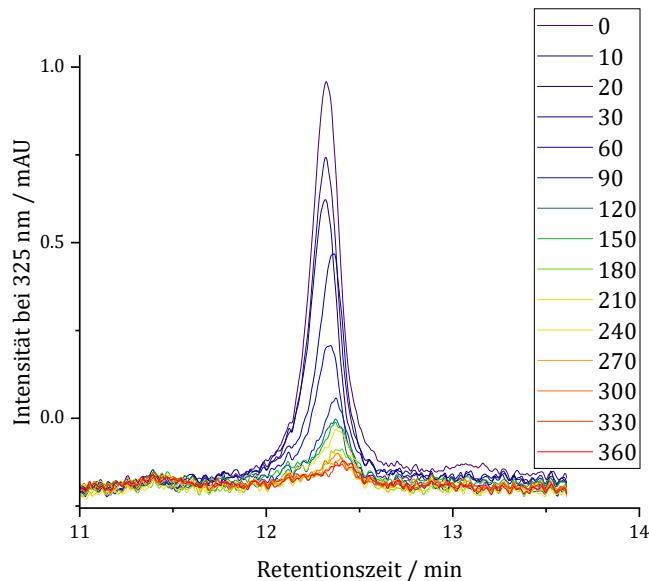


Abbildung A 7: RP-HPLC Chromatogramm bei der Absorption von 325 nm beispielhaft **DNA0-Pyo** mit sinkender Intensität des Peaks bei 12.3 min durch die Umwandlung von Pyo in das DEWAR-Isomer.

Ergänzende Analytik

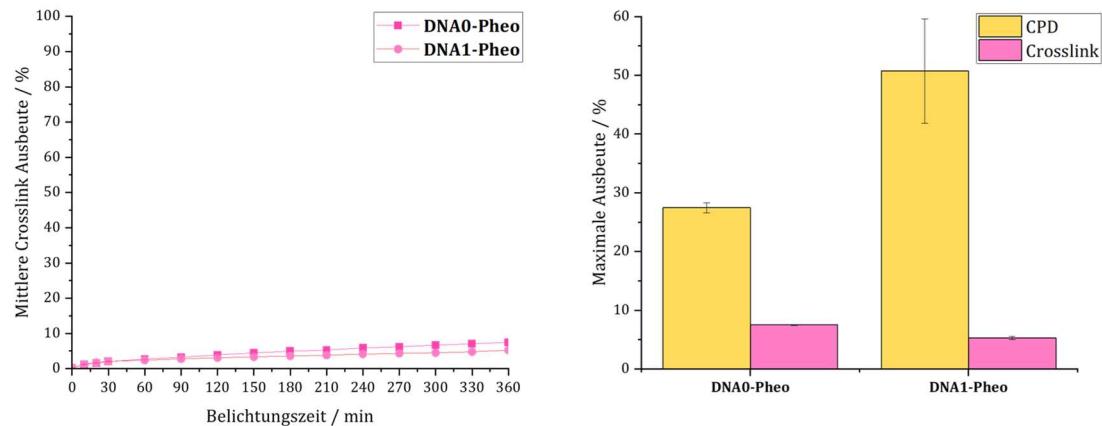


Abbildung A 8: Mittlere *Crosslink*-Ausbeute der DNA-Hybride **DNA0-Pheo** und **DNA1-Pheo** (links) und Vergleich der Maximalausbeuten der beiden DNA-Hybride nach 6 h von CPD-Schäden (gelb) und *Crosslinks* (pink) (rechts).

IX. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Celsius (Temperatur)
µL	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
µm	Micrometer
µs	Microsekunde
µW	Microwatt
A	Angeregter Zustand
Å	Angström
a.u.	willkürliche Einheit (engl. <i>arbitrary unit</i>)
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
Ag ₂ O	Silber(I)oxid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
arom.	aromatisch
BrN(nBu) ₄	Tetrabutylammoniumbromid
Bu	Butyl
cadC	5-Carboxy-2'-desoxycytosin
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
CPG	Glaskügelchen definierter Porengröße; engl. <i>Controlled Pore Glass</i>
CT	Ladungstransfer (engl. <i>charge transfer</i>)
CuBr ₂	Kupfer(II)bromid
d	Dublett (NMR)
dA	2'-Deoxy-adenosin
dC	2'-Deoxy-cytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan

Abkürzungsverzeichnis

ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dG	2'-Desoxy-guanosin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dR	Desoxyribose
dT	Thymidin
DTT	Dithiothreitol
dU	2'-Desoxyuridin
E	Energie
EDTA	Ethyldiaminetetraacetat
EE	Ethylacetat
EnT	Energietransfer
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronensprayionisation
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
Et ₃ N	Triethylamin
fdC	5-Formyl-2'-desoxycytosin
fdU	5-Formyl-2'-desoxyuracil
FRET	FÖRSTER-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
G	Grundzustand
ges.	gesättigt
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
HCl	Salzsäure
HF	Flusssäure
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
hmdC	5-Hydroxymethyl-2'-desoxycytosin
HOAc	Essigsäure
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (engl. <i>highest occupied molecular orbital</i>)

HR	Hochauflösend (engl. <i>high resolution</i>)
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
I	Intensität
ISC	Interkombination (engl. <i>Intersystem crossing</i>)
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin (Temperatur)
L	Liter
LED	Licht-emittierende Diode
Ludox	kolloidales Silica
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (engl. <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
m	Multiplett (NMR)
M	mol pro Liter (Molar)
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
mdC	5 Methyl-2'-desoxycytidin
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeI	Methyliodid
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minuten
mL	Milliliter
mmol	Millimol
M ⁿ⁺	Molekülion einer Ladung n+
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
mW	Milliwatt
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat (wasserfrei)
NaBH(OAc) ₃	Natriumtriacetoxyborhydrat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)

Abkürzungsverzeichnis

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaIO ₄	Natriumperiodat
NaOH	Natriumhydroxid
NaP _i	Natriumphosphat-Puffer
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -Oxid
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOS	NO-Synthase
NOX	NADPH Oxidase
ns	Nanosekunde
OAc	Acetat
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
Pd[dppf]Cl ₂	[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichlorpalladium(II)
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
Pheo	Aus Pheomelanin abgewandeltes Benzothiazol-Derivat
PPh ₃	Triphenylphosphin
ppm	<i>parts per million</i>
Pr	Propyl
<i>p</i> TsOH	<i>para</i> Toluolsulfonsäure
Pyo	1-(β -D -2'-Desoxyribosyl)-5methyl-2-pyrimidone
quant.	quantitativ
R	Kernkoordinate
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
<i>sec</i> BuLi	<i>sec</i> -Butyllithium
SET	Einelektronentransfer (engl. <i>single electron transfer</i>)

SiO_2	Kieselgel (Silica)
Smp	Schmelzpunkt
S_n	Angeregte Singulett-Zustände
t	Zeit
t	Triplet (NMR)
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	Tertbutyldimethylsilan
tBuOH	<i>tert</i> Buthanol
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TET	<i>Ten-Eleven Translocation</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TMS-OTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
T_n	Angeregte Triplet-Zustände
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
Vis	sichtbares Licht
VR	Schwindungsrelaxation oder auch vibronische Relaxation
vs.	<i>versus</i>
W	Watt
δ	chemische Verschiebung
ΔOD	Differenz der Optischen Dichte
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*^[a] und den von der IUPAC-IUB-Kommission^[b] empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden kursiv dargestellt. Als Dezimaltrennzeichen werden in dieser Arbeit Punkte statt Kommata verwendet.

^[a] Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

^[b] IUPAC *Commission on Nomenclature of Organic Chemistry* (CNOC)

X. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fiktiver genmutierter Superheld mit DNA-Doppelhelix, die Bildrechte liegen bei M. Schrödter.....	1
Abbildung 2: Entstehung eines CPD-Schadens durch direkte Absorption oder über die Energieübertragung durch einen Photosensibilisator nach der Bestrahlung mit UV-Strahlung. ^[7]	2
Abbildung 3: JABLONSKI-Diagramm mit der Darstellung der photophysikalischen Prozesse aus dem energetischen Grundzustand (S_0) in die angeregten Singulett- (S_1 und S_2) sowie Triplet-Zustände (T_1 und T_2): Absorption, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Innere Umwandlung (<i>Internal Conversion IC</i>), Vibronische Relaxation (VR), Interkombination (<i>Intersystem Crossing ISC</i>).	6
Abbildung 4: Morsepotential des Grundzustandes and angeregten Zustandes eines fiktiven Moleküls mit den Vibrationswellenfunktionen der Niveaus 0-2 und der Absorption (blau) des wahrscheinlichsten Überganges (links) sowie möglicher Absorptionsbanden der verschiedenen Übergänge in einem Absorptionsspektrum (rechts).....	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung des <i>Single Electron Transfer</i> (SET) Prozess, bei dem ein Elektron von einem angeregten Donormolekül auf den Akzeptor übertragen wird (links) und schematischer Energietransfer (EnT) bei dem das angeregte Donormolekül die Anregungsenergie auf den Akzeptor überträgt (rechts).....	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Energy-Hopping-Mechanismus zwischen zwei Strängen (rot) und innerhalb desselben Stranges (blau), ausgelöst durch die Anregung eines Thymidins durch einen Triplet-Photosensibilisator (sens, grau) in einem Oligonukleotid.	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufes einer Laser-Flash Photolyse mit der Anregung der Moleküle vom Grundzustand (G) in angeregte Zustände (A), und einem zweitem Laserpuls zur Messung der Relaxation in den Grundzustand nach definierter Zeit (t_1).....	15
Abbildung 8: DNA-Basen, links Purine 2'-Desoxy-adenosin (dA) und 2'-Desoxy-guanosin (dG), rechts Pyrimidine Thymidin (dT) und 2'-Desoxy-cytidin (dC) mit als abgekürztem Zucker (dR, Desoxyribose) und ihre Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken nach der WATSON-CRICK Basenpaarung.....	17
Abbildung 9: Unterschiedliche DNA-Basenpaarungen am Beispiel von 9-Methyladenin und 1-Methylthymidin.....	17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 10: Elektromagnetisches Spektrum, hervorgehobenes sichtbares Spektrum (VIS, regenbogenfarben) und UV-Spektrum (violett) ^[43]	19
Abbildung 11: Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Enzyme und FENTON Reaktion und Beispiele für oxidative DNA-Schäden: Strangbrüche (oben), 8-oxo-dG (Mitte oben), Fapy (Mitte unten) und Carboxythymidin (unten) ^[46a, 50]	21
Abbildung 12: Produkte nach Anregung mit UV-Licht von Nukleosiden am Beispiel von zwei Thymidin-Basen: CPD-Schäden (links, rot), (6-4)-Photoläsionen (mittig, hellblau) und DEWAR Isomeren (rechts, dunkelblau)	22
Abbildung 13: Reaktionsschema zur Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPD) gezeigt in der <i>cis-syn</i> Form, die sich in natürlicher DNA bevorzugt bildet.....	22
Abbildung 14: Reaktionsweg zweier benachbarter Thymidine zur (6-4)-Photoläsion und anschließende Isomerisierung in das DEWAR-Isomer	24
Abbildung 15: Schematische Darstellung eines Phosphoramidit-Bausteins zur DNA-Synthese, beispielhaft mit 2'-Desoxycytidin als Base, mit DMT-Schutzgruppe (rot), basenlabiler Schutzgruppe an der Phosphoramiditspezies (blau) und basenlabiler Schutzgruppe (Für dC Benzoyl) an der Base (blau). ^[70]	26
Abbildung 16: Reaktionszyklus einer Phosphoramiditsynthese beispielhaft an dem ersten an CPG angebrachten Nukleosid mit Base 1 (B ₁) ^[75]	27
Abbildung 17: Übersicht der modifizierten 2'-Desoxycytosine: 5-Methyl-2'-desoxycytosin (mdC), 5-Hydroxymethyl-2'-desoxycytosin (hmdC), 5-Formyl-2'-desoxycytosin (fdC) und 5-Carboxy-2'-desoxycytosin (cadC) mit hervorgehobener Modifizierung.....	29
Abbildung 18: Mögliche Photosensibilisatoren, der oxidative Schaden 5-Formyl-2'-desoxyuracil (fdU) und die (6-4)-Photoläsion, hier beispielhaft als T(6-4)T-Schaden dargestellt.....	30
Abbildung 19: Zwei Monomereinheiten: Eumelanin (5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure, DHICA) und Pheomelanin (Benzothiazin-Einheit aus der Cyclisierung von 5-Cysteinyl-Dopamin) mit angezeigten Verknüpfungspunkten zu weiteren Monomeren ^[87]	31
Abbildung 20: Photodegradadtions-Produkte von Eumelanin (DHICA Umwandlung zu Pyrrol-Derivat, oben) und Pheomelanin (Umwandlung Benzothiazin-Derivat in Benzothiazol-Derivat, unten), gelb markiert die Benzothiazol Spezies als möglicher Photosensibilisator. ^[90]	32
Abbildung 21: Die in dieser Arbeit untersuchten möglichen Photosensibilisatoren Formyl-2'-desoxycytidin (fdC), Formyl-2'-desoxyuracil (fdU), 1-(β -D -2'-Desoxyribosyl)-5-methyl-2-pyrimidon (Pyo) und das 2'-Desoxyribofuranosid-modifizierte Pheomelanin-Benzothiazol-Derivat (Pheo).....	33

Abbildung 22: Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten Phosphoramidite für fdU 1a , Pyo 2 und Pheo 3	35
Abbildung 23: Synthese des geschützten fdU-Phosphoramidits 1a nach SUGIYAMA: a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, 12 h, 91 %; b) Pd(OAc) ₂ , PPh ₃ , Vinylacetat, Et ₃ N, DMF, 70 °C, 16 h, 67 %; c) NMO, OsO ₄ , Aceton/H ₂ O/tBuOH 4:1:1, 22 °C, 22 h, 87 %; d) Ac ₂ O, Pyridin, RT.; 22 h, 85 %; e) TBAF (1 M in THF), HOAc, THF, RT, 16 h; f) DMT-Cl, Pyridin, RT, 16 h; g) (CNET)P(N(iPr) ₂) ₂ , 4,5-Dicyanoimidazol, DCM, RT, 5 h, 98 %.....	36
Abbildung 24: Post-DNA-synthetische Umwandlung von 1b in Formyl-2'-desoxyuracil: a) NaOH, MeOH/ H ₂ O (4:1), RT, 17 h; b) NaIO ₄ , H ₂ O, 4 °C, 30 min. ^[94]	38
Abbildung 25: Syntheseroute des DMT-geschützten Pyo-Nukleosids 11 nach LHIAUBET-VALLET: a) POCl ₃ , 1,2,4-Triazol, Et ₃ N, MeCN, 0 °C, 4 h; b) Hydrazin, Dioxan, 0 °C nach RT, 90 min; c) Ag ₂ O, Dioxan, 101 °C, 4 h; d) Et ₃ N·3HF, THF, 4 h, RT, e) DMT-Cl, Pyridin, RT, 16 h. ^[85a]	40
Abbildung 26: Synthese des Pyo-Phosphoramidites 2 : a) (CNET)P(N(iPr) ₂) ₂ , 4,5-Dicyanoimidazol, DCM, RT., 5 h, 80 %.....	40
Abbildung 27: Synthese für das Phosphoramidit des Pheomelaninmonomer-Derivats (Pheo) 3 : a) BrN(<i>n</i> Bu) ₄ , CuBr ₂ , <i>p</i> -TsOH, <i>t</i> BuONO, MeCN, RT, 1 h, 90 %; b) secBuLi, MeI, THF, -78 °C, 2 h, 75 %; c) NBS, MeCN, RT, 16 h, 99 %; d) Glykal 16 , Pd[dppf]Cl ₂ , DIPEA, MeCN, 85 °C, 96 h, 44 %; e) Et ₃ N·3HF, THF, 0 °C, 16 h, 99 %; f) NaBH(OAc) ₃ , EE/ MeCN 1:1, RT, 40 min, 60 %; g) DMT-Cl, Pyrimidin, RT, 16 h, 52 %; h) (CNEt)PN(iPr) ₂ Cl, DIPEA, DCM, RT, 5 h, 68 %. .43	
Abbildung 28: Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Architektur mit variierender Anzahl an A-T Basenpaaren zwischen dem Photosensibilisator X (blau) und der designierten Schadensstelle T T (rot).....	47
Abbildung 29: Schematische Darstellung der Schmelztemperaturanalyse der DNA-Hybride mit zwei unterschiedlichen Schmelztemperaturen, T _{m1} (rot) für den kurzen Gegenstrang und T _{m2} (blau) für den langen Gegenstrang.....	50
Abbildung 30: DNA0-T und DNA0-C mit jeweiligen Gegensträngen als Negativproben für die Bildung von CPD-Schäden bei Belichtung mit den in dieser Arbeit verwendeten LEDs bei 325 nm und 310 nm	51
Abbildung 31: Mutmaßliche Verschiebung der Retentionszeiten durch die Isomerenzusammensetzung von Atto550 in Zusammenhang der Elutionszeit auf der RP-HPLC als drei sichtbare Peaks.....	53
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Absorptionsanalyse bei 260 nm durch RP-HPLC nach 6 h Belichtung mit den jeweiligen zugeordneten DNA-Strängen, beispielhaft mit DNA0-fdC : Der Photosensibilisatorstrang (blau), der Atto-markierte Eduktstrang (gelb), der 6-mer Gegenstrang (grün) und der verlängerte Produktstrang (rot).....	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 33: Schematische Darstellung einer PAGE-Analyse der DNA-Hybride bei drei verschiedenen Belichtungszeiten: Eduktstrang ohne Belichtung (links), Eduktstrang hoher Konzentration und Produktstrang bei verkürzter Gellaufänge zu Zeitpunkt t ₁ (mitte), Produktstrang hoher Konzentration bei verkürzter Gellaufänge und Eduktstrang zu Zeitpunkt t ₂ (rechts).....	55
Abbildung 34: Verwendete DNA-Hybride der Photosensibilisatoren Formyl-2'-desoxyuracil (fdU) und Formyl-2'-desoxycytidin (fdC) mit den natürlichen Basenpaarungen in DNA_n-fdU und DNA_n-fdC , sowie der Fehlpaarung in DNA_n-fdC^m . Der Buchstabe n gibt die Anzahl der A-T-Basen an und variiert von 0 bis 5.....	56
Abbildung 35: a) CPD-Ausbeute der fdU-DNA-Hybride DNA_n-fdU im Verlauf über 6 h Belichtungszeit, b) Die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride nach 6 h Belichtungszeit. Mit angepasstem Verlauf der Maximalausbeuten und in deutscher Übersetzung mit Genehmigung übernommen aus der Publikation von M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2024 , Copyright 2024 American Chemical Society.....	58
Abbildung 36: Die RP-HPLC Analysen nach Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (6 h) mit der Absorption bei 260 nm der fdU-DNA-Hybride beispielhaft mit DNA₃-fdU : bei 11.5 min 6-mer Strang, 12.5 min umgewandelter fdU Strang, 13.2 min fdU-Strang, 29 min Atto-markierter CPD-Produktstrang, 30 min Atto-markierter Eduktstrang.....	59
Abbildung 37: Photochemische Umwandlung der Formyl-2'-desoxyuridin-Modifikation(fdU) in die Carbonsäure-Modifikation (cadU) bei der Belichtung mit 325 nm in wässriger Salz-Phosphatpuffer-Lösung	60
Abbildung 38: DNA₀-fdU-full im Chromatogramm mit der Absorption bei 260 nm der RP-HPLC von 0 min bis 360 min Belichtungszeit (links): 11.2 min cadU-Strang, 12.4 min fdU-Strang, 29.4-30.5 min Atto-markierter Strang. Im Fluoreszenzchromatogramm (rechts): 29.4-30.5 min Atto-markierter Strang.....	62
Abbildung 39: DNA₀-fdU-full* im RP-HPLC Chromatogramm mit der Absorption bei 260 nm von 0 min bis 360 min Belichtungszeit: 11-12 min cadU-Strang und CPD-Strang, 12-14 min fdU-Strang und fdU-Gegenstrang sowie die jeweilige Basenabfolgen der einzelnen Stränge.	63
Abbildung 40: RP-HPLC-Analysen nach Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (6 h) mit der Absorptionsmessung bei 260 nm der fdC-DNA-Hybride beispielhaft mit DNA₀-fdC : bei 17.0 min 6-mer Strang, 17.7 min fdC-Strang, 46.2 min Atto-markierter Produktstrang, 47.2 min Atto-markierter Eduktstrang.....	66
Abbildung 41: a) CPD-Ausbeute der fdC-DNA-Hybride mit dG als Gegenbase DNA_n-fdC im Verlauf über 6 h Belichtungszeit; b) Die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride. Mit	

angepasstem Verlauf der Maximalausbeuten und in deutscher Übersetzung mit Genehmigung übernommen aus der Publikation von M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2024 , Copyright 2024 American Chemical Society.	67
.....	
Abbildung 42: Unterschied in der Analyse der CPD-Ausbeuten im Vergleich zwischen analytischer RP-HPLC und PAGE-Analyse (links) und Darstellung der im Polyacrylamid beobachteten elektrophoretischen Mobilität des kürzeren und durch CPD-Bildung verlängerten fluoreszenzmarkierten Stranges am Beispiel von DNA2-fdC bei Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (rechts).	68
.....	
Abbildung 43: Schematische Darstellung des Selbst-Reparatur-Mechanismus in der DNA mit Guanin direkt benachbart zu den beiden T-T Basen. ^[58a]	69
.....	
Abbildung 44: a) CPD-Ausbeute der fdC ^m -DNA-Hybride mit dA als Gegenbase DNA_n-fdC^m im Verlauf über 6 h Belichtungszeit; b) Die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride. Mit angepasstem Verlauf der Maximalausbeuten und in deutscher Übersetzung mit Genehmigung übernommen aus der Publikation von M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2024 , Copyright 2024 American Chemical Society.	70
.....	
Abbildung 45: Mechanismus der T4 Endonuklease V unter Bildung eines Strangbruches an der Stelle eines CPD-Schadens in DNA. ^[59a]	73
.....	
Abbildung 46: Polyacrylamid-Gel von DNA1-fdU , DNA1-fdC^m , DNA1-fdC (links) und Ausbeute der CPD-Schäden nach 6 h Belichtung mit (grün) und ohne Enzym (pink) (rechts).	74
.....	
Abbildung 47: Mögliche photochemische Reaktionswege eines (6-4)-Photoschadens, hier beispielhaft T(6-4)T, bei Bestrahlung mit Licht im UV-A Spektrum, oben der Triplet-Triplet-Energietransfer zur CPD Bildung, unten die Isomerisierung in das DEWAR-Isomer.	77
.....	
Abbildung 48: Verwendetes DNA-Hybrid mit der Modifikation Pyo als Photosensibilisator, Adenosin als Gegenbase und n = 0-1 A-T-Paare (0-4 Basen) zwischen dem Photosensibilisator und der Schadensstelle DNA_n-Pyo	77
.....	
Abbildung 49: a) CPD-Ausbeute der Pyo-DNA-Hybride im Verlauf über 6 h Belichtungszeit; b) Die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride.....	78
.....	
Abbildung 50: RP-HPLC Analysen nach Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (6 h) bei Detektion der Absorption bei 260 nm der Pyo-DNA-Hybride beispielhaft mit DNA0-Pyo : Bei 11.7 min 6-mer Strang, 12.8 min Pyo Strang, 13.5 min neues Maximum des umgesetzten Pyo-Stranges, 29 min Crosslinks, 33 min Atto-markierter Gegenstrang.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 51: Maximale CPD-Ausbeute der DNA-Hybride DNA0-Pyo und DNA1-Pyo und der korrespondierende CPD-Strang (blau) sowie maximale <i>Crosslink</i> -Ausbeute für DNA0-Pyo und DNA1-Pyo mit vorgeschlagener Zusammensetzung der <i>Crosslink</i> -Stränge (pink).....	80
Abbildung 52: Das DNA0-Pyo-a Oligonukleotid und das DMT-geschützte Nukleosid 11 für die spektroskopischen Untersuchungen.....	82
Abbildung 53: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von DNA0-Pyo-a (links) und DMT-Pyo (rechts), mit einer 43 µM DNA-Lösung und einer 191 µM Lösung von 11 für die Fluoreszenzspektroskopie und einer 214 µM DNA-Lösung sowie einer 200 µM Lösung von 11 in der Phosphoreszenzspektroskopie, jeweils in ddH ₂ O.....	83
Abbildung 54: Fluoreszenzlebenszeit berechnet durch den exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität über 20 ns, links mit einer 43 µM Lösung von DNA0-Pyo-a , rechts mit einer 191 µM Lösung von Nukleosid 11	84
Abbildung 55: Transiente Absorptionsspektren von DNA0-Pyo-a unter Stickstoff Atmosphäre (links), Luft (rechts) und Sauerstoff-Atmosphäre (unten) von 0.5 bis 2.3 µs unter Verwendung einer 420 µM Lösung.....	85
Abbildung 56: Transiente Absorptionsspektren von 11 unter Stickstoff Atmosphäre (links) und Luft (rechts), von 2 bis 10.7 µs unter Verwendung einer 450 µM Lösung.....	86
Abbildung 57: Triplett-Lebenszeiten von DNA0-Pyo-a zwischen 0.4 bis 2 µs (links) und DMT-Pyo zwischen 0.4 bis 30 µs (rechts) jeweils bei einer Absorbanz von 420 nm.....	86
Abbildung 58: Durch UV-A Licht in die Benzothiazol-Form umgewandeltes Pheomelanin in einem Polymer mit Pfeilen als Indikation für die Verknüpfung weiterer Monomere.....	89
Abbildung 59: Verwendetes DNA-Hybrid mit der Modifikation Pheo als Photosensibilisator, Adenosin als Gegenbase und n = 0-1 A-T-Paar (0-4 Basen) zwischen dem Photosensibilisator und der Schadensstelle DNA_n-Pheo	90
Abbildung 60: Normierte Absorbanz des Nukleosids 18 (gelb, rechts) und die verwendete LED bei 325 nm (lila)	90
Abbildung 61: CPD-Ausbeuten der Pheo-DNA-Hybride DNA_n-Pheo im Verlauf über 6 h Belichtungszeit (links) und die Maximalausbeute der verschiedenen Hybride (rechts)....	91
Abbildung 62: Die in dieser Arbeit verwendeten modifizierten Nukleoside und die jeweiligen Oligonukleotide DNA_n-X mit den beiden Gegensträngen der ternären DNA-Architektur, die Anzahl der A-T-Basen n wurden in DNA_n-fdU , DNA_n-fdC und DNA_n-fdC^m von 0 bis 5 und in DNA_n-Pyo und DNA_n-Pheo von 0 bis 1 variiert.....	93
Abbildung 63: Maximale CPD-Ausbeuten in % der verschiedenen „natürlichen“ Photosensibilisatoren in den DNA-Hybridien DNA_n-fdU (Türkis), DNA_n-fdC (Pink), DNA-fdC^m (Lila), DNA_n-Pyo (blau) und DNA_n-Pheo (gelb).....	96

Abbildung A 1: Die RP-HPLC Analysen nach Belichtungszeiten von 0 min bis 360 min (6 h) mit der Absorption bei 325 nm beispielhaft mit DNA0-fdU-full: bei 12.5 min die abnehmende Absorption der fdU Modifikation durch die Umwandlung in cadU, links im vollständigen Verlauf über 6 h, rechts im Vergleich die Absorption zum Zeitpunkt 0 und nach 360 min.	139
.....	
Abbildung A 2: RP-HPLC Chromatogramm bei der Fluoreszenz bei 576 nm von DNA0-fdU nach der Belichtung mit 310 nm über 6 h (360 min) a) Fluoreszenzintensität in den Chromatogrammen bei der Messung der Belichtungsproben von 0-360 min, b) Mittlerer CPD-Verlauf über 6 h (360 min).....	139
Abbildung A 3: PAGE-Analyse der Enzymexperimente mit DNA1-fdU , DNA1-fdC und DNA1-fdC^m nach 1 h Inkubationszeit und Fluoreszenzintensität der CPD-Banden (rechts).....	140
Abbildung A 4: PAGE-Analyse der Enzymexperimente mit DNA1-fdU , DNA1-fdC und DNA1-fdC^m nach 24 h Inkubationszeit und Fluoreszenzintensität der CPD-Banden (rechts).....	140
Abbildung A 5: PAGE-Analyse der Enzymexperimente mit DNA1-fdU , DNA1-fdC und DNA1-fdC^m nach 30 min Inkubationszeit bei doppelter Enzymkonzentration und Fluoreszenzintensität der CPD-Banden (rechts).....	140
Abbildung A 6: PAGE-Analyse der Enzymexperimente mit DNA1-fdU , DNA1-fdC und DNA1-fdC^m nach 30 min Inkubationszeit und Behandlung mit heißem Piperidin für 1 h und Fluoreszenzintensität der CPD-Banden (rechts).....	141
Abbildung A 7: RP-HPLC Chromatogramm bei der Absorption von 325 nm beispielhaft DNA0-Pyo mit sinkender Intensität des Peaks bei 12.3 min durch die Umwandlung von Pyo in das DEWAR-Isomer.....	141
Abbildung A 8: Mittlere <i>Crosslink</i> -Ausbeute der DNA-Hybride DNA0-Pheo und DNA1-Pheo (links) und Vergleich der Maximalausbeuten der beiden DNA-Hybride nach 6 h von CPD-Schäden (gelb) und <i>Crosslinks</i> (pink) (rechts).	142
.....	
Abbildung SI 1: ¹ H-NMR von Verbindung 5	172
Abbildung SI 2: ¹ H-NMR von Verbindung 6	174
Abbildung SI 3: ¹ H-NMR von Verbindung 7	176
Abbildung SI 4: ¹ H-NMR von Verbindung 8	178
Abbildung SI 5: ¹ H-NMR von Verbindung 9	180
Abbildung SI 6: ¹ H-NMR von Verbindung 10.....	182
Abbildung SI 7: ¹ H-NMR von Verbindung 1a.....	184
Abbildung SI 8: ³¹ P-NMR von Verbindung 1a.....	184

Abbildungsverzeichnis

Abbildung SI 9: MALDI Analyse von Verbindung 1a.....	185
Abbildung SI 10: ^1H -NMR von Verbindung 2.....	187
Abbildung SI 11: ^{31}P -NMR von Verbindung 2	187
Abbildung SI 12: MALDI Analyse von Verbindung 2.....	188
Abbildung SI 13: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 2.....	188
Abbildung SI 14: ^1H -NMR von Verbindung 13.....	190
Abbildung SI 15: ^{13}C -NMR von Verbindung 13.....	190
Abbildung SI 16: ^1H -NMR von Verbindung 14.....	192
Abbildung SI 17: ^{31}P -NMR von Verbindung 14.....	192
Abbildung SI 18: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 14.....	193
Abbildung SI 19: ^1H -NMR von Verbindung 15.....	195
Abbildung SI 20: ^{13}C -NMR von Verbindung 15.....	195
Abbildung SI 21: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 15.....	196
Abbildung SI 22: ^1H -NMR von Verbindung 16.....	197
Abbildung SI 23: ^1H -NMR von Verbindung 17.....	198
Abbildung SI 24: ^1H -NMR von Verbindung 18.....	200
Abbildung SI 25: ^{13}C -NMR von Verbindung 18.....	200
Abbildung SI 26: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 18.....	201
Abbildung SI 27: ^1H -NMR von Verbindung 19.....	203
Abbildung SI 28: ^{13}C -NMR von Verbindung 19.....	203
Abbildung SI 29: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 19.....	204
Abbildung SI 30: ^1H -NMR von Verbindung 3.....	206
Abbildung SI 31: ^{13}C -NMR von Verbindung 3	206
Abbildung SI 32: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 3.....	207
Abbildung SI 33: Absorbanz von Nukleosid 18 bei verschiedenen Konzentrationen zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 260 nm.....	208
Abbildung SI 34: Berechnung des Extinktionskoeffizienten des Nukleosids 18 durch eine lineare Fit Funktion.....	208
Abbildung SI 35: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA0-fdU a, gesucht [M]: 4612.0 gefunden: 4613.8	209
Abbildung SI 36: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA1-fdU a, gesucht [M]: 5229.1 gefunden: 5231.7	210
Abbildung SI 37: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA2-fdU a, gesucht [M]: 5846.2 gefunden: 5852.9	211

Abbildung SI 38: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA3-fdU a, gesucht [M]: 6463.3 gefunden: 6467.3	212
Abbildung SI 39: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA4-fdU a, gesucht [M]: 7080.4 gefunden: 7085.3	213
Abbildung SI 40: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA5-fdU a, gesucht [M]: 7697.5 gefunden: 7709.0	214
Abbildung SI 41: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 320 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA0-Pyo a, gesucht [M]: 4582.0 gefunden: 4583.7.....	215
Abbildung SI 42: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 320 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA1-Pyo a, gesucht [M]: 5199.1 gefunden: 5205.5.....	216
Abbildung SI 43: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA0-Pheo a, gesucht [M]: 4651.1 gefunden: 4657.5.....	217
Abbildung SI 44: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA0 Pheo a, gesucht [M+K ⁺]: 5308.2 gefunden: 5306.1.....	218
Abbildung SI 45: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-T sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	219
Abbildung SI 46: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-C sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	219
Abbildung SI 47: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	220
Abbildung SI 48: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	220
Abbildung SI 49: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA2-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	220
Abbildung SI 50: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA3-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	221
Abbildung SI 51: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA4-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	221
Abbildung SI 52: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA5-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	221
Abbildung SI 53: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	222
Abbildung SI 54: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	222

Abbildungsverzeichnis

Abbildung SI 55: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA2-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	222
Abbildung SI 56: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA3-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	223
Abbildung SI 57: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA4-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	223
Abbildung SI 58: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA5-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	223
Abbildung SI 59: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-fdC ^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink Produkte.....	224
Abbildung SI 60: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-fdC ^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink Produkte.....	224
Abbildung SI 61: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA2-fdC ^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	224
Abbildung SI 62: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA3-fdC ^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	225
Abbildung SI 63: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA4-fdC ^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	225
Abbildung SI 64: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA5-fdC ^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.....	225
Abbildung SI 65: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-Pyo sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink-Produkte.....	226
Abbildung SI 66: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-Pyo sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink-Produkte.....	226
Abbildung SI 67: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-Pheo sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink-Produkte.....	227
Abbildung SI 68: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-Pheo sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink-Produkte.....	227

Abbildung SI 69: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 0 h (DNA3-fdU a), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU); m/z gesucht 1292.7 [M ⁵⁺] und 1615.8 [M ⁴⁺], gefunden 1292.2 und 1615.29.....	229
Abbildung SI 70: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA3-fdUox a), Absorption bei 260 nm (DNA) and 325 nm (fdU), MS Analyse des oxidierten fdU DNA3-fdU, m/z gesucht 1295.9 [M ⁵⁺] und 1619.8 [M ⁴⁺]; gefunden 1295.2 und 1619.5.	229
Abbildung SI 71: LC-MS Analyse des CPD-Produktes zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-fdU), Absorption bei 260 nm.; m/z gesucht 1308.3 [M ⁴⁺] und 1744.4 [M ³⁺], gefunden 1307.5 und 1743.4.	230
Abbildung SI 72: LC-MS Analyse des CPD-Produktes zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-fdC), Absorption bei 260 nm; m/z gesucht 1312.3 [M ⁴⁺] und 1749.7 [M ³⁺]; gefunden 1311.6 und 1749.1.	230
Abbildung SI 73: LC-MS Analyse des CPD-Produktes zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-fdCm), Absorption bei 260 nm; m/z gesucht 1308.3 [M ⁴⁺] und 1744.4 [M ³⁺]; gefunden 1307.3 und 1743.7.....	231
Abbildung SI 74: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-fdUfull*), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU), m/z gesucht 1135.0 [M ⁴⁺] und 1513.3 [M ³⁺]; gefunden 1134.45 und 1512.59.....	231
Abbildung SI 75: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-fdUfull*), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU), m/z gesucht 1153.0 [M ⁴⁺] und 1537.3 [M ³⁺]; gefunden 1152.45 und 1536.60.....	232
Abbildung SI 76: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-fdUfull*), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU), m/z gesucht 1135.0 [M ⁴⁺] (CPD-Strang) and 1513.3 [M ³⁺] (CPD-Strang) und 1157.0 [M ⁴⁺] (fdUox-Strang) und 1542.7 [M ³⁺] (fdUox-Strang); gefunden 1134.45; 1512.93 und 1156.70 und 1542.26.	232
Abbildung SI 77: Berechnung des exponentiellen Zusammenhangs der Energieübertragung in DNA-fdU mittels exponentieller Fit-Funktion ohne DNA0-fdU.....	233
Abbildung SI 78: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-Pyo), Absorption bei 260 nm (DNA) und 320 nm (Pyo), m/z gesucht 1145.0 [M ⁴⁺] und 1527.3 [M ³⁺]; gefunden 1144.95 und 1526.60.....	234
Abbildung SI 79: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-Pyo), Absorption bei 260 nm (DNA) und 320 nm (Pyo), 554 nm (Atto550), m/z gesucht 1150.7 [M ⁴⁺] und 1726.0 [M ³⁺]; gefunden 1149.62 und 1724.94.....	234
Abbildung SI 80: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-Pyo), Absorption bei 260 nm (DNA) und 320 nm (Pyo), 554 nm (Atto550), m/z gesucht 1308.3 [M ⁴⁺] und 1744.3 [M ³⁺]; gefunden 1307.55 und 1743.40.....	235

Abbildungsverzeichnis

Abbildung SI 81: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt t = 6 h (DNA0-Pyo, Crosslinks), Absorption bei 260 nm (DNA) und 320 nm (Pyo), m/z gesucht 1606.8 [M ⁵⁺] und 2008.5 [M ⁴⁺]; gefunden 1609.74 und 2012.17.....	235
Abbildung SI 82: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben der Negativprobe DNA0-C im Zeitraum von t = 0-6 h.....	236
Abbildung SI 83: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA0-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.....	236
Abbildung SI 84: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA1-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.....	236
Abbildung SI 85: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA2-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.....	237
Abbildung SI 86: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA3-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.....	237
Abbildung SI 87: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA4-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.....	237
Abbildung SI 88: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA5-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.....	238
Abbildung SI 89: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride DNA_n-fdU	239
Abbildung SI 90: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride DNA_n-fdC	239
Abbildung SI 91: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride DNA_n-fdC^m	240
Abbildung SI 92: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride DNA_n-Pyo	240
Abbildung SI 93: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride DNA_n-Pheo	241

XI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kupplungsprotokoll der Standardbasen, sowie Standard-Entschützungs- und Oxidationsmethode.....	105
Tabelle 2: Kupplungsprotokoll des Formyl-dU Phosphoramidits.....	108
Tabelle 3: Kupplungsprotokoll des Pyo-Phosphoramidits.....	109
Tabelle 4: Kupplungsprotokoll des Pheo-Phosphoramidits	110
Tabelle 5: RP-HPLC Protokoll zur Aufreinigung der modifizierten DNA-Stränge (DNA_n-fdU, DNA_n-Pyo, DNA_n-Pheo).....	112
Tabelle 6: RP-HPLC Analytikprotokoll für die Auftrennung und Untersuchung der belichteten DNA-Hybride (DNA_n-fdU, DNA_n-fdC, DNA_n-fdC^m, DNA_n-Pyo, DNA_n-Pheo).....	112
Tabelle 7: Extinktionskoeffizienten der verwendeten natürlichen und modifizierten Nukleoside.	114
Tabelle 8: Übersicht der hergestellten DNA-Stränge, ihrer Massen, Extinktionskoeffizienten und Schmelzpunkte.	115
Tabelle 9: Zusammensetzung der während der PAGE-Analyse verwendeten Lösungen und Reagenzien.	116

XII. Literaturverzeichnis

- [1] A. Bharath, R. Turner, *J. R. Soc. Med.* **2009**, *102*, 215-218.
- [2] M. C. F. Simões, J. J. S. Sousa, A. A. C. C. Pais, *Cancer Lett.* **2015**, *357*, 8-42.
- [3] M. R. Donaldson, B. M. Coldiron, in *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, Vol. *30*, WB Saunders, **2011**, pp. 3-5.
- [4] a) C. A. Downs, J. C. DiNardo, D. Stien, A. M. S. Rodrigues, P. Lebaron, *Chem. Res. Toxicol.* **2021**, *34*, 1046-1054; b) M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, J. Cadet, M. A. Miranda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1558-1570.
- [5] E. L. Bastos, F. H. Quina, M. S. Baptista, *Chem. Rev.* **2023**.
- [6] J. Cadet, S. Mouret, J.-L. Ravanat, T. Douki, *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 1048-1065.
- [7] S. Mouret, C. Philippe, J. Gracia-Chantegrel, A. Banyasz, S. Karpati, D. Markovitsi, T. Douki, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1706-1711.
- [8] M. F. Hohmann-Marriott, R. E. Blankenship, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2011**, *62*, 515-548.
- [9] G. Ciamician, *Science* **1912**, *36*, 385-394.
- [10] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2 ed., Wiley-VHC Weinheim, **2012**.
- [11] a) J. Franck, E. G. Dymond, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1926**, *21*, 536-542; b) E. Condon, *Phys. Rev.* **1926**, *28*, 1182-1201.
- [12] P. Atkins, J. d. Paula, *Physical Chemistry*, Oxford University Press, Great Britain, **2010**.
- [13] A. P. Demchenko, V. I. Tomin, P.-T. Chou, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 13353-13381.
- [14] G. G. Stokes, *Phil. Trans. R. Soc.* **1852**, *142*, 463-562.
- [15] P. Klán, J. Wirz, *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*, Wiley-VCH, Chichester, **2009**.
- [16] a) C. M. Marian, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2021**, *72*, 617-640; b) , 3.0.1 ed., International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), **2019**.
- [17] a) H. Yersin, A. F. Rausch, R. Czerwieniec, T. Hofbeck, T. Fischer, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2622-2652; b) S. Kappaun, C. Slugovc, E. J. W. List, *Int. J. Mol. Sci.* **2008**,

- 9, 1527-1547; c) G. Mazzini, M. Danova, in *Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols* (Eds.: C. Pellicciari, M. Biggiogera), Springer New York, New York, NY, **2017**, pp. 239-259; d) H. A. Crissman, G. T. Hirons, in *Method. Cell Biol.*, Vol. 41 (Eds.: Z. Darzynkiewicz, J. Paul Robinson, H. A. Crissman), Academic Press, **1994**, pp. 195-209.
- [18] W. Ostwald, *Prinzipien der Chemie. Eine Einleitung in alle chemischen Lehrbücher*, 1 ed., Outlook Verlag GmbH, **1907**.
- [19] R. K. Clayton, *Photosynthesis Physical mechanisms and chemical patterns*, Cambridge University Press, **1980**.
- [20] a) M. S. Baptista, J. Cadet, A. Greer, A. H. Thomas, *Photochem. Photobiol.* **2021**, *20*, 1-28; b) A. Acuña, W. Adam, F. Amat, D. Armesto, T. Atvars, A. Bard, E. Bill, L. Björn, C. Bohne, J. Bolton, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 293-465.
- [21] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836-850.
- [22] 3.0.1 ed., International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), **2019**.
- [23] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55-75.
- [24] J.-L. Mergny, A. S. Boutorine, T. Garestier, F. Belloc, M. Rougée, N. V. Bulychev, A. A. Koshkin, J. Bourson, A. V. Lebedev, B. Valeur, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 920-928.
- [25] a) M. Bixon, B. Giese, S. Wessely, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, J. Jortner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11713-11716; b) P. J. Dandliker, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Science* **1997**, *275*, 1465-1468.
- [26] L. Blancafort, A. A. Voityuk, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 4997-5000.
- [27] a) M. Wohlgemuth, R. Mitrić, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 16536-16551; b) C. T. Middleton, K. de La Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernández, B. Kohler, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217-239.
- [28] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, B. Kohler, *Nature* **2005**, *436*, 1141-1144.
- [29] a) Beer, *Ann. Phys.* **1852**, *162*, 78-88; b) J. H. Lambert, *Lambert's photometrie:(photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae)*(1760), W. Engelmann, **1892**.
- [30] D. F. Swinehart, *J. Chem. Educ.* **1962**, *39*, 333.
- [31] G. Porter, *Science* **1968**, *160*, 1299-1307.

- [32] E. Edelson, *Gregor Mendel, and the Roots of Genetics*, Oxford University Press Inc., **1999**.
- [33] C. Darwin, *On the Origin of Species By Means of Natural Selection*, Good Press, **2023**.
- [34] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, *171*, 740-741.
- [35] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [36] a) S. Zamenhof, G. Brawerman, E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta* **1952**, *9*, 402-405; b) G. R. Wyatt *J. Gen. Physiol.* **1952**, *36*, 201-205.
- [37] K. Hoogsteen, *Acta Crystallogr.* **1963**, *16*, 907-916.
- [38] A. Ghosh, M. Bansal, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 620-626.
- [39] H. Krieger, in *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes* (Ed.: H. Krieger), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2023**, pp. 429-452.
- [40] L. J. Marnett, J. P. Plastaras, *Trends Genet.* **2001**, *17*, 214-221.
- [41] a) L. A. Loeb, C. F. Springgate, N. Battula, *Cancer Res.* **1974**, *34*, 2311-2321; b) D. J. Chang, K. A. Cimprich, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 82-90.
- [42] J. B. Kerr, V. E. Fioletov, *Atmos.-Ocean* **2008**, *46*, 159-184.
- [43] T. Hecht, *Von mechanischen Schwingungen zur Vorhersage und Interpretation von IR-Spektren* **2019**.
- [44] R. P. Gallagher, T. K. Lee, C. D. Bajdik, M. Borugian, *HPCDP* **2010**, *29*.
- [45] W. T. Borden, R. Hoffmann, T. Stuyver, B. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 9010-9018.
- [46] a) H. Sies, V. V. Belousov, N. S. Chandel, M. J. Davies, D. P. Jones, G. E. Mann, M. P. Murphy, M. Yamamoto, C. Winterbourn, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 499-515; b) H. Bayr, *J. Crit. Care Med.* **2005**, *33*, S498-S501.
- [47] S. Di Meo, P. Venditti, T. De Leo, *Experientia* **1996**, *52*, 786-794.
- [48] a) M. Martini, J. Termini, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 234-241; b) M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, *FASEB J.* **2003**, *17*, 1195-1214.
- [49] A. Barzilai, K.-I. Yamamoto, *DNA Repair* **2004**, *3*, 1109-1115.
- [50] S. Premi, S. Wallisch, C. M. Mano, A. B. Weiner, A. Bacchiocchi, K. Wakamatsu, E. J. H. Bechara, R. Halaban, T. Douki, D. E. Brash, *Science* **2015**, *347*, 842-847.
- [51] T. Douki, M. Court, S. Sauvaigo, F. Odin, J. Cadet, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11678-11685.

- [52] a) R. Beukers, A. P. M. Eker, P. H. M. Lohman, *DNA Repair* **2008**, *7*, 530-543; b) R. Beukers, J. Ylstra, W. Berends, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1958**, *77*, 729-732.
- [53] R. Beukers, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *41*, 550-551.
- [54] T. Douki, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 1286-1302.
- [55] a) P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4256-4263; b) F. Bosca, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, J. V. Castell, M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318-6319.
- [56] W. J. Schreier, J. Kubon, N. Regner, K. Haiser, T. E. Schrader, W. Zinth, P. Clivio, P. Gilch, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5038-5039.
- [57] J. Cadet, A. Grand, T. Douki, in *Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids II: DNA Fragments and Phenomenological Aspects* (Eds.: M. Barbatti, A. C. Borin, S. Ullrich), Springer International Publishing, Cham, **2015**, pp. 249-275.
- [58] a) M. R. Holman, T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6-7; b) W. Lee, S. Matsika, *J. Phys. Chem. B* **2022**, *127*, 18-25.
- [59] a) S. Iwai, M. Maeda, M. Shirai, Y. Shimada, T. Osafune, T. Murata, E. Ohtsuka, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4601-4609; b) R. M. A. Costa, V. Chiganças, R. da Silva Galhardo, H. Carvalho, C. F. M. Menck, *Biochimie* **2003**, *85*, 1083-1099.
- [60] M. Zhang, L. Wang, D. Zhong, *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *632*, 158-174.
- [61] G. P. Pfeifer, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 270-283.
- [62] a) T. Mizukoshi, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10634-10642; b) A. F. Glas, S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10387-10396.
- [63] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, *571*, 3-17.
- [64] J. E. LeClerc, A. Borden, C. W. Lawrence, *PNAS* **1991**, *88*, 9685-9689.
- [65] S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *DNA Repair* **2005**, *4*, 836-844.
- [66] R. Herzog, *Biologie in unserer Zeit* **1981**, *11*, 144-149.
- [67] M. Gallo, J. M. Montserrat, A. Iribarren, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 143-151.
- [68] A. Shivalingam, T. Brown, *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 709-715.
- [69] a) E. Sonveaux, *Bioorg. Chem.* **1986**, *14*, 274-325; b) M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185-3191.
- [70] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.

- [71] M. J. Damha, P. A. Giannaris, S. V. Zabarylo, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3813-3821.
- [72] a) K. W. Knouse, J. N. deGruyter, M. A. Schmidt, B. Zheng, J. C. Vantourout, C. Kingston, S. E. Mercer, I. M. McDonald, R. E. Olson, Y. Zhu, C. Hang, J. Zhu, C. Yuan, Q. Wang, P. Park, M. D. Eastgate, P. S. Baran, *Science* **2018**, *361*, 1234-1238; b) P. Kumar, M. H. Caruthers, *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 2152-2166.
- [73] K. A. L. GmBH, , **17.07.24; 17:08**, pp. <https://ka-labs.de/dna-rna-synthesizers/h-8-standard/>.
- [74] R. Gaur, K. Gupta, *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 253-258.
- [75] S. Roy, M. Caruthers, *Molecules* **2015**, *18*, 14268-14284.
- [76] A. Hoose, R. Vellacott, M. Storch, P. S. Freemont, M. G. Ryadnov, *Nat. Rev. Chem.* **2023**, *7*, 144-161.
- [77] G. T. Wondrak, M. K. Jacobson, E. L. Jacobson, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 215-237.
- [78] a) R. S. Mason, J. Reichrath, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 83-97; b) M. Grigalavicius, A. Juzeniene, Z. Baturaite, A. Dahlback, J. Moan, *Dermatoendocrinol.* **2013**, *5*, 150-158.
- [79] V. R. B. Liyanage, J. S. Jarmasz, N. Murugeshan, M. R. Del Bigio, M. Rastegar, J. R. Davie, *Biology* **2014**, *3*, 670-723.
- [80] C. Carlberg, in *Die molekulare Basis von Gesundheit: Wie Epigenetik und Ernährung unser Leben beeinflussen* (Ed.: C. Carlberg), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2023**, pp. 37-61.
- [81] a) J. S. Hardwick, A. N. Lane, T. Brown, *BioEssays* **2018**, *40*, 1700199; b) P. Koivunen, T. Laukka, *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 1339-1348.
- [82] I. S. Fetahu, D. Ma, K. Rabidou, C. Argueta, M. Smith, H. Liu, F. Wu, Y. G. Shi, *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaaw2880.
- [83] M. Lineros-Rosa, A. Francés-Monerris, A. Monari, M. A. Miranda, V. Lhiaubet-Vallet, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 25661-25668.
- [84] a) C. Decarroz, J. R. Wagner, J. E. Van Lier, C. M. Krishna, P. Riesz, J. Cadet, *Int. J. Radiat. Biol.* **1986**, *50*, 491-505; b) D. K. Rogstad, J. Heo, N. Vaidehi, W. A. Goddard, A. Burdzy, L. C. Sowers, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5688-5697.
- [85] a) V. Vendrell-Criado, G. M. Rodriguez-Muniz, M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6604-6607; b) V. Vendrell-Criado, G. M.

- Rodriguez-Muniz, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, M. A. Miranda, *Chem. Phys. Chem.* **2016**, *17*, 1979-1982.
- [86] P. M. Plonka, M. Grabacka, *Acta Biochim. Pol.* **2006**, *53*, 429-443.
- [87] W. Cao, X. Zhou, N. C. McCallum, Z. Hu, Q. Z. Ni, U. Kapoor, C. M. Heil, K. S. Cay, T. Zand, A. J. Mantanona, A. Jayaraman, A. Dhinojwala, D. D. Deheyn, M. D. Shawkey, M. D. Burkart, J. D. Rinehart, N. C. Gianneschi, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 2622-2637.
- [88] P. F. Williams, C. M. Olsen, N. K. Hayward, D. C. Whiteman, *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 1730-1740.
- [89] K. Mokrzynski, S. Ito, K. Wakamatsu, T. G. Camenish, T. Sarna, M. Sarna, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4465.
- [90] S. Ito, K. Wakamatsu, T. Sarna, *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 409-420.
- [91] S. Premi, D. E. Brash, *DNA Rep.* **2016**, *44*, 169-177.
- [92] A. Kittaka, C. Horii, H. Tanaka, T. Miyasaka, K. T. Nakamura, R. Kuroda, T. Sugiyama, *Heterocycles* **2004**, *64*, 367-382.
- [93] S. Nakamura, S. Ogasawara, S. Matuda, I. Saito, K. Fujimoto, *Molecules* **2012**, *17*, 163-178.
- [94] G. Research, Vol. 2022, 2022 ed., Glen Research, https://www.glenresearch.com/media/folio3/productattachments/technical_bulletin/TB_5_Formyl_dC.pdf, **11.07.2022**.
- [95] A. S. Schröder, J. Steinbacher, B. Steigenberger, F. A. Gnerlich, S. Schiesser, T. Pfaffeneder, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 315-318.
- [96] S. Iwai, M. Shimizu, H. Kamiya, E. Ohtsuka, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7642-7643.
- [97] Y. Fujiwara, S. Iwai, *Biochem.* **1997**, *36*, 1544-1550.
- [98] C. LAMBERT, R. S. SINCLAIR, T. G. TRUSCOTT, E. J. LAND, R. MILES CHEDEKEL, C.-T. LIU, *Photochem. Photobiol.* **1984**, *39*, 5-10.
- [99] S. Yoshida, T. Yano, Y. Nishiyama, Y. Misawa, M. Kondo, T. Matsushita, K. Igawa, K. Tomooka, T. Hosoya, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11199-11202.
- [100] a) K. Yoshikawa, A. Yokomizo, H. Naito, N. Haginioya, S. Kobayashi, T. Yoshino, T. Nagata, A. Mochizuki, K. Osanai, K. Watanabe, H. Kanno, T. Ohta, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8206-8220; b) H. J. Dyke, A. Sharpe, H. J. Kendall, R. J. Davenport, V. M. Sabin, G. M. Buckley, M. D. Richards, A. F. Haughan, in *World Intellectual Property*

Organization, Vol. WO2001058897, Darwin Discovery Ltd. United Kingdom, United Kingdom, 2001.

- [101] S. Häcker, M. Schrödter, A. Kuhlmann, H.-A. Wagenknecht, *JACS Au* **2023**, *3*, 1843-1850.
- [102] A. C. Matsheku, R. Tia, M. C. Maumela, B. C. E. Makhubela, *Catalysts* **2021**, *11*, 755.
- [103] N. Gaß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *30*, 6661-6668.
- [104] a) L. Antusch, N. Gaß, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1385-1389; b) A. Kuhlmann, L. Bihr, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2020**, *59*, 17378-17382.
- [105] ATTO-TEC, 2021 ed., https://www.atto-tec.com/product_info.php?language=de&info=p103_atto-550.html, **19.08.2024 13:00**.
- [106] M. Kochoyan, J. L. Leroy, M. Guéron, *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 599-609.
- [107] R. Szabla, H. Kruse, P. Stadlbauer, J. Šponer, A. L. Sobolewski, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 3131-3140.
- [108] M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 20742-20749.
- [109] I. Aparici-Espert, G. Garcia-Lainez, I. Andreu, M. A. Miranda, V. Lhiaubet-Vallet, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 542-547.
- [110] J. D. Coyle, *Chem. Rev.* **1978**, *78*, 97-123.
- [111] A. Francés-Monerris, M. Lineros-Rosa, M. A. Miranda, V. Lhiaubet-Vallet, A. Monari, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 4404-4407.
- [112] a) F. Edhborg, A. Olesund, B. Albinsson, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2022**, *21*, 1143-1158; b) K. Sandros, H. L. Bäckström, *Acta Chem. Scand.* **1962**, *16*, 958-968.
- [113] X. Wang, L. Martínez-Fernández, Y. Zhang, P. Wu, B. Kohler, R. Improta, J. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 1839-1848.
- [114] Q. Zhou, K. Li, Y.-H. Liu, L.-L. Li, K.-K. Yu, H. Zhang, X.-Q. Yu, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13722-13725.
- [115] T. Caruso, A. Capobianco, A. Peluso, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15347-15353.
- [116] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 413-425.
- [117] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300-1303.

- [118] J.-H. Yoon, C.-S. Lee, T. R. O'Connor, A. Yasui, G. P. Pfeifer, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 681-693.
- [119] N. E. Biolabs, Vol. 2024, New England Biolabs, **29.05.2024**, pp. <https://www.neb.com/en/products/m0308-t0304-pdg-t0304-endonuclease-v>.
- [120] E. Ben-Hur, R. Ben-Ishai, *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synth.* **1968**, 166, 9-15.
- [121] C. A. Smith, J. S. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11143-11151.
- [122] T. Douki, E. Sage, *Photochem. Photobio. Sci.* **2016**, 15, 24-30.
- [123] B. P. Fingerhut, S. Oesterling, K. Haiser, K. Heil, A. Glas, W. J. Schreier, W. Zinth, T. Carell, R. de Vivie-Riedle, *J. Chem. Phys.* **2012**, 136.
- [124] K. Haiser, B. P. Fingerhut, K. Heil, A. Glas, T. T. Herzog, B. M. Pilles, W. J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 408.
- [125] M. Yoshida, K. Makino, H. Morita, H. Terato, Y. Ohyama, H. Ide, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 1570-1577.
- [126] D. Gackowski, M. Starczak, E. Zarzowska, M. Modrzejewska, A. Szpila, Z. Banaszkiewicz, R. Olinski, *Anal. Chem.* **2016**, 88, 12128-12136.
- [127] S. F. Singleton, F. Shan, M. W. Kanan, C. M. McIntosh, C. J. Stearman, J. S. Helm, K. J. Webb, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3919-3922.
- [128] M. Minuth, C. Richert, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 11074-11077.

XIII. Appendix

1. Publikationen

S. Häcker, M. Schrödter, A. Kuhlmann, H.-A. Wagenknecht, *JACS Au* **2023**, 3, 1843-1850.

M. Schrödter, H.-A. Wagenknecht, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, 146, 20742-20749.

2. Konferenzen

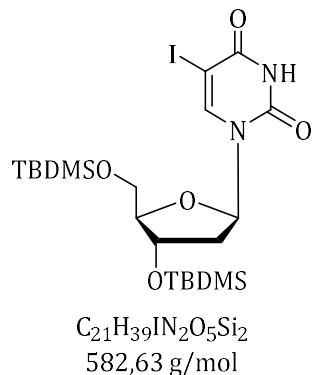
- 08/2022 International Round Table on nucleosides, nucleotides and nucleic acids (IRT3NA2022), Stockholm
Posterbeitrag: *UV induced CPD damages via "natural" photosensitizers*
- 09/2023 GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2023, Leipzig
Posterbeitrag: *UV-induced CPD damages via "natural" photosensitizers*
XI. Nucleinsäurechemietreffen 2023, Würzburg
Posterbeitrag: *UV-induced CPD damages via "natural" photosensitizers*

XIV. Unterstützende Informationen

1. Verbindungen

1.1 Formyl-2'-desoxyuridin Photosensibilisator

1.1.1 Verbindung 5



R_f (nHex/EE 5:1) = 0.29

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (s, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, CH_{arom}), 6.26 (dd, J = 8.0, 5.6 Hz, 1H, C1'H), 4.40 (dt, J = 5.2, 2.3 Hz, 1H, C3'H), 3.98 (q, J = 2.4 Hz, 1H, C4'H), 3.95 – 3.71 (m, 2H, C5'H₂), 2.31 (ddd, J = 13.2, 5.8, 2.3 Hz, 1H, C2'H), 2.06 – 1.94 (m, 1H, C2'H), 1.02 – 0.85 (m, 18H, tBuSi-CH₃), 0.12 (ddd, J = 28.2, 3.9, 0.7 Hz, 12H, MeSi-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[93]

Unterstützende Informationen

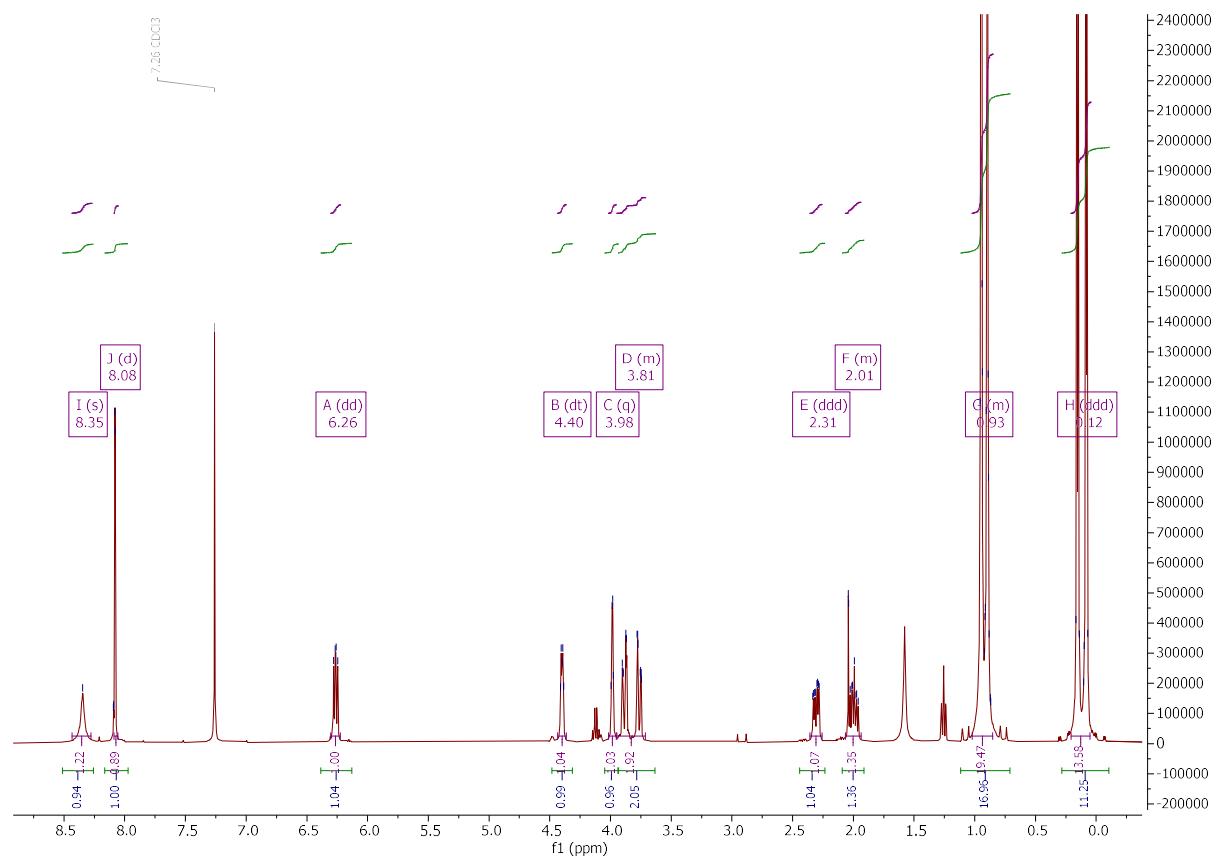
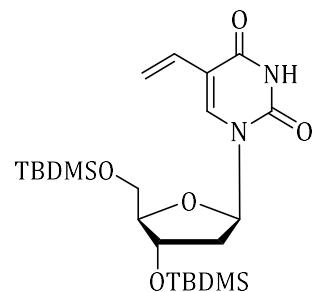


Abbildung SI 1: ¹H-NMR von Verbindung 5.

1.1.1 Verbindung 6



$C_{23}H_{42}N_2O_5Si_2$
482,77 g/mol

$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 5:1) = 0.20$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.06 (s, 1H, NH), 7.66 (s, 1H, CH_{arom.}), 6.44 – 6.24 (m, 2H, C'1H, vinyl CH), 6.00 (dd, $J = 17.5, 1.6$ Hz, 1H, vinyl CH₂), 5.24 (dd, $J = 11.4, 1.6$ Hz, 1H, vinyl CH₂), 4.41 (dt, $J = 5.5, 2.5$ Hz, 1H, C3'H), 3.97 (q, $J = 2.7$ Hz, 1H, C4'H), 3.89 – 3.73 (m, 2H, C5'H₂), 2.32 (ddd, $J = 13.1, 5.8, 2.5$ Hz, 1H, C2'H₂), 2.08 – 1.96 (m, 1H, C2'H₂), 0.91 (d, $J = 6.2$ Hz, 18H, tBu-Si-CH₃), 0.13 – 0.05 (m, 12H, Me-Si-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[93]

Unterstützende Informationen

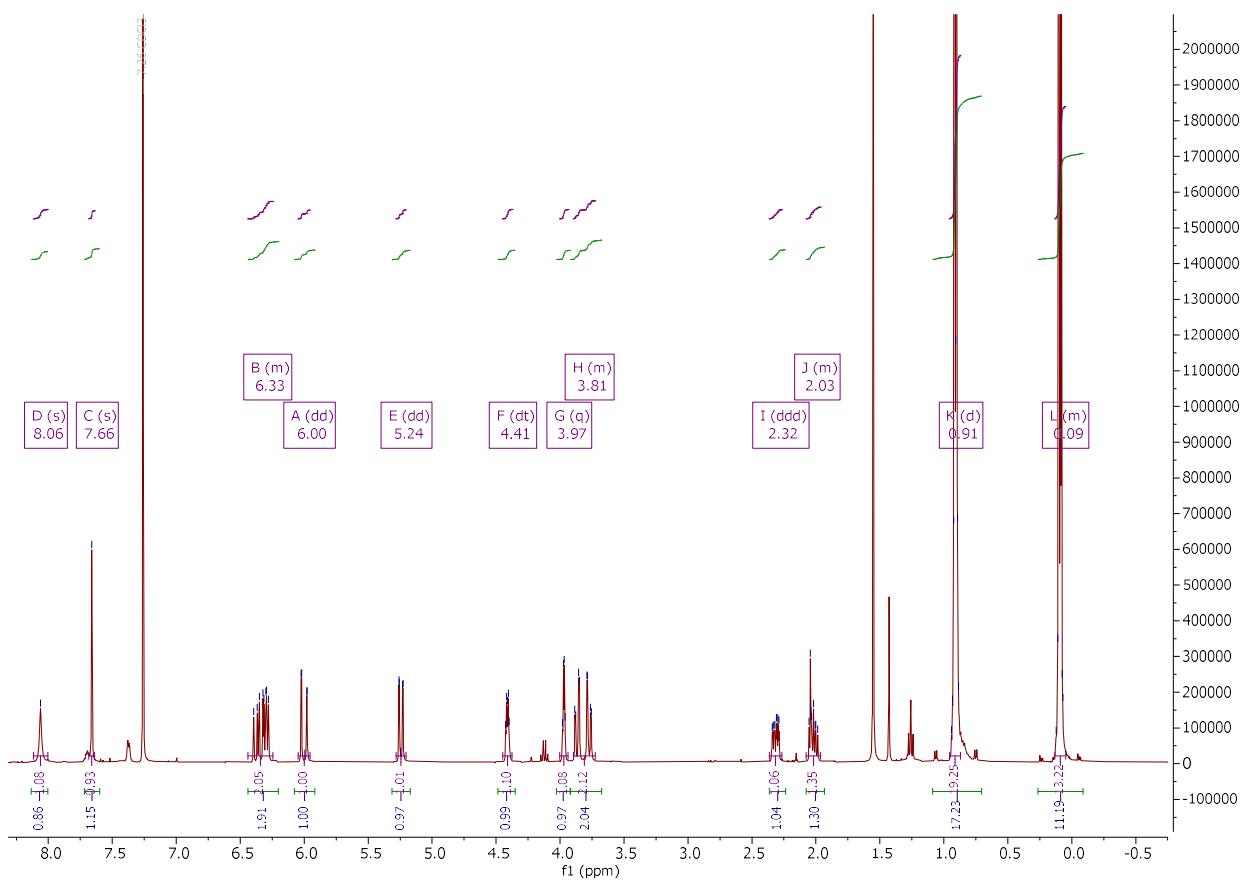
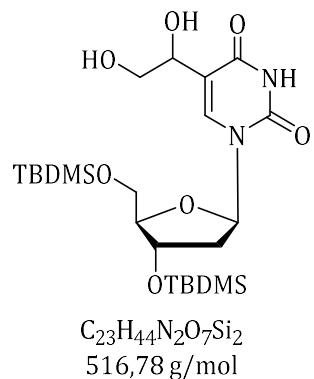


Abbildung SI 2: ¹H-NMR von Verbindung 6.

1.1.2 Verbindung 7



R_f (DCM/MeOH 6:1) = 0.77

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.34 (s, 1H, NH), 7.68 (d, J = 3.9 Hz, 1H, CH_{arom.}), 6.38 – 6.15 (m, 1H, C'1H), 4.58 (d, J = 15.4 Hz, 1H, ethyl-CH), 4.46 – 4.31 (m, 1H, C'3H), 3.94 (d, J = 2.6 Hz, 1H, C'4H), 3.87 – 3.58 (m, 4H, C'5H₂, ethyl-CH₂), 2.37 – 2.18 (m, 1H, C'2H), 2.12 – 1.86 (m, 1H, C'2H), 1.00 – 0.75 (m, 18H, *t*Bu-Si-CH₃), 0.20 – 0.07 (m, 12H, Me-Si-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

Unterstützende Informationen

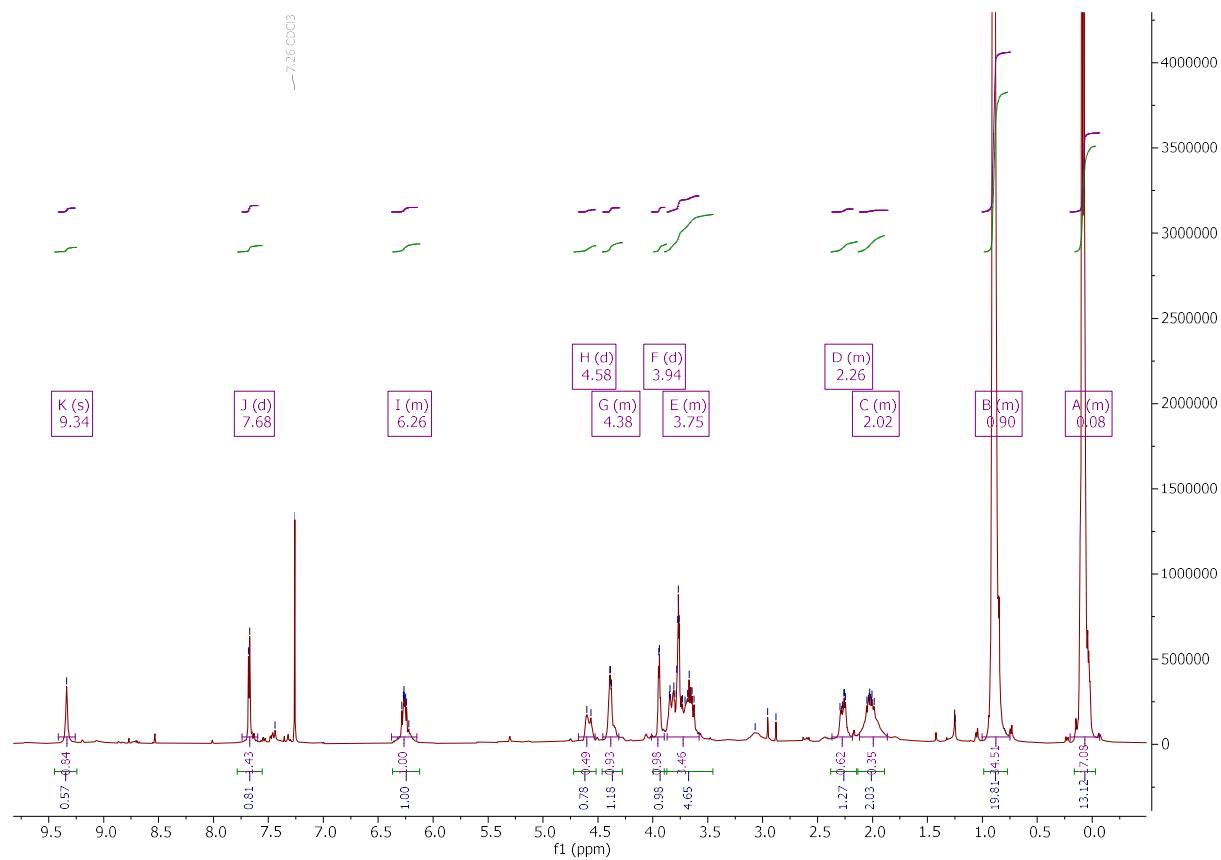
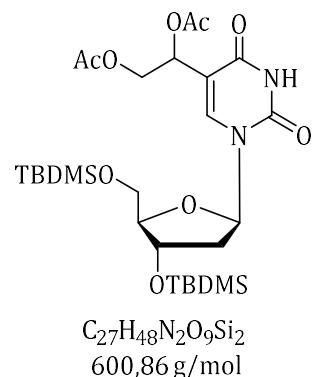


Abbildung SI 3: ^1H -NMR von Verbindung 7.

1.1.3 Verbindung 8



$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 1:1) = 0.69$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.57 (s, 1H, NH), 7.62 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, CH_{arom.}), 6.22 (dt, $J = 8.0, 6.0$ Hz, 1H, C'1H), 5.83 (ddd, $J = 22.4, 7.1, 4.1$ Hz, 1H, ethyl-CH), 4.53 – 4.32 (m, 3H, C'3H, ethyl-CH₂), 3.96 (dtd, $J = 6.3, 3.9, 2.3$ Hz, 1H, C'4H), 3.83 – 3.67 (m, 2H, C'5H), 2.43 – 2.12 (m, 1H, C'2H₂), 2.12 – 1.95 (m, 7H, C'2H₂, (OAc)₂), 0.96 – 0.81 (m, 18H, *t*Bu-Si-CH₃), 0.16 – -0.01 (m, 12H, Me-Si-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

Unterstützende Informationen

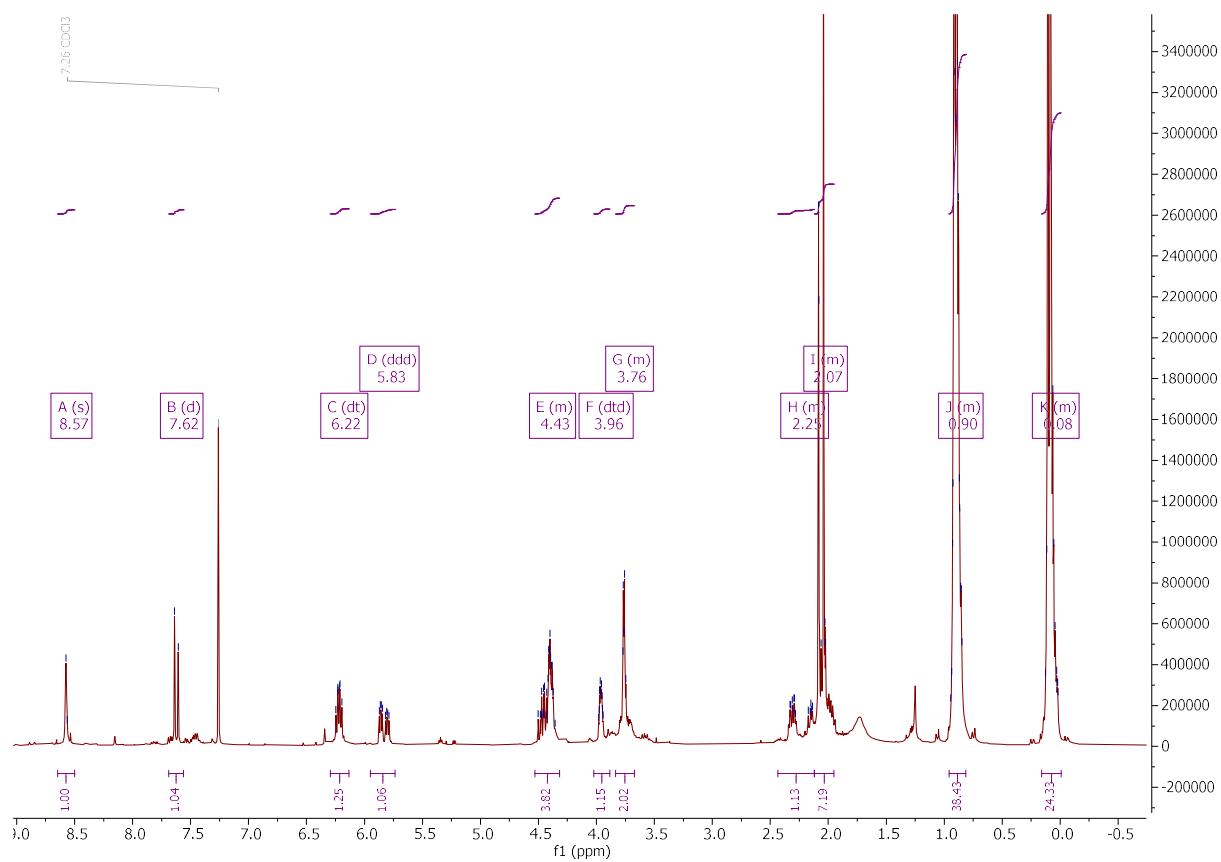
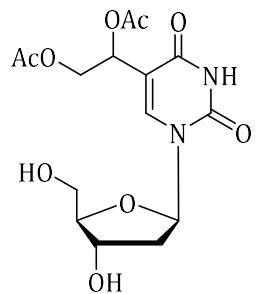


Abbildung SI 4: ¹H-NMR von Verbindung 8.

1.1.4 Verbindung 9



C₁₅H₂₀N₂O₉
372,33 g/mol

R_f(DCM/MeOH 9:1) = 0.54

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (d, J = 5.0 Hz, 1H, CH_{arom.}), 6.23 – 6.13 (t, 1H, C'1H), 5.93 – 5.81 (m, 1H, ethyl-CH), 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 1H, C'3H), 4.41 – 4.31 (m, 2H, ethyl-CH₂), 3.96 (dd, J = 9.8, 3.8 Hz, 1H, C'4H), 3.91 – 3.80 (m, 2H, C'5H), 2.40 (td, J = 13.7, 6.0 Hz, 1H, C'2H), 2.30 – 2.17 (m, 1H, C'2H), 2.10 (d, J = 2.3 Hz, 6H, (OAc)₂).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

Unterstützende Informationen

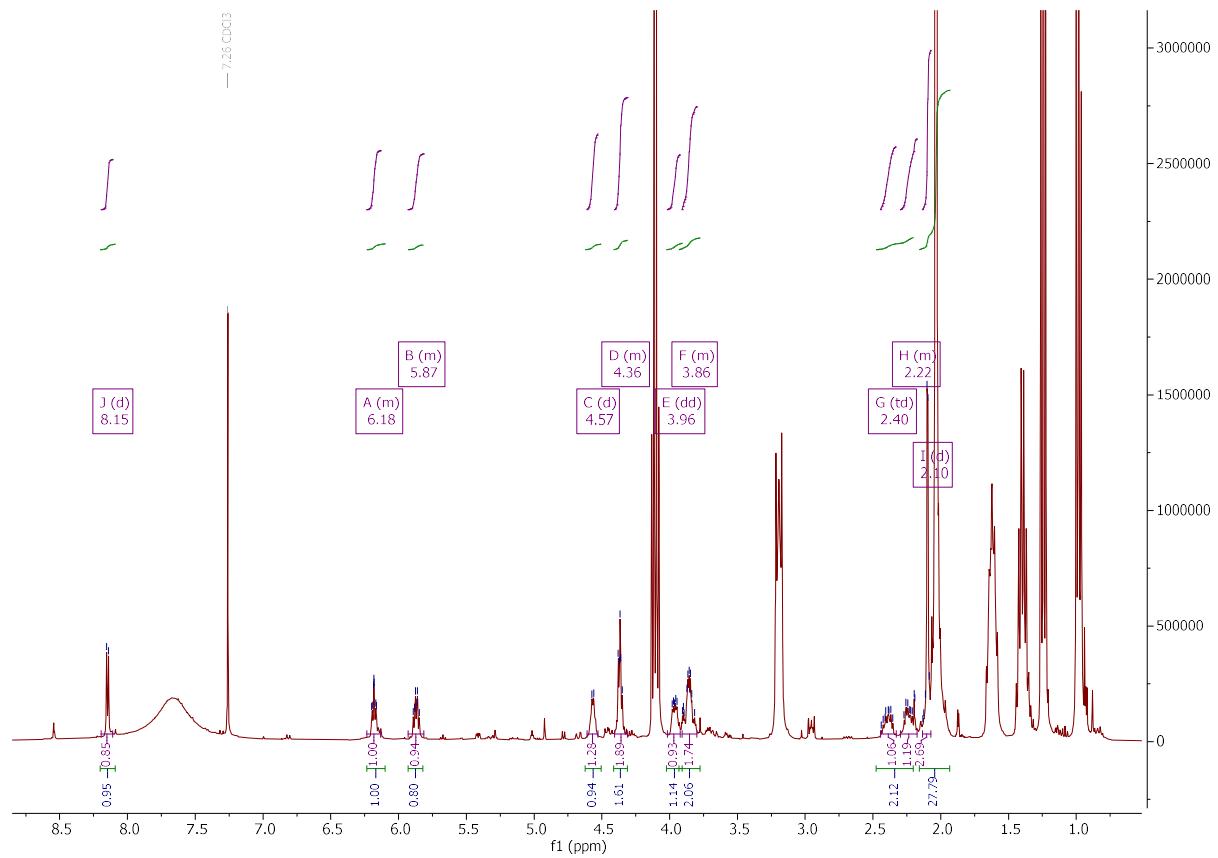
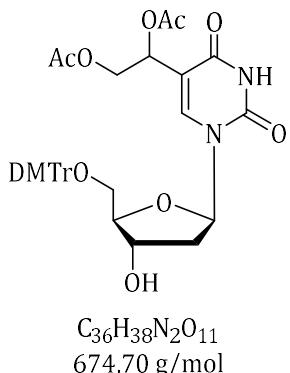


Abbildung SI 5: ^1H -NMR von Verbindung 9.

1.1.5 Verbindung 10



$R_f(n\text{Hex}/\text{EE } 3:7) = 0.17$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.06 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.59 (d, $J = 43.5$ Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.41 (dd, $J = 7.4, 4.5$ Hz, 2H, CH_{arom.}), 7.36 – 7.18 (m, 6H, CH_{arom.}), 6.88 – 6.79 (m, 4H, CH_{arom.}), 6.22 (dt, $J = 29.1, 6.6$ Hz, 1H, C'1H diastereomer), 5.76 (ddd, $J = 24.3, 6.4, 3.8$ Hz, 1H, ethyl-CH diastereomer), 4.42 (dd, $J = 11.9, 6.3$ Hz, 2H ethyl-CH₂ diastereomer), 4.36 – 4.21 (m, 1H, C'3H diastereomer), 4.00 (dt, $J = 18.5, 4.2$ Hz, 1H, C'4H diastereomer), 3.79 (s, 6H, OMe-DMT), 3.40 (td, $J = 19.3, 10.0, 4.7$ Hz, 2H, C'5H₂ diastereomer), 2.51 – 2.37 (m, 1H, C'2H₂ diastereomer), 2.18 (dq, $J = 14.1, 7.4$ Hz, 1H, C'2H₂ diastereomer), 2.01 (d, $J = 24.2$ Hz, 6H, (OAc)₂).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

Unterstützende Informationen

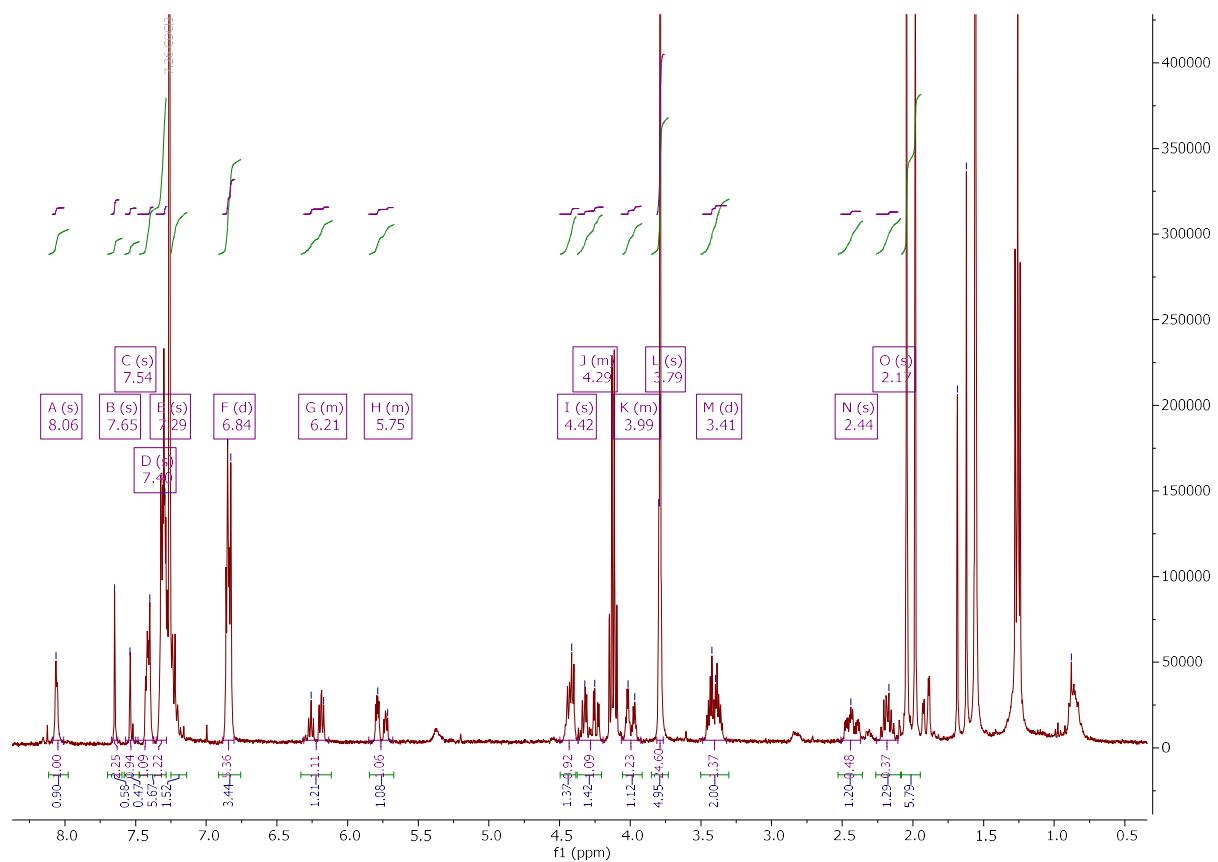
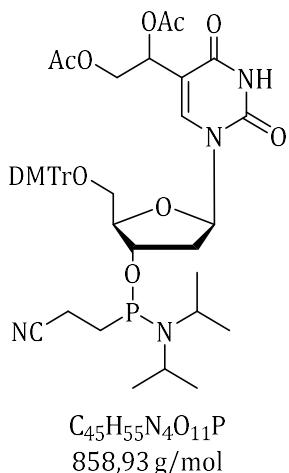


Abbildung SI 6: ^1H -NMR von Verbindung 10.

1.1.6 Verbindung 1a



R_f (*n*Hex/EE 1:2) = 0.69

1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (s, 1H, NH), 7.75 (d, J = 5.9 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.71 – 7.50 (m, 1H, CH_{arom.}), 7.47 – 7.38 (m, 2H, CH_{arom.}), 7.36 – 7.13 (m, 6H, CH_{arom.}), 6.83 (dd, J = 8.9, 5.9, 4.0, 1.6 Hz, 4H, CH_{arom.}), 6.37 – 6.09 (m, 1H, C'1H), 5.83 – 5.69 (m, 1H, ethyl-CH), 4.58 – 4.38 (m, 1H, C'3H), 4.30 (t, J = 5.6 Hz, 1H,), 4.24 – 4.05 (m, 3H, C'4H, ethyl-CH₂), 3.78 (d, J = 2.9 Hz, 6H, OMe-DMT), 3.66 – 3.40 (m, 3H, P-OCH₂, C5'H), 3.35 – 3.16 (m, 1H, C5'H), 2.76 (td, J = 6.2, 2.0 Hz, 1H, N-CH(CH₃)₂), 2.61 (t, J = 6.3 Hz, 1H, N-CH(CH₃)₂), 2.57 – 2.45 (m, 1H, C2'H₂), 2.39 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-CN), 2.17 (tt, J = 14.0, 7.4 Hz, 1H, C2'H₂), 2.08 – 1.95 (m, 6H, (OAc)₂), 1.34 – 1.08 (m, 12H, iPrN-CH₃).

^{31}P NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 148.61, 149.24, 14.18.

MALDI: m/z (berechnet) 815.88 [M⁺-Ac]; m/z(gefunden) 815.09 [M⁺-Ac].

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

Unterstützende Informationen

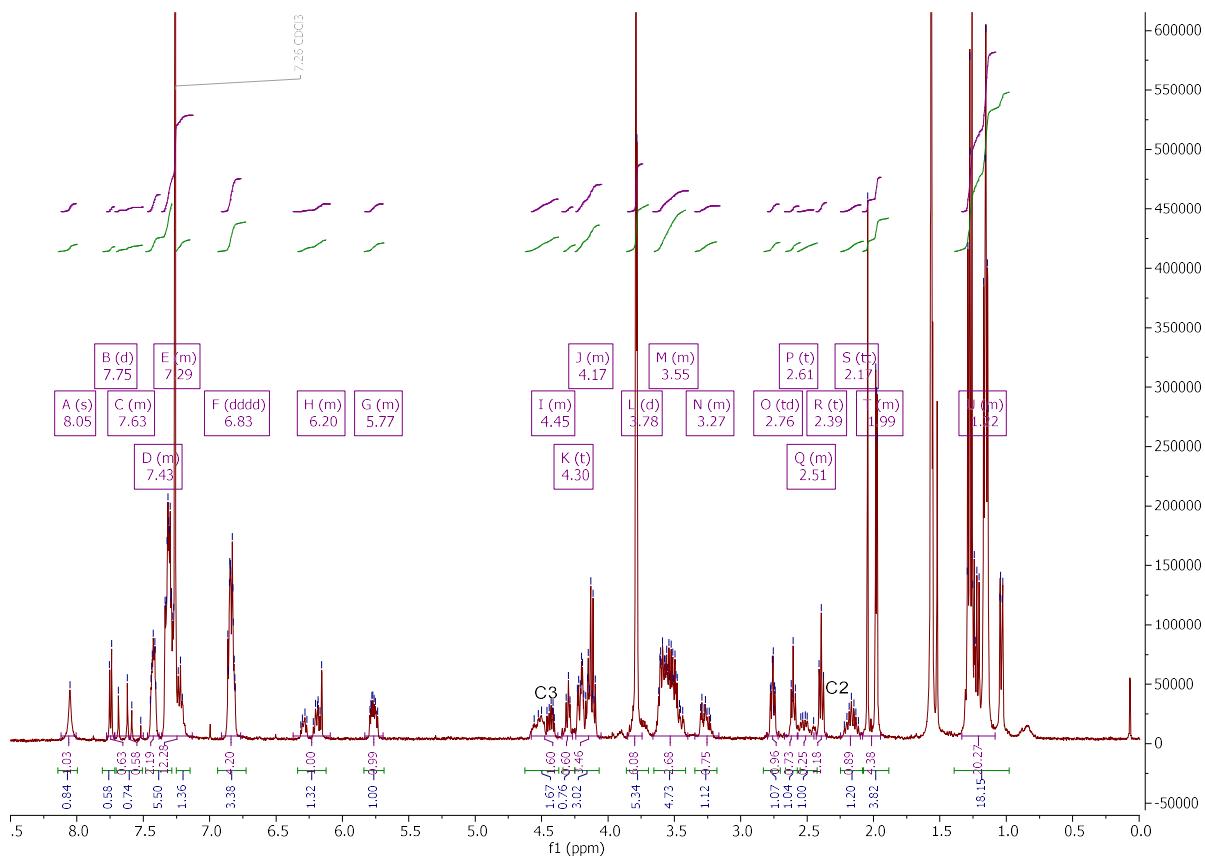


Abbildung SI 7: ^1H -NMR von Verbindung 1a.

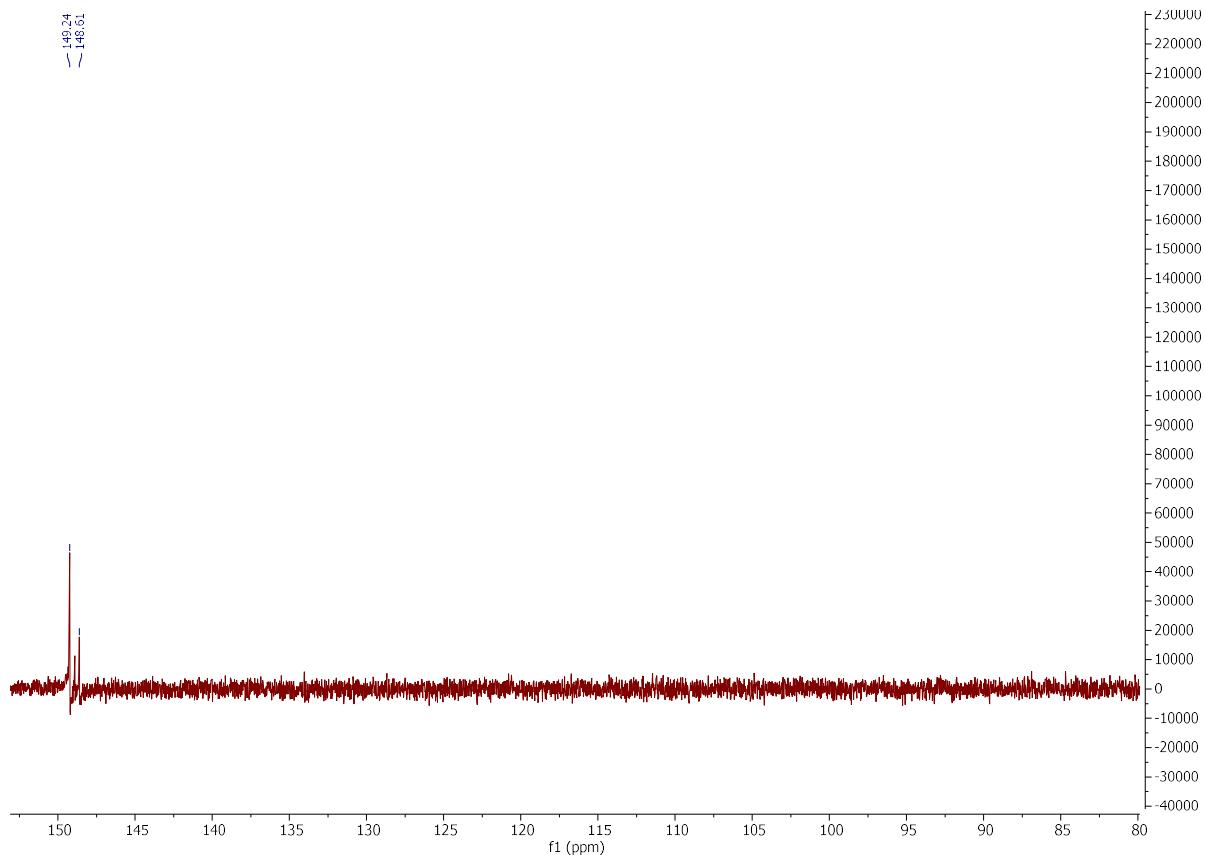


Abbildung SI 8: ^{31}P -NMR von Verbindung 1a.

Confidence
Data: MES_45a_ATT_0002.J10[c] 5 Dec 2022 10:51 Cal: small_Molc_29112022 29 Nov 2022 9:30
Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.3.20110624: Mode 2019_Reflectron_new, Power: 94, Blanked, P.Ext. @ 840 (bin 66

%Int. 171 mV[sum= 5976 mV] Profiles 1-35 Smooth Gauss 30 -Baseline 400

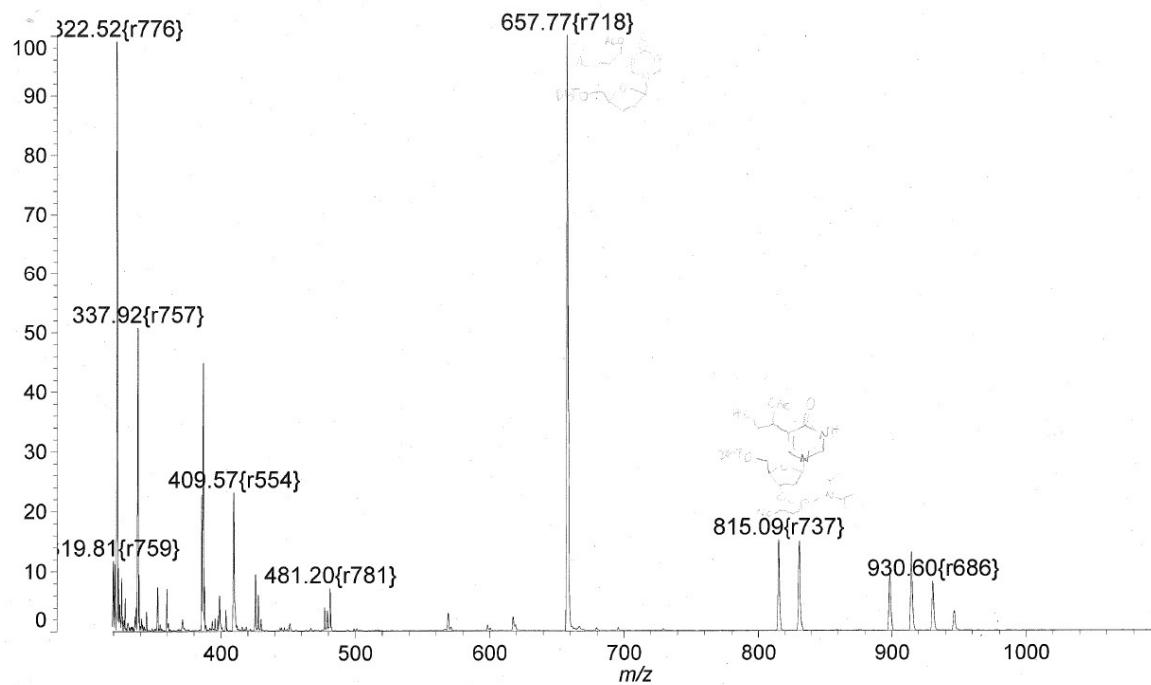
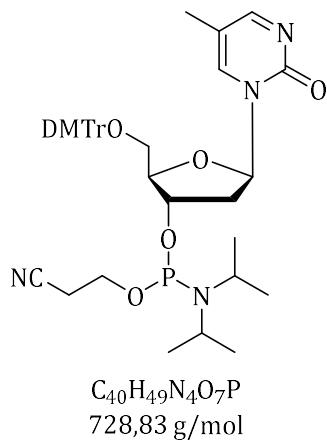


Abbildung SI 9: MALDI Analyse von Verbindung 1a.

1.2 Pyo Photosensibilisator

1.2.1 Verbindung 2



R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.71

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.47 – 8.35 (m, 2H, CH_{arom}), 7.43 (ddd, *J* = 7.1, 3.8, 2.1 Hz, 2H, CH_{arom}), 7.31 – 7.20 (m, 6H, CH_{arom}), 6.88 (ddd, *J* = 8.8, 5.7, 2.8 Hz, 4H, CH_{arom}), 6.19 (dt, *J* = 6.6, 4.7 Hz, 1H, C1'H), 4.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, C3'H), 4.29 – 4.24 (m, 1H, C4'H), 4.23 – 4.08 (m, 2H, PO-CH₂), 3.92 – 3.72 (m, 8H, C5'H₂, O-CH₃), 2.87 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, NC-CH₂), 2.72 (dq, *J* = 11.2, 6.4, 5.5 Hz, 3H, C2'H₂, N-CH), 2.52 – 2.40 (m, 1H, C2'H₂), 1.66 (d, *J* = 11.4 Hz, 3H, CH₃), 1.20 (ddt, *J* = 13.7, 6.8, 4.1 Hz, 12H, iPr-CH₃).

2D-NMR (MeOD-*d*₄): COSY.

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, MeOD-*d*₄) δ 148.67, 148.55, 15.17.

MALDI: m/z (berechnet) = 751.82 [M+Na⁺]; m/z (gefunden) = 751.85 [M+Na⁺].

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 729.3412 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 729.3410 [M+H⁺].

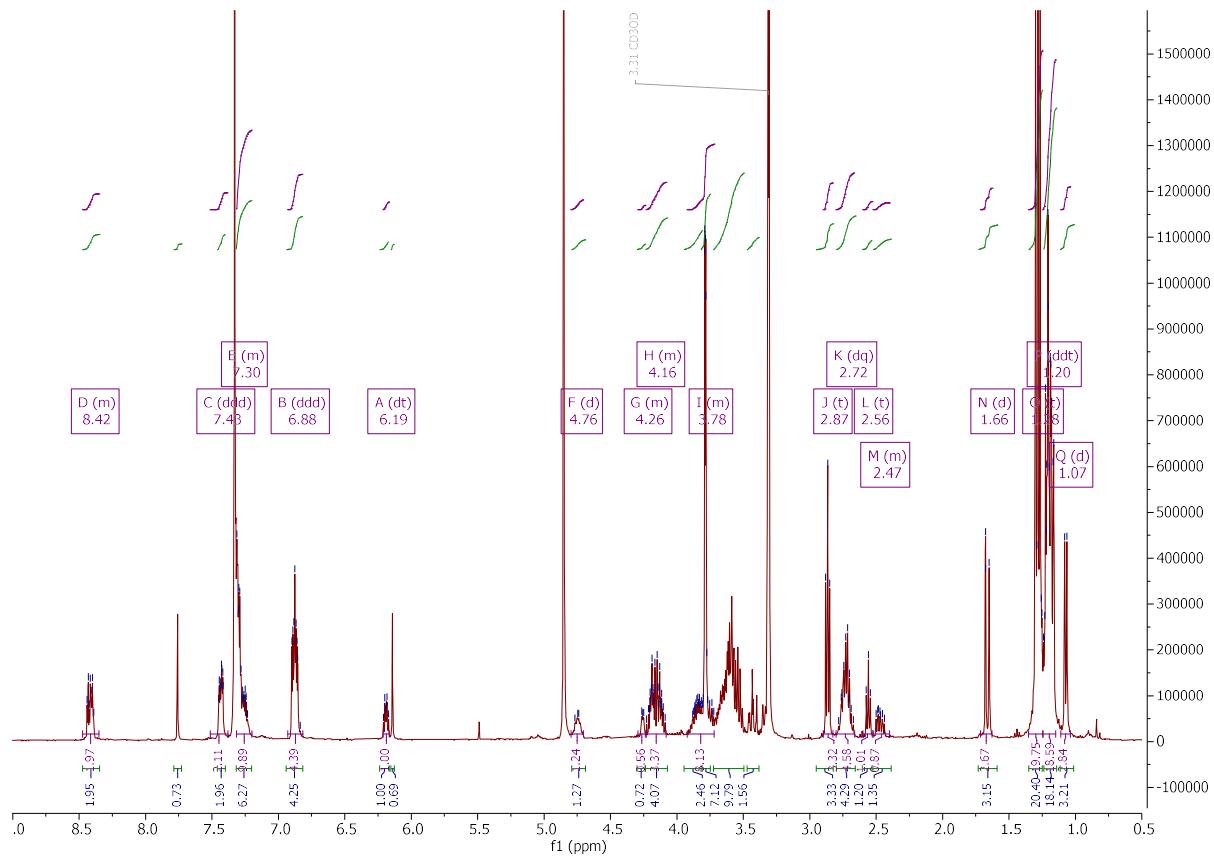


Abbildung SI 10: ^1H -NMR von Verbindung 2.

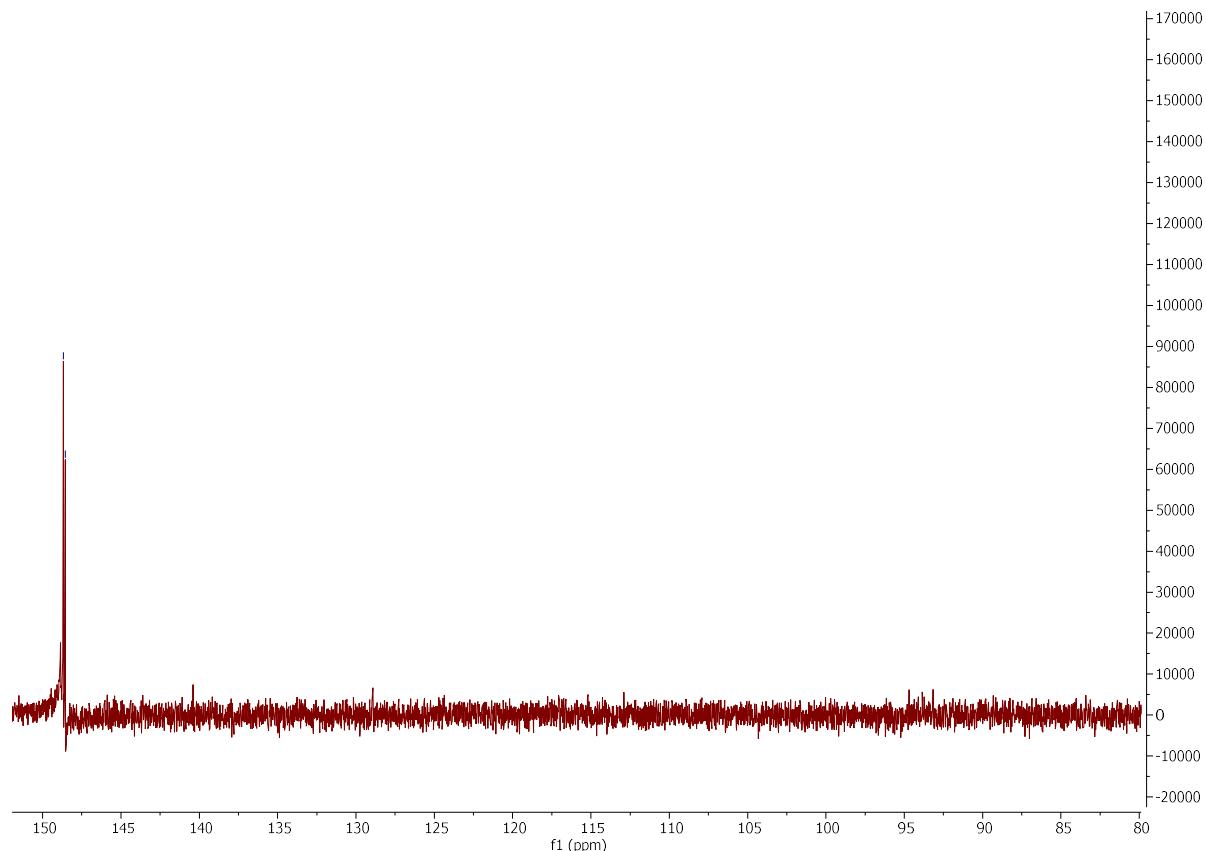


Abbildung SI 11: ^{31}P -NMR von Verbindung 2.

Unterstützende Informationen

Confidence
 Data: MES_ATT_0001.F12[c] 20 Jun 2023 11:33 Cal: small_Molc_13032023 25 Nov 2022 9:30
 Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.3.20110624: Mode 2019_Reflectron_new, Power: 84, Blanked, P.Ext. @ 700 (bin 61

%Int. 42 mV[sum= 3816 mV] Profiles 1-91 Smooth Gauss 5 -Baseline 15

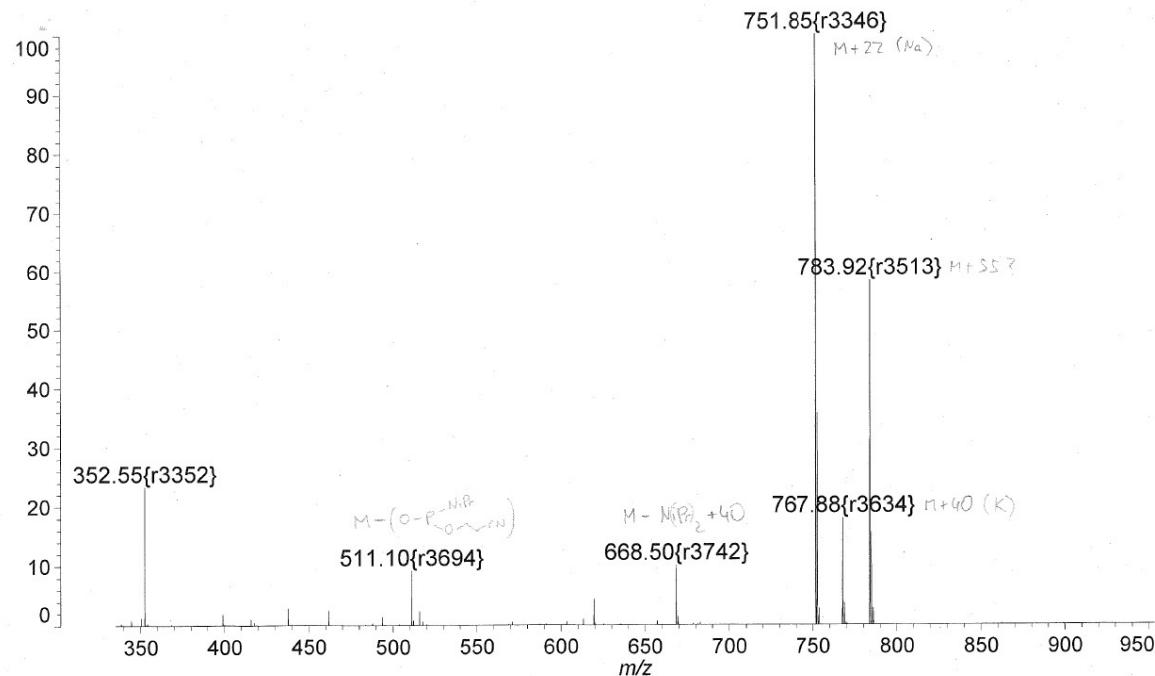


Abbildung SI 12: MALDI Analyse von Verbindung 2.

MES_45C_Pyo #1-20 RT: 0.02-0.39 AV: 20 NL: 8.62E4
 T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1500.0000]

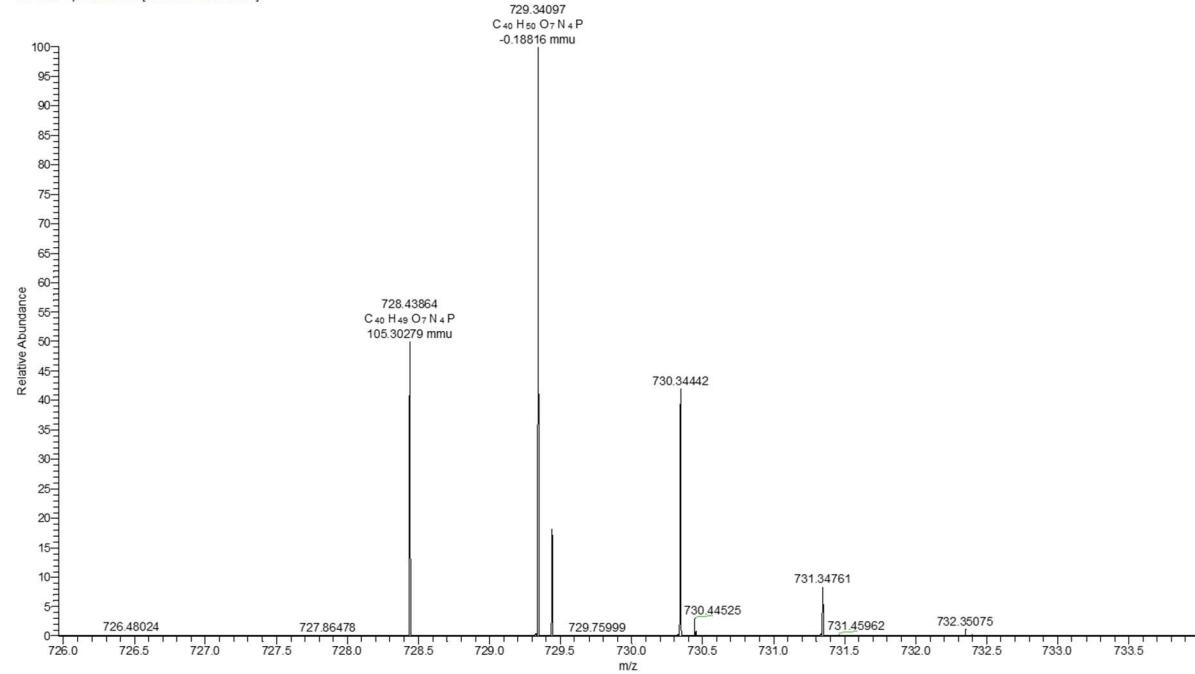
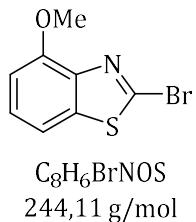


Abbildung SI 13: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 2.

1.3 Pheomelanin Photosensibilisator

1.3.1 Verbindung 13



R_f (*n*Hex/EE 5:1) = 0.50

1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.62 (d, J = 8.1 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.43 (t, J = 8.1 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.07 (d, J = 8.3 Hz, 1H, CH_{arom.}), 3.94 (s, 3H; O-CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.41, 141.83, 138.41, 136.98, 127.13, 113.58, 108.20, 55.91.

2D-NMR (DMSO-*d*₆): COSY, HSQC, HMBC.

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[99]

Unterstützende Informationen

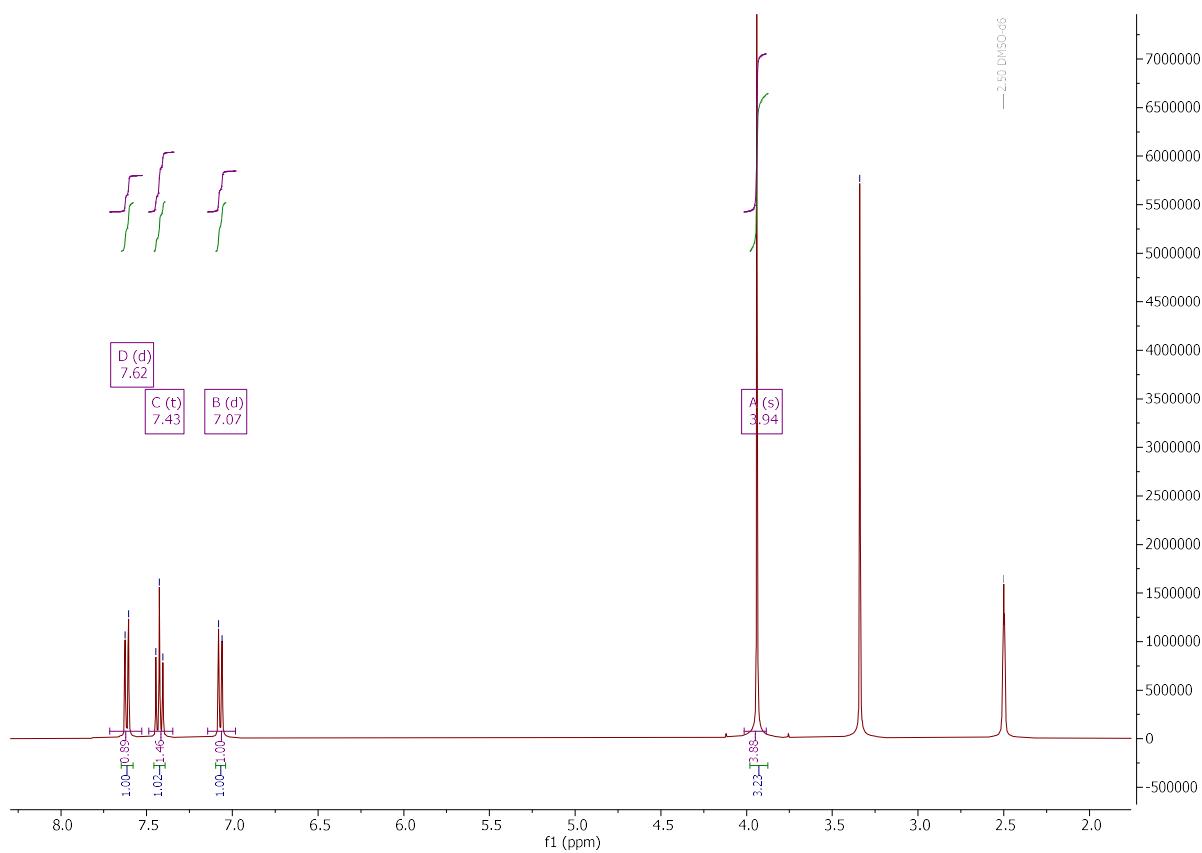


Abbildung SI 14: ¹H-NMR von Verbindung 13.

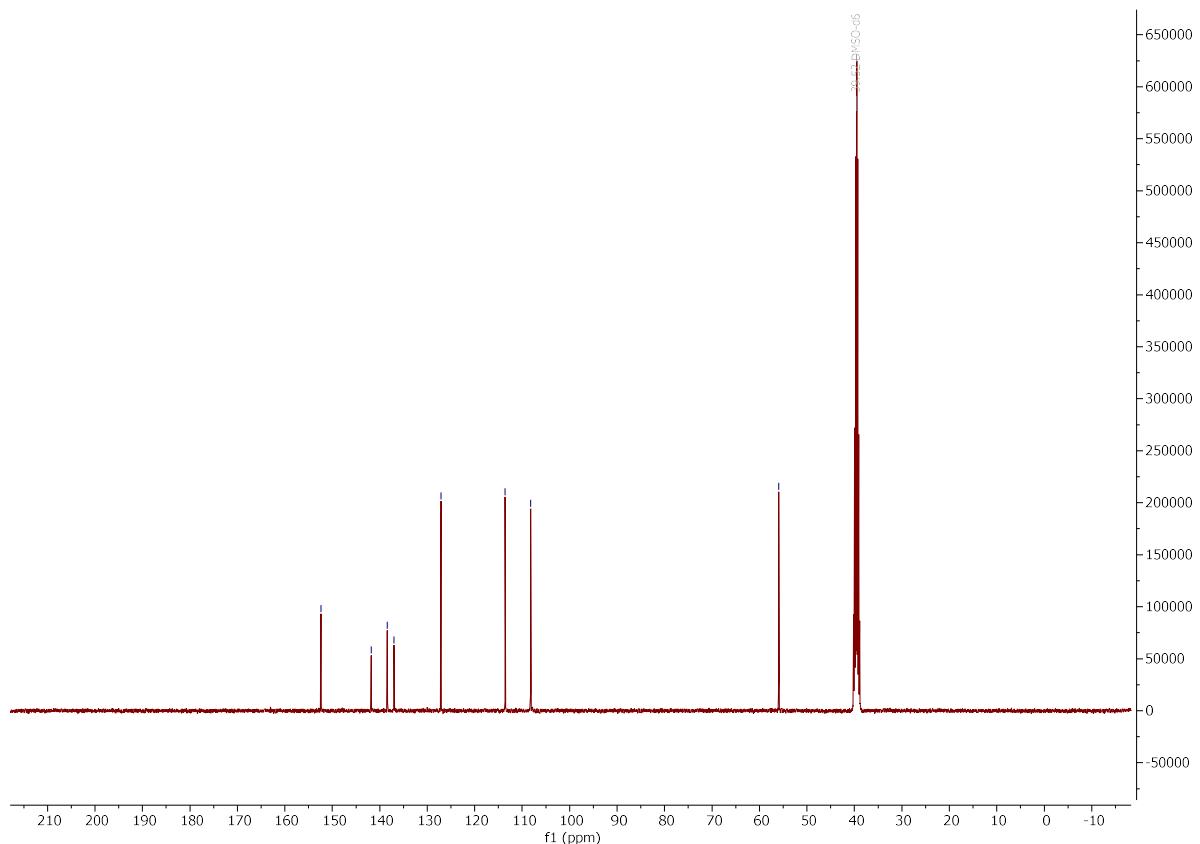
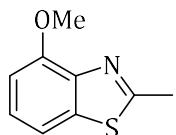


Abbildung SI 15: ¹³C-NMR von Verbindung 13.

1.3.2 Verbindung 14



C₉H₉NOS
179,24 g/mol

R_f(nHex/EE 5:1) = 0.20

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.55 (d, J = 9.1 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.32 (t, J = 8.0 Hz, 1H, CH_{arom.}), 7.00 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH_{arom.}), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 2.76 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.79, 152.60, 142.81, 136.78, 125.78, 113.67, 107.45, 55.78, 19.70.

2D-NMR (DMSO-*d*₆): COSY, HSQC, HMBC.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 180.0478 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 180.0474 [M+H⁺].

Unterstützende Informationen

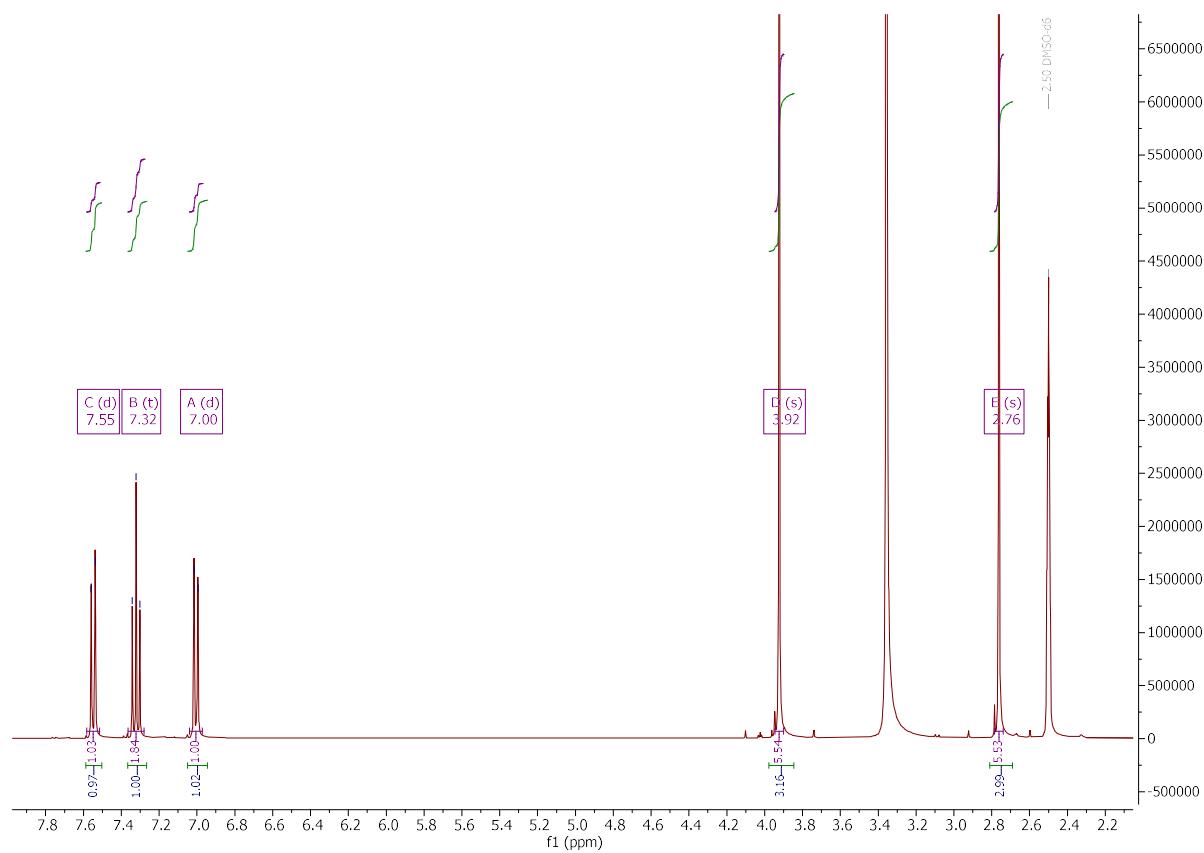


Abbildung SI 16: ¹H-NMR von Verbindung 14.

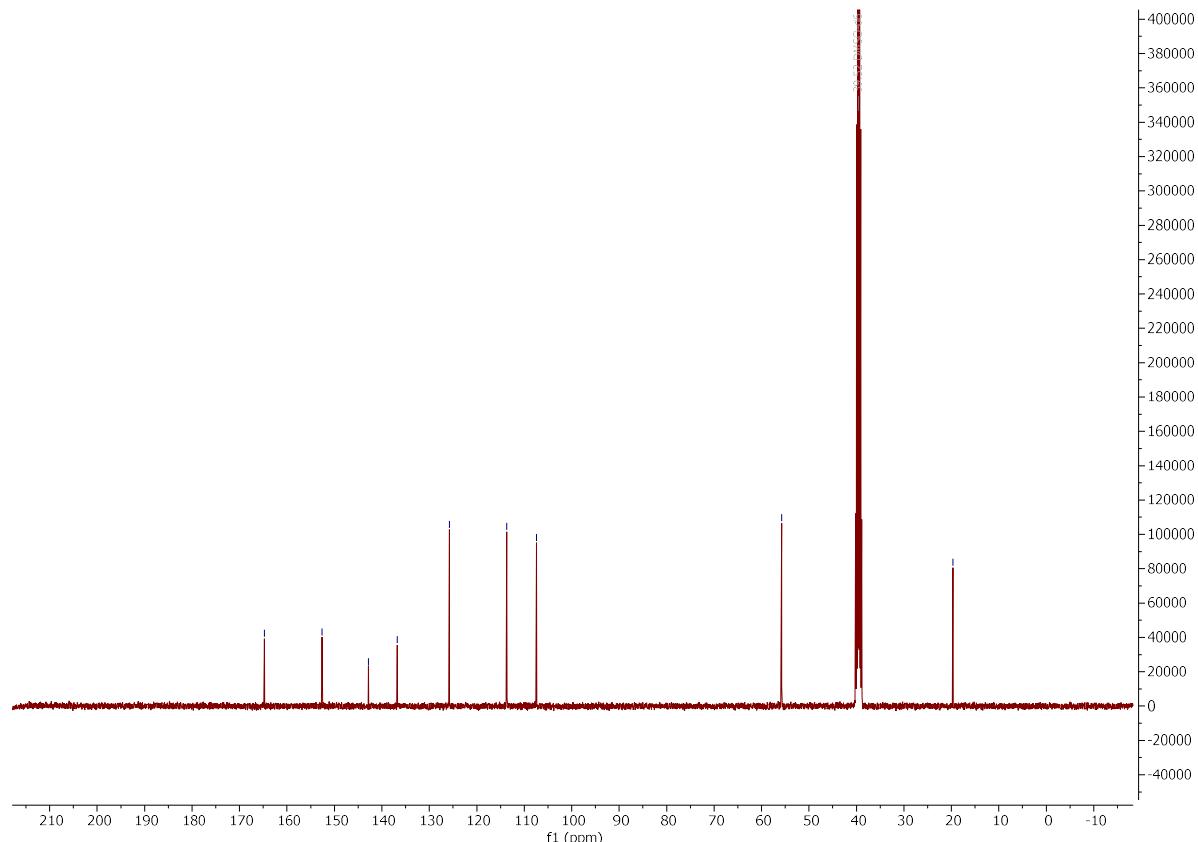


Abbildung SI 17: ³¹P-NMR von Verbindung 14.

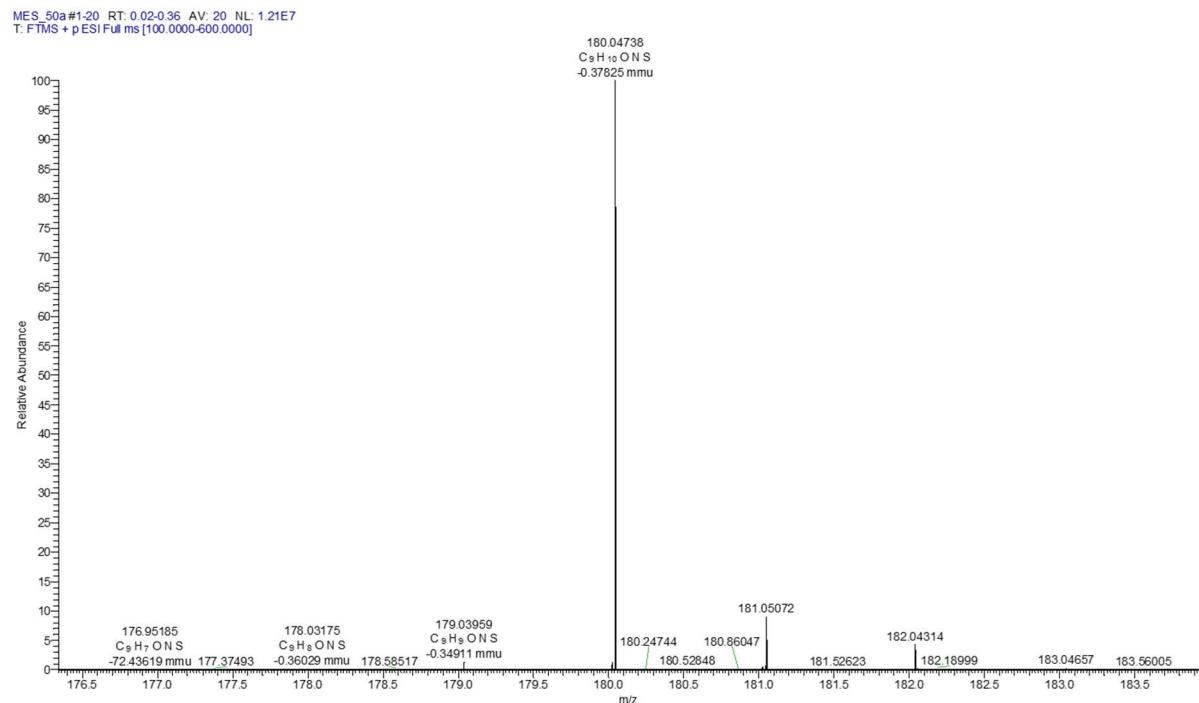
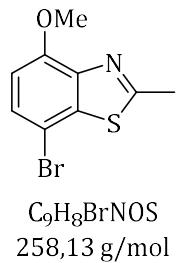


Abbildung SI 18: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 14.

1.3.3 Verbindung 15



R_f (nHex/EE 5:1) = 0.14

1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CH_{arom.}), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CH_{arom.}), 4.01 (s, 3H, O-CH₃), 2.84 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.13, 152.29, 142.90, 139.72, 128.09, 108.22, 104.05, 56.25, 20.30.

2D-NMR (CDCl₃): COSY, HSQC, HMBC.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 259.9562 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 259.9553 [M+H⁺].

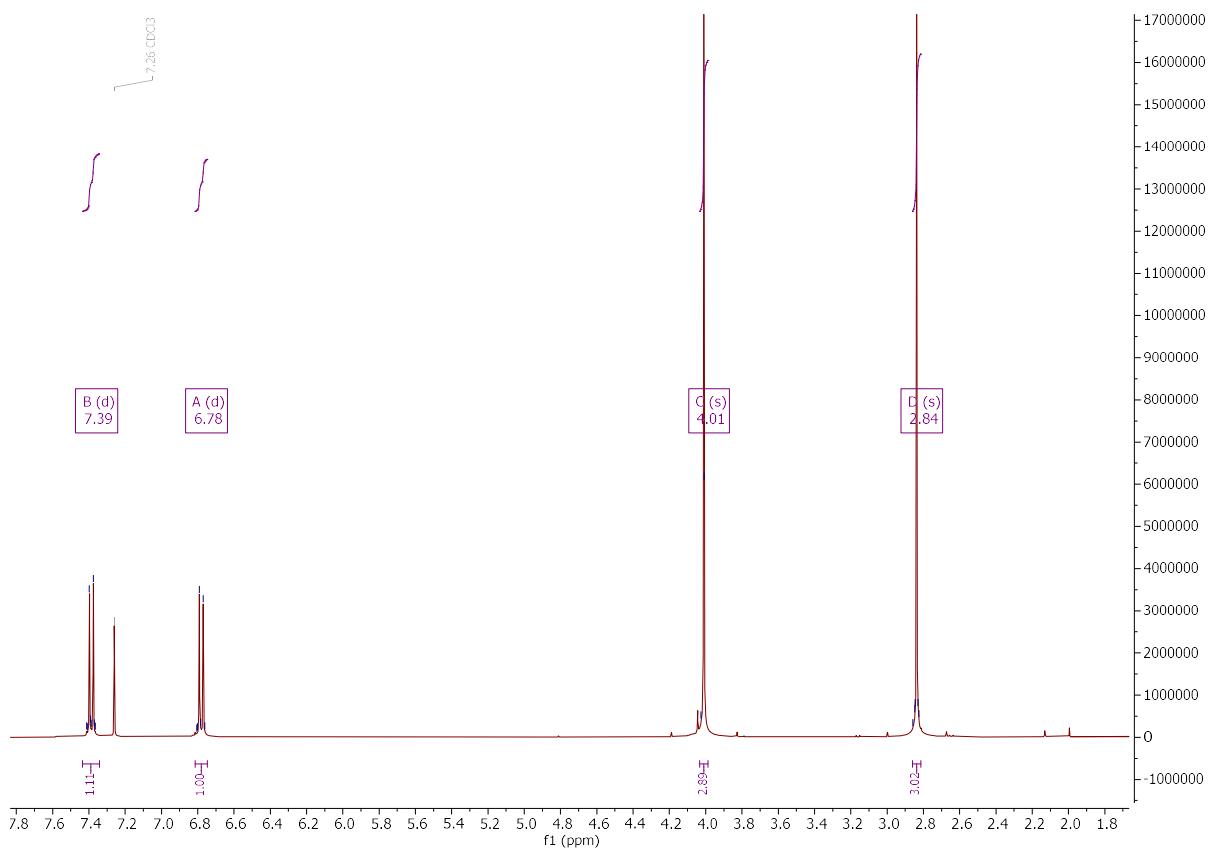


Abbildung SI 19: ^1H -NMR von Verbindung 15.

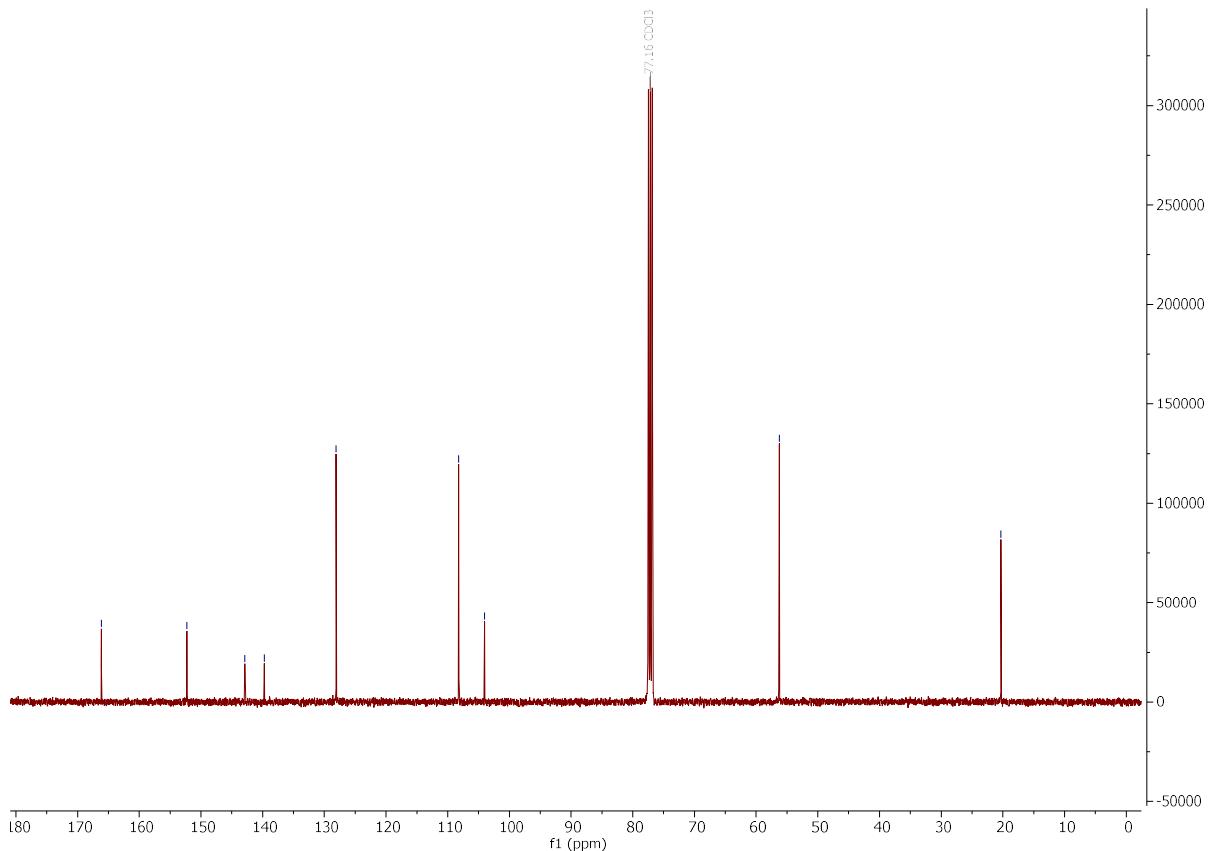


Abbildung SI 20: ^{13}C -NMR von Verbindung 15.

Unterstützende Informationen

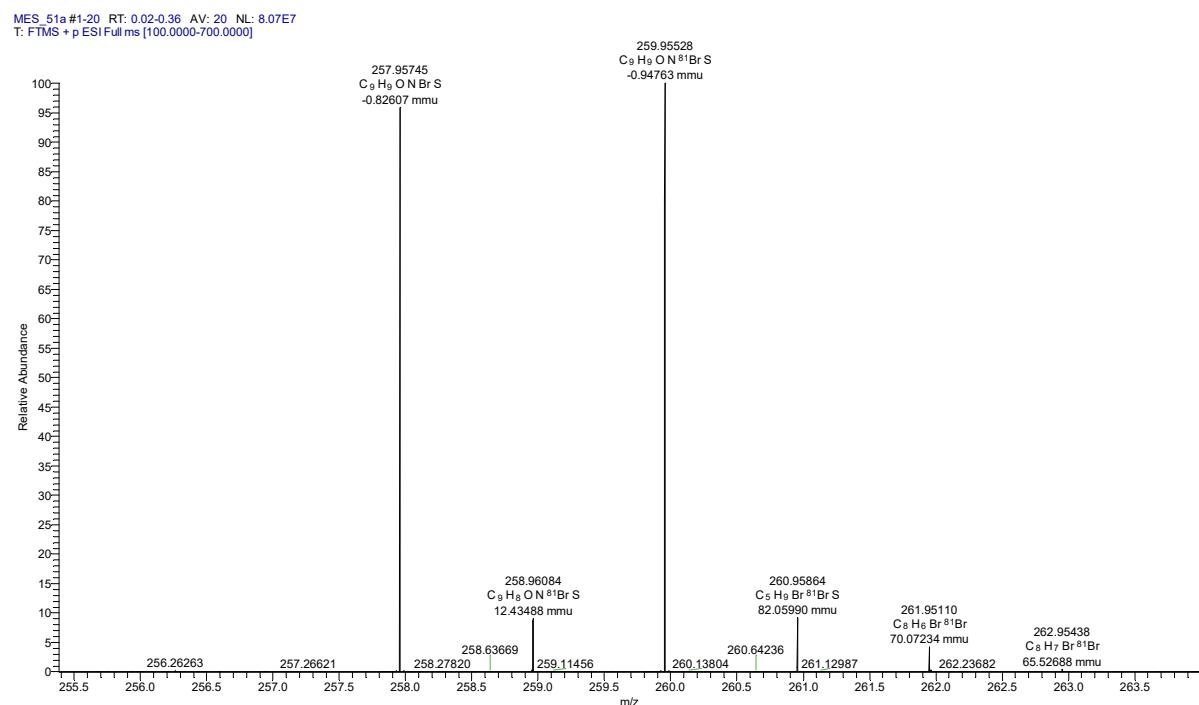
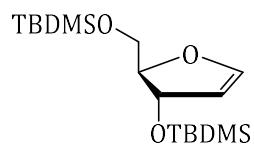


Abbildung SI 21: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 15.

1.3.4 Verbindung 16



$C_{17}H_{36}O_3Si_2$
344,64 g/mol

R_f (DCM) = 0.80

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.47 (dd, J = 2.7, 1.0 Hz, 1H, C1'H), 5.01 (t, J = 2.6 Hz, 1H, C2'H), 4.86 (td, J = 2.7, 1.0 Hz, 1H, C3'H), 4.29 (td, J = 6.0, 2.8 Hz, 1H, C4'H), 3.69 (dd, J = 10.7, 5.7 Hz, 1H, C5'H₂), 3.56 – 3.47 (m, 1H, C5'H₂), 0.93 – 0.82 (m, 18H, *t*Bu-Si-CH₃), 0.15 – 0.03 (m, 12H, Me-Si-CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[128]

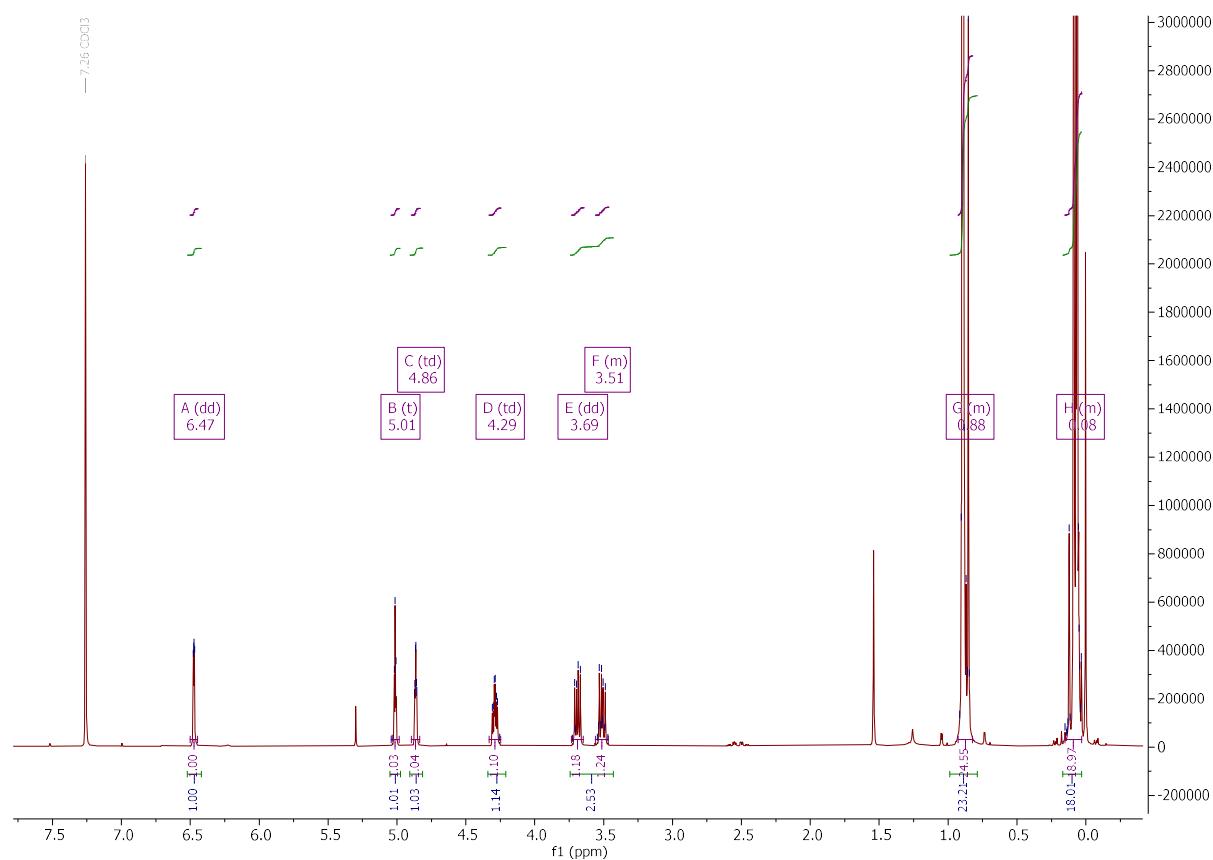
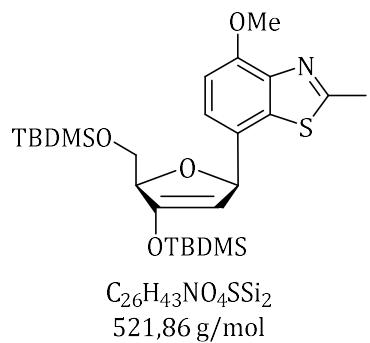


Abbildung SI 22: 1H -NMR von Verbindung 16.

1.3.5 Verbindung 17



R_f (nHex/EE 2:1) = 0.21

^1H NMR (400 MHz, MeOD-*d*4) δ 7.40 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CHarom.) 6.98 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CHarom.), 5.88 (dd, J = 3.8, 1.6 Hz, 1H, C1'H), 5.02 (t, J = 1.8 Hz, 1H, C2'H), 4.59 (ddt, J = 5.9, 4.3, 2.1 Hz, 1H, C4'H), 4.00 (s, 3H, O-CH₃), 3.90 (dd, J = 11.3, 2.3 Hz, 1H, C5'H₂), 3.81 (dd, J = 11.3, 5.3 Hz, 1H, C5'H₂), 2.80 (s, 3H, CH₃), 0.90 (d, J = 93.4 Hz, 18H, *t*Bu-Si-CH₃), -0.07 (d, J = 17.9 Hz, 12H, Me-Si-CH₃).

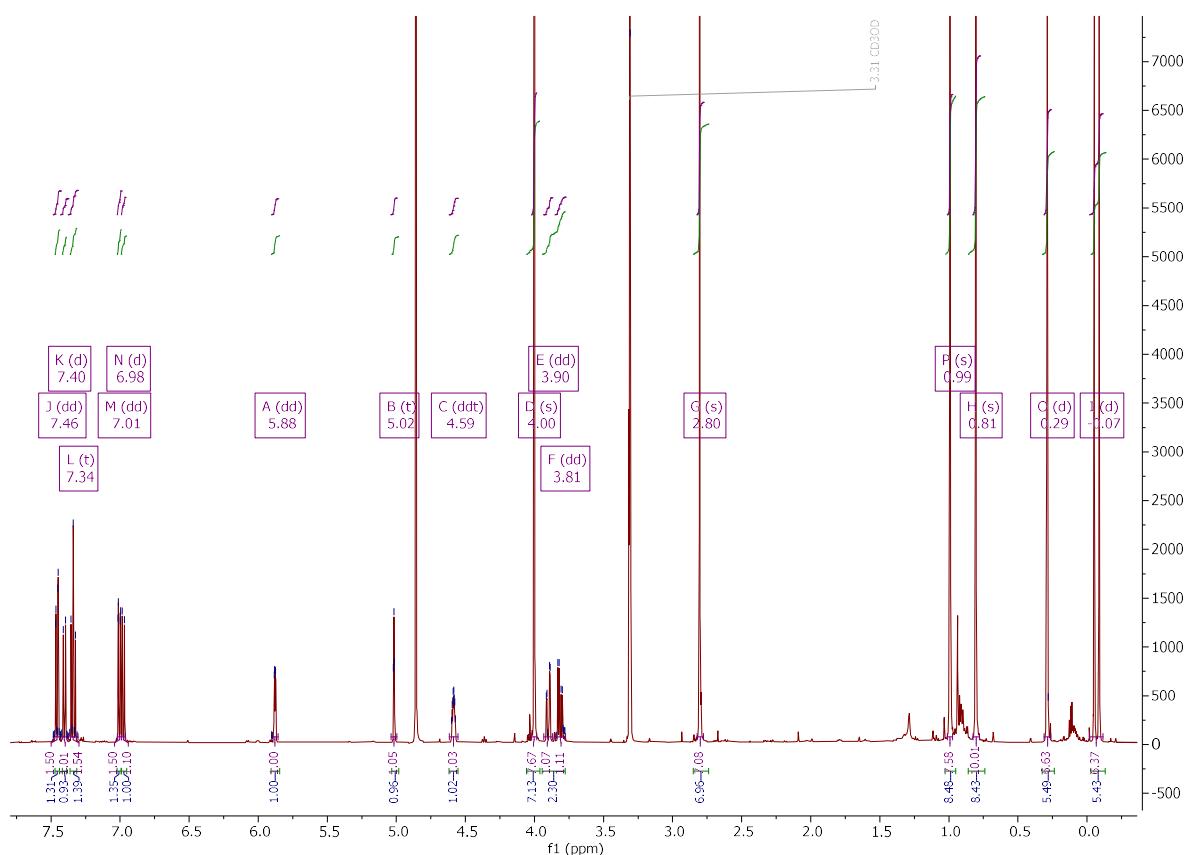
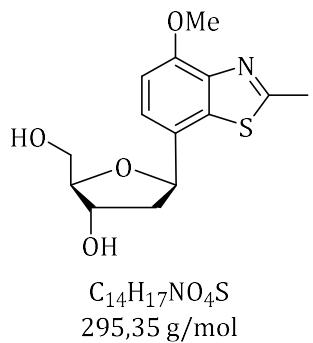


Abbildung SI 23: ^1H -NMR von Verbindung 17.

1.3.6 Verbindung 18



R_{f1} (*n*Hex/EE 2:1) = 0.26

R_{f2} (DCM/MeOH 5:1) = 0.74

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.97 (dd, *J* = 8.3, 3.0 Hz, 1H, CH_{arom}), 5.25 (td, *J* = 10.2, 5.8 Hz, 1H, C1'H), 4.32 (dt, *J* = 6.3, 2.2 Hz, 1H, C3'H), 3.99 (s, 4H, C4'H, O-CH₃), 3.82 – 3.68 (m, 2H, C5'H₂), 2.80 (d, *J* = 2.6 Hz, 3H, CH₃), 2.20 (ddd, *J* = 13.1, 5.5, 1.8 Hz, 1H, C2'H₂), 2.14 – 1.96 (m, 1H, C2'H₂).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 168.86, 153.53, 144.44, 134.53, 129.32, 128.53, 124.42, 107.95, 89.53, 80.60, 74.23, 64.00, 56.39, 42.79, 19.30.

2D-NMR (MeOD-*d*₄): COSY, HSQC, HMBC.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 296.0951 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 296.0941 [M+H⁺].

Unterstützende Informationen

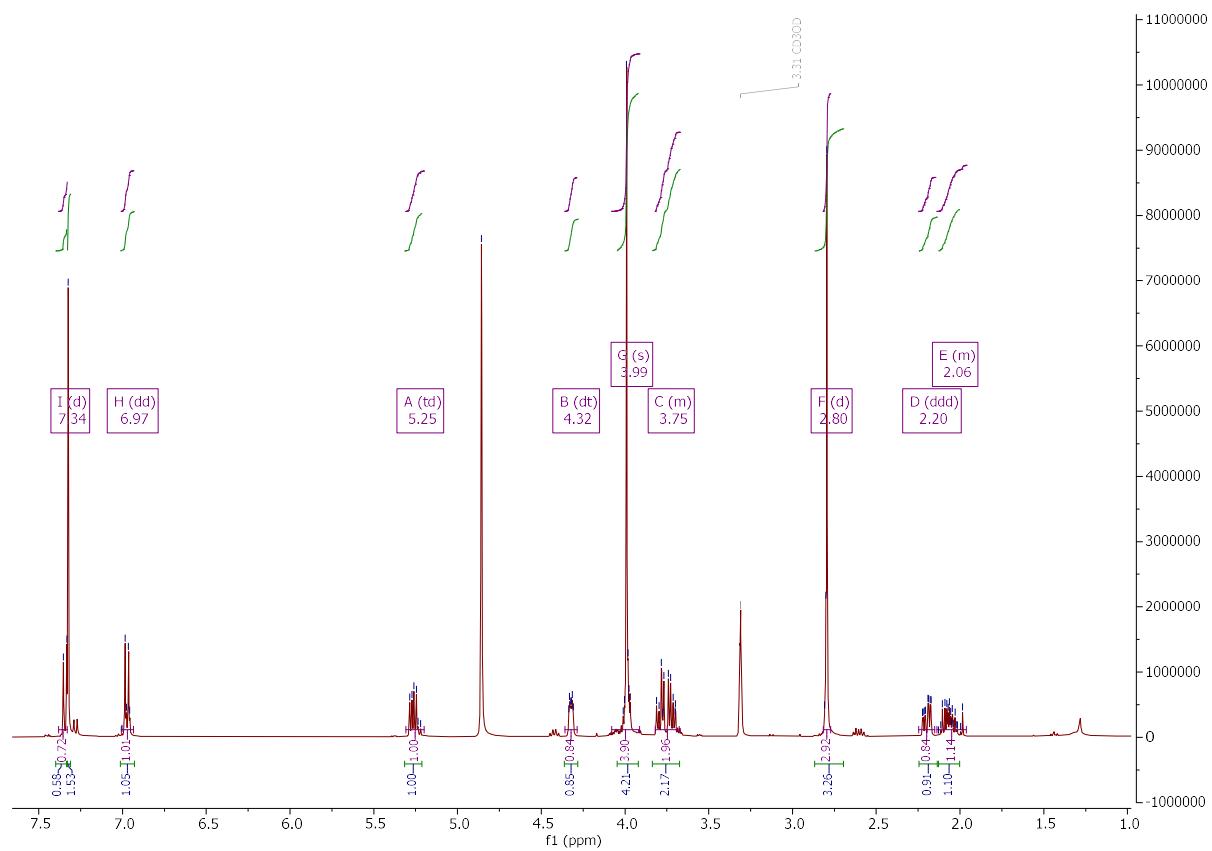


Abbildung SI 24: ^1H -NMR von Verbindung 18.

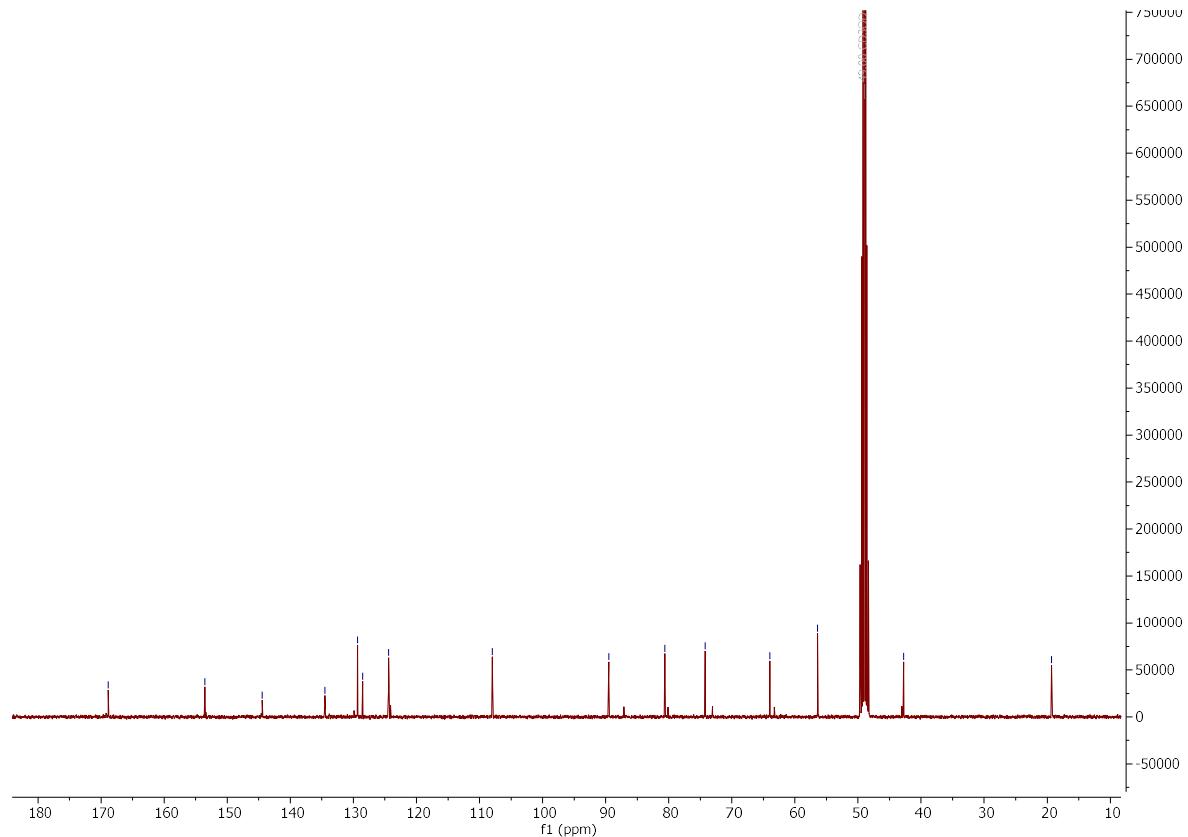


Abbildung SI 25: ^{13}C -NMR von Verbindung 18.

MES_53b_2 #1-20 RT: 0.02-0.36 AV: 20 NL: 4.26E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-650.0000]

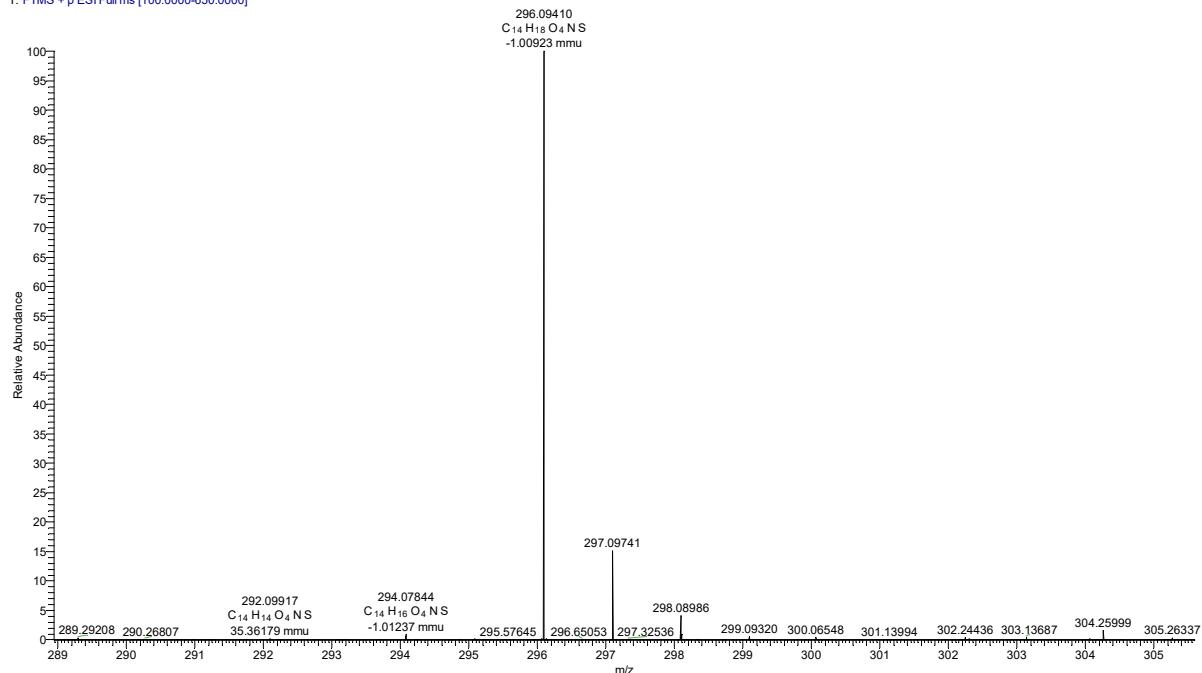
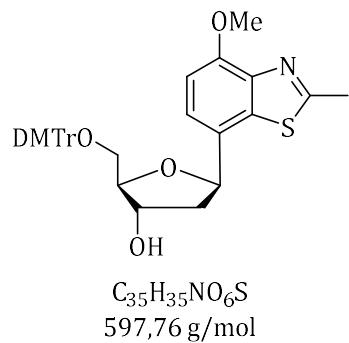


Abbildung SI 26: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 18.

1.3.7 Verbindung 19



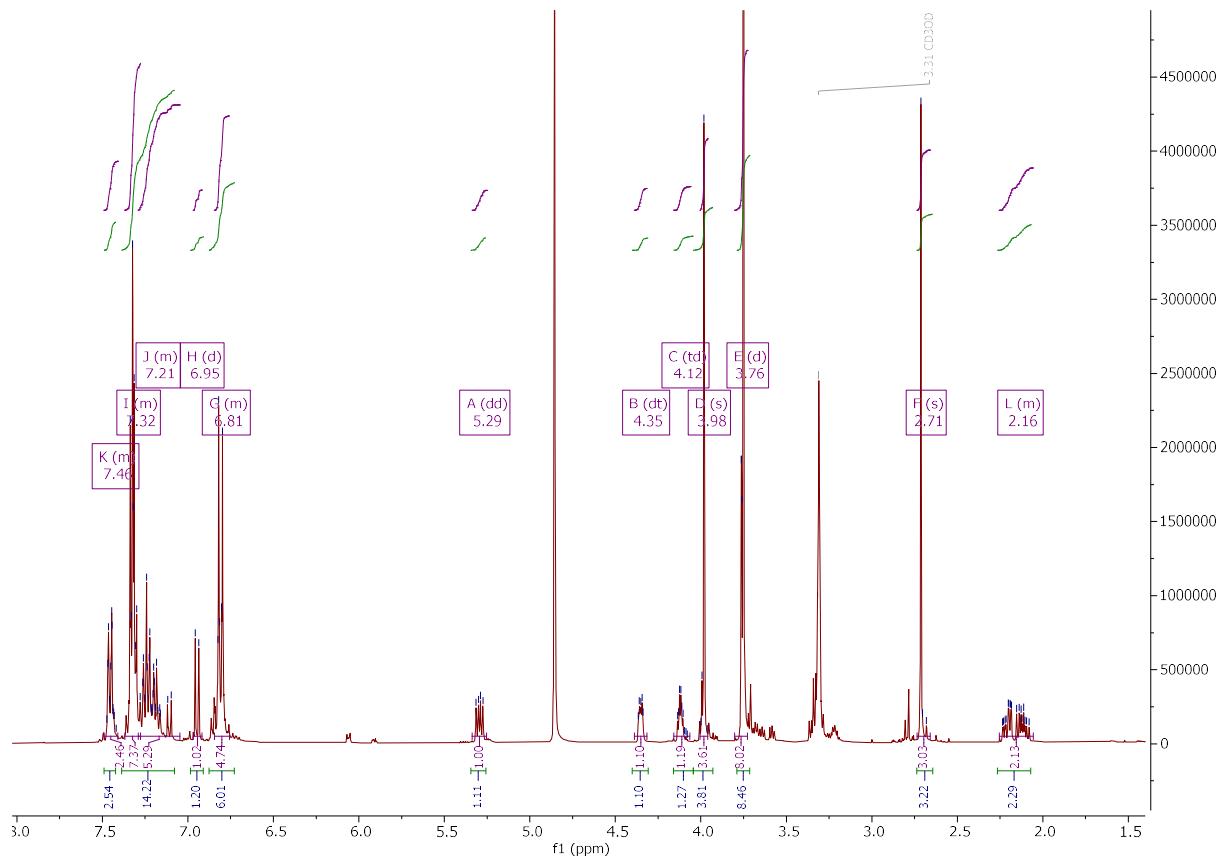
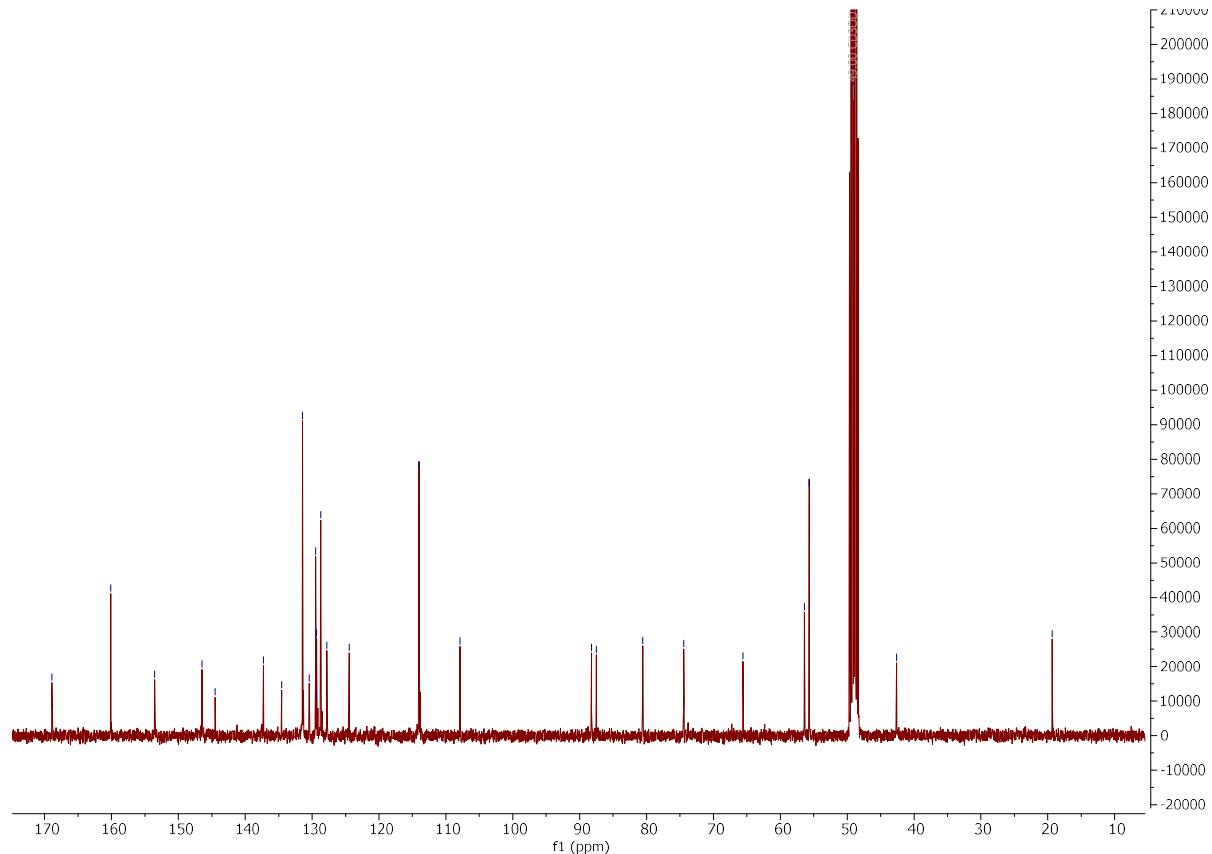
R_f (DCM/MeOH 95:5) = 0.66

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 7.49 – 7.41 (m, 2H, CH_{arom}), 7.37 – 7.28 (m, 7H, CH_{arom}), 7.29 – 7.05 (m, 5H, CH_{arom}), 6.95 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.84 – 6.76 (m, 5H, CH_{arom}), 5.29 (dd, J = 10.1, 5.7 Hz, 1H, C1'H), 4.35 (dt, J = 5.4, 2.3 Hz, 1H, C3'H), 4.12 (td, J = 4.8, 2.8 Hz, 1H, C4'H), 3.98 (s, 3H, O-CH₃), 3.76 (d, J = 4.7 Hz, 8H, C5'H₂, O-CH₃), 2.71 (s, 3H, CH₃), 2.25 – 2.06 (m, 2H, C2'H₂).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, MeOD- d_4) δ 168.91, 160.11, 153.53, 146.45, 144.50, 137.27, 134.55, 131.42, 130.45, 129.46, 129.36, 129.32, 128.72, 127.78, 124.45, 114.02, 107.88, 88.22, 87.52, 80.59, 74.45, 65.56, 56.40, 55.69, 42.63, 19.33.

2D-NMR (MeOD- d_4): COSY, HSQC, HMBC.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 598.2258 [M H⁺]; m/z (gefunden) = 598.2245 [M+H⁺].

Abbildung SI 27: ^1H -NMR von Verbindung 19.Abbildung SI 28: ^{13}C -NMR von Verbindung 19.

Unterstützende Informationen

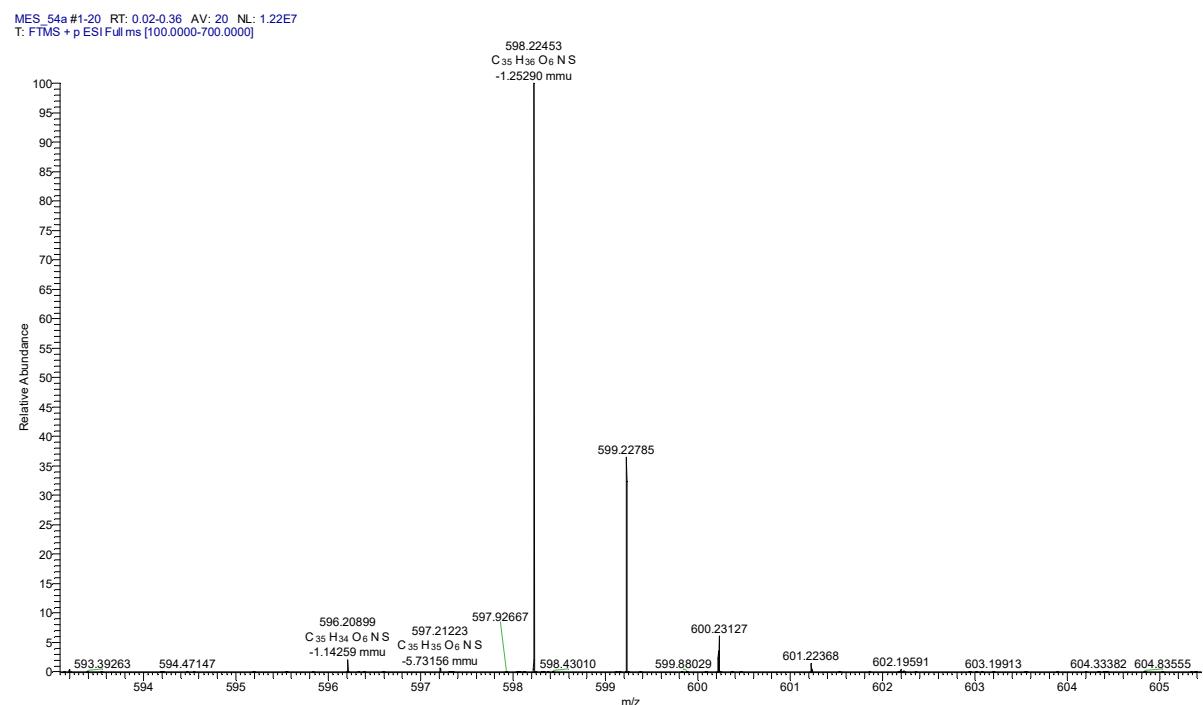
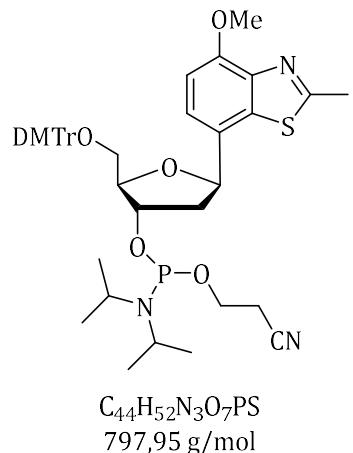


Abbildung SI 29: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 19.

1.3.8 Verbindung 3



R_f (DCM/MeOH 95:5) = 0.74

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 7.52 – 7.43 (m, 2H, CH_{arom}), 7.39 – 7.18 (m, 8H, CH_{arom}), 7.11 (d, J = 8.8 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.98 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.84 (ddd, J = 8.8, 5.9, 2.9 Hz, 5H, CH_{arom}), 5.30 (dd, J = 10.0, 5.6 Hz, 1H, C1'H), 4.59 (d, J = 7.5 Hz, 1H, C3'H), 4.28 – 4.17 (m, 1H, C4'H), 4.00 (s, 3H, O-CH₃), 3.77 (d, J = 2.3 Hz, 8H, iPr-CH, O-CH₃), 3.73 – 3.57 (m, 2H, PO-CH₂), 3.38 (dd, J = 16.0, 4.9 Hz, 2H, C5'H₂), 2.72 (d, J = 5.4 Hz, 3H, CH₃), 2.59 (dt, J = 10.6, 6.0 Hz, 2H, CN-CH₂), 2.47 – 2.30 (m, 2H, C2'H₂), 1.39 – 1.07 (m, 12H, iPr CH₃).

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, MeOD- d_4) δ 148.16, 148.04.

2D-NMR (MeOD- d_4): COSY.

HR-ESI-MS: m/z (berechnet) = 798.3336 [M+H⁺]; m/z (gefunden) = 798.3311 [M+H⁺].

Unterstützende Informationen

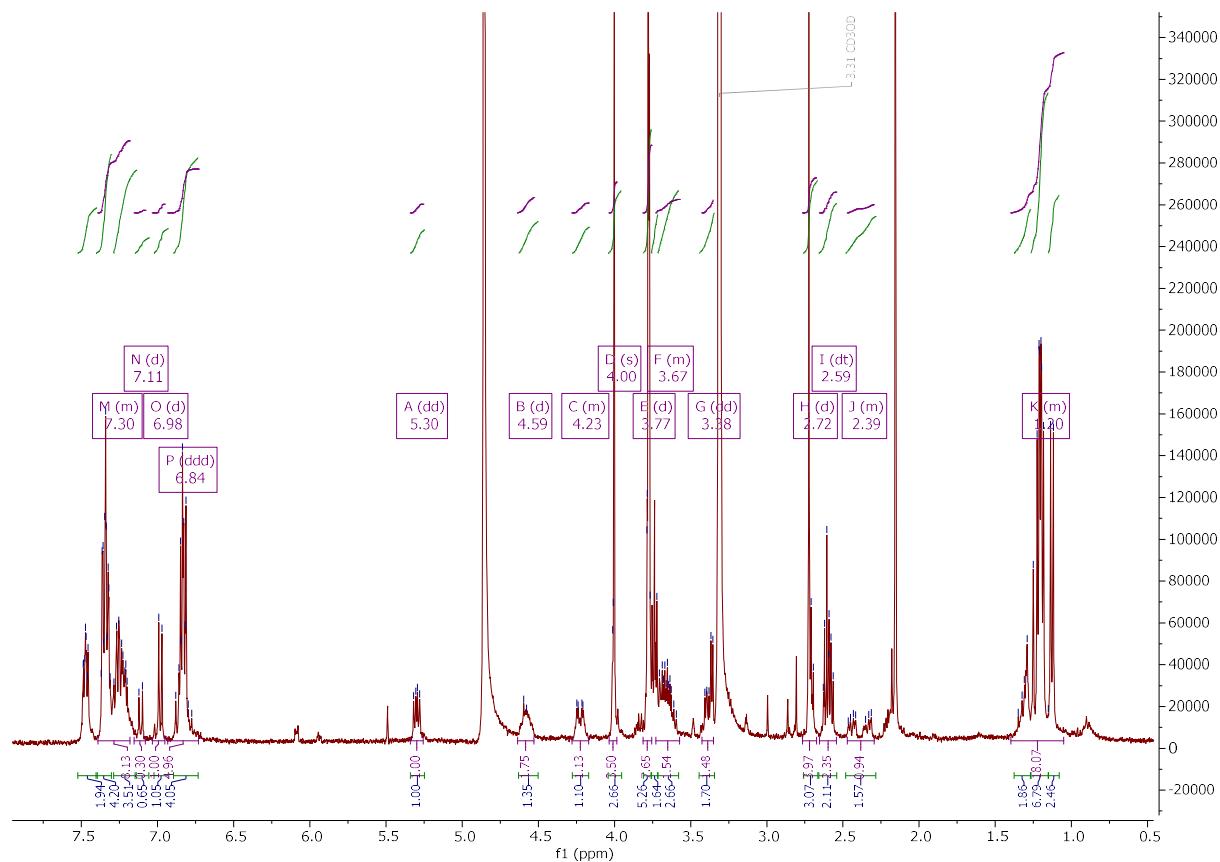


Abbildung SI 30: ^1H -NMR von Verbindung 3.

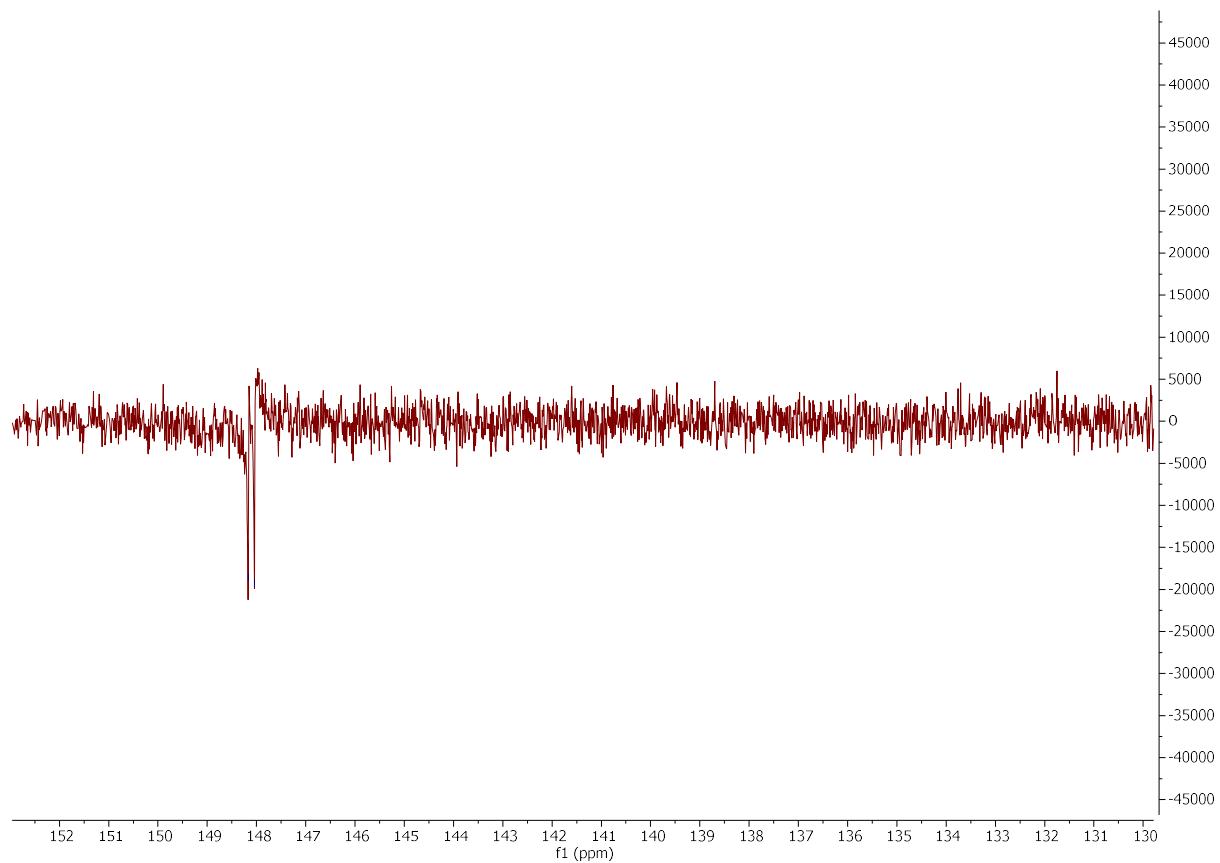


Abbildung SI 31: ^{13}C -NMR von Verbindung 3.

MES-55a #1-20 RT: 0.02-0.36 AV: 20 NL: 4.82E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1100.0000]

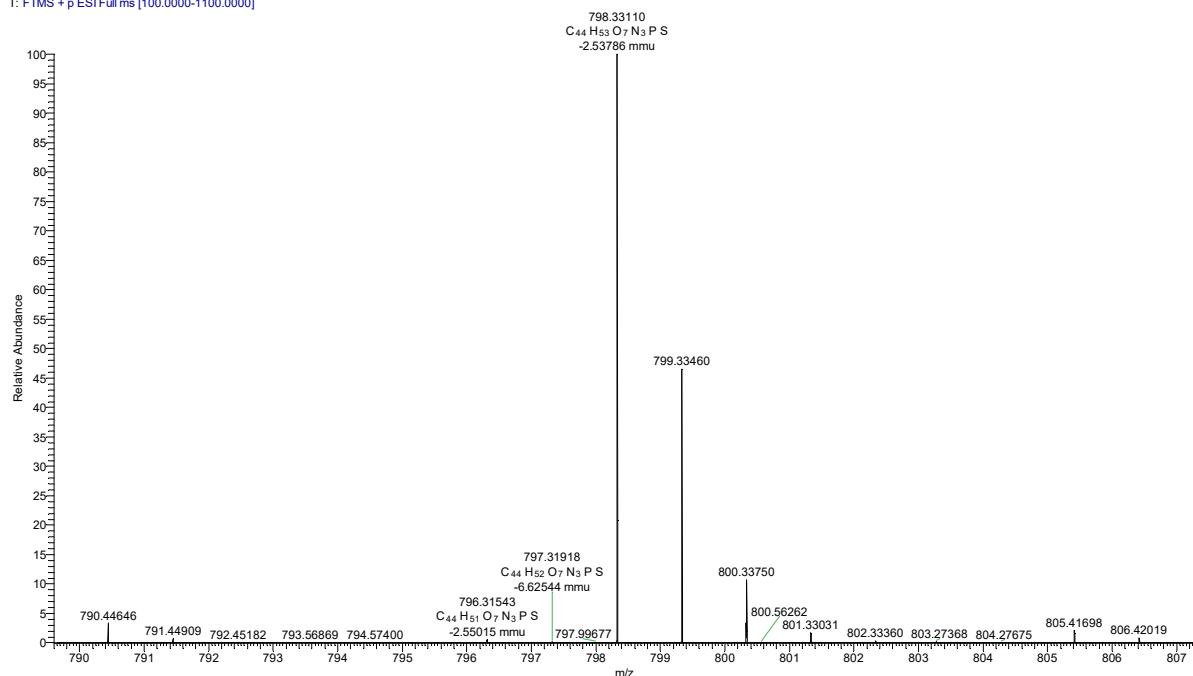


Abbildung SI 32: HR-ESI-MS Analyse von Verbindung 3.

2. Extinktionskoeffizient Pheo

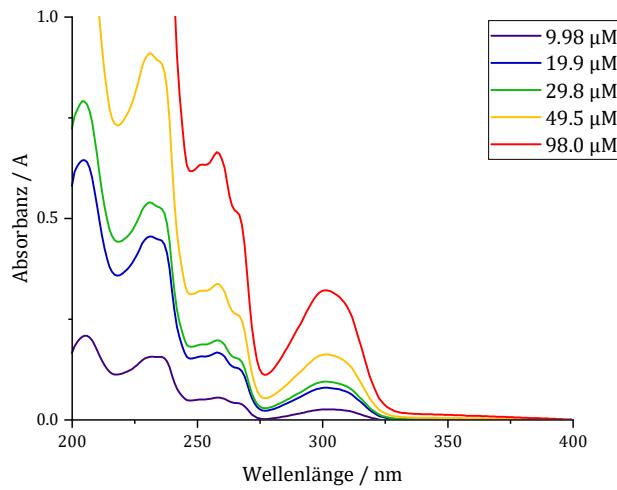


Abbildung SI 33: Absorbanz von Nukleosid **18** bei verschiedenen Konzentrationen zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 260 nm.

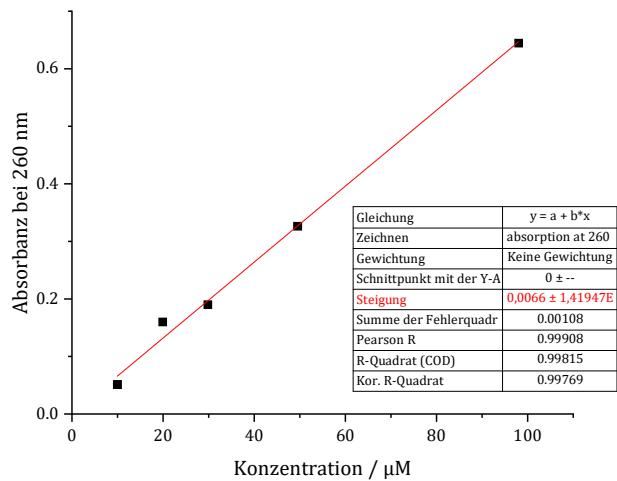


Abbildung SI 34: Berechnung des Extinktionskoeffizienten des Nukleosids **18** durch eine lineare Fit Funktion.

3. Charakterisierung der Oligonukleotide

3.1 Formyl-Modifikationen

3.1.1 DNA0-fdU

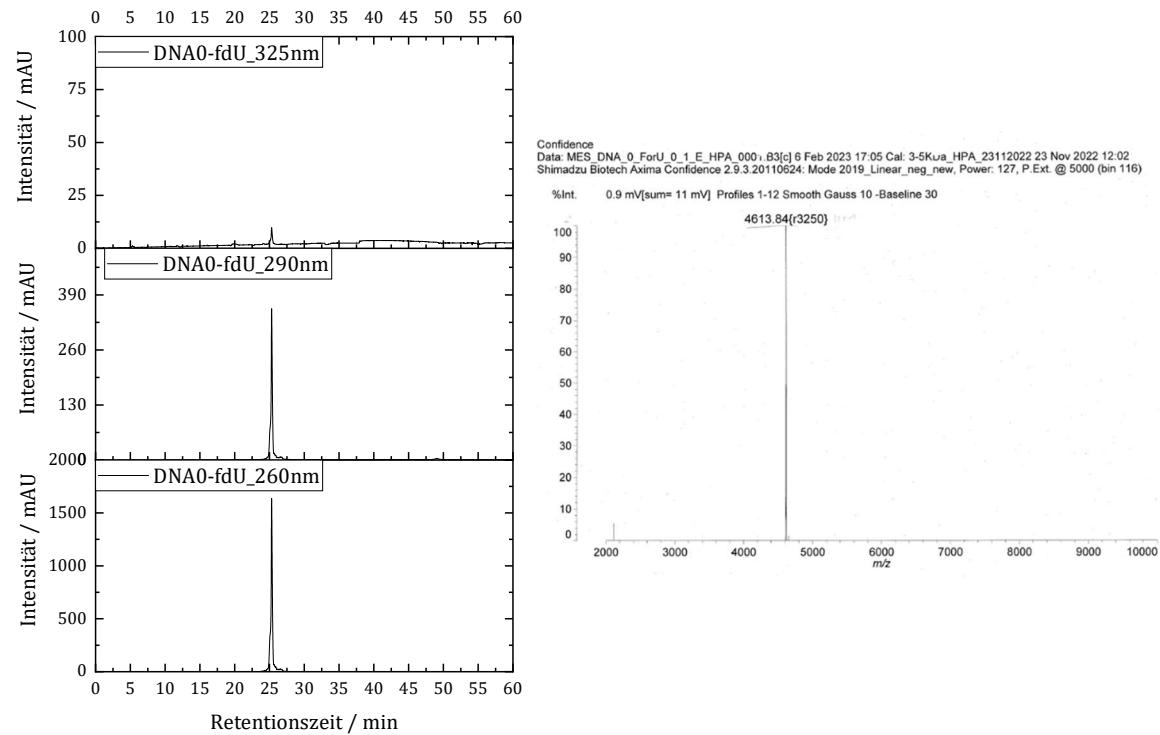


Abbildung SI 35: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA0-fdU a, gesucht [M]: 4612.0 gefunden: 4613.8.

Unterstützende Informationen

3.1.2 DNA1-fdU

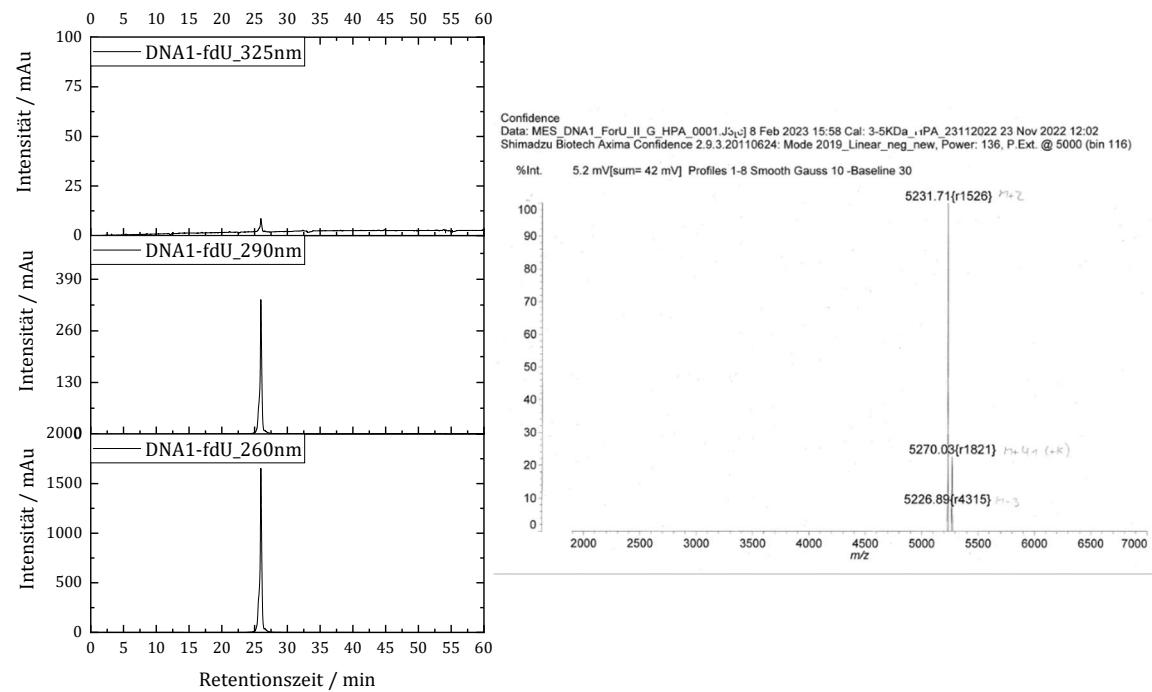


Abbildung SI 36: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA1-fdU a, gesucht [M]: 5229.1 gefunden: 5231.7.

3.1.3 DNA2-fdU

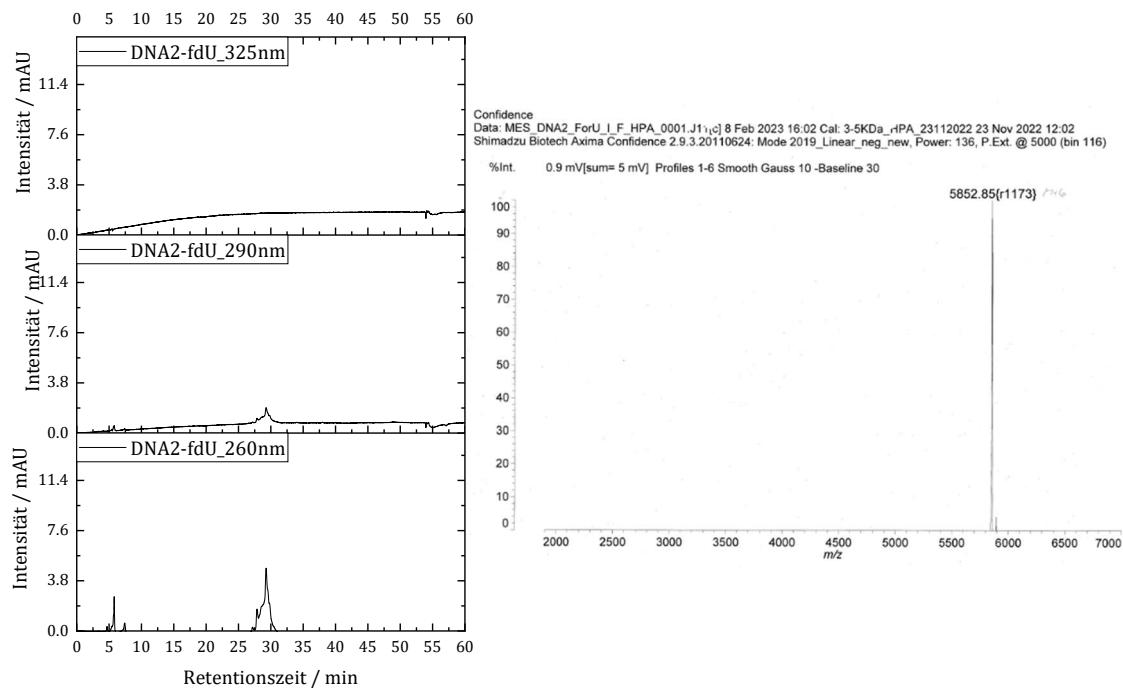


Abbildung SI 37: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA2-fdU a, gesucht [M]: 5846.2 gefunden: 5852.9.

3.1.4 DNA3-fdU

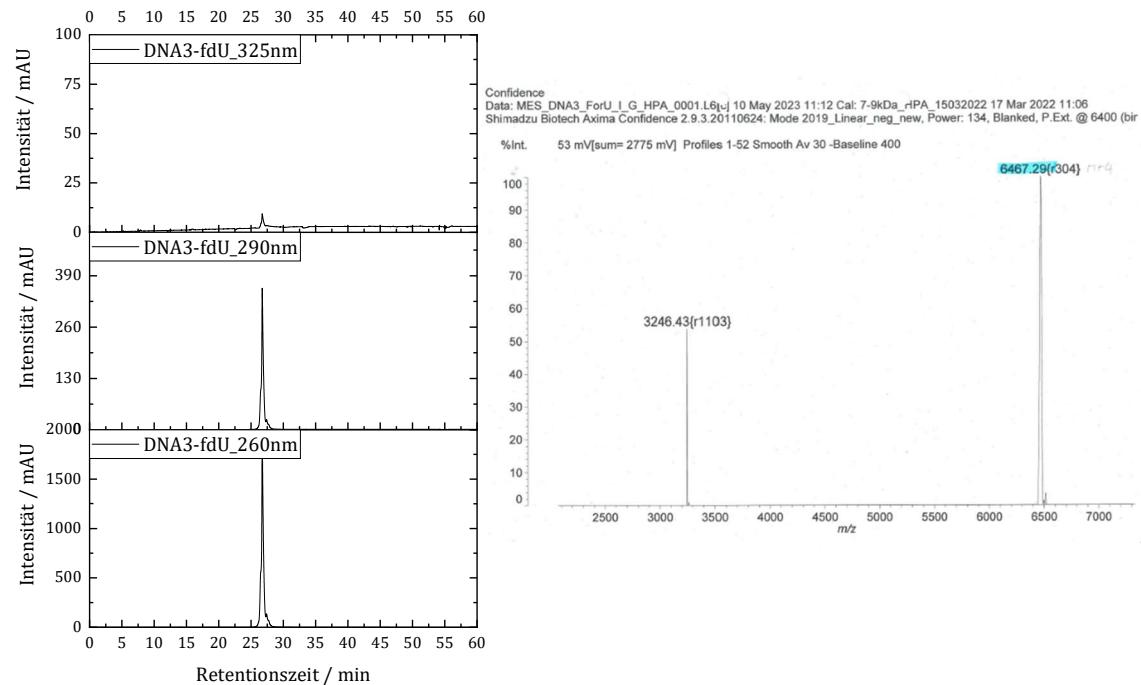


Abbildung SI 38: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA3-fdU a, gesucht [M]: 6463.3 gefunden: 6467.3.

3.1.5 DNA4-fdU

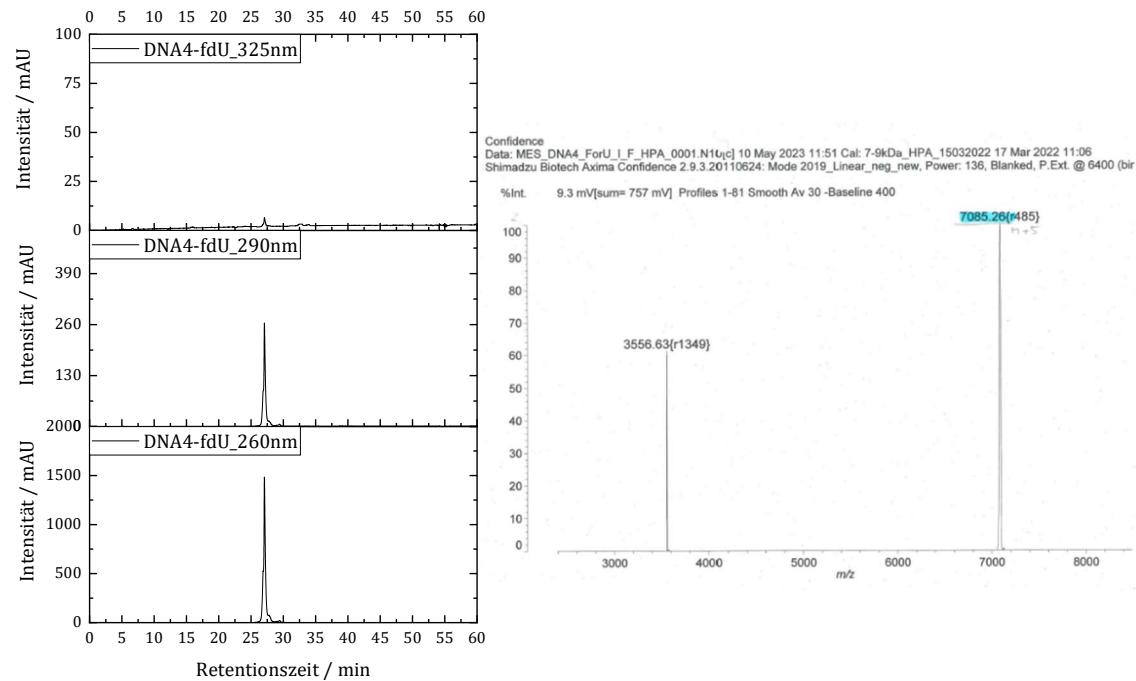


Abbildung SI 39: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA4-fdU a, gesucht [M]: 7080.4 gefunden: 7085.3.

3.1.6 DNA5-fdU

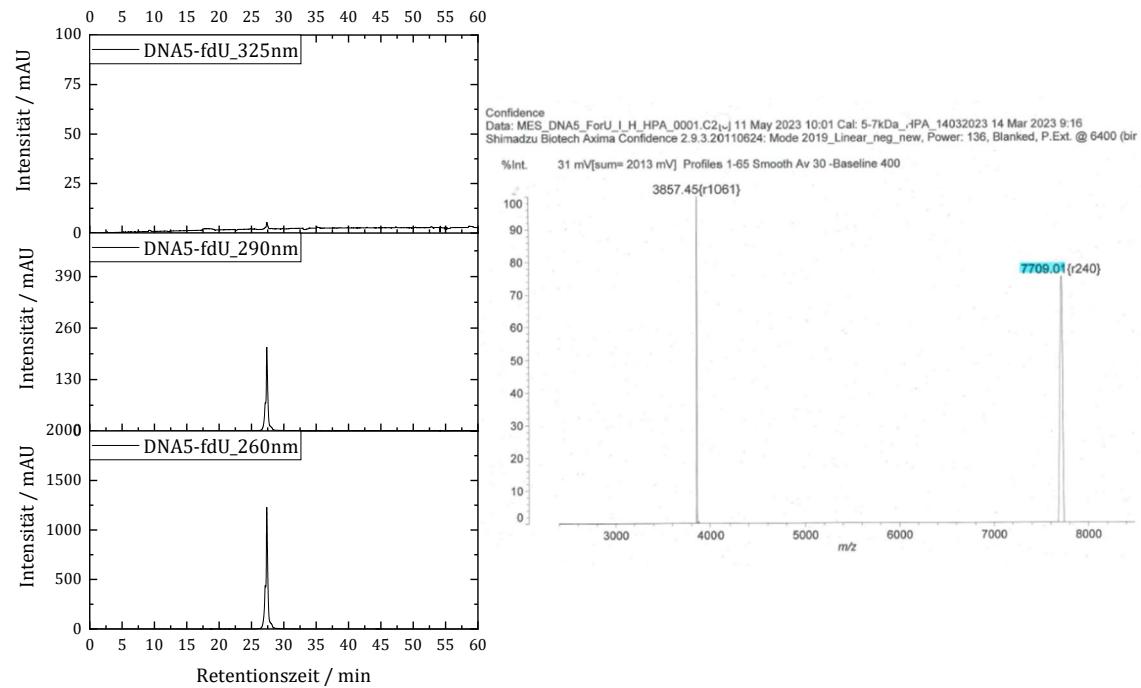


Abbildung SI 40: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA5-fdU a, gesucht [M]: 7697.5 gefunden: 7709.0.

3.2 5-Methyl-Pyrimidon (Pyo)

3.2.1 DNA0-Pyo

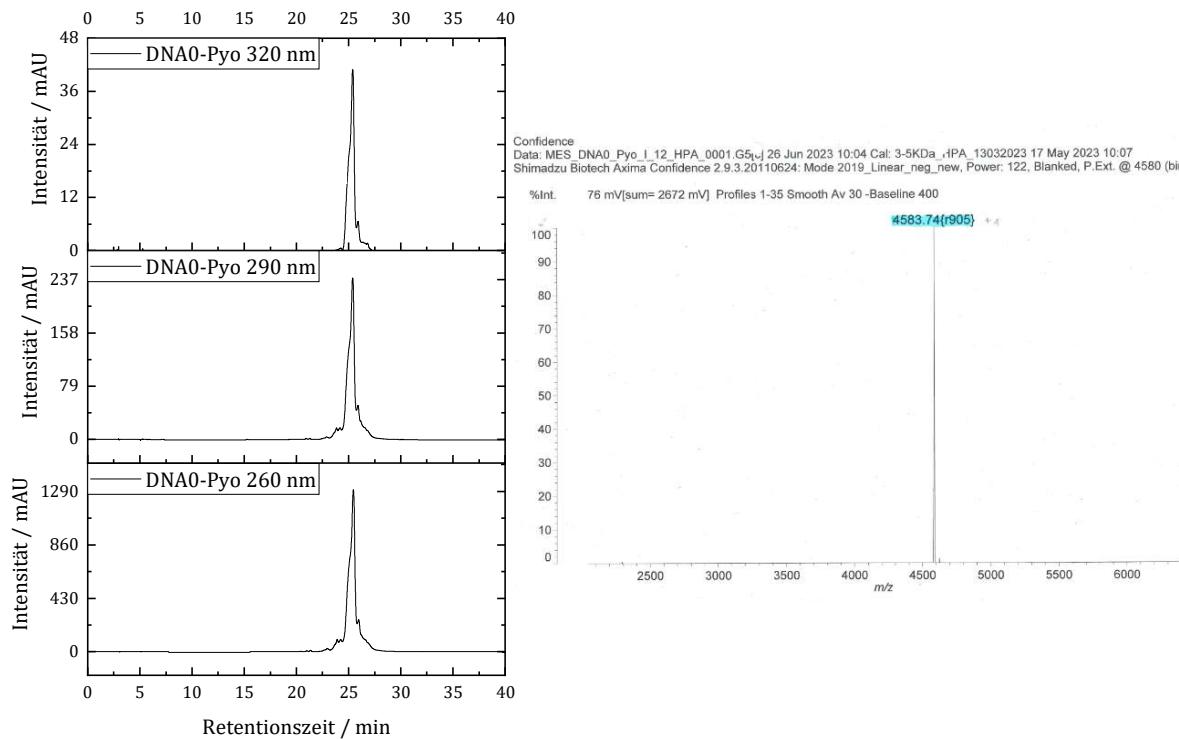


Abbildung SI 41: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 320 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA0-Pyo a, gesucht [M]: 4582.0 gefunden: 4583.7.

3.2.2 DNA1-Pyo

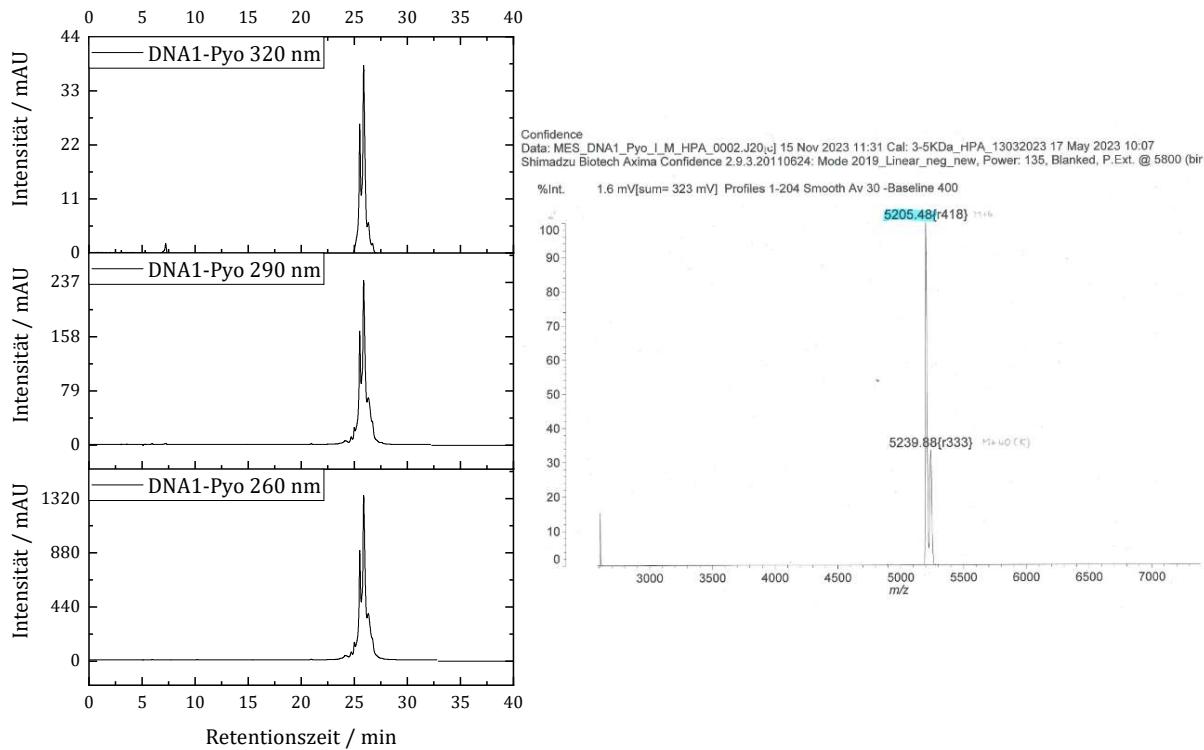


Abbildung SI 42: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 320 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA1-Pyo a, gesucht [M]: 5199.1 gefunden: 5205.5.

3.3 Pheomelaninmonomer-Derivat (Pheo)

3.3.1 DNA0-Pheo

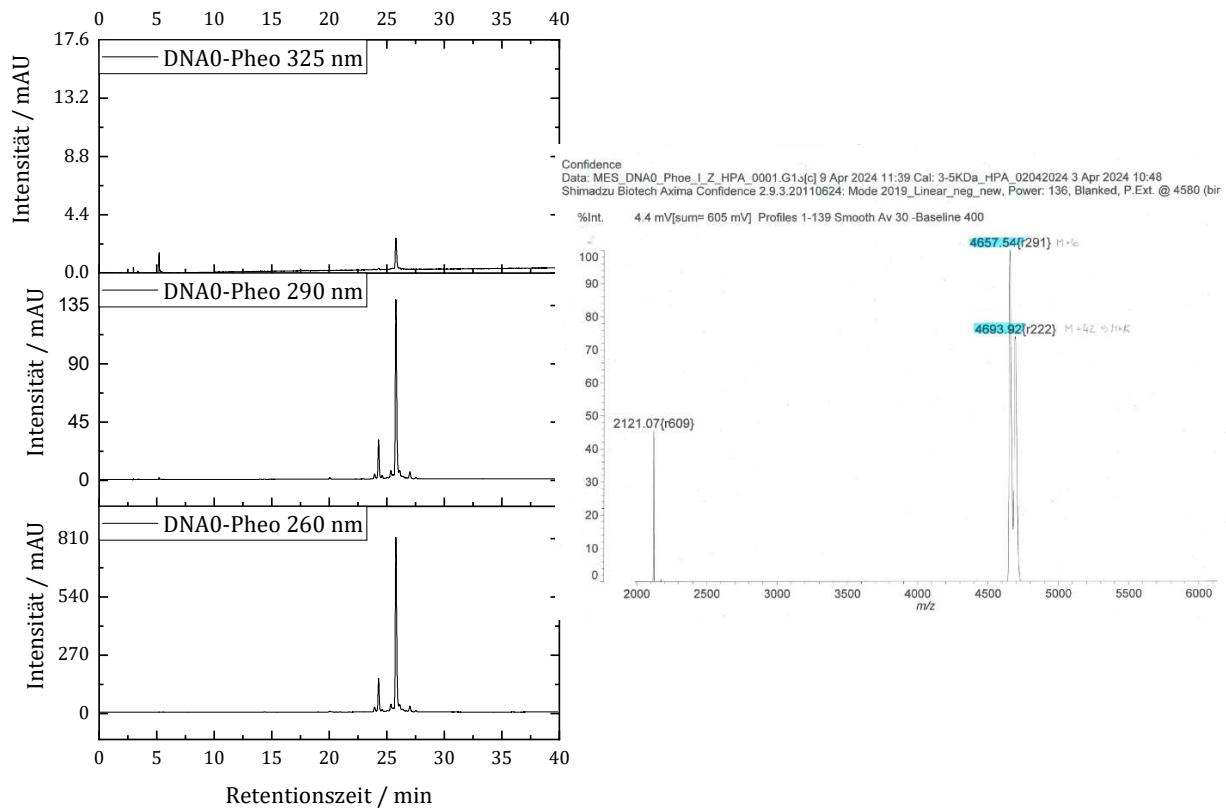


Abbildung SI 43: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA0-Pheo a, gesucht $[M]$: 4651.1 gefunden: 4657.5.

3.3.2 DNA1-Pheo

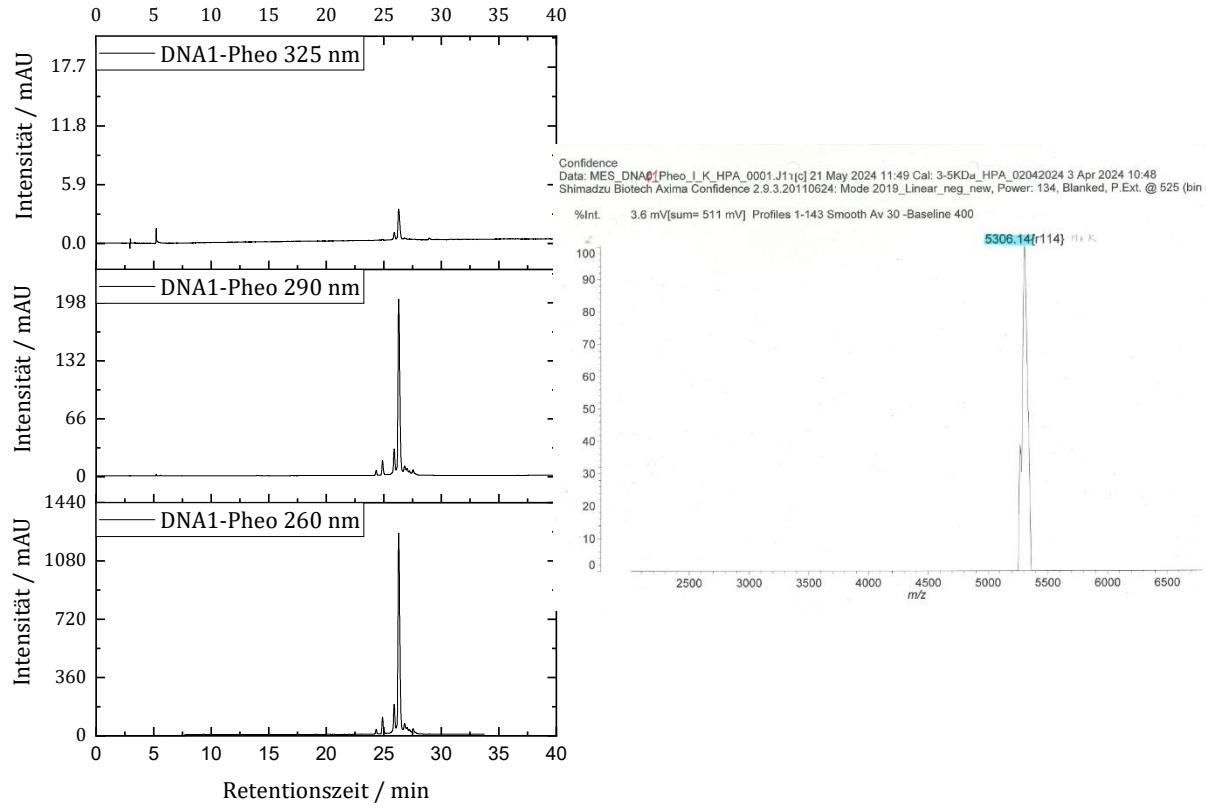


Abbildung SI 44: HPLC Absorptionschromatogramm bei 260, 290 und 325 nm und MALDI Analyse des Stranges DNA0 Pheo a, gesucht $[M+K^+]$: 5308.2 gefunden: 5306.1.

4. HPLC-Analyse

4.1 Negativproben

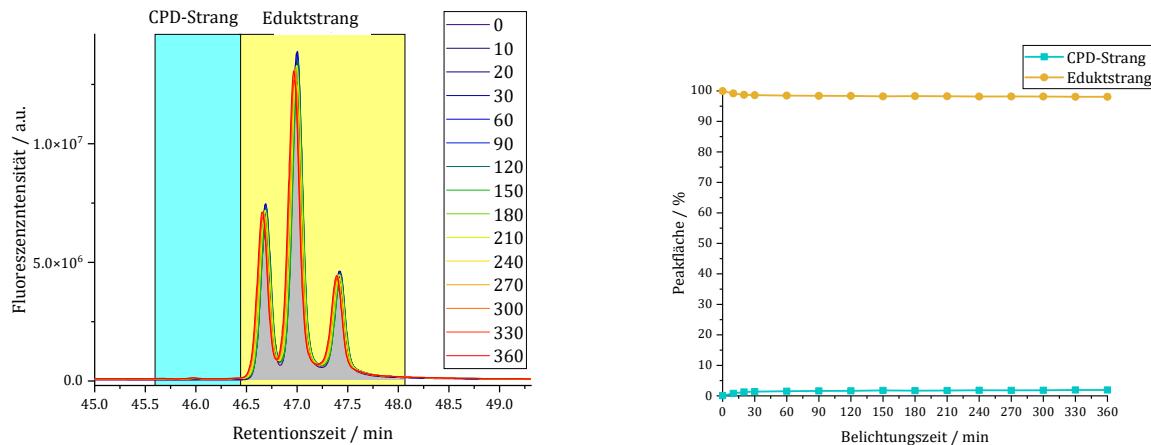


Abbildung SI 45: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-T sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

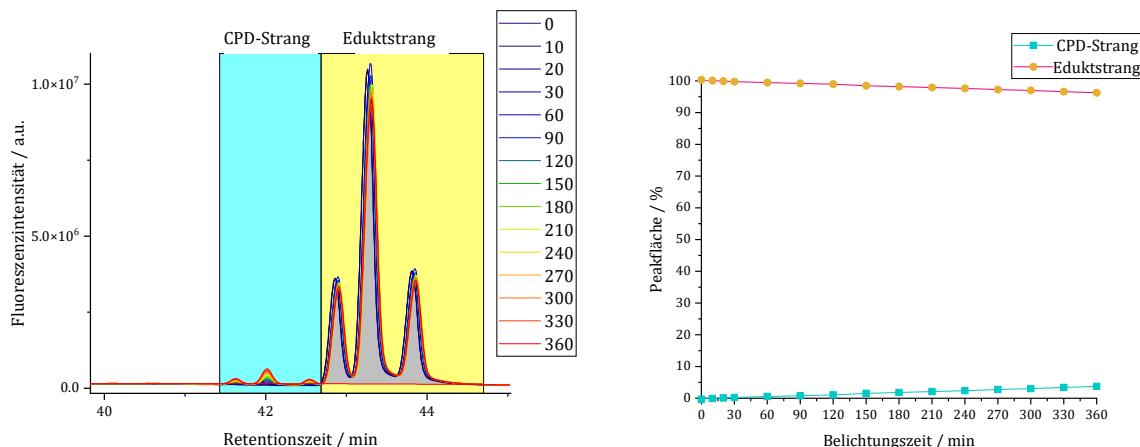


Abbildung SI 46: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-C sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

4.2 Formyl-Modifikationen

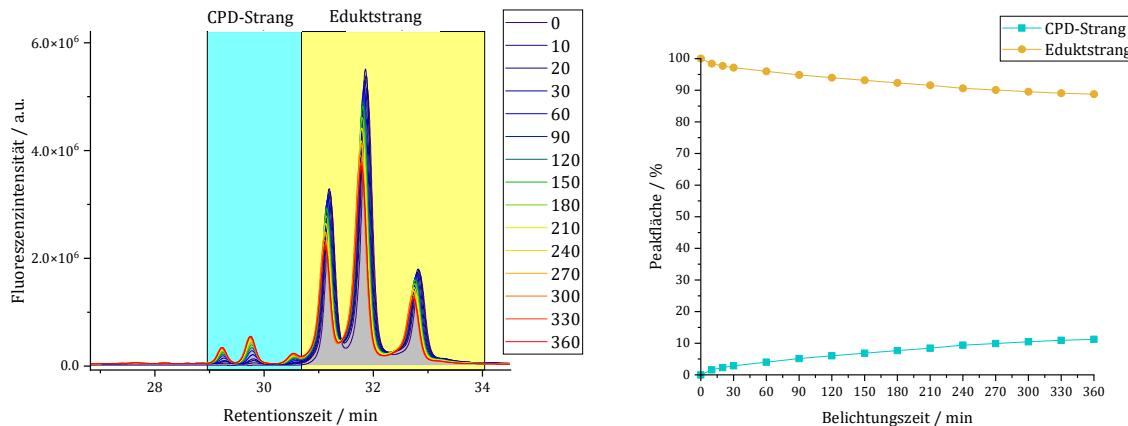


Abbildung SI 47: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0$ -360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

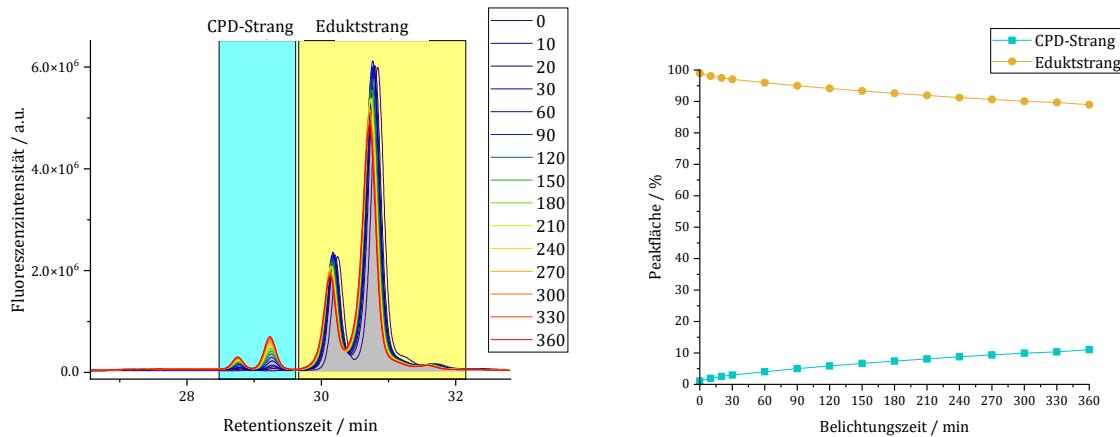


Abbildung SI 48: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0$ -360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

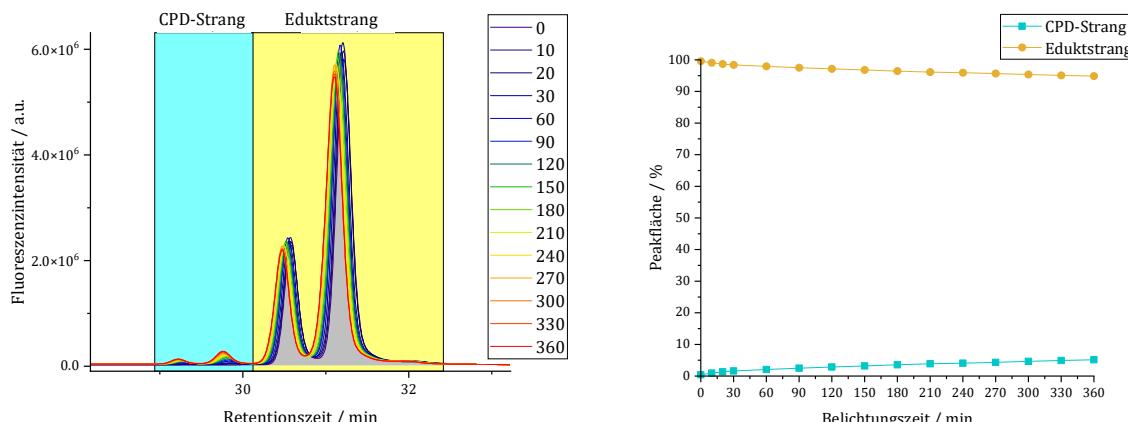


Abbildung SI 49: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA2-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0$ -360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

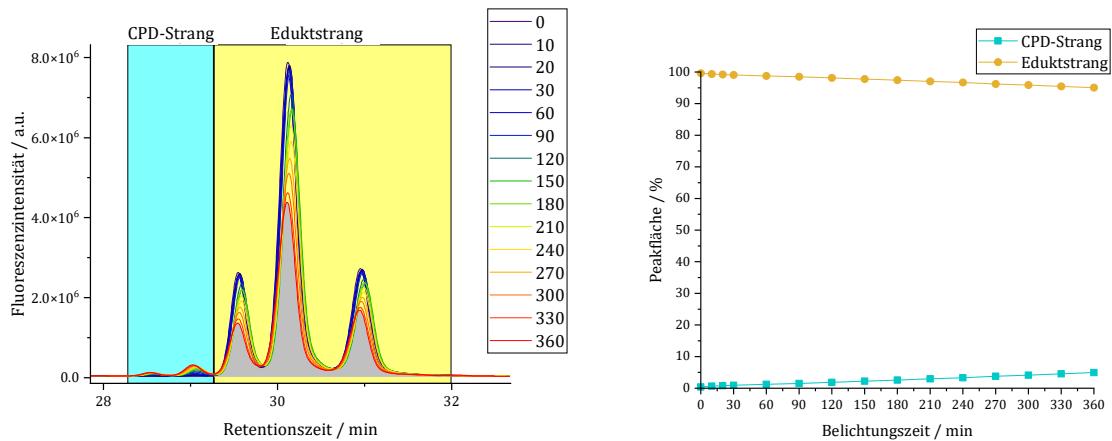


Abbildung SI 50: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA3-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

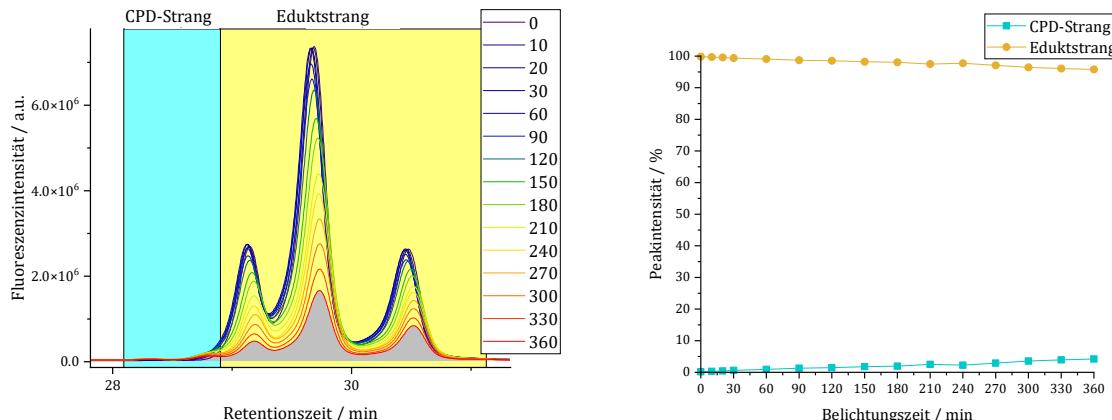


Abbildung SI 51: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA4-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

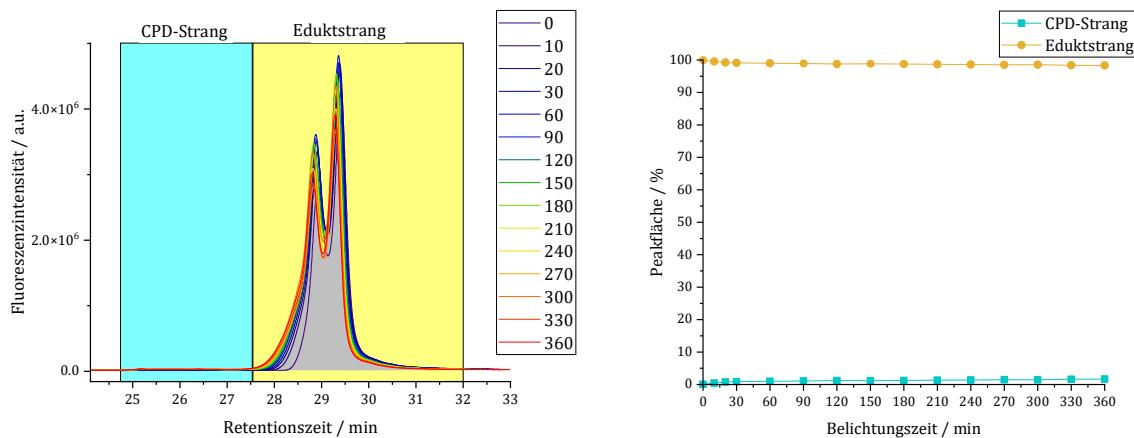


Abbildung SI 52: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA5-fdU sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

Unterstützende Informationen

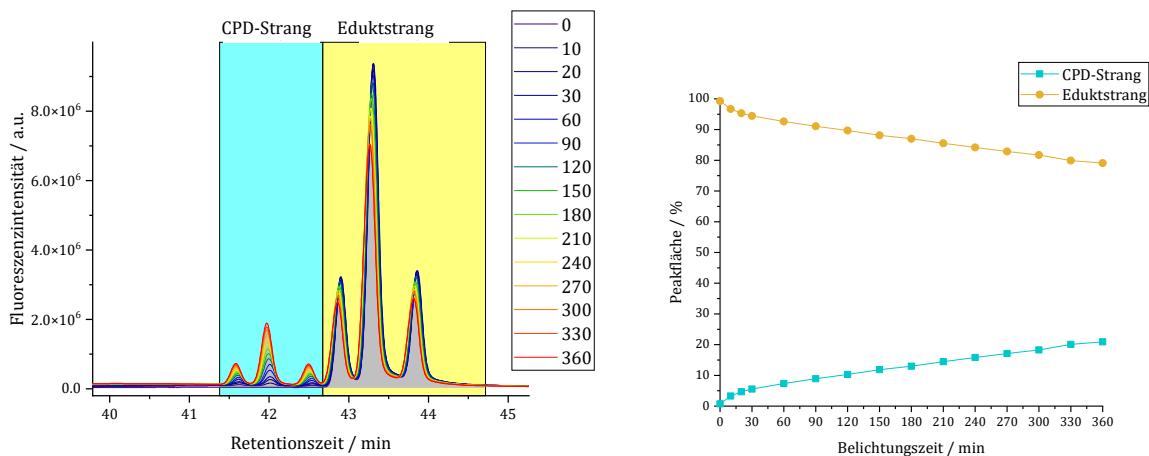


Abbildung SI 53: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

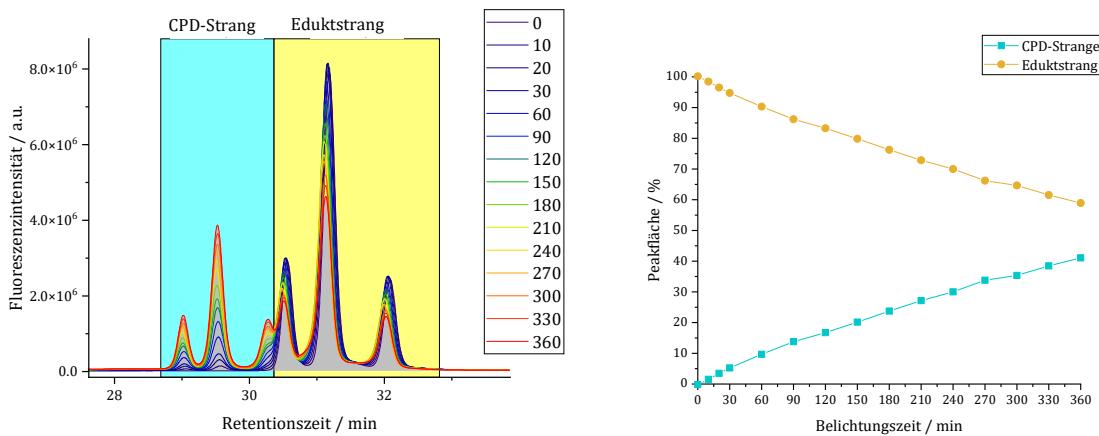


Abbildung SI 54: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

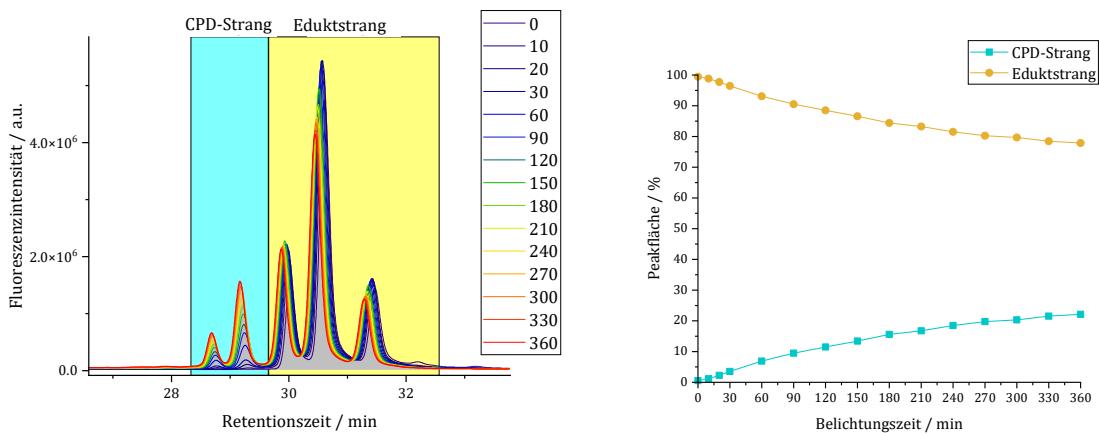


Abbildung SI 55: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA2-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

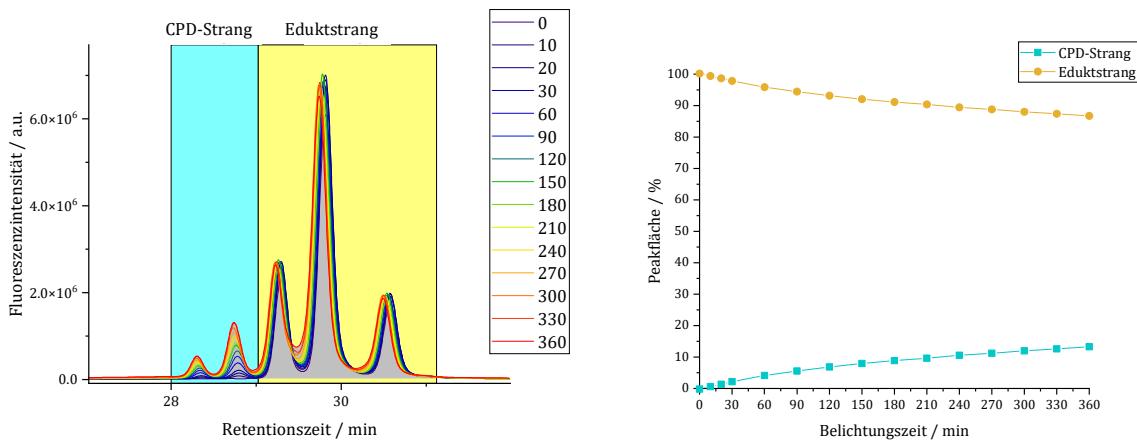


Abbildung SI 56: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA3-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

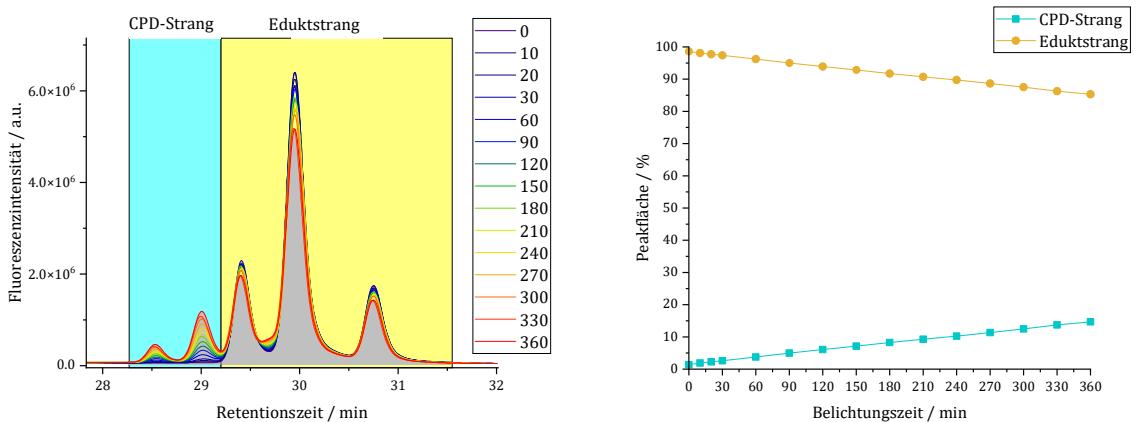


Abbildung SI 57: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA4-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

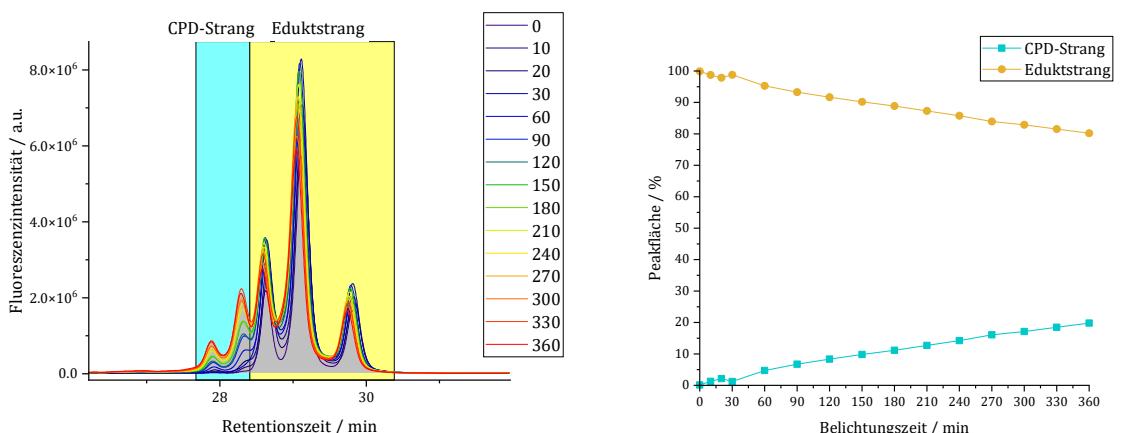


Abbildung SI 58: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA5-fdC sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

Unterstützende Informationen

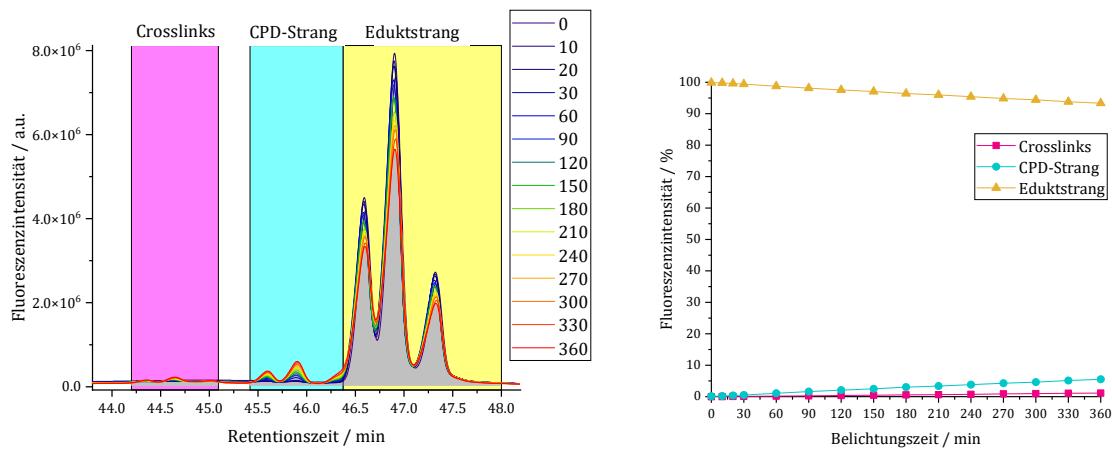


Abbildung SI 59: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-fdC^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink Produkte.

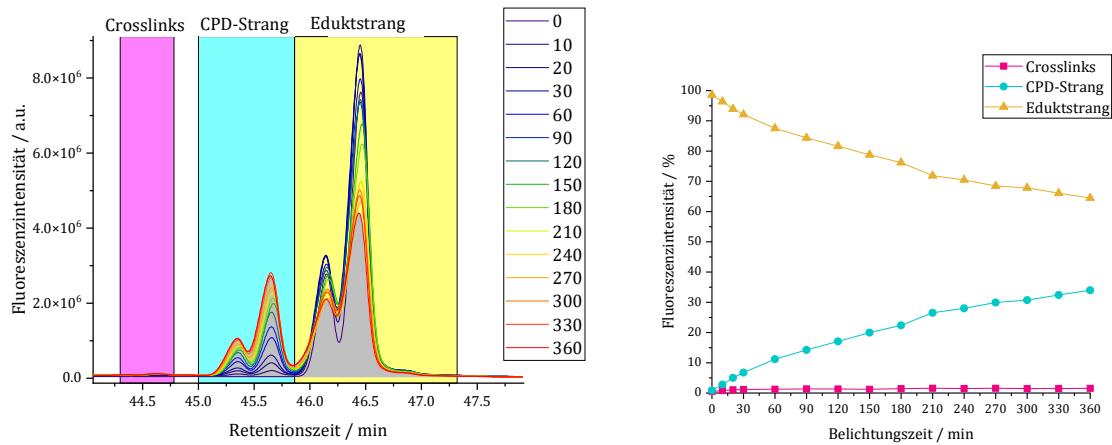


Abbildung SI 60: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-fdC^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink Produkte.

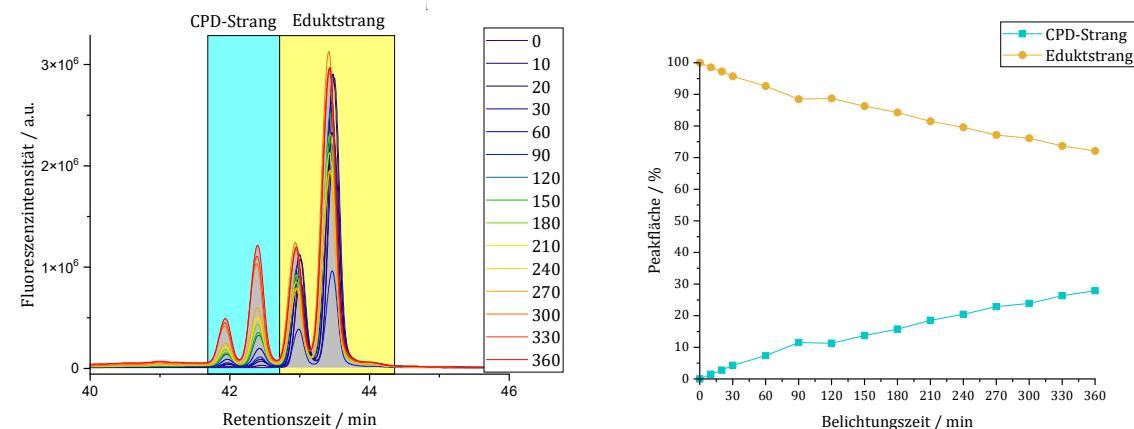


Abbildung SI 61: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA2-fdC^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

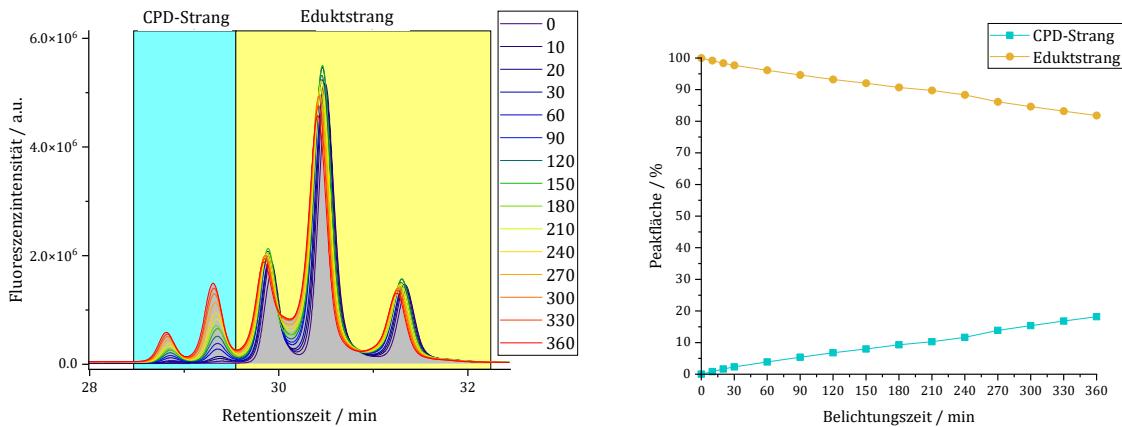


Abbildung SI 62: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA3-fdC^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

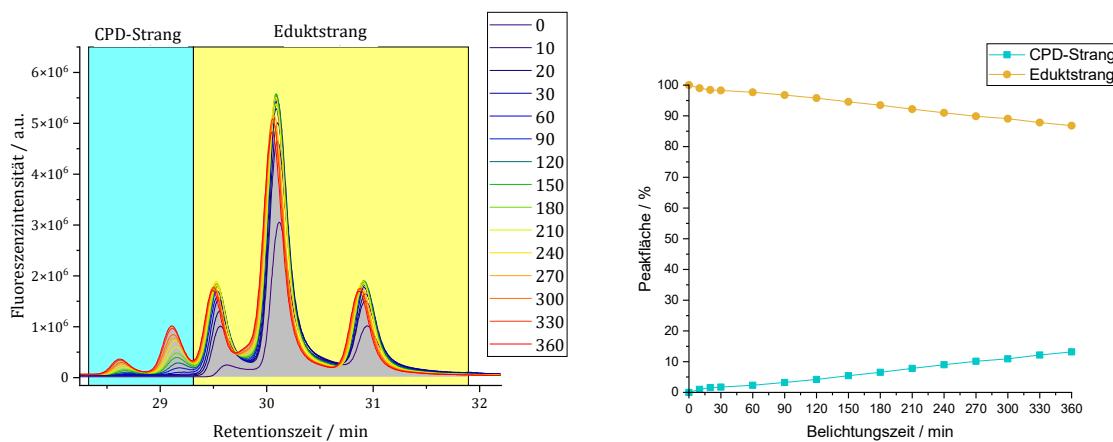


Abbildung SI 63: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA4-fdC^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

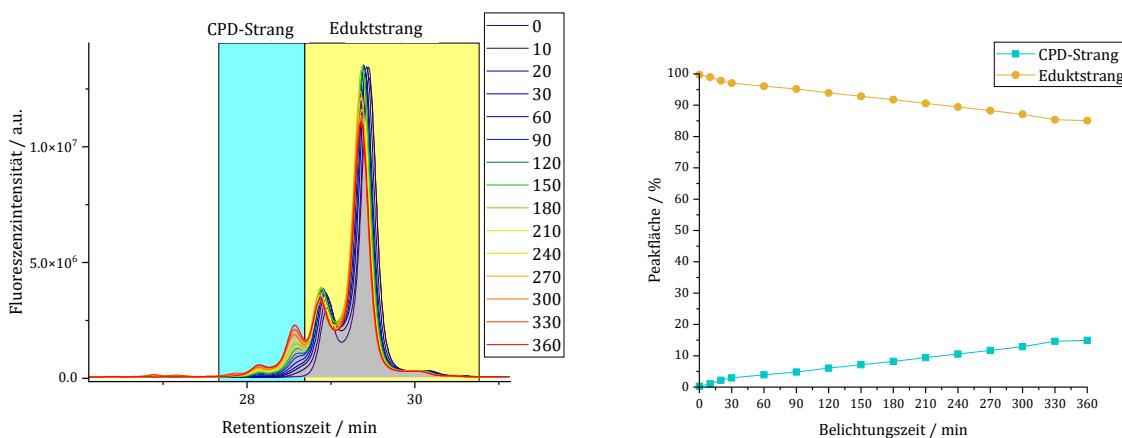


Abbildung SI 64: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA5-fdC^m sowie die Ausbeutebestimmung zwischen t = 0-360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang.

4.3 Pyo

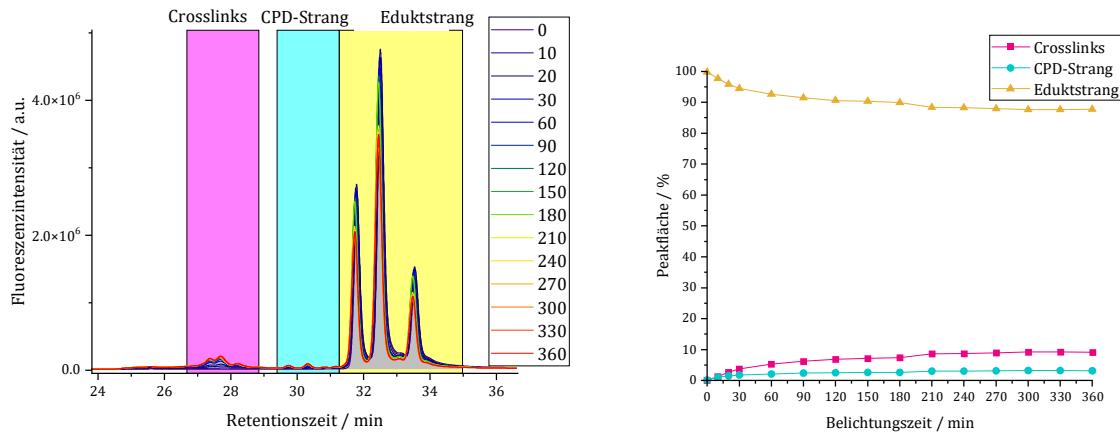


Abbildung SI 65: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-Pyo sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0$ -360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink-Produkte.

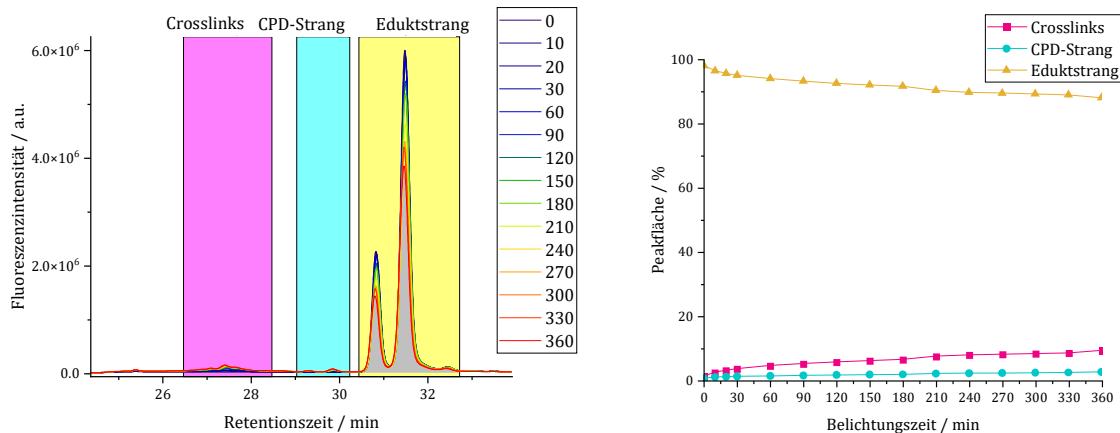


Abbildung SI 66: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-Pyo sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0$ -360 min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink-Produkte.

4.4 Pheo

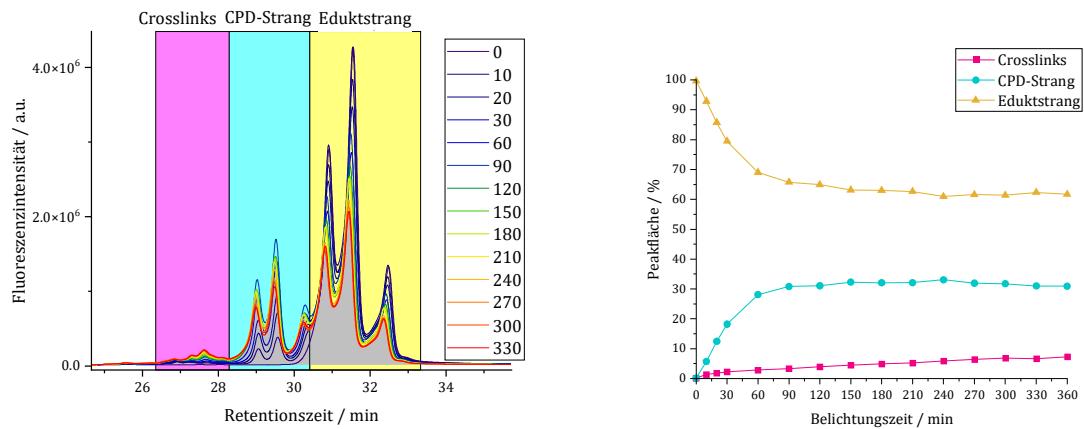


Abbildung SI 67: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA0-Pheo sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink-Produkte.

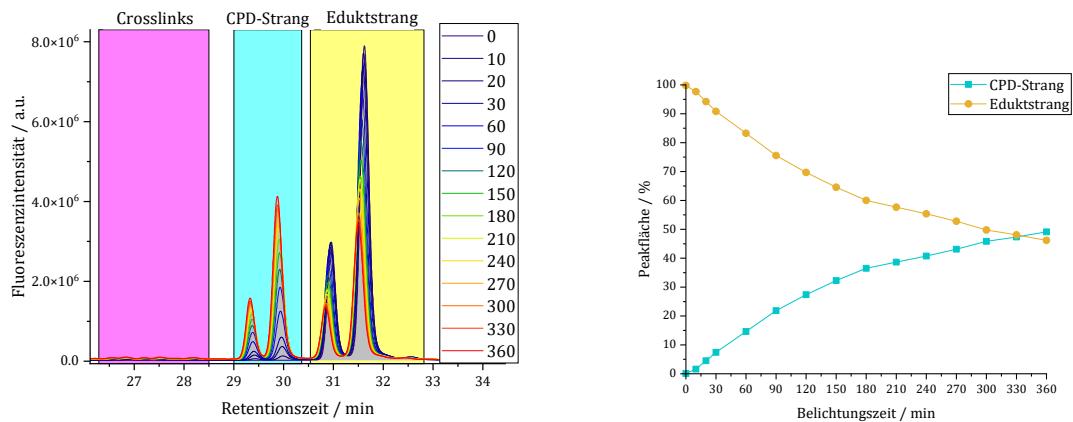
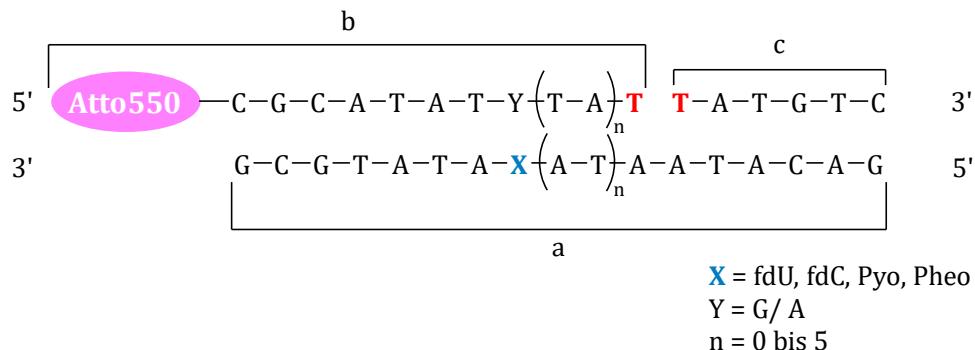


Abbildung SI 68: Repräsentative HPLC-Analyse von DNA1-Pheo sowie die Ausbeutebestimmung zwischen $t = 0\text{--}360$ min, cyan zeigt das CPD-Produkt, gelb zeigt den Eduktstrang, magenta zeigt die Crosslink-Produkte.

5. LC-ESI-MS Analysen



5.1 Formylmodifikationen

	m/z	[M ⁺] gesucht. [Da]	[M ⁺] gefunden [Da]
DNA0-fdU b	1/3	1744.4	1743.4
DNA0-fdU b	1/4	1308.3	1307.5
DNA3-fdU a	1/4	1615.8	1615.3
DNA3-fdU a	1/5	1292.7	1292.2
DNA3-fdU a_{ox}	1/3	1619.8	1619.5
DNA3-fdU a_{ox}	1/4	1295.9	1295.2
DNA0-fdC b	1/3	1749.7	1749.1
DNA0-fdC b	1/4	1312.3	1311.6
DNA0-fdC^m b	1/3	1744.4	1743.7
DNA0-fdC^m b	1/4	1308.3	1307.3

5.1.1 Oxidiertes fdU

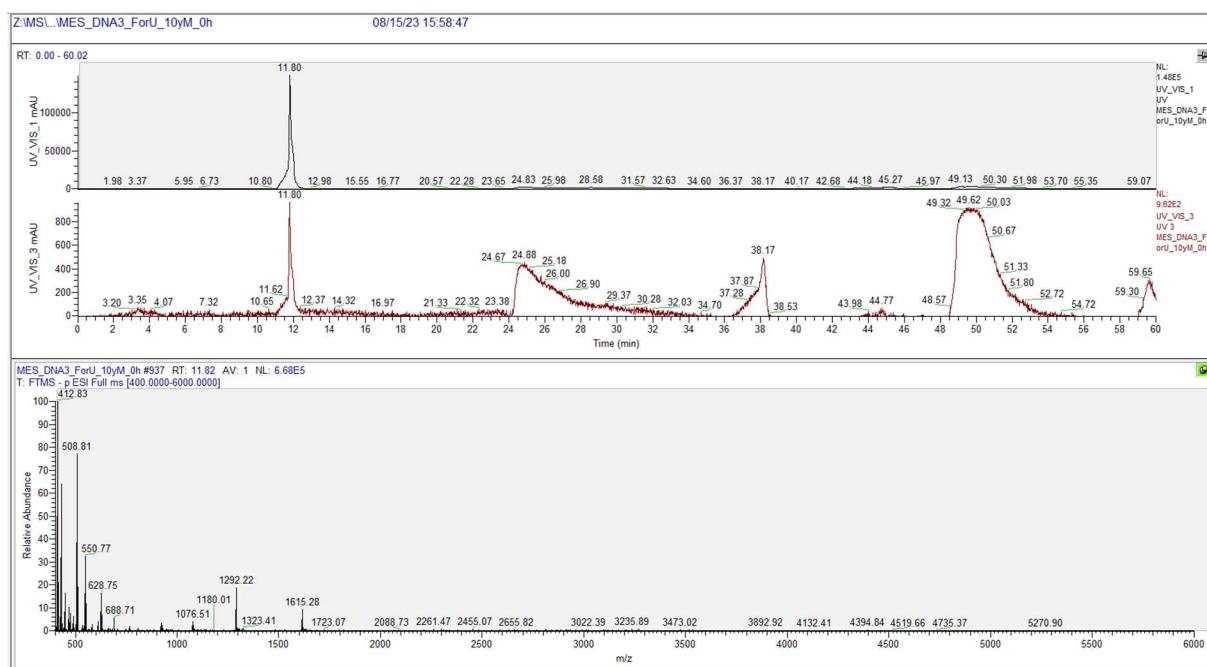


Abbildung SI 69: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 0$ h (DNA3-fdU a), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU); m/z gesucht 1292.7 [M^{5+}] und 1615.8 [M^{4+}], gefunden 1292.2 und 1615.29.

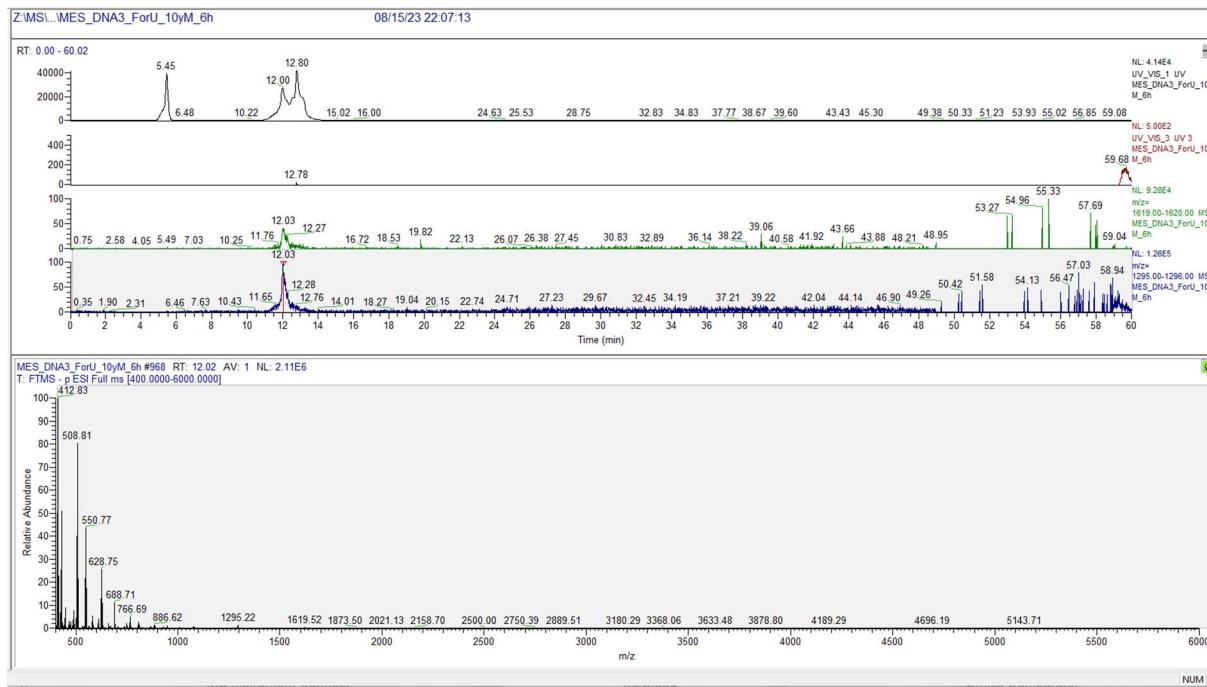


Abbildung SI 70: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 6$ h (DNA3-fdUox a), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU), MS Analyse des oxidierten fdU DNA3-fdU, m/z gesucht 1295.9 [M^{5+}] und 1619.8 [M^{4+}]; gefunden 1295.2 und 1619.5.

Unterstützende Informationen

5.1.2 CPD-Produkt

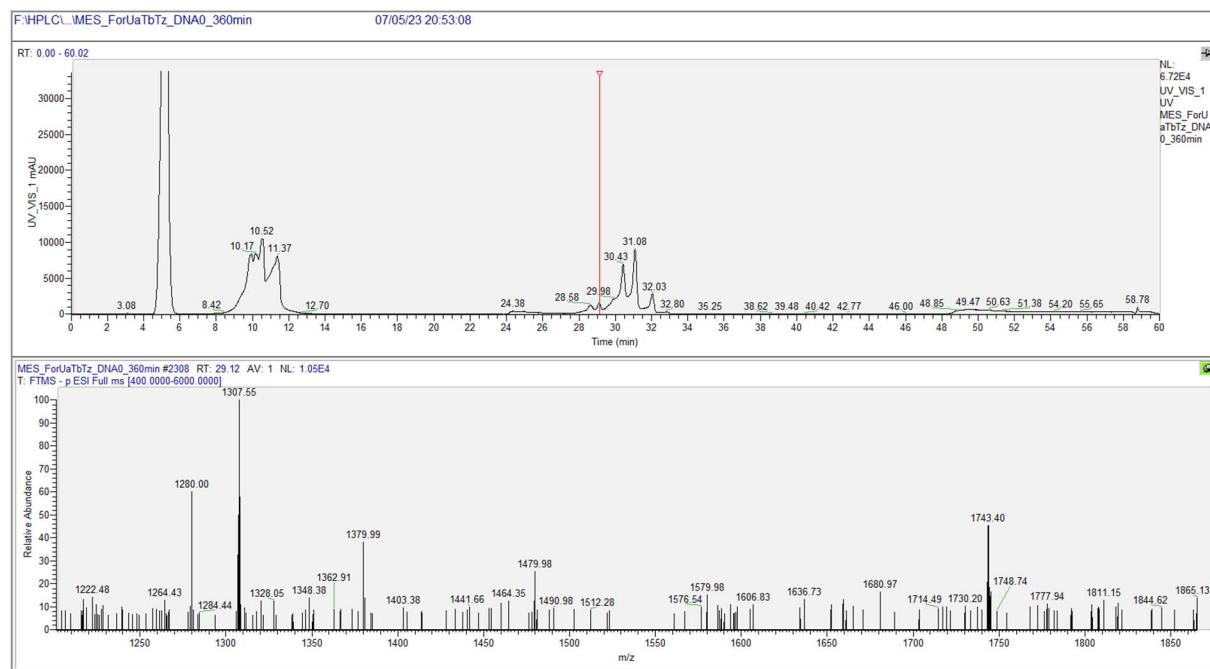


Abbildung SI 71: LC-MS Analyse des CPD-Produktes zum Zeitpunkt $t = 6\text{ h}$ (DNA0-fdU), Absorption bei 260 nm.; m/z gesucht 1308.3 [M⁴⁺] und 1744.4 [M³⁺], gefunden 1307.5 und 1743.4.

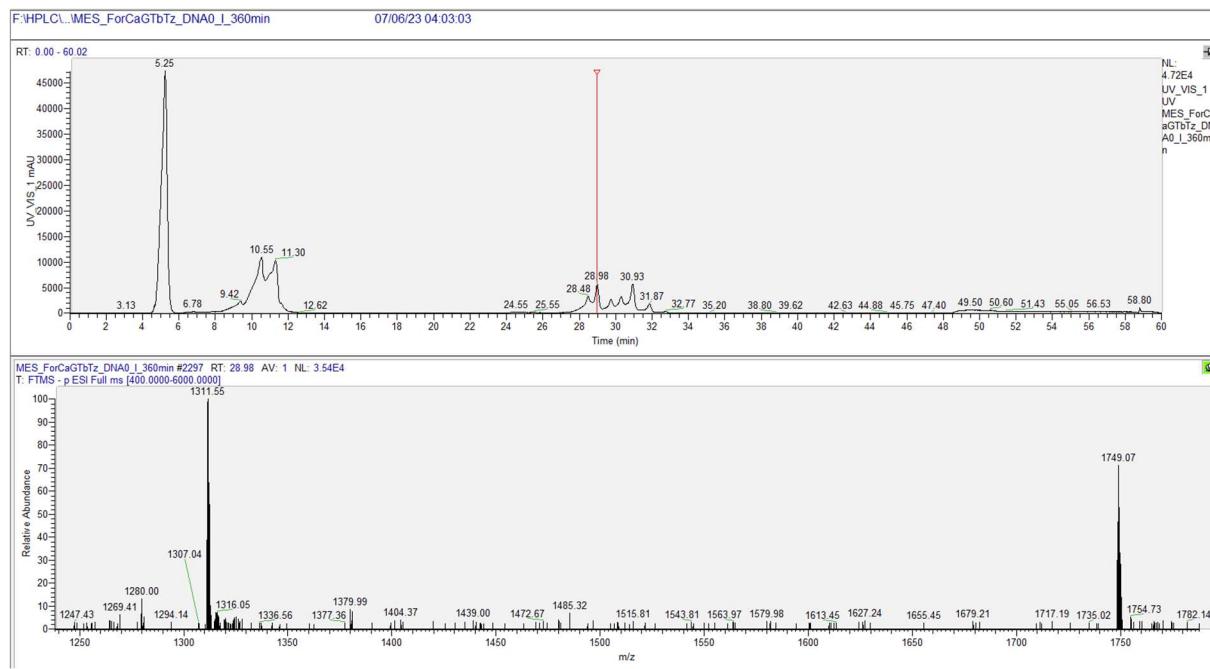


Abbildung SI 72: LC-MS Analyse des CPD-Produktes zum Zeitpunkt $t = 6\text{ h}$ (DNA0-fdC), Absorption bei 260 nm; m/z gesucht 1312.3 [M⁴⁺] und 1749.7 [M³⁺]; gefunden 1311.6 und 1749.1.

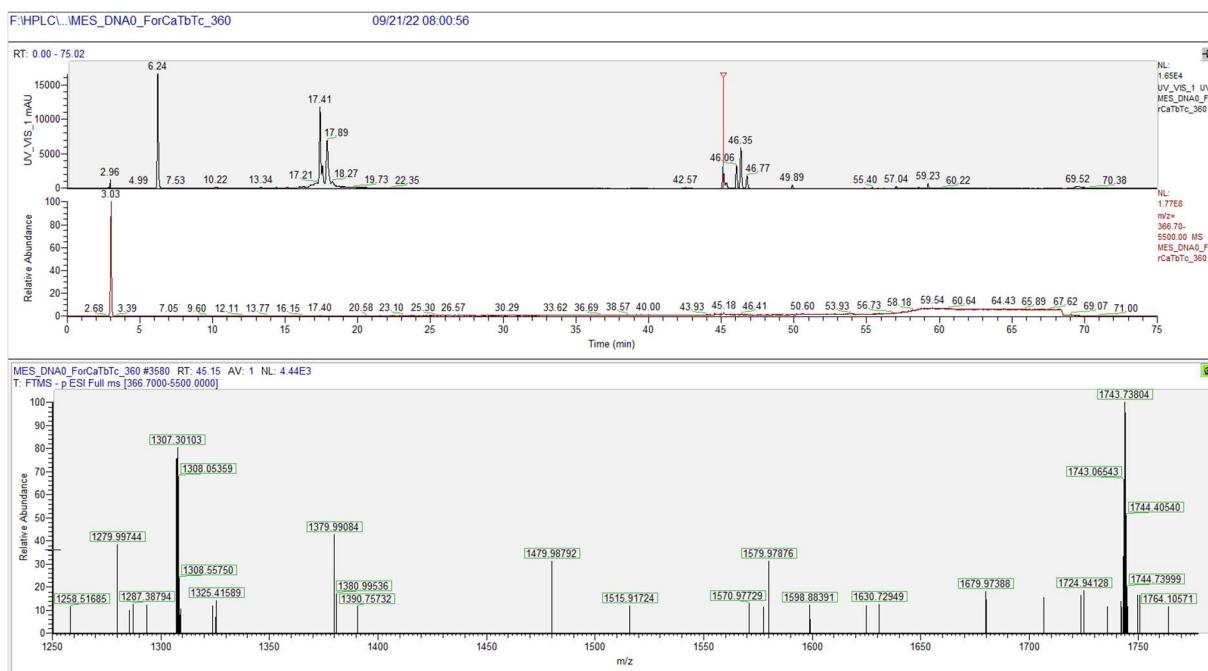


Abbildung SI 73: LC-MS Analyse des CPD-Produktes zum Zeitpunkt $t = 6$ h (DNA0-fdCm), Absorption bei 260 nm; m/z gesucht 1308.3 [M^{4+}] und 1744.4 [M^{3+}]; gefunden 1307.3 und 1743.7.

5.1.3 DNA0-fdUfull*

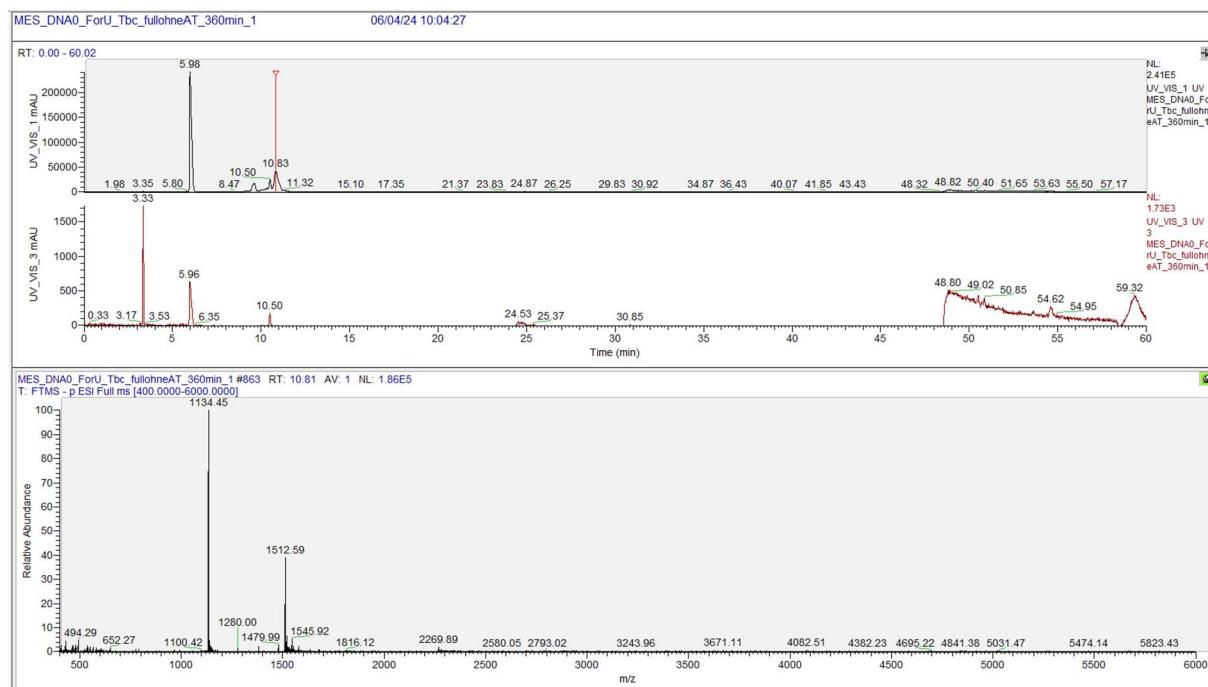


Abbildung SI 74: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 6$ h (DNA0-fdUfull*), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU), m/z gesucht 1135.0 [M^{4+}] und 1513.3 [M^{3+}]; gefunden 1134.45 und 1512.59.

Unterstützende Informationen

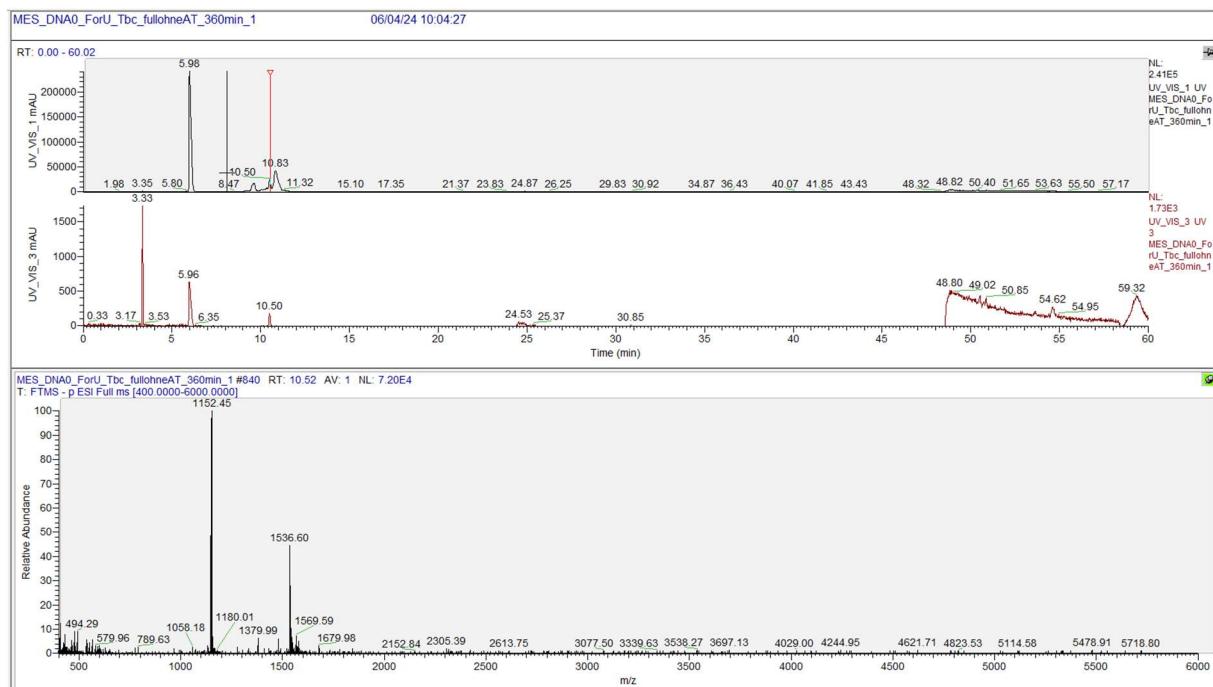


Abbildung SI 75: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 6\text{ h}$ (DNA0-fdUfull*), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU), m/z gesucht 1153.0 [M⁴⁺] und 1537.3 [M³⁺]; gefunden 1152.45 und 1536.60.

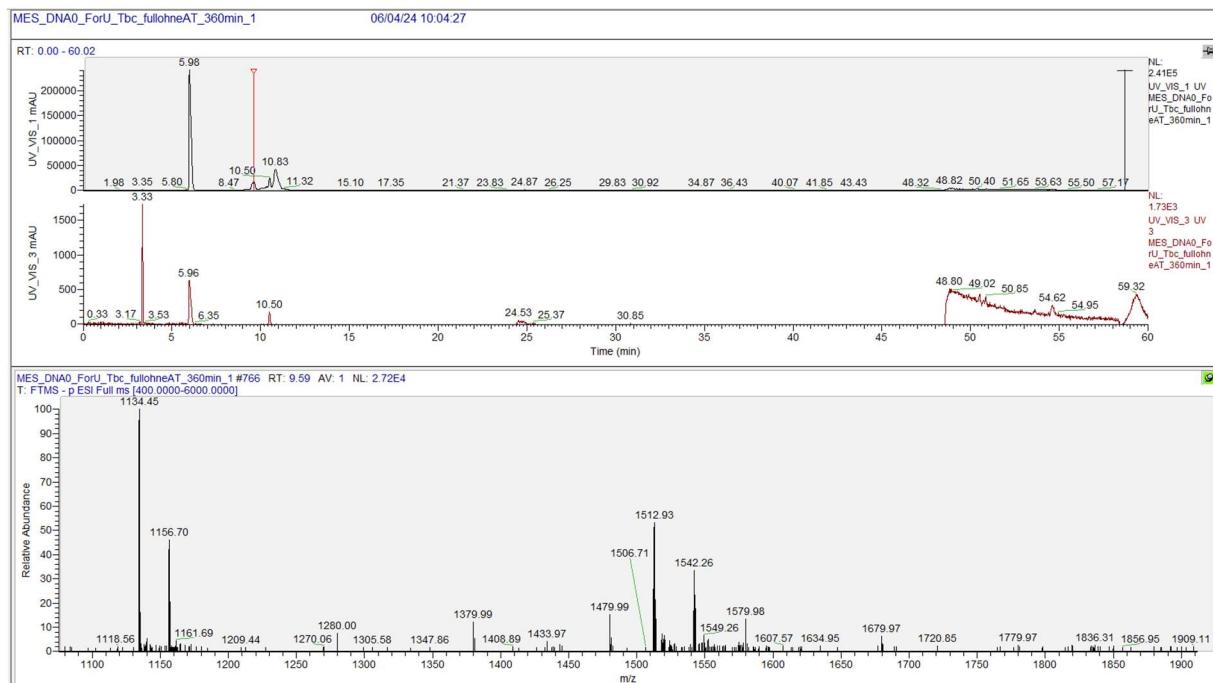
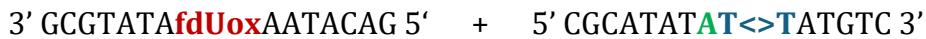


Abbildung SI 76: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 6\text{ h}$ (DNA0-fdUfull*), Absorption bei 260 nm (DNA) und 325 nm (fdU), m/z gesucht 1135.0 [M⁴⁺] (CPD-Strang) und 1513.3 [M³⁺] (CPD-Strang) und 1157.0 [M⁴⁺] (fdUox-Strang) und 1542.7 [M³⁺] (fdUox-Strang); gefunden 1134.45; 1512.93 und 1156.70 und 1542.26.

5.1.4 Berechnung von β

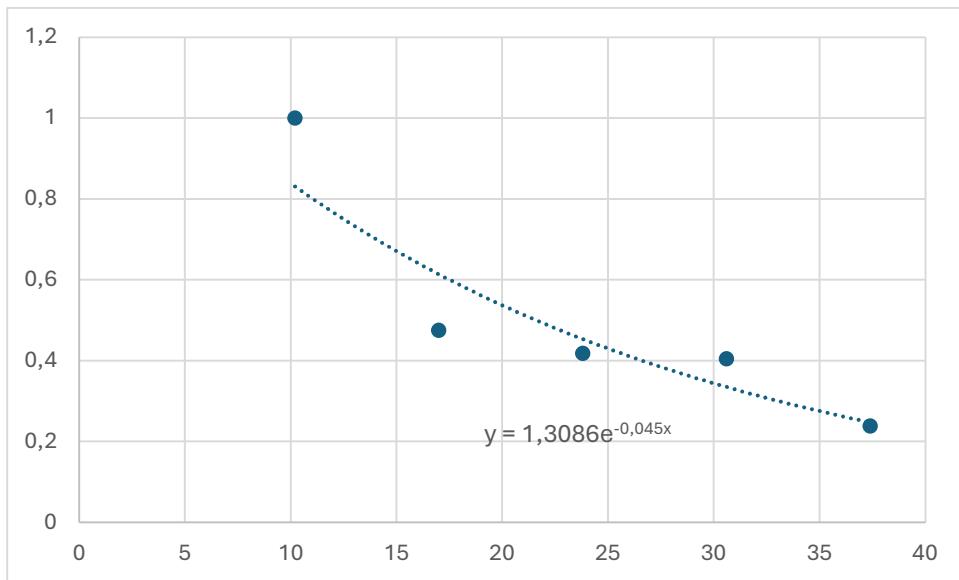


Abbildung SI 77: Berechnung des exponentiellen Zusammenhangs der Energieübertragung in DNAn-fdU mittels exponentieller Fit-Funktion ohne DNA0-fdU.

5.2 5-Methyl-Pyrimidon (Pyo)

	m/z	[M ⁺] gesucht. [Da]	[M ⁺] gefunden [Da]
DNA0-Pyo a	1/3	1527.3	1526.60
DNA0-Pyo a	1/4	1145.0	1144.95
DNA0-Pyo b	1/3	1726.0	1724.94
DNA0-Pyo b	1/4	1150.7	1149.62
DNA0-Pyo CPD	1/3	1744.3	1743.40
DNA0-Pyo CPD	1/4	1308.3	1307.55
DNA0-Pyo	1/4	2008.5	2012.17
Crosslink			
DNA0-Pyo	1/5	1606.8	1609.74
Crosslink			

Unterstützende Informationen

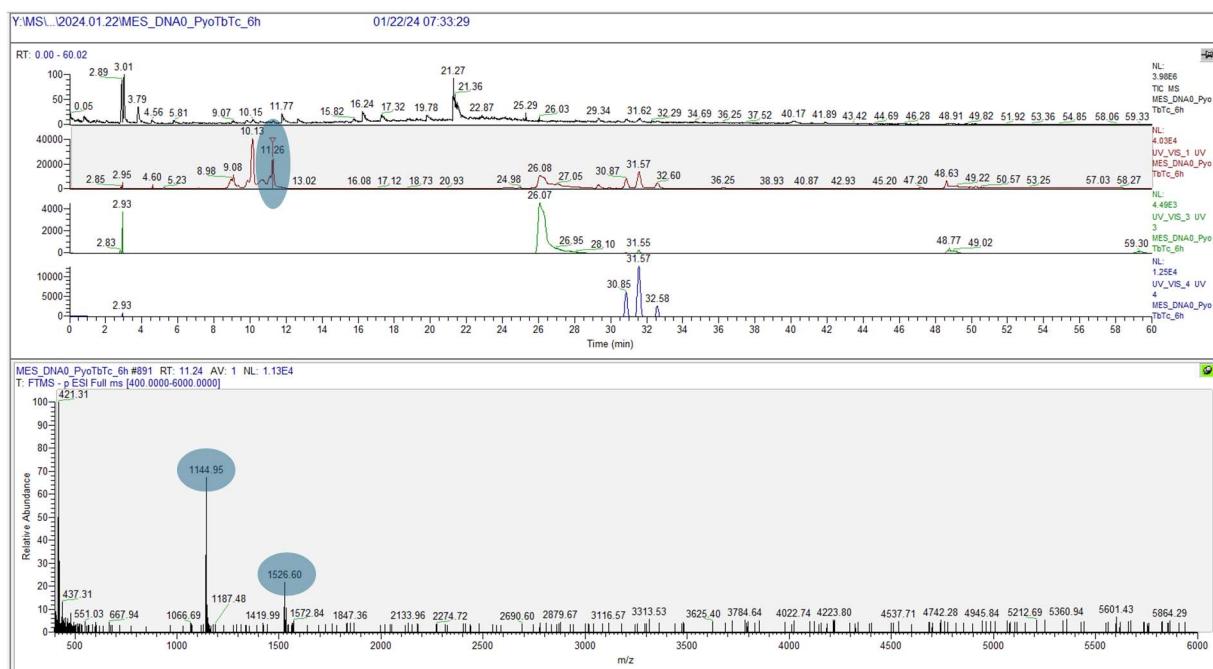


Abbildung SI 78: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 6\text{ h}$ (DNA0-Pyo), Absorption bei 260 nm (DNA) und 320 nm (Pyo), m/z gesucht 1145.0 [M^{4+}] und 1527.3 [M^{3+}]; gefunden 1144.95 und 1526.60.

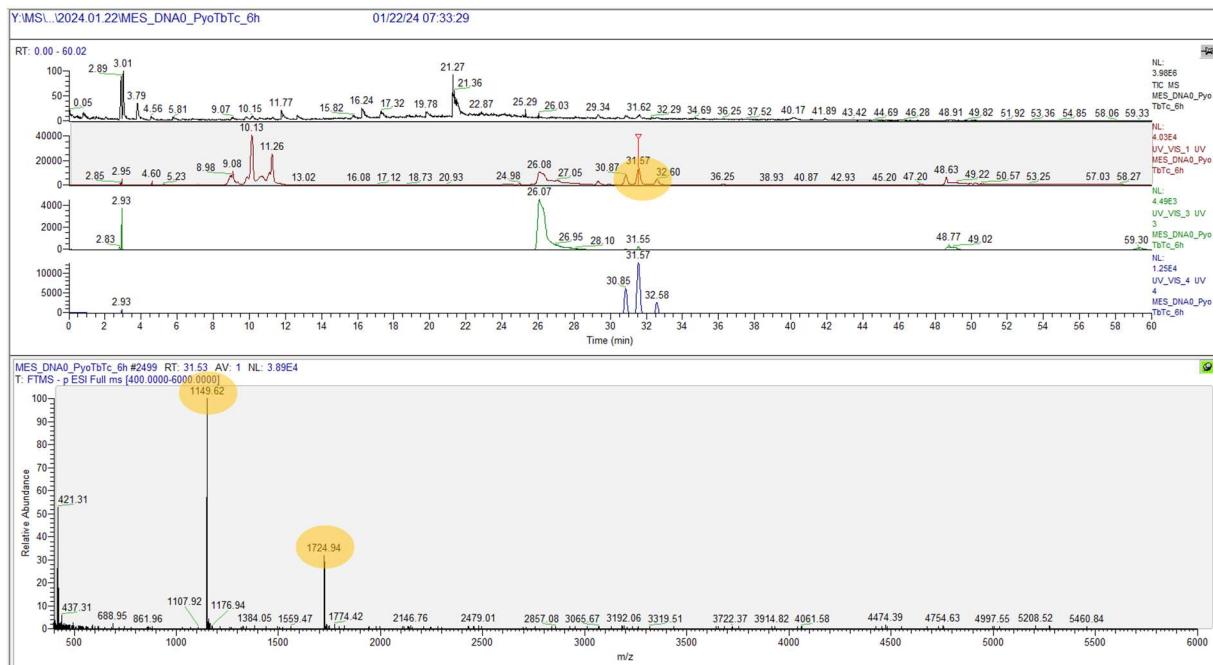


Abbildung SI 79: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 6\text{ h}$ (DNA0-Pyo), Absorption bei 260 nm (DNA) und 320 nm (Pyo), 554 nm (Atto550), m/z gesucht 1150.7 [M^{4+}] und 1726.0 [M^{3+}]; gefunden 1149.62 und 1724.94.

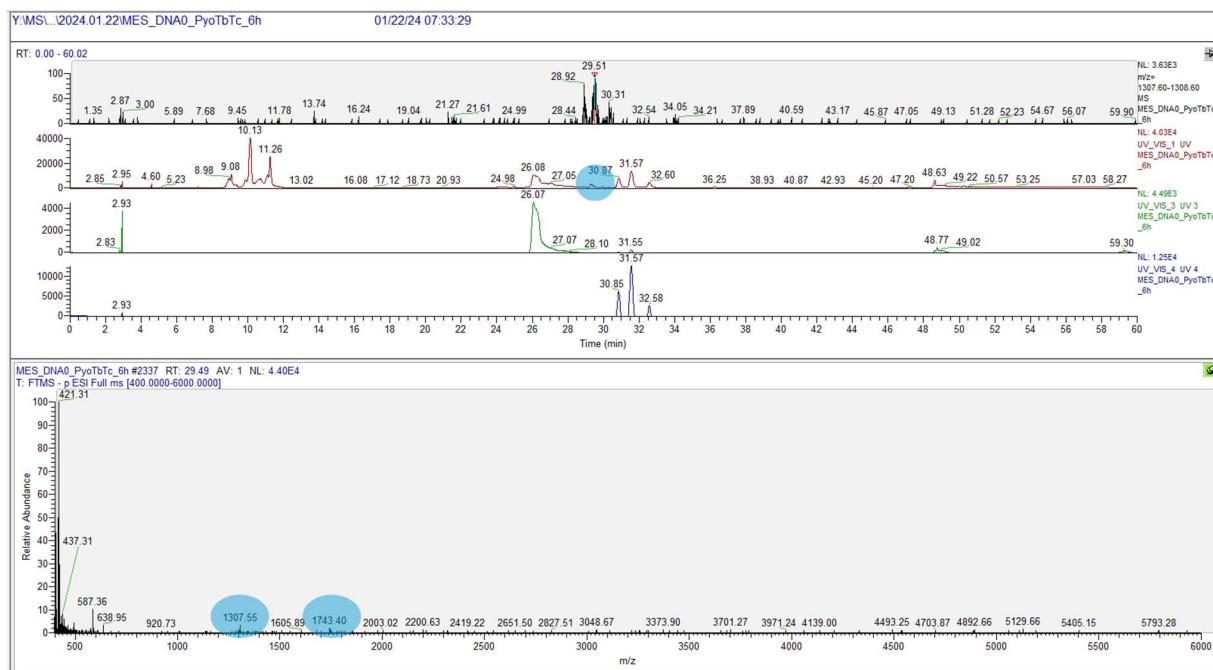


Abbildung SI 80: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 6$ h (DNA0-Pyo), Absorption bei 260 nm (DNA) und 320 nm (Pyro), 554 nm (Atto550), m/z gesucht 1308.3 [M^{4+}] und 1744.3 [M^3+]; gefunden 1307.55 und 1743.40.

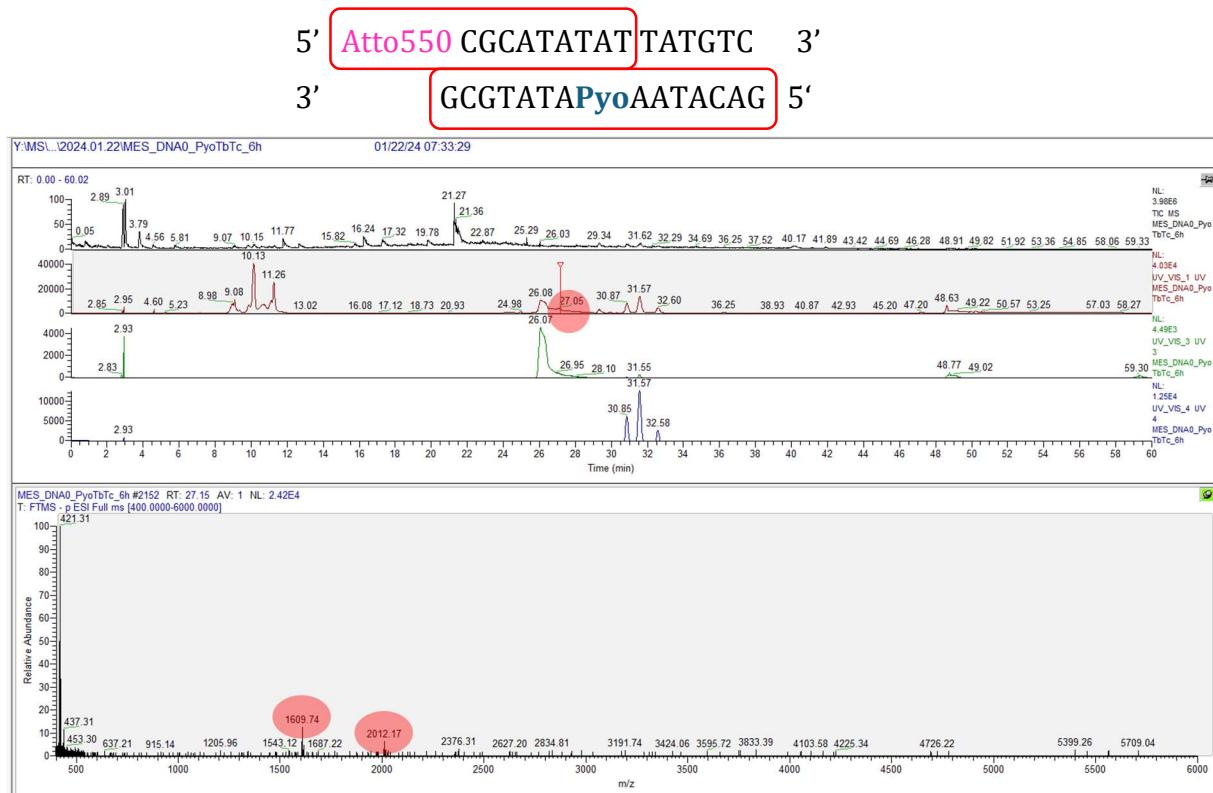
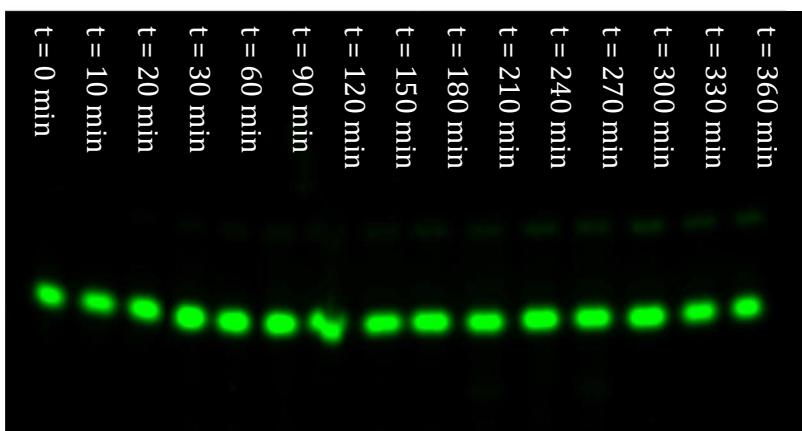


Abbildung SI 81: LC-MS Analyse zum Zeitpunkt $t = 6$ h (DNA0-Pyo, Crosslinks), Absorption bei 260 nm (DNA) und 320 nm (Pyro), m/z gesucht 1606.8 [M^{5+}] und 2008.5 [M^{4+}]; gefunden 1609.74 und 2012.17.

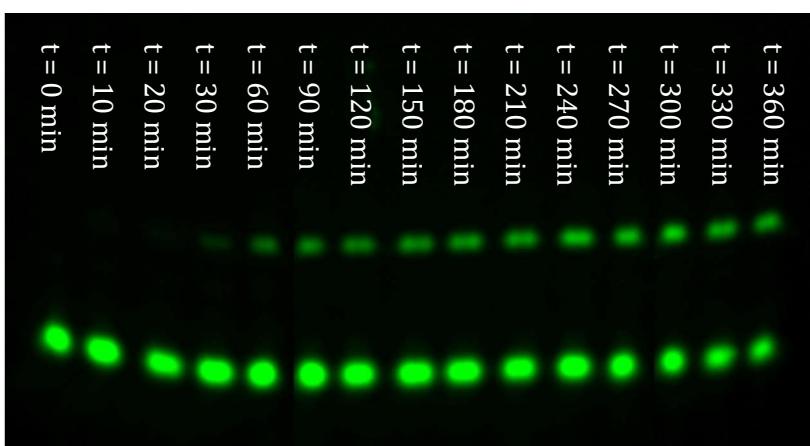
6. PAGE-Analyse



CPD-Strang

Eduktstrang

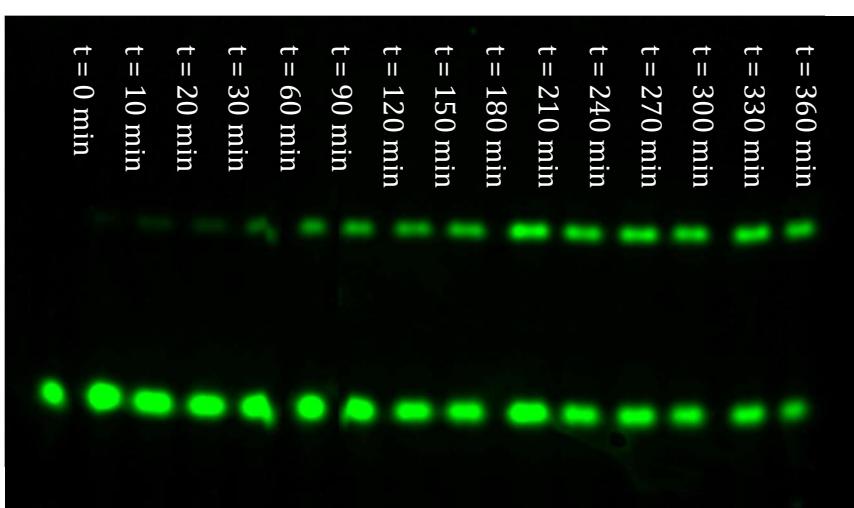
Abbildung SI 82: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben der Negativprobe DNA0-C im Zeitraum von t = 0-6 h.



CPD-Strang

Eduktstrang

Abbildung SI 83: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA0-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.



CPD-Strang

Eduktstrang

Abbildung SI 84: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA1-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.

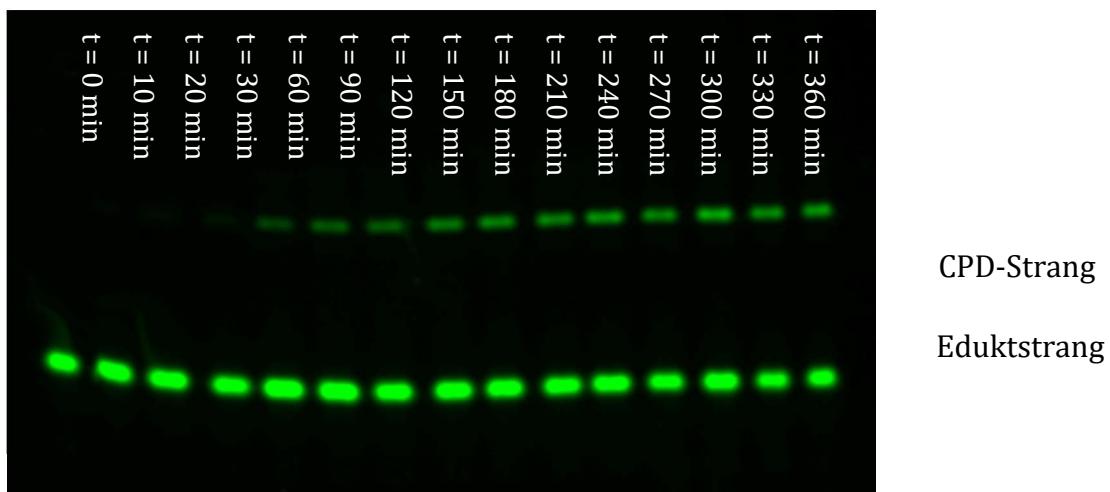


Abbildung SI 85: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA2-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.

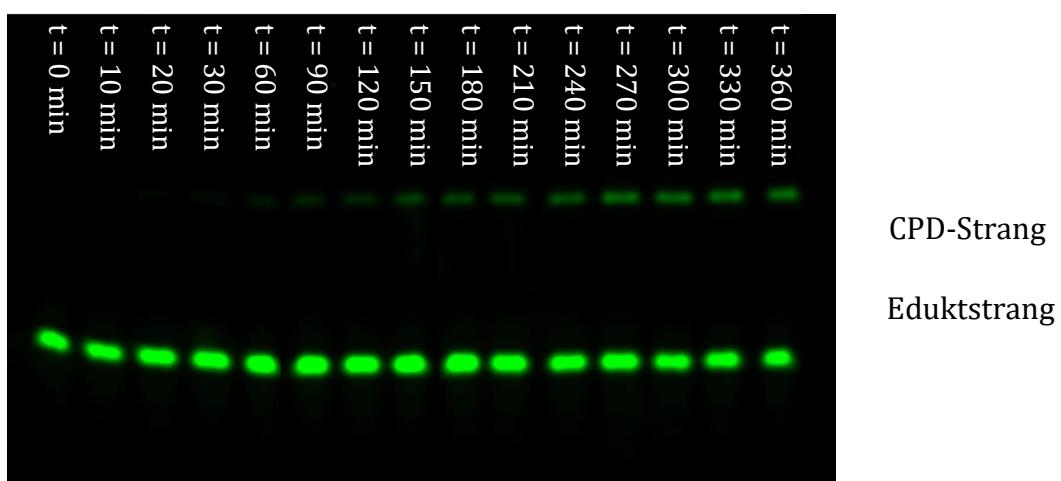


Abbildung SI 86: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA3-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.

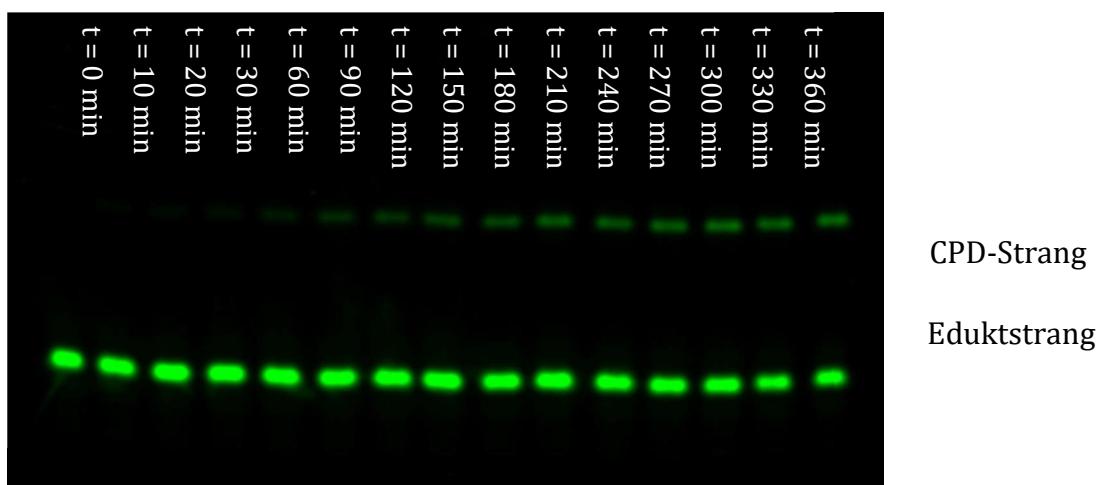


Abbildung SI 87: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA4-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.

Unterstützende Informationen

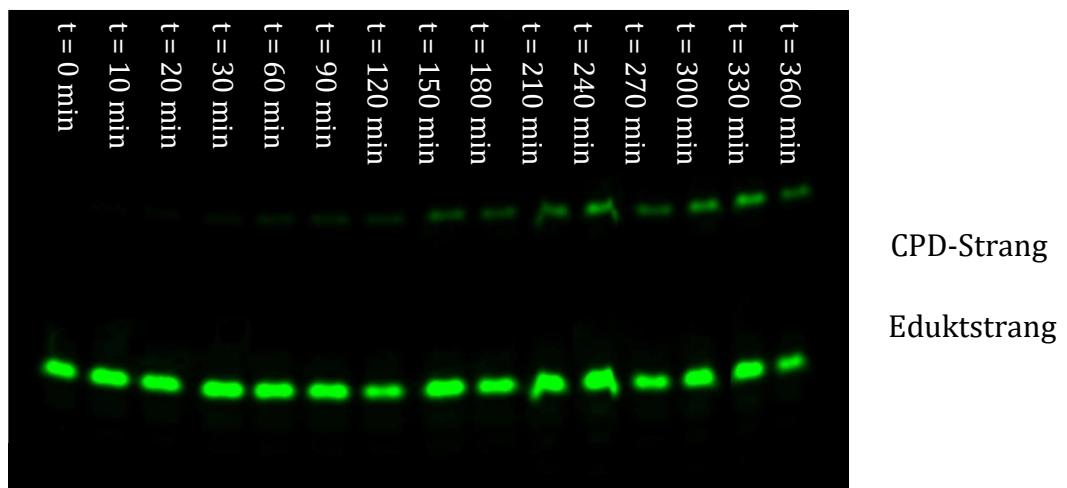


Abbildung SI 88: Repräsentative PAGE-Analyse der Belichtungsproben von DNA5-fdC im Zeitraum von t = 0-6 h.

7. Schmelztemparaturanalyse

7.1 Formyl-Modifikationen

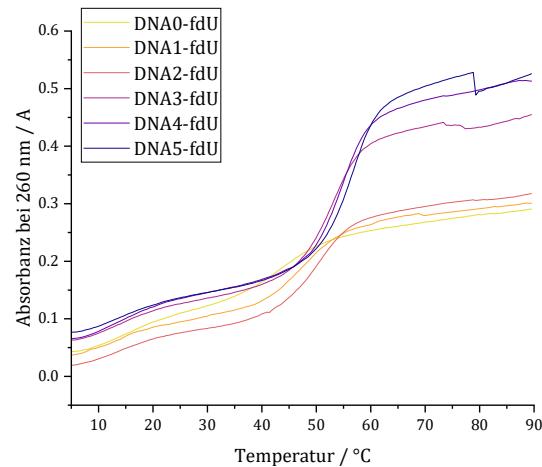


Abbildung SI 89: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride **DNA_n-fdU**.

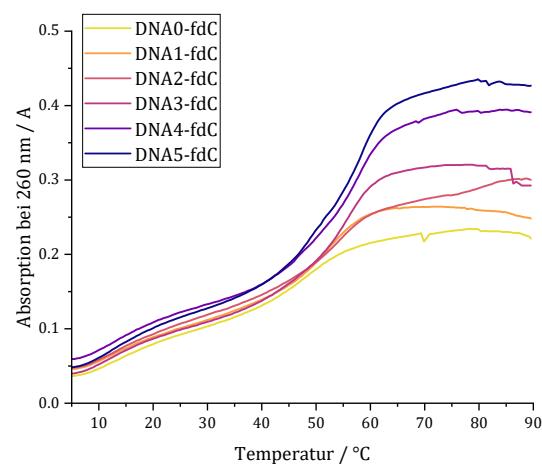


Abbildung SI 90: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride **DNA_n-fdC**.

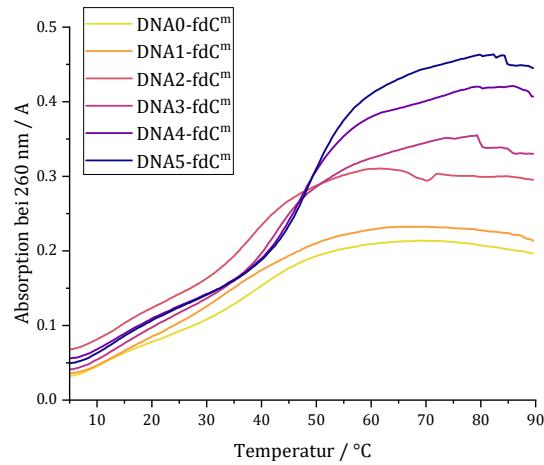


Abbildung SI 91: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride **DNA_n-fdC^m**.

7.2 5-Methyl-Pyrimidon (Pyo)

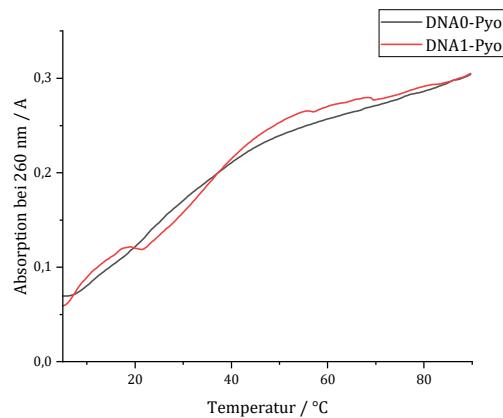


Abbildung SI 92: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride **DNA_n-Pyo**.

7.3 Pheomelaninmonomer-Derivate (Pheo)

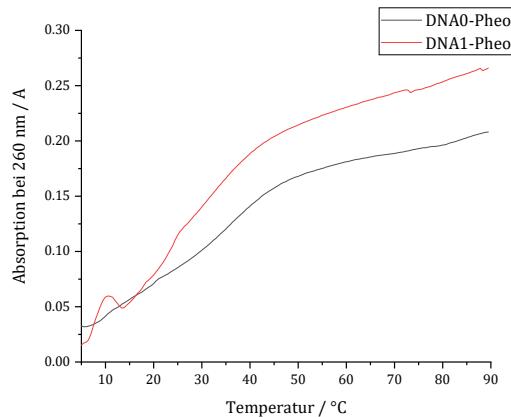


Abbildung SI 93: Schmelztemparaturanalyse der DNA-Hybride **DNA_n-Pheo**.