

CPD-Bildung durch weitreichenden photoinduzierten Energietransfer entlang der DNA

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Arthur Kuhlmann

Karlsruhe, 2025

KIT-Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Joachim Podlech

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2023

Meiner Familie und Freunden

„Man kann die Erkenntnisse der Medizin auf eine knappe Formel bringen: Wasser, mäßig genossen, ist unschädlich.“

- Mark Twain

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2018 bis Juli 2021 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die interessante Themenstellung, das Vertrauen, die Geduld und hervorragende Betreuung bedanken. Besonders schätzenswert war die Möglichkeit der eigenen Ideenverwirklichung, aber auch der Hilfe in schwierigen Phasen und der Unterstützung in vielen Belangen.

Im Speziellen möchte ich mich bei den folgenden Personen bedanken:

- Claudia Sommer für die Hilfe bei allen Bürokratieproblemen, die großartigen Gespräche, für das immer offene Ohr und die Ehrlichkeit.
- Annette Hochgesand für die vielen MALDI-Messungen und die Organisation aller Bestellwünsche.
- Dr. Andreas Rapp für die Unterstützung am NMR und jeglichen IT-Fragen.
- Richard von Budberg für die Reparatur meiner Glasgeräten und damit einem Ausgleich meiner Tollpatschigkeit.
- Meinen Kollegen Dr. Yannic Fritz, Dr. Fabienne Seyfert, Dr. Jeannine Steinmeyer, Dr. Sergej Hermann, Dr. Damian Ploschik, Dr. Ulrike Reisacher, Dr. Fabian Lang, Dr. Julian Gebhard, Dr. Hülya Ucar, Dr. Katja Krell, Dr. Sara Müller, Dr. Samantha Wörner, Dr. Christoph Bickmann, Dr. Larissa Doll, Dr. Daniel Sack, Dr. Dennis Harijan, Dr. Christian Schwechheimer, Dr. David Rombach, Fabian Weick, Lisa Gramespacher, Sina Jaschik, Rita Michenfelder, Maximilian Seifermann, Lisa Rieger, Bastian Pfeuffer, Eileen List, Nicola Seul, Maren Schrödter, Judith Winsauer, Joana Krämer, Karen Möbius, Michaela Mijic, Elena Foitzik, Lara Hirsch, Sebastian Häcker, Philipp Geng, Kerstin Müller, Desirée Steuernagel, Dorothée Ganz und Franziska Rönicke für die angenehmen Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bei jeglicher Art von Probleme. Für viele lustige Einstände und diverse Aktivitäten außerhalb des KITs.

- Meinen Studenten Fabian, Larissa, Janine, Christian und Yves für euer Interesse und engagierte Mitarbeit, für die lustige Zeit, für die erfolgreichen Ergebnisse und das Vertrauen in mich.
- Meinen Hiwi Celina und Simon für eure Hilfe und euer Interesse an meiner Forschung, für die geniale Zeit im Praktikum und im Labor, für so viele lustige Momente und eure erfrischende Art.
- Meinen lieben Laborkollegen Yannic, Fabienne, Fabian, Lisa und Sina für die unglaublich witzige und großartige Zeit im Labor 203 (aka die Irrenanstalt). Danke vielmals für die produktiven Diskussionen, den vielen Insidern, den Hass auf alles, die teils „besonderen“ Gesprächsthemen und für die vielen 203 Abende, die meistens schön dokumentiert wurden. Ihr habt das Labor 203 zu dem gemacht, was es war... ein zweites Zuhause.
 - Yannic Bruddi mein bester Mann für alle Fälle! So vielseitig wie du sind nur die wenigsten. Egal ob als Helene Fischer, Schwabbel, Primaballerina, AK Mülleimer oder der Gerät, du hast deine Rolle immer perfekt gemeistert, das Drama zur Komödie und die Zeit unvergesslich gemacht. Ich danke dir dafür, dass du mich immer zum Lachen gebracht hast, für deine offene Art, für die tief sinnigen Gespräche und deine kompetente Hilfe im Labor.
 - Fabse meine schickimicki Azzlack-Schwester und Блинная рожа. Du hast mir gezeigt, dass ich mich auch mal irren kann. Ich danke dir für die vielen Kaffeepausen, die mich zum Kaffeejunkie gemacht haben, für deine Hilfe und Unterstützung trotz der geringen Motivation dafür, für ein offenes Ohr zu allen Zeiten, für die unglaublich belustigende Reise von naiv zu „203-Niveau“ und für deine unvergesslichen Reaktionen auf unsere Dummheit und Zweideutigkeit.
 - Fabian... der Junge ist einfach Premium (Schwäche: Bier). Du bist gekommen, um zu bleiben und zu verhindern, dass das Niveau in 203 steigt. Ich danke dir, dass du es im Vertiefer ausgehalten hast und du in diese großen Fußstapfen getreten bist. Danke für die konstruktiven Diskussionen, auch wenn wir manchmal unterschiedlicher Meinung waren, für die herrlich witzigen Umtrünke und die geilsten Bilder überhaupt, für viele bekloppte Aktionen, für unsere Fress-Abende und die interessanten Rankings.
 - Lisa oder besser bekannt als Klisi... So ein lieber Mensch kann nur aus Hogwarts von den Hufflepuffs kommen. Deine Unbekümmertheit, dein großes Herz, deine

Tollpatschigkeit und Lässigkeit haben das Labor 203 perfekt abgerundet und eine Balance der Kräfte gesichert. "I can only count to 4"-Klisi wird mir für immer in Erinnerung bleiben. Danke für eine wundervolle und lustige Zeit.

- Sina, meine Azubine, ich danke dir für die großartige Arbeit und eine unglaubliche Geduld bei jeder Säule, für deinen trockenen Humor und deine Freundlichkeit. Ich hoffe, es war für dich nicht nur lehrreich, sondern vor allem lustig, interessant und eine erinnerungswürdige Zeit.
- Fabian L. für die gemeinsame Zeit und den gemeinsamen Weg vom Studium, durch alle Praktika bis hin zur Promotion. Danke dir für die organisatorische und administrative Hilfe, für die Mottotage, die gemeinsame Aufrüstung des AK's und der gleichen positiven Einstellung zur Praktikumsbetreuung.
- Katja für die gelegentlichen Feierabendbierchen, deine Experimentierfreudigkeit und die farbenfrohen Styles (kurz und weiß fand ich am besten).
- Julian das „wieso googlet ihr Namastase“-Monchhichi. Danke dir für die spannenden Black Stories, deine verblüffenden Zaubertricks und die lustige Zeit zusammen.
- Hülya für so manche Knaller-Sprüche, die mich immer zum Lachen gebracht haben.
- Samantha für unsere hitzigen Diskussionen, lustige Zukunftsplanung für ein Kraulstudio, die Wettbereitschaft und deinen unersättlichen Hunger auf Pilmeni.
- Max für die fachliche Kompetenz, die gute Zeit während der Arbeit und bei allen Feiern als kompetenter Gesangs- und Trinkpartner.
- Rita für die interessanten Gespräche, deine gute Laune, für dein Engagement im AK und unsere täglichen Snaps (nächstes Ziel 1000).
- Lisa für die schöne und lustige Zeit zusammen, auch als meine OC-F Studentin.
- Maren für deine super Bastel-Skills und die teilweise Weiterführung meines Themas.
- Nicola für den sportlichen Ansporn und dass ich mich als Opi noch etwas bewegt habe.
- Basti für die coolen Feiern und die täglich gute Ballermann-Stimmung.
- Meinen Eltern und Schwestern für die Ermöglichung meiner Laufbahn, für meine Erziehung, für das Verständnis auch bei schwierigen Themen, für die Unterstützung und die entgegengebrachte Liebe. Danke, dass ihr für mich da seid.
- Meiner Schwiegerfamilie für meine großartige Frau, für das viele Essen, für die interessanten Gespräche und Diskussionen.

- Meiner Frau Caro, die ich im Studium kennen und lieben gelernt habe, für die Unterstützung in jeder Lebenssituation, den Glauben an mich, für das Gefühl, dass jemand auf dich wartet. Danke dir, dass du mich immer wieder zurück auf den Boden bringst und mir zeigst was wirklich wichtig ist. Ohne dich wäre ich zum Workaholic geworden. Danke für unsere gemeinsamen Hobbys, für so viele schöne Momente im Leben und für unsere wundervollen Kinder. Danke euch für das Vertrauen, die Zeit und die Liebe. Danke für so viele tolle Erinnerungen und für die gemeinsame Zukunft. Meine größte Freude ist Ehemann und Vater zu sein.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Themenstellung	1
2	Theoretischer Hintergrund.....	6
2.1	Photochemie.....	6
2.1.1	[2+2]-Cycloadditionen	6
2.1.2	Photokatalyse	8
2.1.3	Photophysikalische Prozesse.....	10
2.1.4	Metallfreie Photosensibilisatoren	15
2.1.5	Xanthon	18
2.2	DNA.....	21
2.2.1	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere	22
2.2.2	DNA-Addukte.....	24
2.2.3	Interkalatoren.....	26
2.2.4	Methylierung von Cytosin	26
2.2.5	Reparatur von CPD-Schäden	27
3	Hauptteil.....	29
3.1	Wahl des Sensibilisators	29
3.2	Synthese.....	32
3.2.1	Syntheseziel.....	32
3.2.2	Glykal	33
3.2.3	Aglycone	33
3.2.4	Syntheseübersicht	40
3.3	Oligonukleotid-Synthese und DNA-Designstrategie	41
3.4	Distanzabhängigkeit der photoinduzierten CPD-Bildung.....	43
3.4.1	Basenabhängige CPD-Bildung	52
3.4.2	Einfluss benachbarter Basenpaare.....	55

3.4.3	Vergleich zu Xanthon- und Thioxanthon-Sensibilisator	57
3.4.4	Benzo[c]xanthon	63
3.5	Ungebundene Photosensibilisatoren und CPD-Bildung	66
3.5.1	Synthetische Photosensibilisatoren	68
3.5.2	Kosmetika	72
3.5.3	Medikamente	74
4	Zusammenfassung und Ausblick	78
5	Experimenteller Abschnitt.....	81
5.1.	Verwendete Materialien und Geräte	81
5.1	Belichtungsexperimente.....	89
5.2	Analyse über Polyacrylamid-Gelelectrophorese (PAGE)	90
5.2.1	Durchführung	90
5.2.2	Analyse	91
5.3	Synthesevorschriften	93
6	Literaturverzeichnis.....	128
6.1	Veröffentlichungen.....	137
6.2	Konferenzen und Poster	137
6.3	Lehre	138
7	Eidesstaatliche Erklärung	140

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
5mC	5'-Methylcytosin
Å	Angstrøm
A	Akzeptor
Abs	Absorption
Äq.	Äquivalente
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBD	Cyclobutan-Dimer
CMP	Cytidinmonophosphat
CpG	Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
D	Donor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EE	Essigsäureethylester
EDG	<i>Electron Donating Group</i>
EWG	<i>Electron Withdrawing Group</i>

Em	Emission
EnT	Energietransfer
Flu	Fluoreszenz
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
HH	<i>head-to-head</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HT	<i>head-to-tail</i>
IC	<i>Internal Conversion</i>
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
Kat.	Katalysator
λ	Wellenlänge
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LM	Lösungsmittel
Lsg.	Lösung
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min.	Minute
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis

NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nm	Nanometer
p.a.	<i>pro analysi</i>
Pho	Phosphoreszenz
P	Produkt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pET	photoindutierter Elektronentransfer
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichlorpalladium(II)
photochem.	Photochemisch
ppm	<i>parts per million</i>
PRK	Photoredoxkatalysatoren
PS	Photosensibilisatoren
quant.	quantitativ
R	Rest
<i>R_f</i> -Wert	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sub	Substrat
S ₁ , S ₂	Singulett-Zustand
SET	<i>Single-Electron-Transfer</i>
SOMO	<i>Single Occupied Molecular Orbital</i>
t	Zeit
T	Temperatur

T ₁ , T ₂	Triplett-Zustand
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TTET	Triplett Triplett Energietransfer
UV	Ultraviolett
v	Schwingungs-Quantenzahl
vgl.	Vergleich
VR	<i>Vibrational Relaxation</i>
vs	<i>versus</i>
z.B.	zum Beispiel

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den Chemical Abstracts¹ und an den von der IUPAC-IUB-Kommission² empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden kursiv gedruckt.

¹ *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

² IUPAC *Commision on Nomenclature of Organic Chemistry* (CNOC).

1 Einleitung und Themenstellung

Die tägliche Sonneneinstrahlung spendet Wärme und Licht. Sie ermöglicht die Sauerstoffproduktion durch oxygene Photosynthese oder wird für die Vitamin-D-Synthese benötigt. Das so erzeugte Vitamin D stärkt das Immunsystem und wird zum Knochenaufbau verwendet. Sonnenlicht beeinflusst in vieler Art und Weise den Hormonhaushalt und die Ausschüttung von Neurotransmittern, wie beispielsweise Serotonin, dessen Durchsatz im Gehirn von der Jahreszeit abhängig ist.^[1] Ein niedriger Serotoninspiegel führt zu einer erhöhten Impulsivität und Aggressivität.^[2] Somit beeinflusst die Sonne maßgeblich unseren Gemütszustand und damit das Zusammenleben der Gesellschaft. Gleichwohl der vielen positiven Einflüsse des Sonnenlichts, ist der energiereiche ultraviolette Anteil (UV-Strahlung) in der Lage Lebewesen auch zu schädigen.^[3,4] Da die routinemäßige Exposition der Haut mit Sonnenstrahlung unvermeidbar ist, sind direkte und indirekte Schädigungen der DNA durch UV-Strahlung ständig stattfindende Prozesse. Hierbei dienen die generierten Photoschäden und Mutationen in der DNA als Quelle für eine Vielzahl von Krankheiten wie der photoallergischen Dermatitis oder Hautkrebs.^[5,6] Mit 252.990 Neuerkrankungen im Jahr 2016 stellt Hautkrebs (Abb.1) die am häufigsten auftretende Krebsart in Deutschland dar. Dies entspricht etwa 51.4 % der neu auftretenden Krebsfälle und damit einer Steigerung um 20.6 % im Vergleich zu 2010.^[7]

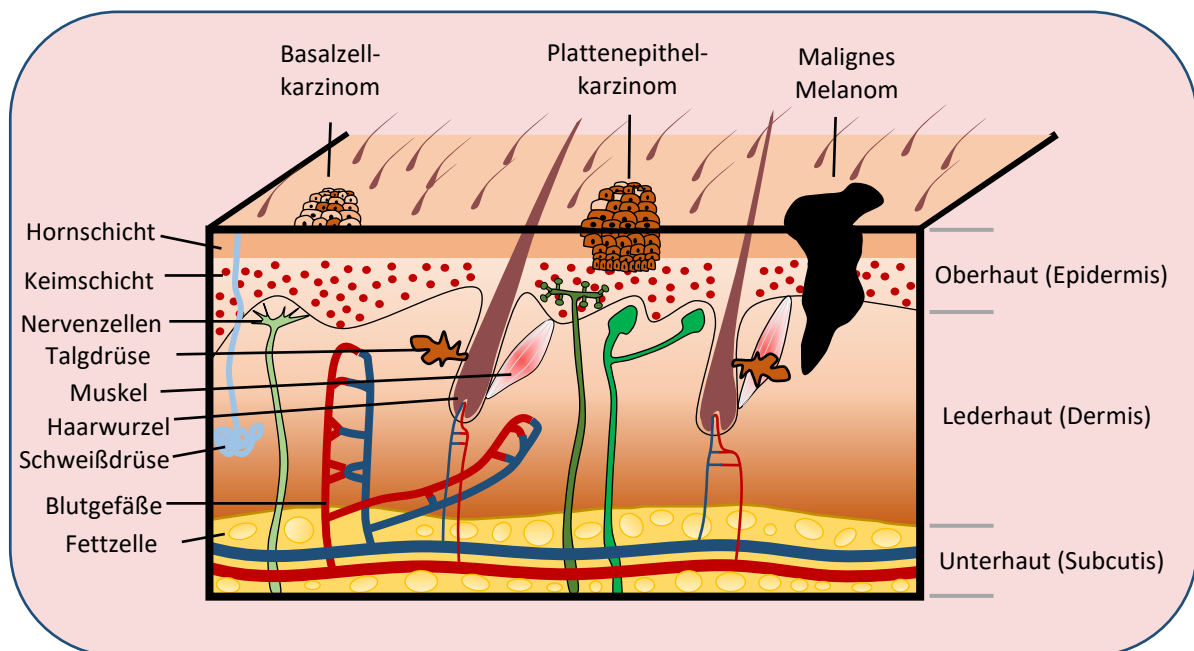


Abbildung 1: Graphische Darstellung von Hautkrebserkrankungen.

UV-Strahlung (100-400 nm) umfasst zwar weniger als 10 % des Sonnenlichts, doch können allen voran UV-A-Strahlung (320-400 nm) und UV-B-Strahlung (280-320 nm) in die Hautzellen eindringen und dort durch DNA absorbiert werden.^[8] Hierbei erfolgt eine direkte Schädigung der DNA durch Absorption von UV-B-Strahlung, welche das Absorptionsmaximum der DNA-Basen (260 nm) umfasst. UV-A-Strahlung wird von den DNA-Basen aufgrund der zu geringen Energie zwar kaum absorbiert, jedoch kann diese in Wechselwirkung mit sogenannten Photosensibilisatoren auf die DNA übertragen werden. Deshalb erfolgt hier die Schädigung überwiegend indirekt.^[8,9] UV-C-Strahlung hingegen (100-280 nm) wird nahezu vollständig von der Ozonschicht absorbiert und trifft daher kaum auf die Erdoberfläche auf.^[10]

Der häufigste durch UV-Strahlung induzierte Photoschaden beruht auf einer Verknüpfung benachbarter Pyrimidine durch eine [2+2]-Cycloaddition. So ist Bildung dieser Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) bereits seit 1960 bekannt.^[11a] Die Zeitskala und der Mechanismus dieser Reaktion konnte jedoch erst 2007 von *Zinth et al.* geklärt werden.^[11b] Neben den CPD-Schäden sind auch oxidative Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *engl.: reactive oxygen species*) zu erwähnen, die ebenfalls durch UV-Strahlung gebildet werden und die DNA über radikalische und oxidative Mechanismen verändern.^[12]

DNA, als universaler Träger der Erbinformation aller Lebewesen ist nicht nur ständiger Schädigung durch hochenergetische Strahlung ausgesetzt, sondern auch anderen Umwelteinflüssen, wie chemischen Substanzen und Schädigungen durch innere Zellstoffwechselprozesse. Schätzungen gehen dabei von etwa 60.000 Schäden pro Tag und Zelle im menschlichen Körper aus.^[13] Ohne die Vielzahl an Reparaturmechanismen, welche die Schäden erkennen und beheben, wären die Folgen für jedes Lebewesen verheerend.

Wie bereits erwähnt, sind Photosensibilisatoren, die in der Lage sind, UV/VIS-Strahlung zu absorbieren, ebenso an Prozessen der DNA-Schädigung beteiligt. Hierbei übertragen sie die aufgenommene Energie, bei räumlicher Nähe, an die DNA-Basen. Die Übertragung kann sowohl über Singulett- als auch Triplett-Mechanismen erfolgen. Ferner kann die Anregung des Sensibilisators, in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, auch zur Ausbildung von ROS führen.^[14-16] Im alltäglichen Leben kommen Photosensibilisatoren nicht nur in der Natur vor, sondern werden industriell vielfältig in Form von Pharmaka in Medikamenten^[17], in Sonnenschutzcremes und Kosmetika^[18] sowie Verpackungsmaterial^[19] verwendet. Die Verwendung und Wirkung dieser Stoffe sind allerdings, aufgrund von gegensätzlichen und

inkonsistenten Resultaten, umstritten. So werden beispielsweise Benzophenon-Derivate in Sonnencremes verwendet, bei denen schädigende Auswirkungen auf Korallenriffe^[20] beobachtet werden. Ebenso konnte aufgezeigt werden, dass die UV-absorbierende Eigenschaft zum Schutze vor DNA-Schäden, zu eben diesen Schäden, bei einer Interkalation in DNA, führen kann.^[21] Ein weiteres Beispiel stellt das Antibiotikum Ciprofloxacin dar. Die Einnahme des Medikaments kann sowohl nukleare als auch mitochondriale DNA schädigen und erhöht durch photochemische Prozesse das Risiko für Hautkrebs.^[22a] In der photodynamischen Therapie (PDT) wird diese unerwünschte Begleiterscheinung hingegen gezielt angewendet.^[22b] Die Methodik basiert auf der photoinduzierten Schädigung der DNA von entarteten Zellen. Dies wird in einem solchen Ausmaß durchgeführt, sodass eine Einleitung der Apoptose erfolgt. Eine solche Anwendung findet in der Behandlung von Hautgewebsveränderungen und nicht-melanotischem Hautkrebs statt.^[23,24]

Ebenso können natürliche Photosensibilisatoren durch Nahrung, wie beispielsweise ungeschälten und ungewaschenen Buchweizen (Fagopyrine), oder durch die tropische Frucht Mangostan (Xanthone) aufgenommen werden und phototoxisch wirken.^[25]

Das verbreitete Vorkommen von Photosensibilisatoren und die häufige Exposition dieser Stoffe erfordert zunehmend ein besseres Verständnis der Wechselwirkungen im Organismus und dessen DNA. Da es eine Vielzahl an Sensibilisatoren und DNA-Sequenzen gibt, sind mechanistische, qualitative und quantitative Unterschiede in der photoinduzierten Ausbildung von DNA-Schäden wahrscheinlich. Da die CPD-Schäden den größten Anteil an Photoschäden abdecken, wäre eine Fokussierung auf diese Gruppe am zielführendsten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein einfaches und zugleich vielversprechendes sowie universal anwendbares Verfahren zur quantitativen Evaluation von photoinduzierten CPD-Schäden ausgearbeitet (Abb.2).

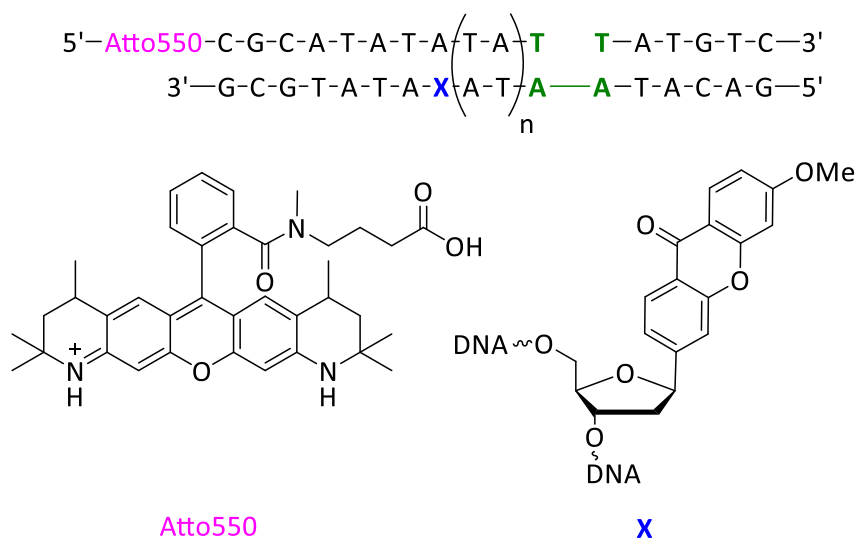


Abbildung 2a: Schematische Darstellung des angewendeten DNA-Designs zur Evaluation von CPD-Schäden.

Hierbei besteht die DNA-Architektur aus einem langen Einzelstrang mit einem eingebauten Photosensibilisator als artifizielle Base. Diesem gegenüber gelegen befinden sich zwei Gegenstränge, die an der designierten Stelle des DNA-Schadens nicht miteinander verbunden sind, weil die Phosphodiesterbindung fehlt. Für die Detektion ist ein Gegenstrang mit einem ATTO550-Farbstoff markiert. Die benachbarten Basen beider Gegenstränge sind Pyrimidine, die zu einer CPD-Formation in der Lage sind. Nach Bestrahlung mit geeigneter Wellenlänge werden die Gegenstränge durch die Ausbildung der kovalenten Bindungen verknüpft. Der neugebildete verlängerte Gegenstrang weist eine erhöhte Retentionszeit bei der Auftrennung auf und ist somit quantifizierbar. Aufgrund der vordefinierten Positionen von Photosensibilisator und CPD-Paare, ist die ortsselektive Lichtinduktion und die Nachverfolgung der Energieausbreitung über unterschiedliche Distanzen möglich. Als Sensibilisatoren sind allen voran Xanthere geeignet, da sie bereits breit Anwendung in der Photochemie finden.^[26] Neben der fast planaren Struktur war auch die Absorptionseigenschaft dieser Verbindungen als Auswahlkriterium für die Verwendung in der DNA-Architektur entscheidend. Im Vergleich zu Xanthon, mit einer Triplett-Energie von $E_{00} = 311 \text{ kJ/mol}$,^[27] hat 3-Methoxyxanthon eine Singulettenergie von $E_{00} = 332 \text{ kJ/mol}$. Weiterhin ist eine Fluoreszenz und nur wenig, wenn überhaupt, Triplettphotochemie zu beobachten.^[28] Da Benzophenone und Acetophenone als Triplettensensibilisatoren im Arbeitskreis *Wagenknecht* bereits untersucht wurden,^[21] sollte 3-Methoxyxanthon als Singulett-Photosensibilisator für diese Belichtungsreaktionen ausgewählt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Synthese der Sensibilisator-gebundenen DNA-Stränge und die Untersuchung photophysikalischer und photochemischer Prozesse in der verwendeten DNA-Architektur, die Quantifizierung von CPD-Schäden durch PAGE-Analyse und die qualitative Analyse der verschiedenen Einflussfaktoren, wie Distanz- und Sequenzabhängigkeit, auf die Mechanismen der photoinduzierten CPD-Bildung. Ebenso wurden Untersuchungen mit nicht-kovalent-gebundenen Sensibilisatoren in analogen DNA-Strukturen durchgeführt, um einen Vergleich ziehen zu können und einen Bezug zu realen Umweltbedingungen darzustellen.

X =

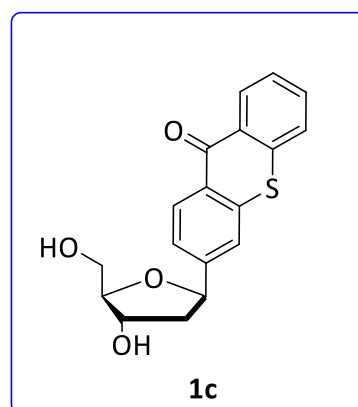
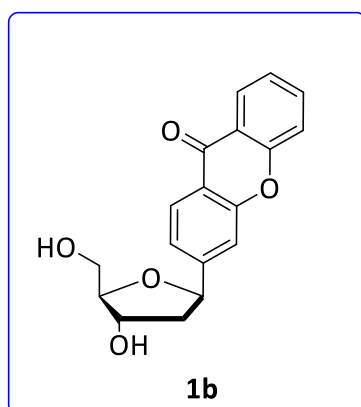
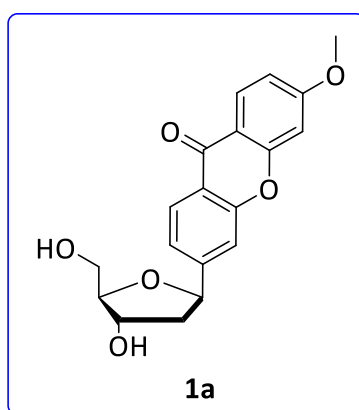


Abbildung 2b: β -C-Nukleoside der Photosensibilisatoren Methoxyxanthon (**1a**), Xanthon (**1b**) und Thioxanthon (**1c**)

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Photochemie

Die klassische Photochemie beschreibt chemische Reaktionen, bei denen die reagierenden Moleküle direkt durch Photonen angeregt werden.^[29,30] Hierfür muss die Anregungswellenlänge der Strahlungsquelle mit dem Absorptionsbereich des zu reagierenden Moleküls überlagern. So ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionen, wie Umlagerungen, Additionen, Spaltungen oder Isomerisierungen, möglich. Eine Erweiterung der Reaktionsmöglichkeiten bietet hierzu die indirekte Anregung durch Photosensibilisatoren, -katalysatoren und -initiatoren.

2.1.1 [2+2]-Cycloadditionen

Eines der bekanntesten Beispiele (Abb.3) für die Photochemie sind die sogenannten [2+2]-Cycloadditionen. Hierbei entstehen aus zwei π -Bindungen unter Ringschluss zwei neue σ -Bindungen. Während diese Reaktionen nach dem *Woodward-Hoffmann-Regeln* photochemisch suprafacial erlaubt sind [$2\pi_s+2\pi_s$], sind sie thermisch suprafacial symmetrieverboten.^[31] Nach der Orbitalsymmetrie wäre ein thermisch antarafacialer Mechanismus zwar theoretisch erlaubt, allerdings aufgrund der Molekülgeometrie praktisch nicht möglich.

So ist für den Reaktionsverlauf mechanistisch betrachtet, die Anregung eines Olefins in den ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 und die darauffolgende Reaktion mit einem weiteren Olefin im Grundzustand S_0 .

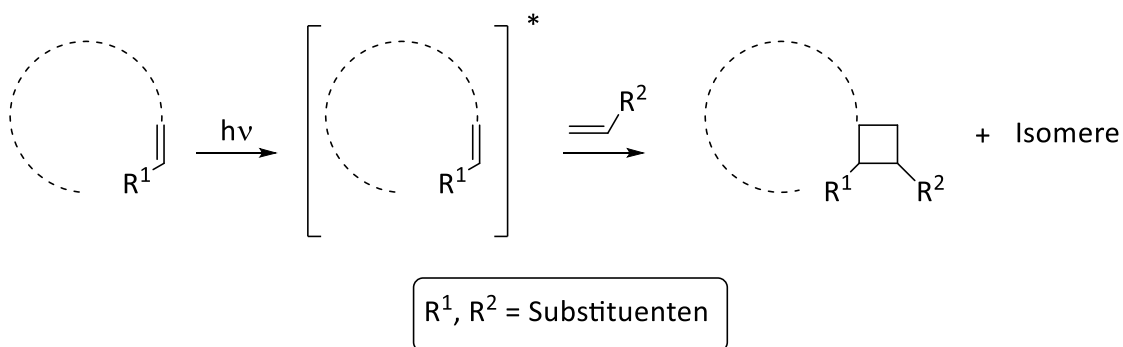


Abbildung 3: Photochemische [2+2] Cycloaddition über den ersten angeregten Singulett-Zustand.

Olefine mit nichtkonjugierten Doppelbindungen besitzen energetisch hochliegende S_1 -Zustände, wodurch oftmals eine Strahlungsquelle mit einer Wellenlänge $\lambda < 250$ nm für die Anregung benötigt wird. Die geringe kommerzielle Verfügbarkeit solcher Strahlungsquellen erschwert daher die Anwendung im Labormaßstab. Die direkte Anregung von Molekülen ist folglich nur bei konjugierten Alkenen oder in Konjugation mit einer Carbonylverbindung, bei denen die S_1 -Niveaus stark abgesenkt sind, praktisch durchführbar. Weiterhin kann die kurze Lebensdauer des S_1 Zustandes die Reaktion erschweren, da hohe Quantenverluste durch Fluoreszenz und strahlungslose Relaxationen (IC) zu berücksichtigen sind.^[32]

Neben der zuvor genannten „gewöhnlichen“ [2+2]-Cycloaddition gibt es eine sehr bekannte Sonderform, die sogenannte *Paternò-Büchi*-Cycloaddition (Abb.4).^[33-35] Hierbei reagiert die angeregte Carbonylgruppe, welche dann als Biradikal vorliegt, mit einem Alken unter Ausbildung eines viergliedrigen Oxetans.

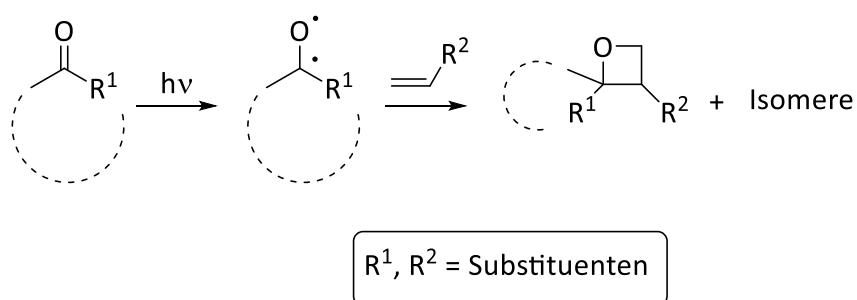


Abbildung 4: Photochemische [2+2] Cycloaddition: *Paternò-Büchi*-Reaktion aus dem ersten angeregten Triplett-Zustand.

In der Regel erfolgt die Anregung der Carbonylbindung durch energiereiches Licht im UV-Wellenlängenbereich. Dieses sorgt für unspezifische Reaktionsbedingungen, was oft den Nachteil unerwünschter Nebenreaktionen hat.

Zur Bestimmung der möglichen Regioisomere einer [2+2]-Cycloaddition müssen die entsprechenden Substituenten der Reaktionspartner betrachtet werden (Abb.5). Die Klassifizierung der Produkte nach ihrer Struktur in *head-to-tail* (HT) und *head-to-head* (HH) ermöglicht eine bessere Einordnung. So bilden elektronenschiebende Gruppen (EDG) bevorzugt HT-Strukturen aus, während elektronenziehende Gruppen (EWG) bevorzugt HH-Strukturen erzeugen.

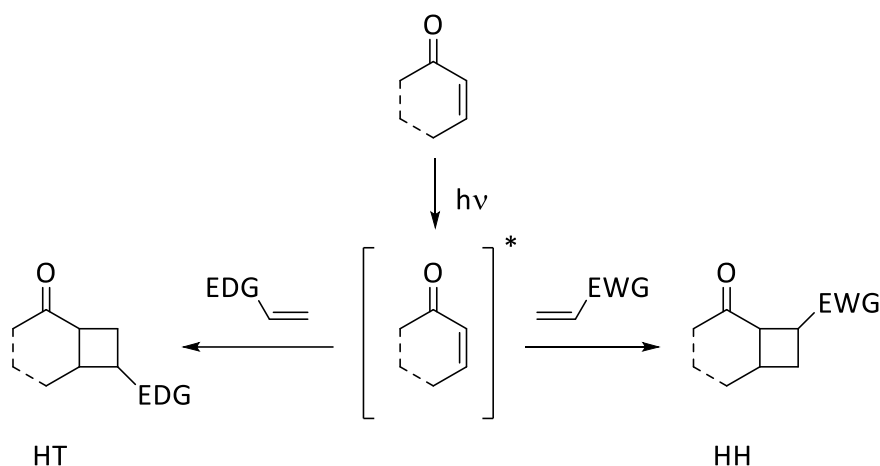


Abbildung 5: Regioselektivität der [2+2]-Cycloaddition.

Photochemische Prozessabläufe über die Triplett-Zustände, wie bei der Paternò-Büchi-Reaktion, sind von besonderer Bedeutung. Allen voran α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen zeichnen sich durch einen S_1 -Anregungsbereich im nahen UV und einen schnellen Übergang (ISC) in den Triplett-Zustand (T_1) aus. Der Vorteil liegt in der relativ langen Lebensdauer diesen angeregten Zustandes, in der das Olefin reaktiv ist. Bei der Cycloaddition von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen erfolgt die Reaktion aus dem niedrigsten Triplett-Zustand T_1 . Die olefinische Doppelbindung existiert hier nicht mehr (Abb.: 4), was die Produktselektivität der Reaktion durch eine freie Drehbarkeit erschwert und zu einem Energieverlust durch Rotationsanregungen führt. Aufgrund dessen zählen zyklische fünf- und sechsgliedrige α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen zu besser geeigneten Substraten.^[32] Hierbei können aber auch Konkurrenzreaktionen auftreten. Wenn der Triplett-Zustand des Alkens höher oder zumindest energetisch gleich zu dem des Ketons ist, sind sowohl Oxetan- als auch Cyclobutan-Isomere als Produkte möglich. Die Konformation des Produkts ist dabei vor allem abhängig von der Ausrichtung des radikalischen Intermediats nach maximaler Stabilität.^[36,37]

2.1.2 Photokatalyse

Wenn die direkte Anregung von Substraten ungünstig ist oder nicht zum gewünschten Ziel führt, so können diese über die indirekte Anregung über sogenannte Photokatalysatoren zur

Reaktion gebracht werden. Im klassischen Sinne beschleunigen oder ermöglichen Katalysatoren (Kat) einen gehemmt verlaufenden chemischen Vorgang, ohne formal an der Reaktion teilzunehmen. Sie werden also im Reaktionsverlauf nicht aufgebraucht und können daher in katalytischen Mengen verwendet werden.^[38] In der Photochemie ermöglicht der Photokatalysator allerdings eine Reaktion über einen Elektronen- und/oder Energietransfer. Dabei entstehen aus den Substraten beispielsweise reaktive Radikationen als aktivierte Intermediate. Im Bereich der Photokatalyse gibt es unterschiedlich ablaufende Prozesse, die in Teilgebiete getrennt werden können. Hierbei wird zwischen katalytischem oder stöchiometrischem Photonverbrauch unterschieden.^[39-41]

Die photoinduzierte Katalyse beschreibt einen Prozess, bei dem der einmalig angeregte Katalysator das Substrat zu einem Übergangszustand umwandelt und dieser, unter Reaktivierung des Katalysators, zum Produkt abreagiert. Die Rückgewinnung des angeregten Katalysators kann somit wiederum für einen weiteren Zyklus verwendet werden, ohne eine erneute Photoneneinstrahlung vorauszusetzen. Daher wird hierbei von einem katalytischen Photonverbrauch gesprochen. Des Weiteren sind in der photoinduzierten Katalyse die Grundzustände des Katalysators und Substrats beteiligt.^[39,41] Die Reaktionsquantenausbeute liegt hierbei über 1.

Im Gegensatz dazu wird bei dem stöchiometrischen Photonverbrauch zwischen drei weiteren Prozessen unterschieden. Bei der katalysierten Photoreaktion sind entweder Katalysator oder Substrat oder beide an einem angeregten Zustand beteiligt, welcher den katalytischen Schritt beschreibt. Nach der Reaktion wird das Substrat zum Produkt umgewandelt und der Katalysator wieder im Grundzustand erhalten. Aus diesem Grund ist eine dauerhafte Bestrahlung der jeweiligen Spezies notwendig, da die Photonen stöchiometrisch verbraucht werden.

Die zwei wohl wichtigsten Reaktionstypen sind jedoch die photoassistierte Katalyse und die katalytische Photosensibilisierung (Abb.6). Beide Prozesse können chemische Reaktionen auslösen, allerdings mit unterschiedlichen Mechanismen und meist auch unterschiedlichen Produkten. Welcher Prozess mit welcher Quantenausbeute abläuft, ist abhängig von Photokatalysator, Substrat und Lösungsmittel. Hierbei kommt es durch die permanente Lichteinstrahlung einer geeigneten Wellenlänge zu einem angeregten Zustand des Katalysators (Reaktionsquantenausbeute ≤ 1). Dieser überträgt anschließend die absorbierten

Photonen in Form von Elektronen oder Energie an das Substrat (Sub). So wird bei der photoassistierten Katalyse ein Eielektronentransfer zwischen dem Katalysator und dem Substrat initiiert. Daher wird der Katalysator auch Photoredoxkatalysator (PRK) genannt. Bei der katalytischen Photosensibilisierung kommt es hingegen zur Energieübertragung auf das Substrat, welches folglich selbst in einen angeregten Zustand versetzt wird. Bei solchen Prozessen wird der Katalysator als Photosensibilisator (PS) bezeichnet. In beiden Varianten erfolgt im Anschluss der Übergang des Katalysators zurück in den Grundzustand und muss infolgedessen erneut angeregt werden. Somit würde die Reaktion ohne dauerhafte Bestrahlung nicht stattfinden.^[41]

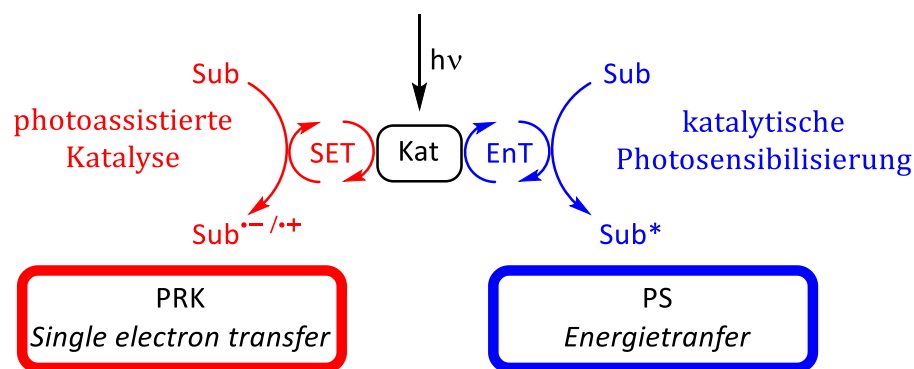


Abbildung 6: Photoredoxkatalyse und Photosensibilisierung im Vergleich: *Single electron transfer* (SET) und Energietransfer (EnT).

2.1.3 Photophysikalische Prozesse

Ein Molekül ist in der Lage mehrere elektronische Konfigurationen bzw. elektronische Zustände anzunehmen.^[42] Neben dem elektronischen Grundzustand (S_0) des Moleküls, existieren eine Vielzahl an angeregten Zuständen, die energetisch über dem Grundzustand liegen. Um diese zu erreichen, muss das Molekül Energie in Form von Licht absorbieren. Für das Verständnis der Lichtabsorption durch Materie kann das Molekül vereinfacht als ein Zweiniveausystem angesehen werden, wobei beide elektronischen Zustände jeweils durch Wellenfunktionen beschrieben sind. Durch eine zeitabhängige Störungsrechnung mit einer einfallenden elektromagnetischen Welle (Licht), als kleine Störung, lässt sich eine Frequenz für den Wechsel zwischen Grund- und angeregtem Zustand errechnen (Formel 1). Das System oszilliert zwischen diesen beiden hin und her. Es handelt sich dabei um die sogenannte Rabi-Frequenz ω_R .

$$\omega_R = \frac{M_{10}E}{\hbar} \quad \text{mit: } \hbar = \frac{h}{2\pi}$$

Formel 1: Berechnung der Rabi-Frequenz.

ω_R	Rabi-Frequenz
M_{10}	Übergangsdipolmoment vom Grundzustand 0 in den angeregten Zustand 1
E	Energie der elektrischen Feldkomponente des einfallenden Lichtfeld
\hbar	Reduzierte Planck-Konstante
h	Plancksche Wirkungsquantum

Hat die einfallende elektromagnetische Welle genau diese Frequenz oder eine nur leicht abweichende (*rotating-wave-approximation*), dann liegt eine Resonanz vor. Entsprechend kommt es nach der Zeit t zu einer kompletten Besetzungsinversion und damit der nahezu vollständigen Population des angeregten Zustandes (Formel 2). Dieser Vorgang wird dann als Absorption bezeichnet.^[43]

$$t = \frac{\pi}{\omega_R}$$

Formel 2: Dauer für eine vollständige Besetzungsinversion.

Da Grundzustand und angeregter Zustand meistens auch in ihrer Teilchendichteverteilung im Molekül unterschiedlich sind, kann in dieser stark vereinfachten Betrachtung auch analog von einem klassischen Hertschem Dipol gesprochen werden.

Nach der Absorption können aus dem angeregten Zustand nun unterschiedliche Prozesse ablaufen. Diese photophysikalischen Vorgänge lassen sich in einem Jablonski-Diagramm schematisch darstellen (Abb.7).^[44-46] Darin werden die elektronischen Zustände nach ihrer Energie und Multiplizität geordnet. Jedes elektronische Niveau beinhaltet wiederum mehrere Schwingungsniveaus. Diese werden als horizontale Linien dargestellt. Die Übergänge zwischen den Zuständen eines Moleküls lassen sich hierdurch besser veranschaulichen.

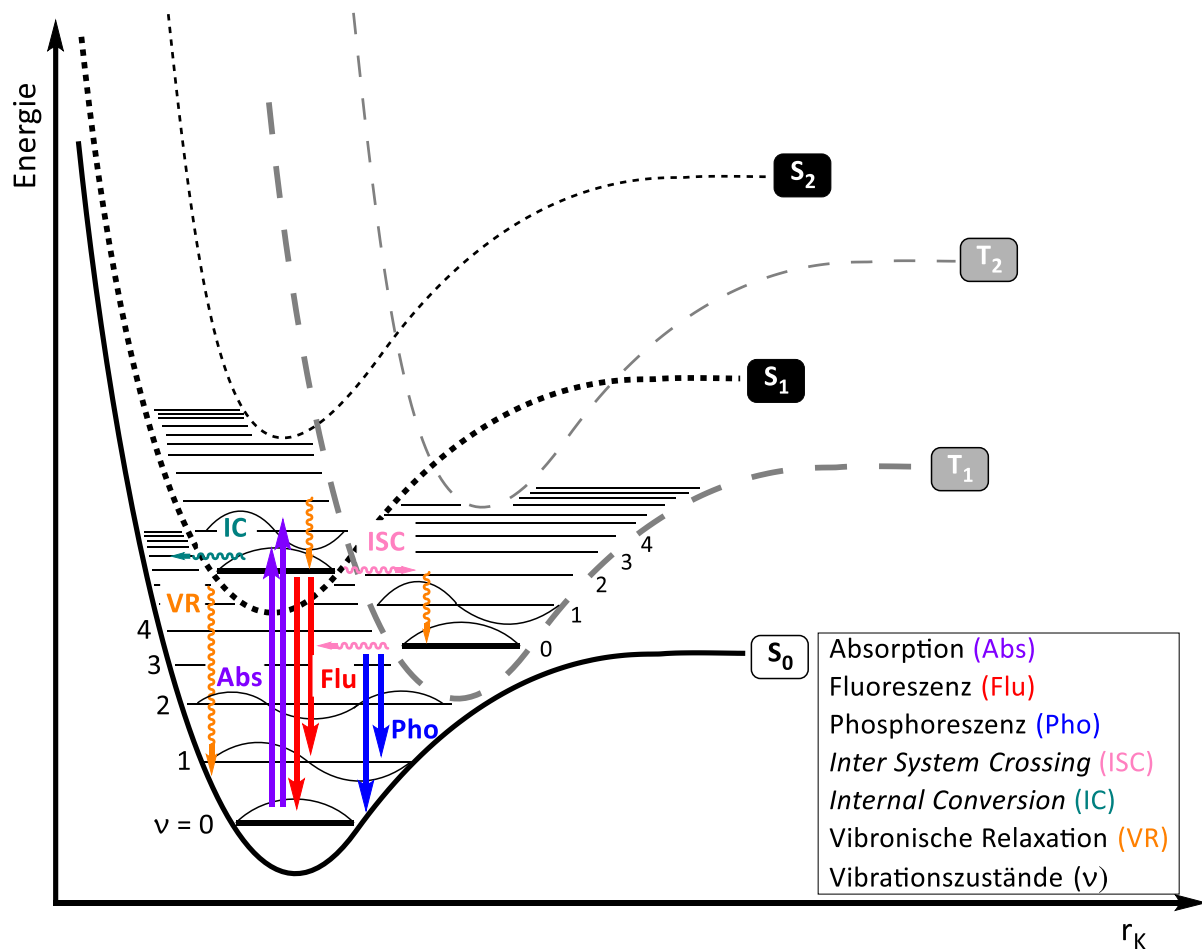


Abbildung 7: Allgemeines Termschema nach Jablonski.

Wie zuvor bereits beschrieben, erfolgt die Absorption (Abs), unter den genannten Voraussetzung, vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_n ($n = 1, 2, \dots$), auch Singulett-Zustände genannt. Dabei verläuft die Anregung in die höheren Vibrationszustände (v) des ersten angeregten Zustands S_1 zumeist mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ab, da die Überlappung zwischen den beiden Wellenfunktionen am größten ist. Nach dem Franck-Condon-Prinzip ist hierbei die Übereinstimmung aller geometrische Parameter, wie die Form der Absorptionsbanden und die Lage der Potentialkurven zueinander, bestimmend.^[47,48] Nach vibronischer Relaxation (VR), unter Wärmeabgabe an die Umgebung, in den ersten Vibrationszustand (Schwingungsgrundzustand) des angeregten Zustands S_1 , können nun eine Reihe unterschiedlicher Prozesse stattfinden.

- Unter Erhaltung der Multiplizität kann es durch die innere Umwandlung (IC) zu einem isoenergetischen Übergang in einen höheren Vibrationszustand des elektronischen Grundzustands S_0 kommen. Das Abfallen in ein niedrigeres Energieniveau wird daher als strahlungslos bezeichnet. Anschließend erfolgt wiederum die vibronische Relaxation.
- Ebenso kann die Energie in Form von Strahlung wiedergegeben werden. Unter Erhaltung der Multiplizität, findet die Fluoreszenz (Flu) vom Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustands S_1 in den Grundzustand S_0 statt. Hierbei wird Energie aus der Absorption wieder als Licht emittiert. Dieses Licht ist jedoch in den meisten Fällen rotverschoben, da die freigesetzte Energie geringer ist als die zuvor durch Absorption aufgenommene (Abb.8). Die Energieverluste ergeben sich durch die zuvor stattgefundenene vibronische Relaxation und durch Übergänge in höhere Vibrationszustände des Grundzustands S_0 , anstatt in den ersten Vibrationszustand. Diese Wellenlängenverschiebung zwischen Absorption und Emission wird auch als *Stokes-Verschiebung* bezeichnet.^[49]

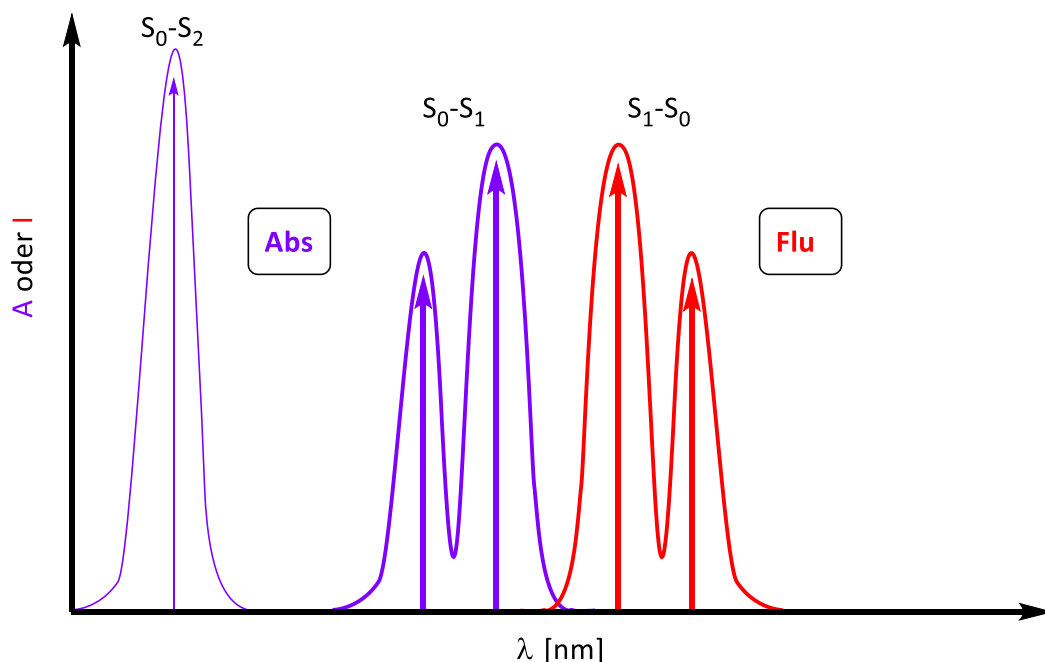


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Absorption und Emission in Form von Fluoreszenz.

- Bei dem Prozess der Interkombination hingegen (ISC) ändert sich die Multiplizität. Deswegen gilt er auch als spinverboten und verläuft daher auf längeren Zeitskalen ab. Hierbei kommt es zu einem Übergang vom angeregten Zustands S_1 in einen Vibrationszustand des Triplett-Zustands T_1 . Im umgekehrten ISC findet der Übergang

wiederum von T_1 zu S_0 statt. Dabei ist die Geschwindigkeit der Vorgänge bzw. die ISC-Rate abhängig von der Symmetrie. Dies ist durch die *El-Sayed*-Regel definiert. So ist die ISC-Rate erhöht, wenn die Art der Orbitale zwischen den verschiedenen Zuständen unterschiedlich ist.^[50]

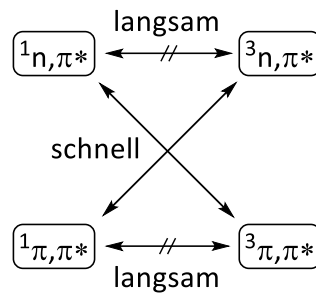


Abbildung 9: Ablauf von ISC-Prozessen nach *El-Sayed*.

Bei einem „schnellen“ Übergang $1\pi, \pi^* \leftrightarrow 3\pi, \pi^*$ und $1n, \pi^* \leftrightarrow 3\pi, \pi^*$ ist demnach ein Spinwechsel des Elektrons erlaubt, da eine Änderung des Bahndrehimpuls der beteiligten Orbitale ($\sigma \leftrightarrow \pi$) stattfindet. Im Umkehrschluss dazu laufen die Übergänge $1\pi, \pi^* \leftrightarrow 3\pi, \pi^*$ und $1n, \pi^* \leftrightarrow 3n, \pi^*$ wegen des Spinverbots langsam ab.

- Bei dem strahlenden Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen verschiedener Multiplizitäten wird von Phosphoreszenz (Pho) gesprochen. Dieser ist ebenso spinverboten und läuft daher auf längeren Zeitskalen ab (Abb.10). Der Übergang findet hier vom niedrigsten Schwingungsniveau des Triplett-Zustandes T_1 in ein Schwingungsniveau des Grundzustands S_0 statt. Triplett-Zustände sind aufgrund der Spinumkehr deutlich langlebiger als die Singulett-Zustände, wodurch sie für die Photochemie von besonderem Interesse sind. Die strahlenden Prozesse sind in der *Kasha*-Regel definiert und gelten sowohl für Singulett-Zustände (Fluoreszenz) als auch Triplett-Zustände (Phosphoreszenz).^[51]

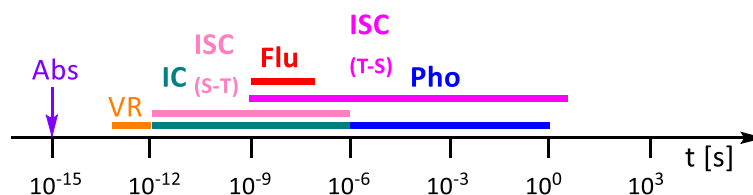


Abbildung 10: Photophysikalische Prozesse auf einer Zeitskala.^[52]

2.1.4 Metallfreie Photosensibilisatoren

Im Gegensatz zu den metallhaltigen Photosensibilisatoren, die meistens aus Übergangsmetallkomplexen bestehen, sind die rein organischen Photosensibilisatoren aus Aromaten, konjugierten Systemen und/oder Carbonylverbindungen aufgebaut. Da viele natürliche Sensibilisatoren Bestandteil von Lebewesen^[53] und synthetische Pendants oft einfach herzustellen sind, sind sie im Vergleich oftmals günstiger, leichter zugänglich und nachhaltiger als ihre metallhaltigen Gegenstücke. Weiterhin ist aufgrund der geringen Zytotoxizität vieler organischer Sensibilisatoren auch die Anwendung *in vivo*^[23,24] sowie die Anwendung *in vitro* mit Naturstoffen möglich.^[54-56] Wie zuvor bereits erläutert können Photosensibilisatoren UV/VIS-Strahlung einer geeigneten Wellenlänge absorbieren. Anstatt die aufgenommene Energie wieder strahlend als Fluoreszenz (aus Singulett-Zuständen) oder Phosphoreszenz (aus Triplett-Zuständen) zu emittieren, können sie bei Anwesenheit eines entsprechenden Akzeptormoleküls diese auf den Akzeptor (A) übertragen. Dabei erfolgt ein strahlungsloser Energietransfer (EnT) von angeregten Singulett- oder Triplett-Zuständen des Sensibilisators bzw. Donors (D) auf den Akzeptor. Dieser Vorgang ist von enormer Bedeutung für biologische und chemische Prozesse, da die Akzeptormoleküle meistens keine signifikante Absorption im sichtbaren Wellenlängenbereich aufweisen. Damit der Energietransfer stattfinden kann, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein. So muss der angeregte Zustand des Sensibilisators energetisch höher liegen als der des Akzeptors. Da der strahlungslose Energietransfer sowohl aus Singulett- als auch Triplett-Zuständen erfolgen kann, sind im Allgemeinen zwei Hauptkonzepte definiert worden.

Der *Förster*-Resonanzenergietransfer (FRET) wird in der klassischen Physik als Oszillationsvorgang des angeregten Donors beschrieben (Abb.11). Dabei wird durch die elektronische Schwingung des angeregten Zustands ein Dipol induziert. Dieser erzeugt eine elektronische Schwingung des Grundzustands des Akzeptors, was schließlich zur Energieübertragung führt.

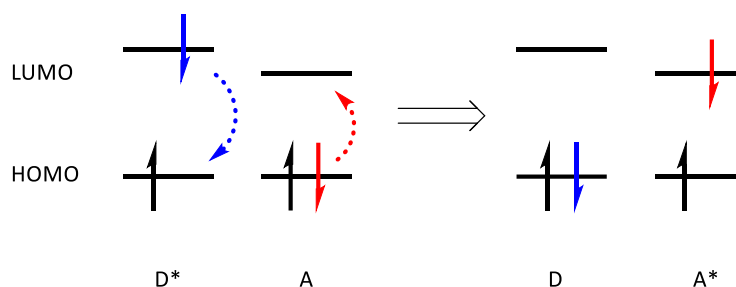


Abbildung 11: Photosensibilisierung über *Förster*-Resonanzenergietransfer.

Daher kann der Prozess zusammengefasst als Energieübertragung durch strahlungslose Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf den Akzeptor beschrieben werden.

Eine wesentliche quantenmechanische Eigenschaft ist hierbei der Spin-Erhalt von Donor- und Akzeptormolekülen. Daher findet beim FRET in der Regel ein Singulett-Singulett-Transfer statt. Für einen optimalen Energietransfer sind vor allem der Abstand, Orientierung und die Überlappungsspektren der FRET-Paare von Bedeutung (Abb.12).^[57-59]

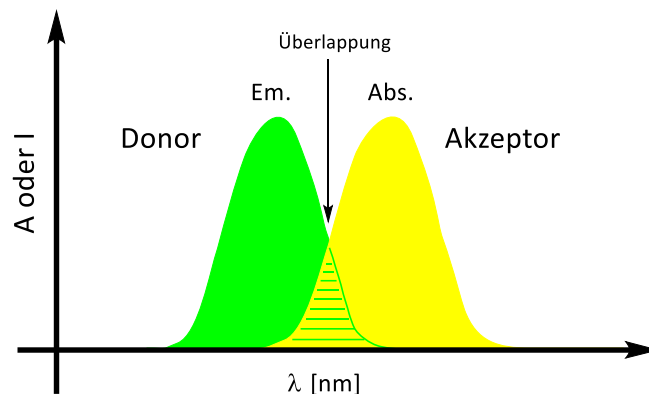


Abbildung 12: Spektrales Überlappungsintegral $J(\lambda)$: Überlappung der Donoremission mit Akzeptorabsorption als schraffierte Fläche dargestellt.

Anhand der Energietransferrate k_{ET} im Verhältnis zur Donoranregung kann die FRET-Effizienz bestimmt werden. Die Transferrate k_{ET} ist allen voran vom Abstand r der FRET-Paare abhängig und nimmt mit der sechsten Potenz des Abstandes ab (Formel 3). Der Abstand (r) zwischen Donor- und Akzeptormolekül liegt dabei in der Regel bei 1 bis 10 nm (10 bis 100 Å). Weiterhin wird k_{ET} von der Strahlungsemissionsrate k_D des Donors und dem Försterradius R_0 bestimmt. R_0 definiert hierbei den Abstand, bei dem eine 50 %ige Energieübertragung stattfindet.

$$k_{ET} = k_D \frac{R_0^6}{r^6}$$

Formel 3: Energietransfargeschwindigkeit des Förster-Resonanzenergietransfers.

Zusammengefasst führen ein geringer Abstand, eine große Spektren-Überlappung und eine möglichst parallele elektronische Schwingungsebene der FRET-Paare zu der größten Effizienz. Verläuft der Energietransfer jedoch über Triplett-Zustände, so ist der Prozess nicht mehr über den FRET-Mechanismus erklärbar.

Der *Dexter*-Energietransfer kann genau diese Lücke schließen.^[60] Die Übertragung der Energie erfolgt beim *Dexter*-EnT über einen konzertierten Zwei-Elektronen-Austausch, welcher über einen Triplett-Triplett- aber auch über einen Singulett-Singulett-Transfer ablaufen kann (Abb.13).

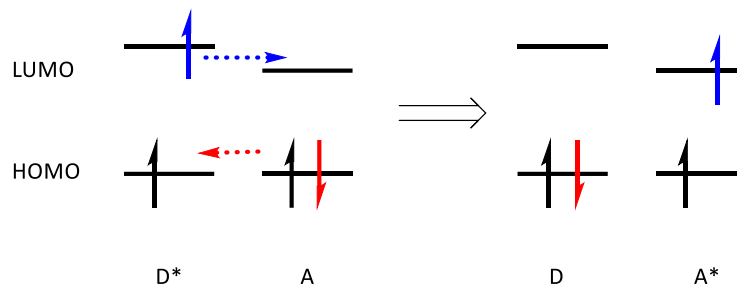


Abbildung 13: Photosensibilisierung nach *Dexter*-Energietransfer: Triplett-Triplett-Transfer.

Dabei überträgt der Donor ein Elektron aus dem energetisch angeregten Zustand auf den Akzeptor. Dieser wiederum überträgt gleichzeitig ein Elektron aus einem energetisch niedrigeren Zustand zurück auf den Donor. Dieses Elektron besitzt einen antiparallelen Spin zum Elektron des Donors, so dass der Sensibilisator in den Grundzustand S_0 übergeht. Der Akzeptor hingegen erlangt, je nach Ausgangszustand des Donors, den Triplett-Zustand T_1 oder Singulett-Zustand S_1 . Die Voraussetzung für diesen EnT ist eine Orbital-Überlappung, also räumliche Nähe, von Donor und Akzeptor, wodurch der Mechanismus vor allem bei kürzeren Abständen (r) zwischen den EnT-Paaren stattfindet (Formel 4).^[60] In der Regel tritt der Mechanismus innerhalb von 1 nm (10 \AA) auf und wird daher als Kurzstrecken-Energieübertragung bezeichnet.

$$k_{ET} = J \exp\left(\frac{-2r}{L}\right)$$

Formel 4: Energietransferrate des *Dexter*-Energietransfers.

Die Energietransferrate k_{ET} kann, wie oben beschrieben, bestimmt werden. Sie ist proportional zum spektralen Überlappungsintegral J und nimmt exponentiell mit dem Abstand r ab. Die Summe der Van-der-Waals-Radien von Donor und Akzeptor ist als L definiert.

Je nach Anwendung kann die Art des Energietransfer-Mechanismus durch die Wahl des Photosensibilisators und den Belichtungs- bzw. Reaktionsbedingungen bestimmt oder gelenkt werden.

Der wohl bekannteste organische Photosensibilisator ist Benzophenon (Abb.14). Aufgrund seiner Eigenschaften ist eine breite Anwendung der Derivate in unterschiedlichen Bereichen möglich.^[20] Der Triplett-Zustand von Benzophenon ist mit einer Verweildauer von $\tau = 6$ ms (bei $T = 77$ K) sehr langlebig und die Triplett-Energie mit $E_T = 290$ KJ/mol vergleichsweise hoch. Hinzu kommt eine hohe ISC-Ausbeute von nahezu 100 % und einem Absorptionsspektrum im nahen UV-Bereich.^[61-64] Diese Eigenschaften machen Benzophenon zu einem hervorragenden Triplet-Sensibilisator. Daher wurden unterschiedliche Benzophenon-Derivate im Arbeitskreis *Wagenknecht* zur Untersuchung der photoinduzierten CPD-Bildung durch einen Triplett-Triplett-Energietransfer (TTET) verwendet.^[21]

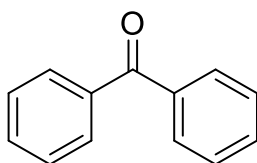


Abbildung 14: Struktur des Photosensibilisators Benzophenon.

2.1.5 Xanthon

Xanthere sind heterocyclische aromatische Oxaverbindungen und gehören zu den Ketonen und Ethern. Sie besitzen eine große Anzahl von natürlichen Derivaten, die von höheren Pflanzen, Flechten und Pilzen gebildet werden. Neben dem Vorkommen als freie Moleküle, sind sie auch oftmals als glykosidische Verbindungen anzutreffen.^[65] Natürlich vorkommenden Derivaten, wie Gentisin, Bellidifolin, Isogentisin, Mangiferin oder Mangostin (Abb.15), werden eine Reihe von Wirkungen auf den Organismus zugesprochen. So können sie antioxidative, antibakterielle und entzündungshemmende Eigenschaften vorweisen. In einer Studie von *Shan et al.* konnten natürliche Xanthon-Derivate ebenso als chemopräventive Wirkstoffe eingesetzt werden.^[66,67]

Aber auch in der chemischen Industrie haben Xanthere einen großen Stellenwert. So kann Xanthon durch Reduktion zu Xanthen synthetisiert werden, welches den Grundkörper der Xanthen-Farbstoffe Rhodamin, Fluorescein und der Eosine darstellt.

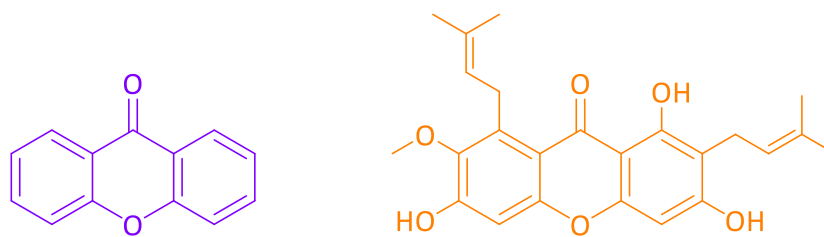


Abbildung 15: Strukturen von Xanthon (links) und dem Pflanzenfarbstoff Mangostin (rechts).

Neben den zuvor genannten Eigenschaften und Anwendungen kann Xanthon ebenso als Photosensibilisator verwendet werden. Im Gegensatz zum Benzophenon besitzt Xanthon eine fast planare Struktur^[68] und weist deutliche photophysikalische Unterschiede zu anderen aromatischen Ketonen auf. So konnte *Huber et al.* aufzeigen, dass der niedrigste Triplett-Zustand eine starke Abhängigkeit von der Temperatur und der Polarität des Lösungsmittels besitzt.^[69] Die Phosphoreszenz verläuft in n-Hexan bei 4,2 K über einen $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang, während ein $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 77 K zu beobachten ist.^[70] Nach der Anregung des Xanthons verläuft ein sehr schnelles ISC von 1 ps zum Triplett-Zustand. Die Fluoreszenzquantenausbeuten sind daher in den meisten Lösungsmitteln nur sehr gering. In Wasser hingegen ist die Fluoreszenzquantenausbeute 100-mal größer, obwohl das ISC immer noch mit etwa 1 ps abläuft.^[71] Die photochemischen Abläufe von Xanthon sind daher von der Lösungsumgebung abhängig.

Eine besondere Anwendungsmöglichkeit von Xanthon konnte *Bach et al.* in einer Studie zur enantioselektiven Photosensibilisierung von [2+2]-Cycloadditionen aufzeigen (Abb.16). Dabei erfolgte die intramolekulare [2+2]-Cycloaddition von 4-(3'-Butenyloxy)chinolon an einem chiralen Templat, welches auf der Kempschen Trisäure basierte.^[72]

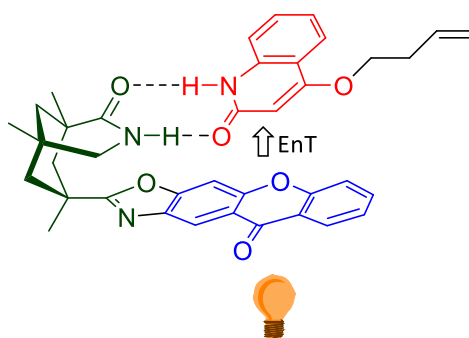


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des templatgebundenen Xanthons.

Die hohe Enantioselektivität des Xanthon-Sensibilisators mit über 90 % ee war hierbei sehr bemerkenswert. Durch die nahezu planare und hydrophobe Ringstruktur des Xanthon konnten Stapelungs-Wechselwirkungen mit dem Ringsystem des benachbarten Substrats erzeugt werden. Dieses wurde durch das Templat in räumlicher Nähe zum Sensibilisator positioniert. Damit wurde durch den definierten Abstand und die festgelegte Orientierung der Triplett-Triplett-Energietransfer begünstigt und ermöglichte somit einen schnelleren Umsatz bei höherer Enantioselektivität.^[72]

2.2 DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (*engl.: desoxyribonucleic acid*, DNA) ist ein Biopolymer, welches aus sogenannten Nukleotidbausteinen aufgebaut ist (Abb.17). Jedes dieser Nukleotide besteht aus einem Phosphatrest und dem Zucker 2-Desoxyribose, die zusammen im Wechsel das DNA-Rückgrat bilden, sowie einer heterozyklischen Base. Die vier Nukleinbasen der DNA sind Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T), wobei eine Basenpaarung von A-T und G-C über Wasserstoffbrücken gebildet wird.^[73]

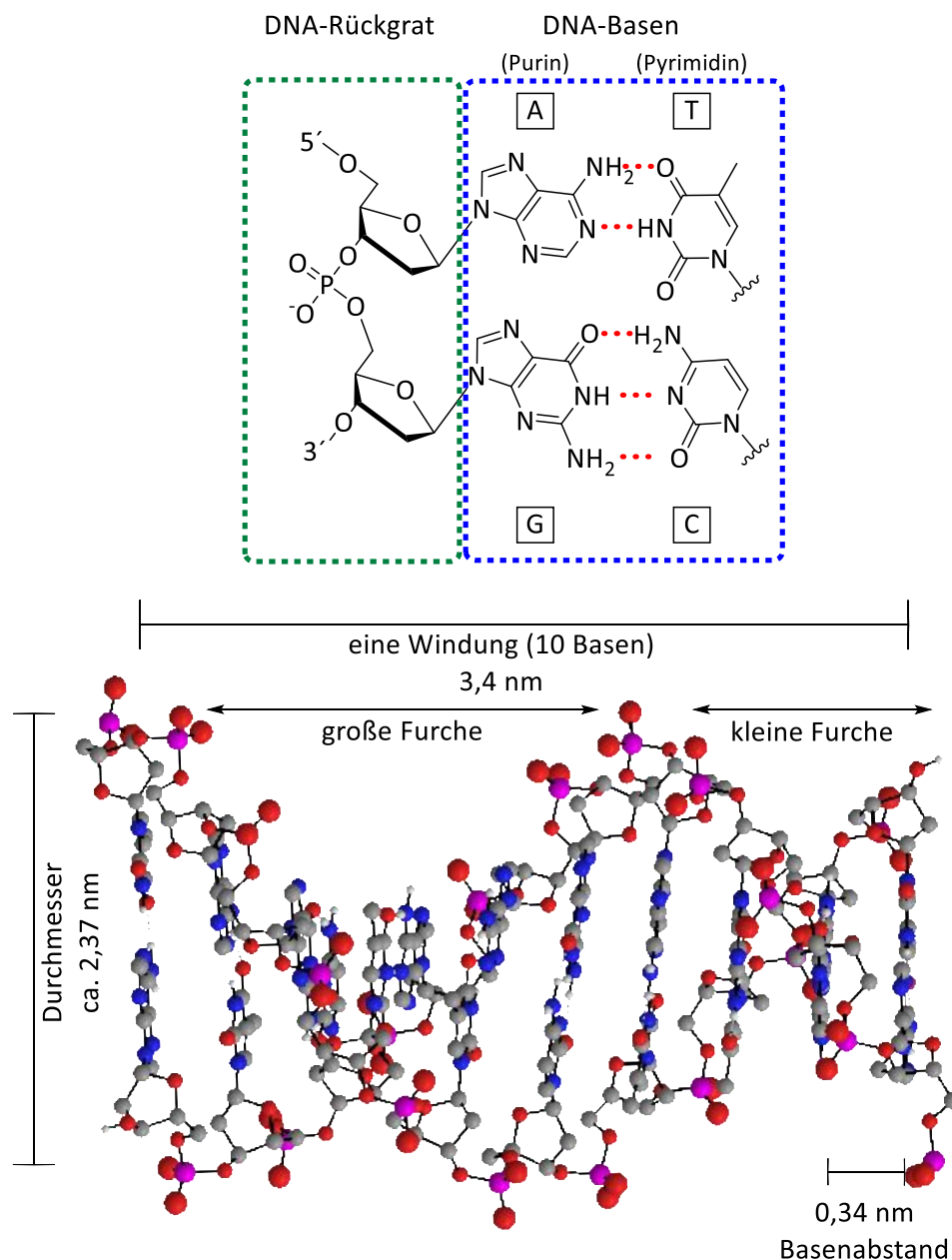


Abbildung 17: Schematische Darstellung DNA-Basenpaarung (oben) und Übersicht einer 10 Basen langen DNA-Helix (unten)

Obwohl die DNA, durch die Basenabfolge, die Erbinformation aller Lebewesen in sich trägt, ist sie einer ständigen Schädigung und Veränderung ausgesetzt. DNA-Schäden umfassen die Modifikation der chemischen Struktur der DNA. Ursachen hierfür sind vor allem UV- und ionisierende Strahlung, Chemikalien, ROS, Wasser und Fehler der DNA-Polymerase. Jedoch können verschiedene Reparaturmechanismen spezifische Schäden erkennen und beseitigen, bevor es zu schwerwiegenden Folgen einer Mutation kommt.^[74-76]

2.2.1 Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere

Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) entstehen durch photochemische [2+2]-Cycloadditionen von benachbarten Pyrimidinen aus allen denkbaren Kombinationen außer C-C und stellen eine der häufigsten Ursachen bei der Hautkrebsentstehung dar. Aufgrund der Änderung der dreidimensionalen DNA-Struktur ist die Replikation und Transkription beeinträchtigt.^[77] Die Entstehung von CPD wird durch UV-Absorption von konjugierten π -Systemen der DNA-Basen initiiert. Während die UV-B-Strahlung von allen DNA-Basen absorbiert wird, kann UV-A-Strahlung aufgrund der geringen Energie nur teilweise von doppelsträngiger DNA mit großen Thymidin-Abschnitten absorbiert werden (Abb18).^[78] Neben der direkten Anregung der Pyrimidine können ebenfalls benachbarte Basen oder Photosensibilisatoren die absorbierte Energie innerhalb der DNA über die π -Systeme übertragen.

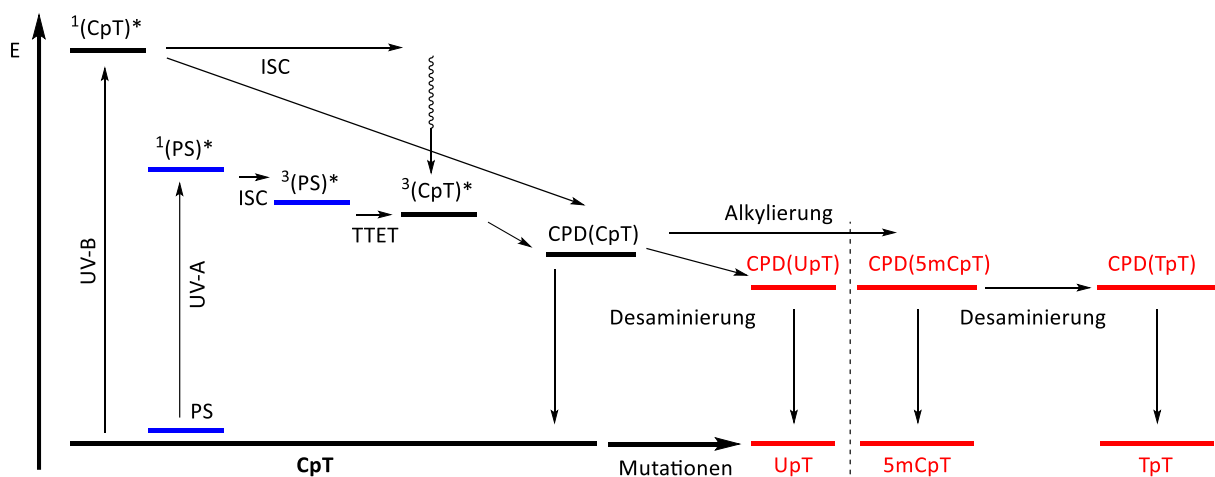


Abbildung 18: Photoinduzierte CPD-Bildung anhand direkter und indirekter Bestrahlung von CpT und anschließender Mutationsmöglichkeiten.

Die Reaktivität der Pyrimidine zeichnet sich durch die Reaktivität der C-C-Doppelbindung aus. Bei Thymidinen (T) wird die Dimerisierung durch Konjugation dieser Doppelbindung mit einer

Carbonylgruppe besonders begünstigt (Abb.19).^[79] Die CPD-Bildung findet mit abnehmender Wahrscheinlichkeit von zwei Thyminen, 5'-Thymin mit 3'-Cytidin, 5'-Cytidin mit 3'-Thymin und zwei Cytidinen statt.^[80,81] Aufgrund der Konformation der DNA-Basen bildet sich die *cis-syn*-Form in großem Überschuss zu den *trans-syn*-Diastereomeren aus. Dieser Effekt ist auch als Templateffekt bekannt.^[79]

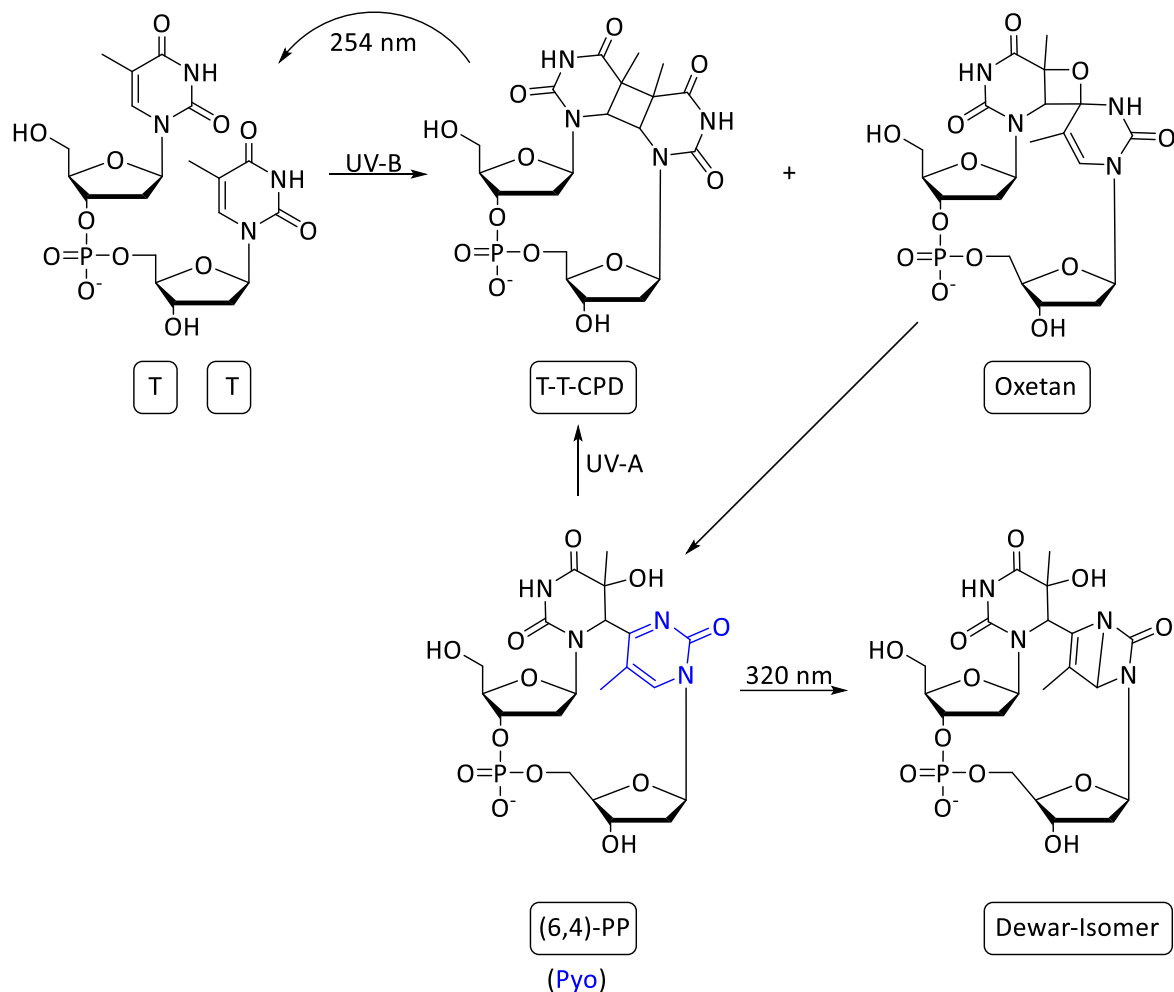


Abbildung 19: UV-induzierte DNA-Photoschäden.

Bei einer Absorption von UV-B-Strahlung kann neben den CPDs auch ein Oxetan gemäß der *Paterno-Büchi*-Reaktion entstehen.^[82] Die Paterno-Büchi-Reaktion wird bei gezielter Anregung der Carbonylgruppe mit elektromagnetischer Strahlung im Wellenlängenbereich von ca. 270 bis 300 nm begünstigt. Das gebildete instabile Oxetan lagert sich spontan unter Rückgewinnung der Aromatizität des Pyrimidins zu einem (6-4)-Photoprodukt ((6-4)-PP) um. Ausgehend von diesem (6-4)-PP können zwei weitere Reaktionen stattfinden. Einerseits

besitzt das gebildete 4-Methylpyrimidon (Pyo) des (6-4)-PP eine photosensibilisierende Wirkung, wodurch es nach Bestrahlung mit UV-A über einen TTET zum CPD reagiert. Andererseits erfolgt die Ausbildung vom Dewar-Isomeren über eine 4π -Elektrocyclisierung bei einer Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 320 nm.^[83-85] CPD können durch photochemische Reversion aufgrund der Absorption bei 254 nm wieder in beide Pyrimidine gespalten werden. Die CPD-Schäden und die (6-4)-Schäden sind die häufigsten DNA-Photoschäden.^[86,87] Die Basenpaarstapelung (π -Stapelung) innerhalb der DNA-Doppelhelix liefert hierbei ein effektives System zur Energie- und Elektronenübertragung, sodass durch UV-Absorption DNA-Schäden entstehen können.^[88,89]

2.2.2 DNA-Addukte

DNA-Addukte werden durch kovalente Bindungen von Molekülen an die Nukleotide (Abb.20) im Beisein verschiedener Mutagene ausgebildet. Sie führen zu Basensubstitutionen, Deletionen und Leserasterverschiebungen während der Replikation.^[90,91] Die wichtigsten Reaktionen sind hierbei Alkylierungen, Arylalkylierungen, Arylaminierungen und Oxidationen.^[92] Je nach Reaktion und Base können entsprechend unterschiedliche Positionen betroffen sein.

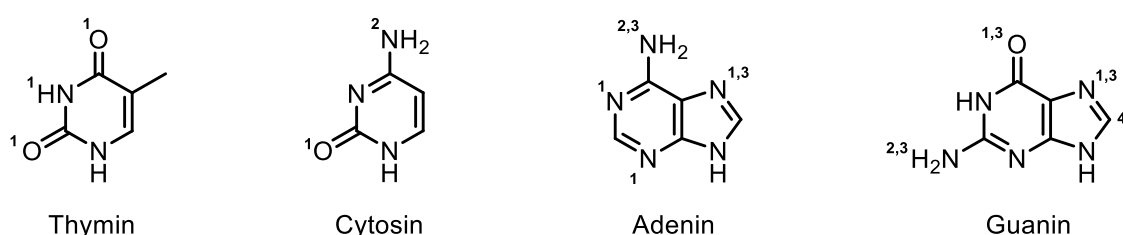


Abbildung 20: Betroffene Positionen durch Alkylierung {1}, Arylalkylierung {2}, Arylaminierung {3} und Oxidation {4}.^[92]

Adduktbildende Mutagene können in exo- und endogene Mutagene unterschieden werden. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie Benzo[*a*]pyren, aromatische Stickstoffverbindungen, wie Anilin, und Alkylanzien, sowie Dimethylsulfat bilden die wichtigsten exogenen Kanzerogene ab.

Endogene DNA-Addukte hingegen entstehen durch Oxidation und Fettsäureoxidation. Hierfür sind beispielsweise die ROS verantwortlich. Diese können sowohl einen endo- als auch einen exogenen Ursprung haben, da sie exogen vermittelt durch Photosensibilisatoren und endogen im Rahmen der Atmungskette in den Mitochondrien entstehen.^[92] Hierbei wurden zwei Haupttypen von Signalwegen für die sauerstoffabhängige DNA-Photoschädigung entschlüsselt. Typ I beschreibt einen photoinduzierten Elektronentransfer zwischen DNA-Basen und einem Cofaktor-Chromophor, bei dem das Radikalkation G als Zwischenprodukt entsteht. Guanin ist die Base mit dem niedrigsten Oxidationspotential und wird daher bevorzugt oxidiert (Abb.21).^[93]

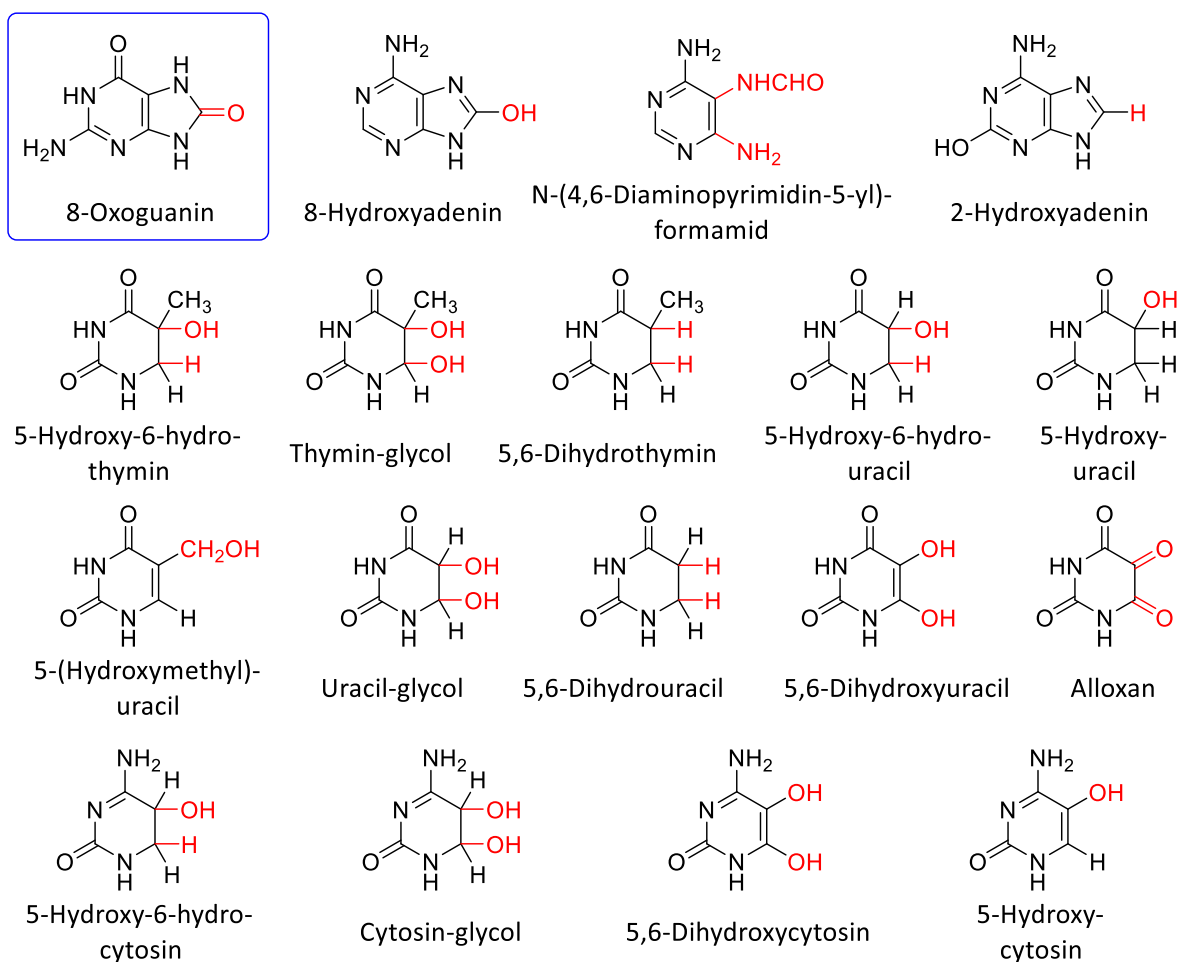


Abbildung 21: Oxidationsprodukte der DNA-Basen durch ROS.

DNA-Photoschäden von Typ II werden durch Singulett-Sauerstoff, der aus zellulärem Triplett-Sauerstoff unter Absorption von UV-Strahlung entsteht, und die anschließend gebildeten ROS verursacht. Somit ist auch UV-A-Licht eine Quelle für oxidativen Stress für biologische Zellen. Oxidativ erzeugte DNA-Schäden sind beispielsweise 8-Oxoguanin (8-Oxo-2'-desoxyguanosin), welches durch eine [4+2]-Cycloaddition zwischen

Guanin und Singulett-Sauerstoff gebildet wird, oder ROS induzierte Strangbrüche. Durch die Bildung von 8-Oxoguanin kann es zu einer GC-AT-Transversion kommen, da 8-Oxoguanin *Hoogsteen*-Wasserstoffbrückenbindungen auch zu Adenin ausbilden kann. Nach der Replikation trägt die DNA dann an dieser Stelle ein AT-Basenpaar. Dies führt zu einer Mutation des genetischen Codes.^[94]

Die DNA-Verknüpfungen (*engl.: crosslinks*), welche durch kovalente Bindungen zwischen Nukleobasen entstehen, gehören ebenso zu den photoinduzierten DNA-Schäden und stellen eine weitere Klasse von Addukten dar. Diese können vermittelt durch ionisierende Strahlung und Vernetzungsmittel intramolekular innerhalb eines DNA-Einfachstrangs (*intrastrand crosslinks*), sowie intermolekular zwischen den DNA-Doppelsträngen (*interstrand crosslinks*) ausgebildet werden.^[95-97] So können beispielsweise Psoralene an der 5'-AT-Sequenzstelle in die DNA interkalieren und bilden in Gegenwart von UV-A-Strahlung Thymidin-Addukte. Psoralene bilden somit eine Quervernetzung mit der Base Thymin. Hierbei kommt es zu lokalen Verzerrungen der DNA am Ort der Interkalation.^[98]

2.2.3 Interkalatoren

Interkalatoren zeichnen sich durch die Einlagerung zwischen Nukleotiden in der DNA aus. Eine polycyclische aromatische Struktur und die passende Molekülgeometrie begünstigt die Interkalation dieser Mutagene. Aufgrund der konjugierten π -Systeme entstehen Wechselwirkungen mit den konjugierten π -Systemen der DNA-Basen über die Stapelwechselwirkungen. Dadurch folgt eine Replikationsstörung durch eine Rasterverschiebung oder eine komplette Inhibition dieser.^[99,100] Interkalatoren werden unter anderem zum DNA-Nachweis und der Chemotherapie zur Replikationsinhibition verwendet. Beispiele hierfür sind DAPI und SYBR-Green.^[101-103]

2.2.4 Methylierung von Cytosin

Eine besondere Stellung unter den DNA-Schäden nimmt die Methylierung von Cytosin ein. Die Methylierung erfolgt durch die Addition einer Methylgruppe an die DNA-Base durch entsprechende Enzyme (DNA-Methyltransferasen). Sie kann anschließend eine spontane Desaminierung fördern (Abb.18). Als Folge dieser Reaktion entsteht aus 5'-Methylcytosin

unter Abspaltung von Ammoniak das Thymin. Wird die Methylierung von den Reparaturmechanismen nicht erkannt und behoben, erfolgt eine Mutation, da aus einem C-G-Paar ein A-T-Paar wird. Ebenso verbessert die Methylierung die Bindung von Karzinogenen und erhöht die UV-Absorption der DNA. Daher nimmt 5'-Methylcytosin eine wesentliche Rolle bei UV-induzierten Mutationen ein (Abb22).^[104,105] Wenn Hautzellen durch natürliches Sonnenlicht bestrahlt werden, so ist die CPD-Bildung aufgrund der Anwesenheit von 5-Methylcytosin bis zu 15-fach erhöht.^[106] Diese kommen vor allem in CpG-Dinukleotiden vor, die Mutationen in krebsrelevanten Genen auslösen.^[104]

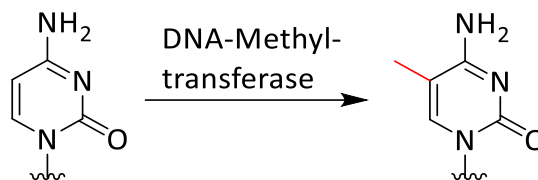


Abbildung 22: Methylierung von Cytosin durch Methyltransferase.

Die Methylierung von Cytosin an der 5'-Position ist eine häufige epigenetische Modifikation in der DNA von Säugetieren. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression. Oxidierte Derivate von 5-Methylcytosin können nicht nur Zwischenprodukte in einem aktiven Demethylierungsweg sein, sondern auch als epigenetische Modifikationen agieren. Epigenetische Modifikationen spielen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Entwicklung und Alterung, als auch bei Krankheiten, einschließlich Krebs.^[104-106] Da Methylierungen im Alter zunehmen und einen großen Einfluss auf die CPD-Bildungen haben, ist eine Relation von erhöhtem Hautkrebsrisiko mit zunehmendem Alter plausibel.

2.2.5 Reparatur von CPD-Schäden

In Anbetracht von ansteigender UV-Belastung durch die Veränderung der Ozonschicht nehmen die Schäden durch UV-Exposition in Lebewesen zu.^[107] Die dabei generierten CPD-Schäden und (6-4)-PP erzeugen Mutationen, die eine DNA-Replikation und -Transkription erheblich stören oder zur Entartung der Zellen führen.^[108] Somit werden Tumorsuppressorgene deaktiviert und wachstumsfördernde Signalwege aktiviert, wodurch

eine normale Zellzyklusprogression gestört ist. Diese Abfolge bildet die primäre Ursache der (Photo-) Karzinogenese und trägt dementsprechend zur Entwicklung von Hautkrebs bei.^[105]

Neben der UV-Strahlung ist die menschliche Zelle täglichen Umwelteinflüssen wie toxischen Chemikalien und anderen Mutagenen ausgesetzt. Dies führt zu DNA-Schädigungen zwischen 10^4 - und 10^6 -mal pro Zelle und pro Tag.^[109] Daher wurden verschiedene Reparaturmechanismen im Körper entwickelt, welche die DNA-Veränderungen beheben. Dies verläuft hierbei im Zuge der DNA-Replikation, damit die Proteinsynthese gesichert ist.^[110]

Die entstehenden CPD-Schäden sind zunächst nicht mutagen. Sie blockieren allerdings teilweise oder vollständig die Polymerasen, welche für die Replikation und Transkription zuständig sind.^[111] Die Modifikationen, die strukturelle Veränderungen der Doppelhelix hervorrufen, werden durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entfernt. Die Schäden müssen direkt zu Beginn der Synthese-Phase repariert werden, um einen Replikationsstopp zu verhindern. Nach der Schadenserkennung wird ein Strangbruch verursacht und die NER schneidet die betroffene Sequenz heraus. Der unbeschädigte DNA-Abschnitt bleibt dabei erhalten und dient als Vorlage für einen kurzen komplementären Strang für die DNA-Polymerase. Dieser neue Strang wird eingefügt und durch eine Ligase geschlossen.^[109,112]

Eine weitere Reparaturmöglichkeit von UV-induzierten DNA-Schäden bilden die Photolyasen. Diese Enzyme binden an ihrem aktiven Zentrum, je nach DNA-Schaden, an CPD oder an (6-4)-Photoprodukte. Sie besitzen einen Flavin-Adenin-Dinukleotid als Cofaktor (FAD) und ein zweites Coenzym in der Nähe der Oberfläche als Photorezeptor. Nachdem eine Bindung am Schaden erfolgt ist, beugt die Photolyase die DNA-Helix um 36° .^[113] Das durch Sonnenlichteinstrahlung angeregte Flavin überträgt ein energiereiches Elektron auf den DNA-Schaden, wodurch das Dimer in die entsprechenden Monomere gespalten und das Elektron wieder zurück auf das Flavin übertragen wird. Dieses kehrt entsprechend wieder in den Grundzustand zurück. Im Gegensatz zu anderen Reparatur-Mechanismen findet diese Reparatur ohne Schneiden der DNA statt. Allerdings sind Photolyasen nur in Bakterien, Pflanzen und Tieren enthalten, jedoch nicht im Menschen.^[112,114]

3 Hauptteil

3.1 Wahl des Sensibilisators

Für eine chemische Reaktion innerhalb der DNA, die durch einen photoinduzierten Energietransfer gestartet wird, sind unterschiedliche Kriterien sowie die Wahl eines geeigneten Sensibilisators unerlässlich. Hierbei ist vor allem die selektive Anregung des Photosensibilisators entscheidend, um die direkte Anregung der DNA-Nukleotide zu unterbinden. Da das Absorptionsmaximum von DNA bei 260 nm liegt und eine Absorbanz bis zu 310 nm zu erkennen ist, eignen sich Sensibilisatoren mit einer Absorbanz über 310 nm (UV-A-Strahlung) für den photoinduzierten Energietransfer (Abb23).^[115]

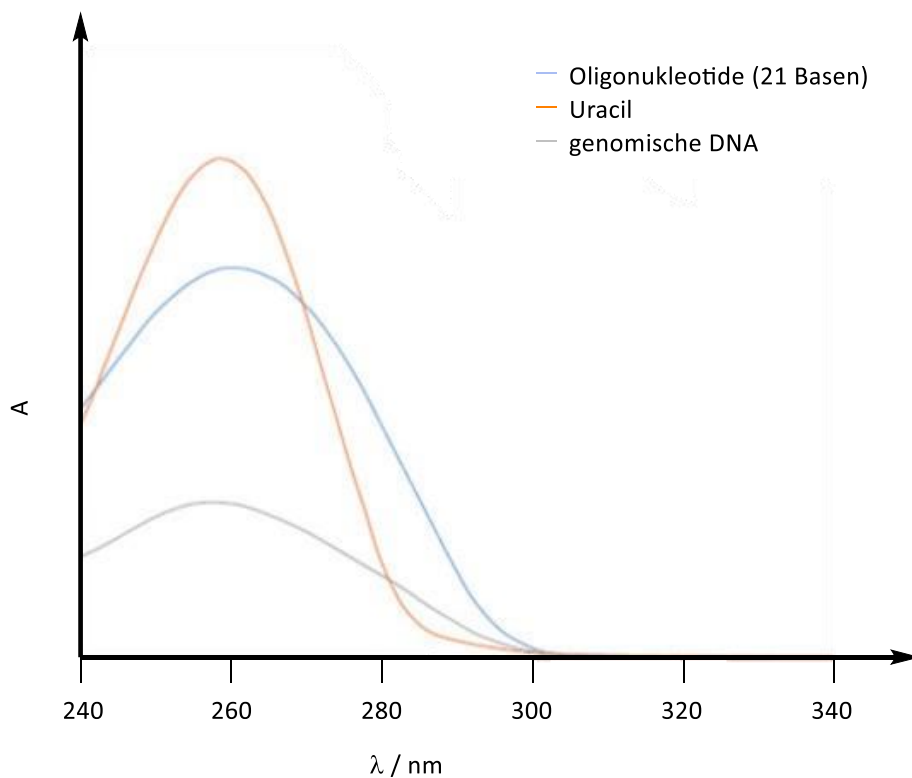


Abbildung 23: UV-/VIS-Absorptionsspektren von Oligonukleotiden, Uracil und genomische DNA. Abgeändert nach [115]

Die aufgenommene Energie bei der Absorption von UV-A-Strahlung resultiert je nach Sensibilisator dann in einem angeregten Singulett Zustand ($n\pi^*$) oder nach einem ISC in einem Triplett Zustand ($\pi\pi^*$). Diese Energieniveaus müssen entsprechend höher sein als die der Substrate, um eine bestmögliche Energieübertragung zu gewährleisten. Neben den energetischen Bedingungen sind auch weitere Sensibilisatoreigenschaften von Vorteil für

einen guten Energietransfer. So ist eine gute Wasserlöslichkeit für die biologische Anwendung und die Planarität des Sensibilisators für eine bessere Inkorporation in die DNA zu nennen. Bereits zuvor konnte *Wagenknecht et al.* durch Acetophenon- und Benzophenonderivate als artifizielle Basen die distanzabhängige **T<>T**-Bildung durch photoinduzierten Energietransfer nachweisen.^[21]

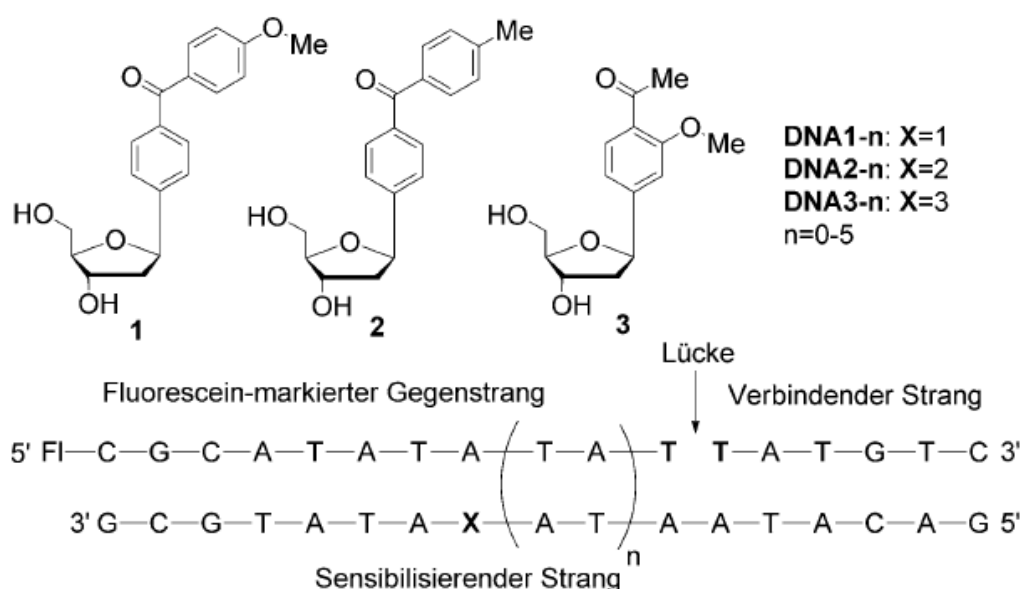


Abbildung 24: Photosensibilisatoren BpOMe, BpMe und ApOMe als C-Nukleoside 1-3 in DNA_n (n=0-5) und Fluorescein (FI).^[21]

Hierbei konnten T-T-Dimere in einem Abstand von bis zu 30Å (n=4) induziert werden. Dabei deuteten die exponentiellen Distanzabhängigkeiten ($\beta=0,13$, $0,34$ und $0,17$) auf einen Dexter-TTET-Mechanismus hin, wobei sich Ausbeuten und Reaktionsgeschwindigkeiten je nach Sensibilisator stark unterschieden. Somit erlaubte diese Studie die erstmalige Aufklärung der distanzabhängigen T-T-Dimerbildung. Aufgrund der vergleichsweise geringen Ausbeuten, sowie die entstehenden Interstrand Crosslinks (ICL) und die rasche Zersetzung des Fluoreszenzmarkers Fluorescein, sind weitere Untersuchungen und Optimierungen für ein besseres Verständnis notwendig. So hat die nicht planare, verdrehte Struktur der verwendeten Sensibilisatoren einen negativen Einfluss auf die Inkorporation in die DNA.^[116] Weiterhin sind Benzophenon und Acetophenon auch als Photoinitiatoren in UV-Härtungs-Anwendungen bekannt, wodurch auch andere Reaktionsmechanismen in der DNA denkbar wären.

Um diese Nachteile und Ungewissheiten möglichst zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit 3-Methoxyxanthon als Sensibilisator verwendet. Die weniger verdrehte Struktur und der hohe energetische Zustand von S_1 mit 332 kJ/mol waren ausschlaggebend für die Wahl.^[28] Jedoch wird in der Literatur photochemisch nur über die Singulett Anregung berichtet und nicht über die Triplett Photochemie des Moleküls, sodass von einem Singulett Sensibilisator ausgegangen werden kann.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden auch Xanthon und Thioxanthon, welche als Triplett Sensibilisatoren bekannt sind, synthetisiert und in Zusammenarbeit mit *Wagenknecht et al.* auf photoinduzierten Energietransfer in der DNA untersucht.

3.2 Synthese

3.2.1 Syntheseziel

Das synthetische Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung des β -C-Nukleosids 3-Methoxyxanthon (**1a**) und im weiteren Verlauf der Arbeit die Nukleoside von Xanthon (**1b**) und Thioxanthon (**1c**), welche als artifizielle Basen in der DNA gebunden und als interne Sensibilisatoren in der DNA bestrahlt wurden (Abb.25). Auf der Grundlage eines, im Arbeitskreis *Wagenknecht* erprobten Synthesewegs für C-Nukleoside sollte die Verbindungen hergestellt werden. Durch die Optimierung der Syntheseroute für Xanthon-Derivate sollte eine bessere Zugänglichkeit ermöglicht werden. Für den weiteren Reaktionsverlauf sollten 2-Desoxyribose und der entsprechende Photosensibilisator funktionalisiert werden, sodass diese in einer palladiumkatalysierten Heck-Reaktion gekuppelt werden konnten. Die Xanthe und ihre C-Nukleoside sublimieren im Vakuum, was nicht nur die Aufarbeitung und Reinigung erschwerte, sondern auch die Ausbeuten verringerte. Nach der DMTr-Schützung der 5'-OH-Gruppe sollte anschließend die Synthese der Phosphoramidite und die Herstellung der unterschiedlichen Oligonukleotid-Sequenzen mittels DNA-Festphasensynthese erfolgen.

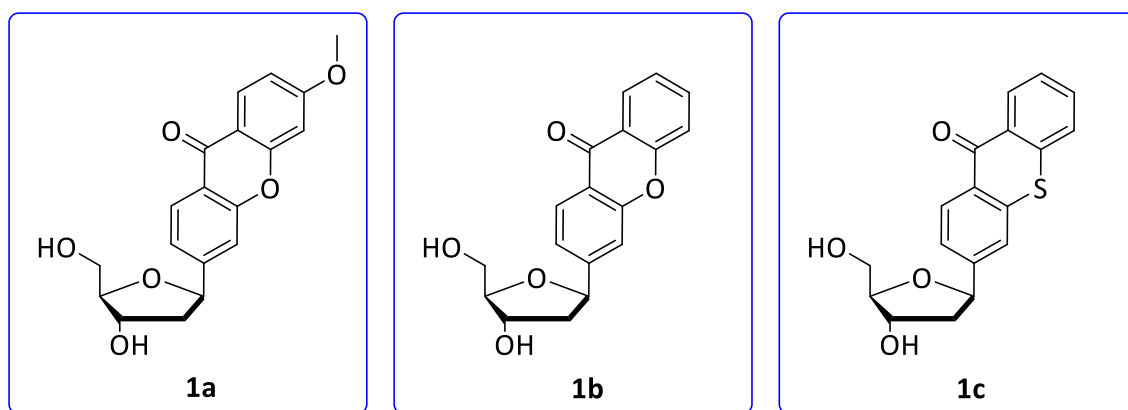


Abbildung 25: β -C-Nukleosid der Photosensibilisatoren Methoxyxanthon (**1a**), Xanthon (**1b**) und Thioxanthon (**1c**)

3.2.2 Glykal

Zunächst wurde das für die Heck-Reaktion benötigte Glykal hergestellt. Hierfür musste die 2-Desoxyribose anhand der Synthesevorschrift von *Hammer et al.* und *Engels et al.* in zwei Schritten funktionalisiert werden (Abb.26).^[117] Als Ausgangsmolekül wurde das kommerziell erhältliche 2'-Desoxythymidin im ersten Schritt durch Umsetzung mit TBDMS-Cl und Imidazol an der 3'- und 5'-Position geschützt. Diese Reaktion ergab Produkt **2** in quantitativer Ausbeute. Hierbei war die hohe Reinheit des TBDMS-Cl entscheidend. Anschließend wurde das Thymin als Abgangsgruppe, durch Silylierung mit Hexamethyldisilazan und Ammoniumsulfat eliminiert und das Glykal in einer Ausbeute von 66 % erhalten.

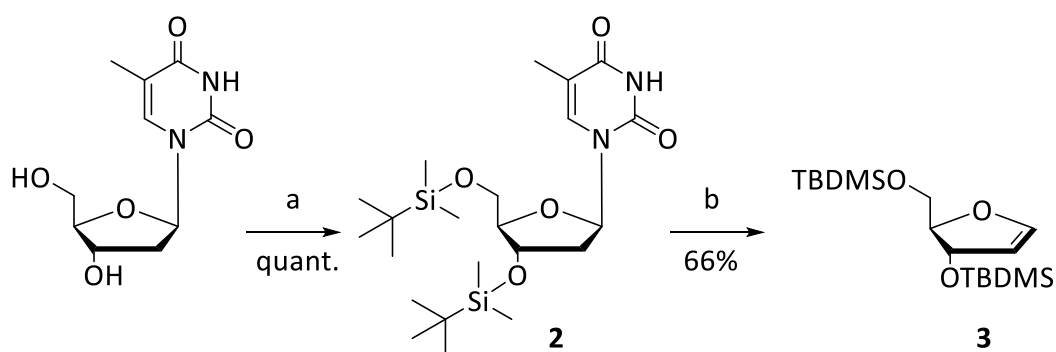


Abbildung 26: Glykalsynthese: a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT., 16 h, quant.; b) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 130 °C, 3 h, 66 %.

3.2.3 Aglycone

Um die Sensibilisatoren **6a-6c** in Nukleoside überführen zu können, wurden die entsprechenden Bromderivate synthetisiert (Abb.27-28), die für die Heck-Reaktion notwendig waren. Im Unterschied zu der einstufigen Benzophenon Synthese verläuft die Synthese bei Xanthonen dreistufig und von Thioxanthonen zweistufig. Im ersten Schritt der Xanthonsynthese wurden die Phenolderivate mit dem Carbonsäurehalogenid in einer Einhorn-Acylierung, einer Schotten-Baumann-Methode, in Anwesenheit von Triethylamin zu den entsprechenden Estern **4a** und **4b** umgesetzt. Daraufhin erfolgte im zweiten Schritt eine Fries-Umlagerung unter Nutzung der Lewis-Säure Aluminiumchlorid zu den jeweiligen Hydroxyarylketone **5a** und **5b**. Da für die letzte Stufe der Xanthonsynthese die Orthoprodukte **5a** und **5b** benötigt wurden, erfolgte die Fries-Umlagerung bei 130 °C. Im Verlauf der Syntheseoptimierung wurden ebenso Reaktionsversuche der Phenole mit Carbonsäurehalogeniden unter Bedingungen der Friedel-Crafts-Acylierung durchgeführt. Bei mindestens stöchiometrischer Verwendung der Lewis-Säure (AlCl_3) und kurzen

Reaktionszeiten entstanden die entsprechenden Phenylester und nicht die gewünschten Hydroxyarylketone. Wurden die Reaktionszeiten jedoch weiter erhöht, so bildeten sich ebenso die gewünschten Produkte **6a** und **6b**. Da die Ausbeuten im Vergleich hierbei geringer ausfielen, wurde diese Synthesevariante verworfen und die dreistufige Synthese bevorzugt. Im letzten Schritt erfolgte schließlich eine katalysatorfreie intramolekulare nukleophile aromatische Substitution nach dem Additions-Eliminierungs-Mechanismus unter Ausbildung der Diarylether bzw. der Xanthonderivate **6a** und **6b**.

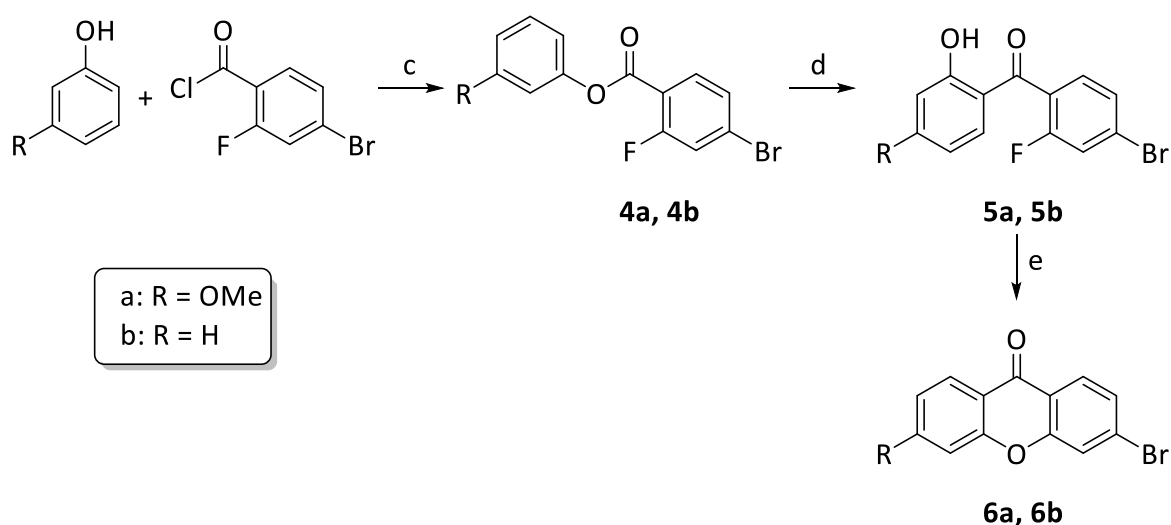


Abbildung 27: Aglyconsynthese von **6a** und **6b**: Bedingungen und Ausbeuten sind in **Tabelle 1** abgebildet.

Tabelle 1: Übersicht der Reaktionsparameter und Ausbeuten der Synthese von **6a** und **6b**.

Syntheseschritt	Produkt	R	Säure/Base	Lösungs- mittel	T	t	Ausbeu- te
c	4a	OMe	Et ₃ N	DCM	40 °C	1 h	97 %
	4b	H	Et ₃ N	DCM	40 °C	1 h	93 %
d	5a	OMe	AlCl ₃	Nitrobenzol	130 °C	1 h	77 %
	5b	H	AlCl ₃	Nitrobenzol	130 °C	1 h	70 %
e	6a	OMe	K ₂ CO ₃	DMF	140 °C	15 min	Quant.
	6b	H	K ₂ CO ₃	DMF	140 °C	15 min	Quant.

Zur Synthese des Thioxanthonderivates wurde im ersten Schritt 2,2`-Dithio-dibenzoessäure durch Zugabe von Thionylchlorid bei 80°C zum Säurechlorid und weiterhin durch Zugabe von Sulfurylchlorid bei 50°C zu 2-Chlorothiobenzoylchlorid (CTBC/**7**) umgesetzt (Abb.28).

Anschließend erfolgte unter Bedingungen der Friedel-Crafts-Acylierung die Reaktion von **6c** mit Brombenzol bei Raumtemperatur. Somit konnte 3-Bromthioxanthon **6c** in einer Ausbeute von 70 % erhalten werden.

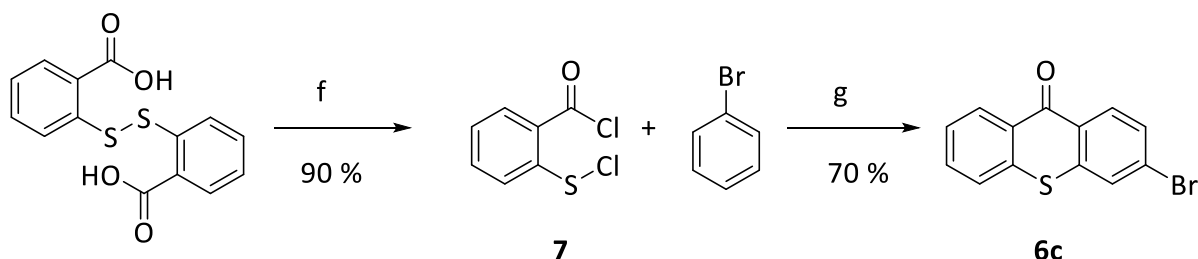


Abbildung 28: Aglyconsynthese von **6c**: f) SOCl_2 , 80 °C, SO_2Cl_2 , 50 °C, NMP, 1 h, 90 %; g) AlCl_3 , DCM, 20 °C, 1 h, 70 %.

Für die nun erforderliche C-C-Knüpfung von Glykal und Aglycon wurde die palladiumkatalysierte *Heck*-Reaktion umgesetzt (Abb29).^[118] Hierbei erfolgt die Kupplung in 5 Schritten. So entsteht zuerst das Organopalladiumreagenz über eine oxidative Addition. In Anwesenheit des Glykals bildet sich dann ein π -Komplex aus der Enoether-Doppelbindung und dem Palladium aus. Anschließend entsteht eine σ -Bindung in der Palladium-Glykal-Spezies durch eine *syn*-Insertion der olefinischen π -Bindung. Durch die darauffolgende β -H-Eliminierung entsteht dann das gewünschte Reaktionsprodukt, wobei der Katalysator schließlich mit Hilfe einer Base wieder regeneriert wird.

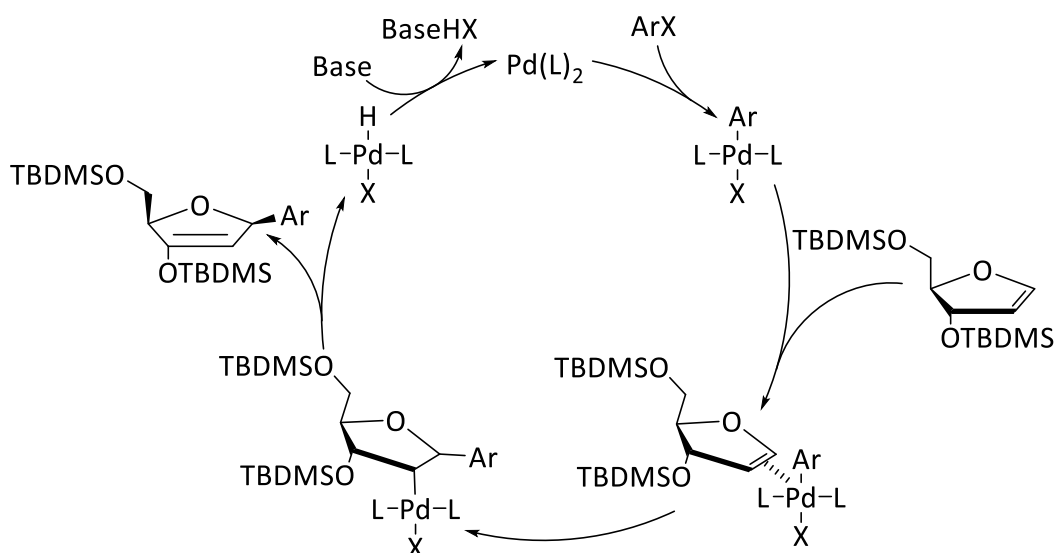


Abbildung 29: C-C-Knüpfung von Glykal und Aglycon nach *Hocek et al.*^[118]

Bei einer mittlerweile großen Vielzahl an möglichen Palladiumkatalysatoren, hat sich vor allem [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen] dichlorpalladium für die Reaktion von Glykal **3** mit den Aglycon **6a-6c** bewährt. Der sterisch gehinderte Ligand führt im Zusammenspiel mit der

großen 3'-TBDMS-Gruppe, die die Unterseite des Glykals abschirmt, zu einer hohen Stereoselektivität zugunsten der β -Anomere, während die Bildung der α -Anomere stark gehemmt wird (Abb.30). Bei der Reaktion kann somit das antibindende Palladium-Aglycon-Komplex-Orbital mit dem HOMO des π -Systems des Enolethers wechselwirken und daher die σ -Bindung zwischen dem 2'-Kohlenstoffatom und dem Palladium-Zentrum bzw. das β -Anomer am 1'-Kohlenstoffatom ausbilden. Dies ist ein enormer Vorteil der C-Nukleosid-Synthese mit Auswirkungen auf die Ausbeuten und der Produktreinheit.

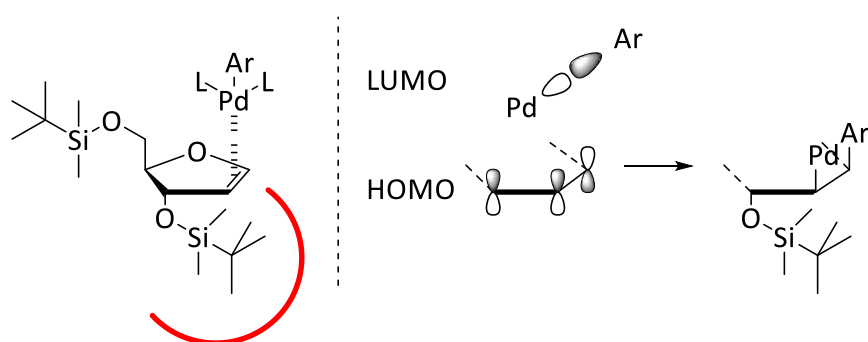


Abbildung 30: Stereoselektivität der *Heck*-Reaktion am TBDMS geschützten Glykal **3** (links) und die Regioselektivität (rechts). [118]

In Vorbereitung auf die *Heck*-Reaktion (Abb.31) wurden zuerst das Glykal **3** und die jeweiligen Aglycone **6a-6c** ins Lösungsmittel Acetonitril gegeben, mit Triethylamin versetzt, über die Freeze-Pump-Thaw-Methode entgast und das Reaktionsgefäß mit Argon geflutet (Abb.31). Dadurch konnte der Katalysator optimal genutzt werden, ohne dabei zersetzt zu werden. Anschließend wurde der Katalysator unter Argon-Atmosphäre dazugegeben und das Reaktionsgemisch bei 75 °C über 48 h unter Rückfluss erhitzt. Die entstandenen Nukleoside **7a-7c** mit den Sensibilisatoren als Basen (**Sens**) wurden als ein Gemisch aus doppelt-, einfachgeschützte und entschützte Varianten erhalten. Statt einer vollständigen Aufreinigung, wäre es daher auch möglich, mit dem Gemisch nach Abtrennung des Katalysators in den weiteren Reaktionsschritten fortzufahren, um die Ausbeuten deutlich zu erhöhen.

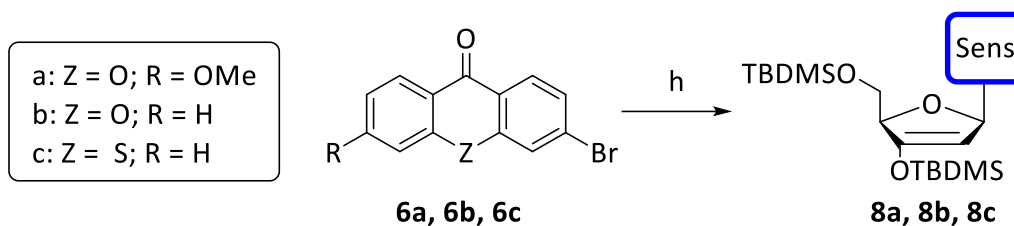


Abbildung 31: Heck-Reaktion Bedingungen: Pd(dppf)Cl₂, Et₃N, MeCN, 75 °C, 48 h. Ausbeuten: **8a** 29 %; **8b** 75% und **8c** 45 %.

Die entstandenen C-Nukleoside **8a-8c** mussten anschließend an den Hydroxygruppen der 3'- und 5'-Positionen von den TBDMS-Schutzgruppen entschützt werden (Abb.32). Hierfür wurde das C-Nukleosid in THF gelöst, Et₃N·3HF bei 0°C zugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Entschützung verlief für jedes C-Nukleosid **9a**, **9b** und **9c** quantitativ unter Ausbildung einer Carbonylfunktion an der 3'-Position.

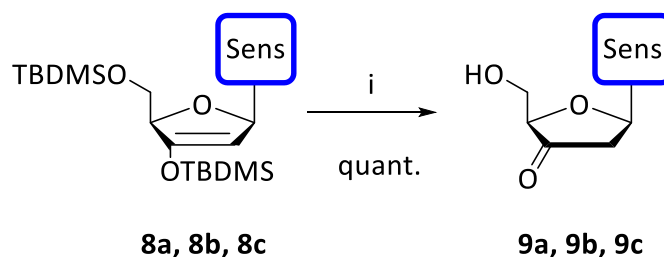


Abbildung 32: Entschützung: Et₃N·3HF, THF, 0-20 °C, 16 h, quant.

Im nächsten Schritt erfolgte die Reduktion der Carbonylfunktion von **9a-9c** durch Natriumacetoxyborhydrid in einem Essigsäure-Acetonitril-Gemisch (1:3).^[118] Die Reduktion der Carbonylfunktion an der 3'-Position verlief auch hier stereospezifisch, da das Boratom an der 5'-Hydroxygruppe koordiniert und das Hydrid daher nur von einer Seite am Carbonylkohlenstoff angreifen kann (Abb.33).^[119] Abschließend wurde mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch (1:1) hydrolysiert, um die C-Nukleoside **1a**, **1b** und **1c** zu erhalten.

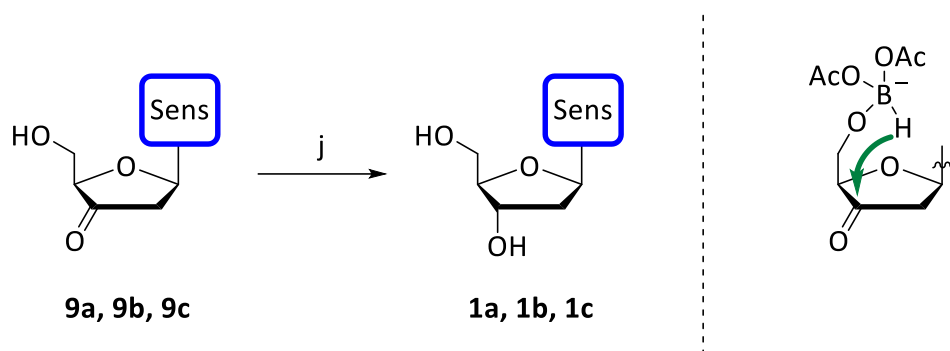


Abbildung 33: Reduktion der Nucleosidvorstufen 9a, 9b und 9c (links): $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, MeCN/AcOH (3:1). Ausbeuten: 1a 61 %, 1b 65 % und 1c 55 %. Stereoselektive Reduktion der Carbonylgruppe (rechts).

Um die artifiziiellen C-Nukleoside **1a**, **1b** und **1c** mit den Xanthon-Sensibilisatoren als Basen in unterschiedliche Oligonukleotide einbauen zu können, mussten diese weiter modifiziert werden. Dementsprechend wurde im nächsten Reaktionsschritt zuerst die 5'-Hydroxygruppe der 2'-Desoxyriboseeinheit durch Dimethoxytrityl geschützt (Abb.34). Dazu wurden die Nukleoside in absolutem Pyridin mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) über Nacht bei Raumtemperatur umgesetzt. Entscheidend hierbei war die äquivalente Menge an DMTr-Cl zum Nukleosid. Obwohl die DMTr-Schutzgruppe mit der 5'-Hydroxygruppe bevorzugt reagiert, kann sie bei einem Überschuss auch an der 3'-Position reagieren.

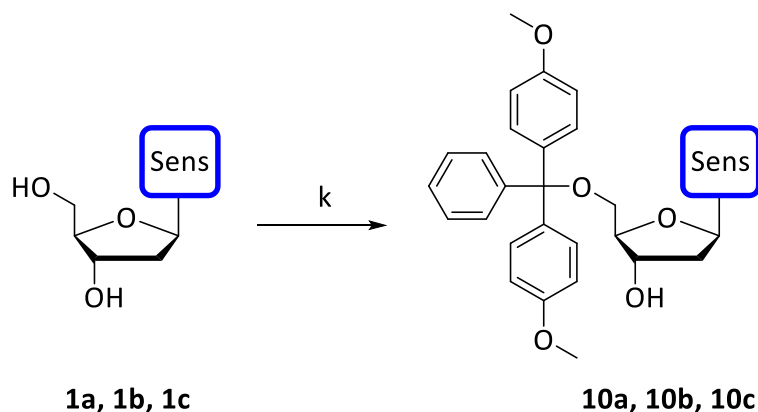


Abbildung 34: DMTr-Schützung: DMTr-Cl, Pyridin, 20 °C 16 h. Ausbeuten: 10a 79 %, 10b 54 % und 10c 77 %.

Die abschließende Reaktion zu den Nukleosid-Phosphoramiditen **11a**, **11b** und **11c** wurde in absolutem DCM mit Diisopropylethylamin und 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit bei Raumtemperatur und Argon-Atmosphäre durchgeführt (Abb.35). Da die Nukleosid-Phosphoramidite **11a**, **11b** und **11c** sehr

reaktiv sind und unter Luft oxidieren und Feuchtigkeit hydrolysieren, mussten diese als trockener Schaum unter Argon-Atmosphäre und bei -35 °C gelagert werden.

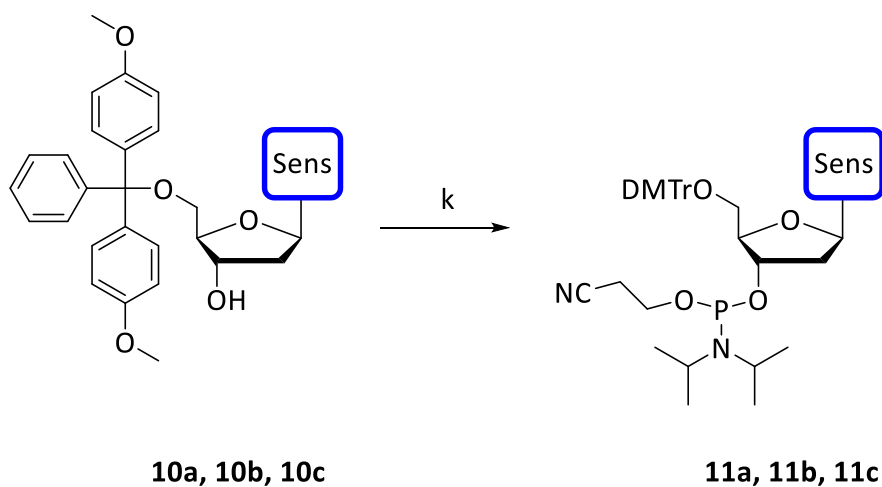


Abbildung 35: Phosphoramiditsynthese: Phosphoramidit-Cl, abs. DCM, 20 °C 4 h. Ausbeuten: 11a 70 %, 11b 75 % und 11c 97 %.

Reaction scheme for the synthesis of fluorescent nucleoside phosphoramidites **11a**, **11b**, and **11c**.

Starting materials: 2-chloro-4-fluorophenyl nucleobase derivative and ribose derivative.

Key steps:

- Reaction of 2-chloro-4-fluorophenyl nucleobase derivative with ribose derivative in the presence of Et_3N , DCM, 40°C , 1 h, yielding **4a, 4b** (93-97%).
- Reaction of **4a, 4b** with AlCl_3 , PhNO_2 , 130°C , 1 h, yielding **5a, 5b** (70-77%).
- Reaction of **5a, 5b** with K_2CO_3 , DMF, 140°C , 15 min, yielding **6a, 6b** (quant.).
- Reaction of **6a, 6b** with Et_3N , MeCN, 75°C , 48 h, yielding **6c** (29-75%).
- Reaction of **6c** with SOCl_2 , SO_2Cl_2 , NMP, 80°C , 1 h, yielding **7** (90%).
- Reaction of **7** with AlCl_3 , DCM, 20°C , 1 h, yielding **8a, 8b, 8c** (70%).
- Reaction of **8a, 8b, 8c** with Et_3N , THF, $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$, RT, 16 h, yielding **9a, 9b, 9c** (quant.).
- Reaction of **9a, 9b, 9c** with $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, MeCN, AcOH, RT, 1 h, yielding **1a, 1b, 1c** (55-65%).
- Reaction of **1a, 1b, 1c** with DMT-Cl, Pyridin, RT, 16 h, yielding **10a, 10b, 10c** (54-79%).
- Reaction of **10a, 10b, 10c** with DIPEA, PA-Cl, DCM, RT, 6 h, yielding **11a, 11b, 11c** (70-97%).

40

3.3 Oligonukleotid-Synthese und DNA-Designstrategie

Die synthetisierten Nukleosid-Phosphoramidite **11a**, **11b** und **11c** wurden mittels automatisierter Festphasensynthese in die gewünschten Oligonukleotid-Sequenzen eingebracht. Dazu wurden sie unter Argon-Atmosphäre als 0,1 M Lösung in abs. Acetonitril vorgelegt. Abweichend zum Standardprotokoll der gewöhnlichen DNA-Bausteine, wurden die Kupplungszeiten pro Kupplung auf 99 s erhöht, um die Einbaueffizienz zu maximieren. Nach der ersten groben Aufreinigung und Abspaltung der Oligonukleotide von der festen Phase, wurden diese nochmals durch *Reversed-Phase*-HPLC aufgereinigt. Schließlich konnten diese dann mit den jeweils dazugehörigen, kommerziell erworbenen Oligonukleotiden hybridisiert werden, welche aus einem fluoreszenzfarbstoff-markierten (**ATTO550**) und aus unmodifizierten Gegensträngen bestanden. Der Wechsel zum Atto-Farbstoff erfolgte aufgrund dessen höherer Stabilität während des Bestrahlungsprozesses, wodurch eine geringere Zersetzung während der Belichtungszeit und geringere Messabweichungen zu beobachten waren. Dies ist ein enormer Vorteil gegenüber dem zuvor erwähnten Fluorescein^[21], welcher zuvor im Arbeitskreis *Wagenknecht* für diese Art von Versuchen verwendet wurde.^[21] Somit konnten Belichtungsversuche mit dem **ATTO550**-Fluoreszenzmarker über mehrere Tage durchgeführt werden. Für das bessere Verständnis werden die synthetisierten und eingebauten Sensibilisator-Nukleotide als **X** in der Oligonukleotid Sequenz dargestellt (Abb.37).

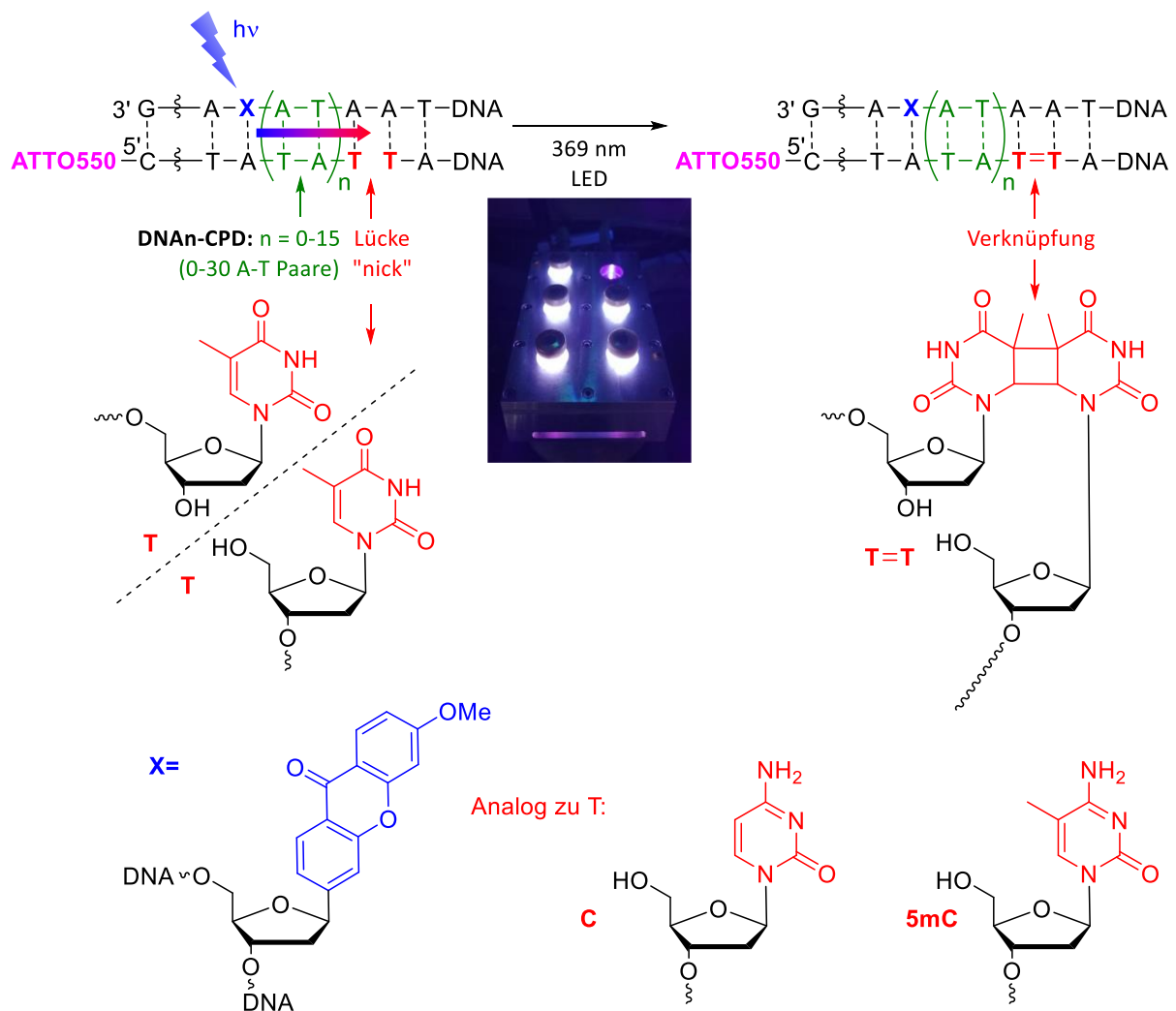


Abbildung 37: DNA Designstrategie zur Ermittlung der gebildeten CPD-Schäden.

Die markantesten Eigenschaften der verwendeten DNA-Architekturen waren die definierten Stellen der Sensibilisatoren und den zwei Pyrimidinen (T, 5mC oder C), welche zum CPD reagierten und in einem wachsenden Abstand zum Sensibilisator mit $n = 1, 2, 3, 4, 5, 10$ und 15 A-T-Paaren lokalisiert vorlagen. Somit konnte eine Distanz von bis zu 30 Basen bzw. $105,4 \text{ \AA}$ untersucht werden. Ein weiteres entscheidende Merkmal war die fehlende Phosphodiesterbindung zwischen den Reaktionspartnern. Somit wurden diese erst durch die kovalenten Bindungen zum Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer miteinander verbunden. Die dadurch resultierende Strangverlängerung und elektrophoretische Mobilität ermöglichte eine chemische CPD-Ausbeutenbestimmung mittels PAGE-Analyse und die Untersuchung des Energietransfers anhand des gebildeten Schadens. Die verwendete DNA-Architektur ermöglichte somit die Untersuchung der Distanzabhängigkeit solcher Prozesse.

3.4 Distanzabhängigkeit der photoinduzierten CPD-Bildung

Die CPD-Bildung und dessen Entstehungsmechanismen werden bereits seit 1960 intensiv untersucht.^[120] Bei direkter UV-B-Anregung von Pyrimidinen, vor allem aber Thymidine, bildet sich ein Singulett-Zustand ($^1\pi\pi^*$) aus, der jedoch in einigen hundert ps zerfällt.^[121] Liegen hingegen zwei Thymidine in der DNA-Sequenz direkt nebeneinander, so entsteht aus dem Singulett-Zustand durch eine nahezu barrierefreie $[2\pi+2\pi]$ -Cycloaddition, in weniger als 1 ps ein Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD).^[121] UV-A-Licht hingegen wird im Vergleich nur schwach von der DNA absorbiert. Jedoch zeigen Analysen, dass auch hier CPDs die vorwiegenden Läsionen ausmachen.^[78] Dies tritt allen voran in sehr Thymidin-reichen Abschnitten der DNA-Sequenz auf, da hier die molare Extinktion der doppelsträngigen DNA bei 350 nm erheblich höher ist als bei gemischten Sequenzen. Dies wird durch die Basenstapelung und damit einhergehende excitonische Wechselwirkungen erklärt, wobei die Triplett-Energie von 310 kJ/mol, für einzelne Thymidin-5'-Monophosphate (TMP), auf etwa 270 kJ/mol, für gestapelte T-Paare, abgesenkt wird.^[122] Somit sind Reaktionsprozesse über Triplett-Zustände naheliegend.

Im Gegensatz dazu sind Mechanismen zum Energietransfer entlang der DNA vergleichsweise wenig untersucht und verstanden. So sind einerseits weitreichende oxidativ erzeugte DNA-Schäden im Rahmen des DNA-vermittelten Elektronenlochtransports^[123] festgestellt worden. Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass Singulett- und Triplett-Energietransfer-Mechanismen über größere Entfernungen in der DNA wirken können.^[124] Die Reichweiten sind dabei sowohl für die Elektronenloch- als auch die Energie-Transportprozesse noch nicht abschließend geklärt.

Zur genaueren Untersuchung solcher Prozesse sind Photosensibilisatoren prädestiniert. So ist die Möglichkeit der indirekten Anregung der DNA bzw. selektiven Anregung des Sensibilisators von enormer Bedeutung, da die Bestrahlung mit UV-A und darüber hinaus mit sichtbarem Licht (VIS) ermöglicht wird. Das Vorkommen von Photosensibilisatoren in der Umwelt und die Exposition mit diesen Molekülen macht die Forschung über Energetische Prozesse innerhalb der DNA notwendig.

Daher wurden für die Untersuchung solcher Prozesse die entsprechenden Oligonukleotide **DNAMEOX-n** (mit n = 0-5, 10, 15) synthetisiert (Abb.38).

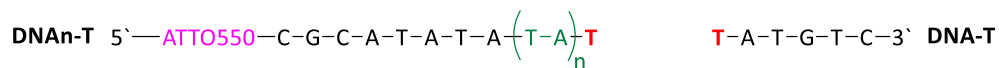


Abbildung 38: Synthetisierte Oligonukleotide **DNA-MeOX-n** mit der 3-Methoxyxanthon-Modifizierung an Position X und kommerziell erworbene Oligonukleotide **DNA_n-T** und **DNA-T**.

Die dazugehörigen Gegenstränge **DNA_n-T** (mit n = 0-5, 10, 15), welche mit einem Atto550-Farbstoff markiert waren, und **DNA-T** wurden kommerziell erworben.

Die Belichtungsreaktionen wurden bei 10 °C durchgeführt, um eine komplette Hybridisierung der drei Oligonucleotide (**DNA-MeOX-n**, **DNA_n-T** und **DNA-T**) in jedem Hybrid zu gewährleisten (Abb.39).

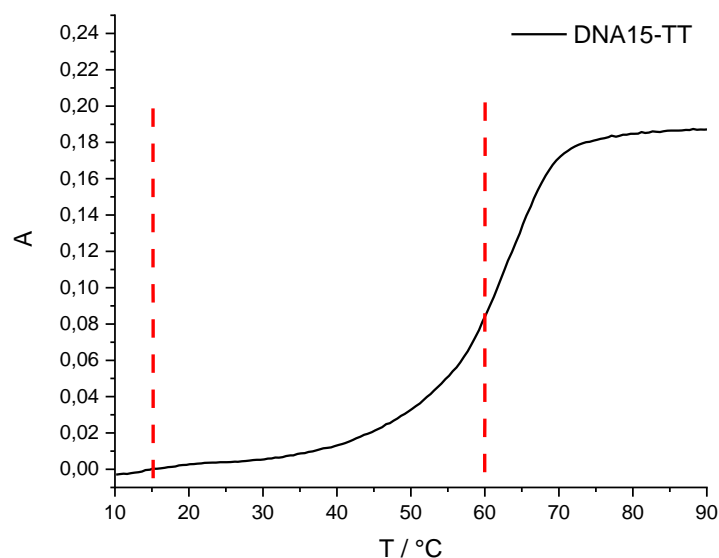


Abbildung 39: Schmelztemperatur des Hybrids **DNA-MeOX-15-TT**.

So zeigte beispielsweise das Hybrid **DNA-MeOX-15-TT**, aufgrund des ternären Aufbaus, zwei Schmelztemperaturen bei $T_m = 14^\circ\text{C}$ und $T_m = 60^\circ\text{C}$. Darüber hinaus wurden die Belichtungsreaktionen unter Argon-Atmosphäre und Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt, um unerwünschte DNA-Schäden zu vermeiden, sowie mindestens dreimal reproduziert, um Abweichungen möglichst gering zu halten.

Mithilfe der generierten Blindproben konnten eindeutige Einflüsse bei Abweichenden Belichtungsbedingungen aufgezeigt werden (Abb.40). Die Abkühlung der Belichtungsproben auf 10°C war zwingend notwendig, um die CPD-Bildung (**P1**-Bande) zu ermöglichen. Weiterhin wurden bei Anwesenheit von Sauerstoff zusätzliche Banden (**P2**) mit erhöhter Retentionszeit erzeugt, welche auf *cross-links* hindeuteten. Ebenso wurden ohne Photosensibilisator keine CPD während der Bestrahlung mit der ausgewählten LED ($\lambda = 369\text{ nm}$) erzeugt, wodurch die selektive Anregung des Photosensibilisators bestätigt wurde.

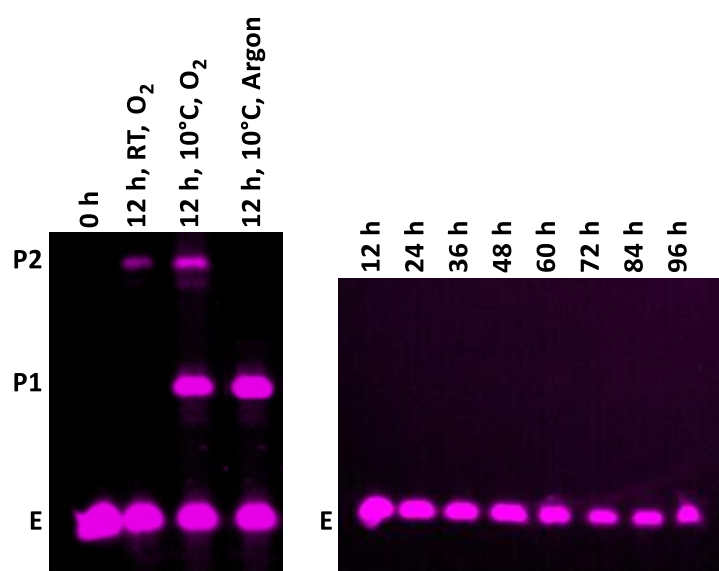


Abbildung 40: Blindproben mit **DNA-MeOX-0-TT** (links) und analogem Hybrid ohne Methoxyxanthon-Modifizierung (rechts).

Wie bereits erwähnt, hängen die photophysikalischen Eigenschaften von Xanthonen auch von Temperatur und der Lösungsmittelpolarität ab. Dieses Verhalten war in den Absorptionsspektren des Methoxyxanthon-Nucleosids **1a** und des synthetisierten Einzelstrangs **DNA-MeOX-0** deutlich zu erkennen. Mit steigender Polarität des Lösungsmittels, angefangen bei Acetonitril, über Methanol, hin zu Wasser, war eine größere Rotverschiebung (bathochromer Effekt) zu beobachten. In den synthetisierten und mit Methoxyxanthon

modifizierten Einzelsträngen war dieses Verhalten durch einen erhöhten Extinktionswert bei 360-380 nm deutlicher zu erkennen (Abb.41). Somit konnte der Photosensibilisator, trotz der geringen Extinktion, in den Belichtungsreaktionen mit der kommerziell erworbenen LED ($\lambda = 369 \text{ nm}$) selektiv angeregt werden.

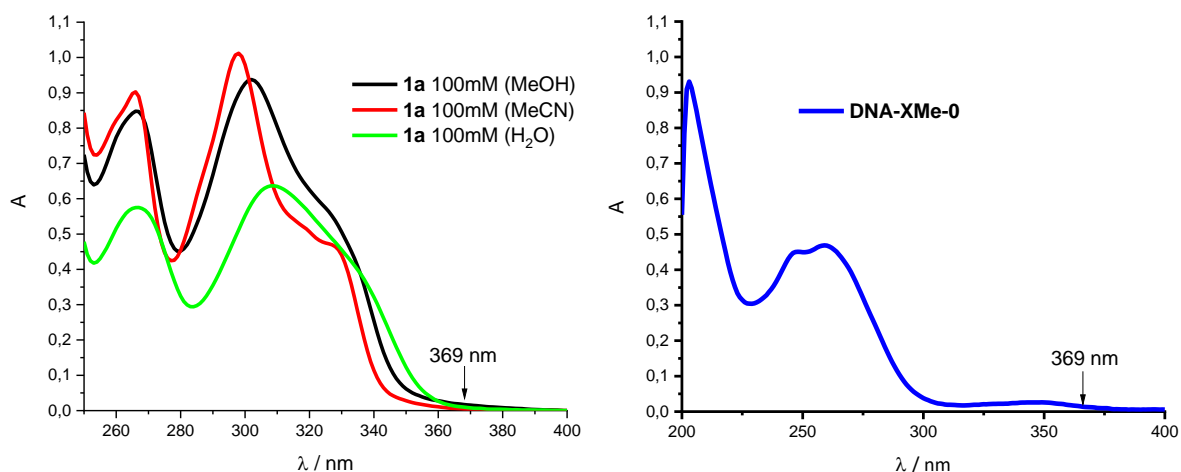


Abbildung 41: Absorptionsspektren von 100 μM Methoxyxanthon-Nucleosid-Lösung (**1a**) in polaren Lösungsmitteln (links) und 2,5 μM wässrige **DNA-MeOX-0-TT-Lösung** (rechts).

In Abbildung 43 ist die PAGE-Analyse des zeitlichen Verlaufs der Belichtung vom Hybrid **DNA-MeOX-0-TT**, bestehend aus **DNA-MeOX-0**, **DNA-0-T** und **DNA-T**, bei 369 nm dargestellt. Zur Bestimmung der Ausbeuten bzw. Umsatz wurden die Fluoreszenzintensitäten der CPD-Banden (**T<>T**) in der jeweiligen Gelspur ins Verhältnis der Edukt-Banden (**E**) gesetzt. Aufgrund derselben Farbstoff-Degradation von Atto550 sowohl in der Edukt- als auch der CPD-Bande konnten die CPD-Ausbeuten anhand der Verhältnisse ausgerechnet werden.

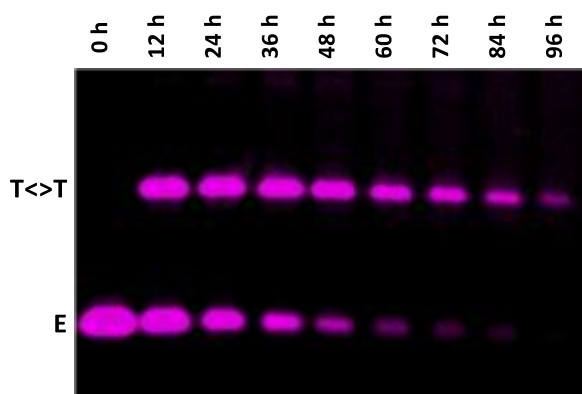


Abbildung 42: PAGE-Analyse: Zeitlicher Belichtungsverlauf von **DNA-MeOX-0-TT**; Bedingungen: 2,5 μM **DNA-MeOX-0**, 2,5 μM **DNA-0-T** und 2,5 mM **DNA-T**, H_2O , 10 mM NaP_i -Puffer (pH 7,0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 $^\circ\text{C}$.

Die Zusammenfassung der Ausbeutebestimmung für **DNA-MeOX-0-TT**, bei benachbarter Position vom Photosensibilisator zum CPD-Paar, ist zum besseren Verständnis nachfolgend tabellarisch (Tab.2) und graphisch abgebildet (Abb.43). Hierbei wurden auch zusätzliche Messpunkte zwischen 0 – 24 h berücksichtigt, um einen besseren Verlauf abbilden zu können. Die Standardabweichungen der gemessenen Ausbeuten lagen dabei immer kleiner als ± 5 %. Für genauere Werte siehe SI.^[125]

Tabelle 2: Zeitlicher Verlauf der (T-T) CPD-Ausbeuten für **DNA-MeOX-0-TT** von 0 – 96 h.

t [h]	1/6	1/2	1	2	3	4	6	8	10	12
Ausb. [%]	5	10	14	20	25	28	34	40	44	50
t [h]	16	18	20	24	36	48	60	72	84	96
Ausb. [%]	54	57	59	62	69	72	74	76	79	80

Die T<>T-Ausbeuten erreichten nach einer Bestrahlung von 96 h einen Wert von 80,5 %. So wurde bereits mehr als die Hälfte der Ausbeute (43,7 %) in den ersten 10 h erreicht. Vor allem der steile Ausbeuteanstieg in der ersten Stunde war bemerkenswert.

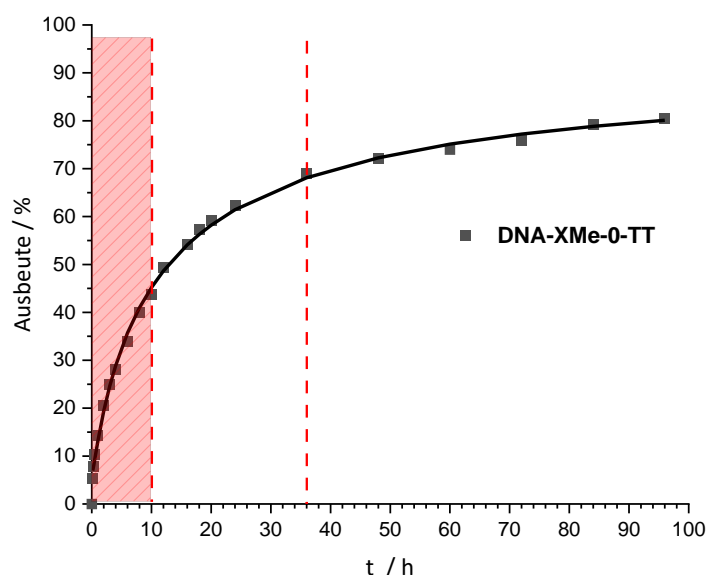


Abbildung 43: Zeitabhängige T<>T-Ausbeute (CPD) von **DNA-MeOX-0-TT**; Bedingungen: 2,5 μ M **DNA-MeOX-0**, 2,5 μ M **DNA-0-T** und 2,5 mM **DNA-T**, H₂O, 10 mM NaPi-Puffer (pH 7,0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

So wurde bereits nach 10 min 5,4 % CPD gebildet, nach 30 min waren es bereits 10,5 % und nach einer Stunde 14,3 %.

In der nachfolgenden Belichtungsdauer von bis zu 36 h konnten trotz abflachender CPD-Ausbildung, weitere 25,4 % erreicht werden, sodass bereits nach etwa einem Drittel der Belichtungszeit der größte CPD-Anteil (69,1 %) umgesetzt wurde. Schließlich wurden die letzten 10 % CPD-Ausbeute innerhalb weiterer 60 h erreicht. Hierbei schien die Ausbeuteentwicklung einem nach oben beschränkten Wachstum zu gleichen, wobei eine langsame Plateauausbildung ab 60 h zu beobachten war. Nichtsdestotrotz wurde die Sättigungsgrenze innerhalb der 96 h Belichtungszeit nicht erreicht. Somit wäre eine längere Belichtungszeit mit einem stabileren Fluoreszenz-Farbstoff als Atto550 für zukünftige Messungen sinnvoll. Da CPD grundsätzlich durch Energie- oder Ladungstransfer wieder geöffnet werden können^[85], wäre diese Rückreaktion und das damit einhergehende chemische Gleichgewicht, im Hinblick auf die Plateauausbildung, schlüssig.

Der Abstand zwischen dem Photosensibilisator und dem CPD-Paar wurde schrittweise um zwei Basen-Paare (A-T) mit $n = 0-5, 10$ und 15 erhöht. Wie in Abbildung 44 (Tab.3) zu sehen, änderten sich entsprechend der Oligonukleotid-Verlängerung auch die Retentionszeiten. Zum Abgleich wurde eine Referenzleiter aus unterschiedlichen Oligomeren während der PAGE-Analyse dazugefügt.

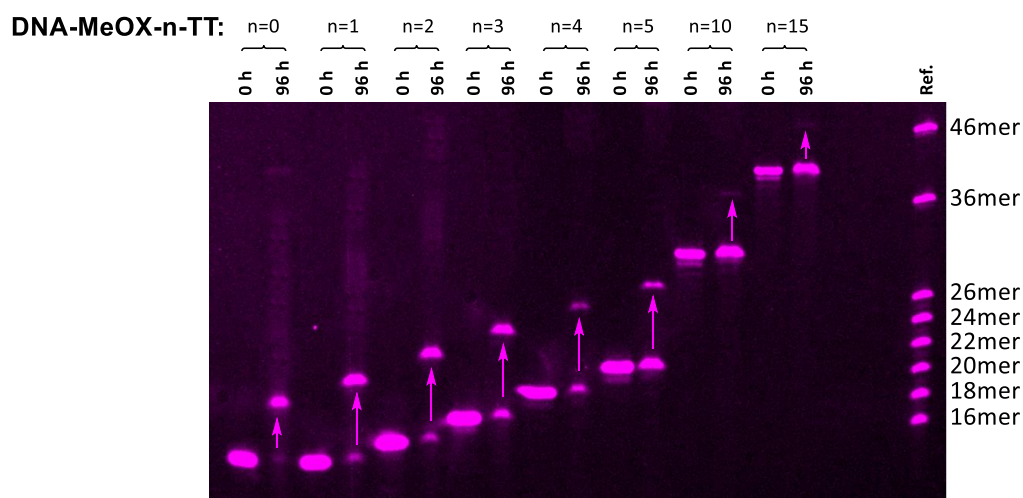


Abbildung 44: PAGE-Analyse: Ausbeutevergleich von allen **DNA-MeOX-n-TT** (mit $n = 0-5, 10, 15$) nach 96 h Belichtung; Bedingungen: 2,5 μM **DNA-MeOX-n**, 2,5 μM **DNA-n-T** und 2,5 mM DNA-T, H_2O , 10 mM NaPi -Puffer (pH 7,0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

Tabelle 3: Ausbeutevergleich von allen **DNA-MeOX-n-TT** (mit n = 0-5, 10, 15) nach 96 h Belichtung.

t [h]	n = 0	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 10	n = 15
96	80%	75%	67%	57%	37%	25%	10%	9,0%

Die Ausbeuten aller DNA-Hybride lagen somit nach 96 h Belichtung im Bereich von 80,5 % für **DNA-MeOX-0-TT** (direkte Nachbarschaft), 75 % für **DNA-MeOX-1-TT** (kurze Distanz) bis 9 % für **DNA-MeOX-15-TT** (lange Distanz).

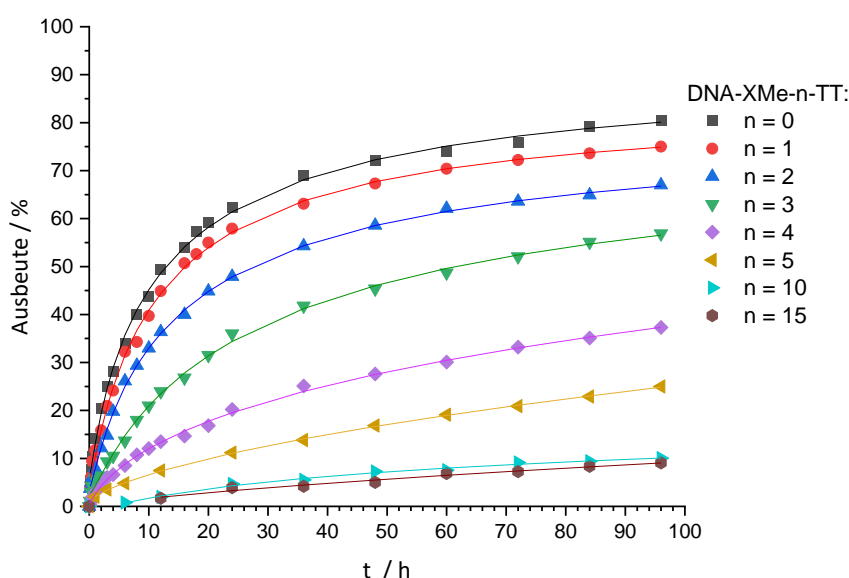


Abbildung 45: Zeitabhängige T<>T-Ausbeute (CPD) von **DNA-MeOX-n-TT** (mit n = 0-5, 10, 15); Bedingungen: 2,5 μ M **DNA-MeOX-n**, 2,5 μ M **DNA-n-T** und 2,5 mM **DNA-T**, H₂O, 10 mM NaPi-Puffer (pH 7,0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

Wie in Abbildung 45 zu sehen, folgte die zeitlich abhängige Ausbeute dem gleichen Schema, mit einer anfänglich schnelleren CPD-Umsetzung und schließlich einer Annäherung an eine Sättigungsgrenze. Somit konnten CPD-Ausbeuten nach 96 in 75,0 % (n = 1), 67,0 % (n = 2), 56,9 % (n = 3), 37,3 % (n = 4), 25,0 % (n = 5), sowie 10,1 % (n = 10) und 9,05 % (n = 15) erzeugt werden. Bemerkenswerterweise war dabei sogar eine CPD-Bildung in einem Abstand von 30 Basen (n = 15) zu beobachten. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Benzophenonen^[21] und entspricht nicht der dort festgestellten exponentiellen Distanzabhängigkeit, welche als ein Triplett-Energietransfer beobachtet wurde. Stattdessen wurde ein sigmoidaler Verlauf bei jedem zeitlichen Abschnitt zwischen 6 h und 96 h Bestrahlung für die Abstandsabhängigkeit der CPD-Ausbeuten beobachtet (Abb.46).

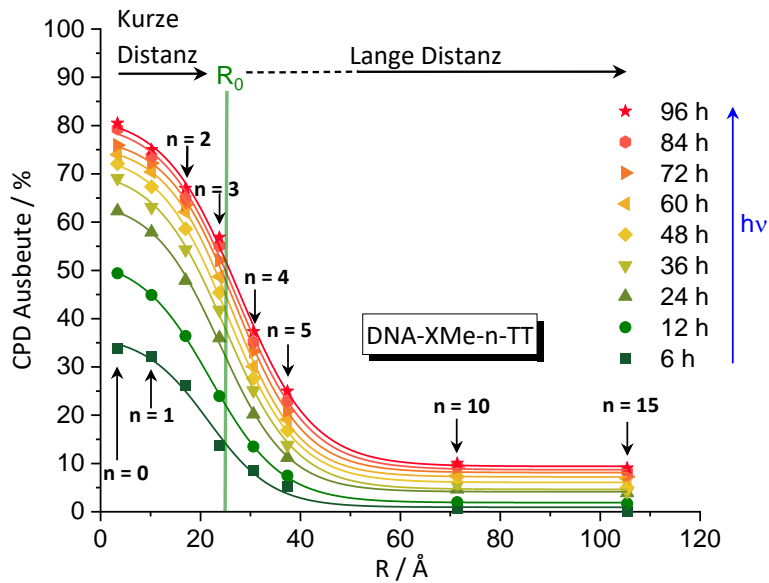


Abbildung 46: Distanzabhängigkeit der T<>T-Bildung in **DNA-MeOX-n-TT** (mit n = 0-5, 10, 15) mit einem sigmoidalem Verlauf.

Die jeweiligen Daten wurden entsprechend der sigmoidalen Boltzmann-Funktion in Abhängigkeit der Distanz R angepasst (Formel 5).

$$y = A_2 + \frac{(A_2 - A_1)}{1 + e^{\frac{R-R_0}{dR}}}$$

Formel 5: Sigmoidale Boltzmann-Funktion zur Anpassung der distanzabhängigen CPD-Bildung.

A_1	Plateau vor dem sigmoidalen Übergang
A_2	Plateau nach dem sigmoidalen Übergang
R_0	Wendepunkt

Der Wendepunkt bildete hierbei den wichtigsten Parameter für den Energietransfer entlang der DNA-Architekturen. Mit $R_0 = 25 \pm 3 \text{ Å}$ wurde hier der Übergang zwischen DNA-Schädigung über kurze und über lange Distanzen festgelegt. Bemerkenswert war die gute Übereinstimmung des R_0 -Werts mit dem Förster-Radius von 27 Å zwischen zwei fluoreszenten artifiziellen DNA-Basen in der Studie von *Wilhelmsson et al.*^[126] Dies bestärkte die Annahme, dass die CPD-Bildung durch einen Energietransfer vom Photosensibilisator über die DNA-Basenstapelung hin zum CPD-Paar verursacht wurde. So konnte bei einer ultraschnellen T-T-Dimerisierung von $\sim 1 \text{ ps}$ davon ausgegangen werden, dass der Energietransfer der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war. Daher konnte aufgrund der extrem schnellen und

kohärent stattfindenden Energiewanderung nur geringe Distanzabhängigkeiten angenommen und somit CPDs in hohen Ausbeuten für kurze Distanzen bis zum Wendepunkt R_0 gebildet werden. Diese Annahmen basierten auf Veröffentlichungen zur Singulett-Chemie der CPD-Bildung, welche als eine nahezu barrierefreie Reaktion vom angeregten $\pi\pi^*$ -Zustand über einen ultraschnellen Prozess zum CPD-Produkt auf einer Femtosekunden-Zeitskala beschrieben wurde.^[127] Die CPD-Bildung diente daher als eine Art kinetische Falle für den Triplett-Energietransfer entlang der DNA.

Die CPD-Ausbeuten fielen bei größeren Distanzen als R_0 hingegen rasch ab, erreichten jedoch trotzdem nie den Wert 0. Dies wurde durch die Plateaubildung zwischen **DNA-MeOX-10-TT** (71,4 Å) und **DNA-MeOX-15-TT** (105,4 Å) mit einer CPD-Ausbeute von etwa 9,4 % (96 h) verdeutlicht. Damit lagen die Reichweiten über $2 \cdot R_0$ (56 Å). Mit diesen Ergebnissen konnte schließlich auf einen weiteren Mechanismus für Distanzen jenseits R_0 geschlossen werden. Im Gegensatz zum Energietransfer für geringe Distanzen bis R_0 konnte dieser zusätzliche Energietransfer über lange Reichweiten einem inkohärenten Hüpfmechanismus, ähnlich dem Ladungstransport über lange Reichweiten, zugeordnet werden (Abb.47). Diese Hypothese müsste jedoch in zukünftigen Untersuchungen durch zusätzliche Analysemethoden und vergleichbare Systeme bestätigt werden, da die vorliegenden Ergebnisse in diesem Kontext zum ersten Mal gefunden wurden.

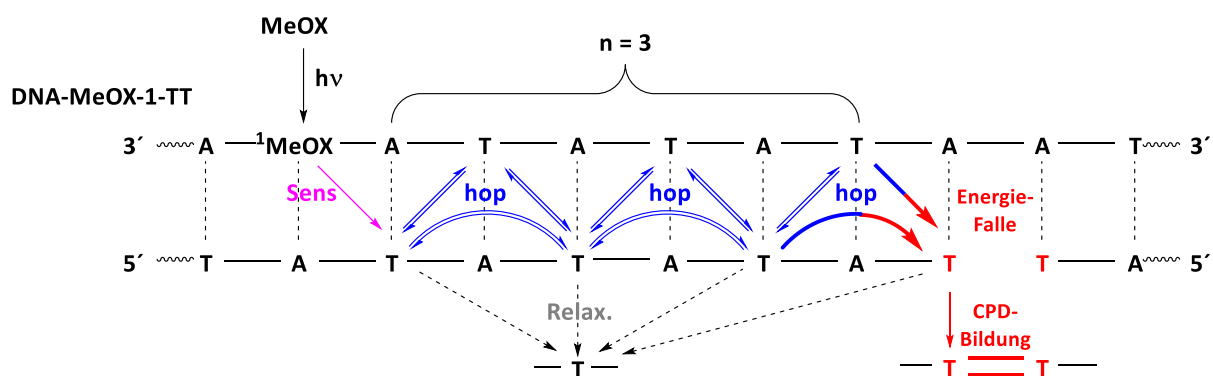


Abbildung 47: Vorgeschlagener Singulett-Energie-Hüpfmechanismus am Beispiel von DNA-MeOX-1-TT. Abgeändert nach [128].

3.4.1 Basenabhängige CPD-Bildung

Neben der Distanzabhängigkeit der CPD-Bildung haben auch die Basen des CPD-Paares einen enormen Einfluss auf den Prozess. So ist bekannt, dass CPD vorzugsweise zwischen **T** und **T** gebildet werden. Jedoch sind auch TC- bzw. CT-Dimere möglich, wohingegen keine CC-Dimere beobachtet wurden. Daher ist die Ausbeuteentwicklung in folgender Reihenfolge festgestellt worden: $TT > TC > CT \gg CC$.^[3] Von größerer Bedeutung hingegen ist das 5-Methylcytosin (**5mC**), welches aus einem Cytosin durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) eine Methylgruppen an der 5-Position erhält und als ein wichtiger epigenetischer Marker fungiert.^[129,130] 5mC ist an dem An- und Ausschalten von Genen beteiligt und nimmt mit steigendem Alter in der Anzahl zu. Im Gegensatz zu Cytosin ist 5-Methylcytosin jedoch auch ein bevorzugter Angriffspunkt für die CPD-Bildung und kann durch eine Desaminierung zum Thymin umgewandelt werden. Somit folgt nicht nur eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur CPD-Bildung, sondern auch zur Mutation.

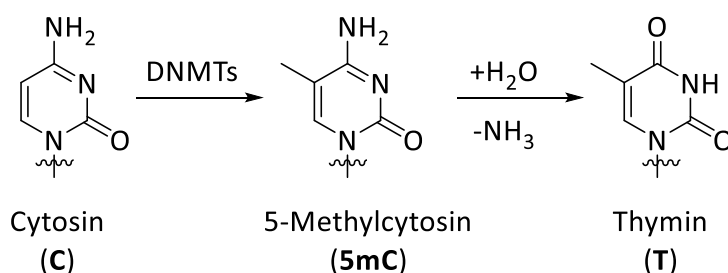


Abbildung 48: Möglicher Modifikationsverlauf von Cytosin (C), über 5-Methylcytosin hin zum Thymin (T).

Da die, in dieser Arbeit verwendete, DNA-Architektur auch die Änderung der Basen zu lies, wurde der Einfluss gemischter CPD-Paare auf die Ausbeuten untersucht. Hierfür wurde zwischen dem Photosensibilisator und dem Dimer-Paar ein Abstand von zwei A-T-Paaren ($n = 1$) gewählt, was 10,2 Å entsprach. Dies sollte mögliche Störungen minimieren, da Guanidin in direkter Nähe zum Photosensibilisator zu Nebenreaktionen führen und einen direkten Einfluss auf die CPD-Ausbeuten haben könnte. So ist beobachtet worden, dass Guanidin eine Selbstreparatur des CPD-Schadens durch eine Ladungsübertragung auslösen kann und damit die CPD-Bildung reduziert.^[131] Ob solch ein Mechanismus durch 3-Methoxyxanthon ausgelöst werden könnte, war zum gegebenen Zeitpunkt unklar.

Weiterhin wurden angepasste Oligonukleotid-Stränge synthetisiert, um die richtige Basenpaarung zu gewährleisten (Abb.49).

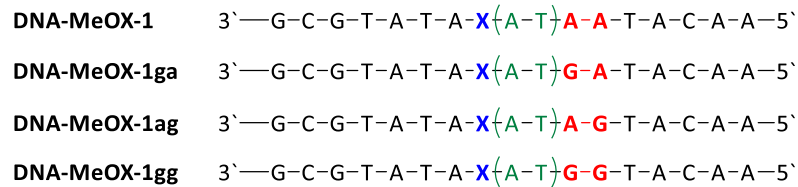


Abbildung 49: Synthetisierte Oligonukleotide mit der 3-Methoxyxanthon-Modifizierung und angepassten Gegenbasen zum CPD-Paar.

Alle Belichtungsreaktionen und PAGE-Analysen wurden unter den gleichen Bedingungen wie zuvor bei der Untersuchung der Distanzabhängigkeit durchgeführt, um mögliche Verknüpfungen oder Ergänzungen zur Distanzabhängigkeit leisten zu können. Nachfolgend soll 5-Methylcytosin zur Vereinfachung durch **mC** dargestellt werden. So konnte beobachtet werden, dass bei den **TmC**- und **mCT**-Dimeren eine eindeutige Sättigungsgrenze bei etwa 82 % und 70 % nach 48 h Belichtungszeit ausgebildet wurde (Abb.50). Diese Verläufe bestätigen daher eindeutig das zuvor vermutete nach oben beschränkte Wachstum und somit ein mögliches chemisches Gleichgewicht zwischen der geöffneten Ausgangssituation der Basen und dem CPD. Ebenso beeindruckend war die schneller erreichte und höhere maximal Ausbeute des **TmC**-Dimers im Vergleich zum **TT**-Dimer.

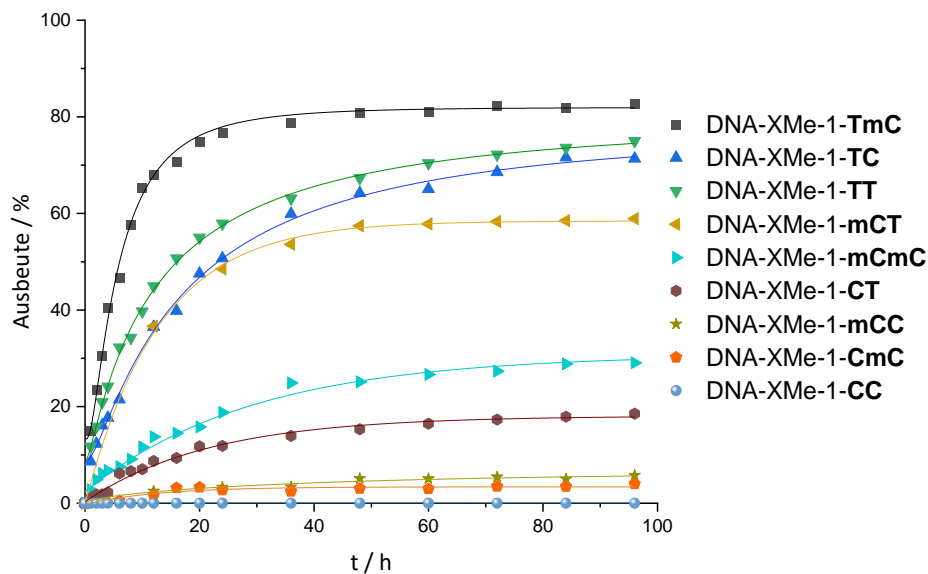


Abbildung 50: Zeitabhängige CPD-Ausbeute von **DNA-MeOX-1-YY** (mit Y = T, C oder mC); Bedingungen: 2,5 μ M **DNA-MeOX-1**, 2,5 μ M **DNA-n-T** und 2,5 mM **DNA-T**, H₂O, 10 mM NaPi-Puffer(pH 7,0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

Dieses Ergebnis würde in zukünftigen Studien neue Möglichkeiten für die Bestimmung des maximal erreichbaren Energietransfer entlang der DNA zur CPD-Bildung schaffen. So kann davon ausgegangen werden, dass für das **TmC**-Paar nur noch eine Belichtungszeit von 48 h für alle Distanzen benötigt würde. Aufgrund der vergleichbaren Ausbeuteentwicklung bzw. -verlaufs, bei gleichbleibendem CPD-Paar über alle Distanzen, wäre das Erreichen der Sättigungsgrenze innerhalb dieser Zeit plausibel. Eine kürzere Belichtungszeit würde daher einen positiven Einfluss auf die Messgenauigkeit haben, da die Atto550-Farbstoff-Degradation weniger fortgeschritten wäre als bei 96 h. Ebenso deutet die höhere Ausbeute vom **TmC**-Dimer im Vergleich zum **TT**-Dimer bei einer Distanz von 2 Basen-Paaren ($n = 1$) auf eine höhere Reaktivität hin, die sich distanzunabhängig verhalten müsste. Daher wären auch höhere Ausbeuten bei den gemessenen großen Distanzen ($n = 10$ und 15) und darüber hinaus denkbar.

Tabelle 4: Ausbeutevergleich von allen **DNA-MeOX-1-YY** (mit Y = T, C oder mC) nach 96 h Belichtung.

DNA-MeOX-1-YY	TmC	TT	TC	mCT	CT	mCmC	mCC	CmC	CC
Ausb. [%]	83	75	71	59	18	29	6	4	0

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Ausbeuten der gemischten CPD generell höher waren, wenn **T** auf der 5'-Seite und daher näher zum Photosensibilisator lokalisiert war, und niedriger auf der 3'-Seite. Zum Vergleichsstrang **DNA-MeOX-1-TT** mit einer CPD-Ausbeute von 75 %, wurde die Ausbeute mit einem **C** (**DNA-MeOX-1-TC**) auf der 3'-Seite auf 71 % reduziert, während **mC** (**DNA-MeOX-1-TmC**) diese auf 83% erhöhte. Hingegen verringerten **mC** (**DNA-MeOX-1-mCT**) und **C** (**DNA-MeOX-1-CT**) auf der 5'-Seite die Ausbeuten auf 59 % und 18 %. Für das **CC**-Paar hingegen (**DNA-MeOX-1-CC**) wurden keine CPDs gebildet, was die Literatur bestätigte. Allerdings konnten die Methylgruppen die Ausbeuten für **DNA-MeOX-1-mCC** auf 6 % und **DNA-MeOX-1-CmC** auf 4 % leicht erhöhen, sowie bei **DNA-MeOX-1-mCmC** deutlich auf 29 %. Die positive Wirkung der Methylgruppe am Cytosin auf die CPD-Bildung bestätigte experimentell die bereits aufgestellte Hypothese und theoretische Messungen zur Verstärkung der Stapelwechselwirkungen durch Änderung der Zuckerkonformation und die resultierende optimierte Orientierung der Pyrimidine.^[132] Aufgrund der fehlenden Phosphodiesterbindung zwischen den CPD-Paaren in der verwendeten DNA-Architektur, war

die CPD-Bildung hauptsächlich abhängig von der relativen Orientierung und Stapelung der Basen.

Zusammengefasst ergaben sich folgende Relationen der CPD-Ausbeuten für gemischte Pyrimidine:

- DNA-Basen: $TT > TC > CT \gg CC \rightarrow$ Bestätigung der Lit.^[3]
- T an 5'-Position: $TmC > TT > TC$
- T an 3'-Position: $TT > mCT > CT$
- Methylierung: $TmC > mCT > mCmC > mCC > CmC \gg CC \rightarrow$ Bestätigung der Lit.^[132]

3.4.2 Einfluss benachbarter Basenpaare

Um der zuvor erwähnten Möglichkeit der Selbstreparatur des CPD durch einen Ladungstransfer durch Guanidin nachzugehen, wurde die DNA-Architektur weiter angepasst und folgender Oligonukleotid synthetisiert (Abb.51).

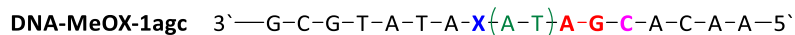


Abbildung 51: Synthetisiertes Oligonukleotid mit der 3-Methoxyxanthon-Modifizierung und angepassten Gegenbasen für die Untersuchung der Nachbarbasen-Effekte.

Hierbei sollte der Vergleich der Dimerausbeuten von **TC** mit **TCG** und **TmC** mit **TmCG** einen Rückschluss über den Unterschied von Guanin statt Adenin als nachfolgende Base hinter dem Dimer-Paar (3'-Position) geben und eine mögliche Selbstreparatur überprüfen (Abb.52).

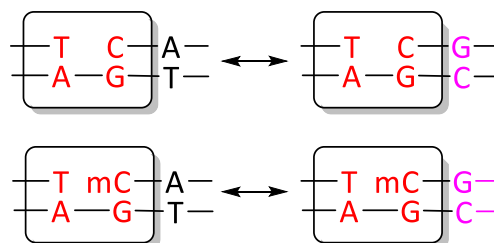


Abbildung 52: Vergleichsstränge zur Betrachtung der Nachbarbasen-Effekte.

Interessanterweise blieb der Verlauf der Ausbeuteentwicklung mit **G** statt **A** als Nachfolgebase zum CPD-Paar nahezu gleich. Jedoch wurde die CPD-Ausbeute in beiden Fällen mit einem **G** reduziert.

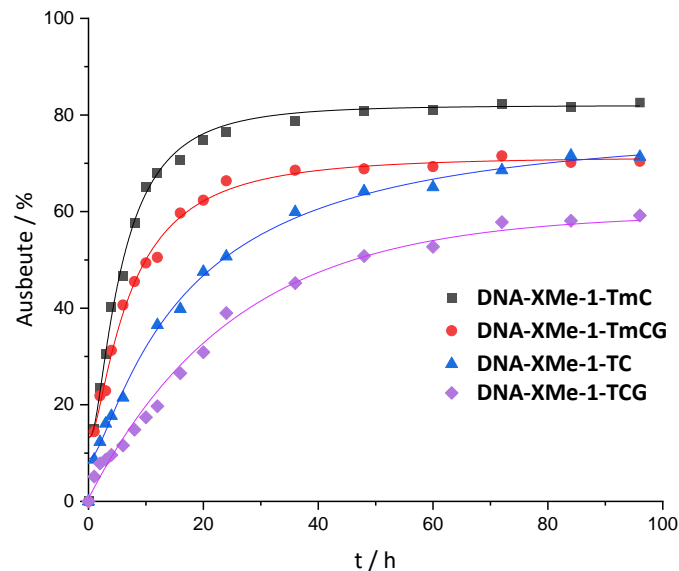


Abbildung 53: Zeitabhängige CPD-Ausbeute von **DNA-MeOX-1-TY** und **DNA-MeOX-1-TYG** (mit Y = C oder mC);
Bedingungen: 2,5 μ M **DNA-MeOX-1**, 2,5 μ M **DNA-n-T** und 2,5 mM **DNA-T**, H₂O, 10 mM NaPi-Puffer (pH 7,0), 250 mM NaCl, 369 nm LED, 10 °C.

Hierbei wurde die CPD-Ausbeute vom **TmC**-Dimer mit einem G als Nachbarbase um 13 % auf 70 % für **DNA-MeOX-1-TmCG** und um 11 % auf 60 % für **DNA-MeOX-1-TCG** reduziert. Dies entsprach für beide Dimere eine Reduktion um nahezu dasselbe Verhältnis von 1,18 (Tab. 5).

Tabelle 5: Ausbeutevergleich von **DNA-MeOX-1-TY** und **DNA-MeOX-1-TYG** (mit Y = C oder mC) nach 96 h Belichtung.

DNA-MeOX-1-YY	TmC	TmCG	TC	TCG
Ausb. [%]	83	70	71	60

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die Selbstreparatur durch einen Ladungstransfer vom Guanin und damit die Beobachtungen in der Literatur bestätigt werden konnte. Dies ist bedeutend, da TCG-Stellen in zellulärer DNA bevorzugt CPD ausbilden und aufgrund der Mutationen mit Krebs in Verbindung stehen.

- Nachbarbasen-Effekt von G: TmC > TmCG und TC > TCG → Bestätigung der Lit. ^[130]

3.4.3 Vergleich zu Xanthon- und Thioxanthon-Sensibilisator

Wie zuvor bereits erwähnt konnten die Synthesen der Xanthon- und Thioxanthon-Nukleoside zwar abgeschlossen, jedoch keine vollständige Untersuchung der induzierten CPD-Bildung mit diesen Sensibilisatoren durchgeführt werden. Vielmehr dienten erste Versuche dem *Proof-of-Concept*, wodurch im weiteren Verlauf der Zusammenarbeit mit *Wagenknecht et al.* Vergleichsuntersuchungen abgeschlossen werden konnten.^[128] Die Wahl dieser Photosensibilisatoren beruhte auf ihren Triplett-Energien, da Xanthon mit einer T_1 -Energie von $E_T = 310 \text{ kJ/mol}$ ^[133] und Thioxanthon von etwa $E_T = 270 \text{ kJ/mol}$ ^[134] in der Lage sein sollten das in der DNA gestapelte Thymidin ($E_T = 270 \text{ kJ/mol}$ ^[135]) anzuregen. Ebenso wurden bereits vor der Wahl erste erfolgreiche Ergebnisse mit 3-Methoxyxanthon als Photosensibilisator erzielt und dahingegen war eine vergleichbare Struktur als Auswahl naheliegend. Photochemisch unterschieden sie sich jedoch von dem Singulett-Photosensibilisator 3-Methoxyxanthon, was einen umfassenden Vergleich zwischen den Sensibilisatoren und den erzeugten CPD liefern sollte.

Die ersten Belichtungsreaktionen mit eingebautem Thioxanthon als Photosensibilisator wurden an Hybriden mit den Abständen $n = 0, 2$ und 5 mit einer LED der Wellenlänge 385 nm durchgeführt (Abb.54). Hierbei wurde die höhere Wellenlänge verwendet, da Thioxanthon eine literaturbekannte Absorbanz bis zu 400 nm aufweist. Die Photoreaktion wurde dabei bis 5 h belichtet, wobei stündlich ein Aliquot für die PAGE-Analyse entnommen wurde. Diese sahen vielversprechend aus und zeigten allen voran eine CPD-Bildung bei direkter Nachbarschaft ($n = 0$) zum Sensibilisator in einer Ausbeute von 27% nach 5 h auf. Mit zunehmendem Abstand vom Photosensibilisator zum CPD-Paar nahmen die Ausbeuten rasch ab. So konnte bei $n = 2$ nur noch eine geringfügige CPD-Ausbildung ($\sim 5 \%$) nach 5 h festgestellt werden, während bei $n = 5$ kein CPD-Schaden zu beobachten war. Da die Belichtungsreaktionen jedoch nicht ausreichend oft wiederholt wurden, ist von einer größeren Standardabweichung auszugehen.

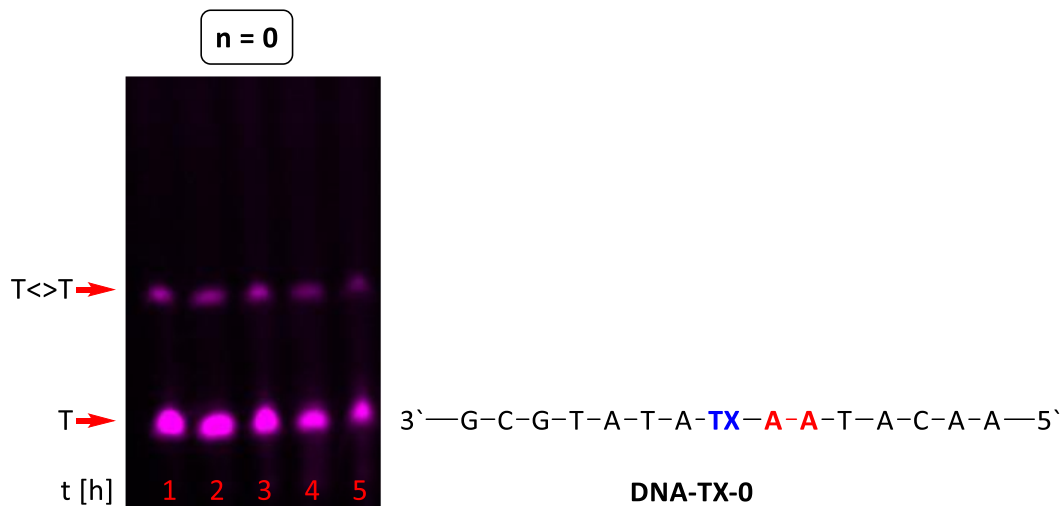


Abbildung 54: DNA Hybrid ($n=0$) mit Thioxanthon als Photosensibilisator X bei einer Belichtung mit 385 nm LED (links) und der synthetisierte thioxanthon-modifizierte Oligonukleotid ($n = 0$).

Im zeitlichen Verlauf der CPD-Ausbeuten ist eine deutliche Plateauausbildung bei etwa 27 % zu sehen, welche bereits nach 3 h Belichtungszeit erreicht werden konnte (Abb.55).

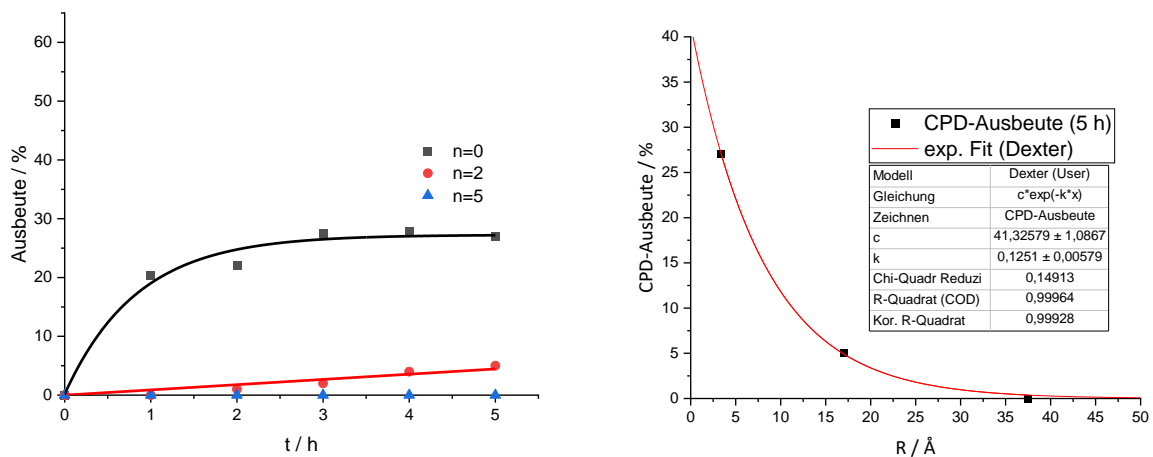


Abbildung 55: CPD-Ausbeuten im zeitlichen Verlauf (links) und Distanzabhängigkeit (rechts) der DNA Hybride ($n=0, 2, 5$) mit Thioxanthon als Photosensibilisator.

So konnte festgestellt werden, dass der TTET vom angeregten Thioxanthon entlang der DNA-Doppelhelix eine exponentielle Distanzabhängigkeit aufweist. Dies war erwartet worden, da Thioxanthon ein Triplett-Photosensibilisator und daher vergleichbare Ergebnisse mit denen von Benzophenone liefern sollte.^[21] Zur Analyse der Distanzabhängigkeit wurde hierfür der monoexponentielle Zerfall verwendet (Formel 6).^[60,136]

$$y = c \cdot e^{(-\beta \cdot x)} ; \text{ mit } x = r_{DA}$$

Formel 6: Monoexponentieller Zerfall zur Analyse der distanzabhängigen CPD-Bildung: Dexter-TTET.

y	Ausbeute an CPD
c	Konstante
r_{DA}	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
β	Systemspezifischer Abschwächungsfaktor

Auch hier gilt für diesen Mechanismus, dass die CPD-Bildung eine ultraschnelle Reaktion im ps-Bereich und der Energietransfer der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Somit wirkte die CPD-Bildung als kinetische Falle für die sich ausbreitende Triplett-Energie. Entsprechend der oben aufgeführten Gleichung konnte die Abstandsabhängigkeit des TTET durch das Auftragen der Ausbeuten (y) an CPD gegen den Abstand zwischen Photosensibilisator (Donor) und CPD-Paar (Akzeptor) r_{DA} bestimmt werden. Hierbei ergab sich im Falle von Thioxanthon als Triplett-Energie-Donor ein systemspezifischer Abschwächungsfaktor von $\beta = 0,125 \pm 0,006 \text{ \AA}^{-1}$. Die exponentielle Distanzabhängigkeit stimmte damit gut mit dem Dexter-TTET^[60], den Ergebnissen für den TTET zwischen interkalierenden Metallkomplexen ($\beta = 0,10 \text{ \AA}^{-1}$)^[137] und den Ergebnissen mit Methoxybenzophenon ($\beta = 0,13 \text{ \AA}^{-1}$) und Methoxyacetophenen ($\beta = 0,17 \text{ \AA}^{-1}$)^[21] überein.

Ebenso wurden erste Belichtungsreaktionen mit Xanthon und Thioxanthon mit einer Wellenlänge von 369 nm durchgeführt (Abb.56). Jedoch wurde festgestellt, dass der Entgasungsprozess durch *Freeze-Pump-Thaw* hierbei ungenügend war oder aber die Belichtungsproben undicht und Sauerstoff an den Belichtungsreaktionen beteiligt war.

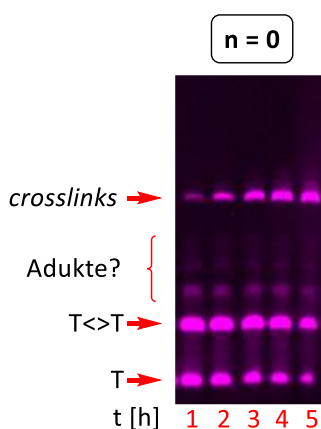


Abbildung 56: DNA Hybrid (n=0) mit Thioxanthon als Photosensibilisator bei einer Belichtung von 369 nm.

Diese Ergebnisse konnten zwar nicht mehr für die Studie der Distanzabhängigkeit verwendet werden, zeigten jedoch eindeutig in beiden Fällen eine CPD-Bildung und den Sauerstoffeinfluss auf die Belichtungsreaktionen auf. Neben den bereits erwähnten *crosslinks* schienen auch weitere DNA-Schäden durch Addukt-Bildung mit erhöhten Retentionszeiten zu entstehen. Aus diesen Erkenntnissen könnten daher in zukünftige Studien, mit der DNA-Architektur und Xanthonen als Photosensibilisatoren, Oxidationsschäden und DNA-Addukte untersucht und quantifiziert werden, um ein besseres Gesamtbild zu photoinduzierten DNA-Schäden zu erhalten.

Somit erfolgten die fortgesetzten Untersuchungen im Arbeitskreis Wagenknecht von S. Häcker und M. Schrödter mit den verwendeten C-Nukleosiden von Xanthon, Thioxanthon sowie einem neuen Photosensibilisator dem Triphenylen und sollen hier lediglich ergänzend erwähnt werden. Im Gegensatz zu den Xanthonen, welche durch einen $\pi\pi^*$ -Übergang (Carbonylgruppe) angeregt wurden, erfolgte die Anregung beim Triphenylen durch den $\pi\pi^*$ -Übergang. Diese Nukleoside wurden, wie in dieser Arbeit beschrieben, durch Heck-Kupplungen synthetisiert und in die entsprechend beschriebenen ternäre photoaktive DNA-Architekturen eingebaut. Zur Verifizierung und Quantifizierung der T-T-Dimerisierung wurde jedoch eine HPLC-Analyse in Kombination mit einer LC-MS-Analyse verwendet.^[128] Da bereits von einem TTET ausgegangen worden war, wurden DNA-Hybride mit Abständen vom Photosensibilisator zum CPD-Paar mit $n = 0, 1, 2$ und 3 synthetisiert, sowie eine Belichtungsdauer von 6 h ausgewählt. Die Hybride mit den entsprechenden Photosensibilisatoren wurden mit einer Wellenlänge von 305 nm (Triphenylen), 369 nm (Xanthon) und 385 nm (Thioxanthon) belichtet.

Hierbei wurde eine direkte CPD-Bildung bei Xanthon und Triphenylen als Sensibilisatoren beobachtet, wobei Thioxanthon jedoch keine CPD-Bildung hervorrief. Stattdessen wurden nur *Crosslinks* im Bereich von $9 - 17\%$ für die unterschiedlichen Abstände generiert, wodurch die vergleichsweise geringe Triplett-Energie von Thioxanthon als grenzwertig für die CPD-Bildung betrachtet wurde. Dies steht im Widerspruch zu den zuvor aufgezeigten Ergebnissen mit Thioxanthon, könnte aber aufgrund von verschiedenen Ursachen erfolgen. Neben möglicher Durchführungsabweichungen der Probenvorbereitung, sind die unterschiedlichen Analysemethoden der Ergebnisse zu erwähnen, sowie auch die Anwesenheit von *Crosslinks* in

diesen Ergebnissen.^[132] Dies könnte auf die Anwesenheit von Sauerstoff hindeuten, wodurch ein Einfluss auf die Ausbeuten zu erwarten wäre. Ebenso könnte die Belichtungsquelle (LED: 385 nm) im Vergleich beider Studien unterschiedliche Intensitäten, aufgrund von Alterung oder Seriennummer, ausweisen, wodurch es auch zu Ausbeute- und Ergebnisunterschieden kommen könnte.

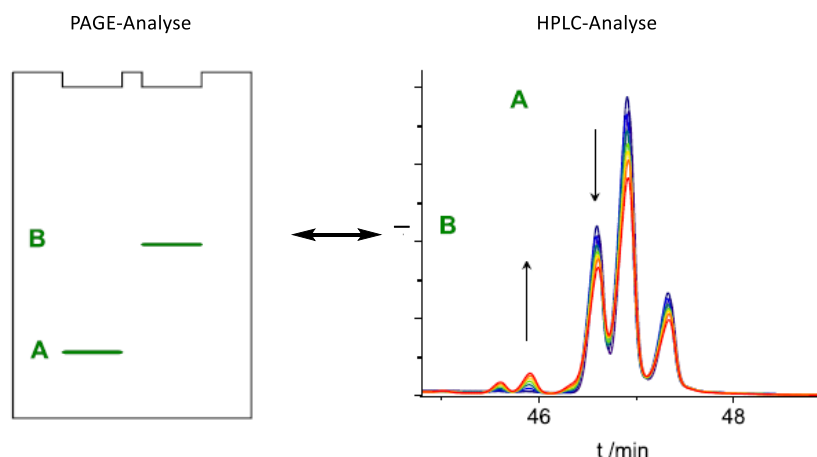


Abbildung 57: Vergleich der PAGE- und HPLC-Analyse. Abgeändert nach [128].

Nur Xanthon war in der Lage, eine CPD-Bildung durch einen Triplett-Energietransfer über bis zu sechs dazwischen liegende A-T-Basenpaare ($n = 3$) zu induzieren. So wurde eine maximale CPD-Ausbeute von 73 % bereits nach einer Stunde in direkter Nähe zum Photosensibilisator ($n = 0$) erreicht. Bei längerer Bestrahlung konnte ein Rückgang der Ausbeuten beobachtet werden, wobei eine gleichzeitige Zunahme von *Crosslinks* stattgefunden hatte, was das Verhalten erklären könnte. Ebenso wäre ein Reparaturmechanismus plausibel, da Xanthon mit einem Reduktionspotential von $E_{\text{red}} = 1,57 \text{ V}$ (gegen SCE) in der Lage wäre, CPD wieder zu öffnen.^[138,139] Für die Abstände $n = 1, 2$ und 3 wurden mit steigender Distanz sinkende Ausbeuten und eine Plateauausbildung nach 2 h Belichtung beobachtet. Daher konnte für Xanthon als Photosensibilisator eine exponentielle Distanzabhängigkeit mit einem Abschwächungsfaktor $\beta = 0,05 \text{ \AA}^{-1}$ beobachtet werden. Dieser war geringer als die bisher verglichenen Parameterwerte der erwähnten Photosensibilisatoren, passte aber zu dem Energietransfer des *Dexter*-Typs.

Schließlich wurde noch mit Triphenylen als Photosensibilisator Belichtungsexperimente durchgeführt. Hierbei musste mit einer Wellenlänge von 305 nm belichtet werden, um den Sensibilisator anregen zu können. Dies führte ebenso zu einer direkten Anregung der DNA als

Nebenreaktion mit einer CPD-Ausbeute in den Negativkontrollen von etwa 13 % nach 6 h Bestrahlung. So konnten CPD-Ausbeuten, nach Abzug der Negativkontrolle, nur in direkter Nähe zum Photosensibilisator nachgewiesen werden. Somit war kein Energietransfer über größere Distanzen mit Triphenylen möglich, was an der $\pi\pi^*$ -Anregung des Sensibilisators liegen könnte.

So scheint die Veränderung durch den Methoxy-Substituenten am Xanthon eine enorme Auswirkung auf den Energietransfer innerhalb der DNA zu haben, weswegen weitere Studien zur Aufklärung der Energiewanderung durch DNA von großer Bedeutung wären. In Anbetracht der Ergebnisse mit 3-Methoxyxanthon als Photosensibilisator und dem vorgeschlagenen Energie-Hüpfmechanismus, stellt sich ebenso die Frage nach dem genauen Mechanismus für den Triplett-Energietransfer des *Dexter*-Typs und möglichen Gemeinsamkeiten und den expliziten Unterschieden.

3.4.4 Benzo[c]xanthon

Erwähnenswert für diese Arbeit ist auch der Einsatz von Benzo[c]xanthon als Photosensibilisator für die photoinduzierte distanzabhängige CPD-Bildung. Jedoch konnte eine komplette und allumfassende Untersuchung nicht abschließend vollendet werden. So konnten einige Synthesestufen nicht vollständig aufgereinigt werden, wodurch keine komplette Analyse der Moleküle stattfinden konnte. Stattdessen wurden die leicht verunreinigten Zwischenstufen weiter umgesetzt, um Belichtungsreaktionen noch ermöglichen zu können. Entsprechend wird ein Vermerk im experimentellen Abschnitt bei den Synthesevorschriften aufgeführt. Die Synthese des C-Nukleosids (Abb.58) erfolgte dabei analog zum Syntheseweg der Xanthere. Ebenso erfolgte die Oligonukleotid-Synthese mit dem Photosensibilisator und die Belichtungsreaktionen nach dem bereits erwähnten Schema.

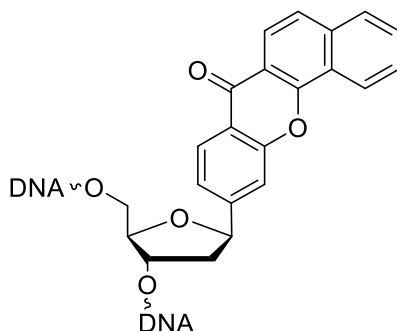


Abbildung 58: Benzo[c]xanthon als C-Nukleosid eingebaut in der DNA.

Die Belichtungsreaktionen wurden bei einer Wellenlänge von 385 nm durchgeführt, da Benzo[c]xanthon in diesem Bereich eine geringe Extinktion aufweisen konnte (Abb.59).

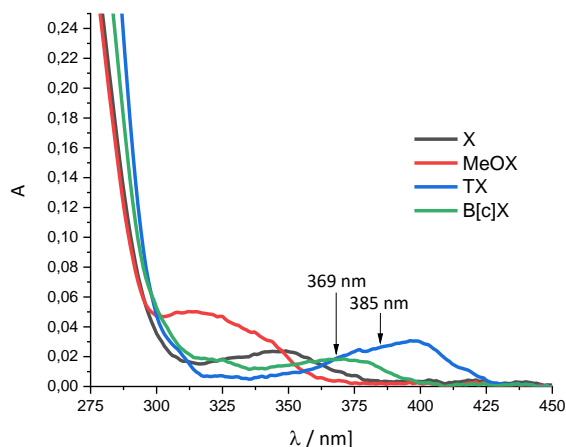


Abbildung 59: Ausschnitt der Absorptionsspektren der DNA-Einzelstränge **DNA-PS-0** mit der Photosensibilisator-Modifikation (PS = **X**, **MeOX**, **TX** oder **B[c]X**) mit $n = 2,5 \mu\text{M}$ **DNA-PS-0**, **DNA-T**, H_2O , 10 mM NaPi-Puffer (pH 7,0), 250 mM NaCl.

Die Belichtungsreaktionen konnten aufgrund der geringen Oligonukleotid-Ausbeuten der jeweiligen Stränge nur zweimal wiederholt werden, wodurch keine ausreichende Reproduktion der Ergebnisse vorlag und die Daten mit einer größeren Abweichung zu betrachten sind (Abb.60).

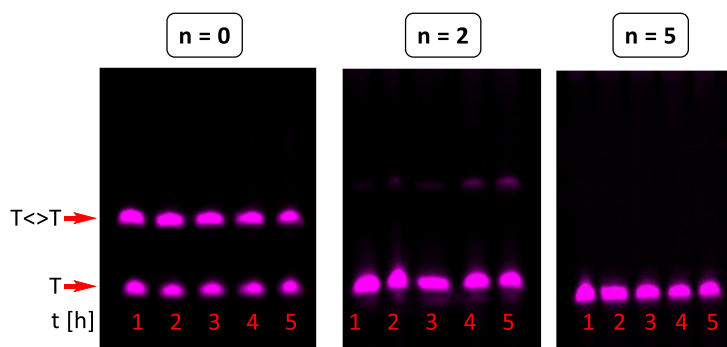
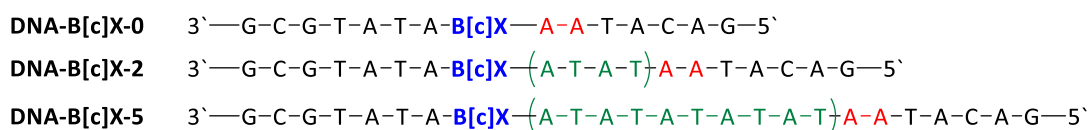


Abbildung 60: Synthetisierte Oligonukleotide mit Benzo[c]Xanthon als Photosensibilisator (oben) und PAGE-Analyse: Zeitlicher Belichtungsverlauf von **DNA-B[c]X-n-TT** (mit n = 0, 2 und 5); Bedingungen: 2,5 μ M **DNA-MeOX-0**, 2,5 μ M **DNA-0-T** und 2,5 mM **DNA-T**, H₂O, 10 mM NaP_i-Puffer (pH 7,0), 250 mM NaCl, 385 nm LED, 10 °C (unten).

In direkter Nähe zum Photosensibilisator konnte eine deutliche CPD-Bildung beobachtet werden, wobei eine CPD-Ausbeute von 54 % nach 5 h erreicht werden konnte (Tab.6). Jedoch hatte sich hier ein Plateau bereits nach einer Stunde Belichtung ausgebildet. In einem Abstand mit 4 AT-Paaren (n = 2) konnte ebenso noch eine CPD-Ausbildung mit 10,1 % festgestellt werden und bei einem Abstand von n = 5 gab es keine Dimer-Bildung mehr.

Tabelle 6: Ausbeutevergleich von **DNA-B[c]X-0-TT**, **DNA-B[c]X-2-TT** und **DNA-B[c]X-5-TT** nach 5 h Belichtung.

DNA-B[c]X-n-TT	n = 0	n = 2	n = 5
Ausb. [%]	54	10,1	0

So konnte auch hier festgestellt werden, dass der TTET vom angeregten Benzo[c]Xanthon entlang der DNA-Doppelhelix eine exponentielle Distanzabhängigkeit aufweist. Da es zu diesem Photosensibilisator keine Literaturangaben über die Photochemie gab, wurde eine

mögliche Triplet-Chemie aufgrund des erweiterten π -Systems angenommen. Durch diese ersten Ergebnisse konnte daher Benzo[c]xanthon als Triplet-Photosensibilisator identifiziert werden. Zur Analyse der Distanzabhängigkeit wurde hier ebenso der monoexponentielle Zerfall verwendet. Daher ergab sich im Falle von Benzo[c]xanthon ein systemspezifischer Abschwächungsfaktor von $\beta = 0,124 \pm 0,006 \text{ \AA}^{-1}$. Dieser traf wiederum mit den bereits ermittelten Parameterwerten für die restlichen Triplet-Sensibilisatoren sehr gut überein.

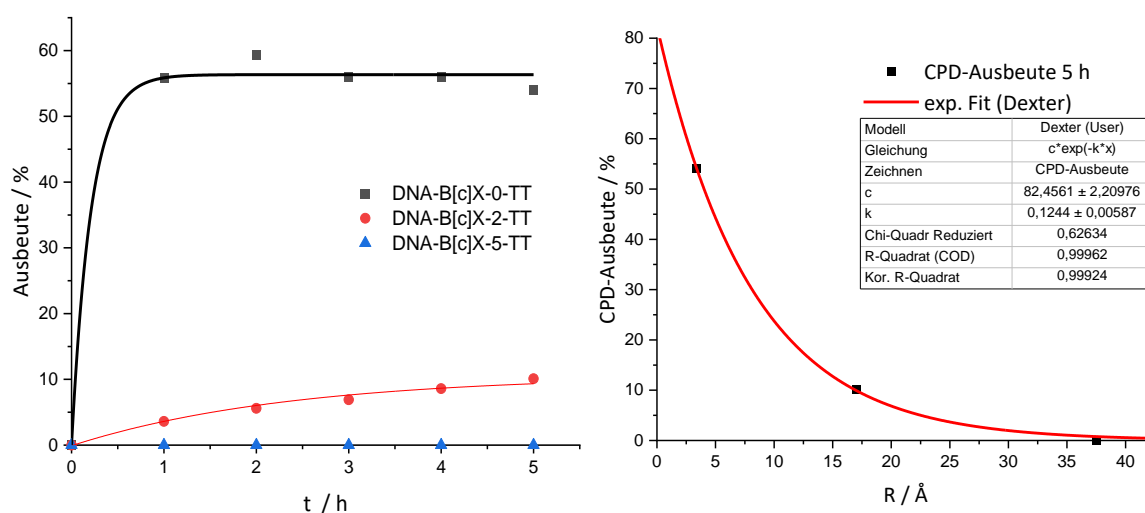


Abbildung 61: CPD-Ausbeuten im zeitlichen Verlauf (links) und Distanzabhängigkeit (rechts) der DNA Hybride (n=0, 2, 5) mit Benzo[c]Xanthon als Photosensibilisator.

3.5 Ungebundene Photosensibilisatoren und CPD-Bildung

Methoxyxanthon hat sich als ein ausgezeichneter Singulett-Photosensibilisator herausgestellt, jedoch ist dieser rein synthetisch verfügbar und besitzt daher kein natürliches Vorkommen. So ist eine Exposition mit diesem Molekül unwahrscheinlich. Weiterhin entspricht die verwendete DNA-Architektur mit definierten Abständen und Sequenzen nicht den tatsächlichen Vorgängen im Organismus, sondern diene zur Bestimmung der Mechanismen und Quantifizierung der Schäden. Da eine Vielzahl an Sensibilisatoren existiert, mit denen der Mensch häufig in Kontakt tritt, sind deren Auswirkungen auf die DNA von besonderem Interesse. Daher wurde zum Abschluss dieser Arbeit eine Reihe an Molekülen ausgewählt, die als potenzielle Photosensibilisatoren wirken könnten. Hierbei wurden einige synthetisiert und andere wiederum kommerziell erworben. Bei der Auswahl wurde auf einen Absorptionsbereich oberhalb 315 nm geachtet, um die direkte Anregung der DNA möglichst zu vermeiden. Für die Untersuchungen sollten diese als ungebundene Moleküle in der Lösung vorliegen und durch Interkalation in der DNA durch Bestrahlung einer passenden Wellenlänge CPD-Formationen bilden. Dafür wurde die DNA-Architektur so angepasst, dass das CPD-Paar etwa mittig vom Hybrid positioniert war. Weiterhin wurde der kommerziell erworbene Hybrid **DNA-Z** im Vergleich zur vorherigen DNA-Architektur **DNA-X** verlängert und an den Enden vermehrt G-C- Paare eingesetzt, um eine bessere Stabilität der Hybridisierung zu gewährleisten (Abb.63).

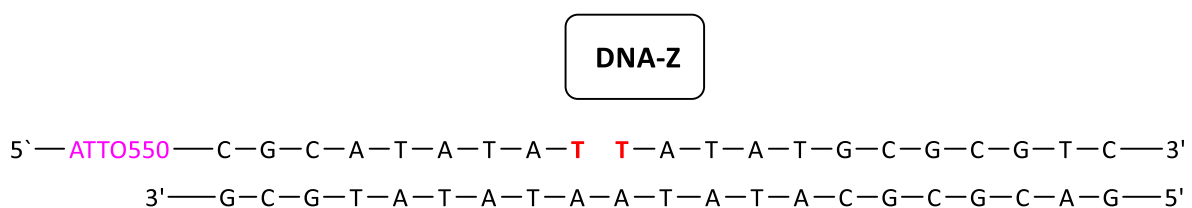


Abbildung 62: Angepasste DNA-Architektur: **DNA-Z** ohne eingebauten Photosensibilisator.

Die potenziellen Photosensibilisatoren wurden bei der Probenvorbereitung stets nach der Hybridisierung der **DNA-Z** in die wässrige Puffer-Lösung gegeben. Für einen besseren Vergleich zu bisherigen Ergebnissen wurde das Verhältnis von DNA zu Photosensibilisator bei 1:1 belassen. Ebenso wurden die Belichtungsreaktionen bei 10 °C und unter Sauerstoffausschluss in einer Argon-Atmosphäre durchgeführt.

Im Allgemeinen war eine größere Ungenauigkeit zur vorherigen Vergleichs-Architektur **DNA-X** zu berücksichtigen, da die Interkalation der Photosensibilisatoren in die DNA nicht zu gewährleisten war und sowohl die Position als auch die Anzahl der interkalierten Moleküle nicht vorgegeben werden konnte. Jedoch bot das ausgewählte System einen besseren Vergleich zu einem natürlichen Vorgang mit vielen verschiedenen Variablen.

Bei der Untersuchung der Negativ-Kontrollen wurde jedoch, anders als bei **DNA-X**, eine Ausbildung von CPD bei einer Bestrahlung mit 369 nm beobachtet (Abb.65). Die Ausbeuten lagen hierbei bei etwa 6 % nach 24 h und 7 % nach 48 h. In Anbetracht der Fehlertoleranzen bzw. Messungenauigkeit konnte davon ausgegangen werden, dass nach 24 h kaum zusätzliches CPD gebildet wurde. So schien der Sequenzunterschied zum vorherigen System und die damit einhergehende Erhöhung der Schmelztemperatur die CPD-Bildung zu ermöglichen.

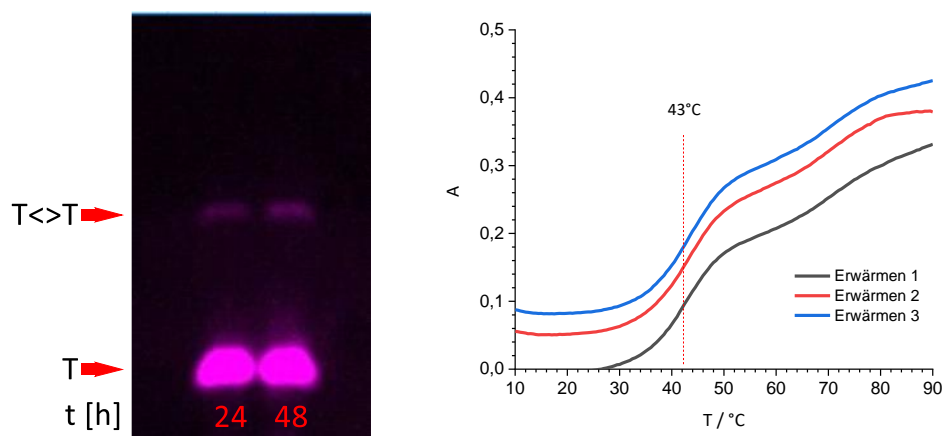


Abbildung 63: DNA-Z: Banden der Blindproben nach gelelektrophoretischer Auswertung (links) und die Schmelztemperaturen (rechts).

Bei der zuvor verwendeten Architektur **DNA-X** könnte eine stärkere Fluktuation des Hybridisierungszustands die gleichzeitige Bindung beider komplementärer DNA-Stränge unwahrscheinlicher machen, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung der Thymin-Dimere sinken würde.^[140] Darüber hinaus konnten *Krueger, Protozanova & Frank-Kamenetskii*^[141] die Temperaturabhängigkeit der Wahrscheinlichkeit zur Basenpaaröffnung beschreiben. Bedeutend hierbei war die Schmelztemperatur, bei welcher 50 % der DNA hybridisiert vorlag. Daher wurde die Annahme getroffen, dass in der Nähe des Schmelztemperaturbereichs größere Sequenzabschnitte geöffnet waren, während bei

sinkender Temperatur die Hybridisierung zunahm und übergangsweise einzelne Basenpaaröffnungen möglich waren. Dies würde somit das gegensätzliche Verhalten der beiden DNA-Architekturen erklären. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde daher eine Negativ-Kontrolle von **DNA-Z** bei $T_m = 37\text{ °C}$ in An- und Abwesenheit von Photosensibilisatoren belichtet. Hierbei wurden keine CPD-Ausbeuten generiert. Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme der dynamischen Fluktuation der Basenpaare. So war die Schmelztemperatur aufgrund des geringeren GC-Anteils, sowie den insgesamt kürzeren Strängen bei **DNA-X**, weit unter der des Hybrids **DNA-Z**. Die gewählte Belichtungstemperatur von 10 °C lag folglich im nahen Bereich der Schmelztemperatur von **DNA-X**. Aus diesem Grund war die Fluktuation stärker ausgeprägt, weshalb keine Ausbildung von CPD-Schäden in den Blindproben von **DNA-X** beobachtet wurde. Ein möglicher Einfluss des Atto550-Farbstoffs auf die CPD-Bildung wurde aufgrund der Distanz zum CPD-Paar und den dazwischen liegenden GC-Paaren, welche den Energietransfer stören, ausgeschlossen.

3.5.1 Synthetische Photosensibilisatoren

Für den Vergleich beider DNA-Architekturen wurde Xanthon als Triplett-Photosensibilisator ausgewählt. Zwar wäre Methoxyxanthon auch eine mögliche Wahl gewesen, doch aufgrund des weitreichenden Singulett-Energietransfers hatte der Photosensibilisator ein Alleinstellungsmerkmal und wäre daher mit anderen, häufiger vorkommenden, Triplett-Sensibilisatoren nicht vergleichbar (Abb.64).

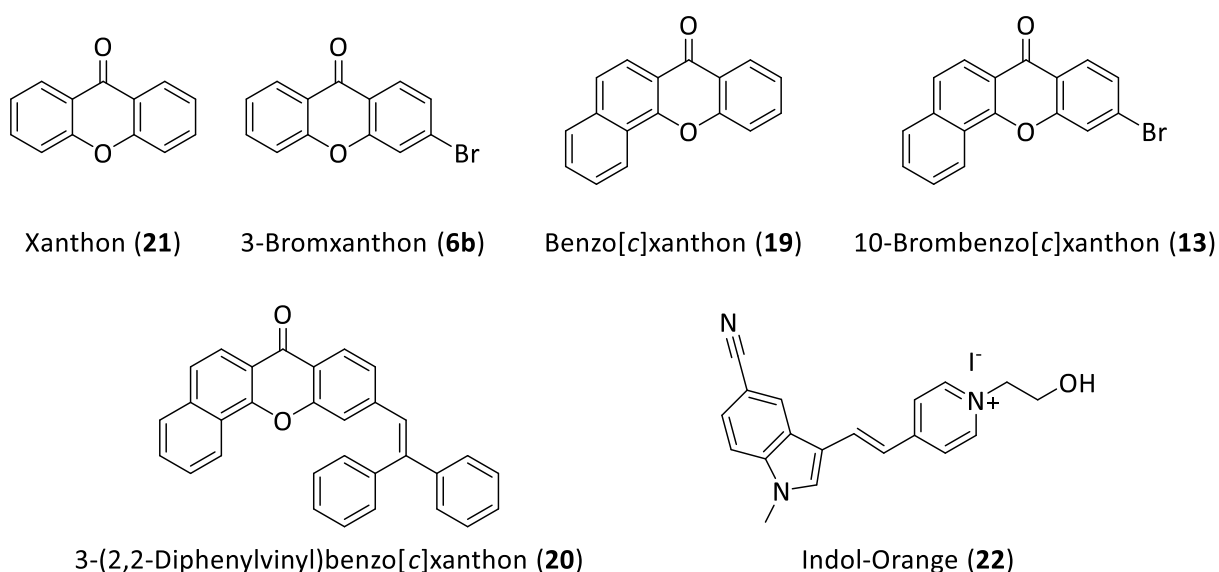


Abbildung 64: Synthetische Photosensibilisatoren **6b**, **13**, **19-22**.

Ebenso wurde 3-Bromoxanthon (**6b**) eingesetzt, um einen möglichen Einfluss des Bromatoms zu untersuchen, welches durch den Schweratomeffekt über einen effizienteren ISC und daher einen langlebigeren Triplett-Zustand verfügen könnte. Analog dazu sollte ebenfalls anhand der Benzo[c]xanthone **13** und **19** dieses Verhalten aufgezeigt werden. Des Weiteren wurden größere aromatische Systeme **20** und Indol-Orange (**22**) für diese Untersuchungen ausgewählt. Im Gegensatz zu den Xanthonen **6b**, **13**, **19-21** war das Indol-Orange **22** ein synthetischer Farbstoff, der im Arbeitskreis *Wagenknecht* hergestellt und wegen der starken Fluoreszenz als Farbstoff in fluoreszenten Sonden verwendet wurde.

Anhand der Absorptionsspektren sollte überprüft werden, ob eine Anregung bei 365 nm möglich war (Abb.65). Die geringe Absorbanz von Xanthon **21** in diesem Bereich wurde bereits in vorherigen Kapiteln diskutiert. Aufgrund der photophysikalischen Eigenschaften von Xanthon war diese geringe Extinktion ausreichend für eine Anregung des Sensibilisators. Analog dazu wurde dasselbe Verhalten vom bromierten Derivat angenommen. Nachfolgend sind die Extinktionskoeffizienten der Sensibilisatoren bei 365 nm aufgelistet (Tab.7).

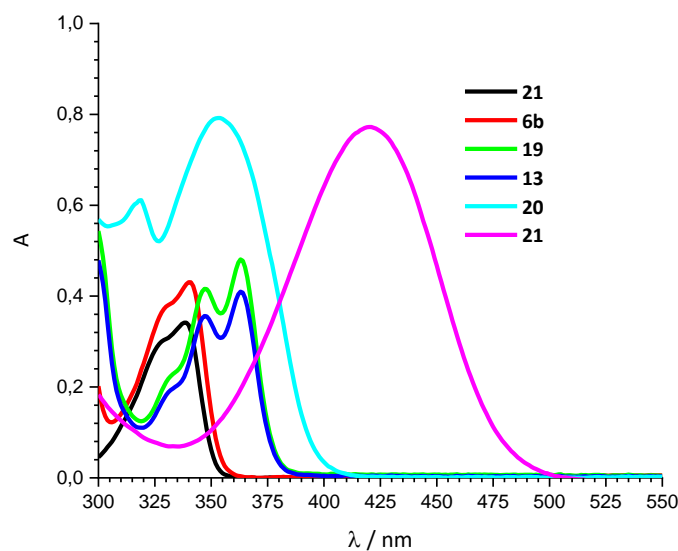


Abbildung 65: Absorptionsspektren der synthetischen Sensibilisatoren in einer 50 µM Lösung; RT, Acetonitril (**21**), DMSO (**6b**, **13**, **19**, **20**), ddH₂O (**22**).

Tabelle 7: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten bei 365 nm der synthetischen Sensibilisatoren **6b**, **13**, **19-22**.

Sensibilisator	Lösungsmittel	Absorptionsmaxima [nm]	ϵ [L/(mol*cm)] bei 365 nm
6b	DMSO	340	(29)
13	DMSO	347, 363	8.000
19	DMSO	347, 363	9.300
20	DMSO	319, 353	14.300
21	Acetonitril	338	(12)
22	ddH ₂ O	421	6.200

Die Quantifizierung der CPD-Ausbeuten erfolgte wie auch zuvor anhand der PAGE-Analyse. Da die Negativ-Kontrolle jedoch eine CPD-Bildung durch direkte Anregung aufzeigte, wurden die Ausbeuten durch diesen Wert runterkorrigiert, um nur die durch Photosensibilisator induzierten CPD-Ausbeuten zu vergleichen (Tab.8). So konnte Xanthon **21** eine Ausbeute von 18 % bereits nach 24 h erreichen. Eine längere Bestrahlung führte zu keiner zusätzlichen CPD-Bildung. Dies bestätigte die Ergebnisse des Xanthon-C-Nukleosids **1b**, bei dem das Maximum bzw. die Plateauausbildung bereits nach einer Stunde erreicht wurde. Ebenso ist die Ausbeute vergleichbar mit der vom Hybrid **DNA-X-2-TT** (n = 2; 4 AT-Paare) mit einer Ausbeute von etwa 20 %. Das gleiche Verhalten war auch bei Benzo[c]xanthon zu beobachten. Mit einer Ausbeute von 11 % nach 24 h als ungebundener Photosensibilisator war diese vergleichbar zum Hybrid **DNA-B[c]X-2-TT** mit einer CPD-Ausbeute von 10,1 %. Dies könnte entweder Rückschlüsse zu der Position der Interkalation der Photosensibilisatoren geben oder beruht rein auf zufälliger Verteilung entlang der DNA und der daraus resultierenden Durchschnittsausbeuten. Die höchste Ausbeute von ~35 % wurde jedoch von Indol-Orange **22** generiert, wobei die maximale Ausbeute ebenso bereits nach 24 h erreicht wurde. Wie zuvor bereits erwähnt, wies das Indol-Orange **22** eine starke Fluoreszenz auf, was auf Singulett-Chemie hindeutete und damit analog zum Methoxyxanthon-C-Nukleosid **1a** die hohen CPD-Ausbeuten erklären könnte. Daher wären weitere Untersuchungen mit Indol-Orange **22** als Photosensibilisator, in Anbetracht des Anwendungsbereichs als fluoreszente Sonde in DNA, von relevantem Interesse.

Tabelle 8: CPD-Ausbeuten der synthetischen Sensibilisatoren **6b**, **13**, **19-22** nach Abzug der Negativ-Kontrolle.

Zeit	6b	13	19	20	21	22
24 h	10 %	7 %	11 %	1 %	18 %	34 %
48 h	10 %	7 %	11 %	0 %	18 %	35 %

Hingegen waren keine Ausbeuten nach Abzug der Negativ-Kontrolle bei **20** zu beobachten. Dies könnte an der Molekülstruktur gelegen haben, die eine Interkalation in die DNA erschwerte und somit zu keinem Energietransfer geführt hatte. Die bromierten Derivate **6b** und **13** haben im Vergleich sowohl beim Xanthon **21** als auch beim Benzo[c]xanthon **19** zu einer Reduktion der CPD-Ausbeuten geführt. Dabei wäre eine Störung der Interkalation durch das Bromatom oder aber unterschiedliche photophysikalische Eigenschaften denkbar. So wären eine nicht optimale Orbitalüberlappung und Orientierung in der DNA die wahrscheinlichsten Gründe für die geringere CPD-Ausbeute.

3.5.2 Kosmetika

In vielen verschiedenen kosmetischen Produkten, wie Sonnencremes und Schminke, werden UV-Filter zum Schutz vor Sonnenbränden, Hautkrebs und zur Verlangsamung der Hautalterung eingesetzt.^[142,143] Dabei absorbieren organische Filter die UV-Strahlung. Im Laufe der Relaxation der angeregten UV-Filter können verschiedene photophysikalische Prozesse stattfinden. Daher könnten UV-Filter potenziell zur Entstehung von CPD-Schäden beitragen. Aus diesem Grund wurden drei UV-Filter für die Untersuchung der CPD-Bildung ausgewählt: Avobenzon, Bisotrizol und Oxybenzon

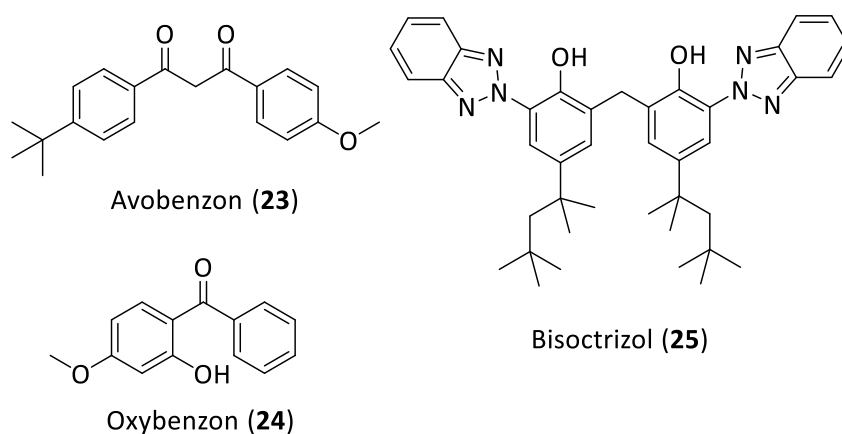


Abbildung 66: Häufig verwendete UV-Filter **23-25** in kosmetischen Produkten.

Da die Bezeichnung UV-Filter eine Absorption in diesem Bereich suggeriert, konnte davon ausgegangen werden, dass eine Anregung mit 365 nm möglich war. Zur Sicherheit wurden die Absorptionsspektren dieser Verbindungen aufgenommen. In der nachstehenden Tabelle sind die Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten bei der Belichtungswellenlänge 365 nm angegeben.

Tabelle 9: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten bei 365 nm der organischen UV-Filter.

UV-Filter	Lösungsmittel	Absorptionsmaxima [nm]	ϵ [L/(mol*cm)] bei 365 nm
Avobenzon 23	Acetonitril	362	66.000
Oxybenzon 24	Acetonitril	325	1.200
Bisotrizol 25	DMSO	303, 344	4.800

Die Ausbeuten der entstandenen CPD-Schäden durch Avobenzon **23** und Oxybenzon **24** nach 24 h bzw. 48 h waren mit 1 % und 3 % in der Toleranzabweichung der Messungen und Durchführung im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen enthalten (Tab.10). Somit konnten diese vernachlässigt werden. Bisotrizol **25** hingegen konnte nach 48 h eine CPD-Zunahme um 6 % erzeugen. Da UV-Filter zum Schutz vor UV-Strahlung eingesetzt werden, war eine mögliche Abnahme der CPD-Schäden in Betracht gezogen worden. Dies konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr wurde bei Bisotrizol **25** sogar eine Zunahme beobachtet.

Tabelle 10: CPD-Ausbeute mit UV-Filter nach Abzug der Blindproben.

Zeit	Avobenzon 23	Oxybenzon 24	Bisotrizol 25
24 h	1 %	1 %	2 %
48 h	3 %	3 %	6 %

Eine verstärkte CPD-Bildung erhöht die Wahrscheinlichkeit der Mutationsentstehung, welche wiederum mit einer Wahrscheinlichkeit der Entartung der Zelle zu einer Hautkrebszelle korreliert. Daher würde hierbei ein gegenteiliger Effekt zum Anwendungszweck erreicht werden. Bei solchen Prozessen ist die räumliche Nähe zwischen der DNA und dem Photosensibilisator entscheidend, welche nach topischer Applikation eine Penetration in die Hautzellen voraussetzt. In Anlehnung an die „500 Da Regel“ von *Bos & Meinardj*^[144] können Stoffe mit einem niedrigen Molekulargewicht, wie Avobenzon **23** und Oxybenzon **24**, die Hornschicht passieren und durch die Zellmembranen diffundieren, Bisotrizol **25** hingegen nicht. Jedoch konnten *Mavon et al.*^[145] eine geringfügige Penetration nachweisen, welche im Rahmen der durchgeführten Studie als nicht relevant deklariert wurde. Angesichts der langen Bestrahlungszeiten von bis zu 48 h und den geringen Konzentrationen bzw. Verhältnissen der untersuchten Stoffe zum Hybrid, waren die CPD-Ausbeuten von keiner großen Relevanz. Daher wäre eine stark erhöhte Konzentration der UV-Filter für zukünftige Untersuchungen auf diesem Gebiet sinnvoll.

Ebenso musste berücksichtigt werden, dass die Photoinstabilität des Avobenzons durch den Zusatz von Photostabilisatoren in Kosmetika vermindert wird. Die geringere Stabilisierung in unpolaren Medien begünstigt die Photodegradierung und führt zu einem angeregten Triplett-Zustand der Keto-Form, die eine Photolyse durchläuft.

3.5.3 Medikamente

Eine große Anzahl synthetischer und natürlicher Pharmaka besitzen ein aromatisches Grundgerüst. Je nach Größe des aromatischen Systems und dessen Substituenten kann Sonnenlicht im UV/VIS-Bereich von diesen Stoffen absorbiert werden. Nach systemischer oder topischer Applikation einiger dieser Medikamente wurde eine erhöhte Lichtempfindlichkeit der Haut dokumentiert, die auf eine sensibilisierende Wirkung des Pharmakons zurückzuführen war.^[17] Vor allem niedermolekulare Stoffe, sogenannte „*small molecules*“, sind in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren und an der DNA anzulagern oder in diese zu interkalieren. Genau diese Eigenschaft macht *small molecules* für die Anwendung als Medikament attraktiv. Jedoch ist hierbei die unspezifische Anreicherung sehr problematisch, da das Pharmakon von nahezu allen Gewebe- und Organzellen, wie beispielsweise der Haut resorbiert wird.^[145] Die in die Hautzellen eingedrungenen Pharmaka können dann durch UV-Strahlung als Photosensibilisatoren wirken und über Energietransfermechanismen DNA-Schäden induzieren. Neben der photoassistierten Entstehung von DNA-Schäden, können ebenfalls Proteine, Lipide und weitere Zellkompartimente durch das angeregte Pharmakon beeinträchtigt werden.^[147] Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit ausgewählte Pharmaka auf ihr Potential zur CPD-Bildung untersucht.

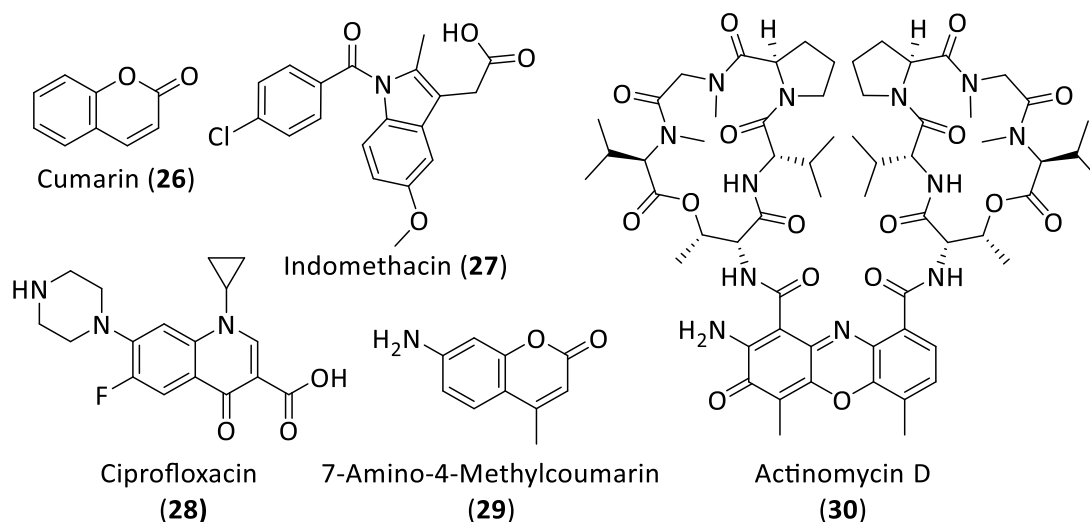


Abbildung 67: Pharmaka 26-30 in Antibiotika, Analgetika und Zytostatika.

Hierfür wurden auf Grundlage der Xanthone fünf strukturell unterschiedliche Pharmaka **26-30** mit Carbonyl-Gruppen ausgewählt. Diese umfassten die Antibiotika

7-Amino-4-Methylcumarin **29** und Ciprofloxacin **26**, sowie das Analgetikum Indomethacin **27**. Weiterhin wurde das Zytostatikum Actinomycin D **30** ausgewählt, welches in der Therapie von Tumorzellen und als Antibiotikum angewendet wird. Abschließend wurde Cumarin **26** für die Untersuchungen ausgewählt, da es als Grundgerüst für eine Vielzahl von Pharmaka dient. 7-Amino-4-Methylcumarin **29** zeigte die stärkste Absorbanz der untersuchten Pharmaka auf und Cumarin **26** die schwächste (Abb.68). Die zusätzlichen Amino- und Methylgruppen führten etwa zu einer dreifachen Verstärkung der Absorption sowie einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums vom 7-Amino-4-Methylcumarin **29**. Actinomycin D **30** zeigte hingegen als einziges der ausgewählten Pharmaka eine starke Absorption im sichtbaren Bereich bis zu einer Wellenlänge von 600 nm. Bei Ciprofloxacin **28** und Indomethacin **27** konnte hingegen eine Absorption im UV-A-Bereich bis ca. 400 nm festgestellt werden. Somit konnten alle ausgewählten Medikamente durch UV-Strahlung angeregt werden (Tab.11).

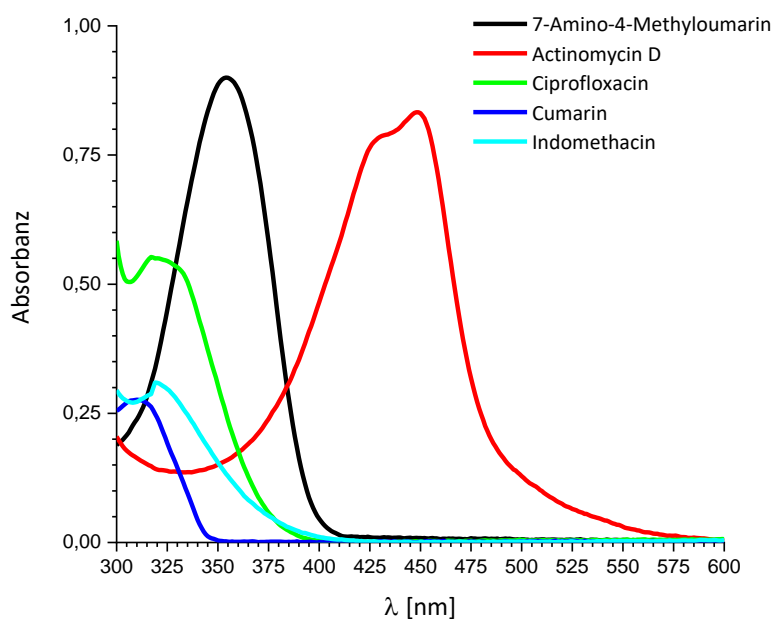


Abbildung 68: Absorptionsspektren der Medikamente in 50 µM Ethanol-Lösung bei Raumtemperatur.

Tabelle 11: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten bei 365 nm der Pharmaka **26-30**.

Medikamente	Lösungsmittel	Absorptionsmaxima [nm]	ϵ [L/(mol*cm)] bei 365 nm
26	Ethanol	312	(23)
27	Ethanol	319	1.700
28	Ethanol	324	2.600
29	Ethanol	356	16.000
30	Ethanol	448	3.500

Im Allgemeinen war ein vergleichbarer Anstieg der CPD-Schäden durch die Pharmaka zu beobachten. So entsprach die CPD-Ausbeute von Actinomycin D **30**, Ciprofloxacin **28** und Cumarin **26** lediglich 1 % nach 24 h Belichtung (Tab.12). Somit konnten diese Ausbeuten vernachlässigt werden. Ebenso vernachlässigbar waren die Ausbeuten von Indomethacin **27** mit 0 % bzw. 3 % nach 24 und 48 h. Die Zunahme der CPD-Schäden durch das 7-Amino-4-Methylcumarin **29** mit 2 % nach 24 h sowie 3 % nach 48 h waren ebenso sehr gering. Auffallend hingegen waren die CPD-Formationen nach 48 h bei Ciprofloxacin **28** mit einer Zunahme um 7 %, welche die größte Ausbeute an CPD-Schäden von allen Medikamenten war, sowie von Cumarin **26** und Actinomycin D **30** mit Ausbeuten von 6 %.

Tabelle 12: Ausbeute der dimerisierten Stränge der Pharmaka Proben nach Abzug der Blindprobe.

Zeit	26	27	28	29	30
24 h	1 %	0 %	1 %	2 %	1 %
48 h	6 %	3 %	7 %	3 %	6 %

Bei der Entwicklung eines Wirkstoffs wird oftmals das Design an einen hochspezifischen Bindungspartner angepasst. Hierbei wird auf eine effiziente Interaktion mit dem Zielmolekül, sowie eine gute Resorption und körperliche Verträglichkeit geachtet. Vier der fünf ausgewählten Medikamente sind *small molecules*. Ausschließlich Actinomycin D, mit einem Molekulargewicht von 1255.44 g/mol, kann nicht durch Diffusion in Zellen eindringen. Grundsätzlich ist eine möglichst geringe photosensibilisierende Wirkung von Pharmaka bei Anreicherung in Zellen erstrebenswert, was in vielen Fällen aufgrund der Molekülstruktur nicht vermeidbar ist. So wurde die photosensibilisierende Wirkung des Ciprofloxacin von

Ferguson & Johnson^[147] untersucht und diese als phototoxisch eingestuft. Für Indomethacin hingegen konnte keine photosensibilisierende Wirkung beobachtet werden.^[149] Die CPD-Ausbeuten für diese Medikamente stützen diese Studien, auch wenn eine permanente Exposition durch Sonnenlicht 24 h nicht überschreitet. Jedoch ist die Dauer der Anwendung und die Geschwindigkeit des Abbaus der Medikamente ebenfalls entscheidend. Eine Anreicherung in den Zellen aufgrund der langsamen Metabolisierung bei längeren Therapien könnte ebenfalls in einer verstärkten CPD-Bildung resultieren. Dementsprechend können phototoxische Reaktionen, trotz geringer Ausbildung von CPD-Schäden, verzögert auftreten. Aus diesem Grund sind die CPD-Ausbeuten nach 48 h nicht zu vernachlässigen. Vielmehr ist der umgekehrte Rückschluss in Anbetracht der Studie von *Ferguson & Johnson* gravierend. So können bereits geringe Mengen an zusätzlich induzierten CPD-Schäden signifikante Auswirkungen auf die Zellen haben. Neben Ciprofloxacin ist auch für Actinomycin D und Cumarin eine ähnlich starke photosensibilisierende Wirkung anzunehmen.

Die geringeren CPD-Ausbeuten beim 7-Amino-4-Methylcumarins im Vergleich zum Cumarin konnten auf die Aminofunktion zurückgeführt werden, da diese eine Ladungstrennung innerhalb des Moleküls ermöglicht und folglich einen Energietransfer unterbindet.

Die erhaltenen CPD-Ausbeuten mit Actinomycin D waren mit denen des Ciprofloxacins und Cumarins vergleichbar. Daher war anzunehmen, dass die sterisch anspruchsvollen Pentapeptidlactone kaum die Interkalation in die DNA hinderte. Eine Evaluation der photosensibilisierenden Wirkung von Actinomycin D war aufgrund der zytotoxischen Wirkung nicht entscheidend, da diese lediglich eine leichte Beschleunigung in der Apoptose bzw. Nekrose der Zellen hervorrufen würde. Vielmehr sollte bei den Untersuchungen gezeigt werden, dass selbst sehr große und sterisch anspruchsvolle Moleküle in die DNA interkalieren und Schäden verursachen können.

CPD-Paare Aufschluss über die Sequenzabhängigkeit (3'-oder 5'-Positionierung), den Einfluss der Methyl-Modifikation und die Wechselwirkung mit Guanin als Nachbarbase zum CPD-Paar geben (Abb.70).

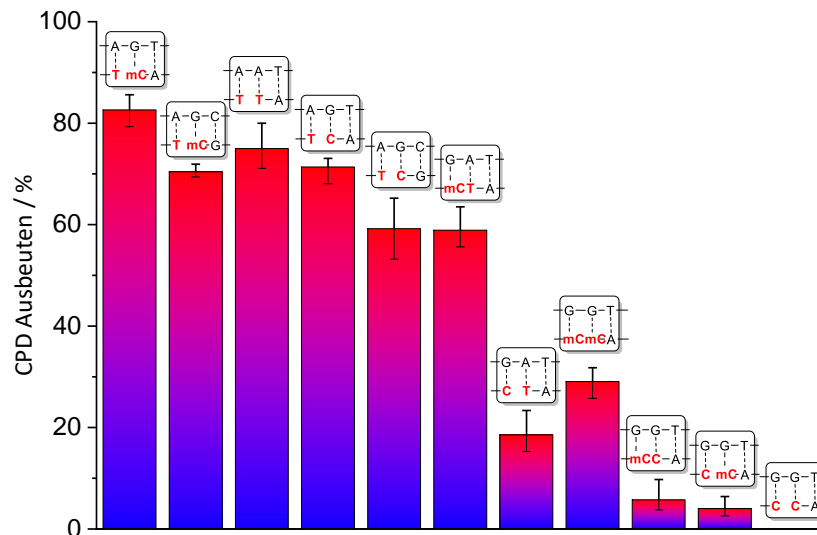


Abbildung 70: Vergleich aller gemischter CPD-Ausbeuten. Abgeändert nach [125]

Im Gegensatz zu 3-Methoxyxanthon-Sensibilisator konnten die Untersuchungen zu den Triplett-Sensibilisatoren Xanthon und Thioxanthon nur in Kooperation mit *Wagenknecht et al.* abgeschlossen, sowie für Benzo[c]xanthon nur teilweise durchgeführt werden. Daher konnten CPD-Schäden quantifiziert werden und die Ergebnisse für diese Sensibilisatoren den exponentiellen Triplett-Energietransfer vom *Dexter*-Typ bestätigen, sowie die Vergleichbarkeit der Prozesse anhand des Abschwächungsfaktor β verdeutlichen. Da der Triplett-Energietransfer im Allgemeinen als gleichzeitiger Elektronen- und Lochtransport in entgegengesetzter Richtung angesehen wird, wäre ein Hüpfmechanismus wie vorgeschlagen, beim Singulett-Energietransfer vom Methoxyxanthon durchaus denkbar. Dies müsste aber in zukünftigen Studien und unterschiedlichen Analysemethoden bestätigt werden.

Schließlich lieferten die Belichtungsreaktionen zu den potenziell photosensibilisierenden Molekülen und der resultierenden CPD-Bildung nicht nur einen groben Überblick zu den im Labor synthetisierten Verbindungen, sondern auch zu den bereits auf dem Markt verfügbaren und eingesetzten Bestandteilen in Kosmetika und Pharmaka (Ab.71). Im Hinblick auf bereits veröffentlichte Studien zur Phototoxizität mancher Verbindungen waren die erzeugten

Ergebnisse umso überraschender. So hätten bereits geringe zusätzlich erzeugte CPD-Schäden einen gewaltigen Einfluss auf die Zellmechanismen im menschlichen Körper.

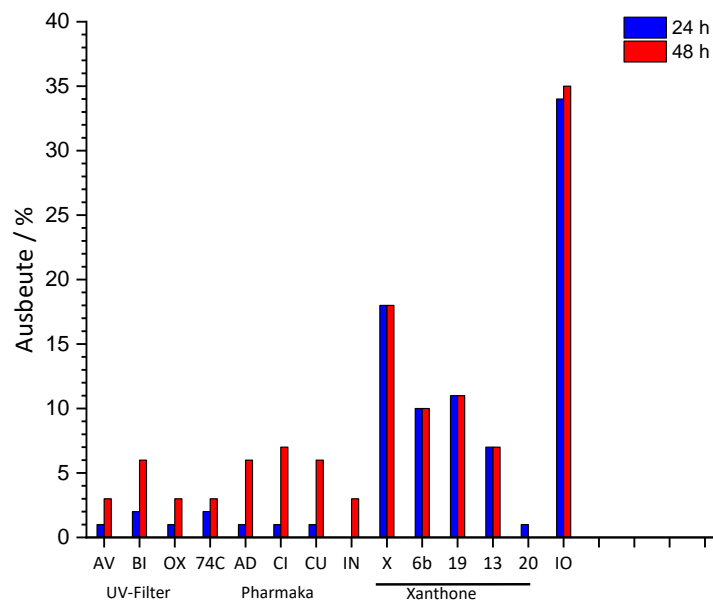


Abbildung 71: Überblick zu allen CPD-Ausbeuten nach 24 und 48 h Belichtung und Abzug der Negativ-Kontrollen.

Durch die verwendete DNA-Architektur mit unterschiedlichen Photosensibilisatoren konnten schnell und umfassend quantitative und qualitative Resultate zur photoinduzierten CPD-Bildung generiert werden. Somit wäre eine Ausweitung auf weitere Photosensibilisatoren und eine Anpassung der DNA-Architektur zum T-mC-Paar (als CPD-Paar) sinnvoll, um die Belichtungsdauer zu reduzieren und höhere Ausbeuten sowie größere Energietransfer-Distanzen zu erhalten.

Zusammenfassend könnten die Ergebnisse das Verständnis von Lichtinduzierten DNA-Schäden und den daraus resultierenden Mutationen erweitern, sowie bei der Prävention und Bekämpfung von Hautkrebs und anderen photoinduzierten Erkrankungen weiterhelfen.

5 Experimenteller Abschnitt

Im Folgenden soll auf die angewandte Methodik und der dazugehörenden Analytik dieser Arbeit eingegangen werden.

5.1. Verwendete Materialien und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die zur Synthese verwendeten Lösemittel wurden mindestens in der Reinheitsstufe p.a. (*pro analysi*) verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Sigma Aldrich* und *Acros Organics* bezogen, unter Argon aufbewahrt und gehandhabt. Zur Aufarbeitung und säulenchromatischen Trennverfahren wurden, falls nicht anders angegeben, technische, abdestillierte Lösungsmittel verwendet. Für HPLC-Trennungen wurden hochreine Lösungsmittel (HPLC grade) sowie doppelt deionisiertes Wasser (*Milli-Q®* Direct 8/16 Anlage der Firma *Merck Millipore*) genutzt. Verwendete Puffer wurden vor dem Gebrauch filtriert. Die bei der Synthese verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *ABCR*, *Acros Organics*, *Alpha Aesar*, *Apollo Scientific*, *Biosynth Carbosynth*, *Carl Roth*, *Fluka*, *Glen Research (maravai LifeSciences)*, *metabion*, *Phytolab*, *Sigma Aldrich*, *TCI* und *VWR* bezogen.

Synthetische Durchführungen

Sauerstoff- und wasserempfindliche Reaktionen wurden mithilfe der Schlenktechnik oder *freeze-pump-thaw* Methode unter Argonatmosphäre (Argon 4.6, *Air Liquide*, 99.999 % Reinheit) und flüssigem Stickstoff durchgeführt. Die hierfür benötigten Glasgeräte wurden vorher im Hochvakuum mit dem Heißluftfön oder im Trockenschrank ausgeheizt. Bei Reaktionsführung mit tiefen Temperaturen wurden folgende Kältemischungen verwendet:

- 0°C Eis in Wasser
- -15°C NaCl in Eis
- -78°C Trockeneis in Isopropanol

Lichtempfindliche Substrate und lichtsensibilisierte/-katalysierte Reaktionen wurden unter Tageslichtausschluss durchgeführt.

Zentrifugation

Die DNA-Proben wurden bei der Aufreinigung und Probenvorbereitung mit einem *Biofuge Pico* von *HERAEUS* mit *24-place microliter rotor* bei 13.000 rpm für 1 min oder 10 min zentrifugiert. Dabei wirkt eine relative Zentrifugalbeschleunigung von 16.000 g auf die Probe.

Oligonukleotid Festphasensynthese

Zur Synthese von Oligonukleotiden wurde die automatisierte Phosphoramidit-Festphasenmethode durchgeführt. Sowohl für die synthetisierten Photosensibilisatoren, als auch die gewöhnlichen Bausteine dienten Nucleosid-Phosphoramidit-Verbindungen hierbei als reaktive Analoga von Nukleotiden. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte unter Argonatmosphäre an einem *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A LABORGERÄTE. Hierbei wurde Controlled Pore Glass (CPG) mit einer Belegung von 1 µmol (500 Å) als feste Phase verwendet.

Vorreinigung mittels Glen-Pak Methode

Die erste Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte mit der Glen-Pak Methode. Dazu wurde eine mit 0,5 mL Acetonitril gewaschene *Glen-Pak Purification Cartridge* mit 1,0 mL einer 2,0 molaren TEAA-Lösung equilibriert. Die Säule wurde mit 2,0 mL Oligonukleotid-Lösung versetzt und mit 2,0 mL NaCl-Lösung (5 % MeCN/ 95 % H₂O) gewaschen. Zuerst wurden CPG-Reste durch Zugabe von 2,0 mL TFA-Lösung von der Säule entfernt. Danach wurde mit 2,0 mL deionisiertem Wasser Reste von TFA und überschüssige Salze entfernt. Die aufgereinigte DNA konnte durch Spülen mit 1 mL einer 0,5 %igen Ammoniak Lösung (50 % MeCN/H₂O) erhalten werden.

Lyophilisierung

Wässrige DNA-Lösungen wurden zur schonenden Trocknung in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend an einem Vakuumkonzentrator *Alpha RVC* der Firma *Christ* und Lyophilisierungsanlage *Alpha 1-2 LD Plus* unter vermindertem Druck eingengt.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der verwendeten DNA-Lösungen wurde spektroskopisch mit einem *Nanodrop 1000* Spektralphotometer von *THERMO SCIENTIFIC* bestimmt. Hierbei wurden die Proben jeweils mit 50 µL bzw. bei zu hoher Absorbanz in mehreren Schritten zusätzlichen 50 µL zweifach deionisiertem Wasser versetzt und bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ gemessen und die Konzentration über das LAMBERT-BEERSche Gesetz (Formel 7) errechnet.

$$E_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Formel 7: BOURGUER-LAMBERT-BEERSches Gesetz

E_{λ}	=	Extinktion (Wellenlängenabhängig)	I_0	=	Intensität des einfallenden Lichts
I	=	Intensität des transmittierten Lichts	ε	=	Extinktionskoeffizient
c	=	Konzentration des Substrats	d	=	Schichtdicke der Küvette

Der Extinktionskoeffizient bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ für die eingebauten Bausteine in der DNA war bereits bekannt und wurde für jeden DNA-Strang wie folgt berechnet (Formel 8):

$$\varepsilon_{260} = (A \cdot \varepsilon_A + G \cdot \varepsilon_G + C \cdot \varepsilon_C + T \cdot \varepsilon_T + mC \cdot \varepsilon_{5mC}) \cdot 0,9 + X \cdot \varepsilon_X + \text{Atto550} \cdot \varepsilon_{\text{Atto550}}$$

Formel 8: Berechnung der DNA Extinktionskoeffizienten.

Die Abkürzungen A, G, C, T, mC, X (Tab.13) und Atto550 stehen jeweils für die Anzahl der Nukleosid-Bausteine, Sensibilisator oder dem Farbstoff Atto550. Der Faktor 0,9 berücksichtigt dabei die Hypochromizität der DNA.^[60]

Tabelle 13: Extinktionskoeffizienten der verwendeten DNA-Bausteine bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$.

Baustein	$\varepsilon_{260} [\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
Methoxyxanthon	5200
Atto 550	28800
A	15400
T	8800
G	11700
C	7300
5mC	5700

Um die Wahrscheinlichkeit von statistischen Fehlern zu verringern, wurde die Extinktion dreimal gemessen und der Mittelwert daraus gebildet. Anschließend konnten die Volumina für die spätere Hybridisierung berechnet werden.

Chromatographische Aufreinigung

- **Dünnschichtchromatographie (DC) – Reaktionskontrolle**

Hierfür wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck* verwendet. Mithilfe von UV-Lampen der Wellenlänge 254 nm (Fluoreszenzlöschung) und 366 nm (Fluoreszenzanregung) erfolgte, wenn möglich, die optische Detektion der Substratumsetzung. Zur vollständigen Visualisierung wurden die DC-Platten in folgende Reagenzlösungen zum Anfärben getaucht und anschließend durch Erwärmung mithilfe von Heißluft entwickelt:

- 5 %ige Schwefelsäure in MeOH
- Vanillin-Lösung: 3,0 g Vanillin, 100 ml Ethanol, 0,5 ml konz. H₂SO₄
- KMnO₄-Lösungen: 2,5 g K₂CO₃, 1,0 g KMnO₄, 0,1 g NaOH, 100 ml H₂O

- **Flash-Chromatographie (FC) – Produktaufreinigung**

Für die Aufreinigung der synthetisch hergestellten Verbindungen wurde als stationäre Phase Kieselgel 60 (Korngröße 40 – 63 µm) der Firma *Sigma Aldrich* und Glassäulen mit Fritte verwendet. Diese wurden nass gepackt, das Rohprodukt, auf Kieselgel beladen oder, gelöst in der mobilen Phase, aufgetragen und mit Quarzsand überschichtet. Zur Auftrennung der Substrate wurde mit leichtem Überdruck (Methode nach *W.C. Still*)^[4] gearbeitet.

- **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) – DNA-Aufreinigung**

Zur Aufreinigung von Oligonukleotiden wurde, unter Verwendung der Software *Chromeleon 7*, ein System der Firma *THERMO FISCHER SCIENTIFIC* aus *Dionex UltiMate 3000* mit *Autosampler*, *Pumpenmodul*, *Säulenofen*, *Multidiodenarray*, *RS Fluoreszenzdetektor* und *Fraktionssammler* verwendet. Die präparative Trennung

erfolgte über eine *VDSpher OptiBio 300 C18-SE*- (250 x 10 mm, 5 µm Porengröße) und *Supelcosil LC 318* (25 cm x 10 mm, 5 µm Porengröße) Reversed-Phase-Säule mit einer Laufgeschwindigkeit von 2,5 ml/min. Die mobile Phase bestand dabei aus einem 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6,5; Komponente A) und einem ansteigenden Anteil an Acetonitril (Komponente B) (Abb.72). Die Detektion der Oligonukleotide erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$. Als Injektionsvolumen wurden 250 µL der jeweiligen DNA-Stränge auf die Säule gegeben.

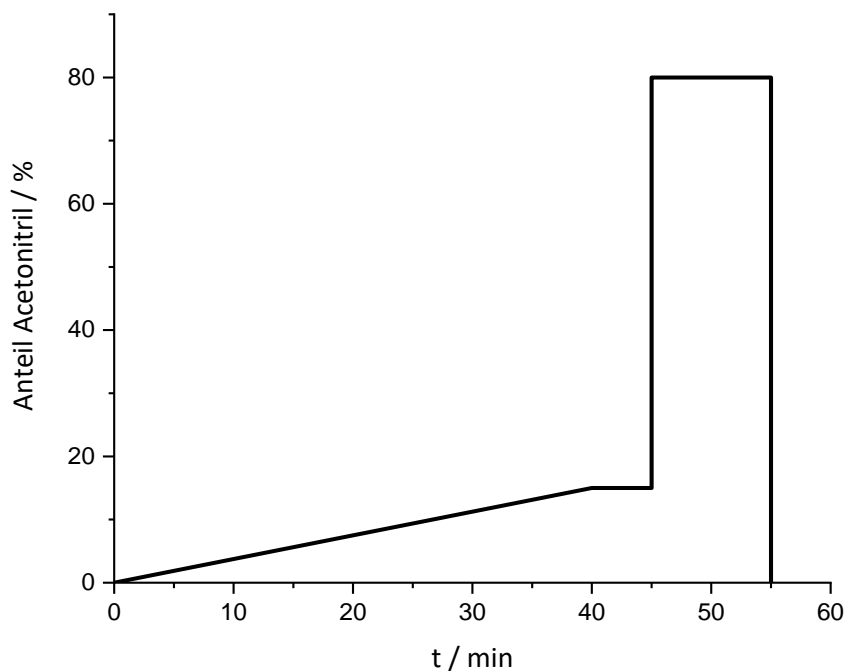


Abbildung 72: HPLC-Methode der synthetisierten DNA-Einzelstränge, zeitlicher Gradientenverlauf.

Hybridisierung

Die aufgereinigten Oligonukleotide und entsprechenden Gegenstränge wurden nach Berechnung der Konzentration und Volumina equimolar zusammen pipettiert und mit einem Puffer (NaH_2PO_4 : Na_2HPO_4 1:1 Lösung) und NaCl-Lösung versetzt. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf 90 °C erhitzt und über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt.

Spektroskopie

NMR- Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*; Kernspinresonanz)

Die 300 MHz ^1H - sowie die 75 MHz ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem NMR-Spektrometer *Bruker Avance 300*, die 400 MHz ^1H - sowie 100 MHz ^{13}C -Spektren an einem *Bruker Avance 400* Spektrometer, und 500 MHz ^1H - sowie 126 MHz ^{13}C -Spektren an einem *Bruker Avance DRX 500* Spektrometer gemessen. Hierfür wurden die Substanzen (ca. 10 mg) in deuterierten Lösungsmitteln (ca. 0,6 mL) der Firma *euriso top* in einem NMR-Röhrchen gelöst. Folgende Referenzwerte wurden verwendet^[150]:

Aceton- d_6	^1H -NMR: $\delta = 2,05$ ppm	^{13}C -NMR: $\delta = 206,26$ ppm
CDCl_3	^1H -NMR: $\delta = 7,26$ ppm	^{13}C -NMR: $\delta = 77,16$ ppm
CD_3CN	^1H -NMR: $\delta = 1,94$ ppm	^{13}C -NMR: $\delta = 1,32$ ppm $\delta = 118,26$ ppm
DMSO	^1H -NMR: $\delta = 2,50$ ppm	^{13}C -NMR: $\delta = 39,52$ ppm
$\text{MeOD-}d_4$	^1H -NMR: $\delta = 4,87$ ppm	^{13}C -NMR: $\delta = 49,00$ ppm
$\text{THF-}d_8$	^1H -NMR: $\delta = 1,72$ ppm $\delta = 3,58$ ppm	^{13}C -NMR: $\delta = 25,31$ ppm $\delta = 67,21$ ppm
$\text{Pyr-}d_5$	^1H -NMR: $\delta = 8,74$ ppm	^{13}C -NMR: $\delta = 150,35$ ppm

Als Referenz wurde Tetramethylsilan verwendet^[149] und die chemische Verschiebung in ppm angegeben. Die Kopplungskonstante J wurde in Hz angegeben. Es wurden folgende Abkürzungen für die Beschreibung der einzelnen Signale verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentett), hept (Heptett), dd (Dublett vom Dublett), dt (Dublett vom Triplet), m (Multiplet).

UV/VIS-Absorptionsspektroskopie

Für die Messungen wurde ein *Lambda 750* und ein *PTP-6+6 Peltier System* der Firma *PERKIN-ELMER* und *Cary 100 Bio*-Spektrometer der Firma *Varian* mit einer Temperatureinheit (*Cary 100 temperature controller*) verwendet. Hierbei wurde eine 1,00 cm breite Quarzglasküvette der Firma *Starna* verwendet, deren Fassungsvermögen 1,00 mL betrug. Die Messungen erfolgten bei 20 °C und wurden gegen das Absorptionsspektrum des Lösungsmittels hintergrundkorrigiert. Folgende Einstellungen

wurden vorgenommen: *average time* 0,1 s; *data interval* 1,0 nm, *scan rate* 600 nm/min und *light source changeover* 350 nm.

- **Schmelztemperaturanalysen der hybridisierten Doppelstränge**

Folgende Grafik zeigt beispielhaft den Vorgang des Erwärmens und Abkühlens für den DNA-Doppelstrang **DNA-MeOX-1-CC** (Abb.73). Der Wendepunkt entspricht dem zu bestimmenden Schmelztemperaturen. Aus den drei Messung des Erwärmens wurde der Mittelwert der Schmelztemperaturen berechnet.

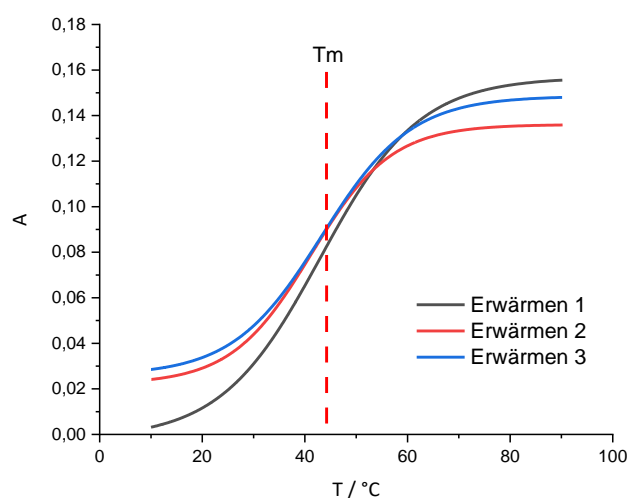


Abbildung 76: Schmelztemperatur für den DNA-Doppelstrang **DNA-MeOX-1-CC**.

Tabelle 14: Schmelztemperaturen aller DNA-Hybride.

DNA	Schmelztemp. [°C]		DNA	Schmelztemp. [°C]	
	Tm1	Tm2		Tm1	Tm2
DNA-MeOX-0-TT	10.4	45	DNA-MeOX-1-TmC	21.9	38
DNA-MeOX-1-TT	11.3	46	DNA-MeOX-1-TmCG	22.3	42
DNA-MeOX-2-TT	12.5	46	DNA-MeOX-1-TC	18.2	37
DNA-MeOX-3-TT	13.6	47	DNA-MeOX-1-TCG	22.1	41
DNA-MeOX-4-TT	14.6	47	DNA-MeOX-1-mCT	15.9	40
DNA-MeOX-5-TT	14.9	53	DNA-MeOX-1-CT	11.5	45
DNA-MeOX-10-TT	15.1	57	DNA-MeOX-1-mCmC	20.5	41
DNA-MeOX-15-TT	15.9	60	DNA-MeOX-1-mCC	20.5	42
			DNA-MeOX-1-CmC	20.5	42
			DNA-MeOX-1-CC	17.7	42

Fluoreszenzmessungen

Die Messungen wurden mit Hilfe des *Fluoromax-3 Fluorimeters* von *Jobin-Yvon* mit einem *Peltier-Element* aufgenommen. Hierfür wurde eine 1,00 cm breite Quarzglasküvette der Firma *Starna* verwendet, deren Fassungsvermögen 1,00 mL betrug. Diese Messungen erfolgten bei 20 °C. Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung des reinen Lösungsmittels korrigiert. Die Eichung des Fluoreszenzspektroskops erfolgte über den Ramanpeak von Wasser.

Spektrometrie

Die Massenspektren wurden im Institut für Organische Chemie am KIT aufgenommen.

Massenspektrometrie – MALDI

Für die Aufnahme der Massenspektren wurde ein *Biflex-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* verwendet. Hierbei wurde 3-Hydroxy-2-pyridincarbonsäure als Matrix eingesetzt.

Massenspektrometrie – ESI

Die hochauflösende Massenspektren wurden unter Verwendung einer Elektronensprayionisationsquelle auf einem *Q Exactive Plus Orbitrap* von der Firma *Thermo Scientific* aufgenommen.

5.1 Belichtungsexperimente

Die Belichtungen der DNA-Proben erfolgte mit einer UV-LED (NVSU233A) der Firma *Nichia* bei 369 nm (Abstrahlwinkel: 120°, 1030 mW). Die Belichtungsreaktoren wurden durch die zentrale feinmechanische und elektronische Abteilung der Universität Regensburg gebaut. Der Kühlblock wurde von der Feinmechanischen Werkstatt des Instituts der Physikalischen Chemie gefertigt. Das System enthält einen CF40 Kryo-Kompakt-Thermostat von der Firma *Julabo*. Die Belichtungsproben wurde vor der Bestrahlung in den Vials viermal mit der *freeze-pump-thaw*-Methode entgast, mit Argon geflutet und anschließend unter leichtem Rühren bis zu 96 h belichtet.



Abbildung 74: Versuchsaufbau zu den durchgeführten Belichtungsexperimenten: Rührer und Belichtungsreaktor (links) und Thermostat (Rechts).

5.2 Analyse über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

5.2.1 Durchführung

Die Produktausbeutebestimmung der verschiedenen Belichtungszeiten für die DNA-Proben, wurden mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) durchgeführt. Dazu wurden Gele im Maß 21 x 40 cm in die *Sequi-Gen DT Sequencing Cell* gegossen und 40 min auspolymerisiert. Anschließend wurde das Gel 45 min ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 50\text{ W}$, $U = 3000\text{ V}$) lang verdichtet. Die Proben wurden mit 20 μL Ladebuffer und 14 μL zweifach deionisiertem Wasser versetzt. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Lade-Puffers und sonstige Lösungen, die bei der Gelelektrophorese verwendet wurden (Tab.15).

Tabelle 15: Zusammensetzung verwendeter Substanzen bei der PAGE.

Substanz	Zusammensetzung
Lade-Puffer	20 mmol/L EDTA 89 mmol/L Tris 89 mmol/L Borsäure 3,9 % Ficoll 0,1 % Bromphenolblau 0,02 % Xylencyano FF 7 mol/L Harnstoff
10-facher TBE-Puffer	27 mmol/l EDTA 890 mmol/l Tris-Base 890 mmol/l Borsäure 8,3 M Harnstoff
1-facher TBE-Lauf-Puffer (1 L Ansatz)	2,7 mmol/l EDTA 89 mmol/l Tris-Base 89 mmol/l Borsäure
APS-Lösung	890 mmol/l Tris-Base
Polyacrylamid-Gel (125 %) (50 mL Ansatz)	890 mmol/l Borsäure 8,3 M Harnstoff

Vor dem Auftragen der 10 μL DNA-Proben wurden die Geltaschen mit einer Kanüle durchgespült und von Harnstoff befreit. Die Auftrennung der DNA im Gel wurde bei gleichen Bedingungen 80 Minuten durchgeführt (Abb.75).

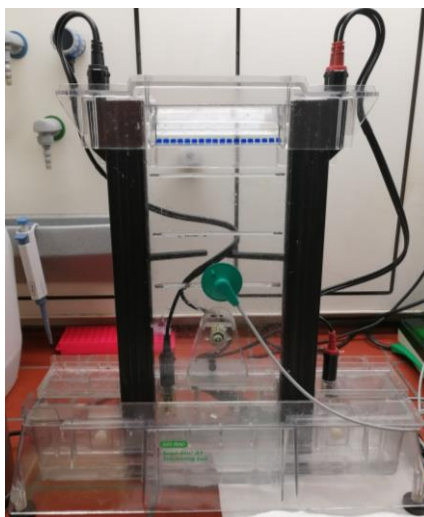


Abbildung 75: In die Elektrophorese-Apparatur eingespanntes Polyacrylamid-Gel mit den aufgetragenen; Bedingungen: 12,5 %iges Polyacrylamid-Gel, $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $U = 3000\text{ V}$, $P = 50\text{ W}$.

5.2.2 Analyse

Die aufgetrennten DNA-Proben wurden mit Hilfe des Fluoreszenzimager *Stella 830* analysiert. Die *Atto550*-Farbstoff markierte Stränge wurden dabei 1-2 min mit einer Wellenlänge von 540 nm belichtet. Nachfolgend erfolgte die Detektion der Emission durch eine CCD-Kamera, welche auf -20°C gekühlt wurde. Die Auswertung wurde mit der Programmsoftware *Image Analyzer v.450* durchgeführt.

Die Produktausbeutebestimmung der Cycloadditionsprodukte erfolgte über die Relation der Intensitätsintegrale zwischen der Edukt- und Dimer-Bande, welche sich während der Gelelektrophorese ausbilden (Abb.76). Traten *Crosslinks* auf, wurden diese ebenfalls ins Verhältnis gesetzt. Die Basislinie wurde zuvor korrigiert. Des Weiteren wurde die Fläche des Produktpeaks maximal und minimal integriert, um den Mittelwert bilden zu können. Das Ansteigen der Intensitäten bei längeren Belichtungszeiten entsprach dabei der Erhöhung des Peaks und dementsprechend das Ansteigen der Produktausbeute.

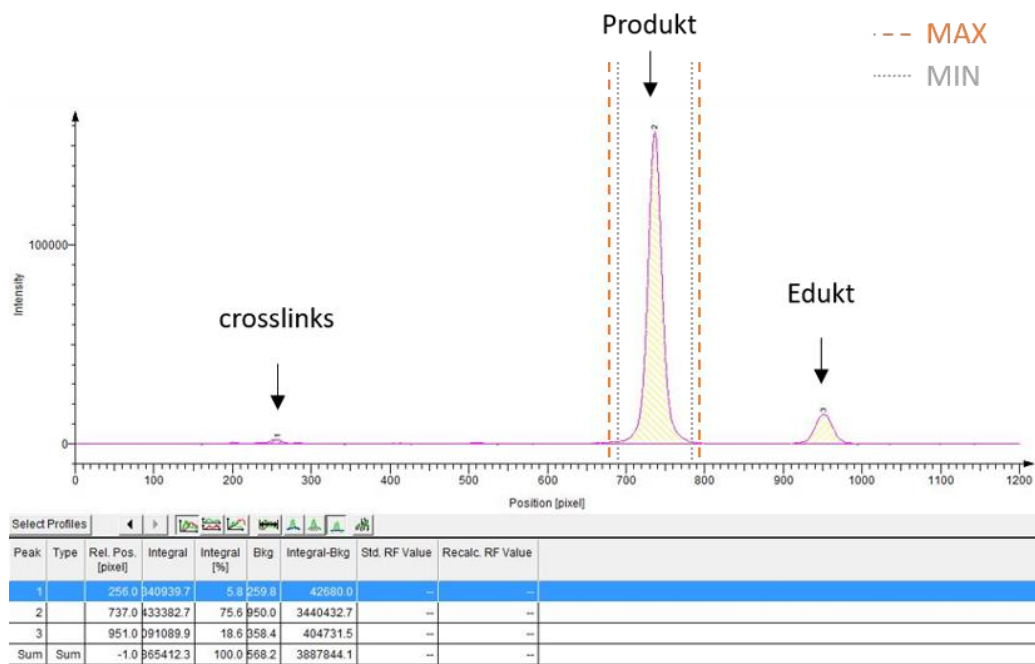
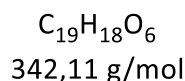
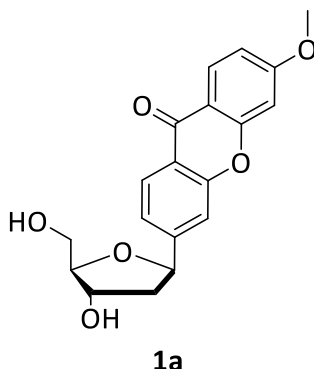


Abbildung 76: Produktausbeutebestimmung über die Relation der Intensitätsintegrale von Produkt und Edukt am Beispiel von: **DNA-MeOX-1-TmC** nach 20 h.

Der komplette Prozess, beginnend bei Zusammenführung der DNA-Einzelstränge, Hybridisierung, Belichtung und das Auftrennen der DNA-Proben während der PAGE, wurde mindestens dreimal für jede Sequenz durchgeführt, um eine möglichst genau Analyse zu gewährleisten und den experimentellen Fehler zu bestimmen..

5.3 Synthesevorschriften

3-Methoxyxanthon-Nukleosid (1a)



1.00 g des entschützten C-Nukleosids **9a** (2.94 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Schutzgas mit 32 ml AcOH/MeCN (1:3) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 4.99 g Natriumtriacetoxyborhydrid (23.5 mmol, 8.00 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 40 min lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 32 ml EtOH/H₂O (1:1) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM → DCM/Methanol, 10:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 613 mg (61 %) erhalten.

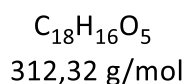
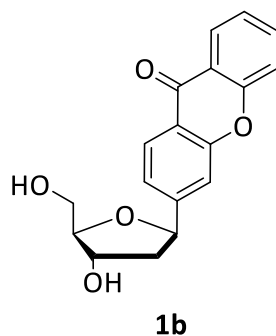
DC (DCM/MeOH 50:1): $R_f = 0.25$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.15 – 8.06 (m, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.46 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.07 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H), 5.21 (dd, $J = 10.3, 5.6$ Hz, 1H), 5.16 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.85 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.27 – 4.22 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (td, $J = 5.1, 2.0$ Hz, 1H), 3.55 (dt, $J = 10.2, 5.1$ Hz, 1H), 3.49 (dt, $J = 11.3, 5.6$ Hz, 1H), 2.22 (ddd, $J = 12.6, 5.7, 1.4$ Hz, 1H), 1.83 (ddd, $J = 12.7, 10.4, 5.5$ Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 174.7, 164.9, 157.6, 155.6, 151.1, 127.5, 125.8, 122.0, 120.1, 115.0, 114.5, 113.5, 100.6, 88.1, 78.5, 72.3, 62.3, 56.1, 43.6.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (berechnet) = 343.1173, m/z (gefunden): 343.1176.

Xanthon-Nukleosid (**1b**)



1.00 g des entschützten C-Nukleosids **9b** (3.22 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Schutzgas mit 32 ml AcOH/MeCN (1:3) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 5.47 g Natriumtriacetoxyborhydrid (25.8 mmol, 8.00 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 40 min lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 32 ml EtOH/H₂O (1:1) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM → DCM/Methanol, 10:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 665 mg (65 %) erhalten.

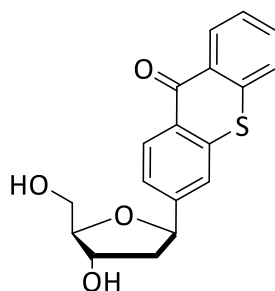
DC (DCM/MeOH 50:1): R_f = 0.27

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ (ppm) = 8.31 – 8.23 (m, 2H), 7.92 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 7.85 (ddd, J = 8.7, 7.1, 1.7 Hz, 1H), 7.64 – 7.56 (m, 2H), 7.50 – 7.42 (m, 1H), 5.28 (dd, J = 10.5, 5.4 Hz, 1H), 4.39 (dt, J = 6.1, 2.0 Hz, 1H), 4.02 (td, J = 4.9, 2.4 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 2.30 (ddd, J = 13.1, 5.4, 1.7 Hz, 1H), 2.01 (ddd, J = 13.1, 10.5, 6.0 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD): δ (ppm) = 178.9, 157.7, 157.1, 139.9, 136.6, 134.7, 127., 125.3, 124.4, 122.6, 122.2, 119.4, 119.3, 89.4, 80.7, 74.4, 64.0, 45.0.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 313.1066; m/z (berechnet) = 313.1071.

Thioxanthon-Nukleosid (1c)



1c

$C_{18}H_{16}O_4S$
328,38 g/mol

1.00 g des entschützten C-Nukleosids **9c** (3.06 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Schutzgas mit 32 ml AcOH/MeCN (1:3) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 5.20 g Natriumtriacetoxyborhydrid (24.5 mmol, 8.00 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 40 min lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 32 ml EtOH/H₂O (1:1) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM → DCM/Methanol, 10:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 552 mg (55 %) erhalten.

DC (DCM/MeOH 50:1): $R_f = 0.3$

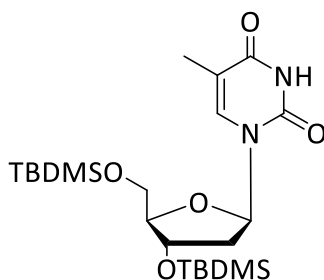
¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.47 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 8.44 – 8.38 (m, 1H), 7.88 – 7.73 (m, 4H), 7.59 (ddt, $J = 8.1, 7.0, 1.2$ Hz, 1H), 5.17 (dd, $J = 10.4, 5.4$ Hz, 1H), 5.14 – 5.09 (m, 1H), 4.82 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.24 (td, $J = 4.6, 4.1, 2.3$ Hz, 1H), 3.85 (td, $J = 5.3, 2.2$ Hz, 1H), 3.59-3.44 (m, 2H), 2.19 (ddd, $J = 12.8, 5.6, 1.7$ Hz, 1H), 1.83 (ddd, $J = 12.7, 10.3, 5.5$ Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 178.7, 141.6, 136.5, 135.3, 132.9, 130.9, 129.1, 128.3, 128.1, 126.7, 126.6, 126.5, 126.0, 88.0, 78.6, 72.4, 62.4, 43.5.

HR-MS (ESI, $[M]^+$): m/z (gefunden) = 328.0758; m/z (berechnet) = 328.0769

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 329.0836; m/z (berechnet) = 329.0842.

Bis(tert-Butyldimethylsilyl)-thymidin (2)



2

$C_{22}H_{42}N_2O_5Si_2$
470,26 g/mol

1.00 g Thymidin (4.12 mmol, 1.00 Äq) und 1.18 g Imidazol (17.3 mmol, 4.20 Äq) wurden unter Schutzgas in 50 ml trockenem DMF gelöst und 5 min lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.31 g tert-Butyldimethylsilylchlorid (8.66 mmol, 2.10 eq) zugegeben und über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 ml Wasser versetzt und mit Hexan extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als weißer Feststoff in einer quantitativen Ausbeute von 1.94 g erhalten.

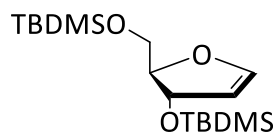
DC (Hexan/E.E. 3:1): $R_f = 0.3$

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.02 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.22 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.32-4.22 (m, 1H), 3.79 (dt, $J = 26.2, 2.6$ Hz, 2H), 3.70 – 3.56 (m, 1H), 2.12 (dd, $J = 10.5, 7.6$ Hz, 1H), 1.89 (dd, $J = 9.1, 3.5$ Hz, 1H), 1.80 (s, 3H), 0.80 (s, 18H), -0.02 (s, 12H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 164.3, 150.9, 136.2, 111.5, 88.6, 85.6, 73.0, 63.7, 42.1, 26.7, 26.5, 19.1, 18.8, -3.9, -4.1, -4.6, -4.7.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 471.6 [M^+]; m/z (berechnet) = 470.26 [M^+].

Bis(tert-Butyldimethylsilyl)-glycal (3)



3

$C_{17}H_{36}O_3Si_2$
344,22 g/mol

1.00 g des geschützten Thymidins **6** (2.12 mmol, 1.00 Äq) und 5.01 ml Hexamethyldisilazan (3.91 g, 24.2 mmol, 11.4 Äq) wurden unter Schutzgas vorgelegt und bis zur kompletten Lösung gerührt. Anschließend wurden 0.11 g Ammoniumsulfat (0.85 mmol, 0.40 eq) zugegeben und 2,5 h lang unter Rühren refluxiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde in DCM gelöst, mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lsg. und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan/Ether, 19:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 430 mg (59 %) erhalten.

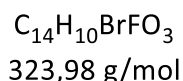
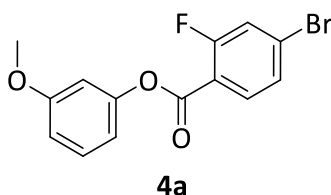
DC (Hexan/E.E. 10:1): $R_f = 0.5$

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 6.49 – 6.46 (m, 1H), 5.01 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.86 (td, $J = 2.6, 0.9$ Hz, 1H), 4.29 (td, $J = 6.1, 2.7$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J = 10.7, 5.7$ Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 10.7, 6.4$ Hz, 1H), 0.89 (s, 18H), 0.05 (s, 12H).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 151.4, 104.2, 91.3, 78.4, 64.1, 30.9, 30.6, 26.0, -1.8, -2.2.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 342.4 [M^+]; m/z (berechnet) = 344.22 [M^+].

3-Methoxyphenyl-4-bromo-2-fluorobenzoat (4a)



0.88 ml 3-Methoxyphenol (1.00 g, 8.10 mmol, 1.00 Äq) und 1.35 ml Et₃N (0.98 g, 9.72 mmol, 1.20 Äq) wurden unter Schutzgas vorgelegt und fünf Minuten lang bei 140 °C gerührt. Anschließend wurde 1.92 g 4-Bromo-2-fluorobenzoyl-chlorid (8.10 mmol, 1.00 Äq) unter Rühren zugegeben. Das auskristallisierte Rohprodukt wurde auf Raumtemperatur gekühlt und anschließend mit Eis versetzt. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit 1 M HCl-Lsg., H₂O und gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/E.E. 10:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 2.55 g (97 %) erhalten.

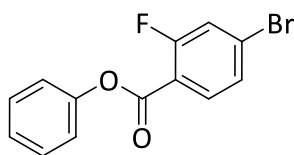
DC (Hexan/E.E. 20:1): R_f = 0.33

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.18 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.85 (ddd, J = 8.7, 7.1, 1.7 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.47 (ddd, J = 8.0, 7.2, 1.0 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 174.9, 165.0, 157.5, 155.6, 135.0, 127.6, 125.9, 124.3, 121.2, 117.9, 114.9, 113.7, 100.6, 56.1.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 322.9[M⁺]; m/z (berechnet) = 323.9[M⁺].

Phenyl-4-bromo-2-fluorobenzoat (4b)



4b

$C_{13}H_8BrFO_2$
295,11 g/mol

1.00 g Phenol (10.6 mmol, 1.00 Äq) und 1.76 ml Et_3N (1.23 g, 12.7 mmol, 1.20 Äq) wurden unter Schutzgas vorgelegt und fünf Minuten lang bei 140 °C gerührt. Anschließend wurde 2.51 g 4-Bromo-2-fluorobenzoyl-chlorid (10.6 mmol, 1.00 Äq) unter Rühren zugegeben. Das auskristallisierte Rohprodukt wurde auf Raumtemperatur gekühlt und anschließend mit Eis versetzt. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit 1 M HCl-Lsg., H_2O und gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/E.E. 10:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 2.91 g (93 %) erhalten.

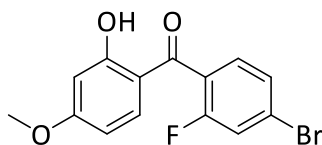
DC (Hexan/E.E. 20:1): $R_f = 0.37$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.73 (d, 1H), 7.53 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.39 – 7.33 (m, 2H), 7.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.87 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 197.4, 163.2, 137.4, 133.2, 131.1, 131.0, 128.0, 128.0, 120.3, 120.1, 119.6, 119.3.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 296.2 $[M^+]$; m/z (berechnet) = 295.1 $[M^+]$.

(4-Bromo-2-fluorophenyl)(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)methanon (5a)



5a

$C_{14}H_{10}BrFO_3$
323,98 g/mol

1.00 g **4a** (3.08 mmol, 1.00 Äq) und 125.4 mg $AlCl_3$ (1.54 mmol, 0.50 Äq.) unter Schutzgas vorgelegt und mit 15 ml Nitrobenzol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 Minuten lang bei 140 °C gerührt. Das auskristallisierte Rohprodukt wurde auf Raumtemperatur gekühlt und anschließend mit Eis versetzt. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit 1 M HCl-Lsg., H_2O und gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/E.E. 10:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 768 mg (77 %) erhalten.

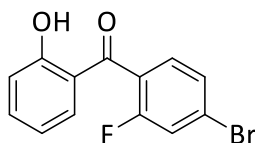
DC (Hexan/E.E. 20:1): R_f = 0.32

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 12.39 (s, 1H), 7.45 – 7.42 (m, 1H), 7.41 – 7.37 (m, 1H), 7.33 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.41 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 195.0, 166.8, 166.0, 134.6, 134.5, 130.7, 130.7, 127.7, 127.7, 119.9, 119.7, 108.1, 100.7, 55.6.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 323.1 [M^+]; m/z (berechnet) = 323.9 [M^+].

(4-Bromo-2-fluorophenyl)(2-hydroxyphenyl)methanon (5b)



5b

$C_{13}H_8BrFO_2$
295,11 g/mol

1.00 g **4b** (3.39 mmol, 1.00 Äq) und 137 mg $AlCl_3$ (1.69 mmol, 0.50 Äq.) unter Schutzgas vorgelegt und mit 15 ml Nitrobenzol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 Minuten lang bei 140 °C gerührt. Das auskristallisierte Rohprodukt wurde auf Raumtemperatur gekühlt und anschließend mit Eis versetzt. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit 1 M HCl-Lsg., H_2O und gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/E.E. 10:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 700 mg (70 %) erhalten.

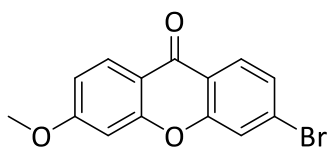
DC (Hexan/E.E. 20:1): $R_f = 0.37$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 11.83 (s, 1H), 7.53 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.39 – 7.33 (m, 2H), 7.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.87 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 197.4, 163.2, 137.4, 133.2, 131.1, 131.0, 128.0, 128.0, 120.3, 120.1, 119.6, 119.3, 118.5.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 294.1 [M^+]; m/z (berechnet) = 294.1 [M^+].

3-Bromo-6-methoxy-9H-xanthon (6a)



6a

$C_{14}H_9BrO_3$
303,97 g/mol

1.00 g **5a** (3.08 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Schutzgas in 15 ml trockenem DMF gelöst, mit 426 mg Kaliumcarbonat (4.62 mmol, 1.00 Äq) versetzt und zehn Minuten lang bei 140 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in DCM gelöst und mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM mehrmals extrahiert und alle org. Phasen vereinigt. Die org. Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/E.E. 5:1). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer quantitativen Ausbeute von 936 mg erhalten.

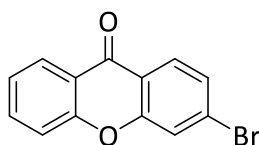
DC (DCM): $R_f = 0.5$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 3.95 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 175.5, 165.3, 157.9, 156.2, 128.5, 128.3, 128.1, 127.5, 120.9, 120.8, 115.7, 113.6, 100.3, 55.9.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 305.0 $[M^+]$; m/z (berechnet) = 303.97 $[M^+]$.

3-Bromo-9H-xanthon (6b)



6b

$C_{13}H_7BrO_2$
275,10 g/mol

1.00 g **5b** (3.39 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Schutzgas in 15 ml trockenem DMF gelöst, mit 515 mg Kaliumcarbonat (3.73 mmol, 1.00 Äq) versetzt und 10 min lang bei 140 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in DCM gelöst und mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM mehrmals extrahiert und alle org. Phasen vereinigt. Die org. Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/E.E. 5:1). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer quantitativen Ausbeute von 932 mg erhalten.

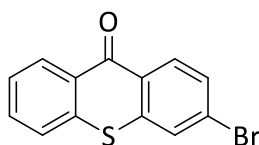
DC (DCM): $R_f = 0.54$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.33 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.75 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.50 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 176.7, 156.3, 156.1, 135.3, 129.3, 128.3, 127.7, 126.9, 124.5, 121.9, 121.2, 120.9, 118.1.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 276.0 $[M^+]$; m/z (berechnet) = 275.10 $[M^+]$.

3-Bromo-9H-thioxanthon (6c)



6c

$C_{13}H_7BrOS$
291,16 g/mol

1.00 g (4.86 mmol, 1.00 Äq) **7** (CTBC) und 0,76 g (4.86 mmol, 1.00 Äq) Brombenzol wurden unter kräftigem Rühren in 30 ml DCM vorgelegt. Zu der Mischung wurden 0.71g (5.35 mmol, 1.10 Äq) trockenes Aluminiumchlorid innerhalb von 30min vorsichtig in kleinen Portionen gegeben, während die Temperatur zwischen 10 °C und 25 °C gekühlt wurde. Nachdem keine HCl-Entwicklung mehr zu beobachten war, wurde der kristalline Aluminiumchlorid-Komplex abfiltriert, der Feststoff mit Hexan gewaschen und dann portionsweise, unter Rühren und Kühlung auf 20 °C, in 5.35 ml einer 1 N Natriumhydroxid-Lösung gegeben. Die Mischung wurde für weitere 30 min gerührt und schließlich abfiltriert. Der Feststoff wurde in DCM gelöst, mehrfach mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 990 mg (70 %) erhalten ^[151]

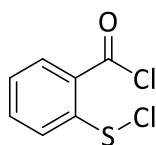
DC (DCM): $R_f = 0.65$

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.67 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.54 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H), 7.60 – 7.53 (m, 2H), 7.43 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.3$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 135.2, 132.6, 132.5, 132.3, 130.5, 130.0, 129.9, 128.9, 127.6, 126.6, 126.1, 126.0, 120.3.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 292.2[M^+]; m/z (berechnet) = 291.16[M^+].

2-Chlorthiobenzoylchlorid (7)



7

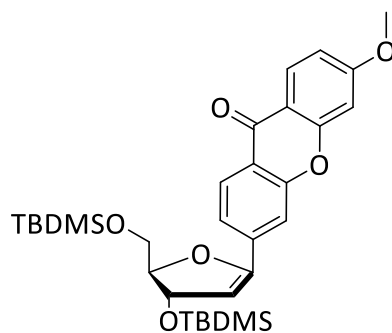
$\text{C}_7\text{H}_4\text{Cl}_2\text{OS}$
207,07 g/mol

1.00 g (3.26 mmol, 1.00 Äq) 2,2'-Dithiodibenzoesäure wurde in 20 ml 1-methyl-2-pyrrolidon (NMP) gelöst. Zu der Mischung wurden 1.59 ml (2.60 g, 21.8 mmol, 6.70 Äq) Thionylchlorid (SOCl_2) hinzugegeben. Die Mischung wurde auf 80 °C erhitzt und solange gerührt, bis eine klare Lösung vorlag und keine HCl-Entwicklung mehr zu beobachten war. Anschließend wurde die Lösung auf 50 °C gekühlt und 0.29 ml (0.48 g, 3.59 mmol, 1,10 Äq) Sulfurylchlorid (SO_2Cl_2) vorsichtig hinzugegeben. Die Lösung wurde für weitere 30 min gerührt. Schließlich wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als hellgelber kristalliner Feststoff in einer Ausbeute von 0.47 g (90 %) erhalten.^[152]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.34 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.77 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.42 (t, J = 7.6 Hz, 2H).

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 206.2 $[\text{M}^+]$; m/z (berechnet) = 207.07 $[\text{M}^+]$.

3',5'-Bis(tert-butyldimethylsilyloxy)-3,5-dihydrofuranyl)-6-methoxyxanthon (8a)



8a

$C_{31}H_{44}O_6Si_2$
568,27 g/mol

1.00 g **6a** (3.29 mmol, 1.00 Äq), 1.14 g **3** (3.29 mmol, 1.00 Äq) und 0.81 ml Triethylamin (594 mg, 5.87 mmol, 2.20 Äq) wurden in 30 ml MeCN vorgelegt, über die *Freeze-Pump-Thaw*-Methode entgast und mit Argonatmosphäre geflutet. Anschließend wurden 361 mg [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]-dichloropalladium(II) (0.49 mmol, 0.15 Äq) zugegeben und die Mischung bei 75 °C für 72 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/E.E., 4:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 542 mg (29 %) erhalten.

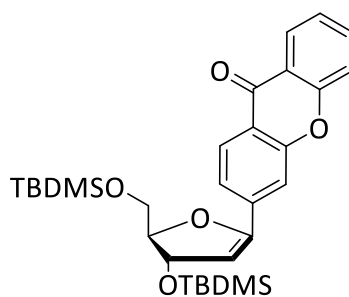
DC (DCM): $R_f = 0.28$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.21 – 8.14 (m, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 5.73 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.56 (s, 1H), 3.88 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.76 (dd, $J = 11.3, 3.6$ Hz, 1H), 0.87 (s, 9H), 0.83 (s, 9H), 0.14 (d, $J = 13.7$ Hz, 6H), 0.01 (d, $J = 10.4$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 176.4, 165.1, 158.3, 156.4, 151.4, 150.7, 128.4, 126.6, 122.8, 121.3, 116.0, 113.0, 101.6, 100.4, 84.5, 84.1, 63.9, 55.9, 26.2, 25.7, 18.7, 18.2, -4.7, -4.8, -5.1.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 569.2742, m/z (berechnet) = 569.2749.

3',5'-Bis(tert-butyldimethylsilyloxy)-3,5-dihydrofuranyl)-xanthon (8b)



8b

$C_{30}H_{42}O_5Si_2$
538,83 g/mol

1.00 g **6b** (3.64 mmol, 1.00 Äq), 1.25 g **3** (3.64 mmol, 1.00 Äq) und 1.11 ml Triethylamin (810 mg, 8.00 mmol, 2.20 Äq) wurden in 30 ml MeCN vorgelegt, über die *Freeze-Pump-Thaw*-Methode entgast und mit Argonatmosphäre geflutet. Anschließend wurden 400 mg [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]-dichloropalladium(II) (0.55 mmol, 0.15 Äq) zugegeben und die Mischung bei 75 °C für 72 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/E.E., 4:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.47 g (75%) erhalten.

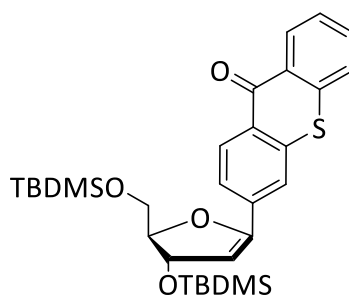
DC (DCM): $R_f = 0.35$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.35 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.16 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H), 7.72 (ddd, $J = 8.7, 7.1, 1.8$ Hz, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.40 – 7.36 (m, 1H), 5.85 (dd, $J = 4.0, 1.6$ Hz, 1H), 4.83 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.62 (tt, $J = 4.0, 2.1$ Hz, 1H), 3.93 (dd, $J = 11.3, 2.2$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J = 11.3, 3.8$ Hz, 1H), 0.93 (d, $J = 20.8$ Hz, 18H), 0.23 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.07 (d, $J = 2.2$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 177.3, 156.3, 156.0, 151.5, 139.3, 134.9, 134.8, 126.8, 124.6, 124.0, 122.0, 121.1, 118.3, 118.1, 102.1, 84.4, 84.1, 64.2, 26.1, 25.7, 18.7, 18.2, -4.7, -4.8, -5.1.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 539.2643, m/z (berechnet) = 539.2644.

3',5'-Bis(tert-butyldimethylsilyloxy)-3,5-dihydrofuranyl)-thioxanthone (8c)



8c

$C_{30}H_{42}O_4SSi_2$
554,89 g/mol

1.00 g **6c** (3.43 mmol, 1.00 Äq), 1.18 g **3** (3.43 mmol, 1.00 Äq) und 1.05 ml Triethylamin (764 mg, 7.55 mmol, 2.20 Äq) wurden in 30 ml MeCN vorgelegt, über die *Freeze-Pump-Thaw*-Methode entgast und mit Argonatmosphäre geflutet. Anschließend wurden 376 mg [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]-dichloropalladium(II) (0.51 mmol, 0.15 Äq) zugegeben und die Mischung bei 75 °C für 72 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/E.E., 4:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 0.86 g (45%) erhalten.

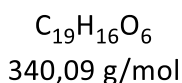
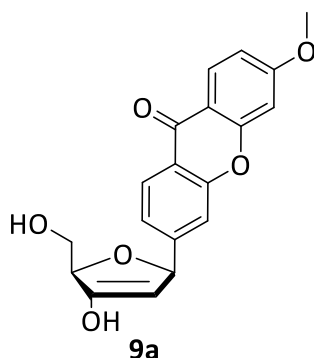
DC (DCM): $R_f = 0.4$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.65 – 8.57 (m, 1H), 8.49 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.06 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.65 – 7.52 (m, 3H), 7.47 (ddd, $J = 8.3, 6.6, 1.9$ Hz, 1H), 5.86 (dd, $J = 4.0, 1.6$ Hz, 1H), 4.84 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 4.63 (tt, $J = 4.0, 2.1$ Hz, 1H), 3.94 (dd, $J = 11.3, 2.4$ Hz, 1H), 3.83 (dd, $J = 11.3, 3.8$ Hz, 1H), 0.98 – 0.89 (m, 18H), 0.29 – 0.17 (m, 6H), 0.09 – 0.02 (m, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 180.0, 151.48, 142.0, 137.4, 136.7, 132.2, 132.2, 129.9, 129.4, 128.7, 127.7, 126.3, 126.1, 102.0, 84.4, 84.3, 64.2, 26.1, 25.7, 18.7, 18.2, -4.7, -4.8, -5.1.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 555.2410, m/z (berechnet) = 555.2415.

3-((5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl)-6-methoxyxanthon (9a)



1.00 g **8a** (1.75 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in 30 ml abs. THF vorgelegt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 0.80 ml Et₃N•3HF (4.90 mmol, 2.80 Äq) versetzt und für 20 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und schließlich säulenchromatographisch (DCM/Aceton, 1:2) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer quantitativen Ausbeute von 595 mg erhalten.

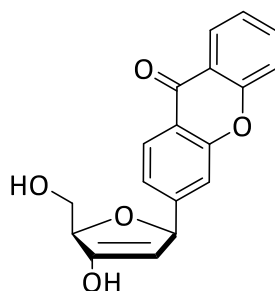
DC (Hexan/E.E. 3:1): R_f = 0.31

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.18 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.58 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 5.40 (dd, J = 10.2, 6.2 Hz, 1H), 5.10 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.09 (t, J = 3.0 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.75 (ddd, J = 12.0, 5.1, 2.6 Hz, 1H), 3.70 (ddd, J = 12.1, 6.1, 3.5 Hz, 1H), 3.00 (dd, J = 17.6, 6.0 Hz, 1H), 2.38 (dd, J = 17.6, 10.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 213.7, 174.7, 164.9, 157.6, 155.7, 149.0, 127.6, 126.1, 122.3, 120.6, 115.2, 115.0, 113.6, 100.6, 82.7, 75.7, 60.5, 56.1, 45.3.

HR-MS (ESI, [M+H]⁺): m/z (gefunden) = 341.1017, m/z (berechnet) = 341.1020.

3-((5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl)-xanthon (9b)



9b

$C_{18}H_{14}O_5$
310,31 g/mol

1.00 g **8b** (1.86 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in 30 ml abs. THF vorgelegt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 0.85 ml $Et_3N \cdot 3HF$ (5.20 mmol, 2.80 Äq) versetzt und für 20 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und schließlich säulenchromatographisch (DCM/Aceton, 1:2) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer quantitativen Ausbeute von 577 mg erhalten.

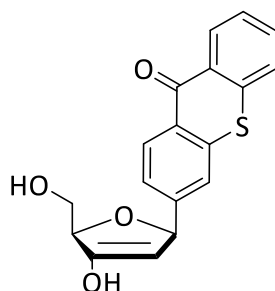
DC (Hexan/E.E. 3:1): R_f = 0.33

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.30 – 8.20 (m, 2H), 7.75 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.67 (ddd, J = 8.6, 7.0, 1.8 Hz, 1H), 7.41 – 7.29 (m, 3H), 5.27 (dd, J = 10.7, 6.0 Hz, 1H), 4.07 (t, J = 3.1 Hz, 1H), 3.98 (qd, J = 12.3, 3.2 Hz, 2H), 2.90 (dd, J = 17.9, 5.8 Hz, 1H), 2.52 (dd, J = 17.8, 11.0 Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 213.6, 177.0, 156.0, 155.8, 136.1, 135.1, 132.8, 126.7, 124.1, 121.5, 121.4, 118.5, 118.0, 82.8, 76.8, 61.5, 45.6.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 311.0912, m/z (berechnet) = 311.0914.

3-((5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl)-thioxanthon (9c)



9c

$C_{18}H_{14}O_4S$
326,37 g/mol

1.00 g **8c** (1.80 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in 30 ml abs. THF vorgelegt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 0.88 ml $Et_3N \cdot 3HF$ (5.05 mmol, 2.80 Äq) versetzt und für 20 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und schließlich säulenchromatographisch (DCM/Aceton, 1:2) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer quantitativen Ausbeute von 587 mg erhalten.

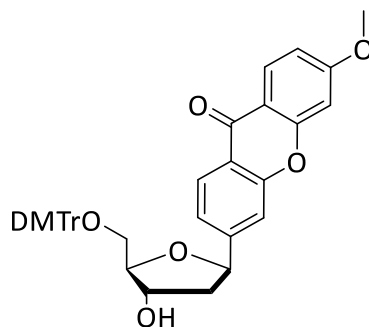
DC (Hexan/E.E. 3:1): $R_f = 0.34$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.67 – 8.57 (m, 2H), 7.73 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H), 7.67 – 7.55 (m, 3H), 7.50 (ddd, $J = 8.2, 6.8, 1.4$ Hz, 1H), 5.35 (dd, $J = 11.0, 5.8$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.06 – 3.95 (m, 2H), 2.96 (dd, $J = 17.9, 5.8$ Hz, 1H), 2.57 (dd, $J = 18.0, 11.0$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 213.4, 179.8, 138.5, 137.4, 137.2, 132.5, 130.1, 130.0, 129.1, 129.0, 127.4, 126.6, 126.6, 126.1, 82.7, 77.0, 61.6, 45.5.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 327.0680, m/z (berechnet) = 327.0686.

3-((4S,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-6-methoxyxanthon (10a)



10a

$C_{40}H_{36}O_8$
644,24 g/mol

1.00 g **1a** (2.92 mmol, 1.00 Äq) wurde unter Argonatmosphäre in 20 ml trockenem THF vorgelegt. Anschließend wurden 1.07 ml Triethylamin und 0.99 g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (2.92 mmol, 1.00 Äq) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Daraufhin wurden 10 mL MeOH zugesetzt und eine weitere Stunde gerührt. Danach wurde die Suspension mit Essigester verdünnt, dreimal mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.49 g (79 %) erhalten.

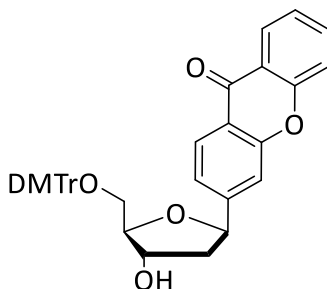
DC (Hexan/E.E. 3:1): R_f = 0.50

1H -NMR (500 MHz, $MeCN-d_3$): δ (ppm) = 8.15 (dd, J = 10.1, 8.5 Hz, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.48 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.37 (ddd, J = 10.7, 6.8, 2.5 Hz, 5H), 7.31 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.23 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.99 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.91 – 6.83 (m, 4H), 5.28 (dd, J = 9.9, 5.9 Hz, 1H), 4.32 (td, J = 5.8, 2.4 Hz, 1H), 4.05 (td, J = 4.5, 2.7 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.27 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 3.23 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 2.33 (ddd, J = 12.8, 5.9, 2.0 Hz, 1H), 2.00 – 1.97 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, $MeCN-d_3$): δ (ppm) = 176.3, 166.1, 159.6, 157.2, 151.8, 146.1, 137.0, 130.9, 129.0, 128.7, 127.7, 126.9, 122.6, 121.7, 116.5, 115.6, 114.2, 113.9, 101.2 (2C), 87.6, 86.9, 80.0, 74.0, 65.4, 56.8, 55.8, 55.1, 44.6, 29.6.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 667.2295, m/z (berechnet) = 667.2302.

3-((4S,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-xanthon (10b)



10b

$C_{39}H_{34}O_7$

614,69 g/mol

1.00 g **1b** (3.20 mmol, 1.00 Äq) wurde unter Argonatmosphäre in 20 ml trockenem THF vorgelegt. Anschließend wurden 1.31 ml Triethylamin und 1.12 g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (3.20 mmol, 1.00 Äq) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Daraufhin wurden 10 mL MeOH zugesetzt und eine weitere Stunde gerührt. Danach wurde die Suspension mit Essigester verdünnt, dreimal mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.06 g (54 %) erhalten.

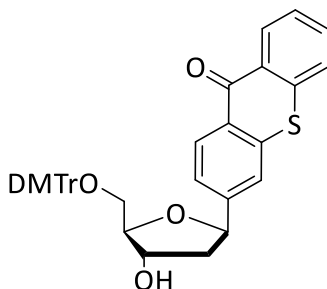
DC (Hexan/E.E. 3:1): R_f = 0.54

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.29 – 8.21 (m, 1H), 8.19 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.73 (dd, J = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 7.66 – 7.58 (m, 1H), 7.38 (dd, J = 13.2, 8.3 Hz, 4H), 7.24 (s, 3H), 7.21 – 7.05 (m, 5H), 6.77 – 6.70 (m, 4H), 5.21 (dd, J = 10.1, 5.6 Hz, 1H), 4.43 – 4.33 (m, 1H), 3.99 (dq, J = 13.4, 4.3 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 4.2 Hz, 6H), 3.29 (dd, J = 9.8, 4.6 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 9.8, 5.3 Hz, 1H), 2.23 (ddd, J = 13.2, 5.6, 1.9 Hz, 1H), 2.00 (ddd, J = 13.0, 10.2, 6.1 Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 177.4, 158.7, 156.3, 147.4, 139.6, 137.5, 136.1, 135.0, 133.0, 130.2, 129.2, 128.4, 127.9, 127.9, 127.2, 126.9, 124.1, 123.9, 118.4, 118.1, 118.1, 113.3, 87.7, 79.4, 74.8, 73.9, 64.6, 63.5, 55.3, 44.4, 43.9.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 637.2195, m/z (berechnet) = 637.2198.

3-((4S,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-thioxanthon (10c)



10c

$C_{39}H_{34}O_6S$

630,76 g/mol

1.00 g **1c** (3.05 mmol, 1.00 Äq) wurde unter Argonatmosphäre in 20 ml trockenem THF vorgelegt. Anschließend wurden 1.25 ml Triethylamin und 1.07 g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (3.05 mmol, 1.00 Äq) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Daraufhin wurden 10 mL MeOH zugesetzt und eine weitere Stunde gerührt. Danach wurde die Suspension mit Essigester verdünnt, dreimal mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.48 g (77 %) erhalten.

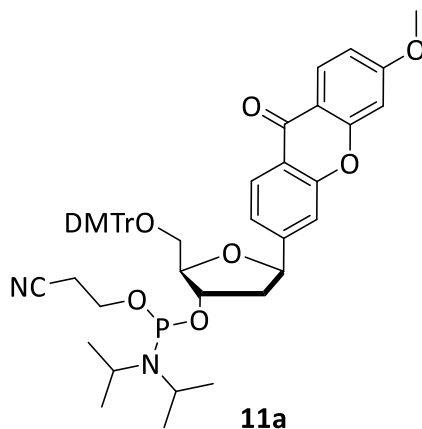
DC (Hexan/E.E. 3:1): $R_f = 0.55$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.62 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 1H), 8.57 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.78 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H), 7.65 – 7.56 (m, 3H), 7.48 (dd, $J = 8.4, 6.8$ Hz, 3H), 7.39 – 7.34 (m, 4H), 7.33 – 7.28 (m, 2H), 7.25 – 7.22 (m, 1H), 6.90 – 6.82 (m, 4H), 5.28 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.48 (td, $J = 6.3, 4.4$ Hz, 1H), 4.25 (q, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.39 (dd, $J = 9.6, 4.6$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 9.6, 5.9$ Hz, 1H), 2.78 (dt, $J = 13.3, 6.8$ Hz, 1H), 2.06 (ddd, $J = 13.3, 7.8, 6.1$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 179.9, 158.5 (2C), 144.7, 141.8, 137.3, 136.2, 135.9, 135.9, 132.2, 130.0 (4C), 129.9, 129.2, 129.2, 128.9, 128.1 (2C), 127.9 (2C), 126.9, 126.8, 126.4, 126.3, 126.0, 113.2 (4C), 86.4, 84.8, 79.3, 77.2, 75.1, 64.6, 55.2, 43.2.

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 630.2070, m/z (berechnet) = 630.2076.

(2R,3S)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(6-methoxyoxoxanthen-3-yl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite (11a)



$C_{49}H_{53}N_2O_9P$
844,35 g/mol

1.00 g **10a** (1.50 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in 10 ml abs. DCM gelöst. Es wurde daraufhin 700 µl Diisopropylethylamin (5.25 mmol, 3.50 Äq) zugegeben und die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 600 µl 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (2.25 mmol, 1.50 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck reduziert und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (DCM/Aceton, 50:1 + 0.1 % Et₃N). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 0.89 g (70 %) erhalten.

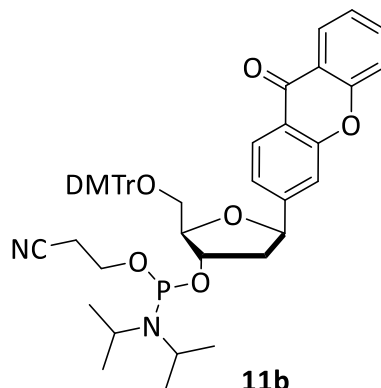
DC (DCM/ Aceton 10:1): R_f = 0.7

¹H-NMR 500 MHz, MeCN-*d*₃): δ (ppm) = 8.16 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 8.12 (dd, J = 8.9, 0.9 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.48 (ddd, J = 8.2, 3.7, 1.2 Hz, 2H), 7.41 – 7.38 (m, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 4H), 7.30 (td, J = 7.6, 3.0 Hz, 2H), 7.26 – 7.22 (m, 1H), 6.99 – 6.95 (m, 1H), 6.92 (dd, J = 5.2, 2.4 Hz, 1H), 6.86 (dt, J = 9.0, 2.7 Hz, 4H), 5.28 (dd, J = 10.0, 5.7 Hz, 1H), 4.58 – 4.46 (m, 1H), 4.21 (dq, J = 22.8, 3.7 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.77 (dd, J = 1.8, 1.0 Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.76 – 3.68 (m, 1H), 3.64 – 3.57 (m, 2H), 3.28 – 3.24 (m, 1H), 2.68 – 2.60 (m, 2H), 2.57 – 2.50 (m, 1H), 2.51 – 2.43 (m, 1H), 2.09 – 1.99 (m, 1H), 1.18 (d, J = 1.8 Hz, 3H), 1.17 (d, J = 2.0 Hz, 3H), 1.16 (d, J = 1.9 Hz, 3H), 1.15 (d, J = 2.7 Hz, 3H) .

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 147.4, 147.3.

HR-MS (ESI, [M+H]⁺): m/z (gefunden) = 843.3437, m/z (berechnet) = 843.3416.

(2R,3S,5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(9-oxo-9H-xanthen-3-yl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite (11b**)**



11b

$C_{48}H_{51}N_2O_8P$
814,92 g/mol

1.00 g **10b** (1.63 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in 10 ml abs. DCM gelöst. Es wurde daraufhin 726 µl Diisopropylethylamin (5.71 mmol, 3.50 Äq) zugegeben und die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 652 µl 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (2.45 mmol, 1.50 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck reduziert und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (DCM/Aceton, 50:1 + 0.1 % Et₃N). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 0.99 g (75 %) erhalten.

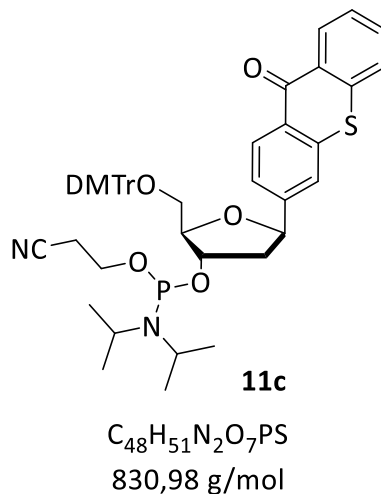
DC (DCM/ Aceton 10:1): R_f = 0.72

¹H-NMR 400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.16 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 8.12 (dd, J = 8.9, 0.9 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.48 (ddd, J = 8.33 (ddd, J = 13.0, 6.6, 1.9 Hz, 2H), 7.88 (ddd, J = 8.4, 5.7, 2.3 Hz, 1H), 7.73 (ddd, J = 8.6, 7.0, 1.8 Hz, 1H), 7.54 – 7.44 (m, 4H), 7.42 – 7.33 (m, 5H), 7.29 (dd, J = 7.3, 4.1 Hz, 2H), 7.20 (td, J = 7.1, 4.4 Hz, 1H), 6.90 – 6.75 (m, 4H), 5.30 (dd, J = 10.7, 5.1 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.27 (s, 1H), 3.81 (s, 1H), 3.79 (d, J = 2.0 Hz, 6H), 3.77 – 3.53 (m, 3H), 3.32 (dtd, J = 24.2, 9.8, 4.4 Hz, 2H), 2.63 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 2.58 – 2.31 (m, 2H), 2.08 (qd, J = 12.8, 11.1, 5.9 Hz, 1H), 1.26 – 1.15 (m, 9H), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 148.26, 147.92.

HR-MS (ESI, [M+H]⁺): m/z (gefunden) = 815.3449, m/z (berechnet) = 815.3456.

(2R,3S,5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(9-oxo-9H-thioxanthen-3-yl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite (11c)



1.00 g **10c** (1.59 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in 10 ml abs. DCM gelöst. Es wurde daraufhin 705 µl Diisopropylethylamin (5.55 mmol, 3.50 Äq) zugegeben und die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 633 µl 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (2.39 mmol, 1.50 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck reduziert und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (DCM/Aceton, 50:1 + 0.1 % Et3N). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.21 g (97 %) erhalten.

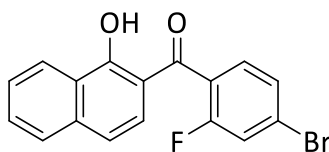
DC (DCM/ Aceton 10:1): Rf = 0.74

¹H-NMR 400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.65 – 8.55 (m, 2H), 7.79 (ddd, J = 8.4, 6.4, 2.0 Hz, 1H), 7.59 (dddd, J = 21.2, 13.1, 8.3, 2.0 Hz, 3H), 7.51 – 7.45 (m, 3H), 7.36 (td, J = 4.1, 2.1 Hz, 6H), 7.23 – 7.17 (m, 1H), 6.88 – 6.77 (m, 4H), 5.35 – 5.27 (m, 1H), 4.54 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.28 (s, 1H), 3.91 – 3.81 (m, 1H), 3.79 (d, J = 2.0 Hz, 6H), 3.73 – 3.53 (m, 3H), 3.40 – 3.24 (m, 2H), 2.63 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 2.55 – 2.39 (m, 2H), 2.14 – 2.01 (m, 1H), 1.21 – 1.16 (m, 9H), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 148.27, 147.90.

HR-MS (ESI, [M+H]⁺): m/z (gefunden) = 831.3224, m/z (berechnet) = 831.3227.

(4-bromo-2-fluorophenyl)(1-hydroxynaphthalen-2-yl)methanon (12)



12

$C_{17}H_{10}BrFO_2$
345,17 g/mol

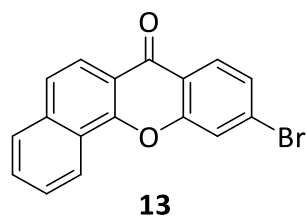
1.00 g 1-Naphthol (6.94 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 20 mL Nitrobenzol unter Schutzgas mit 0.95 mL 4-Bromo-2-fluorobenzoylchlorid (1.65 g, 6.94 mmol, 1.00 Äq.) versetzt und bei 130 °C für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurden insgesamt 0.45 g Aluminiumchlorid (3.47 mmol, 0.50 Äq.) unter Schutzgas zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit Eis versetzt und das Produkt aus der wässrigen Phase DCM extrahiert. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl-Lösung, destilliertem Wasser und gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und abfiltriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan → DCM) aufgereinigt. Das Produkts wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 0.3 g (13 %) erhalten.

DC (Hexan, DCM; 1:1): R_f = 0.63

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 13.62 (s, 1H), 8.45 (dt, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H), 7.69 (dt, J = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.60 (ddd, J = 8.2, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.50 (ddd, J = 8.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H), 7.40 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.38 - 7.29 (m, 2H), 7.20 (dd, J = 8.9, 3.2 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 9.0, 0.7 Hz, 1H).

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 344.99, m/z (berechnet) = 345.17.

10-Brombenzo[c]xanthon (13)



$C_{17}H_9BrO_2$
325,16 g/mol

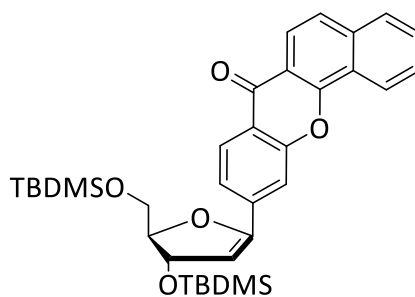
1.00 g **12** (2.90 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 20 mL DMF unter Argon-Schutzatmosphäre 0.44 g K_2CO_3 (3.19 mmol, 1.10 Äq.) zugegeben und das Gemisch bei 140 °C für 1.5 h gerührt. Das Produkt wurde mit DCM extrahiert, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM). Das Produkt wurde als gelber Feststoff in einer quantitativen Ausbeute von 0.94 g erhalten.

DC (Hexan/DCM 1:1): $R_f = 0.28$

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.57$ (ddd, $J = 7.7, 1.8, 0.7$ Hz, 1H), 8.20 (dd, $J = 8.6, 6.6$ Hz, 2H), 7.92 - 7.87 (m, 1H), 7.85 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.71 (dd, $J = 8.6, 0.9$ Hz, 1H), 7.69 – 7.62 (m, 2H), 7.51 (dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, 1H).

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 325.46 $[M^+]$; m/z (berechnet) = 325.16 $[M^+]$.

3',5'-Bis(tert-butyldimethylsilyloxy)-3,5-dihydrofuranyl)-benzo[c]xanthon (14)



14

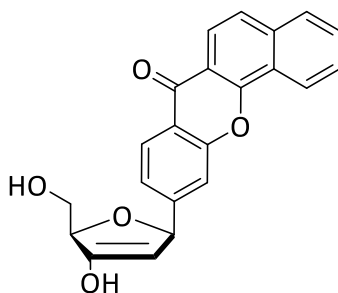
$C_{34}H_{44}O_5Si_2$
588,89 g/mol

1.00 g **13** (3.08 mmol, 1.00 Äq), 1.07 g **3** (3.29 mmol, 1.00 Äq) und 0.93 ml Triethylamin (685 mg, 6.776 mmol, 2.20 Äq) wurden in 30 ml MeCN vorgelegt, über die *freeze_pump-thaw*-Methode entgast und mit Argonatmosphäre geflutet. Anschließend wurden 338 mg [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]-dichloropalladium(II) (0.46 mmol, 0.15 Äq) zugegeben und die Mischung bei 75 °C für 72 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das teilweise aufgereinigte Rohprodukt wurde in einer Ausbeute von 816 mg (45 %) erhalten.

DC (DCM): $R_f = 0.41$

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 588.61[M⁺]; m/z (berechnet) = 588.89[M⁺].

3-((5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl)-benzo[c]xanthon (15)



15

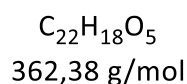
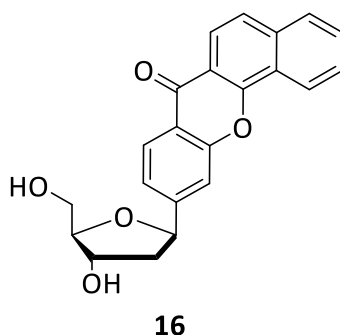
$C_{22}H_{16}O_5$
360,37 g/mol

1.00 g **14** (1.70 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in 30 ml abs. THF vorgelegt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 0.78 ml Et₃N•3HF (4.76 mmol, 2.80 Äq) versetzt und für 20 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und schließlich säulenchromatographisch (DCM/Aceton, 1:2) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute erhalten.

DC (Hexan/E.E. 3:1): R_f = 0.36

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 361.25[M⁺]; m/z (berechnet) = 360.37[M⁺].

Benzo[c]xanthon-Nukleosid (**16**)



1.00 g **15** (2.77 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Schutzgas mit 32 ml AcOH/MeCN (1:3) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 4.71 g Natriumtriacetoxyborhydrid (22.2 mmol, 8.00 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 40 min lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 32 ml EtOH/H₂O (1:1) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM → DCM/Methanol, 10:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 672 mg (67 %) erhalten.

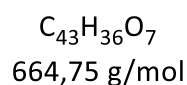
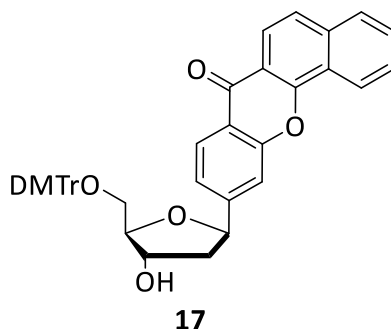
DC (DCM/MeOH 50:1): R_f = 0.29

¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.97 – 7.90 (m, 2H), 7.88 – 7.81 (m, 2H), 7.55 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.26 (dd, J = 10.2, 5.6 Hz, 1H), 5.20 (s, 1H), 4.89 (s, 1H), 4.26 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 3.91 (td, J = 5.1, 2.1 Hz, 1H), 3.59 (dd, J = 10.8, 4.1 Hz, 2H), 3.53 (dd, J = 11.0, 4.7 Hz, 1H), 2.26 (ddd, J = 12.6, 5.7, 1.4 Hz, 1H), 1.87 (ddd, J = 12.6, 10.4, 5.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 175.4, 155.3, 153.0, 151.2, 136.0, 130.0, 128.3, 127.5, 125.7, 124.2, 123.4, 122.6, 120.8, 120.7, 116.9, 115.1, 88.2, 78.6, 72.3, 62.3, 43.65.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 362.23[M^+]; m/z (berechnet) = 362.38[M^+].

3-((4S,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-benzo[c]xanthon (17)



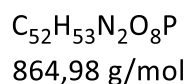
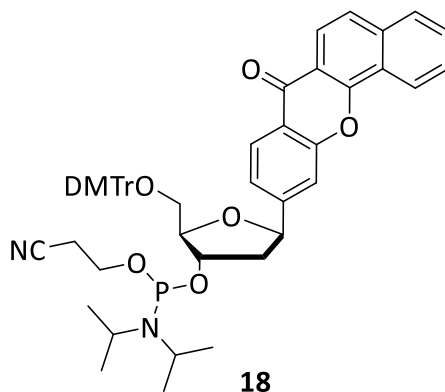
1.00 g **15** (2.76 mmol, 1.00 Äq) wurde unter Argonatmosphäre in 20 ml trockenem THF vorgelegt. Anschließend wurden 1.00 ml Triethylamin und 0.93 g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (2.76 mmol, 1.00 Äq) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Daraufhin wurden 10 mL MeOH zugesetzt und eine weitere Stunde gerührt. Danach wurde die Suspension mit Essigester verdünnt, dreimal mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM) aufgereinigt. Das teilweise aufgereinigte Rohprodukt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 0,88 g (48 %) erhalten.

DC (Hexan/E.E. 3:1): R_f = 0.59

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.62 (dd, J = 35.4, 8.4 Hz, 1H), 8.48 – 8.33 (m, 1H), 8.23 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.19 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 8.11 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 7.76 – 7.69 (m, 2H), 7.64 (dt, J = 14.5, 7.7 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.26 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 5.87 – 5.68 (m, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.53 (s, 1H), 4.10 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 3.91 (s, OH), 3.69 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 3.64 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 2.86 – 2.75 (m, 1H), 2.53 – 2.39 (m, 1H).

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 663.94[M⁺]; m/z (berechnet) = 664.75[M⁺].

(2R,3S,5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(7-oxo-7H-benzo[c]xanthen-10-yl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite (18)



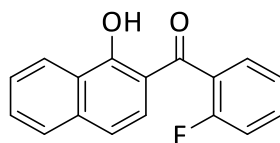
1.00 g **16** (1.50 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in 10 ml abs. DCM gelöst. Es wurde daraufhin 700 µl Diisopropylethylamin (5.25 mmol, 3.50 Äq) zugegeben und die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 600 µl 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (2.25 mmol, 1.50 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck reduziert und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (DCM/Aceton, 50:1 + 0.1 % Et₃N). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.15 g (89 %) erhalten.

DC (DCM/ Aceton 10:1): R_f = 0.72

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 148.21, 147.84.

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 864.86[M⁺]; m/z (berechnet) = 864.98[M⁺].

(2-fluorophenyl)(1-hydroxynaphthalen-2-yl)methanon (21)



$C_{17}H_{11}FO_2$
266,27 g/mol

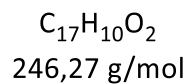
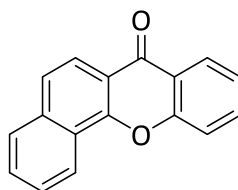
1.00 g 1-Naphthol (6.94 mmol, 1.00 Äq) und 0.828 mL 2-Fluorobenzoylchlorid (1.10 g, 6.94 mmol, 1.00 Äq) wurden in 20 mL Nitrobenzol wurde unter Argon-Schutzatmosphäre mit 0.92 g $AlCl_3$ (6.94 mmol, 1.00 Äq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei 140 °C gerührt. Das Produkt wurde mit DCM und E.E. extrahiert und beide organischen Phasen vereinigt. Diese wurden anschließend mit 1 M HCl-Lösung, gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und destilliertem Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels einer Säulenchromatographie (Hexan→DCM) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 0.547 g (30 %) erhalten.

DC (Hexan/DCM 1:1): $R_f = 0.65$

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 13.74 (s, 1H), 8.45 (dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz, 1H), 7.67 (dt, $J = 8.3, 1.0$ Hz, 1H), 7.58 (ddd, $J = 8.2, 6.8, 1.3$ Hz, 1H), 7.55 – 7.37 (m, 3H), 7.32 – 7.21 (m, 2H), 7.19 – 7.05 (m, 2H).

MALDI-TOF-MS: m/z (gefunden) = 265.70 [M^+]; m/z (berechnet) = 266.27 [M^+].

Benzo[c]xanthon (19)



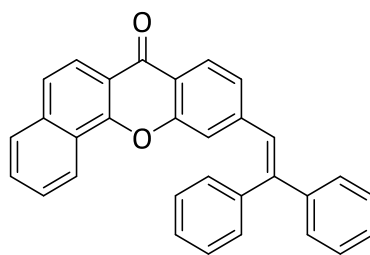
1.00 g **18** (3.76 mmol, 1.00 Äq) wurden unter Argon-Schutzatmosphäre in 20 mL DMF gelöst, mit 0.571 g K_2CO_3 (4.13 mmol, 1.10 Äq) und für 30 min bei 130 °C gerührt. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert, die organische Phase wurde mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 0.638 g (69 %) erhalten.

DC (Hexan, DCM; 1:1): $R_f = 0.30$

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 8.62 (ddd, $J = 7.5, 2.0, 0.8$ Hz, 1H), 8.35 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.91 – 7.83 (m, 1H), 7.78 – 7.54 (m, 5H), 7.39 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.1$ Hz, 1H).

HR-MS (ESI, $[M+H]^+$): m/z (gefunden) = 247.08 $[M^+]$; m/z (berechnet) = 246.27 $[M^+]$.

3-(2,2-Diphenylvinyl)benzo[c]xanthon (20)



$C_{31}H_{20}O_2$
424,50 g/mol

1.00 g **13** (3.08 mmol, 1.00 Äq) in 20 mL DMF wurde unter Argon-Schutzatmosphäre mit 0.543 mL 1,1-Diphenylethylen (0.554 g, 3.08 mmol, 1.00 Äq), 0.225 g Pd(dppf)Cl₂ (0.308 mmol, 0.10 Äq.) und 0.857 mL Triethylamin (0.622 g, 6.15 mmol, 2.00 Äq.) für 24 h bei 130 °C gerührt. Das Lösungsmittel und Triethylamin wurden unter vermindertem Durch entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan → DCM) aufgereinigt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 170 mg (13 %) erhalten

DC (Hexan, DCM; 1:1): R_f = 0.28

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.59 (dd, J = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 8.27 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.78 – 7.60 (m, 3H), 7.49 – 7.32 (m, 10H), 7.28 – 7.26 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.07 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H).

MALDI-MS: m/z (%) = 423.82 [M⁺]

6 Literaturverzeichnis

- [1] G. W. Lambert, C. Reid, D. M. Kaye, G. L. Jennings, M. D. Esler, *The Lancet* **2002**, 360, 1840–1842.
- [2] R. J. Nelson, B. C. Trainor, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 536–546.
- [3] T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, E. Sage, *Biochemistry* **2003**, 42, 9221–9226.
- [4] J. Zhang, G. T. Bowden, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11, 54–61.
- [5] P. G. Unna, *Br. J. Dermatol.* **1895**, 7, 83–85.
- [6] G. M. Findlay, *Lancet* **1928**, 212, 1070–1073.
- [7] a) Robert Koch-Institut, *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*, Robert Koch-Institut, Berlin, **2016**.
- b) Robert Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2009/2010*, Robert Koch-Institut, Berlin, **2013**.
- c) Robert Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2015/2016*, Berlin, **2019**.
- [8] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag*, München, **2006**.
- [9] F. R. de Gruijl, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2002**, 15, 316–320.
- [10] W. M. Horspool, F. Lenci, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, Volumes 1 & 2*, CRC press, Boca Raton, **2003**.
- [11] a) R. Beukers, W. Berends, *Biochimica et Biophysica Acta* **1960**, 41, 550–551.
- b) W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, 315, 625–629.
- [12] J. Cadet, C. Anselmino, T. Douki, L. Voituriez, *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, 15, 277–298.
- [13] J. A. Swenberg, K. Lu, B. C. Moeller, L. Gao, P. B. Upton, J. Nakamura, T. B. Starr, *Toxicol Sci*, **2011**, 130–145; C. Bernstein, A. R. Prasad, V. Nfonsam, H. Bernstein in *New Research Directions in DNA Repair* (Hrsg.: Prof. Clark Chen), *IntechOpen*, London, **2013**, 413–465.
- [14] I. G. Gut, P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2366–2373.

- [15] Z.-Q. You, C.-P. Hsu, G. R. Fleming, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 044506/1-044506/10.
- [16] N. Serpone, A. V. Emeline, *Int. J. Photoenergy* **2002**, *4*, 91–131.
- [17] S. Schauder, *Deutsches Ärzteblatt* **2005**, *102*, 2314–2318.
- [18] M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, J. Cadet, M. A. Miranda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1558–1570.
- [19] P. Wolf, *Deutsches Ärzteblatt* **1999**, *96*, 1493–1498.
- [20] R. B. Raffa, J. V. Pergolizzi, R. Taylor, J. M. Kitzen, *Clin. Pharm. Ther.* **2019**, *44*, 134–139.
- [21] L. Antusch, N. Gaß, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1385–1389.
- [22] a) M. Peacock, R. Brem, P. Macpherson, P. Karran, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *22*, 13714–13722.
- b) J.C. Kennedy, R.H. Pottier, *J Photochem Photobiol B* **1992**, *14*, 275–292.
- [23] S. R. Lucena, N. Salazar, T. Gracia-Cazaña, A. Zamarrón, S. González, Á. Juarranz, Y. Gilaberte, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 25912–25933.
- [24] D. Kessel, Y. Luo, *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, *42*, 89–95.
- [25] T. Bach, J. P. Hehn, *Angew. Chem. (Int. Ed.)* **2011**, *50*, 1000–1045.
- [26] R. Brimioulle, D. Lenhart, M. M. Maturi, T. Bach, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 3944–3963.
- [27] W. G. Herkstroeter, A. A. Lamola, G. S. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4537.
- [28] O. S. Wolfbeis, E. Fiirlinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4069–4072.
- [29] S. Tamke, J. Paradies, *Nachr. Chem.* **2013**, *61*, 1122–1127.
- [30] H. Trommsdorff, *Liebigs Ann. Chem.* **1834**, *11*, 190–207.
- [31] D. Wöhrle, M. W. Tausch, W.-D. Stohrer, *Photochemie. Konzepte, Methoden, Experimente 2010. Aufl.*, Wiley-VCH, Weinheim **2010**.
- [32] S. Poplata, A. Tröster, Y.-Q. Zou, T. Bach, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9748.
- [33] L. A. Paquette, *Combining C-C-Bonds: Volume 5*, Elsevier Science-Verlag, Online-Version, **1992**.

- [34] E. Paternò, G. Chieffi, *Gazz. Chim. Ital.* **1909**, 39, 341-361.
- [35] G. Büchi, C. G. Inman, E. S. Lipinsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 4327-4331.
- [36] M. Demuth, G. Mikhail, *Synthesis* **1989**, 1989, 145.
- [37] T. Bach, *Synthesis* **1998**, 1998, 683.
- [38] W. Ostwald, *Prinzipien der Chemie. Eine Einleitung in alle chemischen Lehrbücher BoD – Books on Demand*, Salzwasser-Verlag, Paderborn, **2011**.
- [39] N. Serpone, A. V. Emeline, *Int. J. Photoenergy* **2002**, 4, 41.
- [40] L. Buzzetti, G. E. M. Crisenza, P. Melchiorre, *Angew. Chem.* **2019**, 131, 3768-3786.
- [41] C. Haeßner, K. Köhler, K. Wussow, *Chem. unserer Zeit* **2014**, 48, 246-259.
- [42] M. Klessinger, J. Michl: *Lichtabsorption und Photochemie Organischer Moleküle*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York **1989**.
- [43] P. F. Bernath, *Spectra of Atoms and Molecules*, Oxford University Press Inc., New York, **2005**.
- [44] A. Jablonski, *Nature* **1933**, 131, 839–840.
- [45] H. P. Latscha, U. Kazmaier, H. A. Klein, *Organische Chemie, Vol. 7*, Springer Spektrum-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2015**.
- [46] A. Jabłoński, *Z. Angew. Phys.* **1935**, 94, 38-46.
- [47] J. Franck, E. G. Dymond, *Trans. Faraday Soc.* **1926**, 21, 536–542.
- [48] E. Condon, *Phys. Rev.* **1926**, 28, 1182–1201.
- [49] S. E. Braslavsky, *Pure Appl. Chem.* **2007**, 79, 293.
- [50] M. A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.* **1967**, 1, 8-16.
- [51] M. Kasha, *Faraday Discuss.* **1950**, 9, 14-19.
- [52] P. Klán, J. Wirz, *Photochemistry of Organic Compounds*, WILEY-VCH-Verlag, Chichester, **2009**.
- [53] E. T. Benković, S. Kreft, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 5715–5724.

- [54] R. Alonso, T. Bach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 4368–4371.
- [55] A. Tröster, R. Alonso, A. Bauer, T. Bach, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 7808–7811.
- [56] R. Alonso, T. Bach, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 4457–4460.
- [57] T. Förster, *Ann. Physik.* **1948**, 437, 55–75.
- [58] T. Förster, *Sci. Nat.* **1946**, 6, 166–175.
- [59] F. Perrin, *Ann. Chim. Phys.* **1932**, 17, 283–314.
- [60] D. L. Dexter, *Int. J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 836–850.
- [61] J. Svoboda, B. König, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 5413–5430.
- [62] P. Wessig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2168–2171.
- [63] P. Wessig, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 2224–2227.
- [64] N. Vallavoju, J. Sivaguru, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 4084–4101.
- [65] J. C. Barreto, M. T. S. Trevisan, W. E. Hull, G. Erben, E. S. De Brito, B. Pfundstein, G. Würtele, B. Spiegelhalder, R. W. Owen, *J. Agr. Food Chem.* **2008**, 14, 5599–5610.
- [66] H. A. Jung, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 2077–2082.
- [67] T. Shan, Q. Ma, *Curr. Mol. Med.* **2011**, 666–677.
- [68] K. Iijima, T. Misu, S. Ohnishi and S. Onuma, *J. Mol. Struct.* **1989**, 213, 263–269.
- [69] H. J. Pownall, J. R. Huber, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 6429–6436.
- [70] R. E. Connors, P. S. Walsh, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, 52, 436–438.
- [71] B. Heinz, B. Schmidt, C. Root, H. Satzger, F. Milota, B. Fierz, T. Kiefhaber, W. Zintha, P. Gilch, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2006**, 8, 3432–3439.
- [72] Ch. Müller, A. Bauer, T. Bach, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 6767–6769.
- [73] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, *Stryer Biochemie*, Springer Verlag, Berlin, **2013**.
- [74] U. Hennecke, "DNA Photoschäden: Untersuchungen zur Synthese, enzymatischen Erkennung und Reparatur", *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität, München, **2007**.

- [75] H. Greim, *Das Toxikologiebuch: Grundlagen, Verfahren, Bewertung*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2017**.
- [76] J. Murken, *Humangenetik*, Georg Thieme Verlag, Leipzig, **2006**.
- [77] W. Schreier, "UV-Strahlung und DNA-Schäden: Untersuchung UV-induzierter Prozesse in Nukleinsäuren mit Femtosekunden-Infrarotspektroskopie", *Dissertation*, Ludwig-Maximilians- Universität, München, **2008**.
- [78] S. Mouret, C. Philippe, J. Gracia-Chantegrel, A. Banyasz, S. Karpati, D. Markovitsi, T. Douki, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1706–1711.
- [79] J.-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *63*, 88–102.
- [80] J. Cadet, T. Douki, E. Sage, *Mutat. Res.* **2006**, *571*, 13765–13770.
- [81] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13765–13770.
- [82] J. S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76–82.
- [83] J. S. Taylor, M. P. Cohrs, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2834–2835.
- [84] 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.* **2012**, *124*, 421–424.
- [85] K. Heil, D. Pearson, T. Carell, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4271–4278.
- [86] T. Douki, E. Sage, *Photochem. Photobiol.* **2016**, *15*, 24-30.
- [87] J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat, *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 140-155.
- [88] H.-A. Wagenknecht, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 3197-3198.
- [89] E. M. Boom, J. K. Barton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *12*, 320-329.
- [90] E. L. Loechler, *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 895–902.
- [91] A. K. Basu, J. M. Essigmann, *Chem. Res. Toxicol.* **1988**, *1*, 1–18.
- [92] C. C. T. Wörth, "Entwicklung eines Nachweis-Verfahrens für DNA-Addukte basierend auf Fluoreszenzderivatisierung und kapillarelektrophoretischer Trennung", *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, **2000**.

- [93] M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, J. Cadet, M. A. Miranda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1558-1570.
- [94] J. Cadet, C. Anselmino, T. Douki, L. Voituriez, *Photochem. Photobiol.* **1992**, *15*, 277-298.
- [95] K. Nakatani, T. Yoshida, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2118-2119.
- [96] A. J. Deans, S. C. West, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 467–480.
- [97] S. R. Rajsiki, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2723–2796.
- [98] Q. Wu, L. A. Christensen, R. J. Legerski, K. M. Vasquez, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 551-557.
- [99] A. J. Deans, S. C. West, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 467–480.
- [100] S. R. Rajsiki, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2723–2796.
- [101] J. Yang, C. J. Wiley, D. A. Godwin, L. A. Felton, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69*, 605-612.
- [102] P. V. Scaria, R. H. Shafer, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5417–5423.
- [103] B. P. Kremer, H. Bannwarth, *Einführung in die Laborpraxis. Basiskompetenzen für Laborneulinge*, Springer Spektrum, Heidelberg, **2018**, 183–195.
- [104] G. P. Pfeifer, Y.-H. You, A. Besaratinia, *Mut. Res.* **2005**, *571*, 19-31.
- [105] M. Martens, C. Seebode, J. Lehmann, S. Emmert, *Akt Dermatol* **2018**, *44*, 226-231.
- [106] S. Tommasi, M. F. Denissenko, G. P. Pfeifer, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 427-473.
- [107] A. F. Bais, R. L. McKenzie, G. Bernhard, P. J. Aucamp, M. Ilyas, S. Madronich, K. Tourpali, *Photochem. Photobiol.* **2015**, *14*, 19-52.
- [108] L. F. Z. Batista, B. Kaina, R. Meneghini, C. F. M. Menck, *Mut. Res* **2009**, *681*, 197-208.
- [109] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974.
- [110] W. Hiddemann, *Die Onkologie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, **2010**.
- [111] D. C. Thomas, T. A. Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1933**, *90*, 7744-7748.
- [112] J. O. Fuss, P. K. Cooper, *PLoS Biol* **2006**, *4*, 899-903.
- [113] J. van Noort, F. Orsini, A. Eker, C. Wyman, B. de Grooth, J. Greve, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 3875-3880.

- [114] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237.
- [115] H.-J. He, E. V. Stein, P. DeRose, K. D. Cole, *BioTechniques* **2018**, *64*, 59-68.
- [116] C. Curutchet, A.A. Voityuk, *Angew. Chem.* **2011**, *50*, 1820.
- [117] J.Krim, C.Grünewald, M. Taourirte, J.W. Engels, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 480-486.
- [118] a) N. Joubert, R. Pohl, B. Klepetárová, M. Hocek, *J. Org. Chem* **2007**, *72*, 6797-6805.
b) G.D. Daves, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 201-206.
- [119] R.N. Farr, G.D. Daves, *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9*, 653-660.
- [120] R. Beukers, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *41*, 550-551.
- [121] W.J. Schreier, T.E. Schrader, F.O. Koller, P. Gilch, C.E. Crespo-Hernandez, V.N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, *315*, 625-629.
- [122] F. Bosca, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, J. V. Castell, M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318-6319.
- [123] H.-A. Wagenknecht, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 974–1006.
- [124] B. M. Pilles, D. B. Bucher, L. Liu, P. Clivio, P. Gilch, W. Zinth, W. J. Schreier, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1616–1622.
- [125] A. Kuhlmann, L. Bihr, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 1-5.
- [126] K. Börjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288–4293.
- [127] L. Liu, B. M. Pilles, J. Gontcharov, D. B. Bucher, W. Zinth, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 292–298.
- [128] S. Häcker, M. Schrödter, A. Kuhlmann, and H.-A. Wagenknecht, *JACS Au* **2023**, *3*, 1843-1850.
- [129] K. D. Robertson, A. P. Wolffe, *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 11–19.
- [130] S. Kumar, V. Chinnusamy, T. Mohapatra, *Front. Genet.* **2018**, *9*, 640.
- [131] D. B. Bucher, C. L. Kufner, A. Schlueter, T. Carell, W. Zinth, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 186-190.

- [132] A. Banyasz, L. Esposito, T. Douki, M. Perron, C. Lepori, R. Improta, D. Markovitsi, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 4232–4242.
- [133] W.G. Herkstroeter, A.A. Lamola, G.S. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4537–4540.
- [134] N.F. Nikitas, P.L. Gkizis, C.G. Kokotos, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 5237–5253.
- [135] F. Bosca, V. Lhiaubet-Vallet, M.C. Cuquerella, J.V. Castell, M.A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318–6319.
- [136] B. Albinsson, M. P. Eng, K. Pettersson, M. U. Winters, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 5847–5864.
- [137] R. E. Holmlin, R. T. Tong, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9724–9725.
- [138] A. Schwögler, L.T. Burgdorf; T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3918–3920.
- [139] D. A. Vicic, D. T.Odom, M. E.Nunez, D. A. Gianolio, L. W. McLaughlin, J. K Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8603–8611.
- [140] B. Bouvier, J.-P. Dognon, R. Lavery, D. Markovitsi, P. Millié, D. Onidas, K. Zakrzewska, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 13512–13522.
- [141] A. Krueger, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 3091–3099.
- [142] S. Kim, K. Choi, *Environ. Int.* **2014**, *70*, 143–157.
- [143] D. G. Mercurio, T. A. L. Wagemaker, V. M. Alves, C. G. Benevenuto, L. R. Gaspar, P. M. B. G. Maia Campos, *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *153*, 121–126.
- [144] J. D. Bos, M. M. Meinardi, *Exp. Dermatol.* **2000**, *9*, 165–169.
- [145] A. Mavon, C. Miquel, O. Lejeune, B. Payre, P. Moretto, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2007**, *20*, 10–20.
- [146] N. J. Yang, M. J. Hinner, *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1266*, 29–53.
- [147] D. E. Moore, *Drug Saf.* **2002**, *25*, 345–372.
- [148] J. Ferguson, B. E. Johnson, *Br. J. Dermatol.* **1990**, *123*, 9–20.
- [149] B. O. Ljunggren, K. Lundberg, *Photodermatol.* **1985**, *2*, 377–382.

[150] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, 29, 2176-2179.

[151] C. Berg, United States Patent: US2003/0229233, A1; Applicationnumber: 10/408332; 2003

[152] L. Vacek, H. M. Foster (The Sherwin-Williams Company); United States Patent: 4101558; Applicationnumber: 05/789465; 1978.

6.1 Veröffentlichungen

A. Kuhlmann, L. Bihr, H.-A. Wagenknecht, How Far Does Energy Migrate in DNA and Cause Damage? Evidence for Long-Range Photodamage to DNA, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 1-5. - <https://doi.org/10.1002/anie.202009216>

German version of *Angewandte Chemie*: „Wie weit wandert Energie in der DNA und verursacht Schäden? Nachweis des Langreichweitigen Photoschadens in DNA“ – <https://doi.org/10.1002/ange.202009216>

S. Häcker, M. Schrödter, A. Kuhlmann, and H.-A. Wagenknecht, Probing of DNA Photochemistry with C-Nucleosides of Xanthenes and Triphenylene as Photosensitizers To Study the Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers, *JACS Au* **2023**, 3, 1843-1850. - DOI:10.1021/jacsau.3c00167

A. Kuhlmann, S. Hermann, M. Weinberger, A. Penner und H.-A. Wagenknecht, Photocatalysis with nucleic acids and peptides, *Phys. Sci. Rev.* **2018**, 3, 20170170. - <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0170>

6.2 Konferenzen und Poster

10/2017 GRK2039 – Symposium on Molecular Architectures for Fluorescent imaging of Cells, Karlsruhe.

06/2019 VIII Ciamician Photochemistry School, Bologna.

09/2019 A. Kuhlmann, L. Bihr, H.-A. Wagenknecht, „Photocatalytic Study of CPD Damage Induced by TTET Using a Simple and Effektive Setup“, IX. Nukleinsäurechemie-Treffen der deutschen Nukleinsäure Gemeinschaft (DNG), Saarbrücken.

10/2019 Tag der Organischen Chemie an der Universität Stuttgart (TOCUS), Stuttgart.

6.3 Lehre

SS18 Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie.

08 – 11/18 Betreuung der Bachelorarbeit von YVES HAUß.

WS18/19 Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikum für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie.

WS18/19 Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenenpraktikum für Studierende der Chemie, Studiengang A, und der Chemischen Biologie.

11/18 – 02/19 Betreuung der Vertieferarbeit von FABIAN WEICK.

09/18 – 08/19 Betreuung der Auszubildenden SINA JASCHIK.

SS19 Betreuung des Seminars zum Organisch-Chemischen Grundpraktikum für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie.

SS19 Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenenpraktikum für Studierende der Chemie, Studiengang A, und der Chemischen Biologie.

06 – 09/19 Betreuung der Bachelorarbeit von LARISSA BIHR.

WS19/20 Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikum für Studierende der Chemie, Chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie.

WS19/20 Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenenpraktikum für Studierende der Chemie, Studiengang A, und der Chemischen Biologie.

SS20 Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikum für Studierende der Chemie, Chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie.

SS20 Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenenpraktikum für Studierende der Chemie, Studiengang A, und der Chemischen Biologie.

03 – 05/20 Betreuung der Hilfswissenschaftler CELINA BOOS und SIMON PELZ.

03 – 09/20 Betreuung der Vertieferarbeit von CHRISTIAN RITSCHEL.

07 – 11/20 Betreuung des Vorpraktikums und der Bachelorarbeit von JANINE HAUG.

WS20/21 Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikum für Studierende der Chemie, Chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie.

WS20/21 Betreuung des Organisch-Chemischen Fortgeschrittenenpraktikum für Studierende der Chemie, Studiengang A, und der Chemischen Biologie.

7 Eidesstaatliche 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

Arthur Kuhlmann