

**OXIDATIVE DNA-SCHÄDIGUNG DURCH
ELEKTRONISCH ANGEREGTE CARBONYLVERBINDUNGEN
UND DARAUS GEBILDETE RADIKALSPEZIES**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Markus A. Arnold
aus Flörsheim

Würzburg 2001

Eingereicht am: 12. Dezember 2001

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Waldemar Adam

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans J. Gross

der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. Dr. h. c. Waldemar Adam

2. Prüfer: Prof. Dr. Dr. Wolfgang Dekant

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur Kindern,
die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton, engl. Mathematiker, Physiker und Astronom

Danksagung

Zur Durchführung einer Dissertation ist man auf die Mithilfe und Unterstützung von vielen Menschen angewiesen. Diesen will ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. h. c. Waldemar Adam für die Möglichkeit danken, dieses interessante, oft längere Diskussionen erfordernde Thema in seinem Arbeitskreis völlig frei bearbeiten zu können. Besonderer Dank gebührt ihm, da er mir die Möglichkeit gab, in Spanien vor internationalem Publikum einen Vortrag über meine Arbeiten zu halten, sowie zwei Wochen in Basel zu verbringen um die spektroskopischen Eigenschaften der angeregten Acetophenonderivate zu untersuchen.

An dieser Stelle sei auch Dr. Chantu Saha-Möller gedankt, der nicht nur alle Paperkonzepte mit korrigiert hat, sondern auch einer der wenigen Experten im Arbeitskreis für DNA-Oxidation war und jederzeit für Diskussionen bereit stand.

Weiter möchte ich Prof. Dr. Nau und Dr. Uwe Pischel für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung bei der Durchführung der Laserblitz-Photolyseexperimente während meines Aufenthaltes in Basel danken. Dr. Matthias Grüne danke ich für die Aufnahme des SELINQUATE-Spektrums.

Innerhalb des Arbeitskreises geht ein besonders herzliches Dankeschön an die Bewohner des „Grünen Salons“, Annemarie Kurz, die uns Mitte 2000 verlassen hat, und Stefan Marquardt, der mit mir die Doktorarbeit begonnen hat und mit dem ich noch gemeinsam den „Grünen Salon“ auflösen werde. Vor allem nach stundenlangem Einspritzen in die HPLC bzw. wenn dieselbe wieder einmal nicht funktionierte sorgten sie für Unterhaltung und gute Laune aber auch wenn die Chemie nicht so klappte wie geplant hatten sie offene Ohren. Auch Dr. Hideki Okamoto danke ich für die gute Zusammenarbeit während seiner PostDoc-Zeit.

Ein weiteres Dankeschön gebührt dem gesamten Labor 412, nämlich Simon Schambony, Nils Bottke, Georg Degen, Katharina Schmidt, Peter Groer sowie den „Gastforschern“ Dr. Dimitri Kazakov, Efsthios Gogonas und Dr. Juan Arguello für die schnelle unkomplizierte

Bereitstellung von Geräten und Chemikalien aller Art sowie die gute Zusammenarbeit. Den Laborantinnen Ana-Maria Krause, Helga Kraft und Christa Wolz danke ich für die Unterstützung bei der synthetischen Arbeit.

Gerade im Zusammenhang mit der Fertigstellung der Dissertation ist den Korrekturlesern zu danken. Ich danke Dr. Annemarie Kurz, die die fast fertige Arbeit nochmals komplett durchgeschaut hat, Rainer Bargon, Manfred Diederich, Dr. Günther Grimm, Stefan Marquardt, Konrad Roschmann und Dr. Armin Sautter für das gründliche Aufspüren und Eliminieren von zahlreichen Fehlern.

Zum Schluss noch ein herzliches Dankeschön an die ganze Gruppe (inklusive SDI sowie Social-Managerin Agi Kämpf) für das gute Arbeitsklima sowie deren sportlichere Mitglieder für die Teilnahme an Tischtennis-, Volleyball und Badmintonspielen.

Und nicht zu vergessen, ein großes Dankeschön an meine Eltern, die mich während der ganzen Zeit unterstützt haben.

Dankeschön!

Publikationsliste

Beiträge in Fachzeitschriften:

1. "Hydroxamate-Bridged Dinuclear Nickel Complexes as Models for Urease Inhibition", M. Arnold, D. A. Brown, O. Deeg, W. Errington, W. Haase, K. Herlihy, T. J. Kemp, H. Nimir, R. Werner, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2920-2925.
2. "4-Tert-Butylperoxymethyl-9-methoxypsoralen as Intercalating Photochemical Alkoxyl-Radical Source for Oxidative DNA Damage", W. Adam, M. A. Arnold, G. N. Grimm, C. R. Saha-Möller, F. Dall'Acqua, D. Vedaldi, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 511-518.
3. "Photooxidative Damage of Guanine in DG and DNA by the Radicals Derived from the a Cleavage of the Electronically Excited Carbonyl Products Generated in the Thermolysis of Alkoxymethyl-Substituted Dioxetanes and the Photolysis of Alkoxyacetones", W. Adam, M. A. Arnold, C. R. Saha-Möller, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 597-604.
4. "Structure-Dependent Reactivity of Oxyfunctionalized Acetophenones in the Photooxidation of DNA: Base Oxidation and Strand Breaks through Photolytic Radical Formation (Spin Trapping, EPR Spectroscopy, Transient Kinetics) versus Photosensitization (Electron Transfer, Hydrogen-Atom Abstraction)", W. Adam, M. A. Arnold, W. M. Nau, U. Pischel, C. R. Saha-Möller, *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 4955-4962.
5. "Spiroiminodihydantoin is a Major Product in the Photooxidation of 2'-Deoxyguanosine by the Triplet States and Oxyl Radicals Generated from Hydroxyacetophenone Photolysis and Dioxetane Thermolysis", W. Adam, M. A. Arnold, M. Grüne, W. M. Nau, U. Pischel, C. R. Saha-Möller, *Org. Lett.*, eingereicht.

6. "A Comparative Photomechanistic Study (Spin Trapping, EPR Spectroscopy, Transient Kinetics, Photoproducts) of Nucleoside Oxidation (dG and 8-oxodG) by Triplet-Excited Acetophenones and by the Radicals Generated from α -Oxy-Substituted Derivatives through Norrish-Type I Cleavage", W. Adam, M. A. Arnold, W. M. Nau, U. Pischel, C. R. Saha-Möller, *J. Am. Chem. Soc.*, eingereicht.

Poster:

1. "Oxidative Stress: Genotoxicity and Cytotoxicity Induced by Reactive Oxygen Species", W. Adam, S. Andler, M. A. Arnold, G. N. Grimm, A. Kurz, S. Marquardt, M. Möller, C. R. Saha-Möller, Internationales Theodor-Boveri-Symposium des SFB 172 "Genomic Instability in Carcinogenesis, Mechanisms, Detection and Clinical Relevance", Würzburg, Deutschland, 5.-7.11.1998.

Vortrag:

1. "Photooxidative DNA Damage Induced by Electronically Excited Species Generated in the Thermolysis of Dioxetanes", M. A. Arnold, W. Adam, C. R. Saha-Möller, 8th Congress of the European Society for Photobiology (ESP), Granada, Spanien, 3.-8.9.1999.

Inhaltsverzeichnis

Erläuterungen und Abkürzungen.....	IX
Zusammenfassung.....	XI
Summary.....	XV
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Oxidativer Stress	3
2.1.1 Beteiligung angeregter Verbindungen am oxidativen Stress	3
2.1.2 Beteiligung von Peroxylradikalen am oxidativen Stress.....	3
2.1.3 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	4
2.2 Oxidative Schädigung von DNA durch reaktive Sauerstoffspezies.....	4
2.2.1 Oxidation der DNA-Basen	5
2.2.2 Bildung von Strangbrüchen.....	6
2.2.3 Schadenstransfer zwischen Basen und Zucker.....	6
2.2.4 Relevanz der DNA-Schäden.....	6
2.2.4.1 8-oxoGua	6
2.2.4.2 Imidazolon.....	6
2.2.5 Detektion der DNA-Schäden.....	7
2.2.5.1 Detektion von Basenschäden.....	7
2.2.5.2 Detektion von Strangbrüchen in plasmidischer pBR 322 DNA.....	8
2.3 DNA-schädigende Wirkung ausgewählter reaktiver Spezies.....	8
2.3.1 UV-Licht.....	9
2.3.2 Elektronisch angeregte Zustände.....	9
2.3.2.1 Singulett-sauerstoff.....	10
2.3.3 Radikalspezies	10
2.3.3.1 Hydroxylradikale.....	10
2.3.3.2 Alkoxyradikale	11
2.3.3.3 Peroxylradikale.....	11

2.3.3.4	Alkylradikale.....	13
2.3.4	Peroxide	14
2.3.4.1	Wasserstoffperoxid	14
2.3.4.2	Superoxidradikalanion	14
2.3.4.3	Hydroperoxide	14
2.4	Einsatz von Dioxetanen zur Untersuchung von DNA-Schäden	15
2.4.1	Thermischer Zerfall von Dioxetanen	15
2.4.2	DNA-Schäden durch bei der Thermolyse von Dioxetanen freigesetzte angeregte Spezies.....	16
2.5	Mechanistische Aspekte der DNA-Oxidation.....	17
2.5.1	Photochemie von Ketonen	17
2.5.1.1	Norrish-Typ-I.....	17
2.5.1.2	Norrish-Typ-II.....	18
2.5.1.3	β -Bindungsbruch.....	18
2.5.1.4	Reaktionen mit H-Donoren und e^- -Donoren.....	19
2.5.2	Reaktivität elektronisch angeregter Carbonylverbindungen.....	19
2.5.2.1	Unterscheidung Typ-I / Typ-II Sensibilisator.....	19
2.5.2.2	Elektronentransfer (Typ-I)	20
2.5.2.3	Durch triplettangeregte Ketone induzierte DNA-Oxidation.....	20
2.5.2.3.1	Acetophenon vs. Aceton	21
2.5.3	Reaktivität kohlenstoffzentrierter Radikale	21
2.5.4	Reaktivität von Peroxylradikalen.....	21
2.5.4.1	Bimolekulare Reaktion von Peroxylradikalen	21
2.5.4.2	Wasserstoffabstraktion durch Peroxylradikale	23
2.5.4.3	Addition von Peroxylradikalen an Doppelbindungen.....	23
2.6	Einsatz des Nukleosids dG als „Modellbase“	23
2.6.1	Zwei- und Vierelektronenoxidation von Guanin	24
2.6.2	Bildung von 8-oxodG.....	24
2.6.3	Weiteroxidation von 8-oxodG	25
2.6.4	Deprotonierungsgleichgewicht des dG-Radikalkations.....	26
2.6.5	Bildung von Spiroiminodihydantoin.....	27
2.6.6	Bildung von guanidin-freisetzenden Verbindungen (GRP).....	28
2.6.7	Produkte der Oxidation von Nukleosiden durch elektronisch angeregte Zustände	29

2.6.7.1.1	Produkte der durch Aceton sensibilisierten Basenoxidation	29
2.6.7.1.2	Produkte der durch Acetophenon sensibilisierten Basenoxidation	29
2.6.7.1.3	Produkte der durch Benzophenon sensibilisierten Basenoxidation.....	29
3	Problemstellung	31
3.1.1	DNA-Basenoxidation durch alkoxymethylsubstituierte Ketone	31
3.1.2	Wird die dG-Oxidation durch angeregte Zustände oder durch Radikale induziert ?	32
3.1.2.1	Auswahl geeigneter Derivate	32
3.1.2.2	Bilden die Ketone bei der Photolyse Radikalspezies ?.....	33
3.1.2.3	Untersuchung der Reaktivität der Peroxylradikale gegenüber DNA und dG	34
3.1.3	Was hat es mit der Sonderrolle des Acetoxysubstituenten auf sich ?	35
3.1.4	Welche Rückschlüsse lassen sich auf die Oxidationsmechanismen ziehen ? ..	35
3.1.5	Synthese eines Dioxetans, das bei der Thermolyse triplettangeregtes AP-OH freisetzt	36
4	4-HO-8-oxodG vs. Spiroiminodihydantoin	37
4.1	Ergebnisse.....	37
4.1.1	Darstellung von Spiroiminodihydantoin	37
4.1.2	Darstellung von Spiroiminodihydantoin durch Einelektronenoxidation von 8-oxodG	37
4.1.3	Selective Inadequate-Spektrum (SELINQUATE, Selective Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment).....	37
4.2	Diskussion	38
5	Oxidation von dG und DNA durch alkoxy-substituierte 3,3,4,4-Tetramethyldioxetane	39
5.1	Ergebnisse.....	39
5.1.1	Bereits in der Diplomarbeit durchgeführte Experimente	39
5.1.1.1	Zersetzungskinetik der Dioxetane – Relative Triplettausbeuten.....	39
5.1.1.2	Relative Effizienz der dG-Oxidation.....	40
5.1.2	Chemilumineszenzmessungen während der dG-Oxidation.....	41
5.1.3	Oxidation von dG	42

5.1.4	Oxidation von <i>Kalbsthymus</i> -DNA	43
5.2	Diskussion.....	45
5.2.1	Beteiligung angeregter Zustände an der dG-Oxidation	45
5.2.2	Oxidation von DNA.....	46
5.2.3	Sonderrolle von angeregtem 1-Methoxy-2-propanon.....	47
5.3	Schlussfolgerungen	48
6	Oxidation von dG und DNA durch alkoxy-substituierte Acetophenone	49
6.1	Ergebnisse	49
6.1.1	Darstellung von 2- <i>tert</i> -Butoxyacetophenon (AP-O ^t Bu) und 2-Acetoxyacetophenon (AP-OAc).....	49
6.1.2	UV-Spektren	49
6.1.3	Laserflash-Photolyse Studien.....	49
6.1.4	Bei der Photolyse von 2-Methoxyacetophenon (AP-OMe) beobachteter Transient	51
6.1.5	Norrish-Typ-II-Spaltung von AP-OMe	51
6.1.6	Kinetik der Photolyse.....	52
6.1.7	EPR-Studien.....	52
6.1.8	Detektion von Benzoylradikalen mit TEMPO.....	53
6.1.9	Die Photoreaktivität der Ketone AP und AP-OAc induziert durch die Nukleoside dG und 8-oxodG.	54
6.1.10	Die Abhängigkeit der Nukleosid-Photooxidation von der Nukleosid-Konzentration.....	54
6.1.11	Photooxidationsprodukte von dG.....	56
6.1.12	Zeitprofil der dG-Photooxidation durch AP-OH	58
6.1.13	Photooxidationsprodukte von 8-oxodG	59
6.1.14	Der Effekt von dG auf die Photooxidation von 8-oxodG in der Ketonphotolyse	60
6.1.15	Einfluss von molekularem Sauerstoff auf die Oxidation von dG.....	60
6.1.16	D ₂ O-Effekt	62
6.2	Ergebnisse der Oxidation von <i>CT</i> -DNA	62
6.2.1	Laserblitz-Photolyse.....	62
6.2.2	DNA-Basenoxidationsprodukte	63

6.2.3	Zeitprofil und relative Effizienz der durch Ketone induzierten DNA-Photooxidation.....	64
6.2.4	DNA-Oxidation in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff.....	65
6.2.5	Einfluss der DNA-Konzentration	65
6.2.6	Einfluss der Keton-Konzentration.....	65
6.2.7	Bildung von Strangbrüchen (SSB)	66
6.2.8	Einfluss von Radikalfängern auf die Bildung von Strangbrüchen	66
6.2.9	Einfluss der DNA-Konzentration	66
6.2.10	Basenoxidation (Guanin) versus Wasserstoffabstraktion am Zuckerrückgrat .	67
6.3	Diskussion der dG-Oxidation durch AP-Derivate.....	68
6.3.1	Reaktivität der „Gruppe A“-Ketone	69
6.3.2	Reaktivität der „Gruppe B“-Ketone	74
6.4	Diskussion der DNA-Oxidation durch AP-Derivate.....	77
6.5	Schlussfolgerungen.....	82
7	Oxidation von dG durch das hydroxymethylsubstituierte Dioxetan 1.....	83
7.1	Ergebnisse.....	83
7.1.1	Synthese von 3,3-Dimethyl-4-hydroxymethyl-4-phenyl-1,2-dioxetan 1 (V-11 bis V-15)	83
7.1.2	Dioxetan Zerfallskinetik.....	84
7.1.3	Radikalabfangexperimente	84
7.1.4	dG Oxidation	85
7.1.5	Konzentrationsabhängigkeit der dG-Oxidation.....	85
7.2	Diskussion	86
7.3	Schlussfolgerung	87
8	Ausblick.....	88
8.1	Mechanistische Untersuchungen.....	88
8.1.1	Nachweis der Bildung von Radikalkationen als Zwischenstufen	88
8.1.2	Experimente mit ¹⁸ O-markiertem molekularem Sauerstoff sowie ¹⁸ O-markiertem Wasser	89
8.1.3	Einfluss / Beteiligung von Superoxidradikalanionen	90
8.1.4	Synthese von ¹³ C/ ¹⁵ N-markiertem dG.....	90
8.2	Synthese der postulierten Zwischenstufen und Untersuchung ihrer Reaktivität.....	91

8.3	Untersuchungen an zellulärer DNA	93
8.4	Untersuchung anderer Peroxylradikalquellen	93
8.4.1	Oxidation von Hydroperoxiden	93
8.4.2	Thermolyse von Azoverbindungen	93
9	Experimentalteil	94
9.1	Allgemeine Vorbemerkungen	94
9.1.1	Geräte für spektroskopische und analytische Untersuchungen	94
9.1.1.1	NMR-Spektroskopie	94
9.1.1.2	Sonstige Spektroskopie	94
9.1.1.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	94
9.1.1.4	Gel-elektrophorese	96
9.1.1.5	Chemilumineszenzmessungen	96
9.1.1.6	Bestrahlungsexperimente	97
9.1.1.7	Photooxygenierungsapparatur	97
9.1.1.8	Bestrahlung zur Herstellung von TEMPO-Benzoyl	97
9.1.1.9	Chromatographie	97
9.1.1.10	Zeitaufgelöste Laserblitz-Photolyse	98
9.1.1.11	Sonstiges	98
9.1.2	Reagenzien und Lösungsmittel	99
9.1.3	Sicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit Peroxiden	100
9.1.4	Arbeitsmethoden	100
9.1.4.1	Ausbeuten	101
9.1.4.2	Mittelwerte und Standardabweichungen	101
9.1.4.3	Bestrahlung bei photochemischen Reaktionen	101
9.1.4.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zur Bestrahlung unter Laboratmosphäre (AAV-1)	102
9.1.4.4	Chromatographische Methoden	102
9.1.4.5	HPLC-Methoden	103
9.1.4.5.1	Herstellung der Puffer	105
9.1.4.6	Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 zur Detektion oxidativer Basenschäden in CT-DNA (AAV-2)	105
9.1.4.6.1	Herstellung der Puffer	105
9.1.4.6.2	Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen	106

9.1.4.6.3	Durchführung DNA-Oxidationsexperimente	106
9.1.4.6.4	Aufarbeitung.....	106
9.1.4.6.5	DNA-Hydrolyse / Detektion Basenumsatz sowie 8-oxoGua-Bildung.	107
9.1.4.6.6	Bestimmung der guanidinfreisetzenden Produkte (GRP)	107
9.1.4.7	Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zur Detektion oxidativer Schäden an dG (AAV-3)	108
9.1.4.7.1	Durchführung dG-Oxidationsexperimente	108
9.1.4.7.2	Detektion des dG-Umsatzes sowie Quantifizierung von 8-oxodG	108
9.1.4.7.3	Nachweis von Spiroiminodihydantoin	108
9.1.4.7.4	Nachweis von durch alkalische Hydrolyse freigesetztem Guanidin mit NQS	108
9.1.4.8	Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 zur Detektion oxidativer Schäden an 8-oxodG (AAV-4)	109
9.1.4.9	Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 zur Detektion des Ketonumsatzes (AAV-5)	109
9.1.4.10	Detektion von Strangbrüchen in plasmidischer pBR 322 DNA.....	109
9.1.4.10.1	Allgemeine Arbeitshinweise und Sicherheitsvorkehrungen.....	109
9.1.4.10.2	Herstellung der Pufferlösungen.....	110
9.1.4.10.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 zur Untersuchung von DNA-Strangbrüchen (AAV-6)	110
9.1.4.11	Durchführung der Laserflash-Experimente.....	112
9.1.4.11.1	Allgemeines	112
9.1.4.11.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 zur Bestimmung der Triplett-Lebensdauer α -substituierter Ketone (AAV-7).....	112
9.2	Synthesen der Edukte	113
9.2.1	Untersuchungen zur Löslichkeit von dG in H ₂ O : Acetonitril-Mischungen ..	125
9.3	Durch ^t BuO-TMD induzierte Oxidation von DNA und dG	126
9.3.1	Oxidation von dG	126
9.3.2	Oxidation von CT-DNA	132
9.4	dG-Oxidation durch AP-Derivate.....	135
9.4.1	UV-Spektroskopie	135
9.4.1.1	UV-Spektren der Acetophenonderivate.....	135
9.4.2	Laserblitz-Photolysestudien.....	137
9.4.2.1	Messung der Triplettabsorptionsspektren.....	137

INHALTSVERZEICHNIS

9.4.2.2	Messung der Triplettlebenszeiten sowie der Quenchkonstanten	138
9.4.2.3	Transient bei der Photolyse von AP-OMe	148
9.4.3	Kinetik der Photolyse	149
9.4.3.1	Kinetik der Ketonphotolyse in konzentrierter Lösung	149
9.4.3.2	Kinetik der Ketonzerersetzung in verdünnter Lösung	150
9.4.4	Radikalabfang-Experimente	150
9.4.5	Quantifizierung der gebildeten Acylradikale mit TEMPO	152
9.4.5.1	Entwicklung einer Messmethode	152
9.4.6	Allgemeine Untersuchungen zur Reaktivität der Ketone	154
9.4.6.1	Einfluss von Wasserstoff- bzw. Elektronendonoren	154
9.4.6.2	Einfluss der dG-Konzentration	156
9.4.6.3	Einfluss der 8-oxodG-Konzentration	157
9.4.7	Oxidation von dG	158
9.4.7.1	Reaktivität und Produkte	158
9.4.8	Untersuchungen zur Oxidation von 8-oxodG	159
9.4.8.1	Reaktivität und Produkte	159
9.4.8.2	Kinetik der Oxidation von 8-oxodG	161
9.4.8.3	Einfluss von Luftsauerstoff auf die dG Oxidation	163
9.4.8.4	D ₂ O-Effekt	167
9.4.9	Oxidation von CT-DNA	167
9.4.9.1	Reaktivität und Produkte	169
9.4.9.2	Strangbruchexperimente mit pBR 322 DNA	174
9.4.9.3	Strangbruchbildung versus Basenoxidation	177
9.5	Oxidation von dG durch Dioxetan 1	178
10	Literatur	181
	Lebenslauf	196
	Erklärung	197
	Ausklapptafel	199

Erläuterungen und Abkürzungen

Der Arbeit ist eine Publikationsliste, ein Inhaltsverzeichnis sowie eine Zusammenfassung vorangestellt. Am Ende der Arbeit befindet sich ein tabellarischer Lebenslauf.

Literaturhinweise sind mit hochgestellten arabischen Ziffern gekennzeichnet und in einer Literaturliste am Ende der Arbeit zusammengefasst. Fußnoten sind mit hochgestellten römischen Ziffern gekennzeichnet. Wichtige chemische Verbindungen sind mit fettgedruckten, arabischen Ziffern oder mit Abkürzungen (z. B. dG) gekennzeichnet. Am Ende der Arbeit befindet sich eine Ausklapptafel, auf der die entsprechenden Strukturformeln abgebildet sind.

Die im Ergebnisteil erläuterten Versuche sind durchnummeriert, auf sie wird im Text mit V-... verwiesen. Im Ergebnisteil wird auf die entsprechenden Eintragungen im Laborjournal verwiesen, z. B. mit IV-MAA-1, wobei die römische Ziffer den Laborjournalband, die arabische Ziffer die Versuchsnummer und die Buchstaben den Namen des Experimentators angeben. (MAA steht für **M**arkus **A**ndreas **A**rnold)

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
AcO-TMD	3-Acetoxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetan
AMVN	2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril)
AP	Acetophenon
AP-OAc	2-Acetoxyacetophenon
AP-O ^t Bu	2- <i>tert</i> -Butoxyacetophenon
AP-OH	2-Hydroxyacetophenon
AP-OMe	2-Methoxyacetophenon
AP-OPh	2-Phenoxyacetophenon
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
BP	Benzophenon
^t BuO-TMD	3- <i>tert</i> -Butoxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetan
Bz	Benzoyl

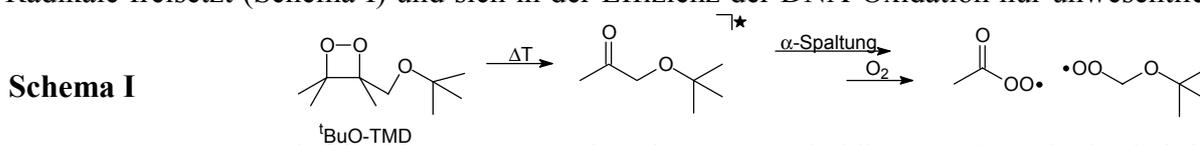
ERLÄUTERUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

CT -DNA	<i>Kalbsthymus</i> -DNA
dG	2'-Desoxyguanosin
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin- <i>N</i> -oxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
GRP	(Guanidine Releasing Products) guanidinfreisetzende Produkte
Gua	Guanin
4-HO-8-oxodG	4,8-Dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-desoxyguanosin
5-HO-8-oxodG	1,6-Didehydro-5,6,7,8-tetrahydro-5-hydroxy-8-oxo-2'-desoxyguanosin
HMBC	Heteronuclear Multi Bond Correlation
HO-TMD	3-Hydroxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Imidazolon	2-Amino-5-[(2-desoxy- β -D- <i>erythro</i> pentofuranosyl)amino]-4H-imidazol-4-on
NQS	1,2-Naphthochinon-4-sulfonat
OC	opencircular (offen-zirkular)
Oxazolon	2,2-Diamino-4-[(2-desoxy- β -D- <i>erythro</i> pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolon
8-oxodG	7,8-Dihydro-8-oxo-2'-desoxyguanosin
8-oxoGua	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
Oxoimidazolidin	2- <i>S</i> -2,5'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D- <i>erythro</i> pentofuranosyl)-5-guanidinylden-2-hydroxy-4-imidazolidin
pBR 322 DNA	ringförmige, super-helikale Plasmid-DNA
PE	Petrolether
SC	supercoiled (super-helikale)
SELINQUATE	Selective Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment
SSB	Single Strand Break (Einzelstrangbruch)
Spiroiminodihydantoin	7-Amino-1-(2-deoxy- β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-1,3,6,8-tetraazaspiro[4.4]non-6-en-2,4,9-trion
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TMD	3,3,4,4- Tetramethyl -1,2- dioxetan
X	

Zusammenfassung

Die oxidative Schädigung von DNA durch reaktive Sauerstoffspezies (*Oxidativer Stress*) spielt eine bedeutende Rolle in der Mutagenese, Kanzerogenese sowie beim Alterungsprozess. In den vergangenen Jahren wurde die DNA-oxidierende Wirkung von Oxyradikalen, die durch den Sauerstoffmetabolismus gebildet werden, intensiv untersucht. Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation steht die mechanistische Aufklärung der DNA-Oxidation durch elektronisch angeregte Ketone, die durch α -Spaltung und anschließende Reaktion mit Sauerstoff Peroxyradikale freisetzen. Solche elektronisch angeregten Spezies werden entweder durch thermische Zersetzung von Dioxetanen oder durch Photolyse von Ketonen generiert. Die thermische Zersetzung von Dioxetanen bietet den Vorteil, dass direkte UV-Bestrahlung von Biomolekülen vermieden und damit photochemische Neben- und Folgereaktionen ausgeschlossen werden können.

In unserem Arbeitskreis wurden bereits ausführliche Studien zur DNA-Oxidation durch das bei der Thermolyse des Dioxetans HO-TMD freigesetzte elektronisch angeregte Hydroxyaceton durchgeführt. Hierbei wurde zur Erklärung der gegenüber nicht hydroxyfunktionalisierten Dioxetanen erhöhten Reaktivität gegenüber DNA die These aufgestellt, dass eine assoziative Wechselwirkung (Wasserstoffbrückenbindung) der Hydroxygruppe des Dioxetans mit der DNA dessen Reaktivität positiv beeinflusst. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde das analoge, an der Hydroxygruppe alkylierte, Dioxetan ^tBuO-TMD synthetisiert. Es zeigte sich, dass das ^tBuO-TMD durch thermische Zersetzung Radikale freisetzt (Schema I) und sich in der Effizienz der DNA-Oxidation nur unwesentlich

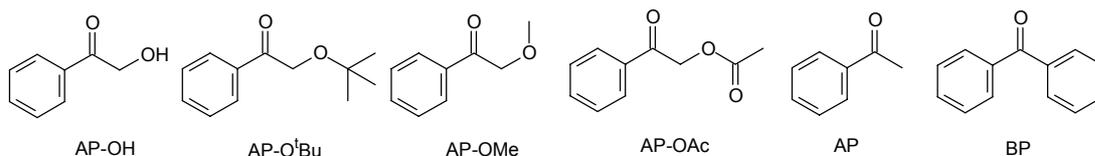


von HO-TMD unterscheidet. Im Gegensatz dazu ist Tetramethyldioxetan (TMD), das bei der Thermolyse nicht α -Spaltung-fähiges angeregtes Aceton bildet, gegenüber DNA inaktiv. Versuche mit entsprechenden photochemisch angeregten Ketonen ergaben ein analoges Verhalten.

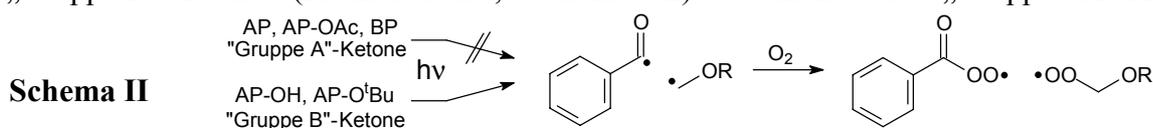
Fazit: Bei der Thermolyse von ^tBuO-TMD sowie der Photolyse von *tert*-Butoxy-2-propanon unter aeroben Bedingungen werden Peroxyradikale gebildet, welche DNA effizient oxidieren. Da keine Hydroxygruppe involviert ist, widerlegen diese Ergebnisse die Annahme, dass eine H-Brückenbindung mit der DNA für eine ausgeprägte Oxidation benötigt wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Nachteile von elektronisch angeregtem *tert*-Butoxy-2-propanon, generell Acetonderivaten, liegen in deren niedrigen Absorptionskoeffizienten, so dass keine spektrophotometrischen Untersuchungen an den angeregten Zuständen mittels Transientenspektroskopie durchgeführt werden können. Aus demselben Grund sind auch für mechanistische Studien sehr hohe Ketonkonzentrationen nötig, wodurch Nebenreaktionen induziert werden können. Um diese Probleme zu umgehen wurden die oxymethyl-substituierten Acetophenonderivate AP-OH, AP-O^tBu, AP-OMe und AP-OAc ausgewählt, zum Vergleich wurde Acetophenon sowie Benzophenon eingesetzt, die bei Bestrahlung keine



Radikale freisetzen können. Mittels Laserblitz-Photolyse wurden die Triplettlebenszeiten sowie die Löschraten der Triplettzustände durch dG, 8-oxodG, DNA, molekularen Sauerstoff und die Ketone selbst bestimmt. Für AP-OAc, AP und BP wurden Triplettlebensdauern von 7-9 μ s gemessen, während die Triplettzustände von AP-OH und AP-O^tBu aufgrund α -Spaltung deutlich kurzlebiger waren (ca. 1 μ s); die α -Spaltung konnte EPR-spektroskopisch durch Spinabfangexperimente mit DMPO und TEMPO belegt werden. Im Fall von AP-OMe wurde weder dessen Triplettzustand noch die Bildung von Radikalen detektiert, was auf einer schnell ablaufenden Norrish-Typ-II-Spaltung beruht. Aufgrund dieses photochemischen Verhaltens wurden die Ketone (mit Ausnahme von AP-OMe) in zwei Gruppen klassifiziert, nämlich die „Gruppe A“-Ketone (keine Radikalbildung) und die „Gruppe B“-Ketone (Radikalbildner, Schema II). Während die „Gruppe A“-Ketone

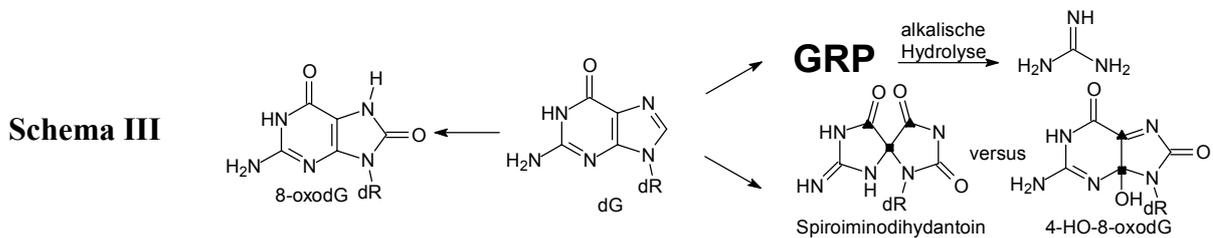


gegenüber niedrigen Konzentrationen von DNA (62.5 μ M) inaktiv waren, verursachten die bei der Bestrahlung der „Gruppe B“-Ketone generierten Peroxylradikale, neben wenigen direkt induzierten Strangbrüchen, hauptsächlich die Guaninoxidationsprodukte 8-oxoGua und guanidinfreisetzende Produkte (GRP). Erst wenn die DNA-Konzentration zehnfach erhöht wird (625 μ M), tritt bei der Photolyse der „Gruppe A“-Ketone auch DNA-Oxidation durch einen Elektronentransfer von der Guaninbase auf das angeregte Keton ein. Ein analoger Konzentrationseffekt wurde auch in der dG-Oxidation beobachtet, bei niedrigen Substratkonzentrationen sind nur die radikalbildenden „Gruppe B“-Ketone aktiv. Die Tatsache, dass in der dG-Oxidation durch die „Gruppe A“-Ketone kein 8-oxodG detektiert wurde, wurde auf dessen effiziente Oxidation durch dG^{•+}-Radikalkationen zurückgeführt.

Fazit: Aufgrund der unterschiedlichen photooxidativen Aktivität der Acetophenonderivate wurden sie in zwei Gruppen eingeteilt. Die „Gruppe B“-Ketone bilden bei der Photolyse in Gegenwart von molekularem Sauerstoff Peroxylradikale, welche ihrerseits DNA oder dG oxidieren. Die elektronisch angeregten „Gruppe A“-Ketone reagieren hingegen über einen Elektronentransfer-Mechanismus und sind bei niedrigen Substratkonzentrationen, wie in den DNA-Versuchen verwendet, durch effektives Löschen inaktiv.

Die „Gruppe B“-Ketone sind in Abwesenheit von O₂ gegenüber dG und DNA oxidativ inaktiv, da die in der α-Spaltung generierten kohlenstoffzentrierten Radikale keine Peroxylradikale bilden können. Die „Gruppe A“-Ketone sind gegenüber DNA in Abwesenheit wie auch in Anwesenheit von Sauerstoff genauso reaktiv, da der Elektronentransfer von DNA zum Keton unabhängig von Sauerstoff ist.

Um mechanistische Einblicke in die oxidative DNA-Schädigung zu erlangen, wurden photochemische Modellstudien mit dem Nucleosid dG sowie 8-oxodG durchgeführt, wobei zusätzlich Spiroiminodihydantoin gebildet wird (Schema III). Bis vor kurzem wurde die



Struktur dieses Oxidationsproduktes als 4-HO-8-oxodG angenommen, dass zuerst in der dG-Oxidation mit Singulett-Sauerstoff (¹O₂) beobachtet wurde. Weder Spiroiminodihydantoin noch 4-HO-8-oxodG sind als authentische Verbindungen bekannt, so dass eine zweifelsfreie Strukturaufklärung die Bestimmung der Konnektivität der markierten Positionen (siehe Schema III) erforderte. Diese Zuordnung erfolgte mittels eines SELINQUATE-NMR Spektrums, mit dem schlüssig die 4-HO-8-oxodG-Struktur ausgeschlossen wurde.

Fazit: Die als Spiroiminodihydantoin revidierte Struktur des zuerst in der durch Photooxygenierung (¹O₂) von dG beobachtete Oxidationsproduktes 4-HO-8-oxodG, das auch in der Ein-Elektronenoxidation von dG und 8-oxodG entsteht, wurde erstmals zweifelsfrei charakterisiert.

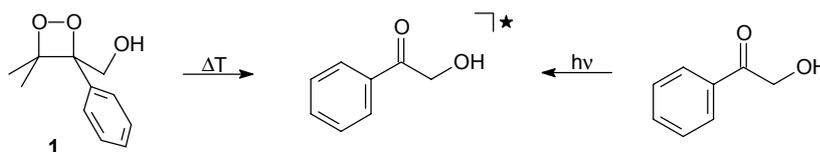
ZUSAMMENFASSUNG

Wie alle „Gruppe B“-Ketone sind auch alle „Gruppe A“-Ketone in Abwesenheit von O₂ mit Ausnahme von AP-OAc gegenüber dG inert. Dies ist ein Beleg dafür, dass der Elektronentransferschritt von dG zum Keton in Abwesenheit von Sauerstoff (im Gegensatz zur DNA-Oxidation) reversibel ist und daher keine Oxidation möglich ist, wenn die Ketylradikale nicht durch O₂ abgefangen werden. Das aus AP-OAc gebildete Ketylradikal besitzt als einziges einen effektiven unimolekularen Deaktivierungsweg, nämlich die Acetation-enspaltung, so dass die Reversibilität nicht mehr möglich ist.

Fazit: Die effektive Acetation-enspaltung des aus AP-OAc mittels Elektronentransfer gebildeten Ketylradikals konkurriert mit dem Rücktransfer zum dG^{•+}-Radikalkation, so dass dieses Keton als einziges dG auch ohne Sauerstoff photooxidiert.

Das Dioxetan **1** wurde synthetisiert, um eine thermische Quelle für die Generierung, bezüglich ihrer photooxidativer Reaktivität gegenüber DNA gut charakterisierter, elektronisch angeregter Zustände (Schema IV) zur Verfügung zu haben. Für dessen thermische

Schema IV



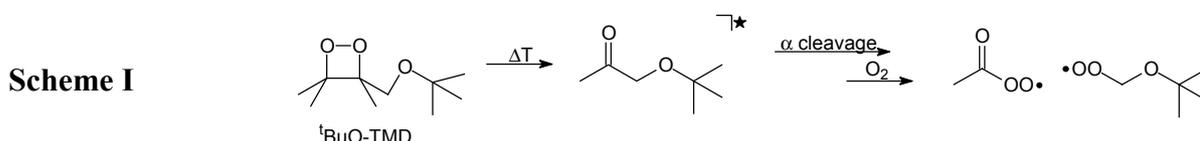
Zersetzung waren Temperaturen von >65 °C nötig, um eine bereits bei tieferen Temperaturen ablaufende Dunkelreaktion zu unterdrücken. Durch Chemilumineszenzmessungen wurde gezeigt, dass dG nicht mit Dioxetan **1** reagiert. Wie in der Photolyse von AP-OH ist die Reaktivität auf die aus den elektronisch angeregten Zuständen durch α -Spaltung und Sauerstoffabfang gebildeten Peroxylradikale zurückzuführen. Dies spiegelt sich auch in der ähnlichen Produktverteilung wider, die bei der dG-Oxidation durch Thermolyse von Dioxetan **1** und durch Photolyse von AP-OH beobachtet wurde.

Fazit: Dioxetan **1** ist eine thermische Quelle für Triplett-angeregtes AP-OH. Die gegenüber dG beobachtete oxidative Reaktivität wurde auf die in Gegenwart von Sauerstoff entstehenden Peroxylradikale zurückgeführt. So kann die Peroxylradikal-induzierte DNA-Oxidation mechanistisch aufgeklärt werden, mit dem Vorteil das biologische Substrat (DNA) nicht mit schädlichen UV-Strahlen zu belasten.

Summary

Oxidative DNA damage, mediated by reactive oxygen species (*oxidative stress*) plays an important role in mutagenesis, carcinogenesis and aging. In the last years, the DNA oxidation by oxyl radicals, which are formed during oxygen metabolism, has been intensely studied. The focus of this thesis is the mechanistic elucidation of the DNA oxidation by electronically excited ketones, which release peroxy radicals by α cleavage and subsequent trapping of molecular oxygen. Such electronically excited species are generated either by thermal decomposition of dioxetanes or by UV irradiation of ketones. The thermal decomposition of dioxetanes possesses the advantage that direct UV irradiation of biomolecules may be avoided, and thereby, photochemical side products and subsequent reactions excluded.

In our group, studies have been conducted on the DNA oxidation by electronically excited hydroxyacetone, generated in the thermolysis of the dioxetane HO-TMD. To explain the enhanced reactivity towards DNA compared to the dioxetanes without hydroxymethyl substituents, hydrogen bonding between the hydroxy group and the DNA was postulated. To validate this hypothesis, the analogous alkylated dioxetane ^tBuO-TMD was synthesized. The results showed that ^tBuO-TMD releases radicals upon thermal decomposition (Scheme 1) and



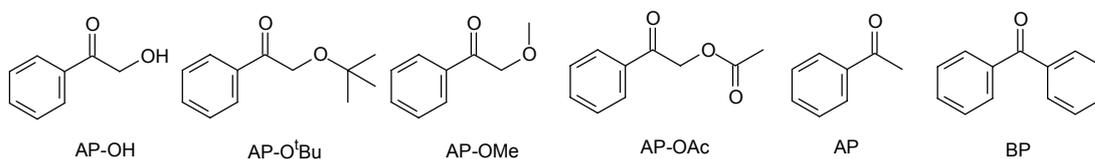
its oxidative efficiency towards DNA is similar to HO-TMD. In contrast, tetramethyldioxetane (TMD), which upon thermolysis produces electronically excited acetone that is incapable of undergoing α cleavage, was inactive towards DNA. The corresponding photochemically excited ketones gave analogous results.

Conclusion: *The thermolysis of ^tBuO-TMD, as well as the photolysis of tert-butoxy-2-propanone, yield peroxy radicals under aerobic conditions, which oxidize DNA efficiently. Since ^tBuO-TMD bears no hydroxy group, hydrogen bonding is not necessary for efficient DNA oxidation.*

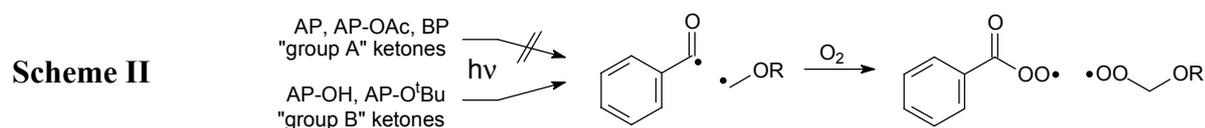
Due to the low extinction coefficients, spectroscopic studies (transient spectroscopy) on the excited states of the electronically excited *tert*-butoxy-2-propanone, in fact, acetone

SUMMARY

derivatives in general, cannot be conducted. For the same reason, high ketone concentrations are necessary for mechanistic studies, which should promote undesirable side reactions. To avoid these problems, the oxymethyl-substituted acetophenone derivatives AP-OH, AP-O^tBu, AP-OMe and AP-OAc were chosen as photochemical radical sources. For comparison,



acetophenone and benzophenone were employed, which do not release radicals upon irradiation. By using the laser-flash-photolysis technique, the triplet lifetimes of the ketones and their quenching rates by dG, 8-oxodG, DNA and molecular oxygen were determined. For AP-OAc, AP and BP, triplet lifetimes of 7-9 μ s were obtained, while for AP-OH and AP-O^tBu the lifetimes were significantly shorter (ca. 1 μ s) due to α cleavage. The α cleavage was verified by spin-trapping experiments with TEMPO and DMPO by EPR-spectral detection. For AP-OMe, neither its triplet state nor radical formation was observed due to rapid Norrish-Type-II cleavage. On the basis of this photochemical behavior, the ketones (with the exception of AP-OMe) were divided into two groups, namely the “group A” ketones (no radical release) and the “group B” ketones (radical release), as displayed in Scheme II.

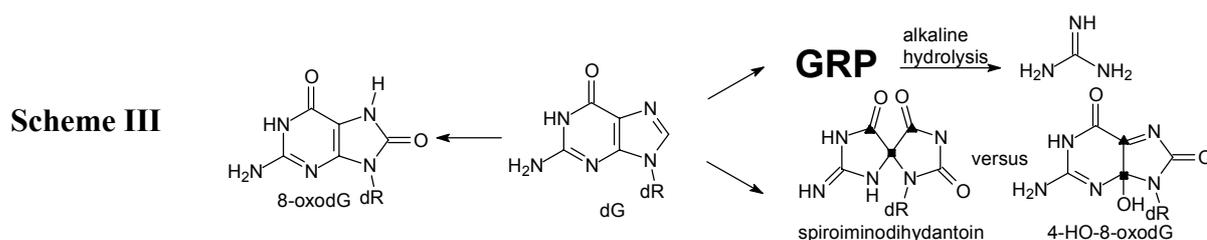


While the “group A” ketones were inactive at low (62.5 μ M) DNA concentrations, the peroxy radicals generated on irradiation of the “group B” ketones led to few directly induced strandbreaks; mainly the guanine oxidation product 8-oxoGua and guanidine-releasing products (GRP) were observed. Only when the DNA concentration was increased tenfold (625 μ M), did the excited ketones oxidize DNA through electron transfer. An analogous concentration effect was observed with dG, since at low substrate concentrations only the radical-releasing “group B” ketones were oxidatively active. The fact that in the dG oxidation by the “group A” ketones no 8-oxodG was detected is attributed to the efficient oxidation of 8-oxodG by the dG^{•+} radical cation.

Conclusion: On account of their different photooxidative activity, the acetophenone derivatives were divided into two groups: The “group B” ketones release peroxy radicals on irradiation in the presence of molecular oxygen, which oxidize DNA and dG. The electronically excited “group A” ketones, however, act through electron transfer and are ineffective at the low substrate concentrations used for DNA oxidation.

In the absence of O₂, the „group B“ ketones do not oxidize dG and DNA, because peroxy radicals are not formed by trapping of the carbon-centered radicals produced upon α cleavage. Since electron transfer is independent of oxygen, the “group A” ketones display the same reactivity towards DNA, whether oxygen is present or not.

To gain insight into the mechanism of the oxidative DNA damage, photochemical model studies with the nucleosides dG and 8-oxodG were performed, in which spiroiminodihydantoin was obtained as an additional oxidation product (Scheme III). Until



recently, the supposed structure of this oxidation product was 4-HO-8-oxodG, which was first observed in the dG oxidation by singlet oxygen. Since neither spiroiminodihydantoin nor 4-HO-8-oxodG are available as authentic compounds, an unequivocal structural elucidation required to assess the connectivity of the marked atoms (see Scheme III). This assignment was achieved by means of the SELINQUATE-NMR technique, which definitively allowed to exclude the 4-HO-8-oxodG structure.

Conclusion: The structure of the oxidation product 4-HO-8-oxodG, first observed in the photooxygenation (¹O₂) of dG, and recently also in the one-electron oxidation of dG and 8-oxodG, was finally unequivocally characterized as spiroiminodihydantoin.

Analogous to the “group B” ketones, in the absence of molecular oxygen also “group A” ketones (except AP-OAc) are unreactive towards dG. Evidently, the electron-transfer step from dG to the triplet-excited ketone is reversible in the absence of oxygen, since no dG oxidation occurs when the ketyl radicals are not trapped by molecular oxygen. The ketyl

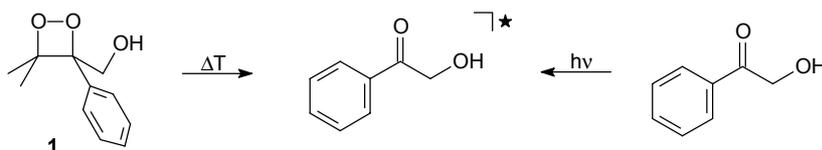
SUMMARY

radical derived from AP-OAc is unique in that it possesses a unimolecular deactivation pathway, namely the cleavage into an acetoxy ion and a benzoylmethyl radical, which provides irreversible electron transfer between triplet-excited AP-OAc and dG even in the absence of molecular oxygen.

Conclusion: *The effective cleavage of the ketyl radical, formed on electron transfer from dG to the triplet-excited AP-OAc, into an acetate ion and the benzoylmethyl radical prevents the regeneration of dG from the $dG^{\bullet+}$ radical cation by electron back-transfer. For this reason, triplet-excited AP-OAc is the only ketone, which photooxidizes dG at low concentrations even in the absence of molecular oxygen.*

As a thermal source for the generation of triplet-excited ketones, the dioxetane **1** was synthesized (Scheme IV). For the thermolysis, temperatures of $>65\text{ }^{\circ}\text{C}$ had to be employed to

Scheme IV



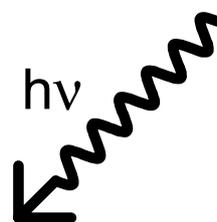
exclude dark decomposition of the dioxetane. Chemiluminescence measurements showed that dG does not react directly with the dioxetane **1**. As in the photolysis of AP-OH, the reactivity is attributed to peroxy radicals, formed in the α cleavage and subsequent oxygen trapping. This is also reflected in the similar product distribution for the dG oxidation in the thermolysis of dioxetane **1** and the photolysis of AP-OH.

Conclusion: *Dioxetane 1 is a thermal source of triplet-excited AP-OH, whose oxidative reactivity towards dG is attributed to peroxy radicals, formed in the presence of molecular oxygen. Thus, the DNA oxidation by peroxy radicals may be mechanistically elucidated without exposure of the biomolecule DNA to damaging UV irradiation.*

1 Einleitung

Der Anstieg der UV-Strahlung aufgrund der Zersetzung der Ozonschicht bedeutet ein zunehmendes Risiko für die Haut, durch reaktive Sauerstoffspezies geschädigt zu werden. Die Folgen reichen vom akuten Sonnenbrand über vorzeitige Hautalterung bis hin zu Hautkrebs.¹ Mehr als 90% der malignen Tumore werden in Körperregionen gefunden, die dem Sonnenlicht ausgesetzt sind. Die Häufigkeit bösartiger Melanome hat in den letzten Jahrzehnten auf über das Zehnfache zugenommen und wird auch weiter zunehmen;² ein Zusammenhang mit UV-Strahlung gilt als gesichert.³ Kurzwellige UV-Strahlung (UVC = 190-290 nm; UVB = 290-320 nm)⁴ kann direkt mit DNA wechselwirken und erreicht nur die oberen Hautschichten³, während langwelligere Strahlung (UVA = 320-400 nm)⁴, die den Hauptanteil der UV-Strahlung des Sonnenlichts bildet (>95%)⁵, nur durch endogene und exogene Photosensibilisatoren absorbiert wird und daher in tiefere Gewebeschichten vordringen kann.⁶ Obwohl auch UVB eine oxidative Aktivität aufweist⁷, wird die UVA-Strahlung als die wichtigste Quelle für oxidativen Stress angesehen.^{8,9}

Absorbiert ein Photosensibilisator ein Photon (Schema 1.1), so bestimmt das Schicksal des so



Sensibilisator

Schema 1.1: Absorption der Lichtenergie durch einen Photosensibilisator

erzeugten elektronisch angeregten Zustandes die weitere Reaktivität. Im Allgemeinen werden dadurch sogenannte „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) induziert, welche dann ihrerseits mit Biomolekülen¹⁰ wie Lipiden, Proteinen oder DNA¹¹ wechselwirken können. Dazu gehören Hydroxyl-, Alkoxyl- und Peroxylradikale, Wasserstoffperoxid, Hydroperoxide sowie Singulett-Sauerstoff. Solche reaktiven Sauerstoffspezies werden jedoch nicht nur durch Übergangsmetall-katalysierte Zersetzung von Peroxiden, durch Röntgenstrahlen oder durch Wechselwirkung von Photosensibilisatoren mit UV-Licht¹² induziert, sondern entstehen auch

1 EINLEITUNG

während des normalen Sauerstoffmetabolismus, z. B. in den Elektronentransfer-Reaktionen der Atmungskette¹³, der Metabolisierung von Fremdstoffen sowie während Entzündungsprozessen¹⁴. Geringe Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies sind normal und für die Zelle sogar notwendig zur Signalübertragung sowie zur Kontrolle des Zellwachstums und der Zellteilung¹⁵ und dienen der Infektabwehr.^{16,17} Den Zustand erhöhter Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies nennt man „oxidativen Stress“.⁹ Um Schäden durch oxidativen Stress zu verhindern, verfügen lebende Zellen über verschiedene Schutzmechanismen. Dazu gehören Antioxidantien¹⁷ wie β -Carotin (Vitamin A), Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), Flavonoide oder Glutathion, aber auch enzymatische Systeme¹⁸ wie Peroxidasen, Katalasen oder die Superoxid-Dismutase. Erst wenn diese Schutzsysteme überfordert sind kommt es zu zellulären Schäden. Wegen ihrer Wichtigkeit besitzt DNA ein zusätzliches Schutzsystem: Sie verfügt über Reparaturenzyme¹⁹, die in der Lage sind bereits vorhandene chemische Veränderungen des Doppelstranges wieder rückgängig zu machen.

Kommt es trotz dieser Schutzsysteme zur Schädigung von DNA, so kann dies zu Zellalterung²⁰, Mutagenese²¹ und Karzinogenese^{22,23} führen. Dabei sind alle drei Stufen der Karzinogenese betroffen (Initiation, Promotion und Progression).^{22,24} Auch in der HIV-Expression²⁵ spielen oxidative Schäden durch ROS eine Rolle.

2 Kenntnisstand

2.1 Oxidativer Stress

Von „oxidativem Stress“ spricht man, wenn die zellulären Schutzsysteme nicht mehr mit der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies mithalten können und dadurch deren Konzentration in der Zelle ansteigt.⁹ Neben den in der Einleitung beschriebenen oxidativen Schäden haben reaktive Sauerstoffspezies aber nicht nur nachteilige Effekte, sondern werden auch gezielt zur Behandlung von Hautkrankheiten oder bösartigen Tumoren eingesetzt. Dabei werden Photosensibilisatoren eingesetzt, die bei Bestrahlung reaktive Sauerstoffspezies freisetzen, man spricht hierbei von „photodynamischer Aktivität“.²⁶ Aufgrund des Einsatzes in der Therapie solcher Krankheiten sowie wegen der momentan stetig ansteigenden Zahl an Hautkrebserkrankungen erscheint es unerlässlich die Mechanismen der Wechselwirkung angeregter Verbindungen mit Biomolekülen genauer zu untersuchen und zu verstehen.

2.1.1 Beteiligung angeregter Verbindungen am oxidativen Stress

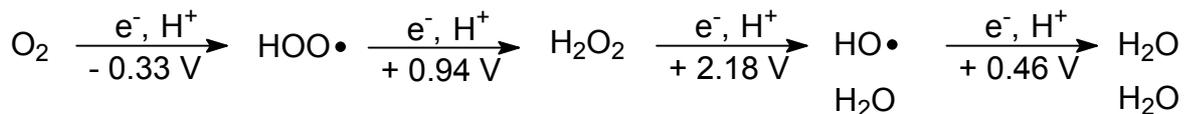
Obwohl ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Bildung angeregter Moleküle besteht, was sich anhand schwacher Chemilumineszenz verfolgen lässt, ist bis heute kein gesicherter molekularer Mechanismus verfügbar. Als wichtigste Vertreter der elektronisch angeregten Verbindungen werden Singulett-Sauerstoff und Carbonylspezies betrachtet.⁹ In *Escherichia Coli*-Bakterien wurde ein Teil der spontan auftretenden Mutagenese, von der man annimmt, dass sie eine natürliche Folge des normalen Metabolismus ist, als „UV-ähnlich“ beschrieben und auf angeregte Zustände zurückgeführt.²⁷

2.1.2 Beteiligung von Peroxylradikalen am oxidativen Stress

Die Beteiligung von Peroxylradikalen an der *in-vivo*-Oxidation von Biomolekülen ist immer noch umstritten, möglicherweise stellen sie jedoch aufgrund ihrer geringen Reaktivität und daher langen Lebensdauer sogar die wichtigste Klasse der reaktiven Sauerstoffspezies dar.²⁸

2.1.3 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Grundformen der reaktiven Sauerstoffspezies erhält man durch Reduktion von Sauerstoff. Zusätzlich zählt man noch elektronisch angeregte Spezies (Singulett-Sauerstoff) und Alkylderivate (Alkoxyradikale, Peroxyradikale, Hydroperoxide). Disauerstoff lässt sich formal in vier Einelektronenreduktionsschritten bis zu Wasser reduzieren. Zwischenstufen sind die reaktiven Sauerstoffspezies Hydroperoxyradikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal (Schema 2.1).²⁹ Das Hydroperoxyradikal ($pK_a = 4.8$)³⁰, das unter

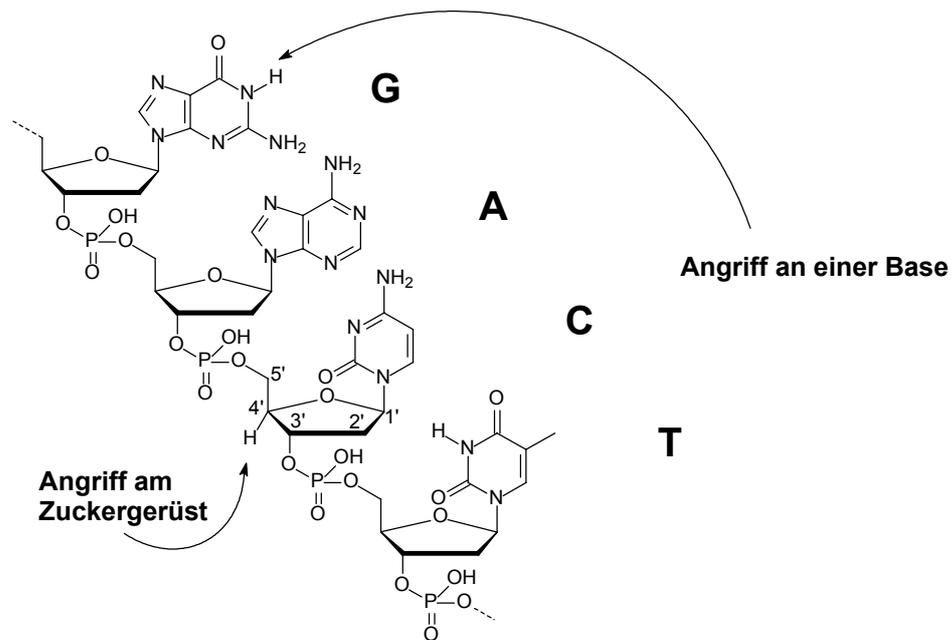


Schema 2.1: Reduktion von O_2 zu H_2O

physiologischen Bedingungen hauptsächlich als Superoxidradikalanion vorliegt, disproportioniert in der Zelle, katalysiert durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD), in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Aus Wasserstoffperoxid werden in der Gegenwart von bestimmten Reduktionsmitteln Hydroxylradikale generiert [z. B. durch Fe^{2+} (Fenton-Reaktion) oder durch Superoxid-Radikalanionen (Haber-Weiss-Reaktion)]. Diese sind sehr reaktiv und reagieren mit den meisten organischen Materialien nahezu diffusionskontrolliert und daher unselektiv.^{31,32}

2.2 Oxidative Schädigung von DNA durch reaktive Sauerstoffspezies

Die Oxidation von DNA durch reaktive Sauerstoffspezies kann entweder durch einen Angriff am Zuckerrückgrat der DNA oder aber durch einen Angriff auf eine der vier Basen [Guanosin (G), Adenosin (A), Cytidin (C), Thymin (T)] induziert werden (Schema 2.2). Angriffe am Zuckerrückgrat induzieren Strangbrüche, Angriffe an den Basen führen zu Basenaddukten, Basenoxidaionsprodukten, abasischen Stellen und Proteincrosslinks.



Schema 2.2: Angriffsmöglichkeiten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an DNA

2.2.1 Oxidation der DNA-Basen

Die oxidative Schädigung von DNA ist massiv, man geht davon aus, dass diese mindestens eine Größenordnung häufiger auftritt als die Bildung von nicht-oxidativen Addukten.³³ So besagt eine Schätzung, dass in einer Rattenzelle trotz aller zellulären Schutz- und Reparaturmechanismen ungefähr eine Million oxidative Addukte vorliegen,^{33a} woraus sich schließen lässt, dass die oxidative DNA-Schädigung auch *in vivo* eine wichtige Rolle spielt. Der geläufigste Marker für die Detektion von „oxidativem Stress“ an DNA ist das Guanin-Oxidationsprodukt 8-oxoGua. Für menschliche Zellen wurde die Menge an 8-oxoGua auf ca. 7500 Moleküle 8-oxoGua oder 150000 oxidative Addukte pro Zelle abgeschätzt.³⁴

Im Vordergrund dieser Arbeit steht die Schädigung von DNA durch angeregte Carbonylchromophore sowie durch Radikalspezies. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Schädigung der Purinbase Guanin.

Allgemein wird bei Typ-I-sensibilisierter Oxidation von DNA vorwiegend Guanin oxidiert.³⁵ Dies liegt daran, dass Guanin das niedrigste Oxidationspotential ($E_{Ox} = 1.28 \text{ V}$)³⁶ der vier DNA-Basen besitzt und einmal im DNA-Strang erzeugte „Elektronenlöcher“ an anderen Basen über eine gewisse Distanz zu Guanin wandern können.³⁷

2.2.2 *Bildung von Strangbrüchen*

Strangbrüche werden durch Abstraktion eines beliebigen Wasserstoffatoms am Zuckerrückgrat der DNA induziert,³⁸ dabei unterscheidet man anaerobe und aerobe Mechanismen. So können die entstehenden Radikale spontan eine Phosphatgruppe eliminieren³⁹, was zum anaeroben Strangbruch führt, oder Sauerstoff addieren. Das so entstandene Peroxylradikal kann dann über verschiedene Zwischenstufen ebenfalls einen Strangbruch ausbilden.

2.2.3 *Schadenstransfer zwischen Basen und Zucker*

Prinzipiell ist der Transfer von Schäden zwischen Basen und Zucker möglich. Ein Guaninradikalkation kann am Zuckerrückgrat ein Wasserstoffatom abstrahieren.^{40,41} So konnte für Hydroxylradikale gezeigt werden, dass nur 20% der Einzelstrangbrüche durch direkten Angriff am Zuckerrest entstehen.⁴²

Zuckerradikale können aber auch Elektronen aufnehmen und dadurch wie Einelektronenoxidantien wirken.⁴³ Nachweise für eine hohe Effizienz solcher Prozesse gibt es jedoch nicht.

2.2.4 *Relevanz der DNA-Schäden*

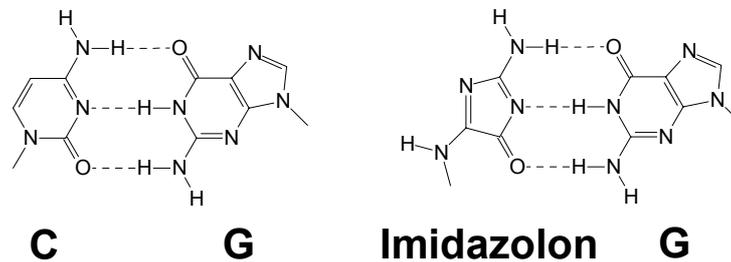
2.2.4.1 *8-oxoGua*

Die wichtigste Eigenschaft von 8-oxoGua ist seine Mutagenität. Die Oxidation von Guanin zu 8-oxoGua führt bei der DNA-Replikation zum DNA-Polymerasekatalysierten Einbau von Adenin oder Cytosin in den Komplementärstrang und damit letztendlich zu G→T-Transversionen.⁴⁴

2.2.4.2 *Imidazolon*

Ein weiteres häufig vorkommendes Oxidationsprodukt von Guanin in DNA ist Imidazolon. Es wurde vorgeschlagen, dass Imidazolon analog Cytosin drei Wasserstoffbrücken zu Guanin

ausbilden kann und so für die mit Photosensibilisatoren, Röntgenstrahlung und Fentonreagenzien beobachteten⁴⁵ G→C-Transversionen verantwortlich ist (Schema 2.3).⁴⁶



Schema 2.3: Analogie Cytosin / Imidazolon in Bezug auf die Basenpaarung mit Guanin

2.2.5 Detektion der DNA-Schäden

2.2.5.1 Detektion von Basenschäden

Da bekannterweise in DNA hauptsächlich Guanin oxidiert wird, liegt der Schwerpunkt in der Detektion von Basenschäden bei der Detektion von Oxidationsprodukten von Guanin sowie des als Modells eingesetzten Nukleosids 2'-Desoxyguanosin (dG). Die Detektion der Zweielektronenoxidationsprodukte 8-oxodG sowie 8-oxoGua, das nach saurer Hydrolyse mit HF / Pyridin aus DNA freigesetzt werden kann, ist per HPLC-Analytik mit elektrochemischer Detektion bei +450 mV bzw. +350 mV möglich.⁴⁷ Hierbei kann im selben Lauf gleichzeitig per UV-Detektor (254 nm) der Umsatz an dG bzw. von allen vier DNA-Basen verfolgt werden. Für die Detektion des bei der Oxidation von dG erhaltenen Vierelektronenoxidationsproduktes Spiroiminodihydantoin stehen ebenfalls HPLC-analytische Methoden (UV-Detektion bei 230 nm) zur Verfügung.⁴⁸

Neben der Quantifizierung dieser definierten Oxidationsprodukte erfolgt die Quantifizierung von Guanidin aus guanidinfreisetzenden Verbindungen (GRP) durch eine indirekte Methode. Durch basische Hydrolyse [von den durch Typ-I- wie auch Typ-II-Oxidation gebildeten Oxidationsprodukten Oxazolone/Oxoimidazolidin sowie deren Vorstufe Imidazolon ist bekannt, dass diese sich in alkalischer Lösung (pH 13) bei 65 °C mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 3$ min unter Freisetzung von Guanidin zersetzen]⁴⁹ wird Guanidin freigesetzt, das mit Natrium-1,2-naphthochinon-4-sulfonat zu einem Fluoreszenzfarbstoff derivatisiert wird, welcher dann HPLC-analytisch per Fluoreszenzdetektion quantifiziert wird.⁵⁰

2.2.5.2 Detektion von Strangbrüchen in plasmidischer pBR 322 DNA

Superhelikale, plasmidische DNA hat die Eigenschaft, bei Auftreten eines Einzelstrangbruches in die relaxierte, offenzirkulare Form überzugehen.⁵¹ Erfolgt ein weiterer Strangbruch am selben DNA-Molekül nicht mehr als 10 Basenpaare entfernt, so bildet sich ein Doppelstrangbruch aus, wobei das nun ringförmige Molekül in die lineare Form übergeht (Abbildung 2.1). Die drei unterschiedlichen Formen der DNA unterscheiden sich in ihrer



Abbildung 2.1: Entstehung offenzirkularer DNA (mitte) und linearer DNA (rechts) durch Strangbrüche aus superhelikaler DNA (links)

Beweglichkeit in viskosem Medium (superhelikal > linear > offenzirkular) und lassen sich durch Gel-elektrophorese in einem Agarose-Gel auftrennen. Die Detektion und Quantifizierung der einzelnen Formen erfolgt durch Zusatz von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert.

2.3 DNA-schädigende Wirkung ausgewählter reaktiver Spezies

Die Schädigung von DNA kann man prinzipiell in zwei unterschiedliche Kategorien einordnen: Schäden, die durch Angriff am Zuckergerüst der DNA hervorgerufen werden und Schäden, welche durch Angriff an den Nukleinbasen induziert werden. Schäden am Zuckergerüst führen in der Regel zu Strangbrüchen, Angriffe an den Nukleinbasen führen zu einer Oxidation (in manchen Fällen auch Reduktion) der Basen. Bisher wurden mehr als 20 DNA-Basenoxidaionsprodukte identifiziert.³⁰ Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Basenradikale zu Strangbrüchen^{35a,52} sowie am Zuckerrückgrat erzeugte Radikalspezies zu Basenoxidation⁴³ führen können und insofern ein gewisser „Transfer“ von Schäden zwischen Basen und Zuckerrückgrat stattfindet.

2.3.1 UV-Licht

Während DNA nur Licht mit Wellenlängen $\lambda < 310$ nm absorbiert, wird Licht mit $\lambda < 290$ nm fast vollständig von der Ozonschicht absorbiert⁴. Der Hauptanteil direkt absorbiertes Strahlung liegt also im UVB-Bereich ($\lambda = 290 - 320$ nm). Untersuchungen mit Endonukleasen ergaben, dass Bestrahlung von DNA mit UVB hauptsächlich zur Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren, Pyrimidin Pyrimidon-Addukten und verwandten Dewar-Isomeren führt⁵³. Im Zusammenhang mit Hautkrebskrankungen wurde festgestellt, dass UV-Licht zur Mutation des Tumor-Suppressor-Gens P-53 führt, der am häufigsten festgestellten genetischen Veränderung bei menschlichen Krebskrankungen.⁵⁴ Langwelligeres UVA-Licht ($\lambda = 320 - 380$ nm) führt zu weniger mutagenen Effekten, welche dann auf durch endogene und exogene Photosensibilisatoren induzierte Schäden zurückzuführen sind.³⁰

2.3.2 Elektronisch angeregte Zustände

Viele Photosensibilisatoren haben Triplettenergien, die höher als die der DNA-Basen liegen und können ihre Energie auf diese transferieren.⁵⁵ Die beobachteten Schäden sind analog den durch UV-Licht induzierten.⁵⁶ So entstehen während der aceton-sensibilisierten Photooxidation von DNA hauptsächlich Cyclobutanpyrimidindimere.⁵⁷⁻⁶⁰ Es wurden jedoch auch Strangbrüche⁶¹, alkalilabile Guaninmodifikationen⁶² und 8-oxoGua^{57b} detektiert, was auf eine gleichzeitig stattfindende H-Abstraktion hinweist. Haben die Photosensibilisatoren Triplettenergien, die niedriger als die der DNA-Basen liegen, so scheidet Energietransfer aus. Man unterscheidet die durch Photosensibilisatoren induzierten Reaktionsmechanismen in solche, welche durch direkte Wechselwirkung zwischen Sensibilisator und Substrat zustandekommen (Typ-I) und solche, die durch Sauerstoff vermittelt werden (Typ-II). Eine klare Unterscheidung wird jedoch oft schwierig, da die Reaktionsprodukte in beiden Fällen oft Peroxide sind, welche ihrerseits Radikalreaktionen induzieren können.⁶³ Eine zusätzliche Möglichkeit ist die Bildung von Addukten mit der DNA, dies passiert z. B. bei der Bestrahlung von 8-Methoxypsoralen in Gegenwart von DNA.⁶⁴ Die Reaktivität angeregter Zustände, die keinen Energietransfer auf DNA eingehen, wird später besprochen.

2.3.2.1 Singulett-Sauerstoff

Singulett-Sauerstoff reagiert selektiv mit Guanin in DNA.^{47a,65} Sowohl die Schädigung von DNA durch Singulett-Sauerstoff über einen Elektronentransfermechanismus,^{19c} als auch die intermediäre Bildung von Dioxetanen und Endoperoxiden durch Cycloaddition⁶⁶ wurden diskutiert. Die Bildung von Strangbrüchen durch Singulett-Sauerstoff ist umstritten.^{65,67} Strangbrüche wurden zwar detektiert, spielen aber auf jeden Fall nur eine untergeordnete Rolle.⁶⁸ Für die durch Methyleneblau induzierte DNA-Oxidation wurde ein Verhältnis von 8-oxoGua zu Strangbrüchen von 17:1 berichtet.^{68c} Singulett-Sauerstoff, der ausserhalb einer Zelle gebildet wird, kann nicht in diese penetrieren; in der Zelle kann er einige 10 nm, aber keine 100 nm diffundieren bevor er deaktiviert wird.⁶⁹ In Experimenten mit zellulärer DNA stellte sich heraus, dass man 5.4 Millionen Moleküle $^1\text{O}_2$ benötigt, um ein Molekül 8-oxoGua zu induzieren.⁷⁰ Die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit DNA führt zu 8-oxoGua, apurinischen Stellen und alkalilabilen Bindungen.⁷¹

2.3.3 Radikalspezies

2.3.3.1 Hydroxylradikale

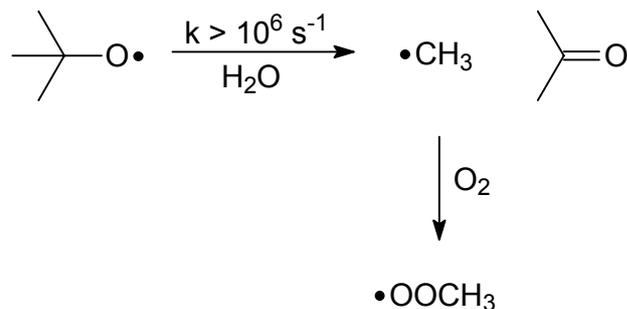
Hydroxylradikale gehören zu den reaktivsten und daher oft auch kurzlebigsten Sauerstoffspezies. Sie greifen DNA völlig unselektiv an⁷² und reagieren sowohl mit Wasserstoffatomen am Zuckergerüst als auch mit allen Purin- und Pyrimidinbasen.^{22,30,41a,41b,73} So wurden Strangbrüche⁷⁴, apurinische und alkalilabile Stellen⁷⁵ und 8-oxoGua detektiert und einem direkten Angriff durch ein Hydroxylradikal zugeordnet. Weitere durch Hydroxylradikale induzierte Oxidationsprodukte sind 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (Fapy-Gua) und 4,5-Diamino-5-formamidopyridin (Fapy-Ade).⁷⁶ Pyrimidinbasen-Hydroxylradikaladdukte addieren unter aeroben Bedingungen rasch Sauerstoff, während Purinbasen-Hydroxylradikaladdukte langsamer oxidiert werden und so die Radikaladdition teilweise wieder umgekehrt wird.⁷⁷

Da das Hydroxylradikal ein elektrophiles Radikal ist⁷⁸, erwartet man hauptsächlich Angriff an den elektronenreichen Basen. Das Verhältnis von Basen- zu Zuckerangriffen hängt davon ab, ob die DNA als Einzel- oder Doppelstrang vorliegt⁷⁹, die Zuckerangriffe liegen jedoch bei maximal 20%,⁸⁰ wobei alle Wasserstoffatome angegriffen werden.

Das Problem bei der Untersuchung hydroxylradikalinduzierter DNA-Schäden ist deren geringe Selektivität. Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von Hydroxylradikalen mit organischen Verbindungen liegen in wässriger Lösung durchweg bis auf wenige Ausnahmen bei ca. $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, während DNA unwesentlich weniger reaktiv ist ($k = 2.5\text{-}8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).⁸¹ Will man also sicher sein, dass die beobachteten Schäden auf einer direkten Wechselwirkung zwischen DNA und Hydroxylradikalen beruhen, muss man darauf achten, dass sich ausser DNA keine organischen Verbindungen in der Lösung befinden, da sonst nicht ausgeschlossen werden kann, dass Sekundärradikale für die beobachteten Schäden verantwortlich sind. Trotzdem finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele, die versuchen, in Gegenwart beträchtlicher Mengen von organischen Verbindungen die beobachteten DNA-Schäden Hydroxylradikalen zuzuschreiben.

2.3.3.2 Alkoxyradikale

Alkoxyradikale werden als DNA-oxidierende Spezies bei der Lipidperoxidation diskutiert.⁸² Für *tert*-Butoxyradikale konnte gezeigt werden, dass sie zu Strangbrüchen und zur Oxidation der Purinbase Guanin führen.⁸³ Die Oxidation von DNA liefert 8-oxoGua und Oxazolone. Die beobachteten Schäden dürften jedoch nicht den *tert*-Butoxyradikalen selber zugeschrieben werden, da diese in wässriger Lösung schnell unter Bildung von Aceton und Methylradikalen zerfallen, welche in Gegenwart von Sauerstoff Peroxyradikale bilden (Schema 2.4).^{84,85}



Schema 2.4: Zerfall von *tert*-Butoxyradikalen in wässriger Lösung

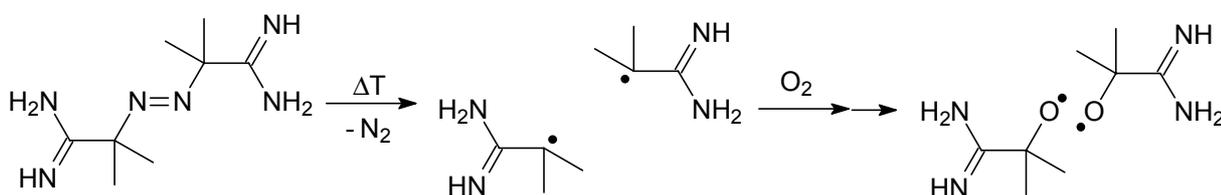
2.3.3.3 Peroxyradikale

Über durch Peroxyradikale induzierte DNA-Schäden ist bis heute relativ wenig bekannt. Es gibt verschiedene Arbeiten zur dG und DNA-Oxidation durch AAPH, eine thermische Quelle kohlenstoffzentrierter Radikale, die in Gegenwart von Sauerstoff zu Peroxyradikalen weiterreagieren.⁸⁶ So wurde nachgewiesen, dass bei der Thermolyse von AAPH in Gegenwart

2 KENNTNISSTAND

von molekularem Sauerstoff Strangbrüche gebildet werden, Thymin hauptsächlich an der Methylgruppe oxidiert wird⁸⁷ und in DNA abasische Stellen induziert werden⁸⁸. In *E. coli* induziert AAPH Transversionen an Guanin, es entstehen hauptsächlich G→C aber auch G→T Mutationen⁸⁹. Schließlich konnte gezeigt werden, dass AAPH in Gegenwart von Sauerstoff alle DNA-Basen sowie alle Desoxyribonukleoside oxidiert, wobei aus Guanin auch 8-oxoGua gebildet wird.⁹⁰

Es gibt jedoch Hinweise, dass die durch AAPH freigesetzten kohlenstoffzentrierten Radikale in Gegenwart von Sauerstoff gar keine stabilen Peroxyradikale bilden, sondern zu den entsprechenden Alkoxyradikalen führen (Schema 2.5), so dass die in oben zitierte Literatur



Schema 2.5: Bildung von Alkoxyradikalen bei der Thermolyse von AAPH

erfolgte Zuordnung in Frage gestellt wird. So konnte während der Thermolyse von AAPH weder direkt noch indirekt (durch Abfang mit DMPO) ein Peroxyradikaladdukt detektiert werden, während mit 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril) (AMVN) Peroxyradikale nachgewiesen wurden,⁹¹ was auf einen schnellen Zerfall der primär durch AAPH gebildeten Peroxyradikale deutet, sofern diese überhaupt gebildet werden. Dadurch wird eine Reaktion von Peroxyradikalen unwahrscheinlich, wenn nicht unmöglich. Es wurde versucht, die im Vergleich zu anderen Quellen für kohlenstoffzentrierte Radikale hohe Reaktivität gegenüber DNA über eine Wechselwirkung negativ geladener Phosphatgruppen an der DNA mit der positiven Ladung des protonierten, aus AAPH gebildeten Peroxyradikals zu erklären,⁹² denselben Effekt würde man aber auch erwarten, wenn im Fall von AAPH statt Peroxyradikalen Alkoxyradikale vorliegen würden.

In Studien, in denen Peroxyradikale durch enzymatische Oxidation von Hydroperoxiden hergestellt wurden, wurde der Umsatz der Base Guanin sowie die Bildung von Strangbrüchen beobachtet.⁹³ *tert*-Butylperoxyradikale induzieren die Bildung abasischer Stellen.⁹⁴ Während der Lipidperoxidation gebildete Peroxyradikale hingegen induzieren Strangbrüche.⁹⁵

Einen weiteren Erkenntnisverlust bezüglich des Auftretens von Peroxylradikalen musste man hinnehmen, als sich herausstellte, dass es sich bei vielen in der Vergangenheit mit dem Radikalfänger DMPO abgefangenen, ohne massenspektroskopische Untersuchungen als Peroxylradikaladdukte zugeordneten Signale in der Wahrheit um Alkoxyradikaladdukte handelte.⁹⁶

Peroxylradikale haben unter den verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies eine bemerkenswert lange Lebenszeit (bis in den Bereich von Sekunden!),⁸⁶ was auf ihre geringe Reaktivität zurückzuführen ist. Ein direkter Elektronentransfer von DNA-Basen auf Peroxylradikale sollte wegen des niedrigen Oxidationspotentials von 1.02 – 1.11 V bei pH 7 nicht stattfinden.⁹⁷

2.3.3.4 Alkylradikale

Neben den bisher beschriebenen sauerstoffzentrierten Radikalen weisen in Abwesenheit von Luftsauerstoff auch kohlenstoffzentrierte Radikale, die nicht zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören, durch diese aber ebenso induziert werden können, eine Reaktivität gegenüber DNA auf. Alkylradikale addieren an Purinbasen bevorzugt an Position C-8 und bilden so nach einem weiteren Oxidationsschritt Alkyladdukte. Dies konnte in DNA und RNA gezeigt werden.^{98,99} Auch die monomeren Nukleoside sowie die freien Purinbasen addieren Alkylradikale an C-8.¹⁰⁰ Des Weiteren wurden durch Alkylradikale induzierte Strangbrüche detektiert³⁰, manche Arbeiten versuchen aber, die beobachteten Strangbrüche auf reaktive Sauerstoffspezies zurückzuführen¹⁰¹.

Zur Reaktivität von Alkylradikalen bezüglich der Addition an Doppelbindungssysteme ist noch anzumerken, dass diese Reaktion, wie auch die Addition von Hydroxylradikalen an Purinbasen, reversibel sein kann.¹⁰²

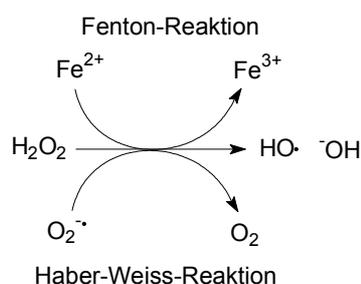
Das in der Thermolyse von AAPH in Abwesenheit von Sauerstoff gebildete kohlenstoffzentrierte Radikal induziert Strangbrüche.¹⁰³ Die Autoren gehen jedoch nicht auf eine evt. mögliche Addition des kohlenstoffzentrierten Radikals an die NN-Doppelbindung ein. So ist z. B. bekannt, dass Benzoylradikale aus Dibenzoyldiazon¹⁰⁴ an die NN-Doppelbindung addieren.¹⁰⁵ Damit liegen neben den primär gebildeten kohlenstoffzentrierten Radikalen noch weitere Spezies vor, die ebenfalls mit DNA wechselwirken können. Auch in

Studien bei der Photolyse von *N*-Acyloxypyridin-2-thionderivaten wurde die Beobachtung von Strangbrüchen kohlenstoffzentrierten Radikalen zugeschrieben.¹⁰⁶

2.3.4 Peroxide

2.3.4.1 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid reagiert mit DNA selektiv zum *N*-1-Oxid des Adenins.¹⁰⁷ Andere Autoren führen Reaktionsprodukte, die bei Behandlung mit Wasserstoffperoxid detektiert wurden (8-oxoGua, 8-oxoAde, FapyGua), auf die metallionenkatalysierte Bildung [Fe(II), das als Gegenion an die DNA gebunden ist] von Hydroxylradikalen zurück¹⁰⁸ und halten H₂O₂ für unreaktiv (Schema 2.6).¹⁰⁹



Schema 2.6: Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid

2.3.4.2 Superoxidradikalanion

Superoxidradikalanionen werden gegenüber DNA als unreaktiv angesehen.¹¹⁰ Teilweise doch detektierte Schäden wurden auf durch die Haber-Weiss-Reaktion¹¹¹ oder durch Metallkatalyse³⁰ gebildete Hydroxylradikale zurückgeführt. Das bei pH 7 im Gleichgewicht zu 1% vorliegende protonierte Hydroperoxylradikal (pK_a = 4.8)³⁰ soll zur H-Abstraktion und damit zur Induktion von Strangbrüchen¹¹² fähig sein.¹¹³

2.3.4.3 Hydroperoxide

Von Hydroperoxiden wird berichtet, dass sie Strangbrüche verursachen.¹¹⁴ Wie bereits für Wasserstoffperoxid erwähnt, sind die beobachteten Schäden jedoch zumindest teilweise auf die metallionenkatalysierte Bildung von Radikalspezies zurückzuführen.¹¹⁵

2.4 Einsatz von Dioxetanen zur Untersuchung von DNA-Schäden

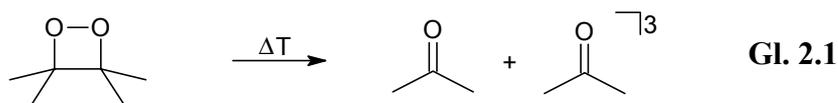
Dioxetane wurden bereits 1947 als Zwischenstufen bei der Autoxidation von Olefinen postuliert.¹¹⁶ 1968 wurde von *Gibson et al.* gezeigt, dass beim oxidativen Abbau von Benzol durch das Bakterium *Pseudomonas Putida* ein Dioxetan involviert ist.¹¹⁷ Des Weiteren wurde die in metabolisierenden Zellen¹¹⁸ sowie bei der Lipidperoxidation¹¹⁹ beobachtete Chemilumineszenz durch Dioxetan-Zwischenstufen erklärt. Auch die enzymkatalysierte aerobe Oxidation von Isobutanal, bei der Tripletacetone gebildet wird, lässt sich über eine Dioxetan-Zwischenstufe erklären.¹²⁰ Mit diesem System wurden erstmals Dioxetane, wenn auch nur als Intermediate, für photobiologische Studien im Dunkeln eingesetzt. *Adam et al.* führten schließlich Untersuchungen zur Zersetzung von authentischen Dioxetanen in Gegenwart von DNA durch.¹²¹

Das Interesse an der DNA-Schädigung durch Dioxetane begründet sich in ihrer einzigartigen Eigenschaft, bei der thermischen Zersetzung Licht zu emittieren und tripletangeregte Carbonylverbindungen zu bilden. Die Synthese der ersten Dioxetane wurde vor mehr als 30 Jahren von *Kopecky* und *Mumford* durch basenkatalysierte Ringschlussreaktion von β -Halogenhydroperoxiden durchgeführt.¹²² Eine weitere Möglichkeit besteht in der [2+2]-Cycloaddition von Sauerstoff an Olefine, die keinen allylischen Wasserstoff enthalten bzw. so elektronenreich sind, dass die En-Reaktion nicht mehr konkurrieren kann.¹²³ Hydroxymethylsubstituierte Dioxetane lassen sich relativ einfach und in guten Ausbeuten aus Allylhydroperoxiden durch Epoxidierung und anschließenden basischen Ringschluss herstellen.¹²⁴

2.4.1 Thermischer Zerfall von Dioxetanen

Der Mechanismus der thermischen Zersetzung von 1,2-Dioxetanen ist bis heute umstritten. Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten: Zuerst eine Spaltung der OO-Bindung mit anschließendem CC-Bindungsbruch (schrittweise, über Diradikal),¹²⁵ synchrone Spaltung beider Bindungen (synchron, konzertiert)¹²⁶ sowie eine gleichzeitige Spaltung beider Bindungen, bei der die OO-Bindung jedoch schneller gelöst wird als die CC-Bindung (asynchron, konzertiert)¹²⁷. Letztere erklärt die gemessenen Aktivierungsparameter sowie die Triplet- und Singulettquantenausbeuten einer Reihe methylsubstituierter Dioxetane am besten.¹²⁸

Beim thermischen Zerfall von Dioxetanen entstehen zwei Carbonylfragmente (Gl. 2.1).



Ein Teil dieser Carbonylfragmente entsteht in elektronisch angeregten Zuständen, meist entstehen bevorzugt Triplettzustände (das Verhältnis von gebildeten Triplettzuständen zu Singulettzuständen beträgt bis zu 1000:1).¹²⁹ Für Tetramethyl-1,2-dioxetan (TMD) wurden Ausbeuten von 30-50% Triplettacetone bestimmt, während nur unter einem Prozent Singulettacetone detektiert wurde.¹³⁰ Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute an triplettangeregten Zuständen mit der Triplettenergie des gebildeten Carbonylfragments korreliert. Bei niedrigeren Triplettenergien werden *weniger* Triplettzustände gebildet.¹³¹ Über die Energieverteilung in unsymmetrischen Dioxetanen liegen nahezu keine Arbeiten vor. Beim Zerfall von 3-Acetyl-4,4-dimethyl-1,2-dioxetan wird hauptsächlich triplettangeregtes 1,2-Propandion gebildet, im Vergleich zu triplettangeregtem Aceton ungefähr 20 bis 70-mal mehr.¹³²

Kurz erwähnenswert ist auch die photochemische Dioxetanzersetzung. Diese verläuft nach einem Quanten-Kettenmechanismus und ist eine nahezu adiabatische Photoreaktion innerhalb des Triplettzustandes, sie spielt jedoch bei geringen Dioxetankonzentrationen keine Rolle.¹³³

2.4.2 DNA-Schäden durch bei der Thermolyse von Dioxetanen freigesetzte angeregte Spezies

Bei der Thermolyse von TMD gebildetes Triplettacetone verursacht eine Reihe endonuklease-sensitiver DNA-Schäden.^{121g} So wurde die Bildung von 8-oxoGua, von Oxazolone, Cyclobutandimeren und von wenigen Strangbrüchen festgestellt.^{121e,134} Verglichen mit TMD sind anders substituierte Dioxetane wie HO-TMD und AcO-TMD bezüglich der Bildung von Strangbrüchen wie auch endonuklease-sensitiver Schäden deutlich reaktiver.^{121g,134} Für HO-TMD wurde ein analoger Reaktivitätsunterschied bezüglich der Bildung von Oxidationsprodukten der Nukleinbase Guanin gezeigt.¹³⁵ Vergleicht man die aus den Endonukleaseexperimenten mit *PM2*-DNA erhaltenen Ergebnisse, so ergibt sich, dass die Dioxetane unterschiedliche Schadensprofile aufweisen. Im Gegensatz zu TMD bilden AcO-TMD sowie HO-TMD bezogen auf den gebildeten Gesamtschaden einen deutlich

geringeren Anteil an UV-endonukleasesensitiven Schäden aus. HO-TMD weist ein ähnliches Schadensprofil wie AcO-TMD auf, letzteres ist um ungefähr den Faktor 1.5 reaktiver.

Im Fall von HO-TMD wurde gezeigt, dass mit steigenden Dioxetankonzentrationen die Bildung von 8-oxoGua zurückgeht, was mit einer Weiteroxidation von 8-oxoGua erklärt wurde.¹³⁶ Bei geringen Dioxetankonzentrationen bildet HO-TMD ungefähr um den Faktor 10 mehr 8-oxoGua als AcO-TMD, wobei bei höheren Konzentrationen der Wert für HO-TMD bis unter den für AcO-TMD fällt.

Für HO-TMD konnte die Mutagenität in menschlichen Lymphoblastenzellen belegt werden.¹²¹ⁱ Der Reaktivitätsunterschied zwischen HO-TMD und TMD wurde über die Bildung von Radikalen erklärt, die durch α -Spaltung der *in situ* aus HO-TMD generierten angeregten Ketone entstehen können,¹³⁷ während eine solche Spaltung im Fall von TMD und AcO-TMD nicht stattfindet. Ebenfalls eine gegenüber TMD erhöhte oxidative Aktivität gegenüber dG sowie die Bildung von Radikalen durch α -Spaltung konnte für alkoxy-methylsubstituierte Dioxetane wie MeO-TMD und ^tBuO-TMD nachgewiesen werden.¹³⁸ Weiterhin konnte für eine Reihe benzylsubstituierter Dioxetane eine Korrelation zwischen oxidativer Aktivität und der Menge an gebildeten Radikalspezies gefunden werden.¹³⁷

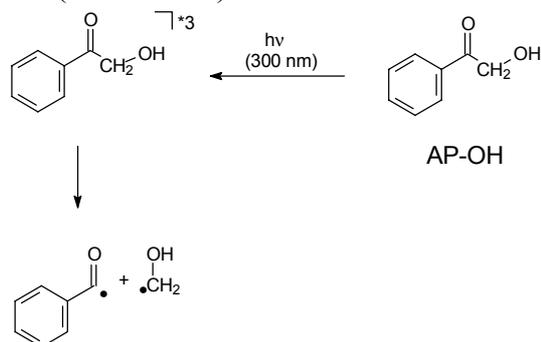
2.5 Mechanistische Aspekte der DNA-Oxidation

2.5.1 Photochemie von Ketonen

2.5.1.1 Norrish-Typ-I

Entsprechend substituierte Ketone können bei Bestrahlung eine Norrish-Typ-I Spaltung eingehen¹³⁹ und so zu Alkylradikalen führen, folglich ist die beobachtete Reaktivität nicht mehr auf elektronisch angeregte Carbonylspezies zurückzuführen, sondern auf die in der α -Spaltung gebildeten Radikale. Hierzu eignet sich beispielsweise ein *tert*-Butylketon, ein Benzylketon, ein Hydroxymethylketon oder ein Alkoxy-methylketon. So ist für angeregtes Hydroxyaceton bekannt, dass dieses in Gegenwart von Isopropanol nicht unter H-Abstraktion reagiert¹⁴⁰ und somit keine Photoreduktion wie gewöhnliche Ketone eingeht, sondern

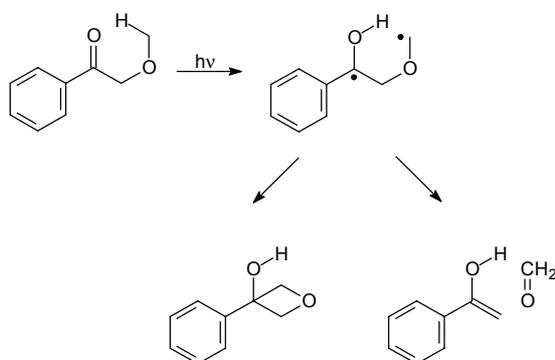
stattdessen in zwei Radikale spaltet^{137,141}. Für α -Hydroxyacetophenon (AP-OH) wurde ein analoges Verhalten beobachtet (Schema 2.7).¹⁴²



Schema 2.7: Norrish-Typ-I-Reaktion von AP-OH

2.5.1.2 Norrish-Typ-II

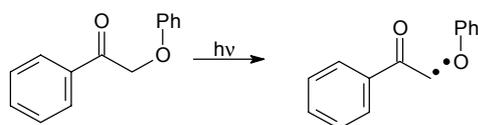
Besitzt ein angeregtes Keton γ -Wasserstoffatome, so kann eine intramolekulare H-Abstraktion erfolgen (Norrish-Typ-II); die dadurch gebildete diradikalische Zwischenstufe kann zu den entsprechenden Vierringderivaten zyklisieren¹⁴³ oder über einen Bindungsbruch zu einem Enol und einem Alken weiterreagieren (Schema 2.8)¹⁴⁴.



Schema 2.8: Norrish-Typ-II Reaktion von AP-OMe

2.5.1.3 β -Bindungsbruch

Im Fall von phenoxyethylsubstituierten Phenylketonen wurde β -Spaltung beobachtet, die mit einer ebenfalls zu erwartenden α -Spaltung konkurrieren kann (Schema 2.9).¹⁴²

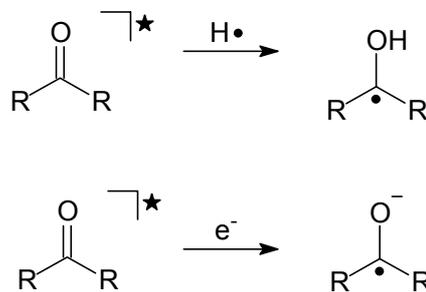


Schema 2.9: β -Bindungsbruch von AP-OPh

Phenoxyaceton bildet nach Bestrahlung 2-Methylbenzofurane und Phenol, beide Produkte wurden auf eine β -Spaltung zurückgeführt.¹⁴⁵

2.5.1.4 Reaktionen mit H-Donoren und e⁻-Donoren

Angeregte Ketone können bei Wechselwirkung mit Wasserstoffdonoren von diesen ein Wasserstoffatom abstrahieren, dabei werden protonierte Ketylradikale gebildet. Analog führt ein Elektronentransfer von einem Elektronendonator zum Keton zu Ketylradikalen (Schema 2.10). Diese Reaktionen sind im Allgemeinen reversibel, sofern nicht zumindest eine der beiden Spezies rasch weiterreagiert.¹⁴⁶

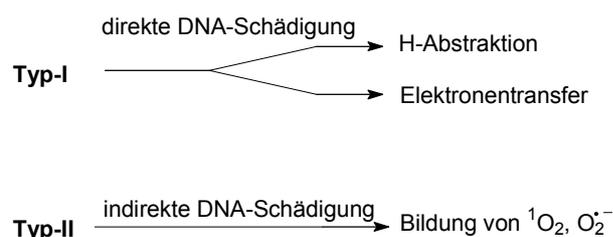


Schema 2.10: Oxidative Reaktivität elektronisch angeregter Ketone

2.5.2 Reaktivität elektronisch angeregter Carbonylverbindungen

2.5.2.1 Unterscheidung Typ-I / Typ-II Sensibilisator

Elektronisch angeregte Verbindungen können auf unterschiedliche Weise mit Biomolekülen wechselwirken. Man unterscheidet die direkte Wechselwirkung des angeregten Chromophors mit dem Substrat (Typ-I, H-Abstraktion oder Elektronentransfer) und die indirekte, sauerstoffvermittelte Wechselwirkung (Typ-II, über Singulett-Sauerstoff oder Minor-Typ-II, über Superoxidradikalanionen, Schema 2.11). Typische Typ-I-Photosensibilisatoren sind



Schema 2.11: Typ-I vs. Typ-II-Photooxidation von DNA

aromatische Ketone wie Benzophenon, Acetophenon (Wasserstoffabstraktion) oder elektronenarme Moleküle wie Menadion oder Riboflavin (Elektronentransfer).¹⁴⁷ Brauchbare Singulett-Sauerstoff-Sensibilisatoren (reine Typ-II-Sensibilisatoren gibt es nicht) sind Methylblau^{47a,148}, Bengalrosa¹⁴⁹ und Porphyrinderivate¹⁵⁰. Da bei Sauerstoff der Singulettzustand um 22.6 kcal/mol über dem Triplettzustand liegt, muss ein Sensibilisator mindestens eine gleich große Triplettenergie aufweisen. Chemische Quellen für die Generierung von $^1\text{O}_2$ sind die thermische Zersetzung von Endoperoxiden¹⁵¹ und die Oxidation von Wasserstoffperoxid durch Natriumhypochlorit, Singulett-Sauerstoff kann jedoch auch enzymatisch generiert werden^{118a}. Durch Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff können Superoxidradikalanionen gebildet werden.

2.5.2.2 Elektronentransfer (Typ-I)

Elektronentransfer induziert DNA-Basenradikalkationen. Da Guanin mit einem Oxidationspotential von 1.28 V³⁶ die am leichtesten zu oxidierende Base ist, wird diese bevorzugt oxidiert. Des Weiteren können die kationischen Radikalzentren entlang der DNA durch „electron hopping“ zu Guanin wandern^{37b}. Guanin, das einem zweitem Guanin benachbart ist, ist hierbei besonders bevorzugt.^{46,152} In der DNA ist das mit Cytosin basengepaarte Guaninradikalkation, insbesondere wenn sich weitere GC-Basenpaare in unmittelbarer Nachbarschaft befinden¹⁵³, zusätzlich stabilisiert.¹⁵⁴ Die so gebildeten Guaninradikalkationen reagieren dann durch Wasseraddition und einen weiteren Oxidationsschritt zu 8-oxoGua.^{26,35a,66,155} Oxazolone wurden nur in geringen Mengen detektiert. Die Ausbeute an Strangbrüchen wurde auf maximal 2% bezogen auf 8-oxoGua abgeschätzt.^{35a}

Gegen eine Verallgemeinerung dieses Reaktionsmechanismus für alle Typ-I-Sensibilisatoren spricht jedoch die Tatsache, dass Riboflavin als anerkannter Typ-I-Sensibilisator in CT-DNA Imidazolone induziert, welches sich in wässriger Lösung langsam zu Oxazolone umlagert, 8-oxoGua wurde nur als Nebenprodukt detektiert.^{152a}

2.5.2.3 Durch triplettangeregte Ketone induzierte DNA-Oxidation

Abgesehen von Energietransfer auf die Nukleinbasen können triplettangeregte Spezies auch per Elektronentransfer oder H-Abstraktion mit DNA wechselwirken. Während für Aceton die

Triplettenenergie des Ketons über der aller DNA-Nukleoside liegt, kann ein Energietransfer für Benzophenon nicht mehr stattfinden, für Acetophenon ($E_T = 74$ kcal/mol) höchstens noch zu Thymin, welches die niedrigste Triplettenenergie der vier DNA-Basen besitzt ($E_T < 73$ kcal/mol).^{55b,156}

2.5.2.3.1 Acetophenon vs. Aceton

Mit Hilfe von Endonukleasen wurde die Reaktivität von Acetophenon sowie Aceton gegenüber DNA untersucht. Es stellte sich heraus, dass im Fall von Acetophenon das Verhältnis von Pyrimidindimeren sowie 5,6-Dihydropyrimidinen zu anderen (FPG-Proteinsensitiven) Schäden 1:1 betrug, während im Fall von Aceton ein Verhältnis von 11 : 1 erhalten wurde.^{57b} Singulett-Sauerstoff, Superoxidradikalanionen und Hydroxylradikale konnten als reaktive Spezies ausgeschlossen werden. Dies ist in Übereinstimmung damit, dass für Aceton ein effektiver Transfer der Triplettenenergie auf DNA möglich ist, während Acetophenon hauptsächlich per Wasserstoffabstraktion oder Elektronentransfer reagiert.¹⁸² Trotzdem wurden in der durch Acetophenon sensibilisierten Oxidation von Dinukleotiden die Bildung von Pyrimidin-Pyrimidon-Addukten detektiert.¹⁵⁷

2.5.3 Reaktivität kohlenstoffzentrierter Radikale

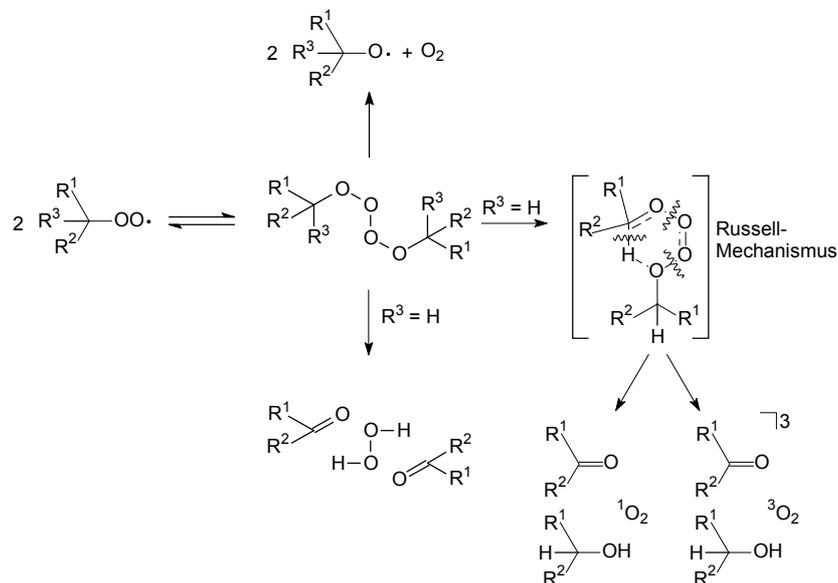
Kohlenstoffzentrierte Radikale addieren in der Regel schnell ($k > 10^9$ M⁻¹s⁻¹) Sauerstoff¹⁵⁸ und bilden dabei Peroxylradikale. Es gibt jedoch auch Ausnahmen. Relevant für die Oxidation von Guanin ist z. B. die geringe Reaktivität gegenüber Sauerstoff ($k = 1.5 \cdot 10^2$ M⁻¹s⁻¹) des mesomeriestabilisierten Guaninradikals, das durch Wasserstoffabstraktion von Guanin entsteht.¹⁵⁹

2.5.4 Reaktivität von Peroxylradikalen

2.5.4.1 Bimolekulare Reaktion von Peroxylradikalen

Peroxylradikale dimerisieren zu Tetraoxiden, die bei tiefen Temperaturen mit den Peroxylradikalen im Gleichgewicht stehen.¹⁶⁰ Bei höheren Temperaturen zerfallen diese in unterschiedliche Produkte. Für eine Reihe primärer und sekundärer Peroxylradikale wurden in Wasser Geschwindigkeitskonstanten von $> 10^9$ M⁻¹s⁻¹ bestimmt.¹⁶¹ Tertiäre Peroxylradikale

reagieren deutlich langsamer ($2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das *tert*-Butylperoxyradikal),¹⁶² aufgrund fehlender α -Wasserstoffatome stehen ihnen auch weniger Reaktionswege offen (Schema 2.12). Für die Russell-Reaktion muss zumindest einer der beiden Alkylreste ein



Schema 2.12: Dimerisierung von Peroxyradikalen und Folgereaktionen der dabei gebildeten Tetraoxide

Wasserstoffatom tragen, damit sich ein sechsgliedriger Übergangszustand ausbilden kann, welcher dann in eine Carbonylverbindung, einen Alkohol und molekularen Sauerstoff zerfällt.¹⁶³ Wegen der Spinerhaltung muss entweder Singulett-Sauerstoff und die Carbonylverbindung im Grundzustand oder aber Triplett-Sauerstoff und triplettangeregte Carbonylverbindung gebildet werden. Ebenfalls über einen elektrozyklischen Prozess kann es zur Bildung von H_2O_2 und zwei Carbonylverbindungen kommen, wie für Hydroxymethylperoxyradikale als Hauptreaktionsweg beschrieben wurde.^{163c,164}

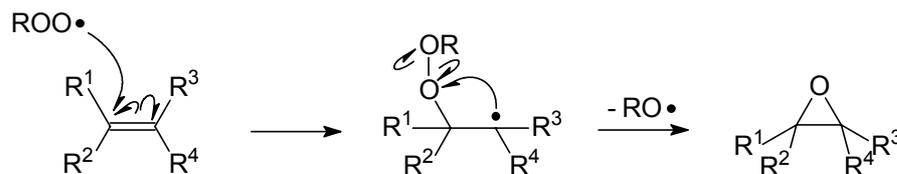
Ohne die Beteiligung eines α -Wasserstoffatoms kommt es zu einem Zerfall in Radikale. Spaltet das Tetroxid die mittleren zwei Sauerstoffatome als molekularen Sauerstoff ab, so bleiben zwei Alkoxyradikale zurück.^{86a} Hierbei ist jedoch anzumerken, dass eine Disproportionierung dieser beiden Radikale wiederum zu denselben Produkten wie beim Russell-Mechanismus führen würde, eine Unterscheidung anhand der Produkte ist daher schwierig.¹⁶⁵

2.5.4.2 Wasserstoffabstraktion durch Peroxylradikale

Peroxylradikale sind stark stabilisierte Radikale. Die OH-Bindung im entsprechenden Hydroperoxid weist eine vergleichbare Bindungsstärke auf wie eine tertiäre CH-Bindung. Peroxylradikale sind daher ziemlich unreaktive, hochselektive H-Abstraktoren (ähnlich wie Bromatome). Ihre Selektivität ist größer als die von Alkoxyradikalen, von Phenylradikalen und dem Methylradikal.^{86a}

2.5.4.3 Addition von Peroxylradikalen an Doppelbindungen

Peroxylradikale addieren an Doppelbindungen, wobei immer das stabilere der beiden möglichen Radikale gebildet wird. Auch hierbei handelt es sich um eine relativ langsame Reaktion. Oft wird darauf in einem zweiten Oxidationsschritt unter Bildung eines Epoxids ein Alkoxyradikal freigesetzt (Schema 2.13).^{86a}



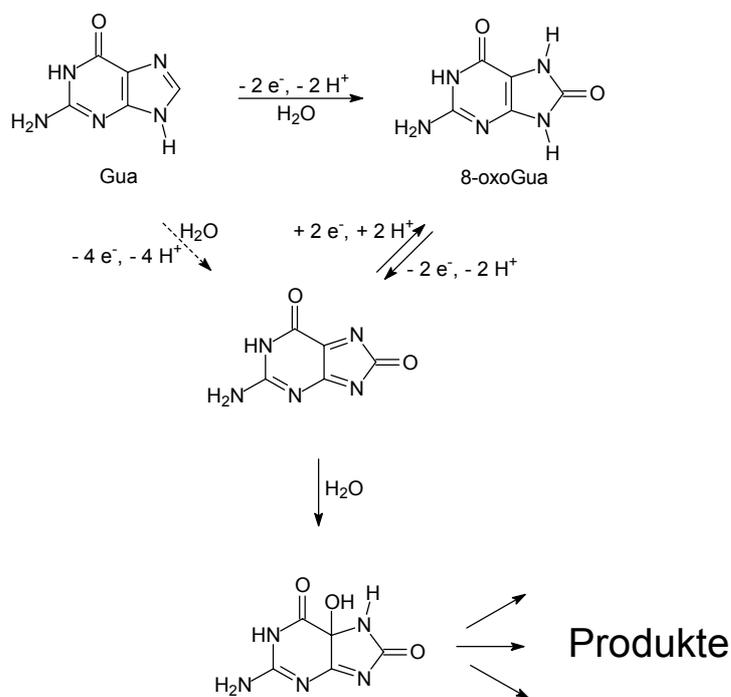
Schema 2.13: Addition von Peroxylradikalen an Doppelbindungen

2.6 Einsatz des Nukleosids dG als „Modellbase“

Für mechanistische Untersuchungen setzt man gewöhnlich das Nukleosid dG ein. Dabei ist zu beachten, dass sich dessen Reaktivität von DNA durch das Fehlen des Basenstranges und der damit verbundenen Wechselwirkungen unterscheidet. Ein wesentlicher Unterschied liegt in der Bildung der Oxidationsprodukte 8-oxodG und 8-oxoGua, welches im Fall der dG-Oxidation bisher nur in sehr geringen Mengen gefunden wurde, bei der DNA-Oxidation aber oft das Hauptprodukt bildet. Ein weiterer Unterschied bildet die Bildung von Spiroiminodihydantoin, das zwar aus dG in großen Mengen gebildet wird, aus DNA aber nahezu unbekannt ist.

2.6.1 Zwei- und Vierelektronenoxidation von Guanin

Bei der elektrochemischen Oxidation von Guanin wird über das Guaninradikalkation 8-oxoGua gebildet. Bei der elektrochemischen Oxidation von 8-oxoGua geht man davon aus, dass ein 2-Imidazolone gebildet wird, welches Wasser addiert und so 5-HO-8-oxoGua bildet (Schema 2.14).¹⁶⁶ 5-HO-8-oxoGua ist jedoch nicht stabil und bildet verschiedene



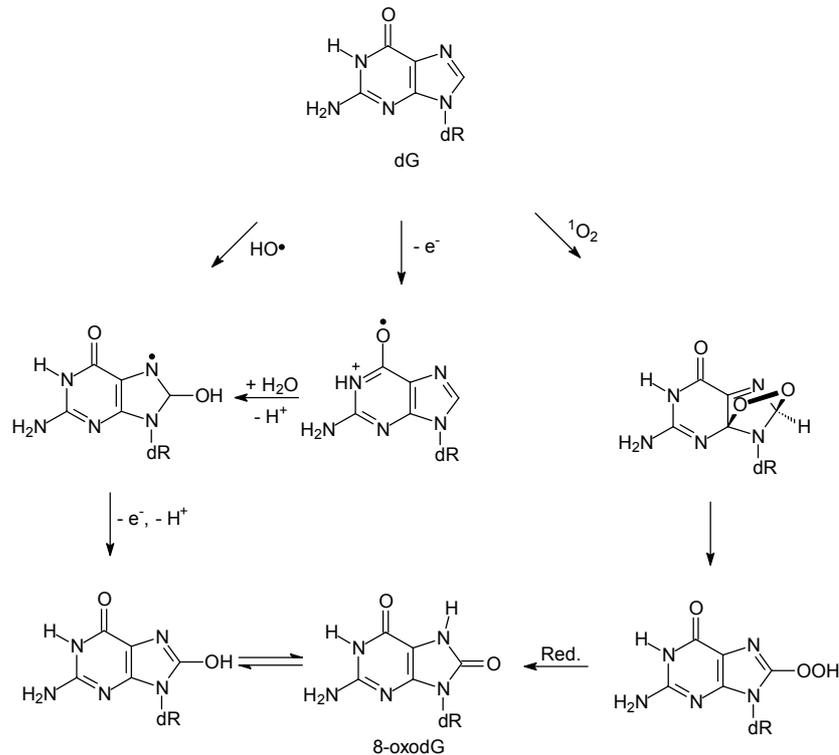
Schema 2.14: Bildung von 5-HO-8-oxoGua durch Oxidation von Gua und 8-oxoGua

Folgeprodukte (Imidazolone sowie Guanidinohydantoin). Kinetische, elektrochemische und analytische Daten weisen darauf hin, dass die Oxidation von 8-oxoGua durch H_2O_2 /Peroxidase analog verläuft.

2.6.2 Bildung von 8-oxodG

Die Bildung von 8-oxodG aus dG und dem Hydroxylradikal stellt man sich mechanistisch über die Bildung eines 8-Hydroxyladduktes an dG vor, welches dann zu 8-HO-dG, einem weniger stabilen Tautomer von 8-oxodG oxidiert wird.^{41a,41b,42,73f} Dieselbe Zwischenstufe erhält man nach Hydrolyse des durch Elektronentransfer-Reagenzien erzeugten Radikalkations.¹⁶⁷ Die pseudounimolekulare Geschwindigkeitskonstante des Angriffes von Wasser an das Guaninradikalkation in DNA wurde auf $6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt.¹⁶⁸ Mit Singulett-Sauerstoff geht man von der Bildung eines Endoperoxids aus (konnte bei der

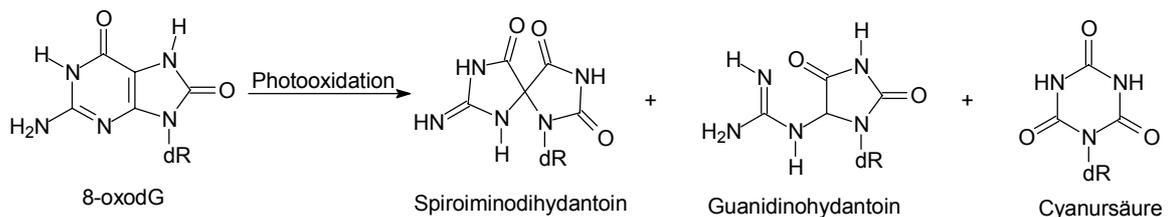
Photooxygenierung von 8-Methyl-dG isoliert werden), das zum Hydroperoxid öffnet und nach einem nicht näher definierten Reduktionsschritt ebenfalls 8-oxodG ergibt (Schema 2.15).¹⁶⁹



Schema 2.15: Mechanismen zur Bildung von 8-oxodG

2.6.3 Weiteroxidation von 8-oxodG

8-oxodG kann per Elektronentransfer oder durch Singulett-Sauerstoff weiter oxidiert werden (Schema 2.16). 8-oxodG wird durch Elektronentransfer-Reagenzien schneller oxidiert als



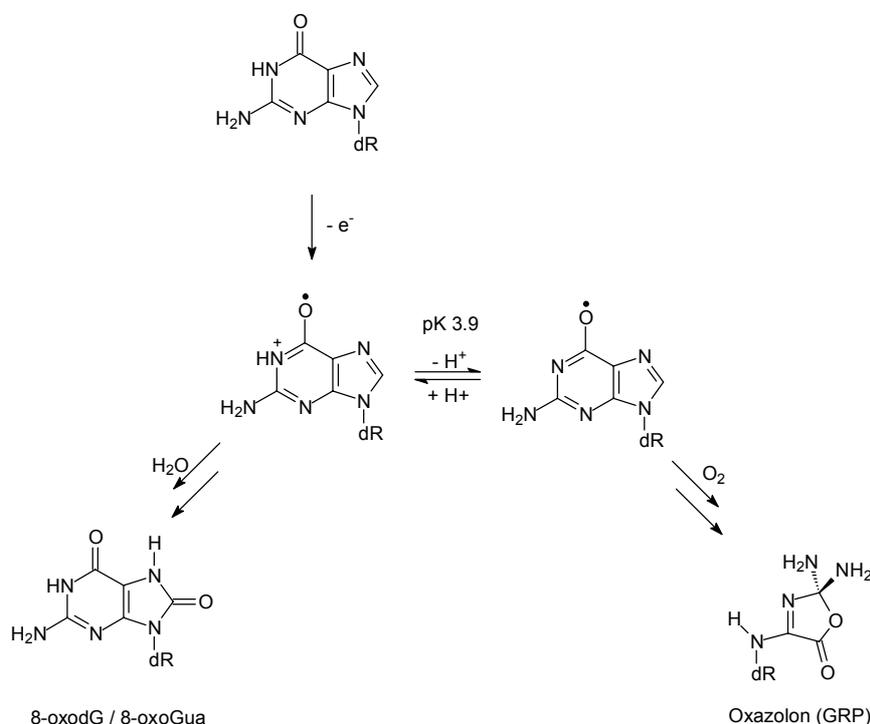
Schema 2.16: Oxidationsprodukte bei der Photooxidation von 8-oxodG (Elektronentransfer oder Singulett-Sauerstoff)

Guanin, dabei entsteht Guanidinohydantoin und Spiroiminodihydantoin.¹⁷⁰ Singulett-Sauerstoff^{169,171} führt zur Bildung von 1-(2-Deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)cyanursäure als Hauptprodukt¹⁷² sowie Spiroiminodihydantoin. Auch aus HO-TMD gebildete Radikalspezies oxidieren 8-oxodG zu Spiroiminodihydantoin.^{137,173} Es ist

anzumerken, dass nur wenige Oxidationsreaktionen bekannt sind, mit denen man dG in guten Ausbeuten zu 8-oxodG umwandeln kann, zumeist entsteht es nur in geringen Mengen. Ein Beispiel hierfür ist die Oxidation von dG durch reduktiv aktivierte 5-Deazaflavinderivate unter anaeroben Bedingungen.¹⁷⁴ Dies ist vermutlich auf die hohe Oxidationsempfindlichkeit von 8-oxodG zurückzuführen, so dass 8-oxodG nur unter nicht-oxidierenden Bedingungen angereichert werden kann und unter den in der Regel angewandten oxidativen Bedingungen sofort weiteroxidiert wird.

2.6.4 Deprotonierungsgleichgewicht des dG-Radikalkations

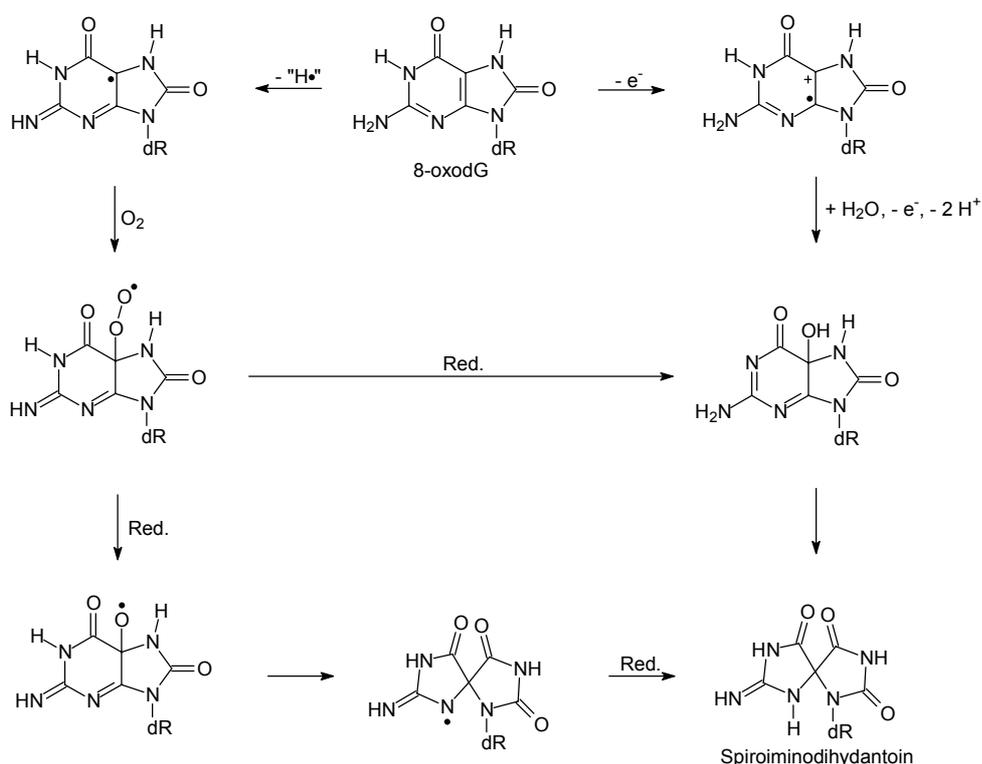
Betrachtet man die Oxidation von Guanin in dG im Vergleich zu DNA, so fehlt die Stabilisierung durch Basenpaarung und Basenstapelung und das dG-Radikalkation kann deshalb rasch ein Proton abgeben.^{37a,37b,167} Addition von Sauerstoff führt schließlich nach einigen Folgeschritten zu Oxazolone (siehe Kapitel 2.6.6 „Bildung von guanidinfreisetzenden Verbindungen“). Aufgrund der schnellen Deprotonierung des dG-Radikalkations erfolgt keine Hydrolyse und es wird kein (oder nur wenig) 8-oxodG gebildet (pK_a 3.9, Schema 2.17).¹⁶⁷



Schema 2.17: Deprotonierung des Guaninradikalkations als Erklärung für die geringen Ausbeuten an 8-oxodG in der Einelektronenoxidation von dG im Vergleich mit DNA

2.6.5 Bildung von Spiroiminodihydantoin

Bei der singulett-sauerstoffinduzierten Oxidation von dG,¹⁴⁹ aber auch bei der durch Einelektronenoxidantien (Riboflavin)¹⁷⁵ und durch Peroxylradikale^{138,137} verursachten Oxidation von dG wird Spiroiminodihydantoin gebildet. Ebenfalls bei der Photooxidation von 8-oxodG durch Benzophenon (Typ-I)¹³⁵ oder Peroxylradikalquellen^{136,137} sowie bei der Oxidation durch Ein-¹⁷⁶ und Zweielektronenoxidantien¹⁷⁷ entsteht Spiroiminodihydantoin. Die früher gemachte Annahme, Spiroiminodihydantoin (damals irrtümlich der Struktur 4-HO-8-oxodG zugeordnet¹⁷⁸, die eindeutige Zuordnung der Struktur des von uns verwendeten Standards wird in Kapitel 4.1 beschrieben) sei ein ausschließlich durch Singulett-sauerstoff gebildetes Produkt, ist damit widerlegt. Während für die singulett-sauerstoffinduzierte Oxidation aufgrund der falschen Zuordnung der Struktur keine Reaktionsmechanismen veröffentlicht sind, geht man bei der Einelektronenoxidation von 8-oxodG von der Bildung eines an Position 5 oxidierten Grundgerüsts aus, das sich dann zu Spiroiminodihydantoin umlagert (Schema 2.18).¹⁷⁶

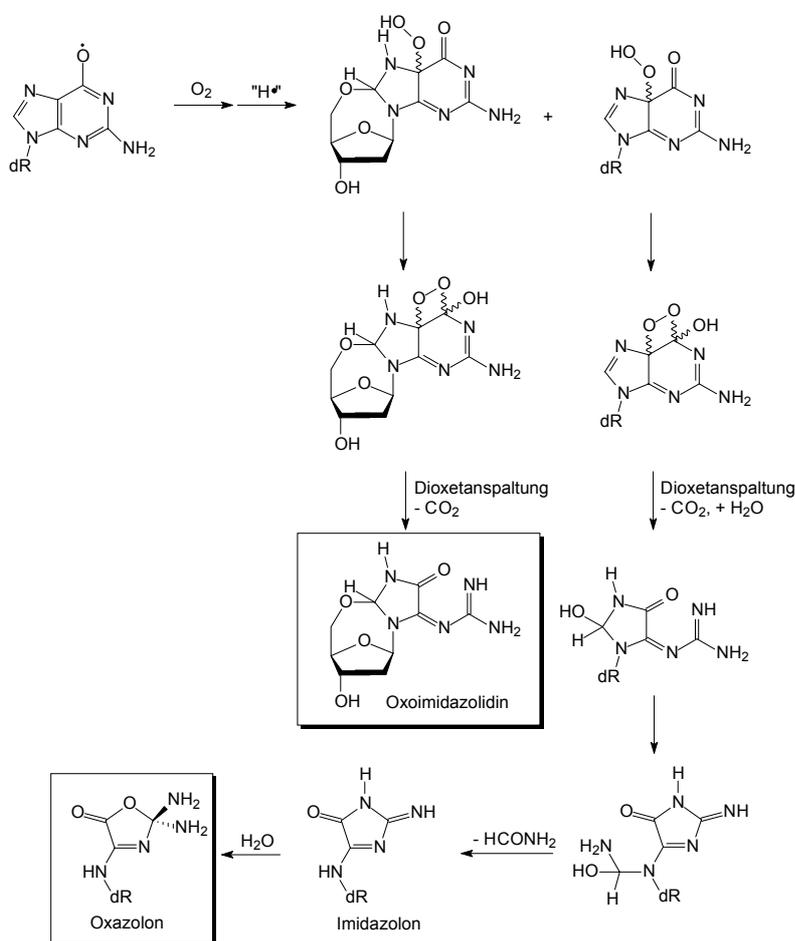


Schema 2.18: Mechanismen zur Bildung von Spiroiminodihydantoin

Über den Mechanismus der direkten Bildung von Spiroiminodihydantoin aus dG ist bisher nichts bekannt. In DNA konnte Spiroiminodihydantoin bisher nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden.¹⁷⁹

2.6.6 Bildung von guanidin-freisetzenden Verbindungen (GRP)

Die Detektion von guanidin-freisetzenden Produkten (GRP) wurde in der Vergangenheit zur Quantifizierung von Oxazolon verwendet. Da aufgrund der angewandten Analytik kein direkter Nachweis der Oxidationsprodukte erfolgt, kann bei der Photooxidation von dG und DNA die Freisetzung anderer, potentiell guanidin-freisetzenden Produkte (z. B. Guanidinohydantoin oder sogar Guanidin selbst) nicht ausgeschlossen werden. Hier soll deshalb beispielhaft die Bildung von Oxazolon und Oxoimidazolidin beschrieben werden (Schema 2.19), die unter den angewandten Bedingungen beide quantitativ



Schema 2.19: Mechanismus der Bildung von Oxoimidazolidin sowie von Oxazolon

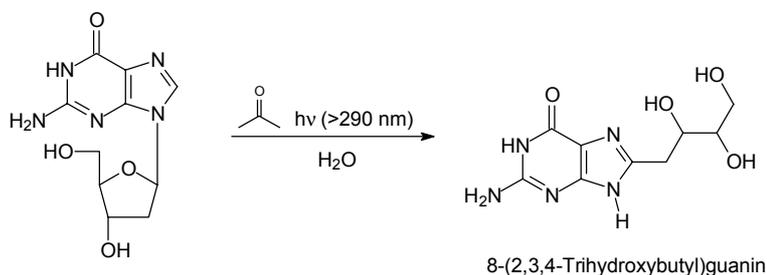
Guanidin freisetzen.^{50,180} Es bleibt festzuhalten, dass 8-oxodG sowie Spiroiminodihydantoin unter den bei der alkalischen Hydrolyse eingesetzten Bedingungen keine signifikanten Mengen an Guanidin freisetzen.^{138a}

2.6.7 Produkte der Oxidation von Nucleosiden durch elektronisch angeregte Zustände

Die Wechselwirkung von triplettangeregtem Benzophenon und Acetophenon mit Guanosin in wässriger Lösung wurde bereits vor 30 Jahren von *Charlier* und *Hélène* per Blitzphotolyse untersucht.¹⁸¹ Die erhaltenen Daten wurden durch eine Wasserstoffatom-Abstraktion des triplettangeregten Carbonylchromophors am Guanin erklärt, vorgeschlagen wurde das Wasserstoffatom an der C-8-Position. H-Abstraktion an Guanosin durch triplettangeregtes Benzophenon wurde auch von *Kasama et al.* beobachtet.¹⁵⁶ Vor einigen Jahren wurden von *Redmond et al.* die Geschwindigkeitskonstanten für den Quenchprozess durch Guanosinmonophosphat bestimmt: $k = 2.0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für BP, $2.4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für AP.^{55b}

2.6.7.1.1 Produkte der durch Aceton sensibilisierten Basenoxidation

Für die aceton-sensibilisierte Photooxidation von sauerstofffreien wässrigen dG-Lösungen wurde die Bildung von 8-(2,3,4-Trihydroxybutyl)guanin als Hauptprodukt beobachtet, mechanistische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt (Schema 2.20)¹⁸².



Schema 2.20: Bildung von 8-(2,3,4-Trihydroxybutyl)guanin in der aceton-sensibilisierten Oxidation von dG

2.6.7.1.2 Produkte der durch Acetophenon sensibilisierten Basenoxidation

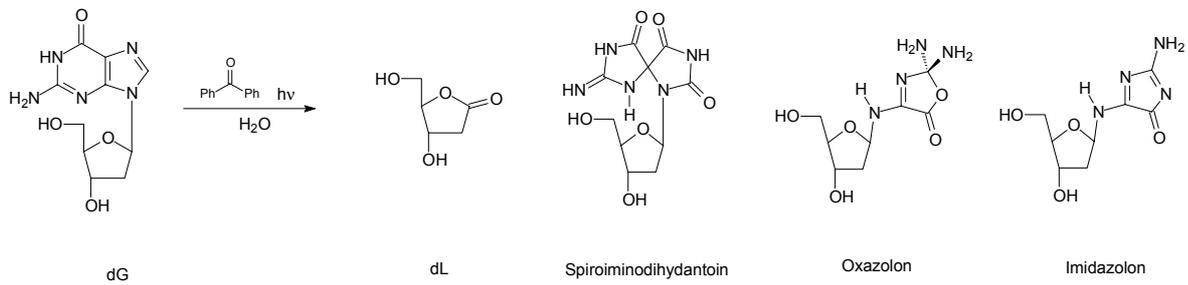
Bei der Oxidation des Nucleosids dG durch Acetophenon entsteht Oxoimidazolidin.¹⁸³

2.6.7.1.3 Produkte der durch Benzophenon sensibilisierten Basenoxidation

Durch Benzophenon photosensibilisierte Oxidation von dG in Gegenwart von Sauerstoff ergibt 2-Deoxy-D-ribo-1,4-lacton (dL)¹⁸⁴, Oxazolone und Imidazolone.^{49,185} Außerdem wurde

2 KENNTNISSTAND

sowohl bei der Oxidation von dG wie auch bei der Oxidation von 8-oxodG Spiroiminodihydantoin detektiert (Schema 2.21).¹³⁵ Es ist bekannt, dass Benzophenon nicht



Schema 2.21: Durch Benzophenon sensibilisierte Oxidation von dG

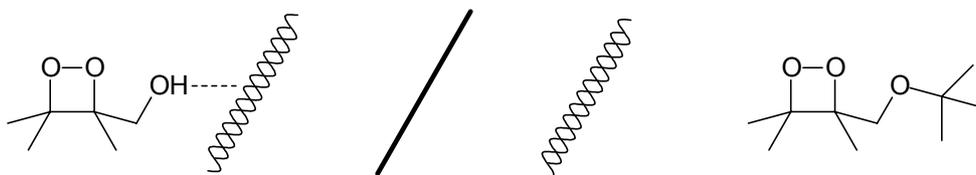
nur Elektronentransfer-Reaktionen eingehen, sondern auch aktivierte Wasserstoffatome abstrahieren kann.¹⁸⁶

3 Problemstellung

Das Interesse an den photobiologischen Eigenschaften angeregter Ketonspezies in unserem Arbeitskreis begründet sich auf Untersuchungen mit Dioxetanen, die in den 80er Jahren erstmals auf ihre Reaktivität mit DNA hin geprüft wurden.¹²¹ Anfangs der 90er Jahre entdeckte man, dass durch einfache Substitution eines Wasserstoffatoms an TMD durch eine Hydroxylgruppe die Reaktivität gegenüber DNA beträchtlich anstieg.^{136,173} Später stellte sich heraus, dass die so substituierten Dioxetane die einzigen sind, welche bei der Thermolyse Radikale freisetzen, deshalb wurden die gebildeten Radikale für die Reaktivität gegenüber DNA verantwortlich gemacht.¹³⁷ Die zuvor aufgestellte These, dass die Dioxetane in wässriger Lösung über die HO-Gruppe an die DNA assoziiert vorliegen, sollte daher überprüft werden. Hierzu wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit bereits verschiedene alkoxymethylsubstituierte Dioxetane sowie die entsprechenden Ketone bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber dem Nukleosid dG untersucht.^{138a} Im Rahmen der Doktorarbeit sollten folgende Aspekte untersucht werden:

3.1.1 DNA-Basenoxidation durch alkoxymethylsubstituierte Ketone

Bezüglich der Beteiligung einer Wasserstoffbrückenbindung zum Phosphatrückgrat stellte sich die Frage, ob die gegenüber dG beobachtete Reaktivität auf DNA übertragbar ist oder ob andere Prozesse eine Rolle spielen. Hierzu sollten die während der Thermolyse von ^tBuO-TMD induzierten Basenoxidationsprodukte quantifiziert und mit denen bei der Thermolyse von HO-TMD induzierten verglichen werden. Als Vergleichsreaktion sollte auch die Photolyse von 1-*tert*-Butoxy-2-propanon in Gegenwart von DNA durchgeführt werden. Bei einer Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen HO-TMD und DNA wäre im Vergleich zu ^tBuO-TMD eine deutlich höhere Reaktivität zu erwarten (Schema 3.1).



Schema 3.1: Assoziation von HO-TMD an DNA

Für 1-Hydroxy-2-propanon konnten in Quenchversuchen mit Benzhydrol keinerlei Tripletzustände detektiert werden, was mit einer schnell ablaufenden

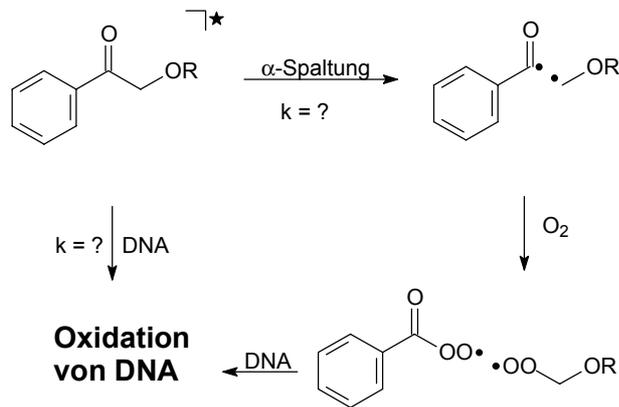
α -Spaltung interpretiert wurde.¹³⁷ Da man jedoch weder Singulett- und Triplettzustand noch die Spaltungsprodukte beobachten kann, lassen sich daraus keine gesicherten Rückschlüsse auf die Reaktivität des in der Dioxetanthermolyse gebildeten triplettangeregten 1-Hydroxy-2-propanons ziehen. Wünschenswert wäre deshalb ein Keton, das effizient Triplettzustände bildet, die eine akzeptable Lebenszeit aufweisen und sich spektroskopieren lassen. Das Hauptproblem besteht in der geringen kurzwelligen Absorption der Acetonderivate sowie ihrer angeregten Zustände. Dies verhindert die Untersuchung der photophysikalischen Eigenschaften der elektronisch angeregten Ketone und erlaubt daher nur spekulative Aussagen über deren Reaktivität. Eine gesicherte Aussage, ob wirklich Radikale an der Oxidation beteiligt sind, wie für HO-TMD und die alkoxyethylsubstituierten Dioxetane angenommen wird, ist daher nicht möglich.

3.1.2 Wird die dG-Oxidation durch angeregte Zustände oder durch Radikale induziert ?

Es war deshalb wünschenswert, ein Keton mit einem besser absorbierenden Chromophor einzusetzen. Ein weiterer Vorteil eines höheren Absorptionskoeffizienten wäre die Möglichkeit, mit geringeren Mengen an Keton zu arbeiten. Im Fall von 1-Hydroxy-2-propanon war ein mehr als 100facher Überschuss an Keton im Vergleich zu dG nötig, um eine signifikante Oxidation zu induzieren. Auch beim Einsatz von Dioxetanen muss wegen relativ geringer Radikalausbeuten mit großen Überschüssen gearbeitet werden. Durch den Einsatz von Ketonen mit höherem Absorptionskoeffizient kann bei der Photooxidation die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung der reaktiven Zwischenstufen mit dem Keton deutlich verringert werden. Da Acetophenon sowie Benzophenon bereits für photobiologische Studien eingesetzt wurden und daher einige Daten bezüglich der Oxidation von dG und DNA verfügbar waren, wurde der Acetophenon-Chromophor ausgewählt, im Vergleich zum Acetonderivat 1-Hydroxy-2-propanon also eine Acetylgruppe durch eine Benzoylgruppe ersetzt (Schema 3.2).

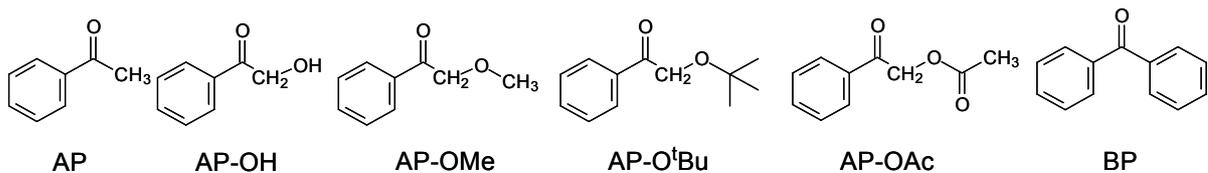
3.1.2.1 Auswahl geeigneter Derivate

Da Acetophenon keine α -Spaltung eingeht,¹⁸⁷ müssen geeignete Substituenten eingeführt werden, die die Stabilität des Methylenradikals erhöhen und damit die Spaltung ermöglichen.



Schema 3.2: Konkurrenz zwischen α -Spaltung und direkter Wechselwirkung mit DNA

Da sich hierfür im Fall der Acetonderivate Hydroxy- und Alkoxygruppen bewährt haben, wurden AP-OH, AP-O^tBu, AP-OMe sowie AP-OAc (für 1-Acetoxy-2-propanon wurde eine effiziente Oxidation von DNA, aber keine Radikalbildung festgestellt)^{137a} ausgewählt. Um einen Vergleich mit nichtradikalbildenden Ketonen zu haben, wurde zusätzlich AP und BP in die Studien mit aufgenommen (Schema 3.3).

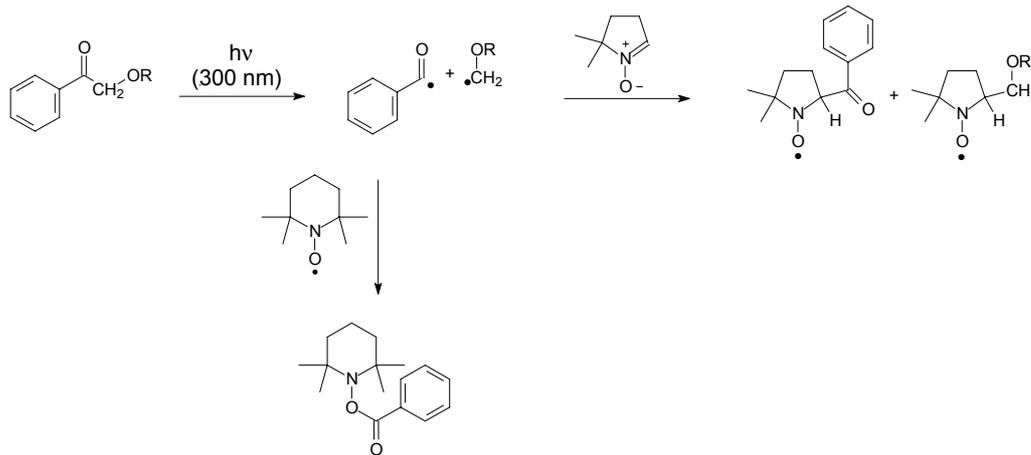


Schema 3.3: Ausgewählte Acetophenonderivate und Benzophenon

3.1.2.2 Bilden die Ketone bei der Photolyse Radikalspezies ?

Um herauszufinden, ob die eingesetzten Ketone tatsächlich Radikale bilden, sollten Radikalabfangexperimente mit DMPO durchgeführt werden. Da der Abfang von Peroxylradikalen mit DMPO in der Literatur umstritten ist, sollte dies in entgasten Lösungen durchgeführt werden; zu erwarten sind Signale für das Benzoylradikal-Addukt sowie ein oxysubstituiertes Methylradikal-Addukt. Zusätzlich sollten durch Zusatz von TEMPO Benzoylradikale abgefangen und mittels HPLC/UV quantifiziert werden (Schema 3.4).

3 PROBLEMSTELLUNG



Schema 3.4: Nachweis von bei der Photolyse gebildeten Radikalspezies

3.1.2.3 Untersuchung der Reaktivität der Peroxylradikale gegenüber DNA und dG

Da die Bildung von Strangbrüchen in DNA allgemein Radikalen zugeschrieben wird, sollen Experimente mit superhelikaler pBR322-DNA Aufschluss darüber geben, ob Radikalspezies gebildet werden. Neben der Induktion von Strangbrüchen verursachen Radikale auch die Bildung von Basenoxidaionsprodukten. Hier sollte mit der im Arbeitskreis zur Verfügung stehenden Analytik (8-oxoGua und GRP) die Bildung von Basenoxidaionsprodukten detektiert und quantifiziert werden.

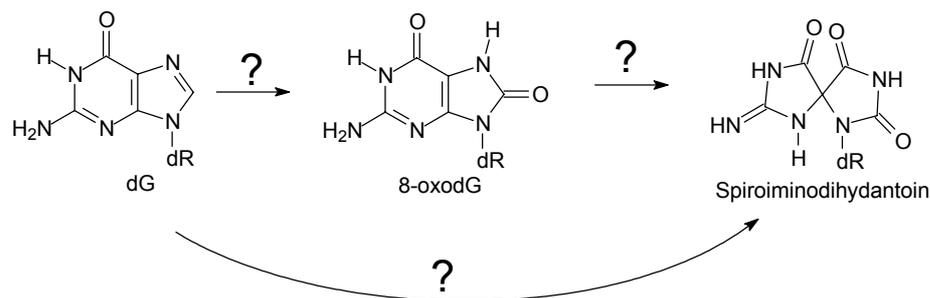
Um Hinweise auf den Oxidationsmechanismus zu bekommen, sollten Experimente mit dem Nukleosid dG, der am leichtesten zu oxidierenden Base in DNA, durchgeführt werden. Versuche mit dG sind einfacher durchzuführen, der Umsatz und die Oxidationsprodukte sind direkt (ohne Aufarbeitung und Hydrolyse) und daher genauer zu quantifizieren. Weiterhin bietet die Oxidation von dG den Vorteil der Bildung eines weiteren Oxidationsproduktes, das in DNA bisher nicht oder nur in Spuren detektiert wurde, nämlich Spiroiminodihydroantoin. Vor allem sollte die Abhängigkeit der oxidativen Aktivität von der Substratkonzentration untersucht werden, um weitere Hinweise auf die Beteiligung von Radikalen zu erlangen.

3.1.3 Was hat es mit der Sonderrolle des Acetoxysubstituenten auf sich ?

Wie bereits im Kenntnisstand erwähnt, beobachtet man bei der Thermolyse des acetoxysubstituierten Dioxetans AcO-TMD im Vergleich zu TMD eine erhöhte Reaktivität gegenüber dG, obwohl in Spinabfangexperimenten mit DMPO keine Radikale detektiert werden konnten. Mit AP-OAc sollte eine Verbindung synthetisiert werden, deren Triplettlebensdauer per Laserblitz-Photolyse untersucht werden kann. Mittels Quenchexperimenten mit dG sollte die Reaktivität von AP-OAc gegenüber dG quantifiziert und mit AP verglichen werden.

3.1.4 Welche Rückschlüsse lassen sich auf die Oxidationsmechanismen ziehen ?

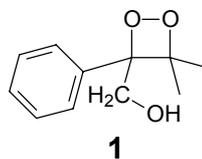
Hierzu sollte vor allem untersucht werden, ob molekularer Sauerstoff für die Oxidation von dG benötigt wird, wie für die Bildung von Peroxylradikalen erforderlich ist. Durch Vergleich der Geschwindigkeit der Oxidation von 8-oxodG mit dG soll herausgefunden werden, ob unter den angewandten Bedingungen 8-oxodG überhaupt persistent genug ist, um detektiert werden zu können oder ob eine Bildung von 8-oxodG, obwohl es nicht als Oxidationsprodukt beobachtet wird, nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterhin soll durch Vergleich der Oxidation von dG und 8-oxodG untersucht werden, ob Rückschlüsse auf eine direkte Bildung von Spiroiminodihydantoin aus dG erhalten werden können ohne 8-oxodG als Zwischenstufe zu bilden (Schema 3.5).



Schema 3.5: Erfolgt die Bildung von Spiroiminodihydantoin aus 8-oxodG oder direkt aus dG ?

3.1.5 *Synthese eines Dioxetans, das bei der Thermolyse triplettangeregtes AP-OH freisetzt*

Schließlich soll, um wieder zurück zum Ausgangspunkt der ganzen Untersuchungen zu gelangen, ein Dioxetan synthetisiert werden, das ein angeregtes hydroxysubstituiertes Acetophenon freisetzt. Dessen Reaktivität bei der Thermolyse soll anhand von Beispielreaktionen mit dG mit der Photolyse des entsprechenden Ketons verglichen werden. Damit soll sichergestellt werden, dass die beobachtete Reaktivität auch wirklich von den elektronisch angeregten Ketonspezies ausgeht und nicht durch direkte Oxidation des Substrats mit dem Dioxetan verursacht wird.

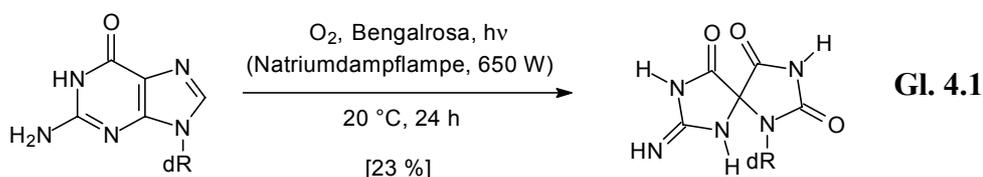


4 4-HO-8-oxodG vs. Spiroiminodihydantoin

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Darstellung von Spiroiminodihydantoin

Die Darstellung von Spiroiminodihydantoin im mehrere 100mg-Maßstab erfolgte ausgehend von kommerziell erhältlichem 2'-Desoxyguanosin (dG) durch Photooxygenierung mit Bengalrosa als Sensibilisator (Gleichung 4.1, V-19). Die Identität der hergestellten



Verbindung mit dem von A. Schönberger hergestellten Standard,¹³⁶ der zur Quantifizierung von 4-HO-8-oxodG verwendet wurde, wurde per HPLC/UV (Methode 3) bestätigt.

4.1.2 Darstellung von Spiroiminodihydantoin durch Einelektronenoxidation von 8-oxodG

Ebenfalls per HPLC-UV wurde bestätigt, dass das durch Oxidation von 8-oxodG mit $K_3Fe(CN)_6$ entstehende Hauptprodukt (gebildet in 69% Ausbeute), das von *Burrows et al.*¹⁷⁶ als Spiroiminodihydantoin beschrieben wurde, identisch zu dem im Arbeitskreis vorhandenen 4-HO-8-oxodG-Standard war (V-20).

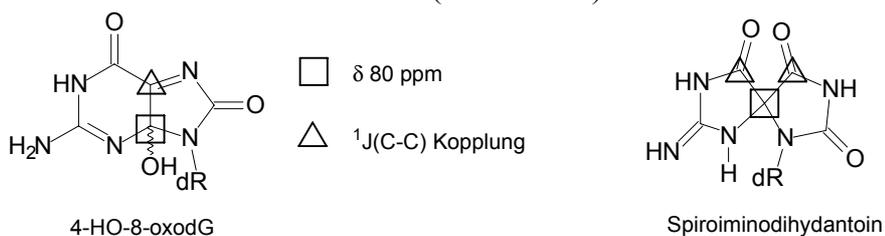
4.1.3 Selective Inadequate-Spektrum (SELINQUATE, Selective Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment)

Das von dem in V-19 hergestellten Produkt angefertigte SELINQUATE-Spektrum (ca. 500 mg in 0.7 mL d_6 -DMSO), bei dem im Bereich von δ 80 ppm auf die Signale bei δ 79.7 ppm sowie δ 80.3 ppm eingestrahlt wurde, weist im Bereich der Basenpeaks (δ 150-185 ppm) zwei Sätze von jeweils zwei Signalsätzen (sowohl 4-HO-8-oxodG als auch Spiroiminodihydantoin liegen als Diastereomergemisch vor) auf. Für die Peaks bei δ 169.4 und 169.5 wurde eine Kopplungskonstante von 52 Hz, bei δ 180.9 und 181.5 ppm von

42 Hz beobachtet. Für die Signale bei δ 155.4 und 156.0 sowie 177.2 und 171.8 ppm wurde keinerlei Kopplung beobachtet.

4.2 Diskussion

Ein Inadequate-NMR-Experiment sollte eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden berichteten Strukturen ermöglichen, nachdem eigene Kontrollexperimente (V-20) die von *Tannenbaum et al.*¹⁷⁸ gemachte Beobachtung, dass es sich bei dem durch Singulett-Sauerstoff gebildeten Produkt, das als 4-HO-8-oxodG beschrieben wurde, und dem durch Einelektronenoxidation gebildeten Spiroiminodihydantoin um einunddieselbe Verbindung handelt, bestätigen. Da in beiden Strukturen die Basen-Kohlenstoffatome bei ca. 80 ppm zugeordnet werden konnten (C-4 im Fall von 4-HO-8-oxodG, C-5 im Fall von Spiroiminodihydantoin), ist für beide Strukturen eine unterschiedliche Anzahl an direkt dazu benachbarten Kohlenstoffatomen zu erwarten (Schema 4.1).



Schema 4.1: Nachbarschaftsverhältnisse der Kohlenstoffatome in 4-HO-8-oxodG vs. Spiroiminodihydantoin

Das erhaltene SELINQUATE-Spektrum (Anregung bei ca. 80 ppm) zeigt zweifelsfrei für beide Diastereomere eine $^1J(\text{C-C})$ -Kopplung zu jeweils zwei Kohlenstoffatomen (δ 169 und δ 181 ppm). Damit kann die in Schema 4.1 links dargestellte 4-HO-8-oxodG-Struktur ausgeschlossen werden und die von *Cadet et al.*¹⁸⁸ aufgrund der Analogie zu dG erfolgte Zuordnung der Struktur muss als Spiroiminodihydantoin revidiert werden.

5 Oxidation von dG und DNA durch alkoxy-substituierte 3,3,4,4-Tetramethyldioxetane

5.1 Ergebnisse

5.1.1 Bereits in der Diplomarbeit durchgeführte Experimente

Die Synthese der Dioxetane (siehe V-1 bis V-7) und 2-*tert*-Butoxy-2-propanon (V-8) sowie die grundlegenden Untersuchungen zu deren Reaktivität wurden bereits in der Diplomarbeit ausgeführt und sind aus diesem Grund hier nicht nochmals erläutert.^{138a} Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die Synthese verschiedener alkoxy-methyl-substituierter Dioxetane, deren Untersuchung bezüglich thermischer Generierung von Radikalen, Studien zur dioxetaninduzierten Strangbruchbildung in pBR 322 DNA und die Bestimmung der Oxidationsprodukte sowie des Umsatzes in der Reaktion mit dem Nucleosid dG. Es stellte sich heraus, dass alkoxy-, acyloxy- und hydroxysubstituierte Dioxetane dG um ein vielfaches effizienter oxidieren als das unsubstituierte Tetramethyldioxetan (TMD). Für die aus den alkoxy-methyl-substituierten Dioxetanen thermolytisch erzeugten Tripletketone führt die α -Spaltung zu kohlenstoffzentrierten Radikalen, die für die dG-Oxidation verantwortlich gemacht werden. Der Schwerpunkt der Arbeiten in der Dissertation lag auf dem Vergleich der Oxidationseffizienz der radikalbildenden Dioxetane HO-TMD und ^tBuO-TMD mit den nichtradikalbildenden Dioxetanen TMD und MeO-TMD gegenüber dG und der Bestimmung der Reaktivität gegenüber DNA.

5.1.1.1 Zersetzungskinetik der Dioxetane – Relative Triplettausbeuten

Die Geschwindigkeit der Dioxetanthermolyse (1.00 mM) wurde bestimmt, indem die Lumineszenzabklingkurve bei 50 °C in Acetonitril aufgenommen wurde.^{138a} Durch Normierung der in der Diplomarbeit gemessenen relativen Tripletquantenausbeuten auf den literaturbekannten Wert für HO-TMD wurden absolute Tripletquantenausbeuten erhalten, die multipliziert mit der Geschwindigkeitskonstante für die Dioxetanzersetzung den „Triplet Excitation Flux“ E_p^T ergeben. Alle E_p^T -Werte (Tabelle 5.1) der alkoxy-methyl-substituierten Dioxetane waren kleiner als für TMD. ^tBuO-TMD bildet die wenigsten triplettangeregten Ketone.

Tabelle 5.1: Triplett-Anregungsparameter der Dioxetane, relative Effizienzen der dG-Oxidation und Triplett-Quantenausbeuten^{a)}

Dioxetan	k_{dec} [10^{-6} s^{-1}]	Φ_{T} [%] ^{b)}	E_{P}^{T} [$10^{17} \text{ s}^{-1} \text{ L}^{-1}$] ^{c)}	rel. Effizienz	
				Dioxetan	Keton
TMD	4.3 ± 0.2	$35 \pm 3^{\text{d)}$	9.1 ± 1.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1
HO-TMD	4.9 ± 1.2	$14 \pm 3^{\text{d)}$	4.1 ± 0.9	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4
MeO-TMD	3.4 ± 0.5	17 ± 4	3.5 ± 0.8	1.5 ± 0.6	0.1 ± 0.1
^t BuO-TMD	3.2 ± 0.3	8 ± 2	1.6 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1

a) Die Werte für HO-TMD und 1-Hydroxy-2-propanon wurden auf 1.00 gesetzt;
 b) T = 37 °C; c) relativ zu HO-TMD in Acetonitril; d) Daten aus Ref 189.

5.1.1.2 Relative Effizienz der dG-Oxidation

Um die relative Effizienz der verschiedenen Dioxetane bezüglich der dG-Oxidation zu berechnen, wurde die Menge (% Umsatz) an verbrauchtem dG in der Thermolyse des entsprechenden Dioxetans (20.0 mM) mit dG (0.500 mM) in einer 9:1 Mischung von Phosphatpuffer (5.00 mM, pH 7.0) und Acetonitril bei 50 °C für 15 h untersucht. Zum Vergleich wurde das Ausmaß der durch die in der Dioxetanthermolyse gebildeten triplettangeregten Ketone induzierten dG-Oxidation relativ zu HO-TMD berechnet, welches auf 1.0 gesetzt wurde (Tabelle 5.1). Die relative Effizienz gibt an, wie viel dG durch ein triplettangeregtes Keton oxidiert wird.

Wie in Tabelle 5.1 gezeigt, waren die alkoxyethylsubstituierten Dioxetane bezüglich der Oxidation von dG etwas effizienter als HO-TMD. Alle oxymethylsubstituierten Dioxetane waren 5- bis 7-mal effizienter als die Stammverbindung TMD. Während die E_{P}^{T} -Werte in der Reihenfolge TMD > HO-TMD > MeO-TMD > ^tBuO-TMD kleiner werden, folgt die Effizienz der dG-Oxidation im Großen und Ganzen dem entgegen gesetzten Trend, nämlich TMD << HO-TMD ~ MeO-TMD ~ ^tBuO-TMD.

Analoge Experimente wurden durch Bestrahlung der entsprechenden Ketone, die in der Dioxetanthermolyse gebildet werden, durchgeführt [20.0 mM Keton, 0.500 mM dG in einer 9:1 Mischung von Phosphatpuffer (5.00 mM, pH 7.0) und Acetonitril bei 300 nm und 0 °C für 40

5 h].^{138a} Die daraus erhaltenen relativen Effizienzen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Das Ausmaß des dG-Umsatzes wurde um den molaren Extinktionskoeffizienten korrigiert, um einen Wert für die Anzahl der angeregten Spezies zu erhalten.

Die Daten der Ketonphotolyse zeigen (Tabelle 5.1, letzte Spalte), dass während 1-Hydroxy-2-propanon und 1-*tert*-Butoxy-2-propanon ähnlich effizient bezüglich der Oxidation von dG sind wie die in der Dioxetanthermolyse gebildeten triplettangeregten Ketone, (Tabelle 5.1, Spalte 5), 1-Methoxy-2-propanon deutlich weniger effizient ist (nur ca. ein Zehntel). Aceton, welches bei der Bestrahlung keine Radikalspezies freisetzt, hat keinerlei dG-Oxidation induziert. Wiederum gibt es keinen direkten Zusammenhang zwischen der beobachteten dG-Oxidation (% Umsatz), die durch die Dioxetanthermolyse und die Ketonphotolyse induziert wurde. Der Hauptunterschied liegt zwischen dem Dioxetan MeO-TMD und dem entsprechenden Keton 1-Methoxy-2-propanon.

5.1.2 Chemilumineszenzmessungen während der dG-Oxidation

Um herauszufinden, ob die elektronisch angeregten Spezies, die aus den Dioxetanen entstehen, tatsächlich die Oxidation von dG verursachen, wurde letzteres bei 50 °C mit ^tBuO-TMD behandelt und gleichzeitig die Chemilumineszenzemission^I (Abbildung 5.1) und der dG-Umsatz^{II} gemessen (V-A1). Die Zersetzungsgeschwindigkeit der Dioxetane in Gegenwart von dG { $t_{1/2}[50\text{ °C, H}_2\text{O} : \text{Acetonitril (9:1)]} = 740 \pm 100\text{ min}$ } war im Fehlerbereich identisch mit der bereits in der Diplomarbeit gemessenen Halbwertszeit in Abwesenheit { $t_{1/2}[50\text{ °C, H}_2\text{O} : \text{Acetonitril (9:1)]} = 580 \pm 100\text{ min}$ } von dG. Nach 1080 min (siehe Pfeil in Abbildung 5.1), wurde ein weiteres Äquivalent von 20 mM Dioxetan zur Reaktionslösung zugegeben um zu überprüfen, ob erneut dG-Oxidation induziert werden kann. Tatsächlich war ein Anstieg der dG-Oxidation (Umsatz) zu beobachten, das Zeitprofil der dG-Oxidation verlief parallel zur Bildung angeregter Carbonylspezies, die in der Dioxetanthermolyse entstanden. Je mehr angeregte Spezies entstanden, desto mehr dG wurde oxidiert (V-A1).

^I verfolgt mit einem Mitchell-Hastings Photometer

^{II} für jeden Punkt in Abbildung 5.1 wurde eine Probe entnommen und der dG-Umsatz mittels HPLC analysiert

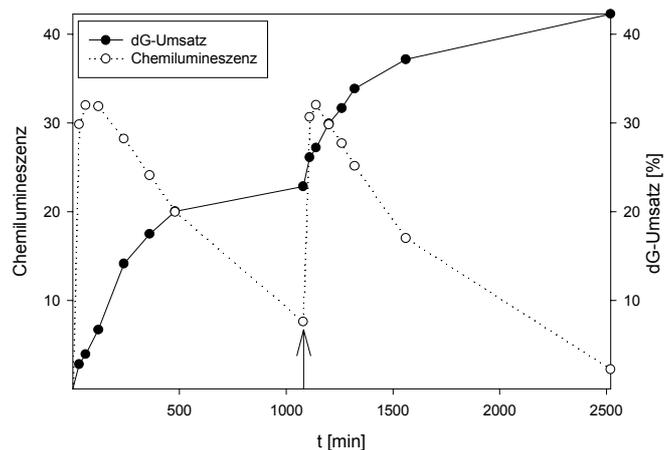


Abbildung 5.1: Zeitprofil des Umsatzes von dG (0.500 mM) gegen die Chemilumineszenz (Dioxetankonzentration) in einer 9:1 Mischung aus Phosphatpuffer (5.00 mM, pH 7.0) und Acetonitril; [$^t\text{BuO-TMD}$] = 20.0 mM, nach 1080 min (Pfeil) wurden erneut 20.0 mM zugegeben (V-A6).

5.1.3 Oxidation von dG

In Experimenten, in denen gleiche Mengen an dG und 8-oxodG mit $^t\text{BuO-TMD}$ oxidiert werden, stellte sich heraus, dass 8-oxodG deutlich rascher oxidiert wird als dG. Setzt man eine Mischung aus dG und 8-oxodG ein, so wird 8-oxodG zuerst oxidiert, dG wird erst umgesetzt, wenn nahezu kein 8-oxodG mehr vorhanden ist (V-A2).

Die Oxidation von dG durch $^t\text{BuO-TMD}$ wird durch den Zusatz von BHT (V-A3, V-A4, V-A5) sowie $^i\text{PrOH}$ (V-A6) vermindert. Um den dG-Umsatz auf die Hälfte zu reduzieren sind ca. drei Äquivalente BHT bzw. 30 Äquivalente $^i\text{PrOH}$ (im Vergleich zu dG) nötig.

In der dG-Oxidation durch Photolyse von 1-*tert*-Butoxy-2-propanon werden vom Anfang an die Hauptprodukte Spiroiminodihydantoin und guanidinfreisetzende Produkte (GRP) in ungefähr gleichen Mengen gebildet. Während beide zusammenaddiert nach 120 min Bestrahlung noch $5.52 \pm 0.29\%$ von $7.23 \pm 0.21\%$ dG-Umsatz ausmachen, sind es nach 480 min nur noch $23.9 \pm 0.3\%$ von $53.9 \pm 1.1\%$ (V-A7).

Für die durch $^t\text{BuO-TMD}$ induzierte dG-Oxidation konnte im Rahmen der Fehlergrenzen keinerlei D_2O -Effekt festgestellt werden. Auch die Mengen an Oxidationsprodukten zeigen

keinen signifikanten Unterschied wenn man den wässrigen Anteil der Reaktionsmischung gegen D₂O austauscht (V-A8).

5.1.4 Oxidation von Kalbsthymus-DNA

Isolierte CT-DNA (0.100 mg/mL, das entspricht 62.5 μM an Guanin) wurde bei 37 °C für 21 h mit dem alkoxyethylsubstituierten Dioxetan ^tBuO-TMD behandelt, um die Guanin Oxidationsprodukte zu bestimmen. Zum Vergleich wurden die Dioxetane TMD (setzt keine Radikale frei)^{137b} und HO-TMD (setzt kohlenstoffzentrierte Radikale frei)^{137b} eingesetzt (Abbildung 5.2). Für alle Dioxetane wurde die Bildung von 8-oxoGuanin

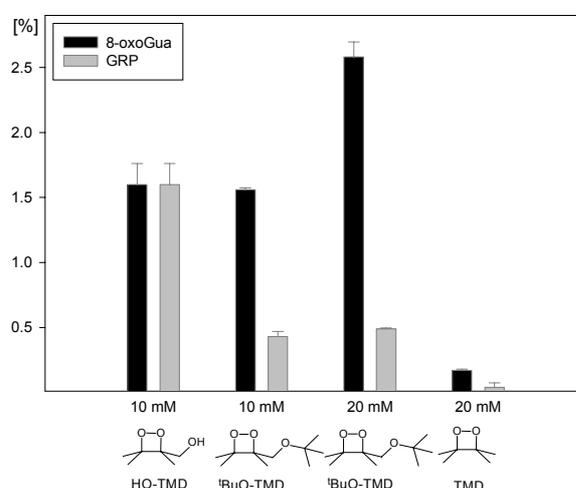


Abbildung 5.2: Oxidationsprodukte von CT-DNA (100 mg/mL) bei der durch Thermolyse von in einer 9:1 Mischung aus Phosphatpuffer (5.00 mM, pH 7.0) und Acetonitril bei 37 °C für 12 h (V-A9).

(8-oxoGua) und guanidinfreisetzender Produkte (GRP) bestimmt. Ein Vergleich der Ausbeuten an Oxidationsprodukten für HO-TMD (1.60 ± 0.16% 8-oxoGua, 1.60 ± 0.16% GRP)¹³⁷ versus ^tBuO-TMD (1.56 ± 0.01% 8-oxoGua, 0.43 ± 0.04% GRP) zeigt, dass beide Dioxetane (10.0 mM) ähnlich reaktiv gegenüber DNA waren, während TMD inaktiv war (20.0 mM: 0.17 ± 0.01% 8-oxoGua, 0.04 ± 0.03% GRP). Dies war wiederum nicht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass die Tripletquantenausbeuten in der Reihe TMD > HO-TMD > ^tBuO-TMD kleiner wurden (Tabelle 5.1). Mit steigender Konzentration an ^tBuO-TMD wurde mehr 8-oxoGua gebildet, so induzierten 20.0 mM ^tBuO-TMD 2.58 ± 0.12% 8-oxoGua und 10 mM 1.56 ± 0.01% 8-oxoGua (Abbildung 5.2).

Radikal-Abfangexperimente (Abbildung 5.3) zeigten, dass in Gegenwart von 2,6-Di-*tert*-

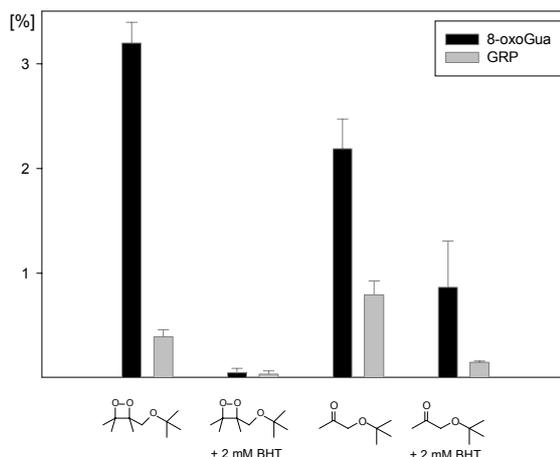


Abbildung 5.3: Einfluss des Radikalfängers BHT auf die Bildung von DNA-Oxidationsprodukten in der ^tBuO-TMD (20.0 mM)-induzierten Oxidation von *CT*-DNA (100 mg/mL) in einer 9:1 Mischung aus Phosphatpuffer (5.00 mM, pH 7.0) und Acetonitril bei 37 °C für 12 h (V-A10). Oxidation von *CT*-DNA (100 mg/mL) in Ab- und Anwesenheit des Radikalfängers BHT durch die Photolyse (300 nm) von 1-*tert*-Butoxy-2-propanon (20.0 mM) in einer 9:1 Mischung aus Phosphatpuffer (5.00 mM, pH 7.0) und Acetonitril bei 0 °C für 30 min (V-A11).

butyl-4-methylphenol (BHT, 2 mM) oder DMPO (2 mM, nicht dargestellt) ein Großteil der DNA-Oxidation verhindert wurde [8-oxoGua fällt von $3.20 \pm 0.20\%$ ($0.40 \pm 0.07\%$ GRP) auf $0.05 \pm 0.04\%$ ($0.04 \pm 0.03\%$ GRP) mit BHT und auf $0.36 \pm 0.02\%$ ($0.02 \pm 0.02\%$ GRP) mit DMPO]. Isopropanol (100 mM) verringert die Oxidationsprodukte auf $2.16 \pm 0.27\%$ für 8-oxoGua und $0.19 \pm 0.03\%$ für GRP.

Ähnliche Ergebnisse wurden in der Photolyse von 1-*tert*-Butyl-2-propanon in der Gegenwart von *CT*-DNA gemacht. Der Radikalfänger BHT inhibierte ähnlich effizient die Bildung von Oxidationsprodukten [8-oxoGua wurde von $2.19 \pm 0.28\%$ ($0.79 \pm 0.14\%$ GRP) auf $0.87 \pm 0.44\%$ ($0.15 \pm 0.01\%$ GRP) verringert]. Das Hauptoxidationsprodukt war 8-oxoGua, aber auch guanidinfreisetzende Produkte wurden gebildet.

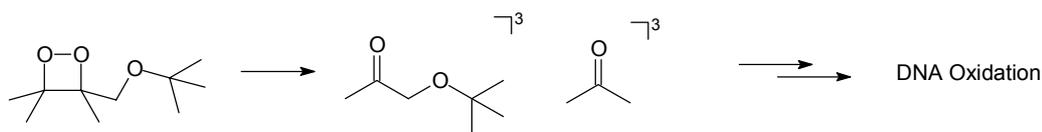
Die Bestrahlung von Aceton unter analogen Bedingungen stellte sich als ineffizient bezüglich der Bildung von DNA-Oxidationsprodukten heraus ($0.14 \pm 0.12\%$ 8-oxoGua und $0.01 \pm 0.02\%$ GRP).

Verwendet man in der durch ${}^t\text{BuO-TMD}$ induzierten Oxidation von CT-DNA anstelle des wässrigen Anteils des Lösungsmittels D_2O , so bleibt die Gesamtmenge der beobachteten Oxidationsprodukte gleich (V-A13). Im Fall der Photolyse von 1-*tert*-Butoxy-2-propanon beobachtet man in D_2O einen Rückgang der Oxidationsprodukte. Das Zeitprofil der DNA-Oxidation durch Photolyse von 1-*tert*-Butoxy-2-propan zeigt, dass die beobachteten DNA-Oxidationsprodukte (Spiroiminodihydantoin sowie GRP) sich linear mit der Bestrahlungszeit akkumulieren (V-A12).

5.2 Diskussion

5.2.1 Beteiligung angeregter Zustände an der dG-Oxidation

Das Zeitprofil in Abbildung 5.1 zeigt, dass der dG-Umsatz parallel zur Bildung triplettangeregter Carbonylspezies während der Dioxetanthermolyse verläuft. Die Chemilumineszenz des Dioxetans wird nicht durch dG inhibiert und die Zugabe von dG beschleunigt auch nicht die Dioxetanzersetzung. Daraus wird geschlossen, dass das Dioxetan nicht selbst am Oxidationsprozess beteiligt ist, sondern dass die bei der Thermolyse gebildeten angeregten Zustände für die beobachtete dG-Oxidation verantwortlich sind (Schema 5.1).



Schema 5.1: DNA-Oxidation durch bei der Thermolyse von ${}^t\text{BuO-TMD}$ gebildete reaktive Spezies

Die direkte Reaktion des Dioxetans mit dG sollte die Chemilumineszenzkurve schneller abklingen lassen und gleichzeitig die Chemilumineszenz quenchen, was beides nicht der Fall ist. Die Weiteroxidation von dG nach weiterer Zugabe von Dioxetan weist darauf hin, dass das Abklingen der dG-Oxidation auf eine Abnahme der Bildung angeregter Spezies zurückzuführen ist und nicht auf einer Inhibierung der dG-Oxidation durch Oxidationsprodukte oder Dioxetan- und Ketonzersetzungsprodukte beruht. Oxidation durch

Singulett-Sauerstoff kann ausgeschlossen werden, da der Austausch des wässrigen Anteils des Lösungsmittelgemisches gegen D₂O keinerlei Effekt auf die Oxidation zeigte. Außerdem ist die durch HO-TMD gebildete Menge an Singulett-Sauerstoff (ungefähr 0.1%)¹⁹⁰ zu niedrig, um den beobachteten Umsatz sowie die gebildete Menge an Spiroiminodihydantoin zu erklären.

5.2.2 Oxidation von DNA

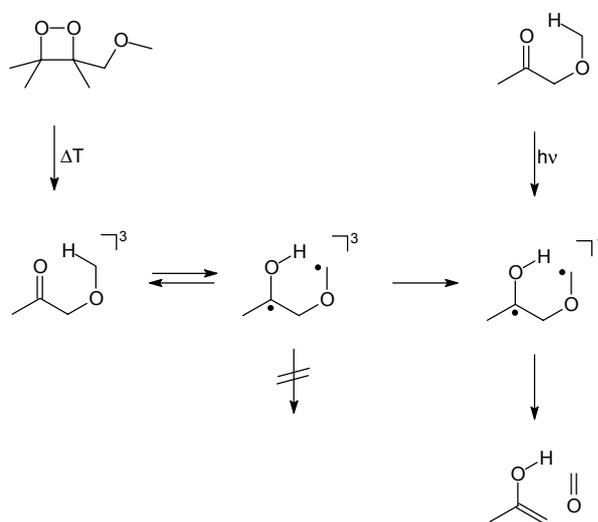
Ein Vergleich der Dioxetanthermolyse von ^tBuO-TMD mit der Photolyse von 1-*tert*-Butoxy-2-propanon zeigt ein ähnliches Schadensprofil, nämlich hauptsächlich 8-oxoGua und nur wenig GRP, wie erwartet, da in beiden Reaktionen dieselben Radikale gebildet werden. Zugabe eines Radikalfängers vermindert in beiden Fällen die Effizienz der Oxidation. Auch bei der Oxidation von DNA erwies sich das keine Radikale freisetzende TMD als ineffizient, während HO-TMD etwas effizienter als ^tBuO-TMD war, was auf eine teilweise Assoziation von 1-Hydroxy-2-propanon über Wasserstoffbrückenbindung an das DNA-Rückgrat schließen lässt. Die Tatsache, dass TMD ineffizient ist weist auf einen durch Radikale induzierten Mechanismus hin.

Im Gegensatz zu dG wird in der DNA-Oxidation als Hauptprodukt 8-oxoGua gebildet. Allgemein wird in DNA häufiger 8-oxoGua gefunden als in dG. Zum Beispiel ist in der durch Hydroxylradikale induzierten Oxidation von DNA 8-oxoGua ein wichtiges Oxidationsprodukt, aus dG wird es jedoch nur in Spuren gebildet.¹⁹¹ Dieser Reaktivitätstrend trifft auch für Einelektronenoxidantien zu. Das intermediär gebildete Radikalkation wird selektiv zu 8-oxoGua hydrolysiert.^{154,192} Da unter den angewandten Bedingungen 8-oxoGua in DNA akkumuliert, aber 8-oxodG rasch oxidiert wird, sind die hohen Mengen an 8-oxoGua in DNA auf den Schutz durch die DNA-Matrix zurückzuführen. Mechanistisch betrachtet kommt also Einelektronenoxidation von Gua in DNA durch Peroxylradikale oder ein direkter Angriff der Peroxylradikale an C-8 in Betracht. Da in Kapitel 6 basierend auf einem breiteren Datensatz ein analoger Mechanismus abgeleitet wurde, wird hier auf die Diskussion in Kapitel 6.3 verwiesen.

5.2.3 Sonderrolle von angeregtem 1-Methoxy-2-propanon

Die relative Reaktivität der eingesetzten Dioxetane hat gezeigt, dass nur diejenigen, die triplettangeregte oxymethylsubstituierte Ketone produzieren auch effektiv DNA oxidieren. Photolyseexperimente mit den entsprechenden Ketonen ergaben ein ähnliches Verhalten, mit 1-Methoxy-2-propanon als Ausnahme. Dies ist durch eine effiziente Norrish-Typ-II-Spaltung^{143a,193} zu erklären, die aus dem Singulettzustand abläuft. Alle anderen eingesetzten Ketone besitzen kein γ -Wasserstoffatom und können diese Art der Fragmentierung daher nicht eingehen. Der Norrish-Typ-II-Prozess für triplettangeregte Ketone wie im Fall der Dioxetanthermolyse ergibt ein Triplettbiradikal mit einer gegenüber dem Singulettbiradikal deutlich erhöhten Lebenszeit.

Allgemein tendieren triplettangeregte Zustände eher zur Norrish-Typ-I-Spaltung als singulettangeregte Zustände, während für singulettangeregte Zustände die Norrish-Typ-II-Spaltung an Bedeutung gewinnt.¹⁹⁴ Für triplettangeregte Zustände wurden für beide Prozesse ähnliche Geschwindigkeitskonstanten beschrieben.¹⁹⁵ Die unterschiedliche Reaktivität von Singulett- und Triplettzustand kann man dadurch erklären, dass das Triplettbiradikal um eine Norrish-Typ-II-Fragmentierung (Schema 5.2) einzugehen zuerst eine Spinumkehr



Schema 5.2: Norrish-Typ-II-Spaltung von 1-Methoxy-2-propanon

(Intersystem Crossing, ISC) bewirken muss. Da die Bildung des Triplettbiradikals aber reversibel ist (wurde in apolarem Medium gezeigt¹⁹⁶ und auch in polaren Medien diskutiert¹⁹⁴), wird wieder das triplettangeregte Keton generiert, das dann eine weitere Chance erhält, eine α -Spaltung einzugehen. Es ist also davon auszugehen, dass im Fall der Photolyse

von 1-Methoxy-2-propanon die Norrish-Typ-II-Spaltung schneller als die Spinumkehr stattfindet (in der Literatur wurde berichtet, dass das β -Sauerstoffatom zu einer Beschleunigung der Typ-II-Reaktion führt.)¹⁹⁷. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, dass keinerlei Radikale und keine dG Oxidation detektiert wurden. Nur das triplettangeregte 1-Methoxy-2-propanon aus der Thermolyse des Dioxetans MeO-TMD besitzt eine Lebenszeit, die lang genug ist, um α -Spaltung einzugehen.

5.3 *Schlussfolgerungen*

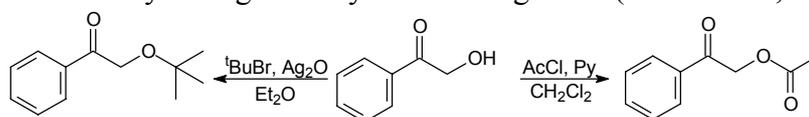
Die Fähigkeit der oxymethylsubstituierten Dioxetane, Guanin in DNA sowie dG zu oxidieren, steht im Zusammenhang mit ihrer Fähigkeit, Radikale zu generieren. Deshalb wurde die beobachtete DNA-Oxidation auf Radikale zurückgeführt. Die Bildung von Strangbrüchen hängt jedoch von der Art der gebildeten Radikale ab und kann nicht einfach mit der Menge an Radikalen korreliert werden. Es wird davon ausgegangen, dass sekundäre Radikalprodukte, die durch weitere Reaktionen der Peroxylradikale entstehen, dafür verantwortlich sind.

6 Oxidation von dG und DNA durch alkoxysubstituierte Acetophenone

6.1 Ergebnisse

6.1.1 Darstellung von 2-*tert*-Butoxyacetophenon (AP-O^tBu) und 2-Acetoxyacetophenon (AP-OAc)

AP-O^tBu und AP-OAc wurden ausgehend von AP-OH durch Alkylierung mit *tert*-Butylbromid bzw. Acylierung mit Acylchlorid dargestellt (Schema 6.1, V-9, V-10).



Schema 6.1: Synthese von AP-O^tBu und AP-OAc

6.1.2 UV-Spektren

Die UV-Spektren der Acetophenonderivate weisen sowohl in Acetonitril als auch in H₂O : Acetonitril (9:1) eine Schulter bei ca. 280 nm auf, in deren langwelligem Teil mit den verwendeten 300-nm-Lampen eingestrahlt wurde. Benzophenon absorbiert im langwelligeren Bereich (Maximum bei 265 nm, Schulter bei 320 nm, V-B1 bis V-B3).

6.1.3 Laserflash-Photolyse Studien

Um die Geschwindigkeitskonstanten für den Quenchprozess der angeregten Ketone durch dG und 8-oxodG zu bestimmen, wurden zuerst die Absorptionsspektren der Transienten, die direkt nach Anregung gebildet werden (ca. 20 ns nach dem Laserblitz, 308 nm, Lambda Physik EMG 101 MSC XeCl Excimer Laser) in sorgfältig entgaster (dreimal „freeze-pump-thaw“) wässriger Lösung mit 10% Acetonitril als Kosolvens gemessen (V-B4).

Alle Transienten der Ketone besitzen Absorptionsmaxima um 340-345 nm, außer AP-OMe, welches ein Absorptionsmaximum bei 355 nm mit einer zweiten Bande bei 480 nm aufweist. Die Tatsache, dass Intersystem-Crossing in aromatischen Ketonen in der Größenordnung von Picosekunden stattfindet¹⁹⁸ und die Ähnlichkeit mit literaturbekannten Triplett-

6 ERGEBNISSE

absorptionsspektren von Acetophenon in wässriger Lösung ($\lambda_{\max} \approx 340 \text{ nm}$)¹⁹⁹ lassen darauf schließen, dass es sich bei den beobachteten Transienten der Acetophenonderivate außer AP-OMe um die Absorption des Triplettzustandes handelt. Deshalb wurde eine Wellenlänge von 340 nm für die Detektion der Triplettzustandsabklingkurven gewählt. Für Benzophenon wurde anstelle des Absorptionsmaximums des Triplettzustandes ($\lambda = 525 \text{ nm}$) bei 600 nm detektiert, da bei 600 nm eine geringere Überlagerung mit der Absorption der entsprechenden Ketylradikale vorliegt,²⁰⁰ welche bereits bei der Photolyse einer 1.00 mM BP-Lösung in geringen Mengen gebildet wurden. Das Abklingen aller anderen Tripletttransienten wurde mit 1.00 mM Ketonlösungen in Wasser : Acetonitril (9:1) gemessen und bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert. Die Triplettabklingzeiten (τ_T) wurden aus den Abklingkurven durch fitten an eine monoexponentielle Funktion errechnet (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Lebenszeiten τ_T und Deaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten k_q der bei der Ketonphotolyse (AP-R) gebildeten Triplettzustände für verschiedene Quencher (V-B5 bis V-B10)

AP-R	τ_T [μs] ^{a),b)}	k_q [$10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]			
		Keton ^{c)}	O ₂ ^{b),d)}	dG	8-oxodG
	6.6	0.12 ± 0.01	3.2 (4.0 ^{e)})	3.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1
	1.1	- ^{f)}	4.0	3.3 ± 0.2	1.9 ± 0.2
	- ^{g)}	-	-	-	-
	0.54	- ^{f)}	1.9	3.9 ± 0.3	3.4 ± 0.2
	6.7	0.12 ± 0.02	2.4	3.3 ± 0.2	2.0 ± 0.2
	9.2	0.30 ± 0.01 ^{h)}	4.8	2.9 ± 0.1	1.9 ± 0.2

a) [AP-R] = 1.00 mM; b) Einzelmessung, Fehler ± 10%; c) Selbstlöschung durch AP-R; d) [O₂] = 0.265 mM unter Laboratmosphärenbedingungen; e) gemessen in H₂O; f) Selbstlöschung vernachlässigbar; g) beim detektierten Transienten handelt es sich nicht um den Triplettzustand; h) für [BP] > 200 μM wurde ein Rückgang der Selbstlöschkonstante beobachtet.

Die Löschung der Tripletttransienten durch das Keton im Grundzustand (Selbstlöschung), durch molekularen Sauerstoff, dG und 8-oxodG wurde untersucht, die letzten beiden durch Variation der Quencherkonzentration. Aus diesen Daten wurden wiederum für jedes einzelne Experiment die Abklinggeschwindigkeit bestimmt, hierzu wurde für das

Triplettabklingverhalten pseudo-erster Ordnung eine monoexponentielle Fitfunktion verwendet. In den Quenchversuchen wurden Ketylradikale gebildet, die als langlebige Transienten in Erscheinung traten und nach einem Prozess zweiter Ordnung abklingen.²⁰¹ Deshalb wurde zusätzlich zur monoexponentiellen Fitfunktion ein Prozess zweiter Ordnung zur Fitfunktion hinzugefügt, um der Bildung von Ketylradikalen Rechnung zu tragen. Für die Berechnung der Lebenszeiten und der Geschwindigkeitskonstanten wurde nur der monoexponentielle Anteil berücksichtigt (Tabelle 6.1). Die Triplettlebenszeiten von AP, AP-OAc und BP betragen zwischen 6 und 10 μs , während für AP-OH und AP-O^tBu Lebenszeiten um 1 μs erhalten wurden.

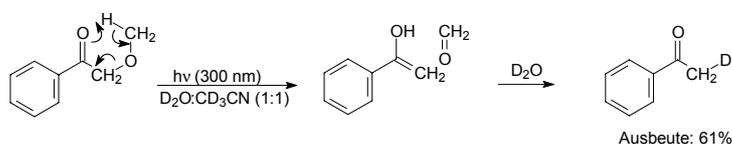
Im Fall von AP und AP-OAc wurden Selbstlöschkonstanten k_q zwischen $1 \cdot 10^8$ und $2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten (V-B8), für BP ergab sich ein Wert von $3.0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Quenchkonstanten k_q für die Desaktivierung des Triplettzustands durch Sauerstoff betragen zwischen $2 \cdot 10^9$ und $4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (V-B9). Die Ergebnisse nach Zugabe von dG zeigen für alle Triplettzustände eine schnelle Desaktivierung im Bereich von $3 \cdot 10^9$ bis $4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Löschung durch 8-oxodG ist ungefähr um einen Faktor 1.5 langsamer.

6.1.4 Bei der Photolyse von 2-Methoxyacetophenon (AP-OMe) beobachteter Transient

Für AP-OMe wurden nicht nur unterschiedliche Absorptionsspektren erhalten (V-B4), sondern auch niedrigere Quenchkonstanten k_q (V-B10) mit O_2 ($k_{\text{O}_2} = 4.0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und dG ($k_{\text{dG}} = 1.5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Mit einer Lösung von 1.00 M AP-OMe in Acetonitril (Lebenszeit des Transienten 10.0 μs) konnte kein Triplettenergietransfer zu 1-Methylnaphthalin (10.0 μM) beobachtet werden.

6.1.5 Norrish-Typ-II-Spaltung von AP-OMe

Um zu untersuchen, ob das methoxy-substituierte Acetophenon Norrish-Typ-II-Spaltung in wässriger Lösung eingeht (Schema 6.2), wurde AP-OMe in einer 1:1 Mischung



Schema 6.2: Norrish-Typ-II-Spaltung in der Photolyse von AP-OMe.

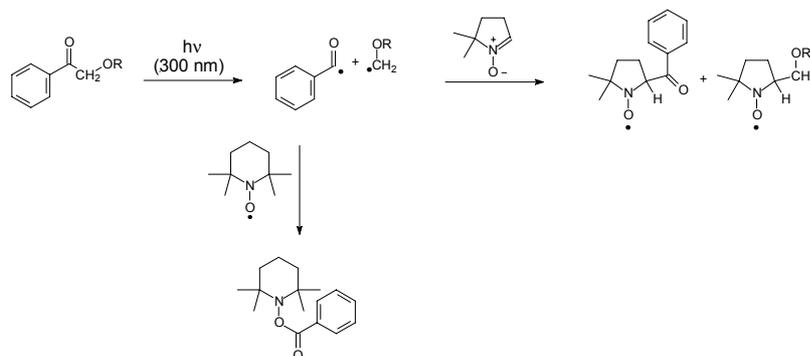
aus D₂O und CD₃CN photolysiert. In der Tat wurde mittels ¹H-NMR-Analytik des Photolysats, deuteriertes Acetophenon als Zersetzungsprodukt in einer Ausbeute von 61% detektiert. Formaldehydhydrat wurde in nur 1% Ausbeute gefunden (V-B11).

6.1.6 Kinetik der Photolyse

Vergleicht man die im NMR-Experiment (V-B12) erhaltenen Ketonumsätze, so ergibt sich für die oxymethylsubstituierten Acetophenonderivate folgende Reaktivitätsreihenfolge: AP-OMe ≈ AP-O^tBu > AP-OH > AP-OAc für die Geschwindigkeit des Ketonumsatzes in der Abwesenheit von Substrat. Die Reihenfolge AP-O^tBu > AP-OH wurde in einem HPLC-Experiment (niedrigere AP-R-Konzentrationen im gleichen Bereich wie für die dG-Oxidationsexperimente, V-B12) bestätigt. Zusätzlich zeigte sich, dass eine Verringerung der Ketonkonzentration (von 5.00 auf 0.1 mM) zu einem schnelleren Ketonumsatz führt.

6.1.7 EPR-Studien

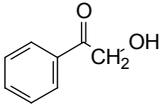
Um die Radikale in der Photolyse der α-alkoxymethyl-substituierten Acetophenonderivate auch spektroskopisch nachzuweisen, wurden Experimente in Gegenwart von DMPO durchgeführt (10% Acetonitril als Kosolvens, Schema 6.3). Nach Photolyse der



Schema 6.3: Nachweis der in der α-Spaltung von AP-OR gebildeten Radikale durch Abfang mit 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin *N*-oxid (DMPO) sowie 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-on (TEMPO).

Ketone AP-OH (V-B13) und AP-O^tBu (V-B14) und Aufnahme des EPR-Spektrums konnten charakteristische Dublett von Triplett-Signale (Tabelle 6.2) für die DMPO-Addukte des Benzoylradikals ($g = 2.0056$, $\alpha_N = 15.3$ G, $\alpha_H = 17.9$ G), des Hydroxymethylradikals

Tabelle 6.2: EPR-Daten der DMPO-Addukte aus der AP-OH and AP-O^tBu^{a)} Photolyse

Substrat	DMPO-addukt	α_N [G]	α_H [G]	g Faktor
	•COPh ^{b)}	15.3 (15.3)	17.9 (18.7)	2.0056 (2.0055)
	•CH ₂ OH ^{c)}	16.0 (15.7)	22.6 (22.7)	2.0055 (2.0056)
	•COPh ^{b)}	15.3 (15.3)	17.9 (18.7)	2.0055 (2.0055)
	•CH ₂ O ^t Bu ^{c)}	16.0 (16.1)	21.1 (21.6)	2.0055 (2.0052)

a) 2.00 mM Keton wurden in einer H₂O : Acetonitril Mischung (9:1) für 30 min bei 20 °C in einem Rayonet Photoreaktor [16 300-nm Lampen (24 W)] bestrahlt, [DMPO] = 50.0 mM; b) in Klammern sind die Werte für ein analoges Acylradikal-addukt in H₂O : Acetonitril (9:1) angegeben, siehe Ref 138b; c) in Klammern sind die Literaturdaten angegeben, siehe Ref 138b.

($g = 2.0055$, $\alpha_N = 16.0$, $\alpha_H = 22.6$ G) sowie des *tert*-Butoxymethylradikals ($g = 2.0055$, $\alpha_N = 16.0$ G, $\alpha_H = 21.1$ G) beobachtet werden. Es soll auch erwähnt werden, dass die DMPO-Addukt-sigale bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) mit einer Halbwertszeit von kleiner 30 min verschwinden, speziell das *tert*-Butoxymethyl-Addukt ist labil ($\tau \approx 5$ min). Für AP, AP-OMe, AP-OAc und BP, wie auch bei der Bestrahlung von DMPO alleine, wurden unter denselben Bedingungen keine Signale beobachtet.

6.1.8 Detektion von Benzoylradikalen mit TEMPO

Die Bildung von Benzoylradikalen in der Photolyse von AP-OH und AP-O^tBu wurde durch Abfang mit 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) bestätigt. In beiden Fällen wurde in der Gegenwart von TEMPO das TEMPO-Benzoylradikaladdukt (Synthese der Referenzsubstanz siehe V-16 bis V-18) durch HPLC/UV detektiert (V-B15). Zu Beginn der Photolyse bildet AP-O^tBu mehr Benzoylradikale als AP-OH, nach längeren Bestrahlungszeiten klingt die Bildung von Benzoylradikalen jedoch ab, so dass nach längeren Bestrahlungszeiten AP-OH mehr Benzoylradikale bildet. Die langen Bestrahlungszeiten in diesem Experiment sind darauf zurückzuführen, dass TEMPO in recht hohen Konzentrationen eingesetzt wurde und in seiner Eigenschaft als Triplettquencher die Lebenszeiten der Triplettzustände drastisch verkürzt.

6.1.9 Die Photoreaktivität der Ketone AP und AP-OAc induziert durch die Nukleoside dG und 8-oxodG.

Nachdem in NMR-Versuchen für AP, AP-OAc und BP durch Zugabe von $^1\text{PrOH}$ während der Bestrahlung ein Ketonumsatz sowie die Bildung von Aceton induziert werden konnte (V-B16), wurden die Ketone AP und AP-OAc in Gegenwart und Abwesenheit von dG und 8-oxodG bestrahlt und anschließend der Ketonumsatz per NMR (V-B17) und HPLC/UV (V-B18) quantifiziert. In Abwesenheit von dG und 8-oxodG, wurden weder AP noch AP-OAc in signifikanten Mengen umgesetzt. Nach Zugabe von dG oder 8-oxodG hingegen, betrug der Ketonumsatz nach Bestrahlung 30-60% (V-B18, Abbildung 6.1). Für beide Ketone

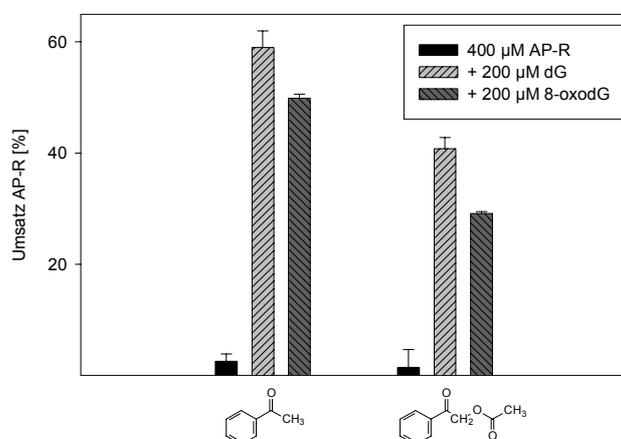


Abbildung 6.1: Erhöhung des AP-R-Umsatzes durch Zugabe von dG oder 8-oxodG bei der Ketonphotolyse [bestrahlt bei 300 nm für 45 min bei 0 °C in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1)].

war die durch dG bewirkte Photoreaktivität höher als die für 8-oxodG. Ein analoger Effekt wurde auch in NMR-Versuchen mit AP-OAc und BP festgestellt. Nach Zugabe von 30 mM dG zu einer Lösung von 30 mM Keton in $\text{D}_2\text{O} : \text{CD}_3\text{CN}$ (1:1) stieg der Umsatz an Keton deutlich an (V-B19). Auch Zugabe von 200 mM $^1\text{PrOH}$ zu 100 mM AP, AP-OAc und BP in $\text{D}_2\text{O} : \text{CD}_3\text{CN}$ (1:1) verursachte einen deutlichen Anstieg des Ketonumsatzes (V-B18).

6.1.10 Die Abhängigkeit der Nukleosid-Photooxidation von der Nukleosid-Konzentration.

Misst man den dG-Umsatz bei der Ketonphotolyse bei verschiedenen dG-Konzentrationen (V-B19), aber identischen Keton : dG-Verhältnissen unter denselben Bestrahlungs-

bedingungen, so weisen die fünf Ketone unterschiedliches Verhalten gegenüber dG auf, wie aus den Auftragungen des dG-Umsatzes gegen [dG] in Abbildung 6.2 hervorgeht.

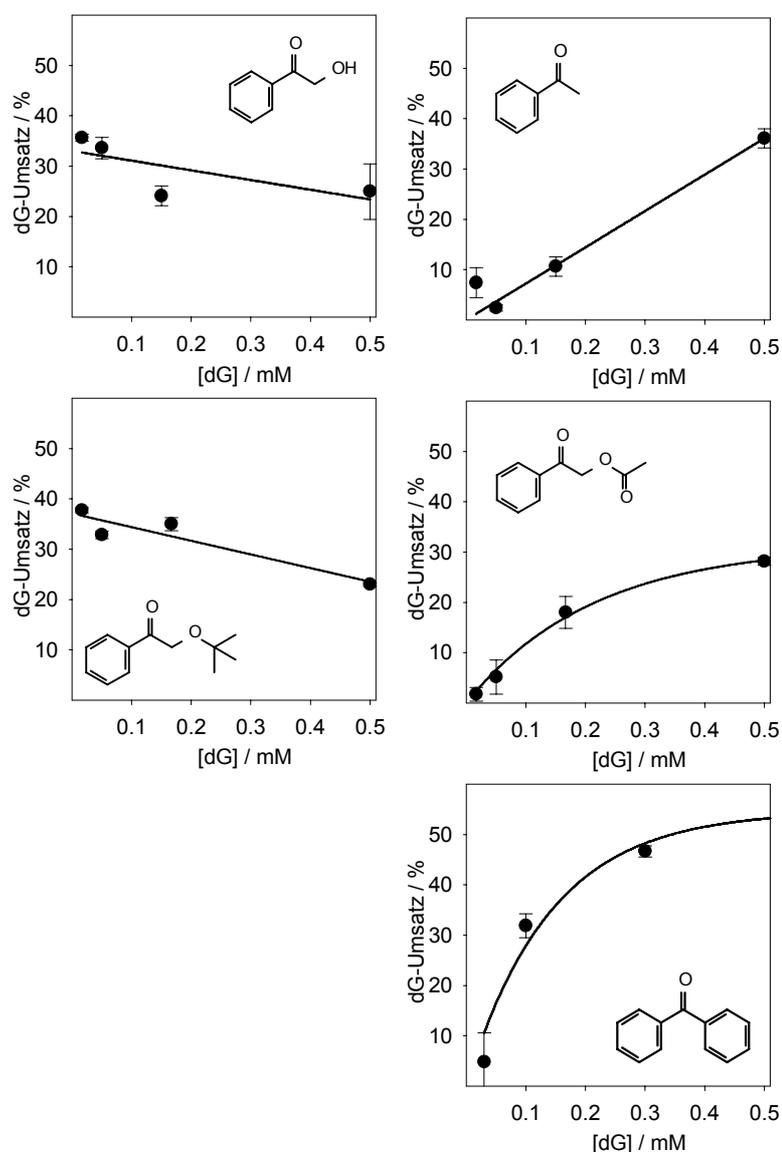


Abbildung 6.2: Abhängigkeit des dG-Umsatzes von der dG-Konzentration im Fall der Ketonphotolyse [2.00 Äquiv. Keton, 10.0 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) in H₂O : Acetonitril (9:1), bestrahlt bei 300 nm für 45 min].

Diese Ketone lassen sich in zwei unterschiedliche Gruppen bezüglich ihrer Photoreaktivität ordnen: AP-OH und AP-O^tBu (links) oxidieren dG auch bei niedrigen (0.1 mM) dG-Konzentrationen; das Ausmaß der dG-Oxidation bleibt nahezu über den gesamten Konzentrationsbereich konstant, bei niedrigeren Konzentrationen an dG ist sogar ein leichter Anstieg des dG-Umsatzes zu beobachten (negative Steigung). In diesem Zusammenhang erhält man für die Bildung des Oxidationsproduktes 8-oxodG eine analoge

Konzentrationsabhängigkeit (V-B20, Abbildung 6.3), das heißt, man beobachtet über den

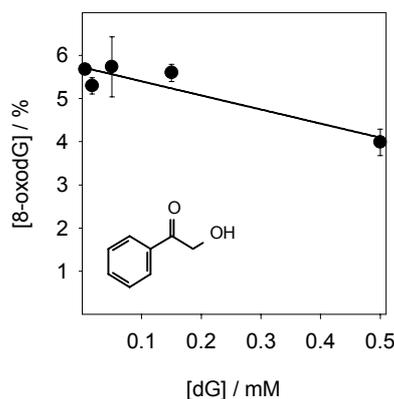


Abbildung 6.3: Abhängigkeit der Bildung von 8-oxodG von der dG-Konzentration in der AP-OH-Photolyse [2.00 Äquiv. Keton, 10.0 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) in H₂O : Acetonitril (9:1), bestrahlt bei 300 nm für 45 min].

gesamten Konzentrationsbereich eine konstante photochemische Aktivität, bei niedrigen dG-Konzentrationen (0.1 mM) wird etwas mehr 8-oxodG gebildet als bei hohen Konzentrationen (0.5 mM). Dagegen ist dG unreaktiv gegenüber den Ketonen AP, AP-OAc und BP (rechts) bei niedrigen dG-Konzentrationen, aber wird bei zunehmender dG-Konzentration mit steigender Effizienz oxidiert.

Ähnliche Konzentrationsprofile wurden für die Oxidation von 8-oxodG (V-B21, Abbildung 6.4) erhalten. AP-OH und AP-O^tBu (links) oxidieren 8-oxodG bereits bei niedrigen 8-oxodG-Konzentrationen und der 8-oxodG-Umsatz bleibt über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich konstant. Im Gegensatz dazu waren AP, AP-OAc and BP (rechts) nur bei hohen 8-oxodG-Konzentrationen aktiv, die Aktivität stieg mit der 8-oxodG-Konzentration.

6.1.11 Photooxidationsprodukte von dG

Um die Bildung von Oxidationsprodukten zu untersuchen wurde dG (0.200 mM) in der Gegenwart von Ketonen (2 Äquiv., 0.400 mM) für 45 min bestrahlt (V-B22). Detektiert wurden der dG-Umsatz sowie die Bildung der Oxidationsprodukte Spiroiminodihydantoin (das in der Vergangenheit als 4-HO-8-oxodG missinterpretiert wurde²⁰²), GRP und 8-oxodG (Abbildung 6.5) mittels etablierter HPLC-Methoden.^{47b,48,179b} In der dG-Bestrahlung in

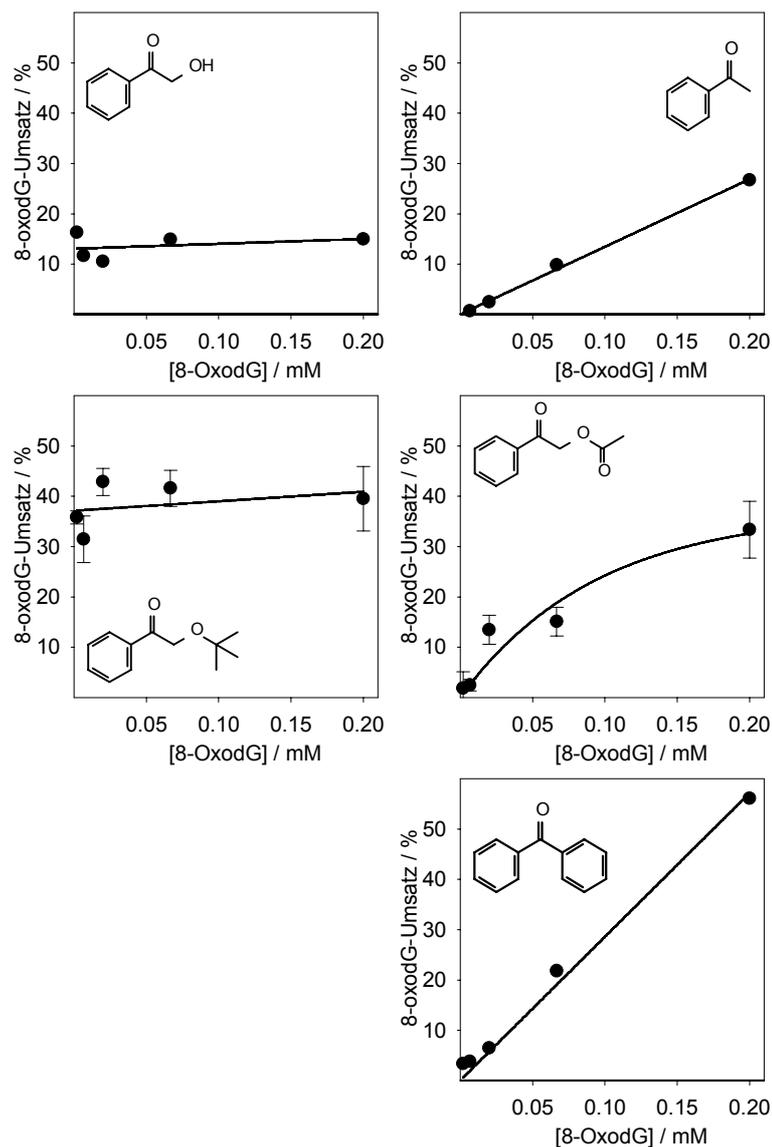


Abbildung 6.4: Abhängigkeit des 8-oxodG-Umsatzes von der 8-oxodG-Konzentration bei der Ketonphotolyse [2.00 Äquiv. Keton, 10.0 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) in H₂O : Acetonitril (9:1), bestrahlt bei 300 nm für 45 min].

Abwesenheit von Keton (Blindprobe) konnten bei Umsatz im Fehlerbereich nur Spuren der angegebenen Oxidationsprodukte nachgewiesen werden, wohingegen nach Zugabe der Ketone AP, AP-OH, AP-OAc and BP ein deutlicher dG-Umsatz beobachtet wurde. Für das Methoxyderivat AP-OMe wurde nur geringer dG-Umsatz festgestellt. Die Hauptoxidationsprodukte waren Spiroiminodihydantoin und GRP, wohingegen signifikante Mengen an 8-oxodG nur im Fall von AP-OH detektiert wurden. Ein Vergleich der Gesamtmenge an Oxidationsprodukten mit dem dG-Umsatz zeigt, dass für die Derivate

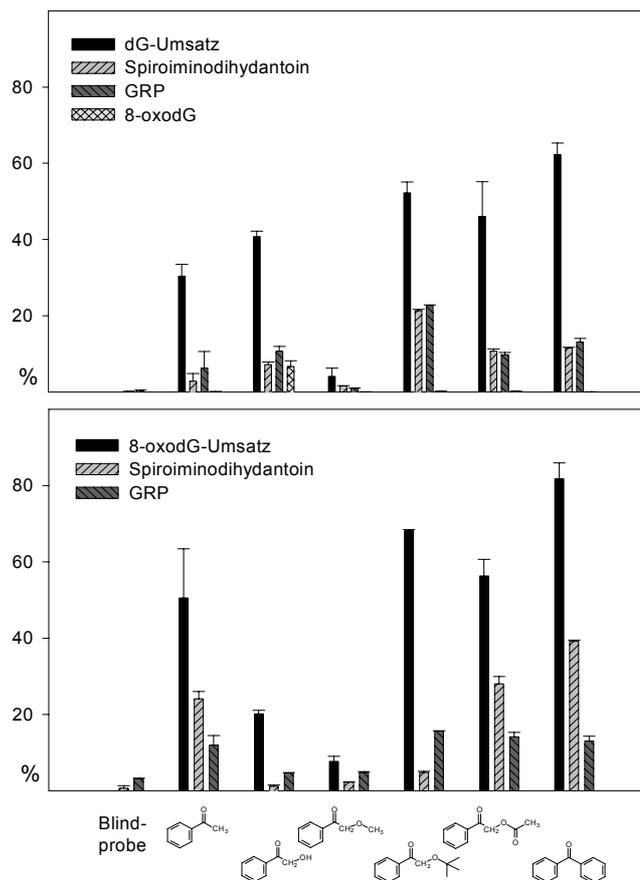


Abbildung 6.5: Umsatz von dG und 8-oxodG und Bildung von Oxidationsprodukten während der Photooxidation [400 μM Keton, 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) in H_2O : Acetonitril (9:1), 45 min $h\nu$, 300 nm, 0 $^\circ\text{C}$] von dG (200 μM , oben) und 8-oxodG (200 μM , unten).

AP-OH und AP-O^tBu ca. 70-80% des umgesetzten dGs in den Oxidationsprodukten wiedergefunden wurden. Dagegen summieren sich die Oxidationsprodukte für AP, AP-OAc und BP nur auf ungefähr 30% des beobachteten dG-Umsatzes.

6.1.12 Zeitprofil der dG-Photooxidation durch AP-OH

Die Zeitabhängigkeit des dG-Umsatzes (V-B23) und der Bildung der Oxidationsprodukte während der Photooxidation von dG durch das Keton AP-OH ist in Abbildung 6.6 dargestellt. Vergleicht man die Bildung von 8-oxodG (weiße Kreise) mit dem dG-Umsatz (schwarze Kreise), so sind diese proportional zueinander, wie auch das konstante 8-oxodG : dG-Verhältnis zeigt (schwarze Dreiecke). Nach einer Stunde Bestrahlungsdauer klingen die Kurven für den dG-Umsatz (schwarze Kreise) wie die Bildung von 8-oxodG (weiße Kreise)

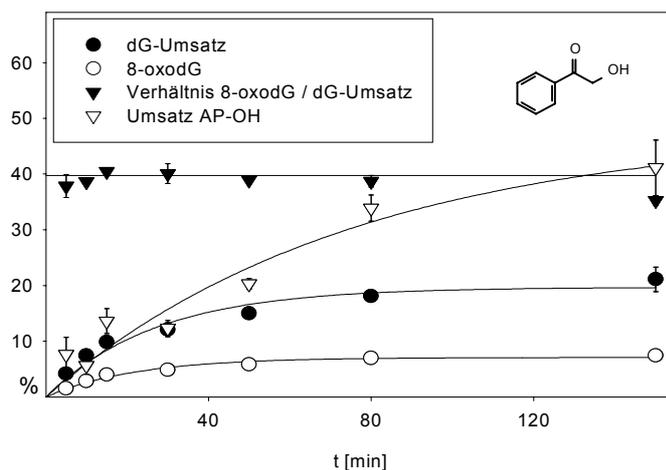


Abbildung 6.6: Zeitprofil der photoinduzierten (300 nm, 0 °C) Oxidation von dG (500 μ M) durch das Keton AP-OH (1.00 mM) in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1).

ab, während AP-OH (weiße Dreiecke) weiter umgesetzt wird. Obwohl das Keton AP-OH weiter umgesetzt wird, ist der dG-Umsatz bei ungefähr 20% abgeschlossen. Vergleicht man die Bildung von 8-oxodG in dieser Reaktion mit einer Vergleichsreaktion, der zu Beginn 25 μ M 8-oxodG zugesetzt wurden, so beobachtet man für beide Reaktionen einen parallelen Anstieg der 8-oxodG-Konzentration.

6.1.13 Photooxidationsprodukte von 8-oxodG

In der Bestrahlung von 8-oxodG (V-B24, V-B25) in Abwesenheit von Keton (Blindprobe) wurden ebenfalls nur Spuren an Oxidationsprodukten detektiert, der Umsatz blieb im Fehlerbereich gleich (Abbildung 6.5), nach Zugabe der Ketone wurde 8-oxodG-Umsatz gebildet. Wiederum wurde für das Methoxyderivat AP-OMe nur ein geringer 8-oxodG-Umsatz detektiert. Durch die Ketone AP, AP-OAc und BP wurde mehr Spiroiminodihydantoin als GRP gebildet, mit AP-OH und AP-O^tBu wurde mehr GRP als Spiroiminodihydantoin gebildet. Ein Vergleich der Mengen an gebildeten Oxidationsprodukten mit dem Ausmaß des 8-oxodG-Umsatzes zeigt, dass für die Ketone AP, AP-OAc und BP ca. 70% des umgesetzten 8-oxodGs wiedergefunden wird. Im Fall der Derivate AP-OH und AP-O^tBu wurden nur ungefähr 30% des umgesetzten 8-oxodGs als Spiroiminodihydantoin und GRP wiedergefunden. Vergleicht man die Effizienz der 8-oxodG-Photooxidation gegen die von dG (% Umsatz von 8-oxodG und dG in Abbildung 6.5), so ergibt sich, dass die Ketone AP, AP-O^tBu, AP-OAc and BP etwas (10-20%) reaktiver gegenüber 8-oxodG sind, wohingegen AP-OH ungefähr zweimal unreaktiver ist.

6.1.14 Der Effekt von dG auf die Photooxidation von 8-oxodG in der Ketonphotolyse

Die Persistenz von 8-oxodG während der Photooxidation von dG in der Ketonphotolyse (V-B26) wurde bestimmt, indem ein Zeitprofil des 8-oxodG-Umsatzes in der Gegenwart von dG (weiße Kreise) und in Abwesenheit von dG (schwarze Kreise) aufgenommen wurde (Abbildung 6.7).

Im Fall der Ketone AP-OH und AP-O^tBu (links) wurde in Abwesenheit von dG (schwarze Kreise) 8-oxodG photooxidiert, jedoch durch AP-OH (oben links) deutlich weniger effizient als durch AP-O^tBu (mitte links). In Gegenwart von dG (weiße Kreise) wurde für das Keton AP-OH (oben links) mit der Zeit anstelle eines Umsatzes ein Anstieg der 8-oxodG-Konzentration beobachtet (Vergleiche V-B27). Der Anstieg (weiße Kreise) verläuft parallel zur Bildung von 8-oxodG in der Photooxidation von dG (schwarze Dreiecke). In Gegenwart von dG (weiße Kreise) ist für das Keton AP-O^tBu (unten links) die Photooxidation von 8-oxodG ungefähr um einen Faktor zwei weniger effizient als in Abwesenheit von dG (schwarze Kreise). Für AP, AP-OAc und BP (rechts) wurde in Abwesenheit von dG (schwarze Kreise) eine langsame Photooxidation von 8-oxodG beobachtet, die in Gegenwart von dG (weiße Kreise) für alle drei Ketone drastisch beschleunigt wurde.

6.1.15 Einfluss von molekularem Sauerstoff auf die Oxidation von dG

Vergleicht man die dG-Oxidation durch die Ketone unter Laboratmosphäre mit einer analogen Reaktionslösung, die vor der Bestrahlung entgast wurde, so trat bei AP, AP-OH, AP-O^tBu und BP keinerlei dG-Oxidation ein. Für AP-OAc hingegen wurde keinerlei Rückgang beobachtet (V-B28). Verwendet man für AP-OAc jedoch geringere dG-Konzentrationen (50 μ M), so beobachtet man in Abwesenheit von Sauerstoff sogar einen Anstieg des dG-Umsatzes ($46 \pm 9\%$ vs. $19 \pm 3\%$, V-B29).

Die Kinetik der Oxidation von dG während der Photolyse von AP-OAc in Abwesenheit von Sauerstoff zeigt, dass in den ersten Minuten sowohl dG-Umsatz, AP-OAc-Umsatz als auch AP-Bildung linear ansteigen, während später der dG-Umsatz abklingt, AP-OAc aber noch weiter umgesetzt wird und auch AP gebildet wird (V-B30).

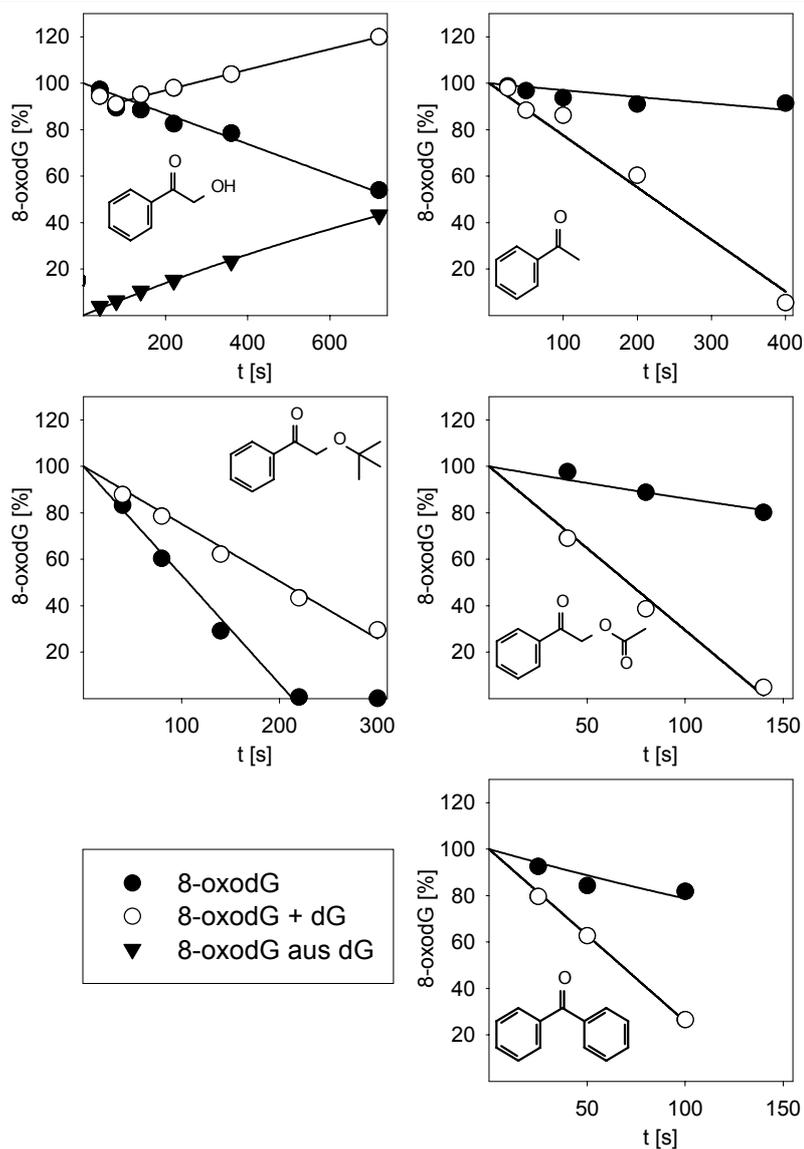


Abbildung 6.7: Zeitprofil für die Photooxidation von 8-oxodG während der Ketonphotolyse [25 μM 8-oxodG, 1.00 mM Keton, 300 nm, 0 $^{\circ}\text{C}$, 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1)] mit und ohne dG (500 μM); die Anfangskonzentration an 8-oxodG (25 μM) wurde auf 100% gesetzt.

Einsatz eines Sauerstoffüberschusses während der dG-Photooxidation verringert die Photooxidation durch AP-OAc (gemessen am dG-Umsatz), hat aber keinen Einfluss auf die Photooxidation durch AP-OH sowie AP-O^tBu (V-B24). Ein analoges Experiment mit AP, AP-OAc und BP zeigt, dass der Quencheffekt für alle drei Ketone zutrifft (V-B31).

Betrachtet man den Ketonumsatz, so findet man bei AP, AP-OMe und AP-O^tBu keinen signifikanten Einfluss eines Überschusses an Sauerstoff. AP-OAc wird in Gegenwart eines

Sauerstoffüberschusses langsamer umgesetzt (33 ± 2 vs. $50 \pm 2\%$ Umsatz). Auch bei AP-OH ist ein Rückgang zu beobachten ($8 \pm 1\%$ vs. $14 \pm 1\%$), der aufgrund des geringen Umsatzes jedoch als im Fehlerbereich liegend (Differenz $<5\%$) zu betrachten ist (V-B32).

6.1.16 D₂O-Effekt

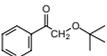
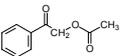
Austausch des wässrigen Anteils des Reaktionsmediums gegen D₂O zeigt keinerlei Einfluss auf den dG-Umsatz in der durch AP und BP induzierten Photooxidation von dG. Im Fall von AP-OAc ist in D₂O ein Rückgang des dG-Umsatzes auf ca. 60% des Wertes in H₂O zu beobachten, also ein inverser D₂O-Effekt (V-B33).

6.2 Ergebnisse der Oxidation von CT-DNA

6.2.1 Laserblitz-Photolyse

Die Daten bezüglich des Quenchverhaltens von CT-DNA auf die angeregten Tripletzustände der Ketone wurde durch zeitaufgelöste Transientenspektroskopie (Anregung bei 308 nm mit einem Lambda Physik EMG 101 MSC XeCl Excimer Laser) gemessen. Wie bereits zuvor (Tabelle 5.1) beschrieben, wurden die Tripletzustände von Acetophenon (AP) und seinen Derivaten AP-R bei 340 nm detektiert. Der Tripletzustand von Benzophenon (BP) wurde bei 600 nm detektiert, da bei dessen Absorptionsmaximum (525 nm)²⁰³ eine starke Überlagerung mit der Absorption der entsprechenden Ketylradikale stattfindet. Das Benzophenonketylradikal wurde als schwacher, langlebiger Transient beobachtet, dessen Intensität mit steigender DNA-Konzentration ansteigt. Für die Bestimmung der Löschkonstanten der Tripletketone mit DNA wurde die Abklingkurve des Transienten bei verschiedenen Konzentrationen an DNA bestimmt. Für jeden Messpunkt wurde die Desaktivierungsgeschwindigkeit mit Hilfe eines monoexponentiellen Modells berechnet. Um das Abklingen der ebenfalls gebildeten Ketylradikale zu berücksichtigen, wurde zusätzlich zur Exponentialfunktion erster Ordnung eine Kinetik zweiter Ordnung hinzugefügt. Die Geschwindigkeitskonstanten der monoexponentiellen Fits wurden gegen die DNA-Konzentration aufgetragen, daraus wurde gemäß der *Stern-Volmer*-Gleichung aus der Steigung die Löschkonstante für DNA erhalten (Tabelle 6.3). Für AP und AP-OAc wurden Werte von $0.89 \cdot 10^9$ und $0.77 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten, für AP-OH und BP betragen die Löschkonstanten ungefähr $4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (V-B34).

Tabelle 6.3: Löschkonstanten von *CT*-DNA für die bei der Ketonbestrahlung gebildeten Tripletzustände (V-B34)

	$k_q [10^9 M^{-1}s^{-1}]$
	<i>CT</i> -DNA ^{a)}
	0.89 ± 0.07
	0.41 ± 0.02
	$1.1 \pm 0.2^b)$
	0.77 ± 0.01
	0.41 ± 0.07

a) Die Geschwindigkeitskonstanten sind auf Guanin bezogen;

b) Einzelmessung, geschätzter Fehler $\pm 20\%$ wegen der kurzen und daher weniger genau zu messenden Triplettlebensdauer.

6.2.2 DNA-Basenoxidaionsprodukte

Die Guaninoxidationsprodukte 8-oxoGua und guanidinfreisetzende Produkte (GRP) in der durch angeregte Ketone vermittelten Photooxidation von *CT*-DNA wurden mit Standard-HPLC-Methoden analysiert (Abbildung 6.8, V-B35).¹³⁶ Die Ketone AP, AP-OMe, AP-OAc

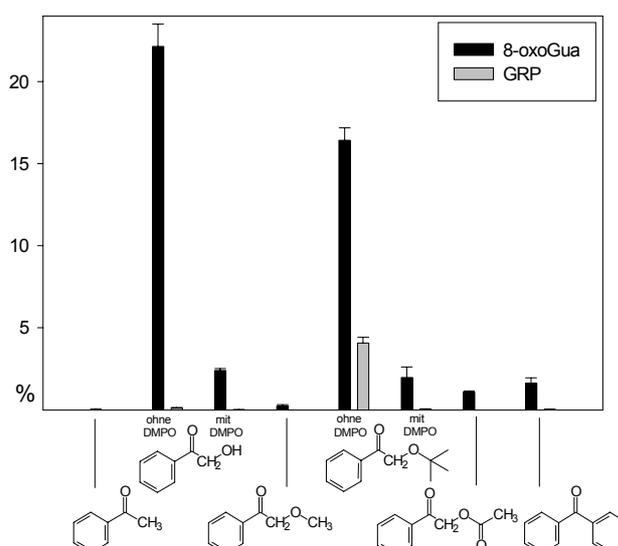


Abbildung 6.8: DNA Photooxidation ($[Gua] = 62.5 \mu M$, 300 nm, 20 min, 0 °C) während der Ketonbestrahlung (200 μM) in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) mit und ohne DMPO (500 μM).

und BP führten nur zu geringen Mengen (< 2%) an 8-oxoGua, während die Photolyse von AP-OH und AP-O^tBu die Bildung großer Mengen (23% and 17%) an 8-oxoGua induzierte. Signifikante Mengen (4%) an GRP wurden nur bei der AP-O^tBu-Photolyse detektiert.

6.2.3 Zeitprofil und relative Effizienz der durch Ketone induzierten DNA-Photooxidation

Zeitprofile wurden für die DNA-Photooxidation durch die oxyfunktionalisierten Ketone AP-OH und AP-O^tBu (Abbildung 6.9, V-B36) aufgenommen. Hierzu wurden der Ketonumsatz (bestimmt mittels HPLC/UV) und die Bildung von 8-oxoGua und GRP nach bestimmten Zeiten quantifiziert. Die Zeitprofile für den Ketonumsatz (oben links in Abbildung 6.9) zeigen, dass AP-O^tBu ungefähr doppelt so schnell als AP-OH photolysiert

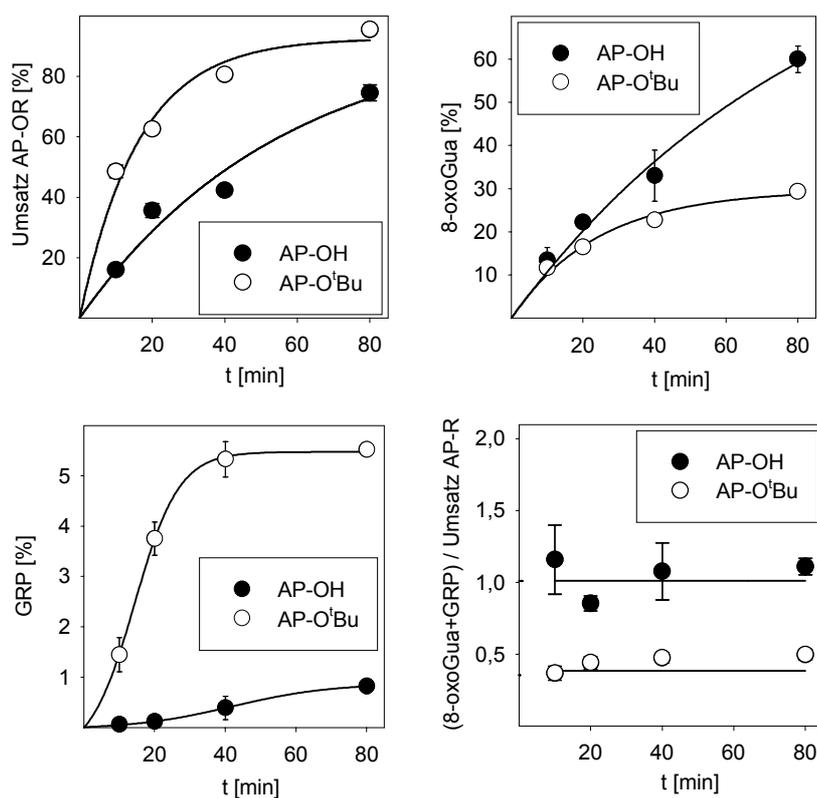


Abbildung 6.9: Zeitprofil für die DNA-Oxidation während der Photolyse der Ketone AP-OH und AP-O^tBu ([Gua] = 62.5 μ M, 300 nm, 20 min, 0 °C, [Keton] = 200 μ M) in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1).

wird und nach einer Stunde Bestrahlung bereits zu über 80% umgesetzt war. Dieses photochemische Verhalten der beiden Ketone ist identisch dem in Abwesenheit von DNA. Das Zeitprofil der 8-oxoGua-Bildung (oben rechts) ist umgekehrt proportional zum Umsatz des Sensibilisators. So bildet das photostabilere AP-OH mehr 8-oxoGua als das schneller zerfallende AP-O^tBu. GRP (unten links) wird am Anfang nicht gebildet, die Kinetik weist sigmoides Verhalten auf. Während AP-OH nur wenig GRP-Bildung induziert, ist AP-O^tBu effizienter (6%). Die Effizienz der DNA Photooxidation ist in der Zeitabhängigkeit (unten rechts) als Verhältnis der DNA-Oxidationsprodukte (8-oxoGua + GRP) pro umgesetztes Keton (AP-OH oder AP-O^tBu) dargestellt.

6.2.4 DNA-Oxidation in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff

Bestrahlt man zuvor entgaste Proben der Ketone in Gegenwart von DNA, so beobachtet man im Fall von AP-OH und AP-O^tBu einen drastischen Rückgang der Bildung an 8-oxoGua, während im Fall von AP, AP-OAc und BP nur kleine Effekte zu beobachten sind (V-B37).

6.2.5 Einfluss der DNA-Konzentration

Erhöht man die eingesetzte DNA-Konzentration von 0.100 g/L auf 1.00 g/L, so erhält man für AP, AP-OMe, AP-OAc sowie BP einen Anstieg der gebildeten 8-oxoGua-Menge, während für AP-OH und AP-O^tBu keine großen Unterschiede festzustellen sind (V-B38).

6.2.6 Einfluss der Keton-Konzentration

Um den Einfluss der Ketonkonzentration auf die Oxidation von CT-DNA zu untersuchen, wurden Proben mit 100 µM und 200 µM an AP-OH und AP-O^tBu miteinander verglichen. Während 8-oxoGua bei Verdopplung der Ketonkonzentration in beiden Fällen um maximal 50% zunahm, stieg die detektierte Menge an GRP um über 100% (V-B39).

6.2.7 Bildung von Strangbrüchen (SSB)

Wie durch gel-elektrophoretische Messungen gezeigt wurde, induziert die Photolyse von AP-OH (ca. 20%) und AP-O^tBu (ca. 50%) Strangbrüche in superhelikaler pBR 322 DNA (V-B40, Abbildung 6.10). Die Ketone AP, AP-OMe, AP-OAc und BP waren bezüglich der Induktion von Strangbrüchen unter den angewandten Bedingungen ineffizient (< 5%).

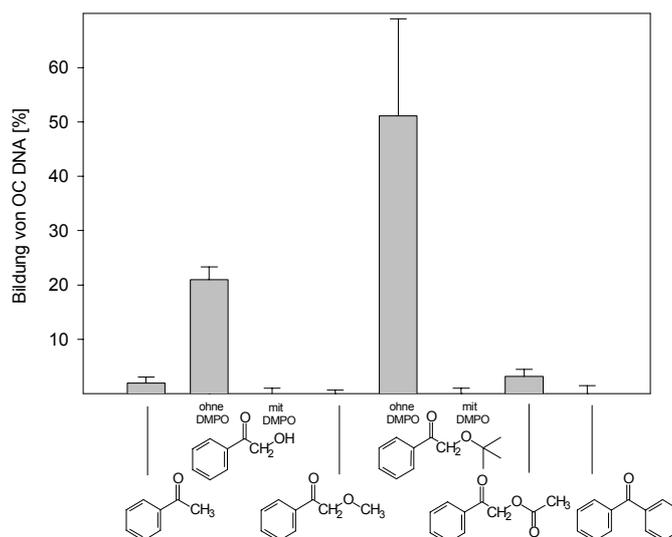


Abbildung 6.10: Bildung der offenzirkularen (OC) Form von pBR 322 DNA (0.010 g/L) während der Ketonbestrahlung (10.0 μ M, 300 nm, 0 °C, 20 min) in 0.500 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) : Acetonitril (9:1) mit und ohne DMPO (5.00 μ M).

6.2.8 Einfluss von Radikalfängern auf die Bildung von Strangbrüchen

Zusatz von 5 μ M BHT zu den Strangbruchexperimenten vermindert die Bildung von SSB bei der Photolyse von AP-OH und AP-O^tBu (V-B41), während Zusatz von 5.00 μ M DMPO jegliche Bildung von Strangbrüchen verhindert.

6.2.9 Einfluss der DNA-Konzentration

Bei höheren Konzentrationen an pBR 322 DNA wurden auch für die Ketone AP (10%), BP (53%) und AP-OAc (64%) die Induktion von Strangbrüchen nachgewiesen (V-B42).

6.2.10 Basenoxidation (Guanin) versus Wasserstoffabstraktion am Zuckerrückgrat

Um das Verhältnis von Basen zu Zuckerschäden zu bestimmen (V-B43) wurden Bedingungen gewählt, bei denen AP-OH, AP-O^tBu und BP ungefähr 50% SSB in pBR 322 DNA induzieren; dies entspricht 0.023% SSB pro Molekül Guaninbase. Für AP-OH and AP-O^tBu wurden diese Experimente mit 0.010 g/L DNA durchgeführt, während für BP 0.100 g/L DNA eingesetzt wurden. Das Ausmaß der Strangbruchbildung wurde direkt nach der Photolyse mittels Gel-Elektrophorese bestimmt, die gebildete Menge an 8-oxoGua wurde nach erfolgter DNA-Hydrolyse (HF/Pyridin, 37 °C, 40 min) der oxidierten pBR 322 DNA mittels HPLC/EC bestimmt; die Verhältnisse sind in Tabelle 6.4 dargestellt. Für AP-OH und AP-O^tBu, werden um den Faktor 85 ± 15 und 60 ± 15 -mal mehr Basenschäden als Strangbrüche detektiert, was im Rahmen der Fehlergrenzen ungefähr identisch ist. Basenoxidation dominiert deutlich gegenüber der Bildung von Strangbrüchen. Für BP konnte ein Verhältnis von <15 abgeschätzt werden. Obwohl eine beträchtliche Menge an Strangbrüchen induziert wird, liegt der für 8-oxoGua detektierte Wert im Fehlerbereich des Detektionslimits, deshalb ist nur die Abschätzung eines oberen Limits möglich. Ähnliches gilt für AP und AP-OAc, für die keine signifikante Bildung von 8-oxoGua detektiert wurde, obwohl Strangbrüche gebildet wurden (8% und 18%).

Tabelle 6.4: 8-oxoGua : OC DNA-Verhältnis bei der Photooxidation von pBR 322 DNA während der Photolyse von Ketonen (V-B43)

Keton	[8-oxoGua]/[OC DNA] ^{a)}
	pBR 322 DNA
b) 	95 ± 20
b) 	65 ± 15
c) 	<15

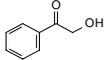
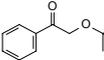
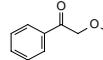
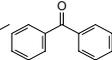
a) Ungefähr 50% SSB, das entspricht 0.023% SSB pro Molekül Guaninbase; b) 0.010 g/L DNA für AP-OH und AP-O^tBu; c) 0.100 g/L DNA für BP.

6.3 Diskussion der dG-Oxidation durch AP-Derivate

Die sechs untersuchten Ketone weisen unterschiedliche Reaktivitäten gegenüber dG auf. Während AP-OMe ziemlich unreaktiv ist, induzieren alle anderen Ketone eine effizientere Oxidation von dG und 8-oxodG. Wie bereits für die alkoxyethylsubstituierten Acetonderivate gezeigt, führt eine effiziente Norrish-Typ-II-Spaltung von 1-Methoxy-2-propanon zur schnellen Deaktivierung des angeregten Zustandes. Aus diesem Grund konnte keine dG-Oxidation induziert werden. In der Literatur wird auch für AP-OMe eine effiziente Norrish-Typ-II-Spaltung berichtet.^{144c} In einem NMR-Experiment, das in D₂O : CD₃CN (9:1) durchgeführt wurde, entsteht monodeuteriertes Acetophenon als Hauptzersetzungsprodukt, welches man erwartet, wenn das in der Norrish-Typ-II Reaktion gebildete Enol von Acetophenon in D₂O deuteriert wird. In Laserblitz-Photolyseexperimenten wurde ein Transient mit Absorptionsmaxima bei 350 und 470 nm und einer Halbwertszeit von 632 ns beobachtet. Die Triplettzustände aller anderen untersuchten Triplettzustände besitzen nur ein Maximum bei 340 nm. Dieser Transient wurde durch dG um einen Faktor von ca. 2 und durch O₂ um ungefähr einen Faktor 5 weniger effizient gequencht als die Triplettzustände aller anderen untersuchten Ketone. Zusätzlich konnte nach Zusatz von 1-Methylnaphthalin kein Triplettenergietransfer beobachtet werden. Weder verkürzte sich die Lebenszeit des Transienten noch konnte man den Aufbau des 1-Methylnaphthalin-Triplettzustands beobachten. Deshalb wird ausgeschlossen, dass es sich beim beobachteten Transienten um den Triplettzustand handelt. Möglicherweise handelt es sich um das Triplettbiradikal, das nach γ -Wasserstoffabstraktion durch die triplettangeregte Carbonylgruppe entsteht. Nach Bestrahlung von AP-OMe in der Gegenwart des Radikalfängers DMPO, konnten keine Radikaladdukte mittels EPR-Spektroskopie beobachtet werden. Eine Norrish-Typ-I Reaktion kann daher ebenfalls ausgeschlossen werden. Wegen der Ineffizienz bezüglich der dG-Oxidation, die auf die effizient ablaufende Norrish-Typ-II-Spaltung zurückgeführt wurde, wird sich die restliche Diskussion auf die Ketone AP, AP-OH, AP-O^tBu, AP-OAc und BP konzentrieren.

Vergleicht man die Reaktivität der Ketone (Tabelle 6.5), wird offensichtlich, dass sie zwei unterschiedliche Gruppen bilden. Der Einfachheit halber werden die photochemisch inaktiven Ketone AP, AP-OAc und BP als „Gruppe A“-Ketone und die photochemisch aktiven AP-OH

Tabelle 6.5: Reaktivitätstrends^{a)} der photochemischen und photobiologischen Aktivität der triplettangeregten Ketone gegenüber dG

Reaktivität					
	AP-OH	AP-OtBu	AP	AP-OAc	BP
AP-R Umsatz ohne Substrat	+	++	-	-	-
Radikalbildung bei der Ketonphotolyse ^{b)}	+	++	-	-	-
Photooxidation bei niedriger [dG] ^{c)}	++	++	-	-	-
dG-Umsatz zu 8-oxodG ^{d)}	++	-	-	-	-
8-oxodG Umsatz zu Spiroiminodihydantoin ^{d)}	+	+	++	++	++
dG erhöht Geschwindigkeit der 8-oxodG-Oxidation ^{e)}	-	-	++	++	++
D ₂ O Effekt (dG Umsatz)	-	-	-	-	-
dG Oxidation ohne O ₂ ^{f)}	-	-	-	++	-
O ₂ (Überschuss) quencht die dG-Oxidation ^{g)}	-	-	+	++	+

a) Qualitative Reihenfolge: hoch (++), trifft zu (+), trifft nicht zu (-); b) siehe Tabelle 6.2; c) siehe Abbildung 6.2; d) siehe Abbildung 6.3; e) siehe Abbildung 6.7; f) Nach drei „freeze-pump-thaw“-Zyklen (0.01 Torr); g) Nach Sättigung mit O₂.

und AP-O^tBu als „Gruppe B“-Ketone bezeichnet. Da die direkte Oxidation von dG und 8-oxodG durch die Triplettketone auch für die „Gruppe B“-Ketone eine gewisse Rolle spielt wird die oxidative Reaktivität der „Gruppe A“-Ketone zuerst diskutiert.

6.3.1 Reaktivität der „Gruppe A“-Ketone

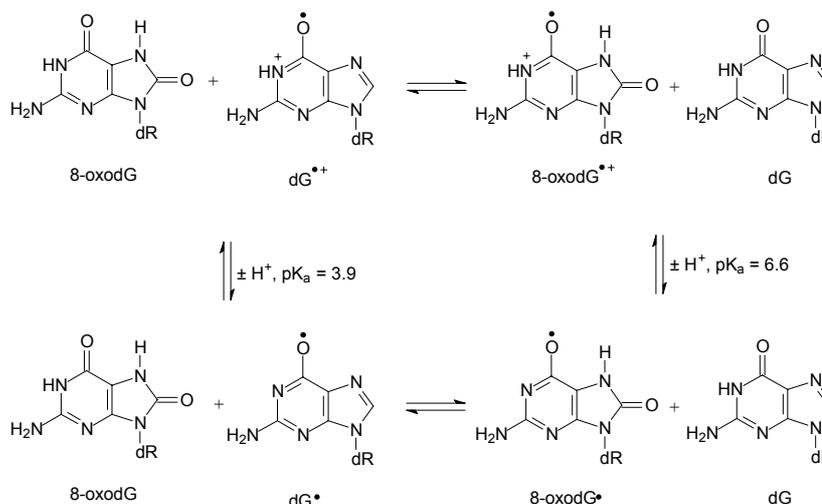
Radikalabfangexperimente mit DMPO zeigen, dass bei Bestrahlung keine Radikale gebildet werden und damit keine α -Spaltung stattfindet. In Abwesenheit von dG und 8-oxodG wird nach Bestrahlung nur ein vernachlässigbarer Ketonumsatz beobachtet (Abbildung 6.1). Das heißt, die Deaktivierung des Triplettzustandes erfolgt über einen Mechanismus, der nicht zum Ketonumsatz führt (Phosphoreszenz, physikalisches Löschen). Reaktionen der angeregten Ketone erfolgen nur nach direkter Wechselwirkung des Triplettzustandes mit einem Substrat.

6 DISKUSSION

Tatsächlich werden die Triplettzustände mit Geschwindigkeitskonstanten um $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für dG und $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für 8-oxodG (Tabelle 6.1) gequench, was mehr als eine Größenordnung schneller ist als Selbstlöschung durch das Keton selbst. Wenn eine direkte Wechselwirkung des angeregten Triplettzustandes mit dem Substrat nötig ist, sollte die Menge an oxidiertem Substrat von der Substratkonzentration abhängen. Bei hohen Konzentrationen hat der angeregte Zustand eine hohe Wahrscheinlichkeit, ein Substratmolekül zu treffen, bevor Deaktivierung stattfindet. Bei niedrigen Substratkonzentrationen ist die Wahrscheinlichkeit ziemlich gering, so dass die meisten angeregten Zustände deaktivieren ohne mit dem Substrat zu reagieren. In den Experimenten mit variierender Substratkonzentration wurde für dG und 8-oxodG (Abbildung 6.2 und Abbildung 6.4) bei niedrigen Konzentrationen tatsächlich ein linearer Anstieg des Substratumsatzes mit der Substratkonzentration beobachtet. Dies liefert einen Hinweis auf eine kurzlebige reaktive Spezies, deren Lebenszeit in der richtigen Größenordnung liegt, um mit der Deaktivierung des angeregten Zustandes durch das Substrat konkurrieren zu können. Für die Reaktion mit dG wurde die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff ausgeschlossen, da Austausch des wässrigen Anteils des Lösungsmittelgemisches gegen D_2O , in dem Singulett-Sauerstoff eine zehnfach längere Lebenszeit aufweist,²⁰⁴ keinerlei Effekt auf den dG-Umsatz zeigte. Deshalb ist eine direkte Wechselwirkung des Triplettzustandes der Ketone mit dem Substrat der erste Schritt in der Induktion des Oxidationsvorgangs.

Die Frage, ob 8-oxodG, obwohl es nicht als finales Oxidationsprodukt vorliegt, als Intermediat an der Photooxidation beteiligt ist, wurde durch kinetische Messungen während der Oxidation von 8-oxodG durch die Triplettzustände untersucht (Abbildung 6.7). Für AP, AP-OAc und BP wurde eine langsame Oxidation von 8-oxodG beobachtet, die jedoch nicht schnell genug verläuft um die Akkumulation von 8-oxodG bei der Oxidation von dG zu verhindern. Eine zweite Reihe von Experimenten wurde in Gegenwart eines Überschusses an dG durchgeführt, die Reaktionsmischung entspricht also der Bildung kleiner Mengen an 8-oxodG während der Photooxidation von dG. Im Vergleich zu den in der Abwesenheit von dG erhaltenen 8-oxodG-Umsätzen beschleunigte sich für AP, AP-OAc und BP die Geschwindigkeit der 8-oxodG-Oxidation drastisch. Sogar wenn fast alles 8-oxodG umgesetzt ist, klingt die Geschwindigkeit der Oxidation (Steigung der Kurve in Abbildung 6.7) nicht ab. Da direkte Oxidation von 8-oxodG (Experimente in Abwesenheit von dG) nur langsam abläuft, muss in der dG-Oxidation eine Zwischenstufe gebildet werden, die mit 8-oxodG wechselwirkt und dessen Umsatz induziert. Ein Kandidat für diese

Zwischenstufe ist das $dG^{\bullet+}$ Radikalkation oder das dG^{\bullet} Radikal, welche 8-oxodG durch Elektronentransfer oxidieren können (Schema 6.4). Aufgrund der Oxidationspotentiale von



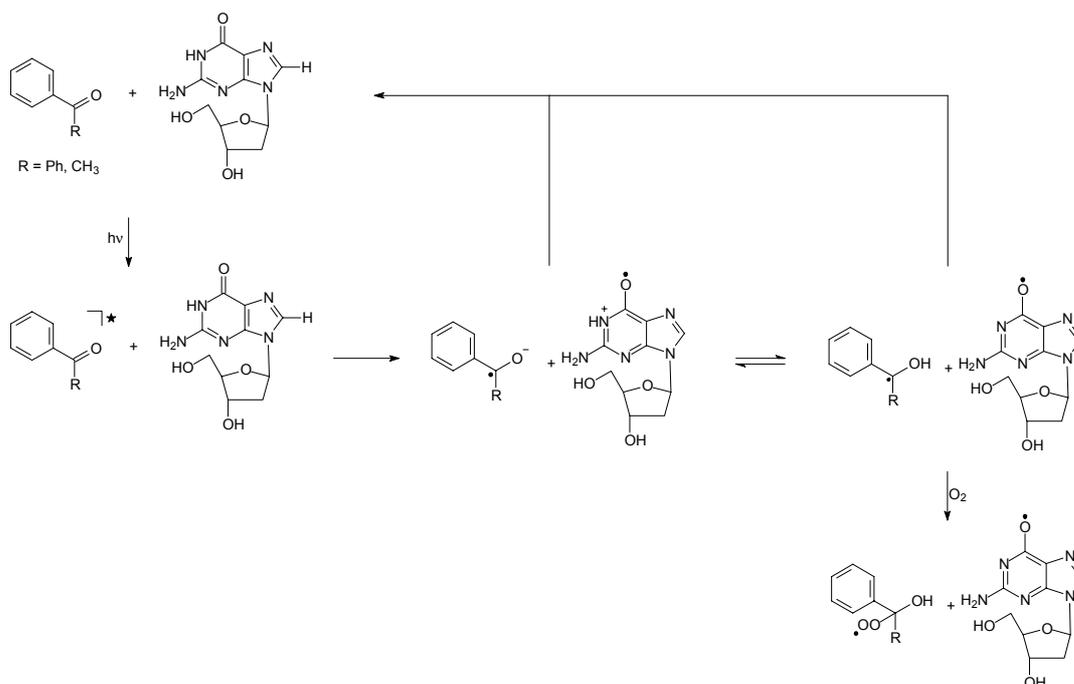
Schema 6.4: Elektronentransfer zwischen 8-oxodG und dem $dG^{\bullet+}$ Radikalkation sowie dem dG^{\bullet} Radikal.

dG (vgl. Guanosin: 1.29 V/NHE)²⁰⁵ und 8-oxodG (0.74 V/NHE)²⁰⁶ sollte das Gleichgewicht auf der rechten Seite liegen. Eine analoge Oxidation von 8-oxodG durch das Guanosinradikal mit einer Geschwindigkeitskonstante von $4.6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ wurde von *Steenken et al.*²⁰⁶ beobachtet.

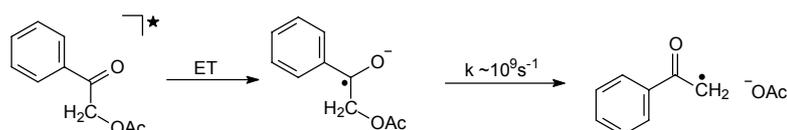
In der Abwesenheit von Sauerstoff führt die Bestrahlung von dG in der Gegenwart von AP und BP nicht zum dG -Umsatz. Da der erste Schritt (Elektronentransfer) sauerstoffunabhängig ist, weist dies darauf hin, dass das $dG^{\bullet+}$ Radikalkation oder das dG^{\bullet} Radikal wieder zu dG reduziert werden muss und deshalb keine dG -Oxidation zu beobachten ist. Das Ketylradikal oder dessen protoniertes Äquivalent (pH 7) kann als Reduktionsmittel agieren (Schema 6.5). Eine derartige Reversibilität des Elektronentransfers zwischen DNA und triplettangeregten Anthrachinonderivaten in der Abwesenheit von Sauerstoff wurde bereits von *Schuster et al.* beobachtet.¹⁴⁶

Lediglich AP-OAc oxidiert dG sogar in der Abwesenheit von Sauerstoff. Da das Ketylradikal, dass nach Elektronentransfer zu AP-OAc entsteht, rasch eine Spaltungsreaktion zu einem Acetophenonradikal und einem Acetatanion eingeht (Schema 6.6), ist das Schicksal des Ketylradikals verantwortlich für den Fortgang der dG -Oxidation. Das in der Photolyse von

6 DISKUSSION



Schema 6.5: Reversible Bildung von Ketylradikalen, $dG^{\bullet+}$ Radikalkationen und dG^{\bullet} Radikalen bei der Ketonphotolyse in Gegenwart von dG.



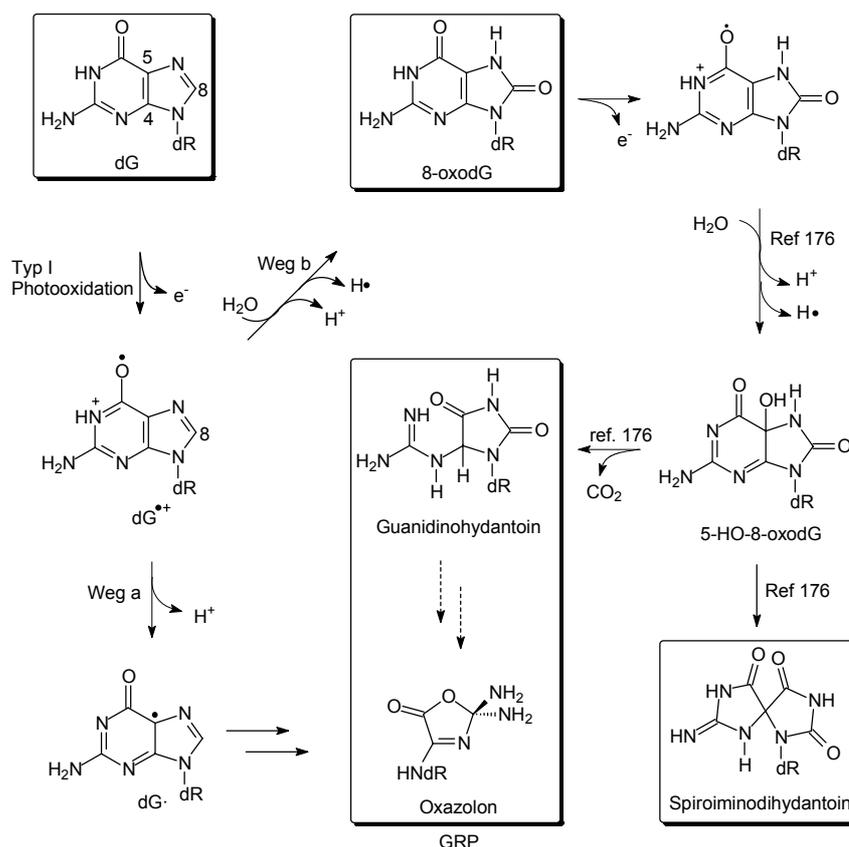
Schema 6.6: Heterolytische Fragmentierung der bei der Photolyse von AP-OAc gebildeten Ketylradikale.

AP-OAc gebildete Ketylradikal zerfällt unimolekular und steht daher nicht für die Reduktion des $dG^{\bullet+}$ Radikalkations oder des dG^{\bullet} Radikals zur Verfügung. Bei den anderen AP-Derivaten werden die protonierten Ketylradikale in Anwesenheit von Sauerstoff zu Peroxyradikalen abgefangen, dadurch verringert sich die Konzentration an protonierten wie auch der im Gleichgewicht vorhandenen unprotonierten Ketylradikale. Als Konsequenz tritt weniger Reduktion der $dG^{\bullet+}$ Radikalkationen und der dG^{\bullet} Radikale ein, und es wird mehr dG-Oxidation beobachtet.

Für alle drei „Gruppe A“-Ketone vermindert ein Überschuss an Sauerstoff das Ausmaß der dG-Oxidation. Das bedeutet, dass ein Überschuss an molekularem Sauerstoff die elektronisch angeregten Zustände quencht, und damit die Lebenszeit des Triplettketons und gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit dG zu oxidieren, verringert. Zusätzlich zu den D₂O-Experimenten liefert dies einen weiteren Hinweis, dass kein Singulett-Sauerstoff beteiligt ist, denn bei Einsatz

von mehr Sauerstoff sollte auch mehr Singulett-Sauerstoff gebildet werden und damit auch mehr dG oxidiert werden.

In Übereinstimmung mit Ergebnissen von *Cadet et al.*¹³⁵ für BP wird die Bildung der Oxidationsprodukte über einen Elektronentransfer von dG zum angeregten Keton (Typ-I-Photooxidation, Schema 6.7) erklärt. *Cadet et al.* berichten hauptsächlich die Bildung von



Schema 6.7: Mechanistischer Vorschlag für die sauerstoffabhängige (Weg a)^{49,167,185a} und sauerstoffunabhängige (Weg b)^{26,35a,66,155a} Typ-I-Photooxidation von dG.

Oxazolone und erklären dies durch die rasche Deprotonierung des Guaninradikalkations in wässriger Lösung. Oxazolone wird dann durch Addition von Sauerstoff und weitere Umlagerungen gebildet. Die Tatsache, dass kein 8-oxodG beobachtet wurde, wurde über die rasche Deprotonierung des dG Radikalkations in Wasser (Schema 6.7, Weg a) erklärt so dass kein nukleophiler Angriff von Wasser (wie im Fall der Guaninoxidation in DNA, Weg b) erfolgen kann. Unsere Ergebnisse (Abbildung 6.7) zeigen jedoch, dass 8-oxodG während der Photolyse in der Gegenwart von dG nicht stabil ist und nicht akkumuliert werden kann. Vermutlich wird es durch das dG^{•+} Radikalkation oder das dG[•] Radikal oxidiert. Deshalb darf

die Tatsache, dass kein 8-oxodG gefunden wurde nicht zwangsläufig dahingehend interpretiert werden, dass während des Oxidationsprozesses kein 8-oxodG gebildet wird.

Die Oxidation von 8-oxodG durch AP, AP-OAc und BP ergibt die Produkte Spiroiminodihydantoin und GRP (Schema 6.7). Für beide Produkte sind die Ausbeuten besser als in der Oxidation von dG. *Burrows et al.*¹⁷⁶ beschreiben die Einelektronenoxidation von 8-oxodG über das 8-oxodG^{•+} Radikalkation, das nach Hydrolyse an C-5 und einem weiteren Einelektronenoxidationsschritt 5-HO-8-oxodG ergibt. Wegen der Tatsache, dass die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff ausgeschlossen wurde und dass 8-oxodG in Gegenwart von dG schnell weiteroxidiert wird, schlagen wir vor, dass Spiroiminodihydantoin in der Oxidation von dG aus intermediär gebildetem 8-oxodG durch Einelektronenoxidation (wie von *Burrows et al.*¹⁷⁶ beschrieben) gebildet wird.

6.3.2 Reaktivität der „Gruppe B“-Ketone

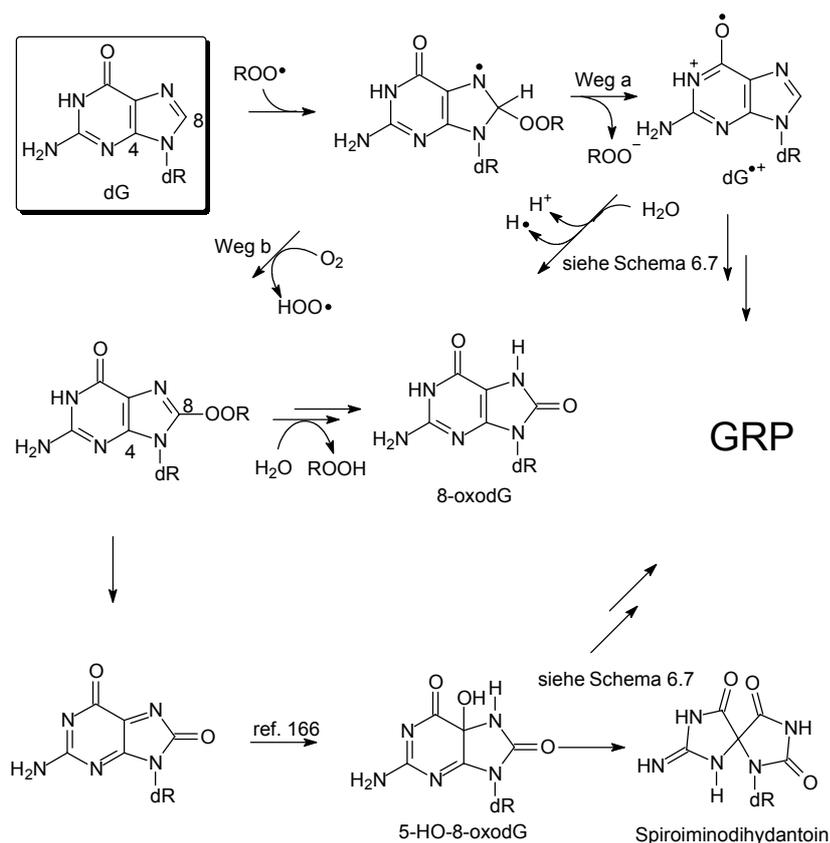
Für die Ketone AP-OH und AP-O^tBu wurde mit Hilfe von Radikalabfangexperimenten mit DMPO gezeigt, dass α -Spaltung stattfindet. Bei der Photolyse beider Ketone wurde ein Benzoylradikal und das entsprechende Oxymethylradikal abgefangen. Der Prozess der α -Spaltung führt für die „Gruppe B“-Ketone im Gegensatz zu den „Gruppe A“-Ketonen auch in Abwesenheit von dG und 8-oxodG zum Ketonumsatz.

Die Triplettzustände von AP-OH und AP-O^tBu besitzen Lebenszeiten von 1 oder 0,5 μ s und sind daher ungefähr um einen Faktor zehn kurzlebiger als die der „Gruppe A“-Ketone. Die gemessenen Quenchkonstanten für triplettangeregtes AP-OH durch dG (Tabelle 5.1) unterscheidet sich nicht von denen der „Gruppe A“-Ketone; AP-O^tBu weist eine ein wenig größere Reaktivität gegenüber dG und 8-oxodG auf. Da die α -Spaltung ein unimolekularer Prozess ist und die Reaktion mit dG und 8-oxodG eine bimolekulare Reaktion, wird die direkte Wechselwirkung des angeregten Zustandes mit dem Substrat bei niedrigen Substratkonzentrationen unwahrscheinlich und spielt keine Rolle mehr, während die α -Spaltung vorherrscht. Bei höheren Substratkonzentrationen kann sie jedoch mit der α -Spaltung konkurrieren. Bei Verringerung der dG- oder 8-oxodG-Konzentration wurde bei niedrigen Substratkonzentrationen nicht ein linearer Anstieg des Umsatzes mit der Substratkonzentration wie im Fall der „Gruppe A“-Ketone, sondern sogar ein leichter Abfall der Reaktivität mit steigender Substratkonzentration beobachtet (Abbildung 6.2 und 74

Abbildung 6.4). Dieses Verhalten deutet auf eine langlebige reaktive Spezies, deren Lebenszeit deutlich länger als die Triplettlebenszeit der Ketone sein muss. Wie bereits bei den „Gruppe A“-Ketonen wurde die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff aufgrund eines fehlenden D₂O-Effektes ausgeschlossen. Deshalb werden Peroxylradikale als dG-oxidierende Spezies vorgeschlagen, die durch Abfang der in der α -Spaltung entstehenden kohlenstoffzentrierten Radikale mit molekularem Sauerstoff entstehen. Peroxylradikale besitzen eine derart lange Lebenszeit,^{86a} da sie nicht in der Lage sind, unimolekulare Deaktivierungsreaktionen einzugehen (wie im Fall des Triplettzustandes). Für AP-OH zeigt die konzentrationsabhängige Bildung von 8-oxodG in der Oxidation von dG ein analoges Verhalten, 8-oxodG wird darum als direkt durch die Radikalspezies gebildetes Oxidationsprodukt angesehen. AP-O^tBu oxidiert 8-oxodG deutlich effizienter als AP-OH. Während mit AP-O^tBu nach 3-4 min alles 8-oxodG umgesetzt ist, ist mit AP-OH nach derselben Zeit noch ca. 80% vorhanden. In der Gegenwart von dG nimmt die Konzentration an 8-oxodG mit der Zeit sogar zu, was bedeutet, dass dessen Bildung schneller ist als dessen Umsatz. 8-oxodG wird durch AP-O^tBu sehr schnell oxidiert. In der Gegenwart von dG wird die Oxidation von 8-oxodG gequenchet, aber nach 5 min sind trotzdem ungefähr 70% des 8-oxodG umgesetzt, das heißt wie bereits im Fall der „Gruppe A“-Reaktivität wird 8-oxodG schneller vernichtet als gebildet.

Für AP-OH wie für AP-O^tBu findet bei Bestrahlung in Abwesenheit von Sauerstoff keine dG-Oxidation statt. In Abwesenheit von Sauerstoff können die kohlenstoffzentrierten Radikale kein O₂ addieren und so keine Peroxylradikale bilden. Kohlenstoffzentrierte Radikale (z. B. das Hydroxymethylradikal)²⁰⁷ addieren gewöhnlich an C-8 von dG. Das so gebildete C-8-Radikaladdukt kann dann zum C-8-dG-Alkyladdukt oxidiert werden. In der Abwesenheit eines Oxidationsmittels (Sauerstoff) ist die Reaktion reversibel und daher wurde keine Reaktion mit dG beobachtet. Auch Oxyradikale addieren bevorzugt an die C-8-Position der Guaninbase.⁷⁷

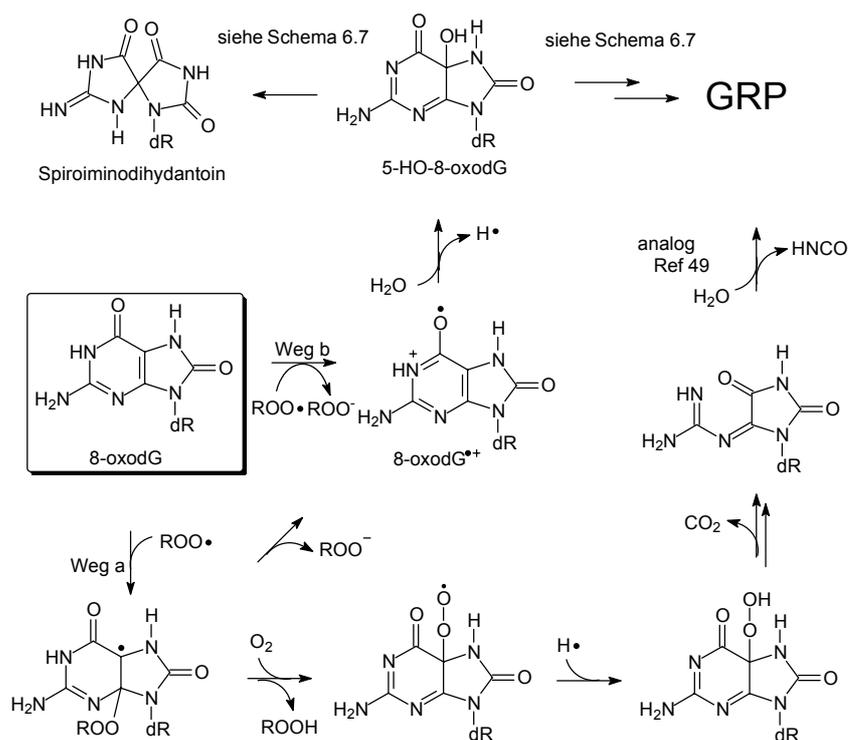
Der Mechanismus der sauerstoffabhängigen Photooxidation von dG und 8-oxodG, für die Peroxylradikale verantwortlich gemacht werden, ist in Schema 6.8 deshalb als Angriff auf Position die Position C-8 dargestellt. Der nachfolgend angegebene mechanistische Vorschlag für die Oxidation von dG durch Peroxylradikale basiert deshalb auf einem primären Angriff auf C-8. Das dabei gebildete Peroxylradikal-addukt hat mehrere Möglichkeiten, sich



Schema 6.8: Mechanistischer Vorschlag für die Oxidation von dG durch Peroxyradikale

chemisch umzuwandeln. Erstens kann es ein Peroxylanion eliminieren und so ein dG^{•+} Radikalkation bilden (Schema 6.8, Weg a), das dann genauso weiterreagiert wie unter „Gruppe A“-Ketone beschrieben und schließlich 8-oxodG bildet. Die zweite Möglichkeit ist Oxidation des Adduktradikals, z. B. durch molekularen Sauerstoff, und Bildung eines dG-Peroxids. Dieses dG-Peroxid kann in Wasser durch Angriff an die Position C-8 hydrolysiert werden. Nach Eliminierung von ROOH wird 8-oxodG gebildet. Eine andere Möglichkeit ist die Eliminierung von ROH und Bildung eines instabilen Diimins welches zu 5-HO-8-oxodG hydrolysiert, das dann zu Spiroiminodihydantoin und GRP umlagert.¹⁷⁶

Der Mechanismus der Oxidation von 8-oxodG durch Peroxyradikale ist ähnlich und in Schema 6.9 dargestellt. In dG ist die nach C-8 nächstreaktive Position gegenüber Oxyradikalen neben C-4.²⁰⁸ Deshalb erwarten wir einen Angriff des Peroxyradikals an der Position C-4 von 8-oxodG als Schlüsselschritt in der durch Peroxyradikale vermittelten Oxidation von 8-oxodG. Das dadurch gebildete Radikal-addukt an 8-oxodG hat zwei Möglichkeiten. Es kann ein Alkylperoxyradikalanion eliminieren und ein 8-oxodG^{•+} Radikalkation bilden (Weg a). Alternativ kann letzteres direkt über einen Elektronentransfer



Schema 6.9: Mechanistischer Vorschlag für die Oxidation von 8-oxodG durch Peroxylradikale

von 8-oxodG zum Peroxylradikal entstehen, da 8-oxodG ein deutlich niedrigeres Oxidationspotential als dG (vgl. Guanosin)^{205,206} besitzt und dadurch auch Elektronentransfer zu Peroxylradikalen möglich wird. Dieses $\text{8-oxodG}^{\bullet+}$ Radikalkation bildet dann Spiroiminodihydantoin und GRP, wie bereits für die „Gruppe A“-Ketone beschrieben (Schema 6.7). Schließlich kann das dG-Peroxylradikal-addukt molekularen Sauerstoff addieren, wodurch nach Eliminierung von Alkylhydroperoxid gemäß in der Literatur beschriebener Schritte Oxazolone (GRP) gebildet wird.^{49,167,185a,209}

6.4 Diskussion der DNA-Oxidation durch AP-Derivate

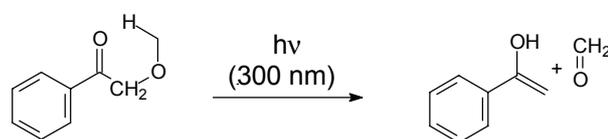
Bevor die erhaltenen Daten mechanistisch interpretiert werden, sind die qualitativen Trends zusammen mit einigen experimentellen Fakten bezüglich des photochemischen Verhaltens der Ketone in Tabelle 6.6 zusammengefasst.

Die Daten für AP-OMe sind nicht dargestellt, da der AP-OMe-Triplettzustand schnell durch Norrish-Typ-II-Spaltung deaktiviert wird (Schema 6.10) und deshalb nur eine geringe

Tabelle 6.6: Qualitative Reaktivitätstrends^{a)} der photochemischen und photobiologischen Aktivität der triplettangeregten Ketone gegenüber DNA

					
photolytische Keton-zersetzung ohne Substrat ^{b)}	+	++	-	-	-
Radikalbildung in der Ketonphotolyse ^{b)}	+	++	-	-	-
8-oxoGua-Bildung bei niedrigen [DNA] ^{c)}	++	+	-	-	-
GRP-Bildung bei der DNA-Basenoxydation ^{c)}	-	+	-	-	-
DNA-Oxidation wird gequencht durch DMPO ^{c)}	++	++			
mehr Basenschäden bei höheren [DNA]	-	-	+	+	+
DNA-Oxidation ohne O ₂	-	-	++	+	++
SSB-Bildung bei niedrigen [DNA] ^{d)}	+	++	-	-	-
SSB-Bildung wird gequencht durch DMPO	++	++			
mehr SSB bei höheren [DNA]	-	-	+	+	+

a) Qualitative Reihenfolge: hoch (++), trifft zu (+), trifft nicht zu (-); b) siehe Tabelle 6.2; c) siehe Abbildung 6.8; d) siehe Abbildung 6.10 (SSB = Strangbruch).

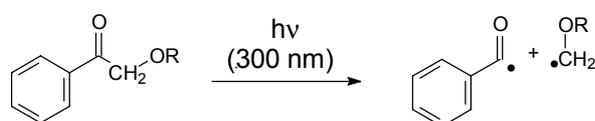


Schema 6.10: Norrish-Typ-II Reaktion in der Photolyse von AP-OMe

Reaktivität gegenüber DNA aufweist. Die restlichen fünf Ketone wurden aufgrund ihres photochemischen Verhaltens mit DNA, das auf der Fähigkeit, bei der Photolyse Radikale freizusetzen, basiert, in zwei Gruppen aufgeteilt (siehe Kapitel 5).

Die erste Gruppe („Gruppe A“-Ketone) besteht aus AP-OH und AP-O^tBu, die effizient Radikale freisetzen, die dann wiederum Basenoxidation und Strangbruchbildung induzieren. Die zweite Gruppe („Gruppe B“-Ketone) besteht aus AP, AP-OAc und BP, welche keine Radikale freisetzen und bei den verwendeten Reaktionsbedingungen nur eine geringe Reaktivität gegenüber DNA aufweisen. Jedoch wird bei höheren DNA-Konzentrationen ebenfalls eine erhöhte oxidative Aktivität gegenüber DNA beobachtet, sowohl bezüglich Basenoxidation als auch bezüglich der Bildung von Strangbrüchen.

Die Triplettlöschkonstanten k_q (Tabelle 6.1) zeigen, dass die Reaktivität der angeregten Ketone gegenüber DNA im Vergleich zu dG recht gering ist, sie liegen durchgehend über eine Größenordnung unter Diffusionskontrolle.²¹⁰ Da niedrige DNA-Konzentrationen (0.100 mg/mL = 62.5 μ M Gua) eingesetzt wurden, werden aus diesem Grund die meisten Ketontriplettzustände wieder zum Grundzustand deaktiviert, bevor sie überhaupt mit DNA reagieren können. Dies ist der Grund für die geringen Mengen an 8-oxoGua und GRP, die in der Photooxidation von CT-DNA durch AP, AP-OAc und BP (Abbildung 6.8) gebildet werden. Dagegen wurden bei der Photolyse von AP-OH und AP-O^tBu wesentlich größere Mengen dieser DNA-Oxidationsprodukte gefunden. Von beiden Verbindungen wissen wir, dass sie eine effiziente Norrish-Typ-I-Spaltung eingehen und daher bei Anregung Radikalspezies bilden (Tabelle 6.2). Dies wurde durch die Radikalabfangexperimente mit DMPO und TEMPO bestätigt und zeigt sich auch in den relativ zu AP, AP-OAc und BP verkürzten Triplettlebensdauern (Tabelle 6.1). Bei der α -Spaltung von triplettangeregtem AP-OH und AP-O^tBu wird ein Benzoylradikal und ein oxysubstituiertes Methylradikal gebildet (Schema 6.11). Da kohlenstoffzentrierte Radikale mit molekularem Sauerstoff



Schema 6.11: Radikalbildung bei der Photolyse der AP-OR Ketone durch α -Spaltung

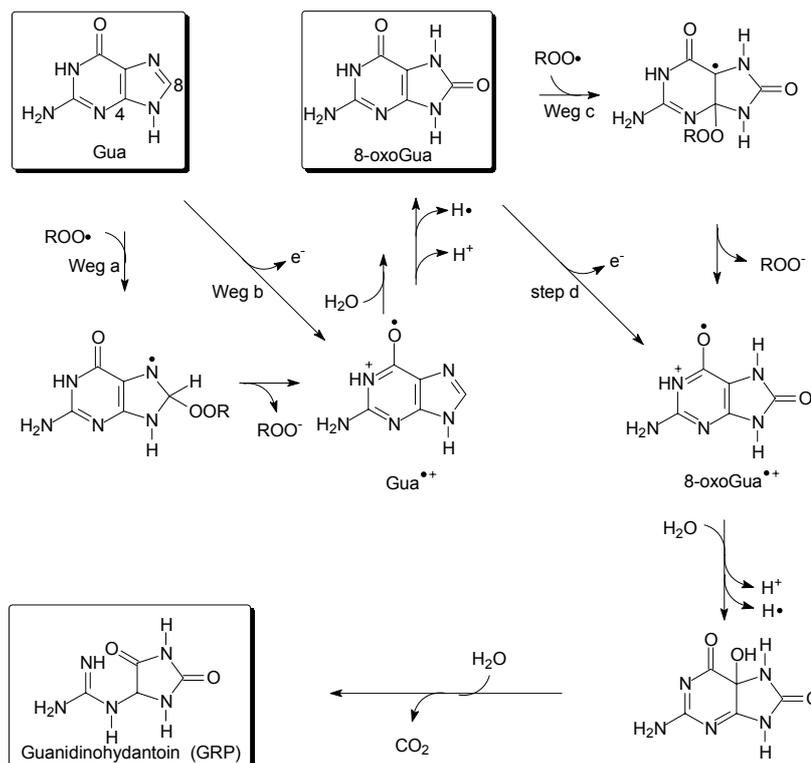
nahezu diffusionskontrolliert^{86a} reagieren, bilden sowohl PhCO[•] als auch ROCH₂[•] in Gegenwart von O₂ effizient Peroxylradikale, die für die DNA-Oxidation verantwortlich gemacht werden. Tatsächlich wurde unter aeroben Bedingungen für die radikalfreisetzenden Ketone eine deutlich höhere Menge an Oxidationsprodukten gebildet als für die keine Radikale freisetzenden Ketone AP, AP-OAc and BP (Abbildung 6.8). Die Beteiligung von Radikalen an der DNA Photooxidation wurde durch Zugabe eines Radikalfängers bestätigt, der die Bildung von Oxidationsprodukten nahezu komplett unterdrückte (Abbildung 6.8).

6 DISKUSSION

In der Photooxidation von DNA durch AP-O^tBu wurde die Bildung geringer Mengen an GRP detektiert. Die GRP werden jedoch nicht von Beginn an, wie die sigmoid Kurve des Zeitprofils (Abbildung 6.9, links) zeigt, sondern erst nach ca. 30 min gebildet. Diese experimentelle Tatsache bedeutet, dass GRP nicht als primäre Photoprodukte anzusehen sind, sondern durch Folgeoxidation eines anderen Photoproduktes, möglicherweise 8-oxoGua, gebildet wurde. Für AP-OH wurde ein analoges Verhalten festgestellt (Abbildung 6.9, unten links), jedoch werden nur ungefähr zehnmal weniger GRP gebildet als durch AP-O^tBu.

Da AP-OH und AP-O^tBu bei der Photolyse beide Benzoylradikale freisetzen, muss der Unterschied des photooxidativen Verhaltens bezüglich der DNA-Base Guanin in DNA auf die zwei unterschiedlichen *tert*-Butoxymethylperoxyl- bzw. Hydroxymethylperoxyradikale zurückzuführen sein. In Betracht der Tatsache, dass AP-O^tBu effizienter GRP bildet als AP-OH (Abbildung 6.8), oxidiert das *tert*-Butoxymethylperoxyradikal, das *in-situ* während der DNA-Photooxidation gebildet wird, 8-oxoGua deutlich effizienter als das Hydroxymethylperoxyradikal. Kontrollexperimente mit 8-oxodG bestätigen, dass AP-OH im Vergleich zu AP-O^tBu ineffizient bezüglich der Oxidation von 8-oxodG ist.

Ein Mechanismus für die Bildung von 8-oxoGua und GRP in der DNA Photooxidation bei der AP-OR (R = H, ^tBu) Photolyse wird in Schema 6.12 vorgeschlagen. Die Bildung von 8-oxoGua als Hauptprodukt bedeutet, dass das Guaninradikalkation (Gua^{•+}) ein Intermediat ist, von welchem bekannt ist, dass durch Addition von Wasser 8-oxoGua entsteht.^{35a} Deshalb wird folgender Mechanismus vorgeschlagen: Addition des Peroxyradikals an Position C-8 der Guaninbase (Weg a), gefolgt durch Elimination des Peroxylanions oder Elektronentransfer (Weg b). Die Bildung von GRP in der Photooxidation durch AP-O^tBu (Abbildung 6.9, unten links) wird durch Einelektronenoxidation des leicht oxidierbaren 8-oxoGua zu Guanidinohydantoin, wie bereits in der Literatur beschrieben,^{170a} erklärt. Alternativ könnte auch Addition des Peroxyradikals an C-4 von 8-oxoGua (Weg c) und anschließende Eliminierung des Peroxylanions oder Elektronentransfer (Weg d) das Radikalkation 8-oxodG^{•+} generieren. Nach Umlagerung zu Guanidinyhydantoin und alkalischer Hydrolyse wird aus der GRP-Vorstufe Guanidin freigesetzt und detektiert. Obwohl AP-O^tBu ungefähr zweimal schneller als AP-OH umgesetzt wird (Abbildung 6.9, oben links), bildet letzteres mehr 8-oxoGua (oben rechts). Dieses Phänomen wird nur in DNA beobachtet, da Oxidation von dG (Abbildung 6.5) durch AP-O^tBu deutlich effizienter verläuft



Schema 6.12: Vorgeschlagener Mechanismus für die Photooxidation von Guanin (Gua) in DNA durch Peroxylradikale, die in der Photolyse von AP-OH and AP-O^tBu gebildet werden

als durch AP-OH. Um die größere oxidative Kraft von AP-OH bezüglich DNA im Vergleich zu AP-O^tBu zu erklären, vermuten wir, dass die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe von AP-OH mit dem Zuckerrückgrat der DNA zu einer Erhöhung der lokalen AP-OH-Konzentration in der Nähe von DNA führt.

Strangbruchexperimente mit superhelikaler pBR 322 DNA zeigten ein der Basenoxidation analoges Verhalten. Keine signifikante Bildung von Strangbrüchen wurde mit AP, AP-OAc und BP beobachtet, AP-OH und AP-O^tBu induzierten deutliche Mengen an Strangbrüchen (Abbildung 6.10). Die Bildung von SSB wurde effizient durch Zugabe von DMPO gequenchet, auch hier sind Radikale die oxidierende Spezies. AP-O^tBu erwies sich als effizienter als AP-OH, was wegen dessen schnellerer Zersetzung auch zu erwarten ist (Abbildung 6.9, oben links).

Aus den Daten in Tabelle 6.4 schließen wir, dass die größten photooxidativen Schäden in DNA hauptsächlich Basenschäden sind, die durch radikalfreisetzende Ketone verursacht werden. Die Bildung von Strangbrüchen spielt nur eine untergeordnete Rolle. Um dies

mechanistisch zu verstehen, wird die Bildung eines intermediären Peroxylradikals vorgeschlagen, das durch Abfang von molekularem Sauerstoff durch das kohlenstoffzentrierte Radikal, das in der Ketonphotolyse entsteht, gebildet wird. Dieses reagiert dann mit der Guaninbase der DNA und bildet die beobachteten Oxidationsprodukte. Die Induktion von Strangbrüchen durch das relativ unreaktive Peroxylradikal durch Wasserstoffabstraktion am Zuckerrückgrat spielt nur eine untergeordnete Rolle, aber der Transfer von Schäden zwischen der Base und dem Zuckerrückgrat kann nicht ausgeschlossen werden.^{40,43}

6.5 Schlussfolgerungen

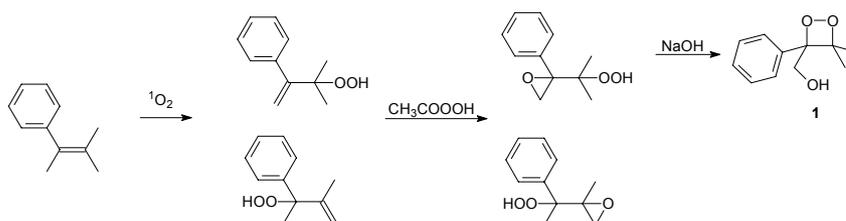
Aufgrund ihres oxidativen Verhaltens wurden die Ketone in zwei Gruppen unterteilt: Die „Gruppe A“-Ketone bewirken nur bei hohen Substratkonzentrationen eine Oxidation über einen Elektronentransfer bzw. eine Wasserstoffabstraktion. Die „Gruppe B“-Ketone hingegen setzen bei der Photolyse Radikale frei, welche in Gegenwart von molekularem Sauerstoff Peroxylradikale bilden die dG effizient oxidieren.

7 Oxidation von dG durch das hydroxymethylsubstituierte Dioxetan 1

7.1 Ergebnisse

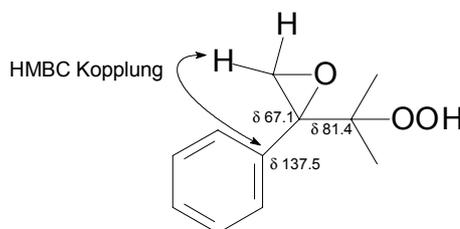
7.1.1 Synthese von 3,3-Dimethyl-4-hydroxymethyl-4-phenyl-1,2-dioxetan 1 (V-11 bis V-15)

Die Synthese von Dioxetan 1 gelang ausgehend von der literaturbekannten Verbindung 2-Methyl-3-phenyl-but-3-en-2-yl-hydroperoxid, welches als Gemisch mit 2-Methyl-3-phenyl-but-1-en-3-yl-hydroperoxid durch Reaktion von 1,2-Dimethyl-1-propenylbenzen mit Singulett-Sauerstoff erhalten wird (Schema 7.1).¹³¹ Reinigung per Säulenchromatographie schlug fehl, wie bereits in der Literatur beschrieben.



Schema 7.1: Synthese von Dioxetan 1

Das entsprechende saubere Epoxid wurde durch Epoxidierung des Gemisches mit Peressigsäure und anschließende Trennung der beiden diastereomeren Produkte mittels Säulenchromatographie erhalten. Die Identität von 1-Methyl-1-(2-phenyloxiranyl)-ethylhydroperoxid wurde durch eine HMBC-Messung bestätigt. Neben einer Kopplung



mit dem Epoxid-Kohlenstoff (67.1 ppm) und dem Hydroperoxid-Kohlenstoff (81.4 ppm, C-OOH) wurde eine Kopplung der Epoxid-CH₂ Wasserstoffatome zu einem Kohlenstoffatom im Phenylring (137.5 ppm) beobachtet, welche für das andere denkbare Diastereomer nicht zu

7 ERGEBNISSE

erwarten ist. Anschließender Ringschluss mit OH^- in verdünnter organischer Lösung ergab Dioxetan **1**.

7.1.2 Dioxetan Zerfallskinetik

Die Geschwindigkeit der Dioxetanzerersetzung (1.00 mM, V-C1) bei der Thermolyse wurden durch Messung der Chemilumineszenzabklingkurven bei verschiedenen Temperaturen in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (9:1) bestimmt (Tabelle 7.1).

Tabelle 7.1: Zerfall von Dioxetan **1** bei verschiedenen Temperaturen. ^{a)}

Temp	$t_{1/2}$ [h]	$10^5 \cdot k_{\text{Zersetzung}}$ [s^{-1}]	I_{max} [mV]	$I_{\text{max}} \cdot t_{1/2}$ [mV·h]
37 °C	41.7 ± 9.5	0.492 ± 0.133	4.64 ± 0.15	193
50 °C ^{b)}	17.0	1.13	23.0	391
65 °C	4.05 ± 0.28	4.78 ± 0.34	309 ± 5	500
80 °C	0.818 ± 0.040	23.6 ± 1.1	628 ± 25	514
80 °C + dG ^{c)}	0.861 ± 0.091	22.6 ± 2.3	554 ± 32	477

a) 1.00 mM in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (9:1); b) Einzelmessung, geschätzter Fehler $\pm 10\%$;
c) 0.500 mM dG und 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) wurden hinzugefügt.

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Zersetzung ($k_{\text{Zersetzung}}$) wurden durch Anpassen der Daten an eine Exponentialfunktion (Kinetik erster Ordnung) erhalten. Zusätzlich wurde die maximale Lichtintensität I_{max} (einige Minuten, nachdem die Probe ins temperierte Mitchell-Hastings Photometer gestellt wurde) der Chemilumineszenzkurve bestimmt. Um den Einfluss von dG und Phosphatpuffer auf die Dioxetanzerersetzung zu bestimmen, wurde das Chemilumineszenzverhalten einer Probe von 0.500 mM dG und 1.00 mM (2 Äquiv.) Dioxetan in Phosphatpuffer (5.00 mM, pH 7) bei 80 °C bestimmt. Aus allen Werten wurde die relative freigesetzte Lichtmenge, die proportional zur Fläche unter der Chemilumineszenzkurve ist, durch Multiplikation von I_{max} and $t_{1/2}$ ausgerechnet (Tabelle 7.1).

7.1.3 Radikalabfangexperimente

Radikalabfangexperimente (V-C2) mit Dioxetan **1** (100 mM) und DMPO (50 mM) wurden in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (9:1) durchgeführt. Nach 15 min Thermolyse bei 80 °C wurde ein Radikal-

addukt ($g = 2.0057$, $\alpha_H = 22.7$ G, $\alpha_N = 15.9$ G) beobachtet, das einem Hydroxymethylradikal zugeordnet wurde.¹³⁷ Es wurden keine Benzoylradikaladdukte an DMPO detektiert.

7.1.4 dG Oxidation

Um herauszufinden, ob die dG-Oxidation während der Thermolyse von Dioxetan **1** über angeregte Ketonspezies als Zwischenstufe verläuft, wurde die Oxidation von dG (0.200 mM) durch Dioxetan **1** (0.400 mM, 2 Äquiv.) bei 80 °C (3 h) in wässrigem Phosphatpuffer (2.00 mM, pH 7.0) : Acetonitril (9:1) untersucht (V-C3). Der dG-Umsatz wurde als Maß für die oxidative Aktivität quantifiziert, zusätzlich wurden die Oxidationsprodukte 8-oxodG, Spiroiminodihydantoin und guanidinfreisetzende Produkte (GRP) quantifiziert. Zum Vergleich sind die Ergebnisse, die bei der Photolyse von AP-OH erhalten wurden, dargestellt (Abbildung 7.1).

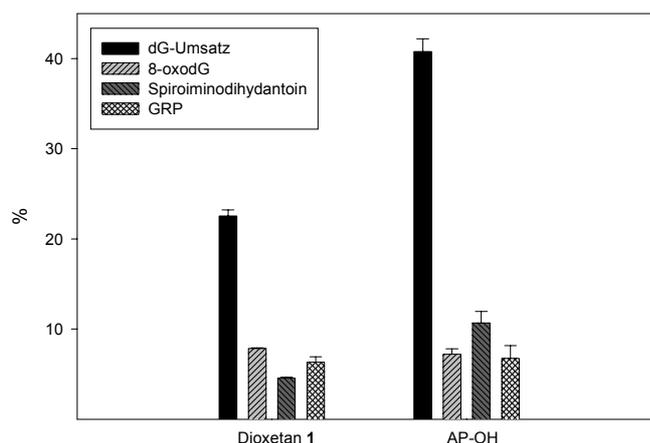


Abbildung 7.1: Vergleich der Oxidation von dG (0.500 mM) während der Thermolyse von Dioxetan **1** (1.00 mM; 80 °C, 3 h) in 5.00 mM Phosphatpuffer : Acetonitril (9:1) mit der Photolyse von AP-OH (V-B23, siehe Abbildung 6.5)

7.1.5 Konzentrationsabhängigkeit der dG-Oxidation

Die oxidative Aktivität bei unterschiedlichen dG-Konzentrationen wurde überprüft, indem Proben mit unterschiedlichen dG-Konzentrationen bestrahlt wurden, die alle dieselben molaren Verhältnisse an dG : Dioxetan **1** : Phosphatpuffer aufwiesen (V-C4, Abbildung 7.2). Die Ergebnisse zeigen, dass die oxidative Aktivität wie bereits bei der AP-OH-Photolyse über

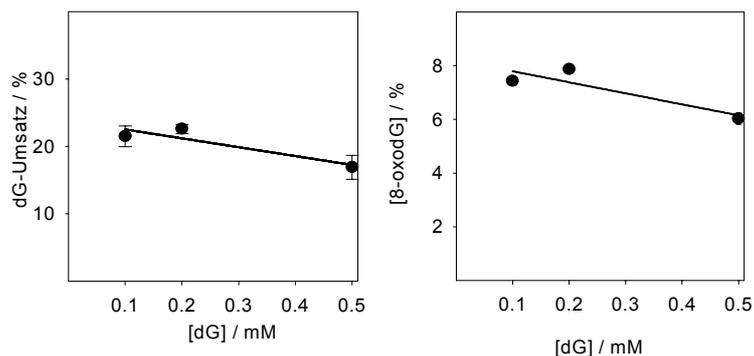


Abbildung 7.2: Abhängigkeit des dG-Umsatzes und der Bildung von 8-oxodG von der dG-Konzentration in der durch Dioxetan **1** induzierten dG-Oxidation.

einen weiten Konzentrationsbereich konstant bleibt und kein Rückgang der Reaktivität bei geringen dG-Konzentrationen zu beobachten ist.

7.2 Diskussion

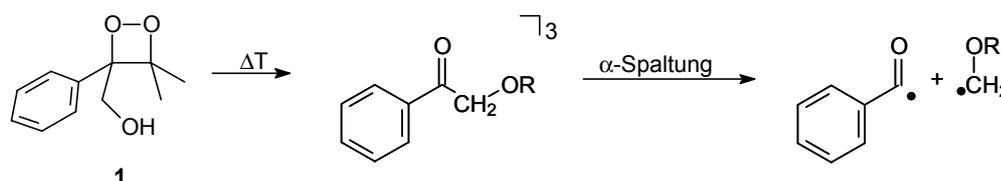
Die Ergebnisse zeigen, dass dG sowohl bei der Thermolyse des Dioxetans **1** als auch bei der Photolyse von AP-OH zu Spiroiminodihydantoin oxidiert wird. Neben Spiroiminodihydantoin wurden auch 8-oxodG und GRP detektiert (Abbildung 7.1). Unabhängig von der Methode der Generierung von triplettangeregtem AP-OH beobachtet man ähnliche photooxidative Reaktivität.

In der Photolyse von AP-OH sind die relativen Ausbeuten an 8-oxodG und GRP im Vergleich zum dG-Umsatz deutlich kleiner als im Fall der Dioxetanthermolyse (ca. 63% im Fall der Dioxetanthermolyse, ca. 34% im Fall der AP-OH-Photolyse). Wegen der höheren oxidativen Reaktivität im Fall der Thermolyse werden diese Photoprodukte weiter umgesetzt. Die ähnliche Produktverteilung in beiden Fällen bedeutet, dass dieselben oxidierenden Spezies vorliegen, vermutlich in der α -Spaltung (siehe Schema 6.11) von angeregtem AP-OH erzeugte Radikale. Die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff kann wegen des Fehlens eines D_2O -Effektes ausgeschlossen werden.

Um die Bedeutung einer direkten Wechselwirkung (Elektronentransfer oder H-Abstraktion) von angeregtem AP-OH mit dG abzuschätzen, wurden konzentrationsabhängige Experimente durchgeführt. Bei niedrigeren dG-Konzentrationen wurde, wie bereits im vorhergehenden Kapitel für die AP-OH-Photolyse erwähnt, auch für die Dioxetanthermolyse kein Rückgang

des dG-Umsatzes beobachtet (Abbildung 7.2). Im Fall einer Oxidation von dG durch angeregte Zustände würde man einen Rückgang der oxidativen Aktivität erwarten, da die bimolekulare Reaktion mit dG verlangsamt würde, während der unimolekulare Deaktivierungsschritt des angeregten Zustandes nicht berührt würde. Dies bedeutet, dass im verwendeten Konzentrationsbereich die bei der α -Spaltung in Gegenwart von Sauerstoff gebildeten Peroxylradikale die dominierende Rolle spielen, während direkte Oxidation von dG durch angeregte Zustände nicht oder nur in untergeordnetem Maße stattfindet.

Die Bildung von kohlenstoffzentrierten Radikalspezies (Schema 7.2) bei der



Schema 7.2: Bildung von kohlenstoffzentrierten Radikalen bei der Thermolyse von Dioxetan **1**

Dioxetanthermolyse wurde durch Radikalabfangexperimente mit DMPO und anschließender EPR-spektroskopischer Untersuchung bestätigt. Die Tatsache, dass hierbei nur ein Hydroxymethylradikal-, aber kein Benzoylradikaladdukt detektiert wurde, wurde auf die Instabilität des DMPO-Benzoylradikaladduktes bei hohen Temperaturen (80 °C) zurückgeführt. So konnte gezeigt werden (siehe V-B13 und V-B14), dass das DMPO-Benzoylradikaladdukt bereits bei 20 °C sich innerhalb einer Stunde nahezu komplett zersetzt. Derart hohe Temperaturen sind nötig, da sich das Dioxetan **1** bei Temperaturen <65 °C nicht mehr ausschließlich zu angeregten Carbonylverbindungen zersetzt (Tabelle 7.1), sondern bei 37 °C bereits zu >50% in einer nicht weiter charakterisierten Dunkelreaktion abreagiert. Durch Zugabe von dG bei der Dioxetanzersetzung ändert sich die freigesetzte Lichtmenge nur unwesentlich, dies schließt eine direkte Oxidation von dG durch das Dioxetan aus.

7.3 Schlussfolgerung

Es lässt sich sagen, dass das Dioxetan **1** triplettangeregtes AP-OH freisetzt, das dann wie bereits im Kapitel zuvor beschrieben, Radikale freisetzt, die für die beobachtete dG-Oxidation verantwortlich gemacht werden.

8 Ausblick

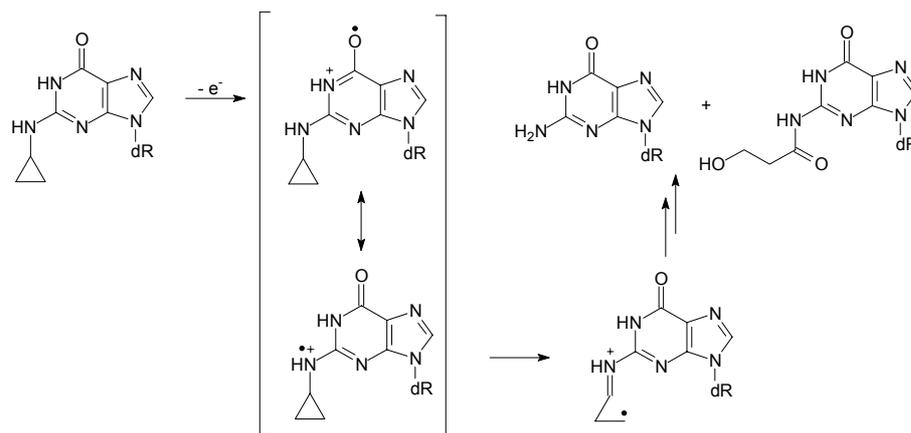
In dieser Arbeit wurde die Reaktivität unterschiedlicher peroxyradikalbildender elektronisch angeregter Ketonspezies gegenüber DNA und der Modellbase dG untersucht und miteinander verglichen. Es wurde gezeigt, dass diese in isolierter DNA die Base Guanin oxidieren sowie in geringem Ausmaß Strangbrüche induzieren. Um Hinweise auf die Reaktionsmechanismen zu erhalten, sollten hierzu weitere mechanistische Studien bezüglich der Oxidation von Guanin durchgeführt werden. Weiter wäre es wünschenswert, neben der Hauptreaktivität gegenüber Guanin die eingesetzten Acetophenonderivate auch auf eine evt. Reaktivität gegenüber anderen DNA-Basen zu untersuchen um schließlich ein komplettes Reaktionsmuster der reaktiven Spezies (angeregte Zustände und Peroxyradikale) gegenüber DNA zu erhalten. Schließlich sollten Vergleichsexperimente mit anderen Peroxyradikalquellen Aufschluss darüber bringen, inwiefern sich die jeweils zwei unterschiedlichen, bei der AP-OR-Photolyse gebildeten Peroxyradikale in ihrer Reaktivität gegenüber DNA unterscheiden. So ist davon auszugehen, dass das Benzoylperoxyradikal (Schema 3.2) ein stärkeres Oxidationsmittel darstellt als herkömmliche (Alkyl-)Peroxyradikale, im Fall von AP-OH soll der Einfluss der Hydroxylgruppe auf die Reaktivität der Peroxyradikale untersucht werden.

8.1 Mechanistische Untersuchungen

Zur Absicherung der angegebenen Mechanismen wäre es wünschenswert, genauere Informationen über die Identität und Weiterreaktion der postulierten Zwischenstufen zu erlangen.

8.1.1 Nachweis der Bildung von Radikalkationen als Zwischenstufen

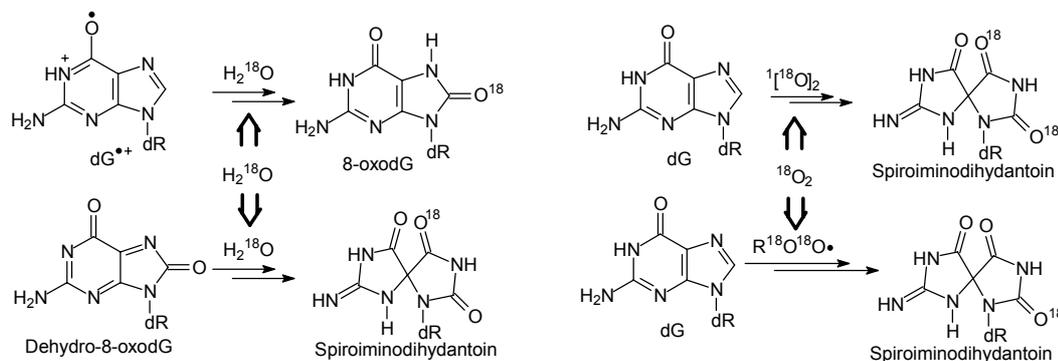
Zum Nachweis von Radikalkationen in der durch AP, AP-OAc und BP verursachten Oxidation von dG und DNA sowie zur Untersuchung der peroxyradikalinduzierten Oxidation sollten Experimente mit N^2 -Cyclopropyldeoxyguanosin durchgeführt werden. In Versuchen mit diesem Nukleosid kann die Bildung von Radikalkationen bei der Nukleosidoxidation, in Versuchen mit in Oligonukleotide eingebautem N^2 -Cyclopropyldeoxyguanosin die Bildung von Radikalkationen in DNA nachgewiesen werden (Schema 8.1).²¹¹



Schema 8.1: Nachweis von Guaninradikalkationen mit Hilfe eines „Elektronenlochfängers“

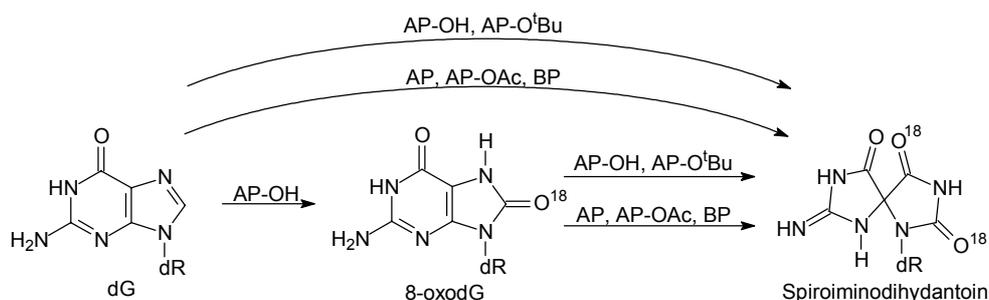
8.1.2 Experimente mit ^{18}O -markiertem molekularem Sauerstoff sowie ^{18}O -markiertem Wasser

Um die Mechanismen der durch Ketone induzierten Oxidation von dG weiter zu untersuchen, wären Versuche mit ^{18}O -markiertem Sauerstoff hilfreich. Hier soll sowohl $^{18}\text{O}_2$ als auch H_2^{18}O eingesetzt werden um herauszufinden, woher die inkorporierten Sauerstoffatome stammen. Wird das ^{18}O -Atom aus H_2^{18}O eingebaut, so deutet dies auf die Hydrolyse von kationischen oder elektrophilen, ungesättigten Verbindungen hin. Wird hingegen $^{18}\text{O}_2$ eingebaut, wäre dies ein Hinweis auf Radikalchemie oder jedoch die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff (Schema 8.2). Es bieten sich verschiedene Reaktionstypen für eine



Schema 8.2: Einbau von H_2^{18}O sowie $^{18}\text{O}_2$ bei der dG-Oxidation

derartige Studie an (Schema 8.3). So kann die Bildung von Spiroiminodihydantoin aus dG sowie aus 8-oxodG, jeweils für die radikalbildenden und die nichtradikalbildenden Ketone untersucht werden. Außerdem sollte die Bildung von 8-oxodG in der durch AP-OH induzierten Photooxidation von dG auf den Einbau von ^{18}O -Atomen aus $^{18}\text{O}_2$ oder H_2^{18}O untersucht werden.



Schema 8.3: Mögliche Reaktionen, die auf den Einbau eines ^{18}O -Atoms untersucht werden sollten

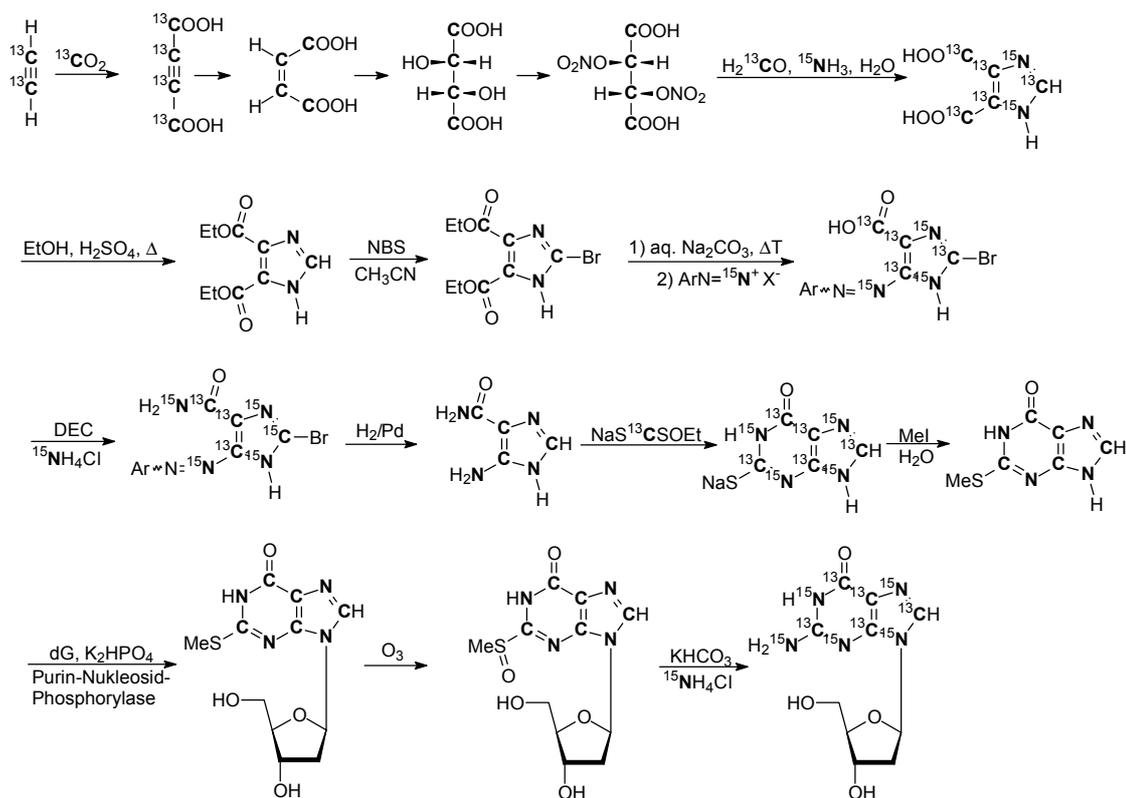
8.1.3 Einfluss / Beteiligung von Superoxidradikalanionen

Nachdem kürzlich für die Typ-I-Oxidation von acetyliertem dG durch Riboflavin ein pH-abhängiger Einfluss von Superoxidradikalanionen festgestellt wurde¹⁷⁵, die im basischen Medium die Reaktivität beeinflussen, wäre es aufschlussreich, auch die Typ-I-Photooxidation durch die Acetophenonderivate auf einen derartigen Effekt hin zu untersuchen. Sofern in Gegenwart von Sauerstoff geringe Mengen an Superoxidradikalanionen gebildet werden, sollte durch Zusatz von Superoxiddismutase versucht werden, diese zu zerstören. Sofern während der Ketonphotolyse kein $\text{O}_2^{\bullet-}$ gebildet wird, soll KO_2 zugesetzt werden. Wenn ein Einfluss von $\text{O}_2^{\bullet-}$ festgestellt wird, können ebenfalls Markierungsexperimente mit $^{18}\text{O}_2^{\bullet-}$ durchgeführt werden, in denen detektiert werden soll, wie viele der zwei Sauerstoffatome in den verschiedenen Oxidationsprodukten wieder zu finden sind. Lässt sich der Einfluss der Superoxidradikalanionen auf die Oxidation von dG verallgemeinern, so entspricht dies einem bisher in der gesamten Diskussion um die dG Oxidation vernachlässigten Aspekt, nämlich der Wechselwirkung von unterschiedlichen bei der Oxidation entstehenden Intermediaten untereinander (z. B. Reaktion des Superoxidradikalanions mit dem $\text{dG}^{\bullet+}$ -Radikalkation), da die Superoxidradikalanionen gegenüber dG unreaktiv sind.

8.1.4 Synthese von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem dG

Ein großer Nachteil bei der Charakterisierung der Oxidationsprodukte ist der geringe Anteil NMR-aktiver Kerne im Basenteil, der oftmals eine schlüssige Zuordnung des Grundgerüsts unmöglich macht. Kopplungen zwischen ^{13}C - und ^{15}N -Kernen sind nur durch Einsatz großer Mengen an Oxidationsprodukt zu erhalten, welche oft nur schwer zugänglich sind. Abhilfe schaffen würde die Synthese von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -angereichertem dG. Nach der Oxidation können dann durch CC und CN-Korrelation alle Konnektivitäten des Basenoxidationsproduktes

aufgeklärt werden. Eine Synthesemöglichkeit ist in Schema 8.4 dargestellt. Durch den Einsatz



Schema 8.4: Synthese von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem dG

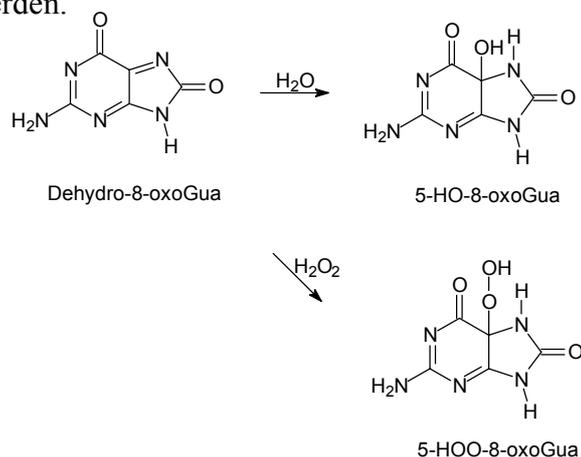
von derartig markiertem dG in den Oxidationsreaktionen können in Zukunft Fehlinterpretationen wie die Verwechslung von 4-HO-8-oxodG und der Spiroiminodihydantoinverbindung vermieden werden. Neben einer zuverlässigen Zuordnung der Spiroiminodihydantoinstruktur wäre damit eine Überprüfung der Strukturen sämtlicher dG-Oxidationsprodukte möglich, die bisher meist nur mittels MS und eindimensionaler ^{13}C -NMR- sowie ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt wurden. Einfaches Durchführen der Reaktion im NMR-Maßstab und anschließende Messung eines Inadequate-Spektrums würde die aussagekräftigen Konnektivitäten des Kohlenstoffgerüsts liefern.

8.2 Synthese der postulierten Zwischenstufen und Untersuchung ihrer Reaktivität

Um den Mechanismus der Einelektronenoxidation von dG sowie 8-oxodG zu untermauern, wäre es wünschenswert, 5-HO-8-oxodG zu isolieren und zu charakterisieren. Da es als thermisch labil beschrieben wurde,¹⁷⁵ muss dies bei tiefen Temperaturen geschehen, im

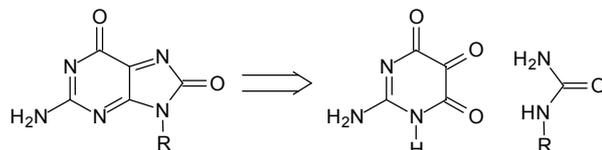
8 AUSBLICK

Anschluss können die thermischen Zersetzungsprodukte bestimmt werden. Da für die Reaktion in Anwesenheit von Sauerstoff auch 5-HOO-8-oxodG postuliert wurde¹⁷⁶ soll auch dieses hergestellt werden. Beides sollte durch Addition von H₂O bzw. H₂O₂ an Dehydro-8-oxodG, welches eine weitere wichtige Zwischenstufe darstellt,¹⁶⁶ möglich sein (Schema 8.5); anschließend soll ihre Reaktivität (Halbwertszeit, Produkte) in wässriger Lösung untersucht werden.



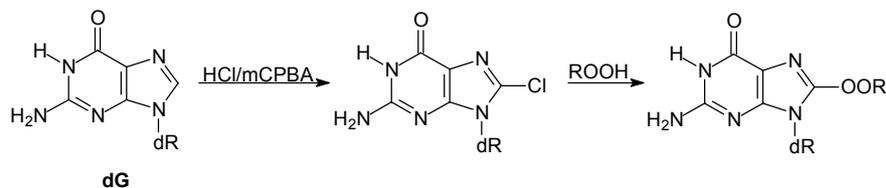
Schema 8.5: Synthese von 5-HO-8-oxodG und 5-HOO-8-oxodG

Die Synthese von alkyliertem Dehydro-8-oxoGua soll wiederum ausgehend von 2-Aminoalloxan und alkyliertem Harnstoff durch Dehydratisierung und säulenchromatographische Aufreinigung des Produktgemischs erfolgen (Schema 8.6).



Schema 8.6: Synthese von Dehydro-8-oxoGua aus 2-Aminoalloxan und Harnstoff

Um den Mechanismus der Oxidation von dG durch Peroxylradikale weiter aufzuklären, sollte ein Peroxylradikal-Addukt an der C8-Position von dG synthetisiert werden (Schema 8.7, z. B.



Schema 8.7: Synthese von 8-ROO-dG

R=^tBu) und analog den oben beschriebenen Verbindungen auf seine Reaktivität in wässriger Lösung hin untersucht werden.

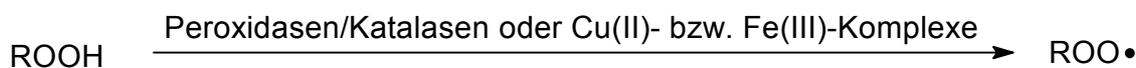
8.3 Untersuchungen an zellulärer DNA

Da die durchgeführten Studien alle mit isolierter DNA durchgeführt wurden, wäre der nächste Schritt, die Oxidation von DNA in zellulärer Umgebung zu untersuchen. Hierzu bietet sich der Comet-Assay²¹² an, bei dem die aus den vorbehandelten Zellen gewonnene DNA gelelektrophoretisch untersucht wird. Durch den Einsatz von Reparaturenzymen²¹³ lassen sich dabei auch Basenmodifikationen nachweisen, die nicht direkt zum Strangbruch führen.

8.4 Untersuchung anderer Peroxylradikalquellen

8.4.1 Oxidation von Hydroperoxiden

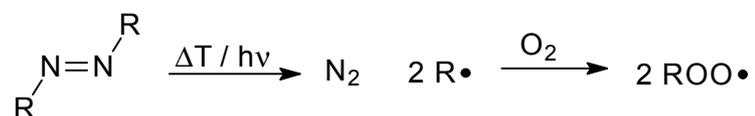
Eine Möglichkeit der Generierung von Peroxylradikalen besteht in der H-Abstraktion von Hydroperoxiden. Verwendet man entsprechend substituierte Hydroperoxide, so lassen sich dadurch enzymatisch oder metallkatalysiert die gewünschten Peroxylradikalspezies freisetzen^{93,214} und auf ihre Reaktivität hin untersuchen (Schema 8.8).



Schema 8.8: Bildung von Peroxylradikalen durch H-Abstraktion von Hydroperoxiden

8.4.2 Thermolyse von Azoverbindungen

Peroxylradikale lassen sich auch durch Thermolyse und Photolyse aus Azoverbindungen herstellen.²¹⁵ Hierbei werden in einem ersten Schritt kohlenstoffzentrierte Radikale gebildet, die von O₂ abgefangen werden (Schema 8.9). Hiermit wäre zusätzlich der direkte Vergleich



Schema 8.9: Bildung von Peroxylradikalen aus Azoverbindungen

von symmetrisch substituierten Azoverbindungen, die nur eine Art von Peroxylradikalen freisetzen mit unsymmetrisch substituierten, die zwei verschiedene Peroxylradikale freisetzen (analog der Ketonphotolyse), möglich. Dadurch können Studien über die Reaktivität unterschiedlich substituierter Peroxylradikale durchgeführt werden.

9 Experimentalteil

9.1 Allgemeine Vorbemerkungen

9.1.1 Geräte für spektroskopische und analytische Untersuchungen

9.1.1.1 NMR-Spektroskopie

¹H-NMR-Spektroskopie: Bruker AC 200 (200 MHz)

Bruker AC 250 (250 MHz)

¹³C-NMR-Spektroskopie: Bruker AC 200 (50 MHz)

Bruker AC 250 (63 MHz)

HMBC/HMQC-Messungen: Bruker Advance 400 (400 MHz)

Inadequate-Messungen: Bruker QF 600 (600 MHz)

9.1.1.2 Sonstige Spektroskopie

EPR-Spektroskopie: Bruker EPR 300

UV-VIS-Spektroskopie: Hitachi U-3200 Spektrophotometer

IR-Spektroskopie: Perkin-Elmer FT-IR Spectrophotometer 1605

9.1.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Anlage 1:

Pumpen: zwei Pumpen der Firma Bischoff (Leonberg, Deutschland)
Modell 2200 mit analytischen Pumpenköpfen
(0.01 - 5.00 mL/min) und Hinterkolbenspülung

Mischkammer: Hochdruckmischkammer der Firma Bischoff (Leonberg,
Deutschland)

Probenaufgabe:	Rheodyne 7125 Injektor mit 100 µl Probenschleife
UV-Detektor:	Waters 994 (programmierbarer Photodiodenarraydetektor mit zwei Kanälen)
Fluoreszenzdetektor:	Bischoff 8450 Fluorescence HPLC Monitor (Shimadzu RF 551 Spektrofluorometer)
Datenaufnahme:	Die Datenaufnahme und –auswertung sowie die Pumpensteuerung erfolgte mit einem Zweikanal-Chromatographie-Daten-System PEAKMASTER 3 der Firma Harley Systems.

Anlage 2:

Pumpe:	Firma Bischoff (Leonberg, Deutschland) Modell 2200 mit analytischem Pumpenkopf (0.01-5.00 mL/min) und Hinterkolbenspülung
Probenaufgabe:	Rheodyne 7125 Injektor mit 100 µl Probenschleife
UV-Detektor:	Diodenarraydetektor SpectraFlow 600 der Firma SunChrom (Friedrichsdorf, Deutschland)
Elektrochemischer Detektor:	ESA (Berlin, Deutschland) Coulochem 5100A mit „high sensitive analytical cell“ 5011
Datenaufnahme:	Die Daten des Photodiodenarraydetektors und des elektrochemischen Detektors wurden mit der Software ChromStar 5.0 Release 9 sowie deren Vorgängerversionen der Firma SCPA aufgenommen sowie ausgewertet.

Die Messproben wurden manuell mittels einer 25µL-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) über Rheodyne-Injektionsventile Modell 7125 (Berkeley, CA, USA) oder mit Hilfe eines Autosamplers Basic Marathon Plus (Spark, Emmen, Niederlande) injiziert. Die Verbindungen

zwischen den Pumpen, den Injektionsventilen, dem Autosampler und den Säulen bildeten Edelstahl- sowie PEEK-Kapillaren (1.6x0.25 mm) der Firmen Knauer (Berlin) sowie Upchurch.

9.1.1.4 Gelelektrophorese

Elektrophoresekammer: DNA-Horizontal-Elektrophoresekammer (GNA 100) der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) mit einem „Gene power supply“ (GPS 200/400)

Kamera: Herolab E.A.S.Y. 429 K (Herolab Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland)

UV-Schirm: 366 nm

Software: Herolab E.A.S.Y. Plus (Herolab Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland)

9.1.1.5 Chemilumineszenzmessungen

Photometer: Mitchell-Hastings Photometer mit Photomultiplier 926B der Firma RCA.

Thermostat: Lauda K20 Umwälzthermostat

Schreiber: BBC GOERZ Servogor Z10

Probengefäße: Szintillationsröhrchen der Firma Beckmann

9.1.1.6 Bestrahlungsexperimente

Rayonet-Photoreaktoren: RPR-100 der Firma Southern New England Ultraviolet Company, Branford, CT 06405, USA mit 16 UV-Lampen (RPR 3000, 300 nm), Leistung je 24 W

Thermostat: RKT-20-D der Firma Wobser (Lauda-Königshofen, Deutschland)

9.1.1.7 Photooxygenierungsapparatur

Lampen: 1 Osram VIOLAX NAV-E 250 W Natriumdampf Lampe in Kombination mit einer Osram VIOLAX NAV-T (SON-T) 400 W Natriumdampf Lampe

Sauerstoff: Der eingesetzte Sauerstoff wurde vor Zufuhr in die Reaktionslösung zur Trocknung über CaCl_2 , Blaugel und P_2O_5 geleitet.

9.1.1.8 Bestrahlung zur Herstellung von TEMPO-Benzoyl

Lampe: Quecksilberdampf Lampe Heraeus TQ 150, 150 W

Filter : Schott WG 400, $\lambda > 400 \text{ nm}$

9.1.1.9 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie: Silicagel-Folien mit Fluoreszenzfarbstoff Polygram SIL G/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

FLASH-Säulenchromatographie: Kieselgel 32-64 μM der Firma Woelm (Erlangen, Deutschland), Adsorbens/Substrat-Verhältnis ca. 100:1

9.1.1.10 Zeitaufgelöste Laserblitz-Photolyse

Laser: Lambda Physik EMG 101 MSC XeCl-Excimerlaser
($\lambda = 308 \text{ nm}$)

Auswertung: MacFitFlash 2.0.1 von A.H.R.B Software Corporation Basel

9.1.1.11 Sonstiges

pH-Meter: pH-Werte wurden mit einem pH-Meter der Firma Wissenschaftlich Technische Werke (WTW, Weilheim, Deutschland), kombiniert mit einer pH-Elektrode LIQ-GLASS der Firma Hamilton (Bonaduz, Schweiz) bestimmt.

Pipetten: Kontinuierlich einstellbare Mikroliterpipetten der Firma Gilson (Villiers le Bel, Frankreich) in den Größen 2, 20, 100, 200 und 1000 μL , der Firma Eppendorf (Köln, Deutschland, 20, 200 μL) sowie der Firma Brand (Wertheim, Deutschland, 1000 μL).

Reaktionsgefäßschüttler: GLW L46 (Vortex) der Firma Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

Zentrifuge: Hettich Mikroliter-Zentrifuge mit Rotor für 24 Eppendorf-Reaktionsgefäße

Vakuumkonzentrator: Bachofer mit Schwingrotor SRQ-Swing-44 und Vakuumölpumpe Bachofer (Saugleistung 5 m^3/h , ca. $2 \cdot 10^{-2}$ Torr)

Thermostaten: Lauda K20
Lauda RK20
Lauda C20 - Umwälzthermostat

Rotationsverdampfer:	Büchi Rotavapor RE111 mit Membranpumpe Vacuumbrand MZ 2C
Kugelrohrdestillation:	Büchi GKR 50
Milli-Q-Anlage:	Millipore Milli-Q Reagent Grade Water Systems
Elementaranalysen:	Mikroanalytische Abteilung des Instituts für Anorganische Chemie, Universität Würzburg
Schmelzpunkte:	Büchi B-545
Eisbadständer:	Hartenstein (Würzburg), für 50 Proben

9.1.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Kommerziell erhältliche Reagenzien wurden, soweit nicht anders erwähnt, ohne weitere Reinigung eingesetzt. Für die Arbeiten wurden ausschließlich Reagenzien von höchstem Reinheitsgrad verwendet. Die Reinigung und Trocknung der eingesetzten Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Methoden.²¹⁶ Entionisiertes Wasser wurde mit Hilfe einer Millipore Milli-Q Anlage weiter aufgereinigt. Sofern für DNA- und dG-Experimente keine Lösungsmittel von mindestens HPLC-Qualität zur Verfügung standen wurden diese per Destillation gereinigt. Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Ethidiumbromid für biochemische Zwecke, 2'-Desoxyguanosin (dG), Borsäure, Dinatriumhydrogenphosphat, *Kalbsthymus* DNA, *tert*-Butanol und Deuteriumoxid (98.5%) wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. pBR 322 DNA (Form I, MW 2.9×10^6 D, 4365 bp) wurde von Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) sowie MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) gekauft. Agarose wurde von Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland) erhalten. Guanin, Fluorwasserstoff/Pyridin-Komplex (70%ige HF in Pyridin), 3 M wässrige Natriumacetat-Lösung (bioanalytische Reinheitsstufe), Ammoniumformiat (97%), Guanidin-Hydrochlorid, Hydroxyaceton, Trimethyloxoniumtetrafluoroborat, Bengalrosa B, 18-Krone-6 und DMPO wurden von Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) bezogen. Methanol (HPLC-Qualität), Acetonitril (HPLC-Qualität) wurden bei Acros Chimica (Geel, Belgien), Zitronensäure (p. A.),

Natriumhydrogenphosphat (p. A.), Natriumhydroxid (p. A.), Kaliumdihydrogenphosphat (p. A.) sowie Kalziumcarbonat stammen von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland). Natrium-1,2-naphthochinon-4-sulfonat, Bromphenolblau „gel loading solution“, 2-Amino-6,8-dihydroxypurin (8-oxoGua), Acetophenon (AP), Benzophenon (BP), α -Hydroxyacetophenon (AP-OH), α -Methoxy-Acetophenon (AP-OMe) sowie Tris(hydroxymethyl)aminomethan wurde von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Peressigsäure 40% in Essigsäure wurde von Kesla Pharma Wolfen (Wolfen, Deutschland) erhalten, 2,3-Dimethylbut-2-en von Hoechst (Frankfurt, Deutschland). Pyridin wurde bei Grüssing (Filcum, Deutschland) gekauft. Tetraphenylporphyrin wurde im Rahmen des Praktikums Biologie I von den Biologiestudenten synthetisiert. Magnesium, 2-Brompropan, Schwefelsäure, Essigsäure sowie NaOH wurden von der Chemikalienausgabe des Instituts für organische Chemie der Universität Würzburg bezogen.

9.1.3 Sicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit Peroxiden

Die Handhabung von Peroxiden sowie Persäuren erfordert äußerste Vorsicht, da diese Verbindungen sich explosionsartig zersetzen können. Dies gilt insbesondere für die instabilen Dioxetane. Wichtige Schutzmaßnahmen wie das Tragen von Handschuhen und Schutzbrillen sollten unbedingt getroffen werden. Dioxetane sollten keinesfalls längere Zeit in reinem Zustand bei Raumtemperatur gelagert werden. Jeglicher Kontakt mit Metallen muss vermieden werden, zum Umfüllen müssen Plastikspatel verwendet werden. Die Aufbewahrung erfolgt bei Temperaturen $<-20\text{ °C}$. Beim Umgang mit Hydroperoxiden und Dioxetanen muss aufgrund ihrer Toxizität ein direkter Hautkontakt vermieden werden.

9.1.4 Arbeitsmethoden

Reaktionslösungen wurden mit einem Rührfisch mittels einem Magnetrührer gerührt, Lösungen in Eppendorf-Gefäßen wurden mit Hilfe eines Reaktionsgefäßschüttlers vermischt. Die angegebenen Reaktionstemperaturen beziehen sich auf die Temperatur des das Reaktionsgefäß umgebenden Mediums.

Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, am Rotationsverdampfer bei 10-40 Torr abdestilliert. Das Entfernen von Lösungsmitteln aus Eppendorf-Gefäßen erfolgte wie auch das

Gefriertrocknen in einem Vakuum-Konzentrator mit einem Schwingrotor, der über eine Kühlfalle (-60 °C) mit einer Vakuumpumpe verbunden war.

Für Versuche unter Sauerstoffausschluss wurden die Lösungsmittel durch jeweils mindestens drei „freeze-pump-thaw“-Zyklen entgast. Weitere Angaben finden sich bei den jeweiligen Allgemeinen Arbeitsvorschriften (AAV). Sofern bei den Versuchen oder im Text nicht anders angegeben, fanden die Versuche unter Laboratmosphäre statt.

9.1.4.1 Ausbeuten

Ausbeuten beziehen sich soweit nicht anders angegeben auf das isolierte, gereinigte Produkt und wurden gravimetrisch bestimmt.

9.1.4.2 Mittelwerte und Standardabweichungen

Sofern nicht anders angegeben handelt es sich hierbei um aus zwei Versuchen berechnete Werte.

9.1.4.3 Bestrahlung bei photochemischen Reaktionen

Bestrahlungen wurden (abgesehen von den Photooxygenierungen) in Rayonet-Photoreaktoren, die mit Lampen der Wellenlänge 300 nm bestückt waren, durchgeführt. Dazu wurden die Proben in Glasgefäße gefüllt, welche zwischen zwei Petrischalen gestellt wurden und in einem dickwandigen Dreiliterbecherglas bestrahlt wurden. Zur Kühlung wurde das Becherglas zu ca. 1 cm mit Ethanol gefüllt welches durch eine Glaskühlschleife mit Hilfe eines Kryostaten auf 0 °C gekühlt wurde. Belichtungen in Eppendorfgläsern wurden durchgeführt, indem dem Rayonet-Photoreaktor auf einer Seite vier Lampen entnommen wurden, so dass man nach Kippen des Reaktors an deren Stelle die in einem Eisbadständer steckenden Eppendorfgläser bestrahlen konnte. Diese wurden mittels eines durch ein Eisbad geführten Kühlmittelschlauch auf 0 °C gekühlt.

9.1.4.3.1 *Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zur Bestrahlung unter Laboratmosphäre (AAV-1)*

Zur Bestrahlung von HPLC-Proben unter Laboratmosphäre wurde ein 300 nm-Rayonet-Photoreaktor verwendet, in den ein dickwandiges 3L-Becherglas gestellt wurde. In diesem Becherglas befanden sich zwei Petrischalen, so dass ein Ring entstand, in den man ca. 24 3 mL-Präparatgläschen mit einem Durchmesser von ca. 1 cm stellen konnte. In diese Präparatgläschen wurde die zu bestrahlende Lösung gegeben. Zur Kühlung wurde ca. 1 cm hoch Ethanol in das Becherglas gefüllt und mit einem Kryostaten auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde für die gewünschte Zeit bestrahlt. Ausnahme: Die Bestrahlung der Acetonderivate zur Oxidation von DNA (V-A11 und V-A12) erfolgte wegen deren geringen Absorptionskoeffizienten ohne Becherglas. Hier wurden die Gläschen bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) mitten in den Photoreaktor gestellt.

9.1.4.4 **Chromatographische Methoden**

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden fluoreszenzfarbstoffbeschichtete Silicagel-Folien verwendet. Hydroperoxide sowie Dioxetane wurden durch Aufsprühen einer 10%igen wässrigen Kaliumiodidlösung bei Raumtemperatur sichtbar gemacht, bei Dialkylperoxiden wurde die DC-Platte nach Auftragen der KI-Lösung mit einem Heissluftföhn erhitzt. Alle anderen Verbindungen wurden durch Fluoreszenzlöschung bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) detektiert.

Für die präparative Säulenchromatographie wurde stets Kieselgel als stationäre Phase verwendet, das Eluens ist bei den Versuchen angegeben. Zur Tieftemperatur-Säulenchromatographie wurden Säulen mit Kühl- und Vakuummantel benutzt; die Kühlung erfolgte mit einem Kryostaten (sofern nicht anders angegeben auf -20 °C). Bei allen säulenchromatographischen Reinigungen handelt es sich um Blitzsäulenchromatographie, der Druck wurde mit einem Halbgebläse aufgebaut.

9.1.4.5 HPLC-Methoden

Die Eluenten wurden, um keine Feststoffe in die HPLC einzuführen, vor Gebrauch unter Vakuum durch einen Membranfilter (0.05 μ M regenerierte Nitrocellulose) filtriert. Neben vollständiger Durchmischung wird hierdurch eine ausreichende Entgasung gewährleistet.

Methode 1

Säule: Eurospher-100, C18, Partikelgröße 7 μ m,
Abmessungen 250 x 4.6 mm (Knauer, Berlin)
Eluens: 50 mM Natriumcitratpuffer (pH 5.0) / Methanol (90:10)
Fluss: 1.0 mL/min
Detektion: UV (λ = 254 nm) für die DNA-Basen
Guanin, Thymin, Cytosin sowie Adenin,
elektrochemischer Detektor (E = + 350 mV) für 8-oxoGua

Methode 2

Säule: Eurospher-100, C18, Partikelgröße 7 μ m,
Abmessungen 250 x 4.6 mm (Knauer, Berlin)
Eluens: 50 mM Natriumcitratpuffer (pH 5.0) / Methanol (80:20)
Fluss: 1.0 mL/min
Detektion: UV (λ = 254 nm) für dG
elektrochemischer Detektor (E = + 450 mV) für 8-oxodG

Methode 3

Säule: LiChrospher-100, NH₂, Partikelgröße 5 μ m,
Abmessungen 250 x 4.0 mm (Knauer, Berlin)
+ Vorsäule mit den Abmessungen 10 x 4.0 mm
Eluens: 25 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 7.0) / Acetonitril (30:70 bis 15:85, je
nach Zustand der Säule)
Fluss: 1.0 mL/min
Detektion: UV (λ = 230 nm) für Spiroiminodihydantoin

Zu dieser Methode ist anzumerken, dass aminosubstituierte Kieselgelsäulen unter den angegebenen Bedingungen recht kurze Standzeiten aufweisen. Durch Ketone, Aldehyde, Peroxide, aber vor allem durch den eingesetzten Ammoniumformiatpuffer wird das Packungsmaterial angegriffen, weshalb die Säule jeweils nach Gebrauch mit einer Wasser/Acetonitrilmischung im gleichen Verhältnis gespült wurde. Wenn die Retentionszeiten von Spiroiminodihydantoin zu kurz wurden, wurde der Acetonitrilanteil des Eluens erhöht um weiterhin eine gute Trennung zu ermöglichen. Das nicht kommerziell erhältliche Spiroiminodihydantoin wurde von A. Schönberger im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert¹³⁶ und bei – 50 °C gelagert.

Methode 4

Säule: Eurospher-100, C18, Partikelgröße 5 µm,
Abmessungen 250 x 4.6 mm (Knauer, Berlin)
Eluens: 25 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 7.0) / Methanol (90:10)
Fluss: 1.0 mL/min
Detektion: Fluoreszenzdetektor ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$)

Methode 5

Säule: Eurospher-100, C18, Partikelgröße 7 µm,
Abmessungen 250 x 4.6 mm (Knauer, Berlin)
Eluens: Wasser : Acetonitril (15:85)
Fluss: 1.0 mL/min
Detektion: UV ($\lambda = 240 \text{ nm}$)

Bei den Methoden 1 und 2 wurde der UV-Detektor hinter den elektrochemischen Detektor geschaltet, da dieser einen Druck aufbaut, der die Zelle zerstören würde, was die Detektion der DNA-Basen bzw. von dG jedoch nicht beeinträchtigt. Quantifizierung der Peaks erfolgten unter Verwendung authentischer Vergleichsverbindungen als externe Standards, welche gravimetrisch eingewogen wurden (Einwaage > 5 mg, Wägefehler $\pm 0.03 \text{ mg}$). Zur Herstellung des äußerst schwer in Wasser löslichen 8-oxoGua-Standards wurde der Standardlösung einige Tropfen 1N NaOH (zu ca. 5 mg 8-oxoGua in 500 mL H₂O) zugesetzt und die Lösung einige Minuten im Ultraschallbad auf ca. 40 °C erhitzt. Die Standardlösungen

für 8-oxoGua müssen wegen ihrer Instabilität vor jeder Messung frisch angesetzt werden. Die Stammlösungen für 8-oxodG, Spiroiminodihydantoin sowie Guanidin-Hydrochlorid wurden durch Lösen in Milli-Q-Wasser hergestellt und sind bei -20 °C über ein Jahr stabil.

9.1.4.5.1 Herstellung der Puffer

50 mM Natriumcitratpuffer pH 5.0: Der für die elektrochemische Detektion nötige Natriumcitratpuffer wurde durch Lösen von 10.5 g (50.0 mmol) Zitronensäuremonohydrat in 500 mL Milli-Q-Wasser, Titration mit 5 N Natronlauge auf pH 5.0 und Auffüllen auf 1000 mL hergestellt.

25 mM Ammoniumformiatpuffer pH 7.0: Der für die Detektion der guanidinfreisetzenden Produkte (GRP) sowie zur Detektion von Spiroiminodihydantoin verwendete Ammoniumformiatpuffer wurde als 500 mM Stammlösung angesetzt und vor der Verwendung auf 25 mM verdünnt.

9.1.4.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 zur Detektion oxidativer Basenschäden in CT-DNA (AAV-2)

9.1.4.6.1 Herstellung der Puffer

200 mM Phosphatpuffer pH 7.0: Der für die Oxidationsexperimente eingesetzte Phosphatpuffer wurde als 200 mM Stammlösung hergestellt und anschließend auf die Endkonzentration verdünnt. Es wurde jeweils eine 200 mM Lösung von KH_2PO_4 (2.72 g in 100 mL Wasser) und $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (7.16 g in 100 mL Wasser) in Milli-Q-Wasser hergestellt. Anschließend wurden diese gegeneinander titriert, bis sich ein pH-Wert von 7.0 einstellte. Die Pufferlösung sollte im Kühlschrank bei 4 °C nicht länger als einen Monat aufbewahrt werden. Für Phosphatpuffer in D_2O gilt eine analoge Vorschrift, um dieselbe Protonenstärke wie in H_2O zu erhalten, müssen zum abgelesenen pH-Wert 0.4 Einheiten addiert werden. ($\text{pD} = \text{pH} + 0.4$).²¹⁷

9.1.4.6.2 Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen

Für die DNA-Versuche wurde die kommerziell erhältliche lyophilisierte CT-DNA in Milli-Q-Wasser gelöst (langsam über Nacht mit dem Magnetrührer gerührt) und anschließend, nach Filtration die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurde je nach Konzentration der Lösung eine Lösung mit einer Absorption von ungefähr 1.0 bei 260 nm hergestellt und anhand des allgemein für DNA gebräuchlichen Literaturwertes die Konzentration ausgerechnet ($A_{260\text{ nm}} = 1.0$ bei 50 mg/L DNA).²¹⁸

9.1.4.6.3 Durchführung DNA-Oxidationsexperimente

Sofern nicht anders angegeben, betrug die Konzentration an CT-DNA jeweils 0.100 mg/mL. Die Bestrahlung in Gegenwart des jeweiligen Ketons (die eingesetzten Konzentrationen sind im Versuch angegeben) erfolgte in durch Phosphatpuffer pH 7.0 gepufferten wässrigen Lösungen mit 10% Acetonitril als Kosolvens. Während der Bestrahlung wurden die Proben auf 0 °C gekühlt. Die Dioxetanthermolysen wurden bei 37 °C durchgeführt (15 h), die sonstigen Reaktionsbedingungen sind analog der Photooxidation durch Bestrahlung der Ketone.

9.1.4.6.4 Aufarbeitung

Jeder Probe wurden 100 µL Lösung für die Bestimmung von 8-oxoGua entnommen und in Eppendorfgefäße (1.5 mL) überführt. Anschließend wurde zweimal mit je 200 µL Essigsäureethylester ausgeschüttelt, die wässrige Phase mit 11.0 µL einer 3M Natriumacetatlösung versetzt, geschüttelt, zentrifugiert und in ein Eisbad gestellt. Durch Zugabe von 300 µL kaltem (-50 °C) Ethanol, kurzem Schütteln und Aufbewahren der Probe bei -50 °C für mindestens 24 h wurde die DNA ausgefällt. Die noch kalte Lösung wurde für 3 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das DNA-Pellet für mindestens eine Stunde im Vakuumkonzentrator getrocknet. Man erhält ein DNA-Pellet (10 µg). Dieselbe Prozedur (doppelter Ansatz) erfolgte mit 200 µL Lösung zur Bestimmung der guanidinfreisetzenden Produkte (GRP) und ergibt ebenfalls ein DNA-Pellet (20 µg).

9.1.4.6.5 DNA-Hydrolyse / Detektion Basenumsatz sowie 8-oxoGua-Bildung

Die HF/Pyridinlösung wurde wegen der gefährlichen Handhabung sowie der Hydrolyseempfindlichkeit bei Anlieferung unter Argon in verschraubbare 2-mL-Eppendorfgefäße portioniert (jeweils ca. 200 μL) und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Bei der Arbeit mit der stark rauchenden, ätzenden und giftigen HF/Pyridinlösung muss im Abzug gearbeitet sowie Handschuhe getragen werden. Weiterhin ist darauf zu achten, dass die HF/Pyridinlösung immer gut gekühlt bleibt. Ein Kontakt mit Haut und Atmungsorganen ist strikt zu vermeiden.

Zur für die 8-oxoGua-Bestimmung nötigen DNA-Hydrolyse wurden die getrockneten DNA-Pellets (10 μg) jeweils mit 13 μL HF/Pyridin versetzt, intensiv geschüttelt, zentrifugiert und für 40 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ins Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße kurz zentrifugiert und in jeden Deckel zum Druckausgleich mit einer Spritzenkanüle ein Loch gestochen. Jede Probe wurde mit einer vorher angesetzten Suspension von 15 mg CaCO_3 in 200 μL Milli-Q-Wasser versetzt, 30 min intensiv geschüttelt und anschließend 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische, gekennzeichnete Eppendorfgefäße überführt und der Rückstand mit 200 μL Milli-Q-Wasser versetzt, nochmals 30 min geschüttelt und 15 min zentrifugiert und wiederum der Überstand abgenommen und zu den zuvor entnommenen Lösungen gegeben. Diese werden darauf mit Parafilm verschlossen, perforiert und gefriergetrocknet. Nach dem Gefrier Trocknen werden 100 μL Milli-Q-Wasser zugegeben und eine Stunde intensiv geschüttelt. Die so erhaltenen Lösungen der DNA-Basen wurden gemäß HPLC-Methode 1 analysiert.

9.1.4.6.6 Bestimmung der guanidinfreisetzenden Produkte (GRP)

Die DNA-Pellets (20 μg) wurden in 100 μL Milli-Q-Wasser aufgenommen und bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 h lang geschüttelt. Anschließend wurden 37.0 μL 1.00 N NaOH und 20.0 μL einer 20.0 mM wässrigen Lösung des Natriumsalzes der 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure (NQS, 5.00 g/L) zugegeben. Nach Erwärmen (9 min, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, im Wasserbad unter Lichtausschluss), wobei aus den guanidinfreisetzenden Produkten durch Hydrolyse Guanidin entsteht, wurden 443 μL 97.1 mM HCl (setzt sich zusammen aus 43.0 μL 1.00 N HCl sowie 400 μL Milli-Q-Wasser) zugesetzt, wobei sich die während der Hydrolyse braun gewordene Lösung wieder entfärbt. Die Proben wurden mittels HPLC-Methode 4 analysiert. Als Standard wurden

analog mit NQS behandelte Proben Guanidinhydrochlorid (in der Regel 100 μL 10 μM Guanidinhydrochlorid) eingesetzt.

9.1.4.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zur Detektion oxidativer Schäden an dG (AAV-3)

9.1.4.7.1 Durchführung dG-Oxidationsexperimente

Sofern nicht anders angegeben, betrug die Konzentration an dG jeweils 0.200 mM. Die Bestrahlung in Gegenwart des jeweiligen Ketons (die eingesetzten Konzentrationen sind im Versuch angegeben, in der Regel 0.400 mM = 2.00 Äquiv.) erfolgte in durch Phosphatpuffer pH 7.0 (2.00 mM) gepufferten wässrigen Lösungen mit 10% Acetonitril als Kosolvens. Während der Bestrahlung wurden die Proben auf 0 °C gekühlt.

9.1.4.7.2 Detektion des dG-Umsatzes sowie Quantifizierung von 8-oxodG

Die Proben wurden möglichst umgehend direkt aus der Reaktionslösung nach HPLC-Methode 2 analysiert. Die Quantifizierung des dG-Umsatzes erfolgt jeweils gegen eine unbestrahlte dG-Probe gleicher Startkonzentration.

9.1.4.7.3 Nachweis von Spiroiminodihydantoin⁴⁸

Die Proben wurden ebenfalls direkt aus der Reaktionslösung gemäß HPLC-Methode 3 analysiert.

9.1.4.7.4 Nachweis von durch alkalische Hydrolyse freigesetztem Guanidin mit NQS^{179b)}

Der Reaktionslösung wurden 200 μL entnommen und zweimal mit je 400 μL Essigsäureethylester ausgeschüttelt, um Dioxetan- und Ketonreste aus der Lösung zu entfernen. Nach Lyophilisieren und Aufnahme in 100 μL Milli-Q-Wasser schüttelt man 24 h. Anschließend wurden 37.0 μL 1.00 N NaOH und 20.0 μL einer 20.0 mM wässrigen Lösung des Natriumsalzes der 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure (NQS, 5.00 g/L) zugegeben. Nach Erwärmen (9 min, 65 °C, im Wasserbad unter Lichtausschluss), wobei aus den

guanidinfreisetzenden Produkten durch Hydrolyse Guanidin entsteht, wurden 443 µl 97.1 mM HCl (setzt sich zusammen aus 43.0 µL 1.00 N HCl sowie 400 µL Milli-Q-Wasser) zugesetzt, wobei sich die während der Hydrolyse braun gewordene Lösung wieder entfärbt. Die Proben wurden mittels HPLC-Methode 4 analysiert. Als Standard wurden analog mit NQS behandelte Proben Guanidinhydrochlorid (in der Regel 100 µL 10 µM Guanidinhydrochlorid) eingesetzt.

9.1.4.8 Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 zur Detektion oxidativer Schäden an 8-oxodG (AAV-4)

Die Reaktionen mit 8-oxodG wurden analog denen mit dG (AAV-3) durchgeführt, indem dG durch 8-oxodG ersetzt wurde. Der 8-oxodG-Umsatz wurde analog dem dG-Umsatz durch Vergleich mit einer unbestrahlten 8-oxodG-Probe gleicher Startkonzentration bestimmt. Hierbei ist zu beachten, dass die 8-oxodG-Proben vor der HPLC/EC-Quantifizierung wegen der hohen Empfindlichkeit stark verdünnt werden müssen. (Bei einer 8-oxodG-Anfangskonzentration von 0.200 mM um den Faktor 100). Die Quantifizierung von dG entfällt, Spiroiminodihydantoin sowie GRP wurden analog dem dG-Versuch bestimmt.

9.1.4.9 Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 zur Detektion des Ketonumsatzes (AAV-5)

Zur Bestimmung des Ketonumsatzes wurden die photolysierten Proben (aus den Versuchen mit dG oder 8-oxodG, AAV-3) gemäß Methode 5 untersucht und mit einer authentischen, nichtphotolysierten Ketonprobe verglichen. Auf diese Weise können AP, AP-OAc, AP-OMe sowie AP-O^tBu untersucht werden.

9.1.4.10 Detektion von Strangbrüchen in plasmidischer pBR 322 DNA

9.1.4.10.1 Allgemeine Arbeitshinweise und Sicherheitsvorkehrungen

Zusätzlich zu den üblichen Vorsichtsmaßnahmen ist bei der Arbeit mit dem Kanzerogen Ethidiumbromid besonders darauf zu achten, dass jeglicher Hautkontakt unterbleibt. Alle Arbeiten wurden daher nur mit Einmalhandschuhen durchgeführt. Die Gefäße, z. B. zum Kochen des Gels, wurden ausschließlich dafür verwendet.

9.1.4.10.2 Herstellung der Pufferlösungen

TBE-Puffer: TBE-Puffer (5-fach konzentriert) für die Gelelektrophorese wurde aus 54.0 g (89.0 mmol) Trisbase, 27.5 g (89.0 mmol) Borsäure und 20.0 mmol (2.00 mmol) einer 0.50 M EDTA-Lösung (pH 8.0, in Milli-Q-Wasser) durch Auffüllen mit Wasser auf 1000 mL hergestellt. Bei Bedarf wurde die so hergestellte Stammlösung auf ein Fünftel verdünnt.

I_{1/2}-Puffer: Eine 500 mM KH₂PO₄-Lösung wurde durch Lösen von 13.6 g (100 mmol) KH₂PO₄ in 100 mL Milli-Q-Wasser, Titration mit 5 N Kalilauge auf pH 7.4 und Auffüllen auf 200 mL hergestellt. 5.85 g (100 mmol) Natriumchlorid, 20.0 mL der 500 mM KH₂PO₄-Lösung und 180 mL Milli-Q-Wasser ergaben den I_{1/2}-Puffer (10-fach konzentriert) für die Strangbruchexperimente.

9.1.4.10.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 zur Untersuchung von DNA-Strangbrüchen (AAV-6)⁵¹

9.1.4.10.3.1 Ansatz

Zur Detektion von Strangbrüchen wurde, sofern nicht anders angegeben, eine 10-mg/mL-Lösung pBR 322 DNA in gepufferter (I_{1/2}-Puffer) wässriger Lösung (10% Acetonitril als Kosolvens) in Gegenwart des zu untersuchenden Ketons bestrahlt. Dies erfolgte in geöffneten Eppendorfgefäßen, die jeweils 10 µL Lösung enthielten. Die Bestrahlungen wurden durchgeführt, indem dem Rayonet-Photoreaktor auf einer Seite vier Lampen entnommen wurden, so dass man nach Kippen des Reaktors an deren Stelle die in einem Eisbadständer steckenden Eppendorfgefäße stellen konnte, welche durch einen durchgeführten Kühlmittelschlauch auf 0 °C gehalten wurden. Für kurze Bestrahlungszeiten wurde auch Eiskühlung verwendet.

9.1.4.10.3.2 Herstellung des Agarosegels

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 600 mg Agarose in 60 mL TBE-Puffer suspendiert und kurz aufgeköcht. Die entstandene klare Lösung wurde mit 15.0 µL einer Ethidiumbromidlösung von 2.00 mg/mL versetzt (entspricht einer Endkonzentration im Gel von 0.500 mg/L). Der Gelträger wurde auf beiden Seiten mit Klebeband verschlossen und ca.

50 mL des Gels eingefüllt. Zur Aussparung von 11 oder 22 Taschen wurden ein bzw. zwei Käbme eingehängt. Nach dem Abkühlen (ca. 2 h) wurde das Klebeband sowie die Käbme vorsichtig entfernt.

9.1.4.10.3.3 Probenvorbereitung

Die bestrahlten Proben wurden mit 2.5 μ L Ladepuffer (loading buffer) versetzt, kurz geschüttelt und zentrifugiert. Der Ladepuffer enthält Glycerin, das die Flüssigkeit spezifisch schwerer macht als Wasser, damit die Lösung nicht aus den Taschen herausdiffundiert. Ebenfalls enthaltenes Bromphenolblau wandert während der Gelelektrophorese der DNA voraus und ermöglicht so, die Laufweite zu bestimmen.

9.1.4.10.3.4 Gel-elektrophorese

Das Gel wurde in die mit TBE-Puffer gefüllte Laufkammer gehängt, so dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. In die Geltaschen wurden jeweils 10.0 μ L der mit Ladepuffer versetzten Probenlösungen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 78 V für ca. 2 h. Die kompakte, superhelikale Form läuft im elektrischen Feld am schnellsten, gefolgt von der durch Doppelstrangbrüche gebildeten linearen Form (sofern vorhanden). Die durch Einzelstrangbrüche generierte offenzirkulare Form wandert am langsamsten.

9.1.4.10.3.5 Auswertung

Zur Auswertung wurde das Gel auf einen UV-Schirm (366 nm) gelegt, wobei das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid angeregt wird und fluoresziert. Die Fluoreszenz wird mit Hilfe einer Kamera aufgenommen und die Helligkeit der einzelnen Spots am Computer integriert. Aus diesen Daten wird die Verteilung der DNA in die verschiedenen Formen (superhelikal, offenzirkular und, falls vorhanden, linear) berechnet und als prozentualer Anteil an der Gesamt-DNA-Menge angegeben. Da keine exakt quantitativen Daten aus diesen Versuchen berechnet wurden, wurde auf eine Korrektur der Werte um einen Faktor, der die unterschiedliche Interkalation und Fluoreszenzeigenschaften von Ethidiumbromid in den unterschiedlichen DNA-Formen berücksichtigt, verzichtet. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die direkt beobachtete Helligkeit der DNA-Spots, wobei berücksichtigt wurde, dass

Ethidiumbromid in offenzirkuläre DNA um einen Faktor von 1.2 häufiger interkaliert als in superhelikale DNA.²¹⁹

9.1.4.11 Durchführung der Laserflash-Experimente

9.1.4.11.1 Allgemeines

Die Laserblitz-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Uwe Pischel im Arbeitskreis von Prof. Werner Nau am Institut für Physikalische Chemie der Universität Basel mit einem Lambda Physik EMG 101 MSC XeCl-Excimerlaser ($\lambda = 308 \text{ nm}$) durchgeführt.²²⁰

9.1.4.11.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 zur Bestimmung der Triplett-Lebensdauer α -substituierter Ketone (AAV-7)

9.1.4.11.2.1 Messung der Triplettabsorptionsspektren

Für die Messungen wurden jeweils ca. 5 mL einer Lösung des jeweiligen Ketons (4.00 mM) im angegebenen Lösungsmittel (in der Regel H₂O : Acetonitril 9:1) hergestellt und durch drei „freeze-pump-thaw“-Zyklen entgast. Zur Messung des Triplettabsorptionsspektrums wurde durch einen Laserblitz bei 308 nm (ca. 25 ns, $9 \pm 1 \text{ ns}$ Abklingzeit, 75 mJ) angeregt und direkt nach der Anregung das Triplettabsorptionsspektrum gemessen.

9.1.4.11.2.2 Messung der Triplettlebenszeiten

Zur Bestimmung der Triplettlebenszeiten wurden jeweils ca. 5 mL einer Lösung des jeweiligen Ketons (1.00 mM) im angegebenen Lösungsmittel (H₂O : Acetonitril 9:1) hergestellt und durch drei „freeze-pump-thaw“-Zyklen entgast. Zur Messung des Triplettabsorptionsspektrums wurde durch einen Laserblitz bei 308 nm (ca. 25 ns, $9 \pm 1 \text{ ns}$ Abklingzeit, 75 mJ) angeregt und bei 340 nm (im Maximum der Triplettbande, im Fall von Benzophenon bei 600 nm, dort absorbieren die bei der Photolyse gebildeten Ketylradikale nur noch schwach) das Abklingen der Absorption des Triplettzustandes zeitaufgelöst detektiert. Die erhaltene Kurve wurde monoexponentiell ausgewertet, unter Berücksichtigung eines 2. Ordnung-Anteils für die Abreaktion ebenfalls gebildeter Ketylradikale. Man erhält die

Geschwindigkeitskonstante für die Deaktivierung nach 1. Ordnung, daraus läßt sich gemäß $\tau = 1/k$ die Lebenszeit berechnen.

9.1.4.11.2.3 Messung der Deaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten durch zugesetzte Triplettquencher

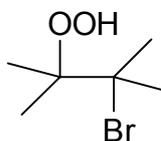
Für die Messung der Deaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten wurden den oben beschriebenen Lösungen geeignete Konzentrationen an Quencher zugesetzt und wiederum nach Entgasen die Triplettlebensdauer des Ketons bestimmt. Dies wurde (soweit nicht anders angegeben) bei vier unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt und die Geschwindigkeitskonstanten gegen die Quencherkonzentration aufgetragen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden wurde die Geschwindigkeitskonstante der Deaktivierung durch den Quencher bestimmt. Bei der Bestimmung der Deaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten durch molekularen Sauerstoff wurde die Probe belüftet, was zu einer Sauerstoffkonzentration von ca. 265 μM in wässriger Lösung führt.

9.2 Synthesen der Edukte

V-1: Silber(I)-oxid²²¹
(II-MAA-156)²²²

Eine Lösung von 6.90 g (172 mmol) NaOH in 200 mL (80-90 °C) heißem Wasser wurde zu einer Lösung von 30.0 g (177 mmol) Silbernitrat in 200 mL ebenfalls heißem Wasser gegeben. Die erhaltene Suspension wurde schnell filtriert, der Feststoff mit 200 mL heißem Wasser, 200 mL 95% Ethanol und 200 mL absolutem Ethanol gewaschen und unter Membranpumpenvakuum bei 100 °C getrocknet. Es wurden 18.6 g (80.3 mmol, 91%, Lit.²²¹: 87-89%) Silberoxid erhalten.

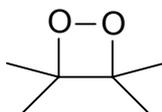
V-2: 3-Brom-2,3-dimethyl-2-butylhydroperoxid^{223,224}
(II-MAA-26)²²²



9 EXPERIMENTALTEIL

1.80 g (21.3 mmol) 2,3-Dimethylbut-2-en wurden in 18 mL Diethylether gelöst und auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Es wurden 3.00 mL (4.10 g, 102 mmol) 85% Wasserstoffperoxidlösung zugegeben und innerhalb von einer halben Stunde portionsweise 3.03 g (10.6 mmol) 1,3-Dibrom-5,5-dimethylhydantoin zugefügt. Anschließend wurde innerhalb einer Stunde auf $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und drei Stunden bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Der unlösliche Rückstand wurde abfiltriert, das Filtrat mit 50 mL Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit je 25 mL Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand in wenig Pentan aufgenommen und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Abfiltrieren des gebildeten hellgelben Feststoffes ergab 2.15 g (10.9 mmol, 51%, Lit.^{223,224}: 76%).

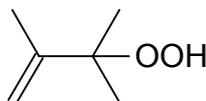
V-3: *Tetramethyl-1,2-dioxetan (TMD)*¹³³
(II-MAA-28)



1.00 g (5.07 mmol) 3-Brom-2,3-dimethyl-2-butylhydroperoxid wurden in 7 mL Diethylether gelöst und auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Es wurden im Dunkeln portionsweise 0.946 g (5.57 mmol) fein pulverisiertes Silbernitrat zugegeben und langsam auf $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Der Feststoff wurde abfiltriert, mehrmals mit Diethylether gewaschen und die vereinigten Filtrate mit 5 mL Eiswasser, zweimal mit je 5 mL eiskalter 10% Natronlauge und nochmals mit 5 mL Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Abdestillieren des Lösungsmittels ergab ein gelbliches Öl, das in Pentan gelöst und auf $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wurde. Abfiltrieren des Feststoffes ergab 118 mg des Dioxetans TMD als gelbe Nadeln (1.01 mmol, 20%, Lit.¹³³: 25%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) = 1.51 (s, 12 H).

V-4: *2-Hydroperoxy-2,3-dimethylbut-3-en*²²⁵
(II-MAA-36)²²²

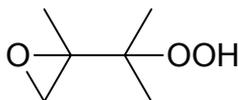


18.0 mL (12.6 g, 108 mmol) 2,3-Dimethylbut-2-en in 50 mL durch basisches Aluminiumoxid filtriertes Dichlormethan wurden mit 40 mg 5, 10,15, 20-Tetrakisphenylporphyrin versetzt und bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 19 h photooxygeniert (2 Natriumdampf lampen mit einer Gesamtleistung von 650 W). Die so erhaltene Lösung wurde direkt für **V-5** verwendet.

IR (Film): $\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)} = 3416, 3093, 2984, 1648, 1451, 1375, 1300, 1269, 1208, 1148, 1012, 901, 833\text{-}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): $\delta\text{ (ppm)} = 1.26\text{ (s, 6 H)}, 1.71\text{ (dd, } J = 0.8\text{ Hz, } J = 1.4\text{ Hz, 3 H)}, 4.82\text{ (Pentett, } J = 1.4\text{ Hz, 1 H)}, 4.88\text{ (m, 1 H)}, 8.16\text{ (s, br, 1 H)}$.

V-5: *2-Hydroperoxy-2-(2'-methyloxiranyl)propan*²²⁶
(II-MAA-37)²²²

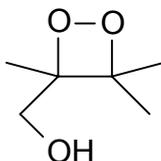


Zu der in V-4 erhaltenen Lösung wurden 90 mL Dichlormethan gegeben, auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und innerhalb von 30 min eine Lösung von 4.10 g (50.0 mmol) Natriumacetat in 68.5 g (359 mmol) 40% Peressigsäurelösung (in Essigsäure) gegeben. Es wurde sechs Tage bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter Kochsalzlösung (3 x 50 mL), gesättigter Natriumcarbonatlösung (2 x 50 mL) und mit Wasser (2 x 50 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Erhalten wurden 11.1 g 2-Hydroperoxy-2-(2'-methyloxiranyl)propan als farblose Flüssigkeit (84.0 mmol, 78% über zwei Stufen, Lit.^{225,226}: 74%).

IR (Film): $\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)} = 3388, 2986, 2941, 1456, 1377, 1208, 1162, 1110, 1071, 858\text{-}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): $\delta\text{ (ppm)} = 1.19\text{ (s, 3 H)}, 1.36\text{ (s, 3 H)}, 1.41\text{ (s, 3 H)}, 2.61\text{ (d, } J = 4.6\text{ Hz, 1 H)}, 3.11\text{ (d, } J = 4.6\text{ Hz, 1 H)}, 9.18\text{ (s, 1 H)}$.

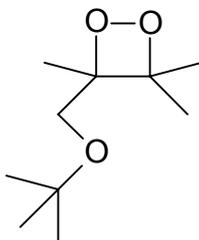
V-6: 3-Hydroxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetan (HO-TMD)¹²⁴
(II-MAA-52)²²²



4.30 g (32.4 mmol) 2-Hydroperoxy-2-(2'-methyloxiranyl)propan wurden in 150 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurde eine Lösung von 9.11 g (228 mmol) Natriumhydroxid in 180 mL Milli-Q-Wasser und eine Spatelspitze 18-Krone-6 gegeben. Es wurde sieben Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 50 mL gesättigte Natriumchloridlösung zugegeben und dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und der größte Teil des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer abdestilliert (bis auf etwa 1-2 mL). Der Rückstand wurde mit etwa 50 mL Pentan versetzt und auf -50 °C gekühlt. Abfiltrieren des Feststoffs ergab 2.71 g (20.5 mmol, 63%, Lit.¹²⁴: 62%) des Dioxetans HO-TMD als gelbe Nadeln.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) = 1.39 (s, 3 H), 1.46 (s, 3 H), 1.67 (s, 3 H), 2.19 (s, br, 1 H), 3.87 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H), 4.13 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H).

V-7: 3-*tert*-Butoxy-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetan (*t*BuO-TMD)
(II-MAA-85)²²²



Zu einer Lösung von 794 mg (6.00 mmol) 3-Hydroxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetan (HO-TMD) und 822 mg (6.00 mmol) *tert*-Butylbromid in 10 mL Diethylether wurde eine Suspension von 711 mg (3.00 mmol) frisch hergestelltem Silberoxid in 15 mL Diethylether gegeben und für 6 h bei 20 °C gerührt. Es wurden 50 mL gesättigte Natriumcarbonatlösung zugegeben und ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen

(2 x 25 mL), über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Zweimalige blitzsäulenchromatographische Reinigung [Kieselgel, Eluens: zuerst Dichlormethan und anschließend Petrolether (30-50) : Diethylether (100 : 1), -30 °C] ergab 195 mg (1.04 mmol, 17%) des Dioxetans ^tBuO-TMD als eine gelbe Flüssigkeit.

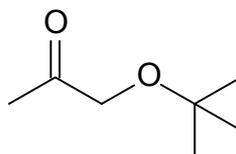
IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2974, 2932, 1723, 1470, 1386, 1364, 1197, 1150, 1087, 878.-

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) = 1.18 (s, 9 H), 1.44 (s, 6 H), 1.58 (s, 3 H), 3.43 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 4.06 (d, J = 8.8 Hz, 1 H).-

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = (ppm) 18.6, 22.4, 23.8, 27.0, 64.4, 73.0, 89.4, 89.8.-

Anal.: (C₁₀H₂₀O₃, 188.3 g/mol) ber. C 63.80, H 10.70; gef. C 63.03, H 9.97.

V-8: *1-tert-Butoxypropan-2-on*
(II-MAA-135)²²²



Zu einer Lösung von 1.67 g (22.5 mmol) Hydroxyaceton und 3.09 g (22.5 mmol) *tert*-Butylbromid in 25 mL Diethylether wurden 2.59 g (11.2 mmol) frisch gefälltes Silberoxid gegeben und 64 h im Dunkeln bei 20 °C gerührt. Es wurde mit 25 mL gesättigter Natriumcarbonatlösung und 25 mL Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde mittels Kugelrohrdestillation (70 °C, 20 Torr) gereinigt, es wurden 1.04 g (7.99 mmol, 35%) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

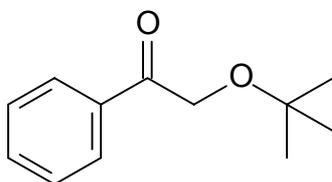
IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2976, 1722, 1471, 1422, 1391, 1367, 1237, 1193, 1106, 883.-

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) = 1.22 (s, 9 H), 2.17 (s, 3 H), 3.94 (s, 2 H).-

¹H-NMR (CD₃CN, 200 MHz): δ (ppm) = 1.17 (s, 9 H), 2.05 (s, 3 H), 3.97 (s, 2 H).-

¹H-NMR [D₂O:CD₃CN (9:1), 200 MHz]: δ (ppm) = 1.22 (s, 9 H), 2.14 (s, 3 H), 3.34 (s, 2 H).

V-9: 2-*tert*-Butoxy-Acetophenon (AP-*O*^tBu)²²⁷
(V-MAA-68)

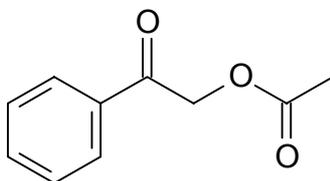


Zu einer Lösung von 1.00 g (7.34 mmol) Hydroxyacetophenon und 1.01g (7.34 mmol) *tert*-Butylbromid in 10 mL destilliertem Diethylether wurden 850 mg (3.67 mmol) frisch gefälltes Silberoxid gegeben und 4 d im Dunkeln bei 20 °C gerührt. Es wurde von Feststoff abfiltriert, die organische Phase mit 10 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wurde per Blitzsäulenchromatographie [Kieselgel, Eluens: Petrolether (30-50) : Diethylether (2 : 1)] gereinigt. Erhalten wurden 643 mg (46%) einer farblosen Flüssigkeit.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) = 7.8-7.9 (m, 2 H), 7.3-7.5 (m, 3 H), 4.59 (s, 2 H), 1.21 (s, 9 H).-

¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz): δ (ppm) = 27.8 (CH₃), 66.6 (CH₂), 74.9 (quartär), 128.5 (C-H), 128.9 (C-H), 133.6 (C-H), 135.7 (quartär), 197.5 (quartär).

V-10: 2-Acetoxy-Acetophenon (AP-*O*Ac)²²⁸
(V-MAA-69)



Zu einer Lösung von 1.27 g (1.16 mL, 16.2 mmol) Acetylchlorid in 10 mL Dichlormethan wurden bei 0 °C zuerst 1.28 g (1.31 mL, 16.2 mmol) Pyridin und anschließend 2.00 g (14.7 mmol) Hydroxyacetophenon zugegeben und 10 min gerührt. Es wurde mit 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit je 10 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und die organische Phase einrotiert. Das

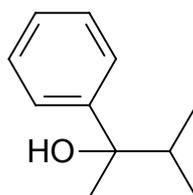
Rohprodukt wurde per Blitzsäulenchromatographie [Kieselgel, Eluens: Petrolether (30-50) : Diethylether (am Anfang 10 : 1, später 5 : 1)] gereinigt. Erhalten wurden 2.22 g (12,4 mmol, 77%) farblose nadelförmige Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) = 7.9-8.0 (m, 2H), 7.1-7.7 (m, 3H), 5.34 (s, 2H), 2.22 (s, 3H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 63 MHz): δ (ppm) = 21.0 (CH_3), 66.4 (CH_2), 128.2 (C-H), 129.3 (C-H), 134.3 (C-H), 134.6 (quartär), 170.8 (quartär), 192.6 (quartär).

V-11: *2-Phenyl-3-methyl-2-butanol*²²⁹

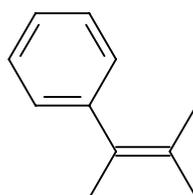
(V-MAA-64)



3.44 g (141 mmol) Magnesiumspäne wurden mit 10 mL absolutem Diethylether überschichtet und durch Zutropfen von 15.8 g (128 mmol) 2-Brompropan in 60 mL absolutem Diethylether zum Grignard-Reagenz umgesetzt. Es wurde 1 h unter Rückfluss erhitzt, anschließend wurden langsam 15.4 g (150 mmol) Acetophenon in 50 mL absolutem Diethylether zugetropft. Die erhaltene Suspension wurde vorsichtig zu 200 mL eiskalter 10% HCl gegeben. Die organische Phase wurde einmal mit 200 mL gesättigter Natriumcarbonatlösung und zweimal mit je 200 mL destilliertem Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat und Abdestillieren des organischen Lösungsmittels wurden 18.6 g (113 mmol, 88%) einer gelben Flüssigkeit erhalten, die ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt wurde.

V-12: *2-Phenyl-2,3-dimethyl-2-buten*²³⁰

(V-MAA-66)



9 EXPERIMENTALTEIL

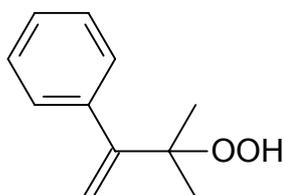
18.6 g (113 mmol) 2-Phenyl-3-methyl-2-butanol wurden mit einer Mischung aus 4.50 g (2.45 mL) konzentrierter Schwefelsäure sowie 17.9 g (17.0 mL) Eisessig versetzt, 4 min auf 60 °C erhitzt und auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 200 mL Diethylether extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit 200 mL gesättigter Natriumcarbonat sowie zweimal mit je 200 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Solvens abdestilliert (20 °C, 10 Torr). Das Rohprodukt wurde durch Destillation (Sdp.: 79-85 °C im Membranpumpenvakuum) gereinigt. Erhalten wurden 12.8 g (87.6 mmol, 77%) einer farblosen Flüssigkeit.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) = 1.72 (s, 3 H), 1.93 (s, 3 H), 2.08 (s, 3 H), 7.2-7.5 (m, 5 H).-

¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz): δ (ppm) = 21.0, 21.3, 22.5, 126.2, 127.5, 128.4, 129.0, 130.5, 145.8.

V-13: *1,1-Dimethyl-2-phenyl-2-propenylhydroperoxid*¹³¹

(VII-MAA-48a)

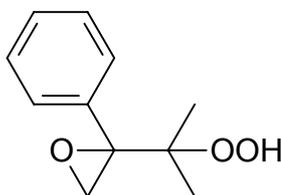


20.0 g (137 mmol) 2-Phenyl-2,3-dimethyl-2-buten in 40 mL destilliertem Dichlormethan wurden mit 30 mg Tetraphenylporphyrin versetzt und bei -20 °C für 22 h photooxygeniert (2 Natriumdampflampen mit einer Gesamtleistung von 650 W). Die so erhaltene, mit 1,2-Dimethyl-1-phenyl-2-propenylhydroperoxid verunreinigte (Verhältnis Produkt : Verunreinigung ca. 2 : 1), Lösung wurde direkt für V-14 verwendet.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = (ppm) 1.45 (s, 6H), 5.25 (d, 1 H, *J* = 1.2 Hz), 5.47 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz), 7.3-7.4 (m, 5H), 7.42 (s, 1H).

V-14: *1-Methyl-1-(2-phenyloxiranyl)ethylhydroperoxid*²³¹

(VII-MAA-48b)



Zu der in V-13 erhaltenen Lösung wurden 60 mL Dichlormethan gegeben, auf 0 °C gekühlt und innerhalb von 30 min eine Lösung von 11.1 g (135 mmol) Natriumacetat in 109 g (571 mmol) 40% Peressigsäurelösung (in Essigsäure) gegeben. Es wurde drei Tage bei 20 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (2 x 60 mL) sowie gesättigter Natriumcarbonatlösung (60 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Reinigung erfolgte per Blitzsäulenchromatographie [Kieselgel, Petrolether (30-50) : Ethylacetat, Gradient von 25 : 1 bis 5 : 1]. Erhalten wurden 10.2 g 1-Methyl-1-(2-phenyloxiranyl)ethylhydroperoxid als leicht rosa gefärbter Feststoff (52.5 mmol, 38% über zwei Stufen).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) = 1.28 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 2.85 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 3.50 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz) 7.3-7.5 (m, 5H), 9.24 (s, br, 1H).-

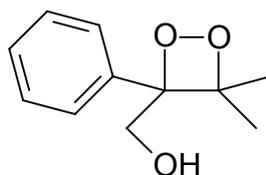
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ (ppm) = 20.5, 22.9, 51.4, 67.1, 81.4, 128.3, 128.4, 128.5, 137.5.-

IR (Film): ν (cm^{-1}) = 3347, 2993, 1448, 1379, 1343, 1204, 1161, 1134, 921.-

Anal.: ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$, 194.2 g/mol) ber. C 68.02, H 7.27; gef. C 67.57, H 7.20.

V-15: 3,3-Dimethyl-4-hydroxymethyl-4-phenyl-1,2-dioxetan (**1**)²³¹

(VII-MAA-56)



1.03 g (5.30 mmol) 1-Methyl-1-(2-phenyloxiranyl)ethylhydroperoxid wurden in 200 mL Dichlormethan gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 2.03 g (53.0 mmol) Natriumhydroxid in 200 mL Milli-Q-Wasser und eine Spatelspitze 18-Krone-6 gegeben. Es wurde 45 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt, die wässrige nochmals mit 100 mL Dichlormethan gewaschen, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde in etwa 1 mL Dichlormethan aufgenommen und mit etwa 10 mL Pentan bei -20 °C ausgefällt. Das Ausfällen wurde insgesamt dreimal wiederholt. Abfiltrieren des Feststoffs ergab 176 mg (906 μmol , 17%) des Dioxetans **1** als gelbe Nadeln.

9 EXPERIMENTALTEIL

Schmp.: 61-63 °C (Zersetzung),-

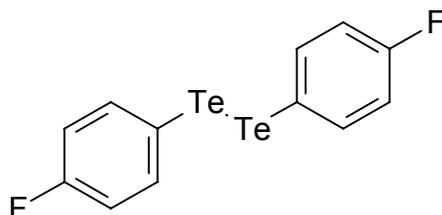
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) = 1.31 (s, 3 H), 1.65 (s, 3 H), 2.31 (dd, 1 H, $J = 4.7$ Hz, $J = 8.4$ Hz), 4.06 (dd, $J = 12.5$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 1 H), 4.49 (dd, $J = 12.5$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 7.1-7.5 (m, 5H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ (ppm) = 21.8, 26.1, 65.8, 90.4, 93.7, 124.5, 128.3, 128.9, 138.2.-

IR (Film): ν (cm^{-1}) = 3299, 3000, 1452, 1384, 1152, 1084, 1047.-

Anal.: ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$, 194.2 g/mol) ber. C 68.02, H 7.27; gef. C 67.96, H 7.32.

V-16: *Bis-(4-fluorphenyl)ditellurid*²³²
(VI-MAA-35)

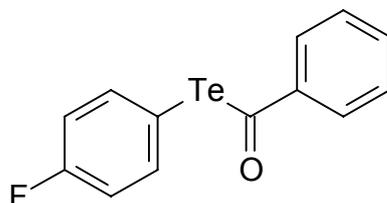


Zu 0.720 g (30.0 mmol) Magnesiumspänen, die mit 5 mL THF bedeckt wurden, wurde eine Lösung von 4.04 g (24.0 mmol) 4-Bromfluorbenzol in 15 mL THF gegeben und zur Grignardverbindung umgesetzt. Anschließend wurden 3.00 g (24.00 mmol) Tellurpulver zugegeben und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Es wurde gesättigte Ammoniumchloridlösung zugegeben und über Cellite abfiltriert, einmal mit 100 mL Diethylether ausgeschüttelt, die organische Phase mit 100 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt (20 °C, 10 Torr). Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert und es wurden 1.85 g (4.16 mmol, 35%) rotbrauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) = 6.8-7.0 (m, 4H), 7.6-7.8 (m, 4H).

V-17: *Benzolcarbotellursäure-Te-(4-fluorophenyl)ester*²³²

(VI-MAA-36)

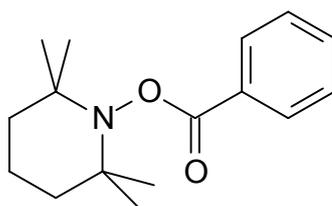


891 mg (2.00 mmol) Bis-(4-fluorophenyl)ditellurid wurden bei 20 °C in 16 mL THF gelöst und 300 mg (8.00 mmol) Natriumborhydrid zugegeben. Es wurden langsam 2 mL Methanol zugetropft und solange gerührt, bis sich eine blassgelbe Lösung bildete. Anschließend wurden 600 mg (4.40 mmol) Benzoylchlorid zugetropft und weitere 30 min gerührt. Nach Zugabe von 10 mL Wasser wurde dreimal mit je 60 mL Diethylether ausgeschüttelt, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Das Rohprodukt wurde per Blitzsäulenchromatographie [Kieselgel, Eluens: Petrolether (30-50) : Diethylether (50 : 1)] gereinigt. Erhalten wurden 276 mg (874 µmol, 22%) einer roten Flüssigkeit.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) = 7.0-7.8 (m, 9H).

V-18: *1-(Benzoyloxy)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin*²³²

(VI-MAA-44)



276 mg (812 µmol) Benzolcarbotellursäure-Te-(4-fluorophenyl)ester sowie 130 mg (812 µmol) TEMPO wurden unter Sauerstoffausschluss (gesättigt mit Argon) in 40 mL Benzol für 4 h bei 8 °C bestrahlt (sichtbares Licht, Quecksilberdampf mit 400 nm-Filter, λ > 400 nm). Das Rohprodukt wurde per Blitzsäulenchromatographie [Kieselgel, Eluens: Petrolether (30-50) : Diethylether (10 : 1)] gereinigt. Erhalten wurden 149 mg (570 µmol, 70%) 1-(Benzoyloxy)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 6H), 1.53 (s, 6H), 1.6-2.1 (m, 6H), 7.6-7.9 (m, 3H), 8.2-8.4 (m, 2H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ (ppm) = 12.0, 15.9, 27.1, 34.2, 55.6, 124.3, 125.3, 125.3, 128.8, 162.3.

V-19: *Synthese von Spiroiminodihydantoin im „Mehrere 100 mg-Maßstab“*
(VII-MAA-61)

2.00 g (7.01 mmol) dG Monohydrat wurden mit 10 mg Bengalrosa in 300 mL H_2O : Acetonitril (60:40) gelöst und für 23 h photooxygeniert (650 W). HPLC-Kontrolle ergab vollständigen dG-Umsatz. Das Lösungsmittel wurde abrotiert und der Rückstand in 40 mL Methanol suspendiert und abfiltriert. Erhalten wurden 359 mg brauner schmieriger Feststoff sowie nach Einengen des Filtrats 1.73 g rosa Feststoff. Der rosa Feststoff wurde in wenig H_2O : Acetonitril (1:1) gelöst und blitzsäulenchromatographisch [Kieselgel, Acetonitril : Methanol (4 : 1)] gereinigt. Erhalten wurden 434 mg (1.45 mmol, 21%) eines durch Reste an Bengalrosa, das sich nicht abtrennen liess, leicht rosa angefärbten Feststoffes [2'-Desoxyribofuranosyl-spiroiminodihydantoin (Spiroiminodihydantoin), Mischung aus 2 Diastereomeren].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ (ppm) = 36.3, 38.0, 63.4, 63.7, 72.3, 72.5, 82.9, 84.1, 87.7, 88.0, 154.4, 156.5, 170.0, 170.9, 173.5, 174.0, 182.7, 183.3.-

Es wurde ein eindimensionales ^{13}C - ^{13}C -Inadequate-Experiment durchgeführt (Abbildung 9.1).

V-20: *Vergleichssynthese von Spiroiminodihydantoin durch Einelektronenoxidation von 8-oxodG*
(VII-MAA-69)

400 μL einer 3.75 mM Lösung an 8-oxodG und 3.75 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 37.5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) wurde 24 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und mittels Methode 3 analysiert. Es wurden 69 % Spiroiminodihydantoin gebildet.

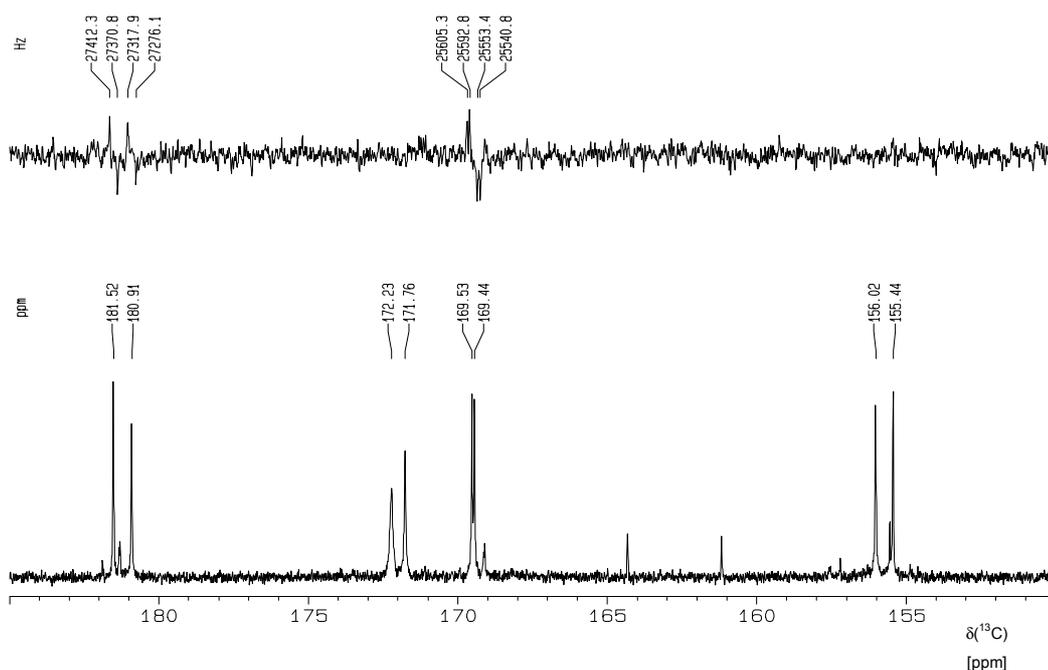


Abbildung 9.1: 151 MHz ^{13}C -SELINQUATE Spektrum von Spiroiminodihydantoin in DMSO-d_6 (Region von 155-182 ppm) nach Anregung (270° Gauss-Puls, 1 ms Pulslänge) bei 80 ppm (oben) und ^{13}C -NMR Spektrum (unten).

9.2.1 Untersuchungen zur Löslichkeit von dG in H_2O : Acetonitril-Mischungen

V-21: Bestimmung der Löslichkeit von dG in H_2O : Acetonitril-Gemischen
(VII-MAA-82)

Die Löslichkeit von dG in verschiedenen H_2O : Acetonitril-Mischungen wurde bestimmt, indem zu dieser Mischung jeweils ein Überschuss an dG gegeben wurde, abzentrifugiert wurde und die überstehende Lösung zur Quantifizierung von dG gemäß Methode 2 analysiert wurde.

In reinem Acetonitril ist dG unlöslich, in reinem Wasser lösen sich etwas mehr als 5 mmol pro Liter, ein Maximum wird bei 40-50% Acetonitrilanteil erreicht, dort sind bis zu 35 mmol pro Liter löslich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9.2 dargestellt.

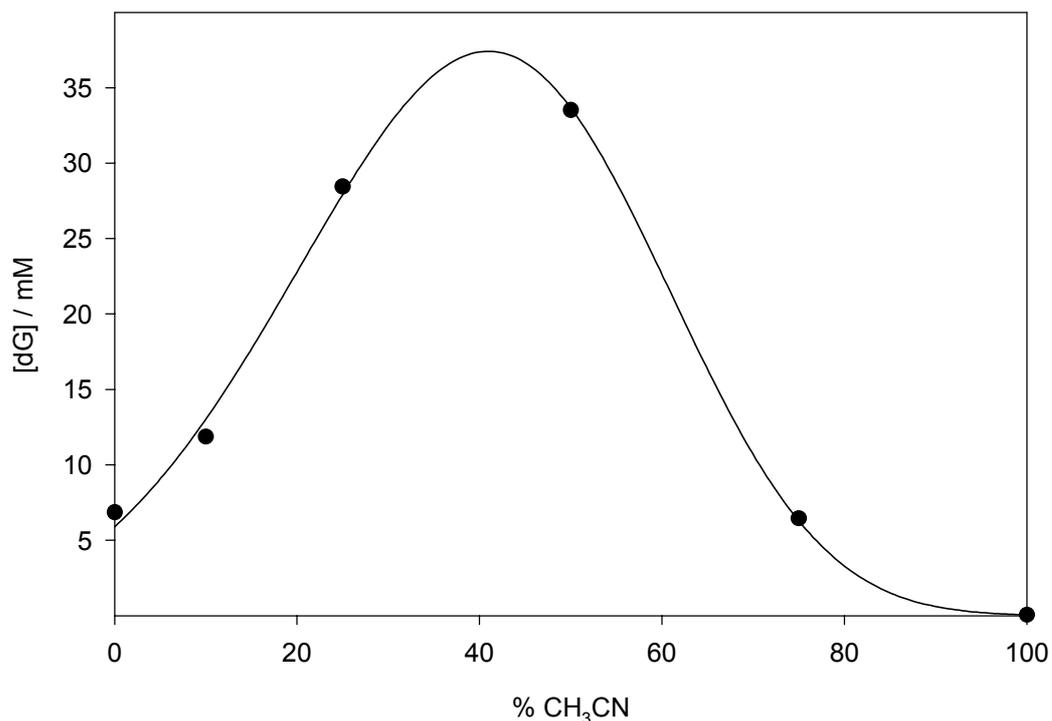


Abbildung 9.2: Löslichkeit von dG in wässriger Lösung, Abhängigkeit vom Acetonitrilanteil

9.3 Durch ^tBuO-TMD induzierte Oxidation von DNA und dG

9.3.1 Oxidation von dG

V-A1: *Kinetik der dG-Oxidation durch bei der ^tBuO-TMD-Thermolyse gebildete angeregte Carbonylspezies*
(III-MAA-56)

Eine Probe dG (0.500 mM) in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) wurde in Gegenwart von 20.0 mM ^tBuO-TMD im Mitchell-Hastings-Photometer thermolysiert (50 °C, Gesamtvolumen: 3.00 mL). Dabei wurde die Lumineszenzabklingkurve detektiert, während nach verschiedenen Zeiten Proben (50.0 µl) entnommen wurden, aus denen gemäß AAV-3 der dG-Umsatz bestimmt wurde. Nachdem die Lumineszenz nach 1080 min deutlich abgenommen hatte, wurden erneut 20.0 mM Dioxetan (60.0 µl 1.00 M Stammlösung) zugegeben. Die erhaltene Lumineszenzabklingkurve sowie der dG-Umsatz sind in Tabelle 9.1 dargestellt.

Tabelle 9.1: Kinetik der dG-Oxidation durch bei der ^tBuO-TMD-thermolysse gebildete angeregte Carbonylspezies^{a)}

t	dG Umsatz	Chemilumineszenz
[min]	[%]	[mV]
30	2.80	29.8
60	3.90	32.0
120	6.67	31.9
240	14.2	28.2
360	17.5	24.1
480	20.0	20.0
1080	22.9	7.58
1110	26.1	30.7
1140	27.2	32.0
1200	29.9	29.8
1260	31.7	27.7
1320	33.9	25.1
1560	37.2	17.0
2520	42.3	2.22

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 0.500 mM, [^tBuO-TMD] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), T = 50 °C; b) nach 1080 min wurden erneut 20.0 mM ^tBuO-TMD zugegeben.

V-A2: *Zeitprofile des Umsatzes von 8-oxodG und dG in der durch Thermolyse von ^tBuO-TMD induzierten Oxidation von dG*
(III-MAA-19)

Eine Probe dG (17.5 μM) und/oder 8-oxodG (17.5 μM) mit 10.0 mM ^tBuO-TMD wurde in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) für verschiedene Zeiten thermolysiert (50 °C) und gemäß AAV-3 nach verschiedenen Zeiten der Umsatz bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.2 zusammengefasst.

Tabelle 9.2: Oxidation von dG und 8-oxodG durch Thermolyse von ^tBuO-TMD^{a)}

t [min]	dG Umsatz ohne 8-oxodG [%]	dG Umsatz mit 8-oxodG [%]	8-oxodG Umsatz ohne dG [%]	8-oxodG Umsatz mit dG [%]
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
30	28 ± 7	0 ± 3	59 ± 1	59 ± 5
60	42 ± 5	2 ± 4	95 ± 2	89 ± 10
180	52 ± 9	7 ± 11	100 ± 0	100 ± 0

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 17.5 µM und/oder [8-oxodG] = 17.5 µM, [^tBuO-TMD] = 10.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 50 °C.

V-A3: *Inhibierung des dG-Umsatzes bei der durch Thermolyse von ^tBuO-TMD induzierten Oxidation von dG*
(III-MAA-66)

Eine Probe dG (0.500 mM) mit 20.0 mM ^tBuO-TMD wurde in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an BHT für 15 h thermolysiert (50 °C) und gemäß AAV 3 der Umsatz bestimmt. Aus den Daten wurde bezogen auf die Reaktion ohne BHT die prozentuale Inhibierung der dG-Oxidation ausgerechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.3 zusammengefasst.

Tabelle 9.3: Inhibierung der dG-Oxidation durch BHT^{a)}

[BHT] [mM]	Inhibierung [%]
0	0.0 ± 4.8
1	28.3 ± 3.1
2	59.3 ± 0.7

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 0.500 mM, [^tBuO-TMD] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 50 °C, t = 15 h.

V-A4: *Zeitprofil des dG-Umsatzes bei der durch Thermolyse von ^tBuO-TMD induzierten Oxidation von dG in Gegenwart von BHT*
(III-MAA-72)

Eine Probe dG (0.500 mM) mit 20.0 mM ^tBuO-TMD wurde in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) in Abwesenheit und Gegenwart von 2.00 mM BHT thermolysiert (50 °C) und gemäß AAV-3 nach verschiedenen Zeiten der Umsatz bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.4 zusammengefasst.

Tabelle 9.4: Kinetik der dG-Oxidation durch ^tBuO-TMD in Abwesenheit/Gegenwart von BHT^{a)}

t	dG Umsatz ohne BHT	dG Umsatz mit BHT
[h]	[%]	[%]
1	4.44 ± 0.93	2.40 ± 0.11
2		3.54 ± 0.33
4	13.2 ± 0.2	4.81 ± 0.31
8	17.7 ± 0.9	9.62 ± 1.49
18	20.5 ± 0.9	10.5 ± 1.6

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 0.500 mM, [^tBuO-TMD] = 20.0 mM, [BHT] = 2.00 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 50 °C.

V-A5: *Zeitprofil des Umsatzes sowie der Produktbildung bei der durch ^tBuO-TMD induzierten Oxidation von dG*
(III-MAA-69, III-MAA-72, III-MAA-88)

Eine Probe dG (0.500 mM) in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) wurde in Gegenwart von 20.0 mM ^tBuO-TMD thermolysiert (50 °C) und nach unterschiedlichen Zeitintervallen gemäß AAV-3 Umsatz, Spiroiminodihydantoin und GRP bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.5 zusammengefasst.

Tabelle 9.5: Zeitprofil der dG-Oxidation durch ^tBuO-TMD^{a)}

t [h]	dG Umsatz ohne BHT [%]	dG Umsatz mit BHT [%]	Spiroimino- dihydantoin ohne BHT [%]	Spiroimino- dihydantoin mit BHT [%]	GRP ohne BHT [%]	GRP mit BHT [%]
0.5	0.00	0.00	0.08	0.11	0.24	0.16
1	3.24	0.00	0.18	0.07	0.44	0.31
2	6.59	0.06	0.21	0.20	0.74	0.76
4	14.2	2.50	0.22	0.40	1.18	1.44
8	19.3	2.69	0.66	1.15	2.43	2.38
22	25.8	0.16	3.06	1.18	5.40	2.39

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 0.500 mM, [^tBuO-TMD] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 50 °C.

V-A6: *Inhibierung der dG-Oxidation durch ^tBuO-TMD durch ⁱPrOH*
(III-MAA-71)

0.500 mM dG wurden durch 20.0 mM ^tBuO-TMD in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) durch Thermolyse (15 h, 50 °C) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an ⁱPrOH oxidiert und gemäß AAV-3 der dG-Umsatz bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.6 zusammengefasst.

Tabelle 9.6: Inhibierung der dG-Oxidation durch ⁱPrOH^{a)}

[ⁱ PrOH] [mM]	dG Umsatz [%]
0	17.3 ± 0.3
5	14.2 ± 0.3
10	10.5 ± 0.1
20	8.4 ± 0.3
50	3.8 ± 0.6

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 0.500 mM, [^tBuO-TMD] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 50 °C, t = 15 h.

V-A7: *Zeitprofil des Umsatzes sowie der Produktbildung bei der durch Photolyse von 1-tert-Butoxy-2-propanon induzierten Oxidation von dG*
(III-MAA-90)

Eine Probe dG (0.500 mM) in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) wurde in Gegenwart von 20.0 mM 1-tert-Butoxy-2-propanon photolysiert (0 °C, 300 nm, im Rayonet-Photoreaktor gemäß AAV-1) und nach unterschiedlichen Zeitintervallen gemäß AAV-3 Umsatz, Spiroiminodihydantoin und GRP bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.7 zusammengefasst.

Tabelle 9.7: Kinetik der dG-Oxidation durch Photolyse von 1-tert-Butoxy-2-propanon^{a)}

t [min]	dG Umsatz [%]	Spiroiminodihydantoin [%]	GRP [%]
8	0.83 ± 0.42	0.42 ± 0.11	0.52 ± 0.01
15	0.00 ± 1.46	0.50 ± 0.02	0.75 ± 0.01
30	2.04 ± 0.16	1.19 ± 0.03	1.29 ± 0.09
60	7.23 ± 0.21	2.83 ± 0.23	2.69 ± 0.06
120	16.9 ± 0.8	5.45 ± 0.13	5.04 ± 0.41
240	31.0 ± 0.3	8.69 ± 0.01	7.17 ± 0.34
480	53.9 ± 1.1	13.5 ± 0.2	10.4 ± 0.1

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 0.500 mM, [1-tert-Butoxy-2-propanon] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 0 °C, λ = 300 nm.

V-A8: *D₂O-Effekt auf die Oxidation von dG durch ^tBuO-TMD*
(IV-MAA-14, IV-MAA-24, IV-MAA-25)

Für die dG-Reaktion wurden bestimmte Reaktionsbedingungen festgelegt und die Reaktionen dann zweimal durchgeführt, einmal in wässrigem Medium und einmal derart, dass jegliches H₂O durch D₂O ersetzt wurde. Für die dG-Reaktionen wurde eine 0.500 mM dG-Lösung in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) mit 20.0 mM ^tBuO-TMD für 15 h bei 50 °C thermolysiert und anschließend per AAV-3 Umsatz sowie die Bildung von Spiroiminodihydantoin und GRP bestimmt (Tabelle 9.8).

Tabelle 9.8: D₂O-Effekt auf die Oxidation von dG durch ^tBuO-TMD^{a)}

	dG Umsatz [%]	Spiroiminodihydantoin [%]	GRP [%]
H ₂ O	24.1 ± 0.6	5.34 ± 0.26	9.43 ± 0.34
D ₂ O	23.8 ± 2.0	5.75 ± 0.81	8.24 ± 0.29

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 0.500 mM, [^tBuO-TMD] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer in D₂O (pD 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 50 °C, t = 15 h.

9.3.2 Oxidation von CT-DNA

V-A9: Oxidation von CT-DNA durch Thermolyse von ^tBuO-TMD
(III-MAA-91)

Eine Probe CT-DNA (0.100 g/L) mit unterschiedlichen Konzentrationen an ^tBuO-TMD wurde in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) für 21 h thermolysiert (37 °C) und gemäß AAV-2 die Bildung von 8-oxoGua und GRP bestimmt. Zum Vergleich wurde TMD eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.9 zusammengefasst.

Tabelle 9.9: Oxidation von CT-DNA durch ^tBuO-TMD im Vergleich zu TMD^{a)}

	8-oxoGua [%]	GRP [%]
^t BuO-TMD 10 mM	1.56 ± 0.01	0.43 ± 0.04
^t BuO-TMD 20 mM	2.58 ± 0.12	0.49 ± 0.01
TMD 20 mM	0.17 ± 0.01	0.04 ± 0.03

a) Reaktionsbedingungen: [CT-DNA] = 0.100 g/L in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 37 °C, t = 21 h.

V-A10: Oxidation von CT-DNA durch Thermolyse von ^tBuO-TMD – Inhibierung durch BHT, DMPO und ^tPrOH
(IV-MAA-10)

Eine Probe CT-DNA (0.100 mg/mL) mit 20.0 mM ^tBuO-TMD wurde in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) in der Gegenwart von BHT, DMPO sowie ^tPrOH für 24 h thermolysiert (37 °C) und gemäß AAV-2 die Bildung von 8-oxoGua und GRP bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.10 zusammengefasst.

Tabelle 9.10: Inhibierung der Oxidation von *CT*-DNA durch ^tBuO-TMD^{a)}

	8-oxoGua [%]	GRP [%]
20 mM ^t BuO-TMD	3.20 ± 0.20	0.40 ± 0.05
+ 2 mM BHT	0.05 ± 0.04	0.04 ± 0.01
+ 2 mM DMPO	0.37 ± 0.02	0.00 ± 0.01
+ 100 mM ⁱ PrOH	2.16 ± 0.27	0.19 ± 0.01

a) Reaktionsbedingungen: [*CT*-DNA] = 0.100 g/L, [^tBuO-TMD] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 37 °C, t = 24 h.

V-A11: *Oxidation von CT-DNA durch Photolyse von 1-tert-Butoxy-2-propanon*
(IV-MAA-14)

Eine Probe *CT*-DNA (0.100 mg/mL) mit 20.0 mM 1-*tert*-Butoxy-2-propanon wurde in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) für 30 min bei 0 °C bestrahlt (300 nm, im Rayonet-Photoreaktor gemäß AAV-1) und gemäß AAV-2 die Bildung von 8-oxoGua und GRP bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.11 zusammengefasst.

Tabelle 9.11: Oxidation von *CT*-DNA durch 1-*tert*-Butoxy-2-propanon im Vergleich zu Aceton^{a)}

	8-oxoGua [%]	GRP [%]
Blindprobe	0.53 ± 0.11	0.09 ± 0.04
1- <i>tert</i> -Butoxy-2-propanon	2.72 ± 0.28	0.89 ± 0.14
Aceton	0.40 ± 0.12	0.10 ± 0.02
1- <i>tert</i> -Butoxy-2-propanon + BHT	1.40 ± 0.44	0.24 ± 0.01

a) Reaktionsbedingungen: [*CT*-DNA] = 0.100 g/L, [1-*tert*-Butoxy-2-propanon] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 0 °C, λ = 300 nm, t = 30 min.

V-A12: *Kinetik der DNA-Oxidation durch Photolyse von 1-tert-Butoxy-2-propanon*
(IV-MAA-28)

Eine Probe *CT*-DNA (0.100 mg/mL) mit 20.0 mM 1-*tert*-Butoxy-2-propanon wurde in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) bei 0 °C bestrahlt (300 nm, im Rayonet-Photoreaktor gemäß AAV-1) und gemäß AAV-2 nach verschiedenen Zeiten die Bildung von 8-oxoGua und GRP bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.12 zusammengefasst.

Tabelle 9.12: Kinetik der Oxidation von *CT*-DNA durch 1-*tert*-Butoxy-2-propanon^{a)}

t	8-oxoGua	GRP
[min]	[%]	[%]
10	0.56 ± 0.07	0.14 ± 0.01
20	0.71 ± 0.52	0.31 ± 0.08
30	1.12 ± 0.00	0.58 ± 0.04

a) Reaktionsbedingungen: [*CT*-DNA] = 0.100 g/L, [1-*tert*-Butoxy-2-propanon] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 0 °C, λ = 300 nm.

V-A13: *D₂O-Effekt auf die Oxidation von CT-DNA durch ^tBuO-TMD*
(IV-MAA-14, IV-MAA-24, IV-MAA-25)

Für die Oxidation von *CT*-DNA wurden bestimmte Reaktionsbedingungen festgelegt und die Reaktionen dann zweimal durchgeführt, einmal in wässrigem Medium und einmal derart, dass jegliches H₂O durch D₂O ersetzt wurde. Für die Reaktion mit *CT*-DNA wurde eine 0.100 mg/mL Lösung an *CT*-DNA mit 20.0 mM ^tBuO-TMD in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) für 21 h bei 37 °C thermolysiert (Tabelle 9.13) und gemäß AAV-2 analysiert.

Tabelle 9.13: D₂O-Effekt auf die Oxidation von *CT*-DNA durch ^tBuO-TMD^{a)}

	8-oxoGua + GRP
	[%]
H ₂ O	3.69 ± 0.41
D ₂ O	3.56 ± 0.23

a) Reaktionsbedingungen: [*CT*-DNA] = 0.100 g/L, [^tBuO-TMD] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer in D₂O (pD 7.0), 10% Acetonitril als Kosolvens, T = 0 °C, λ = 300 nm, t = 21 h.

V-A14: *D₂O-Effekt auf die Photooxidation von CT-DNA durch 1-tert-Butoxy-2-propanon*
(IV-MAA-22)

Alle Reaktionen wurden zweimal durchgeführt, einmal in wässrigem Medium und einmal derart, dass jegliches H₂O durch D₂O ersetzt wurde. Für die Reaktion mit *CT*-DNA wurde eine 0.100 mg/mL Lösung an *CT*-DNA mit 20.0 mM 1-*tert*-Butoxy-2-propanon in 5.00 mM

Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) für 300 min mit 300 nm bestrahlt (im Rayonet-Photoreaktor wurde durch ein dickwandiges Becherglas bestrahlt) und gemäß AAV-2 analysiert (Tabelle 9.14).

Tabelle 9.14: D₂O-Effekt auf die Oxidation von CT-DNA durch 1-*tert*-Butoxy-2-propanon^{a)}

	8-oxoGua + GRP [%]
H ₂ O	1.70 ± 0.23
D ₂ O	0.69 ± 0.18

a) Reaktionsbedingungen: [CT-DNA] = 0.100 g/L, [1-*tert*-Butoxy-2-propanon] = 20.0 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer in D₂O (pD 7.0) : Acetonitril (9:1), T = 0 °C, λ = 300 nm, t = 300 min.

9.4 dG-Oxidation durch AP-Derivate

9.4.1 UV-Spektroskopie

9.4.1.1 UV-Spektren der Acetophenonderivate

Zur Bestimmung der UV-Spektren wurden in 1-mL-Küvetten gegen eine entsprechende Referenzprobe mit reinem Lösungsmittel als Standard ein UV-Spektrum aufgenommen. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass die optische Dichte des zu detektierenden Maximums ungefähr Eins betrug.

V-B1: *Bestimmung der UV-Spektren der Acetophenonderivate in Acetonitril*
(VII-MAA-13)

In Acetonitril liegen die Absorptionsmaxima bei ungefähr 240 nm, außerdem beobachtet man eine Schulter bei 280 nm, die sich bis ca. 300 nm ausdehnt (Abbildung 9.3).

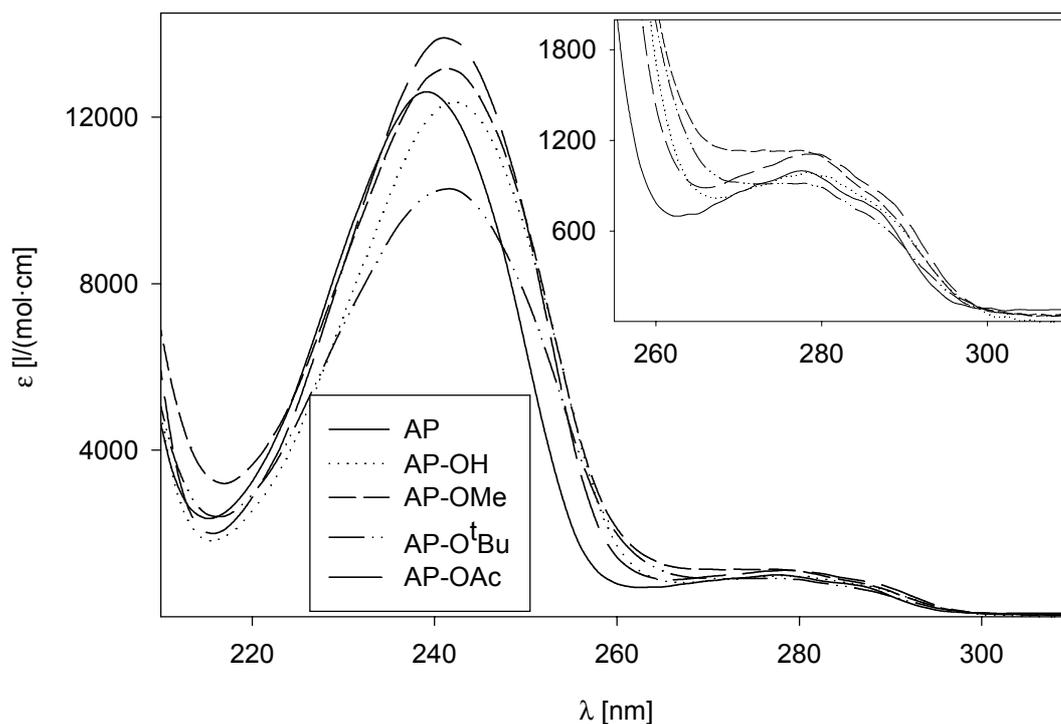


Abbildung 9.3: UV-Spektren der Acetophenonderivate in Acetonitril

V-B2: Bestimmung der UV-Spektren der Acetophenonderivate in Wasser : Acetonitril (9 : 1)
(VII-MAA-14a)

In H₂O : Acetonitril sind die Spektren ähnlich denen in Acetonitril (Abbildung 9.4). Die

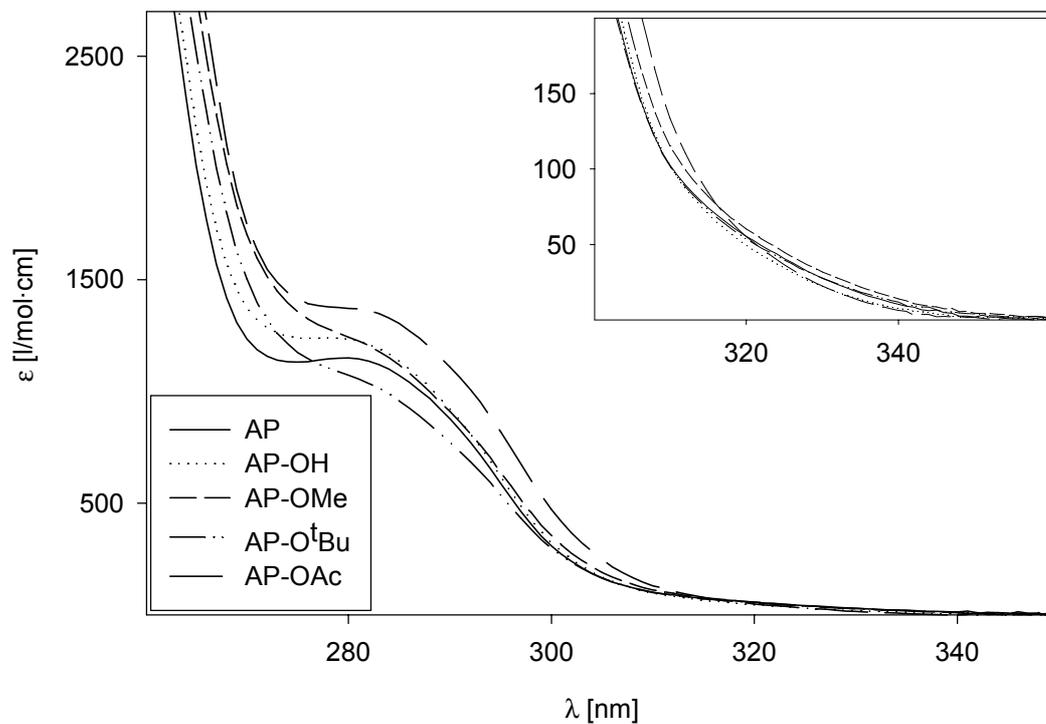


Abbildung 9.4: UV-Spektren der Acetophenonderivate in H₂O : Acetonitril (9:1)

Acetophenonderivate absorbieren wie erwartet, recht ähnlich, und die Spektren bestehen aus einem Maximum <260 nm mit einer Schulter bei ungefähr 285 nm, in deren langwelligem Teil die Bestrahlung im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) erfolgt.

V-B3: *Bestimmung des UV-Spektrums von Benzophenon in Wasser : Acetonitril (9 : 1)*
(VII-MAA-14b)

Benzophenon absorbiert etwas langwelliger (265 nm) mit einer Schulter bei 320 nm und der Extinktionskoeffizient ist daher bei der eingesetzten 300 nm-Rayonetstrahlung ungefähr dreimal größer als die der Acetophenonderivate (Abbildung 9.5).

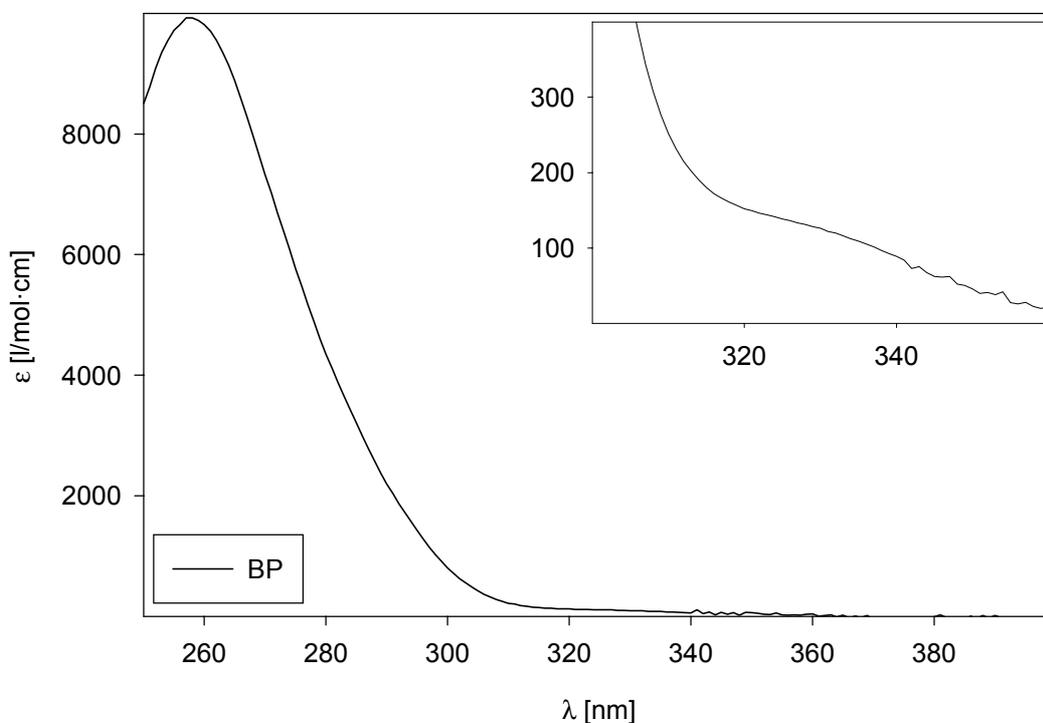


Abbildung 9.5: UV-Spektrum von Benzophenon in Wasser : Acetonitril (9:1)

9.4.2 Laserblitz-Photolysestudien

9.4.2.1 Messung der Triplettabsorptionsspektren

Die Triplettabsorptionsspektren wurden direkt nach dem Abklingen des Laserblitzes detektiert. Da ein Mehrkanalgerät zur Verfügung stand, konnten die Spektren mit einem einzigen Laserblitz aufgenommen werden und mussten nicht Punkt für Punkt gemessen werden.

V-B4: Messung der Triplettabsorptionsspektren

(VII-MAA-38a)

Die für die Acetophenonderivate erhaltenen Triplettabsorptionsspektren sind in Abbildung 9.6 dargestellt.

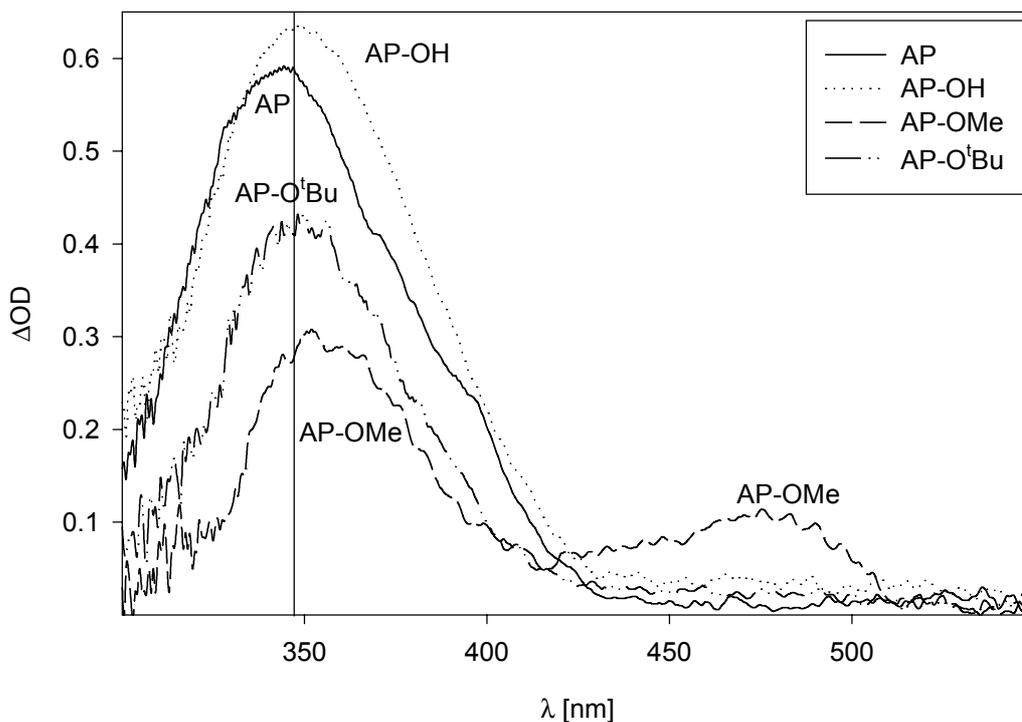


Abbildung 9.6: Triplettabsorptionsspektren der Acetophenonderivate

9.4.2.2 Messung der Triplettlebenszeiten sowie der Quenchkonstanten

Die Triplettlebenszeiten sowie die Triplettquenchkonstanten wurden gemäß AAV-6 durch zeitaufgelöste Detektion der Absorption bei 340 nm bestimmt. Es wurde, sofern nicht anders angegeben eine Lösung ohne Zusatz von Quencher gemessen, daraus erhält man die Triplettlebenszeit des angeregten Zustandes im verwendeten Lösungsmittel. Zusätzlich wurden, sofern nicht anders angegeben, drei verschiedene Konzentrationen an Quencher eingesetzt und aus diesen Werten durch Auftragen der Geschwindigkeitskonstanten gegen die Quencherkonzentration die Geschwindigkeitskonstante für die Deaktivierung des Triplettzustandes bestimmt. In Abbildung 9.7 ist am Beispiel der Löschung des Triplettzustandes von Acetophenon (AP) durch DNA dargestellt, wie die Abklingkurven aussehen. Als Lösungsmittel wurde, sofern nicht anders angegeben, Wasser : Acetonitril (9:1)

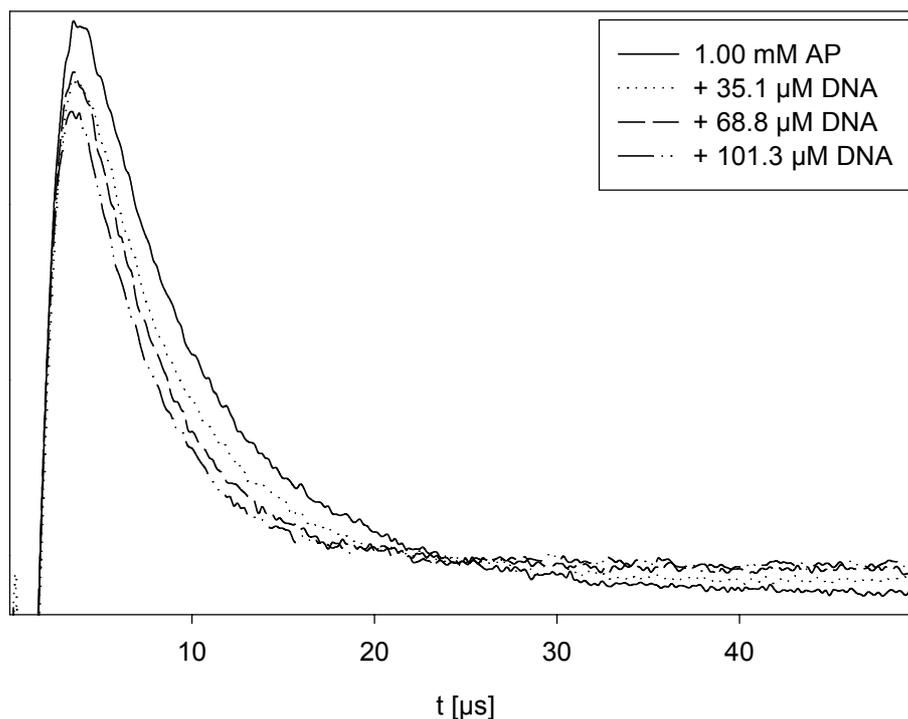


Abbildung 9.7: Abklingkurven (340 nm) des Acetophenontriplettzustandes bei verschiedenen DNA-Konzentrationen (bezogen auf Gua, VII-MAA-38/15)

eingesetzt. Die Kurve in Abwesenheit von Quencher zeigt einen exponentiellen Abfall und wurde daher mit einer Exponentialfunktion gefittet. Die Kurven in Gegenwart von Quencher zeigen einen schnelleren Abfall der Absorption und später (nach $>25 \mu\text{s}$) einen schwachen, längeranhaltenden Transienten. Dieser wurde der Bildung von Ketylradikalen zugeordnet und nach einem Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung mitgefittet, um eine Verfälschung des Fits erster Ordnung zu vermeiden. In die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für die Triplettenquenchkonstante geht jedoch nur der Term erster Ordnung ein (k_1 ist die Geschwindigkeitskonstante für den Löschvorgang, Gleichung 9.1).

$$I = I_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad \text{Gl. 9.1}$$

Die so aus dem monoexponentiellen Fit erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die Quencherkonzentration aufgetragen und durch lineare Regression die Quenchkonstanten berechnet. Für die DNA-Versuche wurden die Quenchkonstanten auf die Base Guanin bezogen (0.100 mg/mL CT-DNA enthält 62.5 μM Gua). Es wurden

Quenchkonstanten für dG, 8-oxodG, CT-DNA, das Keton selbst (*self-quenching*) sowie O₂ bestimmt. Die Ergebnisse sind nachfolgend (V-B5 bis V-B10) dargestellt.

V-B5: Bestimmung der Triplettlebenszeiten der Ketone

Die Triplettlebenszeiten der Ketone wurden aus den Exponentialfaktoren gewonnen, die aus dem Fit erster Ordnung erhalten wurden. Aus k berechnet sich die Halbwertszeit gemäß Gleichung 9.2:

$$\tau = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Gl. 9.2}$$

Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 9.15 dargestellt.

Tabelle 9.15: Triplettlebensdauern der Ketone
(VII-MAA-38b)

	τ_T [μs] ^{a),b)}
AP	6.6
AP-OH	1.1
AP-OMe	c)
AP-O ^t Bu	0.54
AP-OAc	6.7
BP	9.2

a) bestimmt für [AP-R] = 1.00 mM in H₂O : Acetonitril (9:1); b) Fehler $\pm 10\%$; c) beim beobachteten Transienten handelt es sich nicht um das Triplett.

V-B6: Bestimmung der dG-Quenchkonstanten (VII-MAA-38c)

Die Geschwindigkeitskonstanten für den Quenchprozess von angeregtem Keton mit dG wurde durch Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten k bei unterschiedlichen dG-Konzentrationen gegen die dG-Konzentration bestimmt. Aus der Steigung der Regressionsgeraden des Stern Volmer-Plots wurde die Geschwindigkeitskonstante für den Quenchvorgang berechnet (Abbildungen 9.8 bis 9.12).

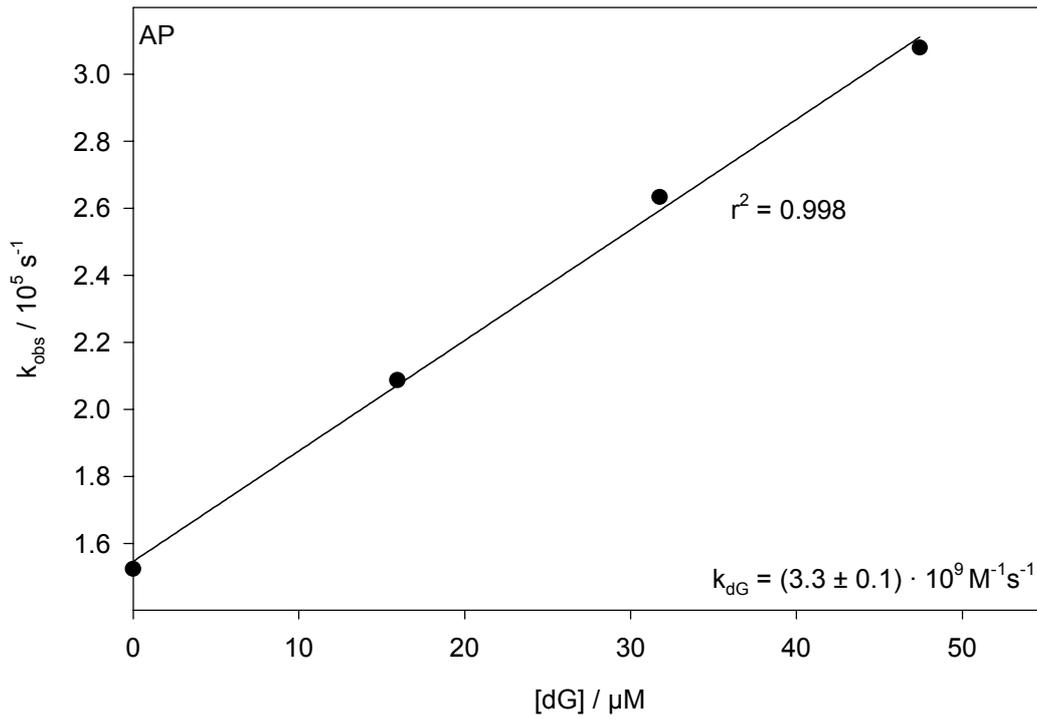


Abbildung 9.8: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP durch dG.

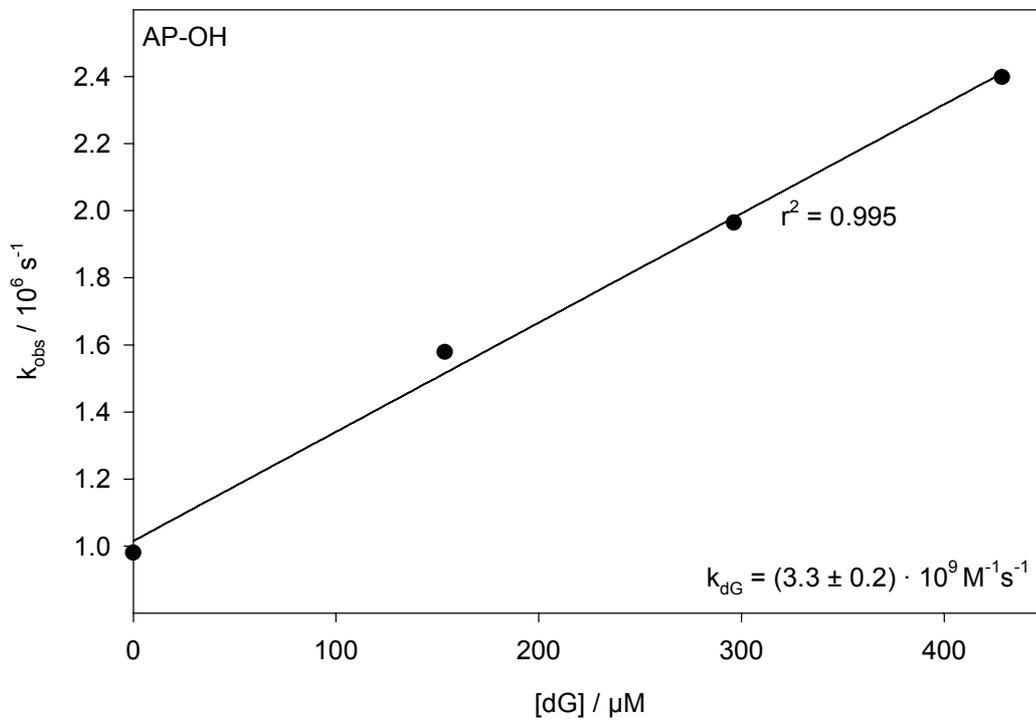


Abbildung 9.9: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP-OH durch dG.

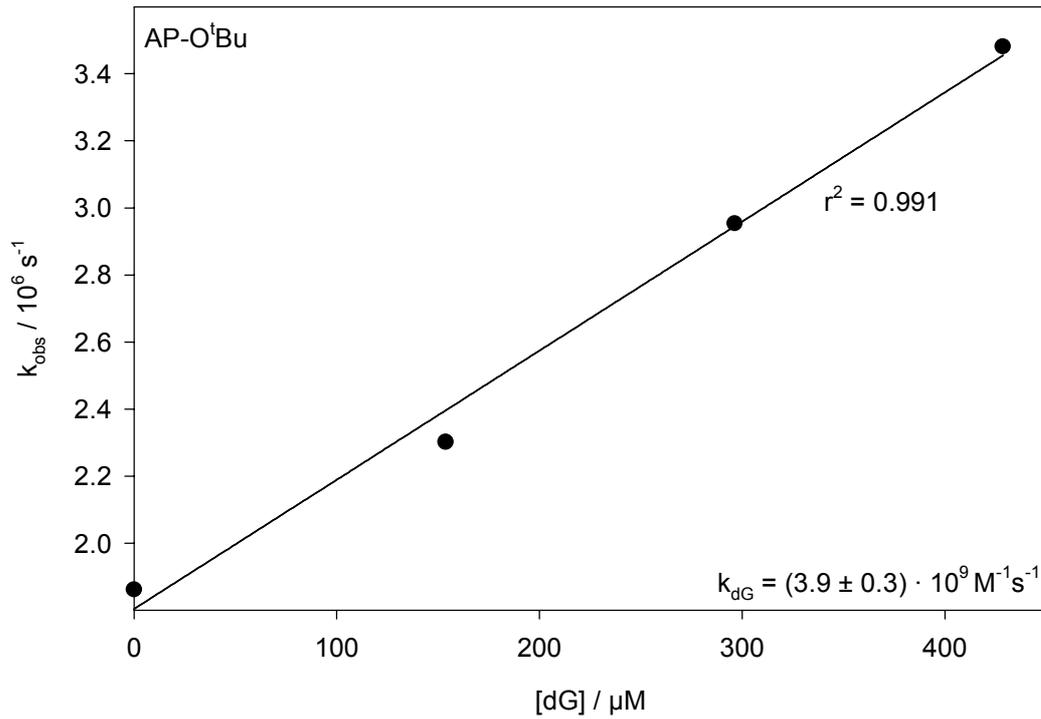


Abbildung 9.10: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP-O^tBu durch dG.

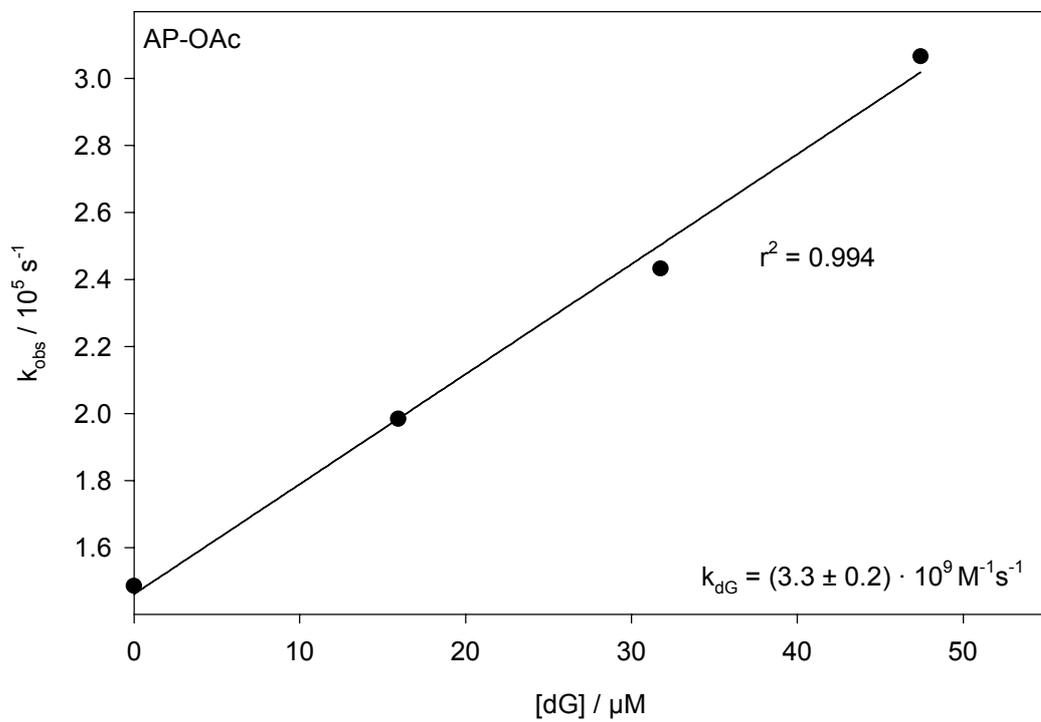


Abbildung 9.11: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP-OAc durch dG.

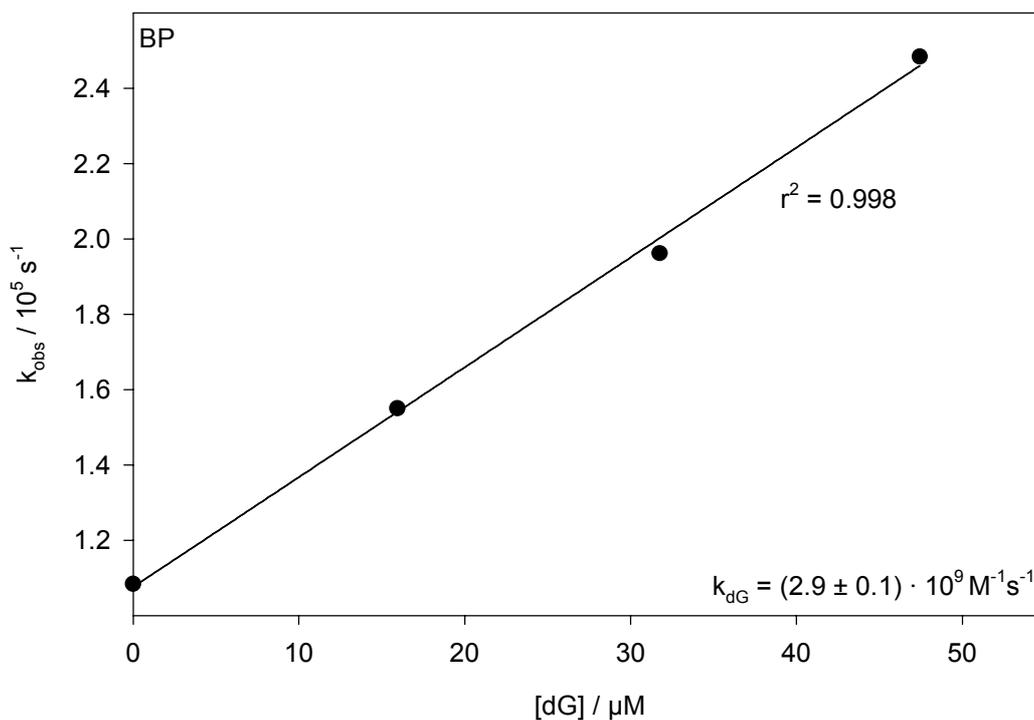


Abbildung 9.12: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem BP durch dG.

V-B7: Bestimmung der 8-oxodG-Quenchkonstanten

(VII-MAA-38d)

Die Geschwindigkeitskonstanten mit 8-oxodG wurden analog denen mit dG bestimmt (V-B6). Die Stern Volmer-Plots sind in den Abbildungen 9.13 bis 9.17 dargestellt.

V-B8: Bestimmung der Quenchkonstanten durch die Ketone selbst

(VII-MAA-38f)

Für die Bestimmung der Quenchkonstanten mit den Ketonen selbst wurden unterschiedliche Konzentrationen der Ketone eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte analog V-B6. Die Stern Volmer-Plots sind in den Abbildungen 9.18 bis 9.20 gezeigt.

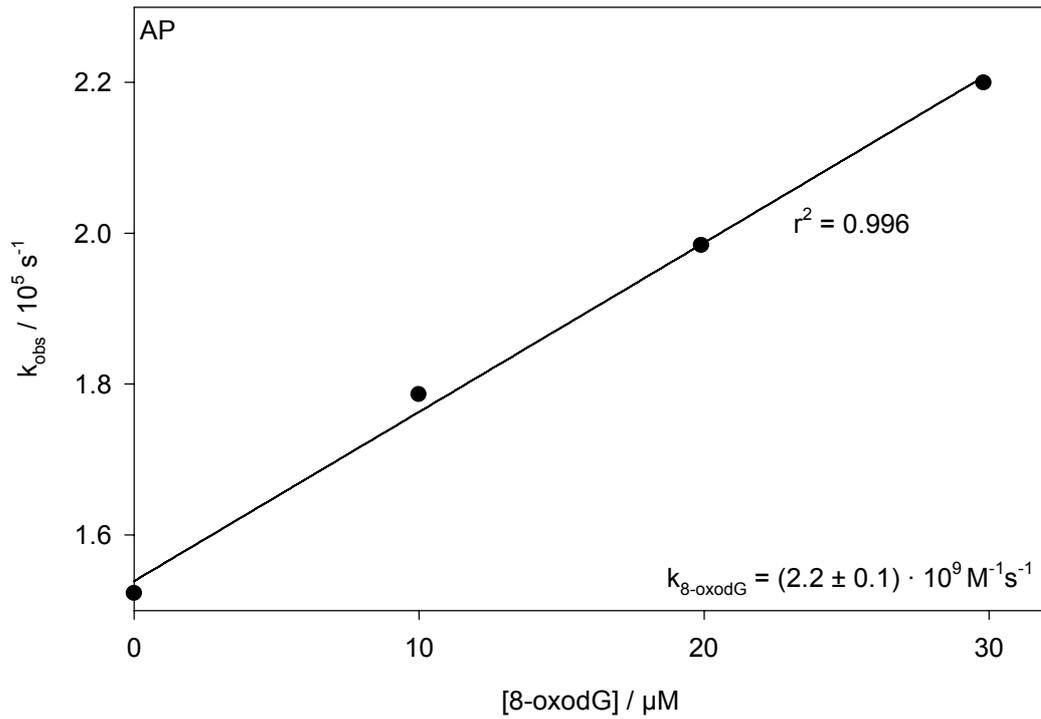


Abbildung 9.13: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP durch 8-oxodG.

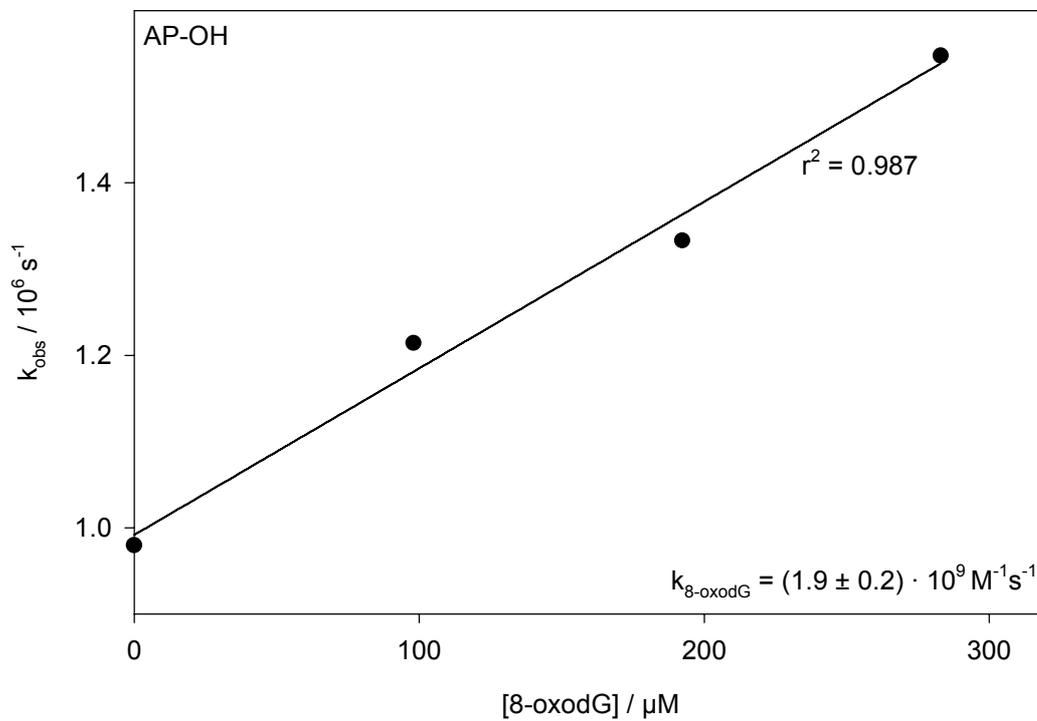


Abbildung 9.14: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP-OH durch 8-oxodG.

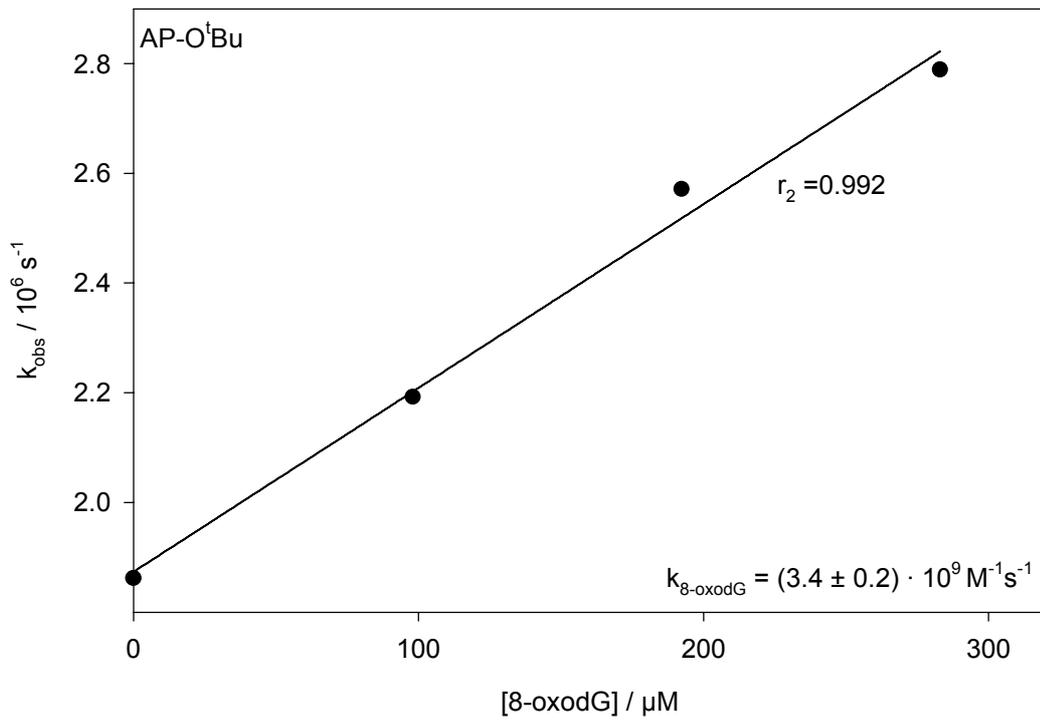


Abbildung 9.15: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP-O^tBu durch 8-oxodG.

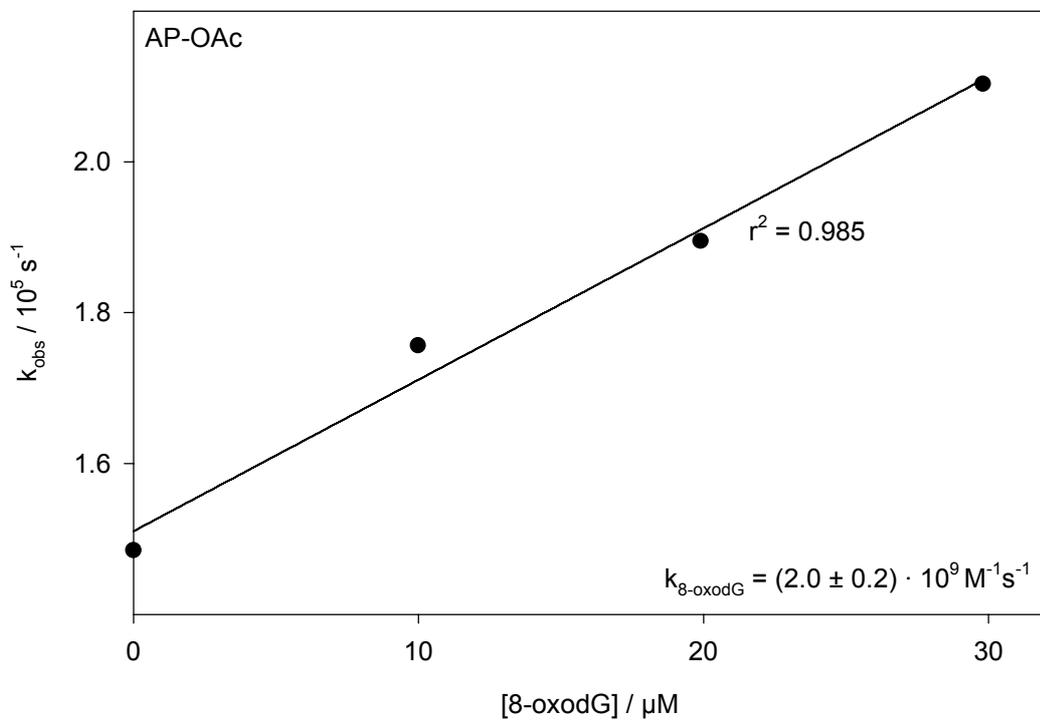


Abbildung 9.16: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP-OAc durch 8-oxodG.

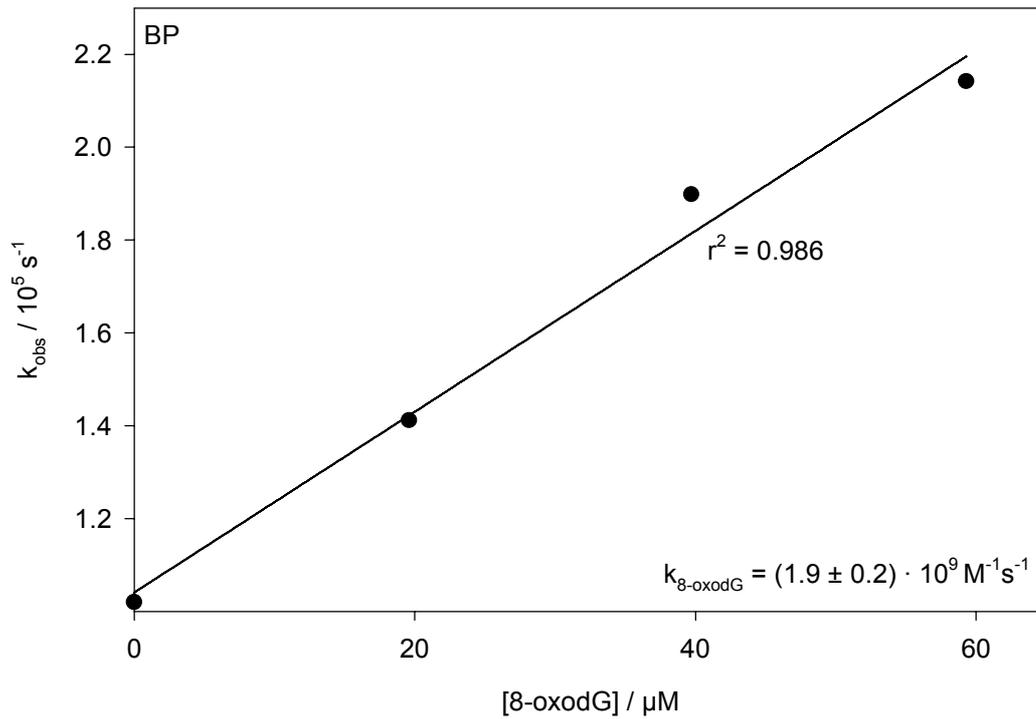


Abbildung 9.17: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem BP durch 8-oxodG.

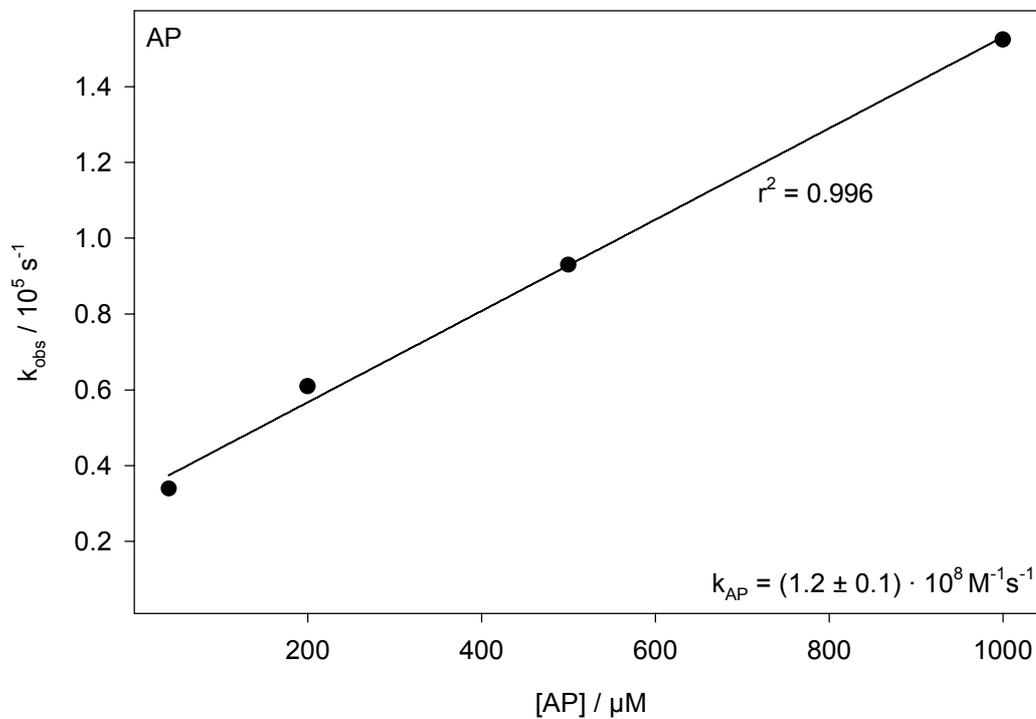


Abbildung 9.18: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP durch AP.

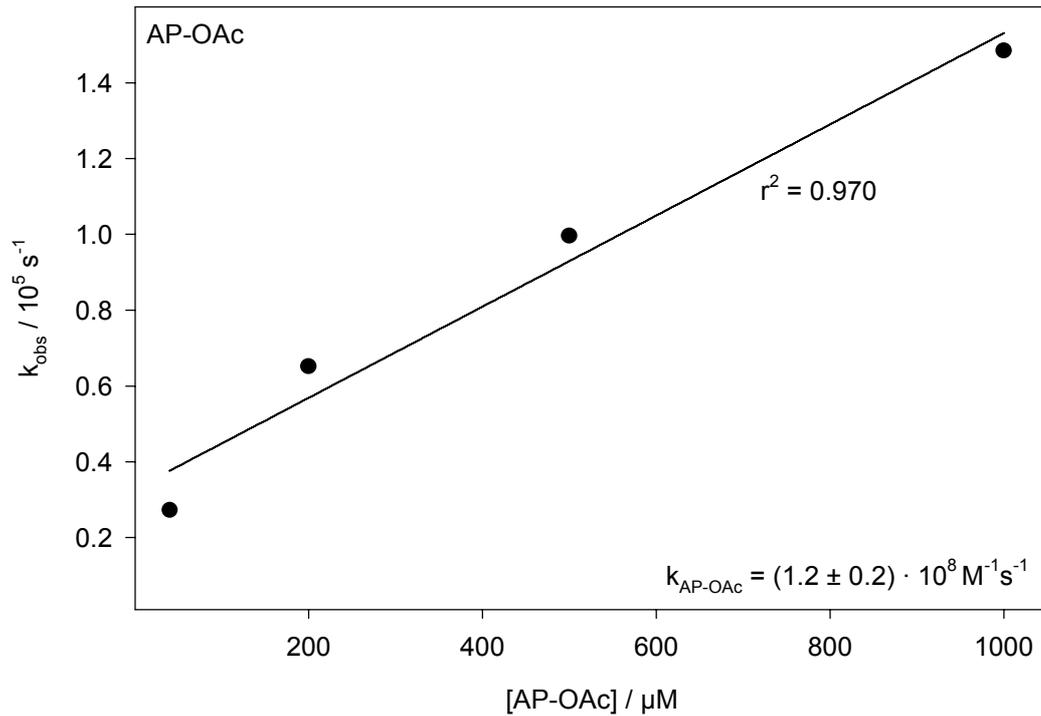


Abbildung 9.19: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem AP-OAc durch AP-OAc.

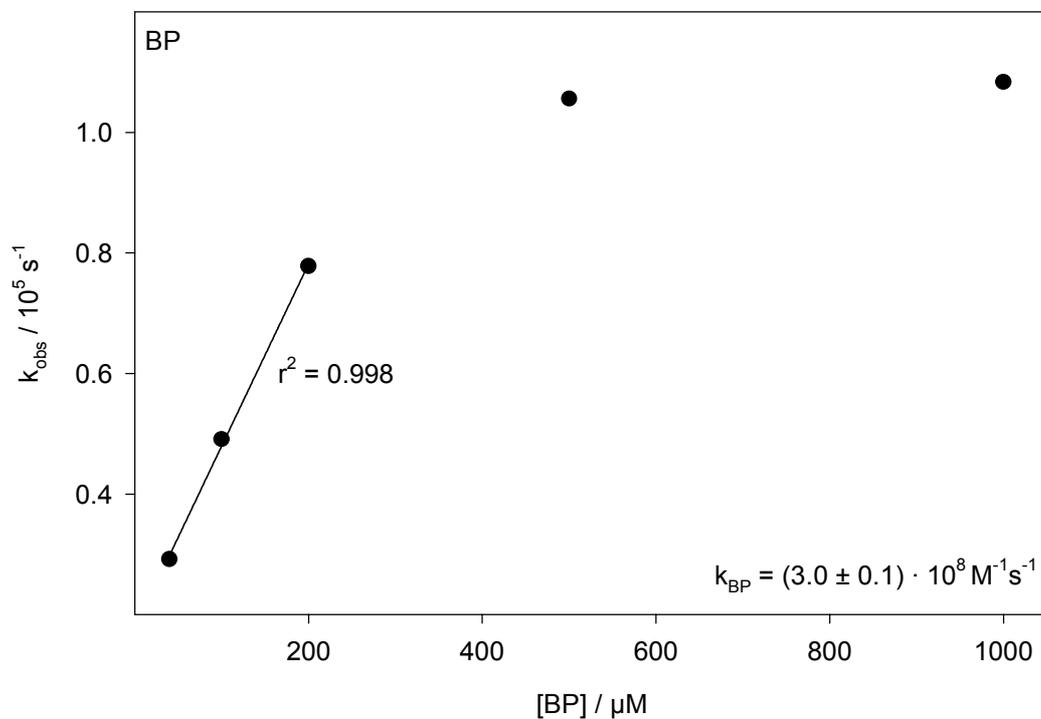


Abbildung 9.20: Kinetik der Deaktivierung von triplettangeregtem BP durch BP.

Bei Benzophenon wurde für Konzentrationen $> 200 \mu\text{M}$ eine Sättigung des Quenchverhaltens beobachtet. Für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten wurden nur die ersten drei Werte bis zu einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ verwendet.

V-B9: *Bestimmung der Quenchkonstanten durch molekularen Sauerstoff*
(VII-MAA-38g)

Die Bestimmung der Quenchkonstanten durch molekularen Sauerstoff erfolgte durch Messungen in Abwesenheit von Sauerstoff. Anschließend wurde belüftet, einige Sekunden gut geschüttelt, damit sich die Gleichgewichtskonzentration von $0.265 \text{ mM O}_2^{233}$ einstellen kann und anschließend nochmals die Triplettabklingkurve gemessen. Aus der Differenz der zwei Messungen wurden die in Tabelle 9.16 dargestellten Geschwindigkeitskonstanten berechnet.

Tabelle 9.16: Quenchkonstanten mit Sauerstoff

	$k_{\text{O}_2} [10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]^{\text{a),b),c)}$
AP	3.2 (4.0 ^{d)})
AP-OH	4.0
AP-O ^t Bu	1.9
AP-OAc	2.4
BP	4.8

a) bestimmt für $[\text{AP-R}] = 1.00 \text{ mM}$ in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril} (9:1)$; b) Fehler $\pm 10\%$; c) $[\text{O}_2] = 0.265 \text{ mM}$, Laboratmosphäre; d) in reinem Wasser.

9.4.2.3 Transient bei der Photolyse von AP-OMe

V-B10: *Verhalten des in der Photolyse von AP-OMe gebildeten Transienten*
(VII-MAA-38h)

AP-OMe wurde analog den anderen Ketonen angeregt und bezüglich des Quenchverhaltens untersucht. Die Daten sind nachfolgend dargestellt. Die Triplettlebensdauer wurde mit 632 ns bestimmt, die Deaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 9.17 zusammengefasst.

Tabelle 9.17: Geschwindigkeitskonstanten der Deaktivierung des beobachteten Transienten

	$k [10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]^{\text{a)}$
$\text{dG}^{\text{b)}$	1.5
$\text{O}_2^{\text{b)}$	0.40
1-Methylnaphthalin ^{c)}	$\ll 1$

a) Fehler $\pm 10\%$; b) in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (9:1); c) in Acetonitril.

9.4.3 Kinetik der Photolyse

9.4.3.1 Kinetik der Ketonphotolyse in konzentrierter Lösung

V-B11: Bestrahlung von AP-R in $\text{D}_2\text{O} : \text{CD}_3\text{CN}$ (9:1), NMR-Versuch (VI-MAA-40)

Um einen Überblick über die relativen Photolyseraten zu erhalten, wurden die verschiedenen substituierten Acetophenone in einem NMR-Rohr als 160 mM Lösung in $\text{D}_2\text{O} : \text{CD}_3\text{CN}$ (40:60) im Rayonet-Photoreaktor bei 300 nm bestrahlt und per NMR-Analytik der Umsatz bestimmt (Tabelle 9.18).

Tabelle 9.18: Acetophenon-Umsatz bei Bestrahlung (300 nm)^{a)}

t	Umsatz			
	AP-OH	AP-O ^t Bu	AP-OMe	AP-OAc
[min]	[%]	[%]	[%]	[%]
490	66%	>95%	>95%	17%
5492	>95%	>95%	>95%	38%

a) Reaktionsbedingungen: in $\text{D}_2\text{O} : \text{CD}_3\text{CN}$ (9:1), $T = 0^\circ\text{C}$, $\lambda = 300 \text{ nm}$.

Bei AP-OH sowie AP-O^tBu entstehen als Produktsignale hauptsächlich breite Signale in der Aromatenregion (7.6-7.8 ppm), die auf eine komplexe Produktmischung hinweisen (enthält wahrscheinlich zum Großteil Acetaldehyd, eine zweifelsfreie Charakterisierung konnte nicht erfolgen), aliphatische Signale gehören nur zu Nebenprodukten. Im Fall der AP-OMe-Photolyse konnte nach 490 min Bestrahlung und >95% Umsatz 61% deuteriertes Acetophenon detektiert werden, dass durch Norrish-Typ-II-Spaltung entstanden ist. Damit ist

für diesen Fall die Norrish-Typ-II-Reaktion belegt, die eine Bildung von Radikalen verhindert. Im Fall der AP-OAc-Photolyse entsteht im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum hauptsächlich ein neues Singulett bei 1.97 ppm, bei dem es sich um das Methylsignal der Essigsäure (entspricht bei 17% Umsatz nach 490 min einer Ausbeute von 68%) handelt.

9.4.3.2 Kinetik der Ketonzerersetzung in verdünnter Lösung

V-B12: *Bestimmung der Zersetzungskinetik der Ketone bei Bestrahlung*
(V-MAA-76)

Um die Kinetik der Photolyse der Ketone zu bestimmen, wurden diese als 0.100 mM bzw. 5.00 mM Lösung in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (9:1) im Rayonet-Photoreaktor (300 nm, 0 °C, AAV-1) bestrahlt. Der Ketonumsatz wurde gemäß AAV-5 bestimmt (Tabelle 9.19).

Tabelle 9.19: Zeitprofil der photoinduzierten Zersetzung von AP-OH sowie AP-O^tBu in Acetonitril : H_2O (9:1)^{a)}

t [min]	Umsatz			
	AP-OH 0.1 mM [%]	AP-OH 5.0 mM [%]	AP-O ^t Bu 0.1 mM [%]	AP-O ^t Bu 5.0 mM [%]
0	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 2
31	36 ± 1	29 ± 0	77 ± 1	36 ± 0
60	57 ± 0	42 ± 0	94 ± 2	57 ± 0
135	78 ± 0	63 ± 0		79 ± 2

a) Reaktionsbedingungen: in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (9:1), $T = 0\text{ °C}$, $\lambda = 300\text{ nm}$.

9.4.4 Radikalabfang-Experimente

Es wurden Radikalabfang-Experimente mit DMPO durchgeführt. Dazu wurde eine 2.00 mM Lösung des entsprechenden Ketons mit 50.0 mM DMPO in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (9:1) angesetzt, dreimal gemäß „freeze-pump-thaw“ entgast, bestrahlt (Rayonet-Photoreaktor, 300 nm, 20 °C) und anschließend EPR-spektroskopisch untersucht. Die Spektrometereinstellungen waren wie folgt: „receiver gain“: $4 \cdot 10^5$; „modulation amplitude“ 0.52 G; „microwave power“: 20 mW; „time constant“: 163.84 ms; „sweep time“: 167.77 s; „sweep width“: 100 G und es wurden jeweils 5 scans akkumuliert.

V-B13: EPR-Studie – Spinabfangexperimente während der Photolyse von AP-OH
(VII-MAA-9)

Dieser Versuch wurde in Schlenck-Gefäßen durchgeführt, die vor der Bestrahlung [1.00 mM Keton sowie 50.0 mM DMPO in H₂O : Acetonitril (9:1)] durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ entgast wurden. Die Bestrahlungsdauer betrug 30 min bei 20 °C. Die EPR-Spektren wurden direkt danach aufgenommen. Die Zeit zwischen Bestrahlung und Messung ist angegeben (Abbildung 9.21).

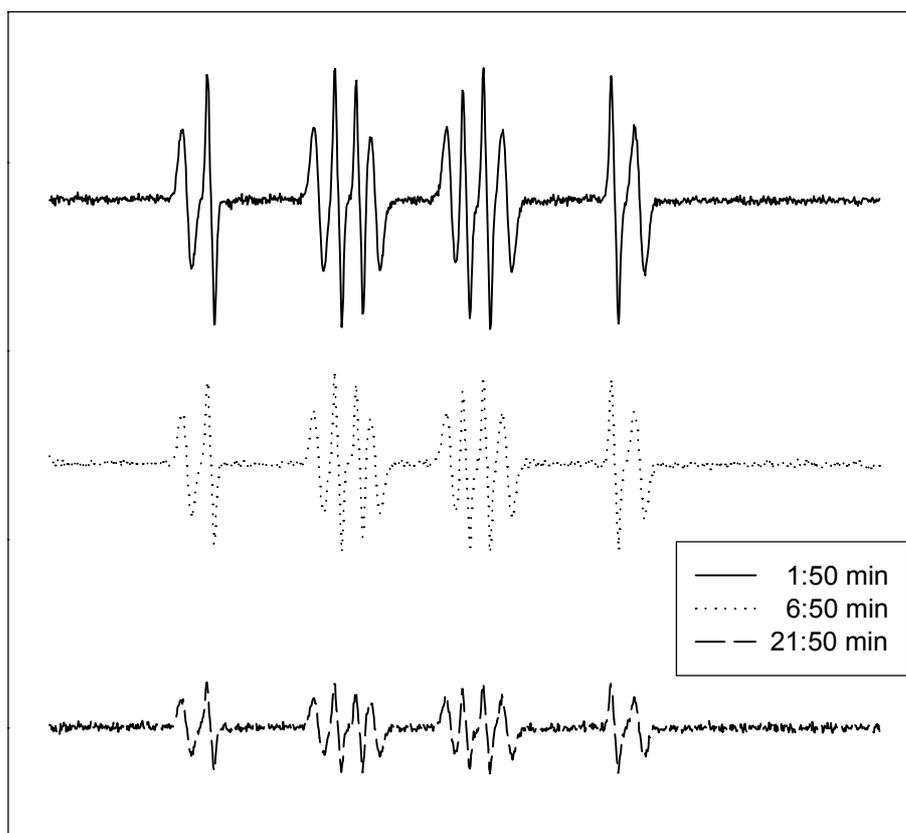


Abbildung 9.21: EPR-Spektren, aufgenommen nach der Photolyse von AP-OH [in H₂O : Acetonitril (9:1), dreimal „freeze-pump-thaw“] in Gegenwart des Radikalfängers DMPO (50.0 mM)

V-B14: EPR-Studie – Spinabfangexperimente während der Photolyse von AP-O^tBu
(VII-MAA-8)

Analoge Experimente wurden mit AP-O^tBu durchgeführt, die Spektren der DMPO-Addukte sind in Abbildung 9.22 dargestellt.

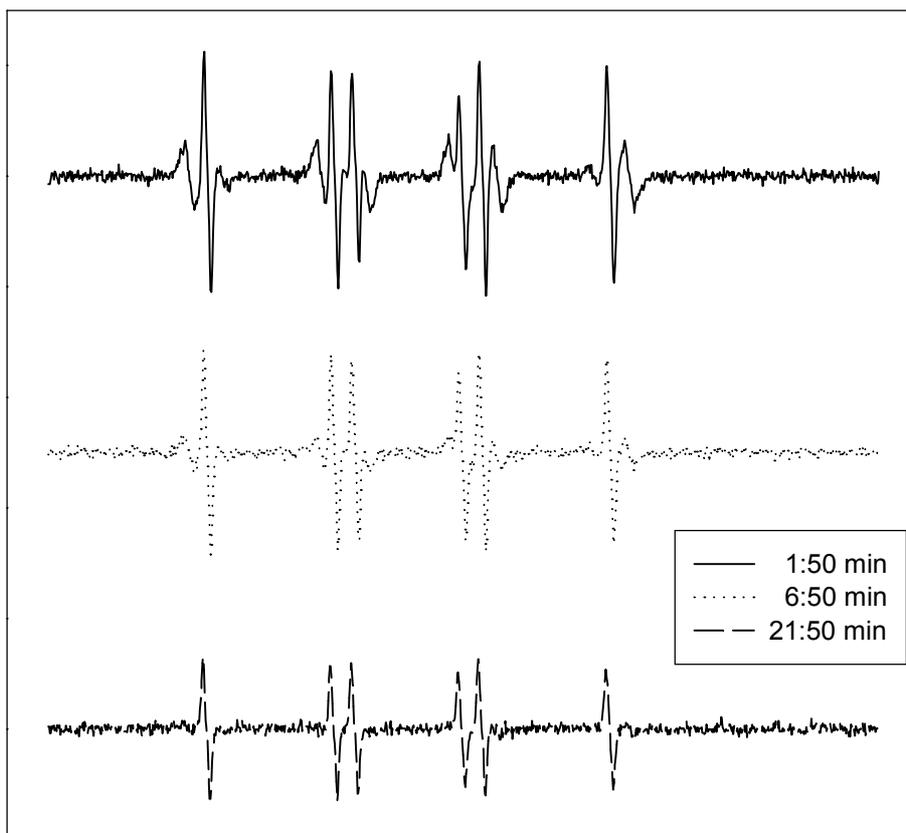


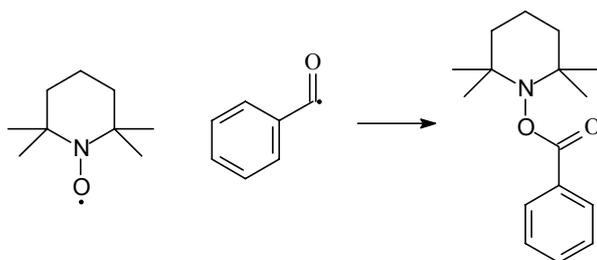
Abbildung 9.22: EPR-Spektren, aufgenommen nach der Photolyse von AP-O^tBu [in H₂O : Acetonitril (9:1), dreimal „freeze-pump-thaw“] in Gegenwart des Radikalfängers DMPO (50.0 mM)

Nach Bestrahlung von AP, AP-OMe, AP-OAc, BP in Abwesenheit sowie bei Bestrahlung von AP-OH sowie AP-O^tBu in Gegenwart eines Überschusses an Sauerstoff konnten keine Radikaladdukte detektiert werden.

9.4.5 Quantifizierung der gebildeten Acylradikale mit TEMPO

9.4.5.1 Entwicklung einer Messmethode

Um die Reaktivität der gebildeten Radikalspezies abschätzen zu können, wurden die durch α -Spaltung gebildeten Benzoylradikale mit TEMPO abgefangen^{234,235} (Gl. 6.1), und die resultierenden Addukte mittels HPLC/UV-Analytik [$\lambda = 240$ nm, nahe des Absorptions-



Gl. 6.1

maximums von 234 nm auf einer Eurosphere 100-C18 7 μ M Säule mit 4.60 mm ID und 25 cm Länge mit 1.00 mL/min $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (15:85) als Eluens] quantifiziert (VI-MAA-45). Die Synthese des Standards erfolgte nach einer Literaturvorschrift²³². Die Retentionszeit des Standards betrug 5.49 min. Die Menge an abgefangenem Benzoylradikal wurde gegen einen externen Standard bestimmt und es wurden die UV-Spektren (DAD-Detektor, Abbildung 9.23) verglichen. Zur Quantifizierung der in der Photolyse

File: C:\NEUEHP\1\H8060045.DAD

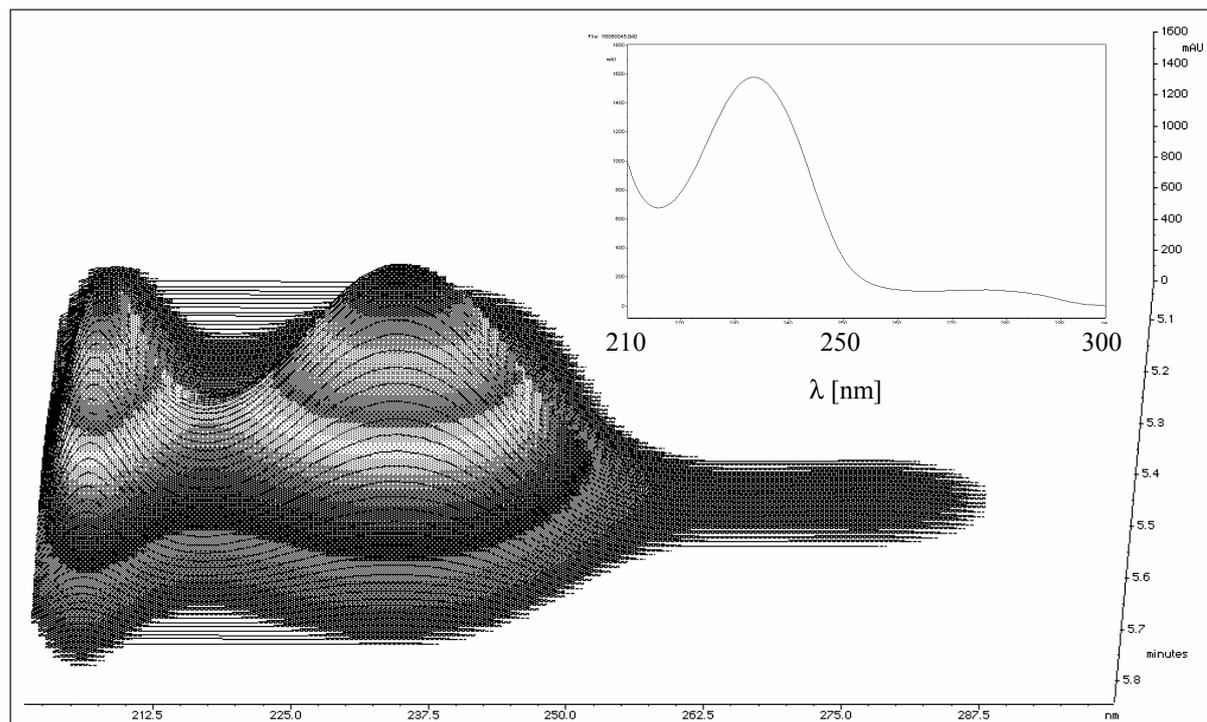


Abbildung 9.23: Chromatogramm sowie UV-Spektrum von TEMPO-Bz zur Bestimmung der Benzoylradikale.

der Ketone gebildeten Radikale wurden jeweils 400 μ L einer 1.00 mM Lösung des Ketons in Gegenwart von 10.0 mM TEMPO in $\text{H}_2\text{O} : \text{Acetonitril}$ (9:1) hergestellt. Diese wurde im Rayonet-Photoreaktor (300 nm, 0 °C, AAV-1) bestrahlt. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurde jeweils eine Probe von 20 μ L entnommen und mittels eben beschriebener HPLC-Methode auf TEMPO-Bz hin untersucht.

V-B15: *Detektion von TEMPO-Bz*
(VI-MAA-48)

Die bei der Bestrahlung der verschiedenen Ketone erhaltenen Mengen an TEMPO-Bz sind in Tabelle 9.20 zusammengefasst.

Tabelle 9.20: Zeitprofil der Bildung von Benzoylradikalen [%]^{a)}

t [min]	AP-OH	AP-OMe	AP-O ^t Bu	AP-OAc
120	3.8	0.2	4.8	0.2
200	5.9	0.4	7.7	0.2
480	12.4	0.7	13.2	0.4
1170	21.0	0.7	13.3	2.0

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 1.00 mM, [TEMPO] = 10.0 mM in H₂O : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C. Die Angaben [%] sind bezogen auf die Menge an eingesetztem Keton.

9.4.6 Allgemeine Untersuchungen zur Reaktivität der Ketone

9.4.6.1 Einfluss von Wasserstoff- bzw. Elektronendonoren

V-B16: *Einfluss von ⁱPrOH auf die Photolyse von Ketonen (¹H-NMR-Analytik)*
(VI-MAA-79)

Es wurden 100 mM Lösungen der Ketone in Gegenwart und Abwesenheit von 200 mM ⁱPrOH in D₂O : CD₃CN (1:1) hergestellt. Als NMR-Standard wurde 100 mM ^tBuOH zugesetzt. Es wurde für 186 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt, und anschließend ¹H-NMR-spektroskopisch der Umsatz sowie die Bildung von Aceton bestimmt (Tabelle 9.21).

V-B17: *Einfluss von dG auf die Photolyse von Ketonen (¹H-NMR-Analytik)*
(VI-MAA-83)

Es wurden 30 mM Lösungen der Ketone in Gegenwart und Abwesenheit von 30 mM dG in D₂O : CD₃CN (1:1) hergestellt. Als NMR-Standard wurde 5.00 mM ^tBuOH zugesetzt. Es

Tabelle 9.21: Einfluss von ¹PrOH auf die Photolyse von Ketonen - Umsatz des Ketons [%]^{a)}

	Umsatz		
	AP [%]	AP-OAc [%]	BP [%]
Umsatz ohne ¹ PrOH ^{b)}	8	5	4
Umsatz mit ¹ PrOH ^{b)}	63	56	99
Umsatz ¹ PrOH ^{c)}	33	34	57
Bildung Aceton ^{c)}	23	30	39

a) Reaktionsbedingungen: 100 mM Keton in D₂O : CD₃CN (1:1) mit 100 mM ¹BuOH als NMR-Standard; b) die Werte sind bezogen auf die Anfangskonzentration an Keton; c) die Werte sind bezogen auf die Anfangsmenge an ¹PrOH, es wurden bezogen auf das Keton 2.00 Äquiv. ¹PrOH eingesetzt (200 mM).

wurde für 186 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt, und anschließend ¹H-NMR-spektroskopisch der Umsatz bestimmt (Tabelle 9.22).

Tabelle 9.22: Einfluss von dG auf die Photolyse von Ketonen - Umsatz an Keton [%]^{a)}

	Umsatz	
	AP-OAc [%]	BP [%]
ohne dG	16	16
mit dG	74	34

a) Die Werte sind bezogen auf die Anfangskonzentration an Keton; Reaktionsbedingungen: 30 mM Keton in D₂O : CD₃CN (1:1) mit 5 mM ¹BuOH als NMR-Standard in Gegenwart und Abwesenheit von 30 mM dG. λ = 300 nm, t = 186 min.

V-B18: *Einfluss von dG und 8-oxodG auf die Photolyse von Ketonen (HPLC-Analytik)*
(VII-MAA-19, VII-MAA-20, VII-MAA-21)

Es wurden 400 μM Keton in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) gelöst und in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von 200 μM dG bzw. 200 μM 8-oxodG für 45 min bei 0 °C gemäß AAV-1 photolysiert. Der Umsatz an Keton wurde anschließend gemäß AAV-5 analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.23 zusammengefasst.

Tabelle 9.23: Einfluss von dG sowie 8-oxodG auf die Photolyse von Ketonen - Umsatz an Keton [%]^{a)}

Additiv	Umsatz				
	AP	AP-OH	AP-OMe	AP-O ^t Bu	AP-OAc
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
ohne	3 ± 1	53 ± 1	97 ± 0	74 ± 0	1 ± 3
dG	59 ± 3	39 ± 1	94 ± 1	62 ± 0	41 ± 2
8-oxodG	50 ± 1	44 ± 6	92 ± 1	59 ± 4	29 ± 0

a) Bezogen auf die Ketonkonzentration vor der Photolyse ($\lambda = 300 \text{ nm}$, $t = 45 \text{ min}$).
Reaktionsbedingungen: 400 μM Keton in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1),
in Gegenwart und Abwesenheit von 200 μM dG bzw. 8-oxodG.

9.4.6.2 Einfluss der dG-Konzentration

V-B19: Konzentrationsabhängigkeit der dG-Oxidation

(VI-MAA-85, VI-MAA-86, VII-MAA-5)

Hierzu wurde eine Lösung von dG mit 2.00 Äquivalenten Keton in 10.0 Äquivalenten Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) hergestellt, die dann mit H₂O : Acetonitril (9:1) auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt wurde. Die Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen wurden dann für 18 min gemäß AAV-1 bestrahlt, und der dG-Umsatz wurde gemäß Methode 2 analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.24 dargestellt.

Tabelle 9.24: Konzentrationsabhängigkeit der dG-Oxidation durch Ketone - Umsatz an dG [%]^{a)}

dG [μM]	16.7	30.0	50.0	100	150	167	300	500	1000
AP	7 ± 3		2 ± 1		11 ± 2			36 ± 2	
AP-OH	36 ± 1		34 ± 2		24 ± 2			25 ± 6	
AP-O ^t Bu	38 ± 1		33 ± 1			35 ± 1		23 ± 0	
AP-OAc	2 ± 1		5 ± 3			18 ± 3		28 ± 1	
BP		5 ± 6		32 ± 3			47 ± 1		55 ± 1

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 2.0 Äquiv. bezogen auf dG in 10 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), $\lambda = 300 \text{ nm}$, $T = 0 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 18 \text{ min}$.

V-B20: *Konzentrationsabhängigkeit der 8-oxodG-Bildung*
(VI-MAA-86)

Analog dem AP-OH-Experiment aus V-B29 wurde die Bildung von 8-oxodG gemäß Methode 2 bestimmt, die Ergebnisse sind in Tabelle 9.25 zusammengefasst.

Tabelle 9.25: Konzentrationsabhängigkeit der dG-Oxidation durch AP-OH (Bildung von 8-oxodG [%])^{a)}

dG [μ M]	5.00	16.7	50.0	150	500
8-oxodG [%]	6 \pm 0	5 \pm 0	6 \pm 1	6 \pm 0	4 \pm 0

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 2.0 Äquiv. bezogen auf dG in 10 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 18 min.

9.4.6.3 Einfluss der 8-oxodG-Konzentration

V-B21: *Konzentrationsabhängigkeit der 8-oxodG-Oxidation*
(VII-MAA-2, VII-MAA-3, VII-MAA-4)

Hierzu wurde eine Lösung von 8-oxodG mit 2.00 Äquiv. Keton in 10.0 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) hergestellt, die dann mit H₂O auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt wurde. Die Lösungen unterschiedlicher Konzentration wurden dann für 18 min gemäß AAV-1 bestrahlt und der 8-oxodG-Umsatz wurde gemäß Methode 2 analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.26 dargestellt.

Tabelle 9.26: Konzentrationsabhängigkeit der 8-oxodG-Oxidation durch Ketone - Umsatz an 8-oxodG [%]^{a)}

	8-oxodG [μ M]				
	2.00	6.67	20.0	66.7	200
AP	0	1	2	10	27
AP-OH	16	12	10	15	15
AP-O ^t Bu	36 \pm 1	31 \pm 5	43 \pm 3	42 \pm 4	39 \pm 6
AP-OAc	2 \pm 3	2 \pm 1	13 \pm 3	15 \pm 3	33 \pm 6
BP	3	4	6	22	56

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 2.0 Äquiv. bezogen auf 8-oxodG in 10 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 18 min.

9.4.7 Oxidation von dG

9.4.7.1 Reaktivität und Produkte

Es wurden Lösungen der Ketone in Gegenwart von dG in Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) bei 0 °C mit UV-Licht ($\lambda = 300$ nm, Rayonet-Photoreaktor) bestrahlt (AAV-1). Umsatz sowie die aus dG gebildeten Oxidationsprodukte wurden anschließend gemäß AAV-3 bestimmt.

V-B22: *Oxidationsprodukte von dG*
(VII-MAA-19, VII-MAA-20, VII-MAA-21)

Es wurden 200 μ M Lösungen von dG in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) und 2.00 Äquivalenten (400 μ M) Keton angesetzt und wie oben beschrieben für 45 min bestrahlt und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.27 dargestellt.

Tabelle 9.27: Photooxidation von dG durch Ketone in Gegenwart von Luftsauerstoff (Laboratmosphäre)^{a)}

[%]	AP	AP-OH	AP-OMe	AP-O ^t Bu	AP-OAc	BP
dG-Umsatz	30 ± 3	41 ± 1	4 ± 4	52 ± 3	46 ± 9	62 ± 3
Spiroiminodihydrodantoin	3 ± 2	7 ± 1	2 ± 0	21 ± 0	11 ± 1	12 ± 0
GRP	6 ± 4	11 ± 1	1 ± 0	23 ± 0	10 ± 1	13 ± 1
8-oxodG	0 ± 0	7 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

a) Alle Angaben in [%] sind bezogen auf die Anfangskonzentration an dG; Reaktionsbedingungen: [dG] = 200 μ M, [Keton] = 400 μ M in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1). $\lambda = 300$ nm, t = 45 min.

V-B23: *Kinetik der 8-oxodG-Bildung in der AP-OH-sensibilisierten Oxidation von dG*
(VI-MAA-6)

Die Reaktion von 400 μ M AP-OH und 200 μ M dG in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) wurde auch zeitabhängig untersucht. Es wurden nach

verschiedenen Bestrahlungszeiten Proben entnommen und gemäß AAV-3 untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 9.28 dargestellt. Es zeigte sich, dass während der ersten zwei Stunden

Tabelle 9.28: Zeitprofil der dG-Oxidation durch Photolyse von AP-OH [%]^{a)}

t [min]	Umsatz		Ausbeute 8-oxodG	rel. Ausbeute an 8-oxodG
	dG	AP-OH		
5	4 ± 0	8 ± 3	1.9 ± 0.0	38 ± 2
10	7 ± 0	6 ± 2	2.5 ± 0.3	39 ± 1
15	10 ± 0	14 ± 2	4.0 ± 0.1	40 ± 0
30	12 ± 1	12 ± 1	4.1 ± 0.0	40 ± 2
50	15 ± 1	20 ± 1	5.9 ± 0.1	39 ± 0
80	18 ± 1	34 ± 2	6.6 ± 0.3	39 ± 1
150	21 ± 2	41 ± 5	7.2 ± 0.1	35 ± 1

a) Reaktionsbedingungen: [AP-OH] = 400 µM, [dG] = 200 µM in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), $\lambda = 300$ nm, T = 0 °C.

die Bildung von 8-oxodG parallel zum Umsatz an dG erfolgt, d.h. dass keine weitere Oxidation von 8-oxodG stattfand und dieses somit akkumuliert werden konnte.

9.4.8 Untersuchungen zur Oxidation von 8-oxodG

9.4.8.1 Reaktivität und Produkte

Der Umsatz sowie die Oxidationsprodukte von 8-oxodG wurden bestimmt, indem Lösungen der Ketone und von 8-oxodG in Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) bei 0 °C mit UV-Licht ($\lambda = 300$ nm, Rayonet-Photoreaktor) bestrahlt wurden (AAV-1). Umsatz und Oxidationsprodukte wurden anschließend gemäß AAV-4 bestimmt.

V-B24: *Oxidationsprodukte von 8-oxodG*
(VI-MAA-62)

Es wurden 200 µM Lösungen von 8-oxodG in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) mit 1.00 mM Keton angesetzt und wie oben beschrieben verfahren. Es wurde für 25 min bei 0 °C bestrahlt (300 nm). Die Detektion des Umsatzes sowie der Oxidationsprodukte gelang mit den Methoden 2, 3 und 4. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.29 dargestellt.

Tabelle 9.29: Umsatz von 8-oxodG in der Photooxidation von 8-oxodG durch Ketone in Gegenwart von Luftsauerstoff (Laboratmosphäre)^{a)}

[%]	Blindprobe	AP	AP-OH	AP-OMe	AP-O ^t Bu	AP-OAc
8-oxodG- Umsatz	4 ± 0	79 ± 1	58 ± 3	16 ± 0	97 ± 2	84 ± 1
Spiroiminodi- hydantoin	2 ± 0	24 ± 0	2 ± 1	2 ± 0	4 ± 0	28 ± 1
GRP	0 ± 0	39 ± 3	17 ± 3	8 ± 0	41 ± 0	45 ± 1

a) Bezogen auf die Anfangskonzentration an 8-oxodG. Reaktionsbedingungen: [8-oxodG] = 200 µM, [Keton] = 1.00 mM in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 25 min.

V-B25: *Oxidationsprodukte von 8-oxodG*
(VII-MAA-19, VII-MAA-20)

Dieser Versuch wurde analog V-B24 durchgeführt, es wurde für 45 min bestrahlt. Die Detektion des Umsatzes sowie der Oxidationsprodukte gelang mit den Methoden 2, 3 und 4. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.30 zusammengefasst.

Tabelle 9.30: Umsatz von 8-oxodG in der Photooxidation von 8-oxodG durch Ketone in Gegenwart von Luftsauerstoff (Laboratmosphäre)^{a)}

[%]	Blind- probe	AP	AP-OH	AP-OMe	AP-O ^t Bu	AP-OAc	BP
8-oxodG- Umsatz	0 ± 2	51 ± 13	20 ± 1	8 ± 1	68 ± 0	56 ± 4	82 ± 4
Spiroiminodi- hydantoin	1 ± 1	24 ± 2	1 ± 0	2 ± 0	5 ± 0	28 ± 2	39 ± 0
GRP	3 ± 0	12 ± 3	5 ± 0	5 ± 0	16 ± 0	14 ± 1	13 ± 1

a) Bezogen auf die Anfangskonzentration an 8-oxodG. Reaktionsbedingungen: [8-oxodG] = 200 µM, [Keton] = 400 µM in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 45 min.

9.4.8.2 Kinetik der Oxidation von 8-oxodG

V-B26: *Oxidation und Bildung von 8-oxodG in der Photooxidation durch AP-OR*
(VII-MAA-2, VII-MAA-3, VII-MAA-4)

Zur Untersuchung der Photooxidation von 8-oxodG wurden 25.0 μM Lösungen von 8-oxodG mit 1.00 mM Keton in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril hergestellt. Zusätzlich wurden analoge Lösungen, die zusätzlich 500 μM dG enthielten angesetzt. Beide Lösungen wurden parallel bestrahlt (AAV-1), und nach unterschiedlichen Zeitintervallen jeweils Proben entnommen, die gemäß Methode 2 auf den Umsatz an 8-oxodG hin untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9.31 bis 9.35 dargestellt. Für den Versuch mit AP-OH (Tabelle 9.31) sind zusätzlich die in einer 500- μM dG-Lösung (kein Zusatz von 8-oxodG zu Beginn der Reaktion) detektierten Werte für die Bildung von 8-oxodG angegeben.

Tabelle 9.31: Kinetik der Oxidation und Bildung von 8-oxodG bei der Bestrahlung von AP-OH - Umsatz an 8-oxodG sowie Bildung an 8-oxodG^{a)}

[%]	Zeit [s]					
	40	80	140	220	360	720
8-oxodG	3	11	11	17	22	46
8-oxodG+dG	6	9	5	2	-4	-20
dG ^{b)}	4	6	10	15	23	43

a) Reaktionsbedingungen: [8-oxodG] = 25 μM , und/oder [dG] = 500 μM , [Keton] = 1000 μM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), $\lambda = 300$ nm, T = 0 °C; b) Bildung von 8-oxodG.

Tabelle 9.32: Kinetik des Umsatzes von 8-oxodG in der 8-oxodG-Oxidation bei der Bestrahlung von AP-O^tBu^{a)}

8-oxodG-Umsatz [%]	Zeit [s]				
	40	80	140	220	300
8-oxodG	17	40	71	99	100
8-oxodG+dG	12	21	38	57	70

a) Reaktionsbedingungen: [8-oxodG] = 25 μM , und/oder [dG] = 500 μM , [Keton] = 1000 μM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), $\lambda = 300$ nm, T = 0 °C.

Tabelle 9.33: Kinetik des Umsatzes von 8-oxodG in der 8-oxodG-Oxidation bei der Bestrahlung von AP^{a)}

8-oxodG-	Zeit [s]				
Umsatz [%]	25	50	100	200	400
8-oxodG	1	3	6	9	9
8-oxodG+dG	2	12	14	40	95

a) Reaktionsbedingungen: [8-oxodG] = 25 μ M, und/oder [dG] = 500 μ M, [Keton] = 1000 μ M in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C.

Tabelle 9.34: Kinetik des Umsatzes von 8-oxodG in der 8-oxodG-Oxidation bei der Bestrahlung von AP-OAc^{a)}

8-oxodG-	Zeit [s]		
Umsatz [%]	40	80	140
8-oxodG	2	11	20
8-oxodG+dG	31	61	95

a) Reaktionsbedingungen: [8-oxodG] = 25 μ M, und/oder [dG] = 500 μ M, [Keton] = 1000 μ M in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C.

Tabelle 9.35: Kinetik des Umsatzes von 8-oxodG in der 8-oxodG-Oxidation bei der Bestrahlung von BP^{a)}

8-oxodG-	Zeit [s]		
Umsatz [%]	25	50	100
8-oxodG	8	16	18
8-oxodG+dG	20	37	74

a) Reaktionsbedingungen: [8-oxodG] = 25 μ M, und/oder [dG] = 500 μ M, [Keton] = 1000 μ M in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C.

V-B27: *Einfluss des Zusatzes von 8-oxodG zur AP-OH induzierten Photooxidation von dG*
(VI-MAA-13)

Der Versuch wurde analog zu V-B22 durchgeführt, jedoch wurde bei Versuchsanfang 10.0 μM 8-oxodG hinzugesetzt. Zum Vergleich ist in Abbildung 9.24 (als weiße Kreise) die Bildung von 8-oxodG ohne anfänglichen Zusatz dargestellt.

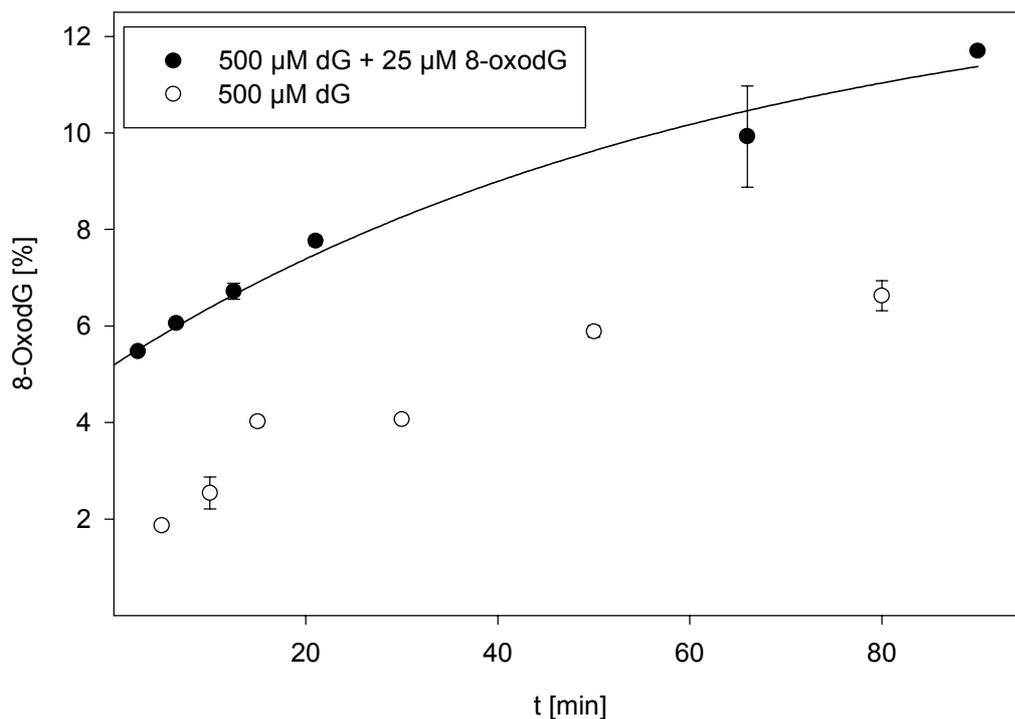


Abbildung 9.24: Bildung von 8-oxodG in der AP-OH-sensibilisierten Oxidation von dG mit und ohne Zugabe von 8-oxodG am Anfang der Reaktion (VI-MAA-13)

9.4.8.3 Einfluss von Luftsauerstoff auf die dG Oxidation

Hierzu wurden die Proben entweder durch einminütiges Durchleiten von Sauerstoff mit O_2 gesättigt oder durch dreimaliges entgasen („freeze-pump-thaw“) vom Sauerstoff befreit. In allen Experimenten, in denen mindestens eine Probe entgast wurde, wurden anstelle der normalerweise eingesetzten Probengläschen für alle Proben (auch die nichtentgasten Vergleichsreaktionen) Schlenck-Gefäße verwendet. Es wurde unter Vakuum bestrahlt und erst nach erfolgter Bestrahlung belüftet. Die Schlenck-Rohre wurden von oben in den Rayonet-Photoreaktor gehängt. Zur Verringerung der Strahlungsintensität befand sich zusätzlich ein dickwandiges 3L-Becherglas im Photoreaktor.

V-B28: *Einfluss eines Sauerstoffunterschusses auf den Ketonumsatz*
(VII-MAA-24)

Proben mit einer dG-Konzentration von 200 μM und 400 μM Keton in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) wurden durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ entgast, für verschiedene Zeiten (AAV-1) bestrahlt und nach Methode 2 der dG-Umsatz detektiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.36 dargestellt.

Tabelle 9.36: Einfluss von Entgasen auf den dG-Umsatz^{a)}

dG-Umsatz	AP	AP-OH	AP-O ^t Bu	AP-OAc	BP
[%]	10 min	5 min	5 min	10 min	5 min
Laboratmosphäre	23 \pm 0	21 \pm 1	63 \pm 3	37 \pm 7	35 \pm 0
Entgast	0 \pm 1	0 \pm 2	5 \pm 2	41 \pm 0	1 \pm 3

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 200 μM , [Keton] = 400 μM in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C.

V-B29: *Einfluss von O₂ auf die Photooxidation von dG durch AP-OAc bei unterschiedlichen dG-Konzentrationen*
(VII-MAA-26)

Es wurde eine 200 μM Lösung von dG mit 400 μM AP-OAc in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) angesetzt. Daraus wurden zwei Proben von je 400 μL entnommen, von denen eine durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ entgast wurde. Das gleiche geschah mit zwei Proben, die vorher mit H₂O auf 50.0 μM dG verdünnt wurden. Alle Proben wurden in Schlenck-Gefäßen im Rayonet-Photoreaktor (300 nm, 0 °C) für 10 min bestrahlt und nach Methode 2 analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.37 dargestellt.

Tabelle 9.37: Einfluss von O₂ auf den dG-Umsatz [%] in der Photooxidation durch AP-OAc bei unterschiedlichen dG-Konzentrationen^{a)}

dG-Umsatz [%]	200 μM	50 μM
Laboratmosphäre	37 \pm 7	19 \pm 3
Entgast	41 \pm 0	46 \pm 9

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 2.0 Äquiv. bezogen auf dG in 10 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 10 min.

V-B30: *Kinetik der dG-Oxidation durch AP-OAc in Abwesenheit von Sauerstoff*
(VII-MAA-46)

Hierzu wurde in einem Schlenck-Gefäß eine durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ entgaste Lösung von 200 μM dG sowie 400 μM AP-OAc in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) vorgelegt und im 300-nm-Rayonet-Photoreaktor bei 0 °C bestrahlt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und nach AAV-5 bezüglich des Umsatzes an AP-OAc sowie der Bildung von AP untersucht. Der dG-Umsatz wurde gemäß Methode 2 bestimmt. Daraus wurde die in Abbildung 9.25 dargestellte Kinetik erhalten.

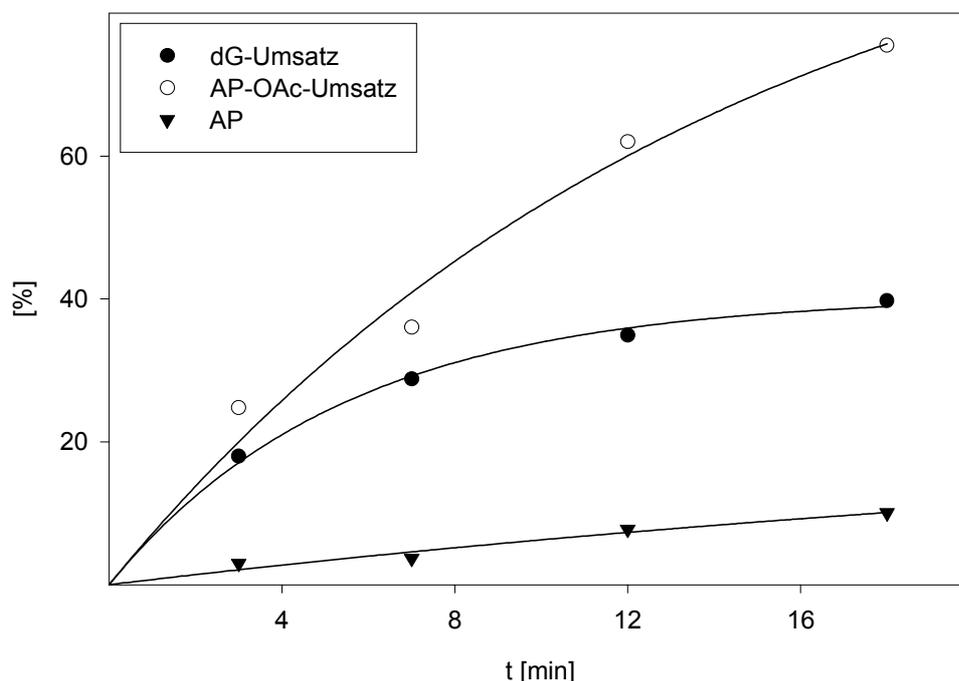


Abbildung 9.25: Kinetik der Photooxidation von dG durch AP-OAc in Abwesenheit von Luftsauerstoff (VII-MAA-46)

V-B31: *Einfluss von Sauerstoffsättigung auf die Photooxidation von dG*
(V-MAA-84a, VII-MAA-33)

Es wurden 500- μM Lösungen von dG in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) und 2.00 Äquiv. (1.00 mM) Keton angesetzt und es wurde wie bei V-B22 beschrieben verfahren. Für jedes Keton wurde eine Probe normal behandelt, während durch eine weitere Probe vor der Bestrahlung eine Minute reiner Sauerstoff zur Sättigung geleitet wurde. Nach Bestrahlung im Rayonet-Photoreaktor (300 nm, 0 °C, 35 min, AAV-1) wurde der dG-Umsatz nach Methode 2 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.38 dargestellt.

Tabelle 9.38: Einfluss von O₂ auf den dG-Umsatz^{a)}

dG-Umsatz [%]	AP-OH	AP-O ^t Bu	AP-OAc
Laboratmosphäre	6 ± 3	21 ± 0	50 ± 3
Sauerstoffsättigung	6 ± 0	20 ± 1	15 ± 2

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 500 µM, [Keton] = 1.00 mM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 35 min.

V-B32: *Einfluss von Sauerstoffsättigung auf den Ketonumsatz*
(V-MAA-84b)

Es wurde analog zu V-B31 verfahren, anstelle des dG-Umsatzes wurde jedoch der Ketonumsatz nach Methode 5 detektiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.39 dargestellt.

Tabelle 9.39: Einfluss von O₂ auf den Ketonumsatz in der Photooxidation von dG^{a)}

Ketonumsatz [%]	AP	AP-OH	AP-OMe	AP-O ^t Bu	AP-OAc
Laboratmosphäre	42 ± 1	14 ± 1	36 ± 0	34 ± 0	50 ± 2
Sauerstoffsättigung	49 ± 3	8 ± 1	32 ± 1	35 ± 1	33 ± 2

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 500 µM, [Keton] = 1000 µM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 35 min.

Um den Effekt auf den dG-Umsatz zu bestimmen, wurde analog zu V-B31 verfahren, jedoch geringere Konzentrationen eingesetzt. So betrug die dG-Konzentration 200 µM und es wurden 400 µM Keton in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) eingesetzt. Die Bestrahlungszeit (AAV-1) betrug 45 min. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.40 dargestellt.

Tabelle 9.40: Effekt der Sauerstoffsättigung auf den dG-Umsatz^{a)}

dG-Umsatz [%]	AP	AP-OAc	BP
Laboratmosphäre	30 ± 3	46 ± 9	62 ± 3
Sauerstoffüberschuss	17 ± 2	8 ± 4	27 ± 9

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 200 µM, [Keton] = 400 µM in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 45 min.

9.4.8.4 D₂O-Effekt

V-B33: *D₂O-Effekt*
(VII-MAA-32)

Es wurden jeweils 200 µM Lösungen an dG mit 1.00 mM Keton in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) sowie in einer analogen Mischung, in der der Phosphatpuffer mit D₂O hergestellt wurde, vorbereitet. Die Lösungen wurden für 45 min nach AAV-1 bestrahlt, und gemäß Methode 2 wurde der dG-Umsatz bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.41 dargestellt.

Tabelle 9.41: D₂O-Effekt - dG-Umsatz^{a)}

dG-Umsatz	AP	AP-OAc	BP
[%]			
H ₂ O	30 ± 3	46 ± 9	62 ± 3
D ₂ O	29 ± 5	28 ± 2	65 ± 6

a) Reaktionsbedingungen: [dG] = 200 µM, [Keton] = 1.00 mM in 2.00 mM Phosphatpuffer in D₂O (pD 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C, t = 45 min.

9.4.9 Oxidation von CT-DNA

V-B34: *Bestimmung der CT-DNA-Quenckonstanten*
(VII-MAA-38e)

Die Quenckonstanten mit CT-DNA wurden analog denen mit dG und 8-oxodG bestimmt (V-B6 und V-B7). Die Konzentration der DNA wurde dabei bezogen auf die Base Guanin angegeben (0.100 g/L CT-DNA = 62.5 µM Gua, Abbildungen 9.26 bis 9.28).

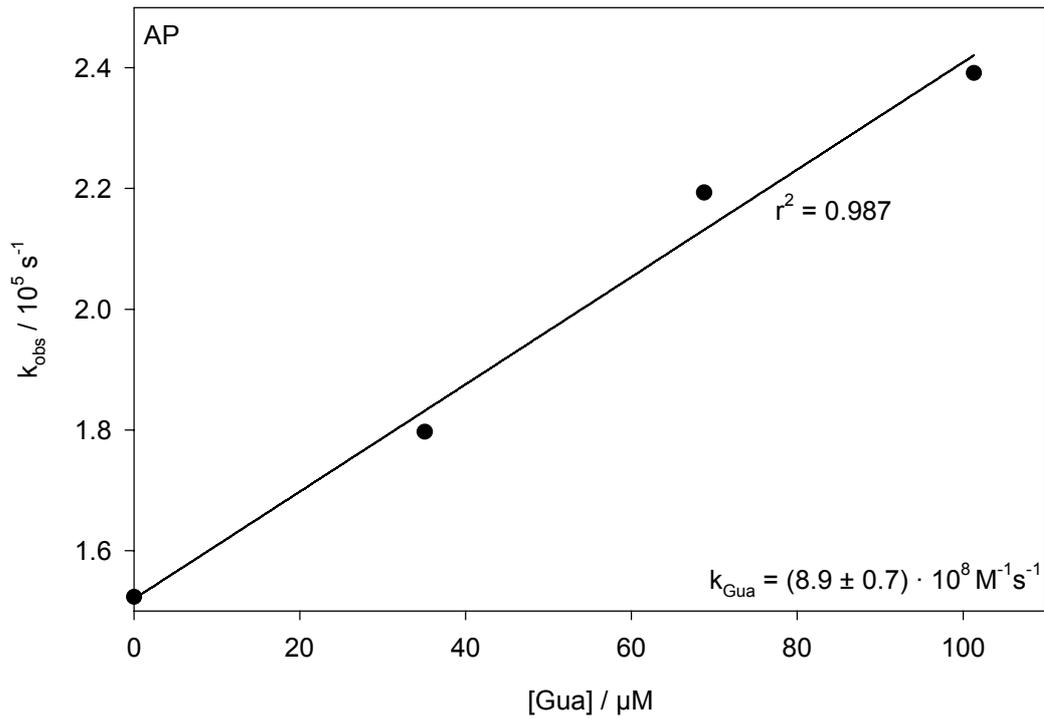


Abbildung 9.26: Kinetik für die Desaktivierung von triplettangeregtem AP durch CT-DNA.

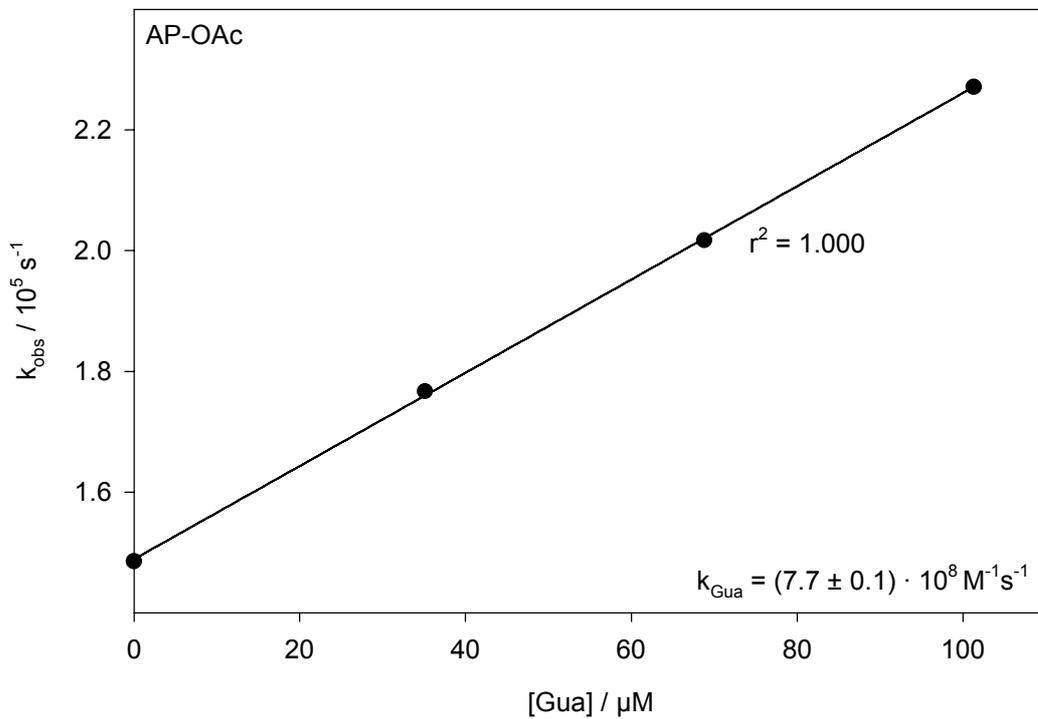


Abbildung 9.27: Kinetik für die Desaktivierung von triplettangeregtem AP-OAc durch CT-DNA.

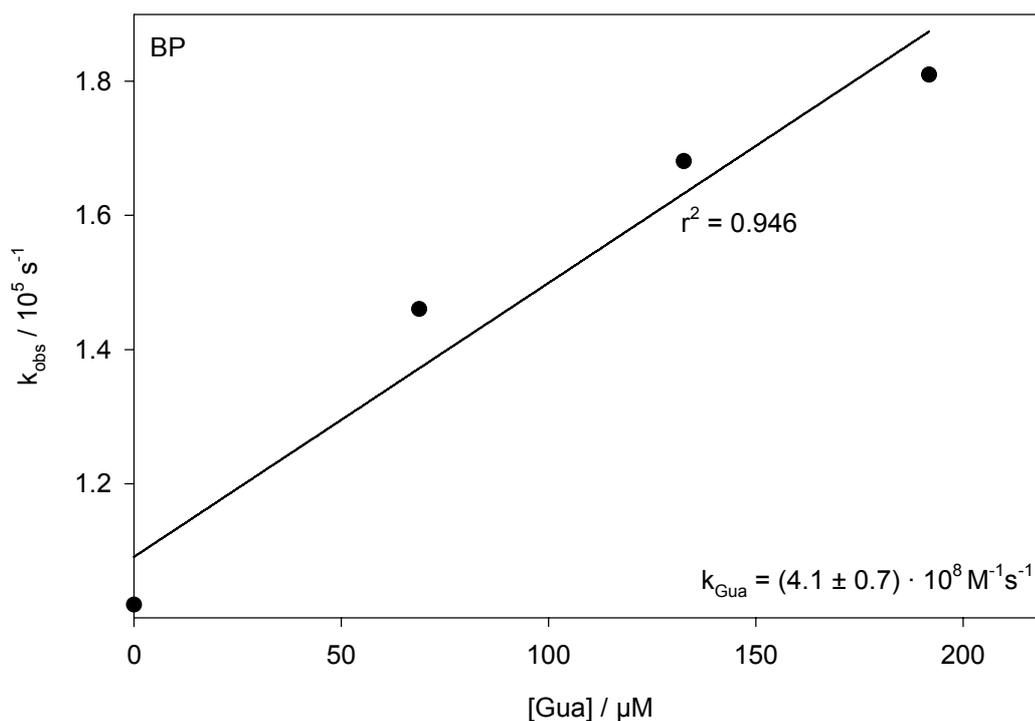


Abbildung 9.28: Kinetik für die Desaktivierung von triplettangeregtem BP durch *CT*-DNA.

Für AP-OH und AP-O^tBu, die kurze Triplettlebenszeiten aufweisen, wurde die Geschwindigkeitskonstante mit *CT*-DNA in einer Einpunktmessung bei hoher DNA-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.42 zusammengefasst.

Tabelle 9.42: Geschwindigkeitskonstanten für die Deaktivierung von elektronisch angeregtem AP-OR durch *CT*-DNA

	$k_{\text{Gua}} [10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]^{\text{a)}$
AP-OH	0.41 ± 0.02
AP-O ^t Bu	1.1 ± 0.2

a) [Gua] = 329 μM , [AP-R] = 1.00 mM in H₂O : Acetonitril (9:1).

9.4.9.1 Reaktivität und Produkte

Der Umsatz sowie die Oxidationsprodukte von *CT*-DNA wurden bestimmt, indem Lösungen der Ketone und von *CT*-DNA in Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) bei 0 °C mit UV-

9 EXPERIMENTALTEIL

Licht ($\lambda = 300$ nm, Rayonet-Photoreaktor) bestrahlt wurden (AAV-1). Umsatz und Oxidationsprodukte wurden anschließend gemäß AAV-2 bestimmt.

V-B35: *Oxidation von CT-DNA durch Photolyse der Ketone*
(VII-MAA-15, VI-MAA-25)

Es wurden 0.100 g/L (= 62.5 μ M Gua) Lösungen von CT-DNA und 200 μ M Keton in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) angesetzt und für 21:40 min bestrahlt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.43 dargestellt.

Tabelle 9.43: Photooxidation von CT-DNA durch die Photolyse der Ketone in Gegenwart von Luftsauerstoff (Laboratmosphäre).^{a)}

Oxidations-	Oxidations-						
produkte	AP	AP-OH	AP-OMe	AP-O ^t Bu	AP-OAc	AP-OH	AP-O ^t Bu
[%]						DMPO ^{b)}	DMPO ^{b)}
8-oxoGua	0 ± 0	28 ± 2	0 ± 0	15 ± 1	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 1
GRP	0 ± 0	2 ± 0	0 ± 0	8 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

a) Reaktionsbedingungen: [CT-DNA] = 0.100 g/L, [Keton] = 200 μ M in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), T = 0 °C, $\lambda = 300$ nm, t = 21:40 min; b) [DMPO] = 500 μ M.

V-B36: *Kinetik der DNA-Oxidation durch AP-OH und AP-O^tBu*
(VII-MAA-34a)

Es wurden 0.100 mg/mL (62.5 μ M Gua) Lösungen von CT-DNA in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) mit 200 μ M Keton angesetzt und wie in V-B35 beschrieben verfahren. Es wurde unterschiedlich lange bestrahlt und jeweils nach AAV-2 wurden die Oxidationsprodukte sowie der Ketonumsatz bestimmt. Die dadurch erhaltenen Kinetiken sind in den Tabellen 9.44 bis 9.47 dargestellt.

Tabelle 9.44: Zeitprofil der Bildung von 8-oxoGua [%] in der Photooxidation von *CT*-DNA durch die Photolyse von AP-OR^{a)}

t [min]	AP-OH	AP-O ^t Bu
10	12 ± 3	11 ± 1
20	20 ± 1	15 ± 1
40	30 ± 5	21 ± 1
80	55 ± 3	27 ± 1

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 200 μM, [Gua] = 62.5 μM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C.

Tabelle 9.45: Zeitprofil der Bildung von GRP [%] in der Photooxidation von *CT*-DNA durch die Photolyse von AP-OR^{a)}

t [min]	AP-OH	AP-O ^t Bu
10	0.05 ± 0.02	1.33 ± 0.31
20	0.10 ± 0.02	3.45 ± 0.30
40	0.35 ± 0.21	4.90 ± 0.32
80	0.75 ± 0.13	5.07 ± 0.02

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 200 μM, [Gua] = 62.5 μM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C.

Tabelle 9.46: Zeitprofil des Umsatzes von AP-OR [%] in der Photooxidation von *CT*-DNA durch die Photolyse von AP-OR^{a)}

t [min]	AP-OH	AP-O ^t Bu
10	16 ± 1	48 ± 2
20	36 ± 2	63 ± 1
40	42 ± 1	81 ± 1
80	75 ± 3	96 ± 0

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 200 μM, [Gua] = 62.5 μM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C.

Tabelle 9.47: Zeitprofil des Verhältnisses (8-oxoGua+GRP)/Sensibilisator in der Photooxidation von CT-DNA durch die Photolyse von AP-OR^{a)}

t [min]	AP-OH	AP-O ^t Bu
10	1.06 ± 0.22	0.34 ± 0.05
20	0.78 ± 0.05	0.40 ± 0.04
40	0.99 ± 0.18	0.43 ± 0.03
80	1.02 ± 0.05	0.46 ± 0.03

a) Reaktionsbedingungen: [Keton] = 200 µM, [Gua] = 62.5 µM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), λ = 300 nm, T = 0 °C.

V-B37: *Einfluss von Sauerstoff auf die Oxidation von CT-DNA durch die Keton-Photolyse*
(VII-MAA-45)

Es wurden 0.100 mg/mL (62.5 µM Gua) Lösungen von CT-DNA in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) 100 µM Keton in einem Schlenck-Rohr angesetzt. Es wurde für 20 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm, ohne zusätzliches Becherglas) bestrahlt. Die Bildung von 8-oxoGua wurde gemäß AAV-2 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.48 dargestellt.

Tabelle 9.48: Photooxidation von CT-DNA in Abwesenheit von Sauerstoff. Dargestellt ist die Bildung von 8-oxoGua^{a)}

8-oxoGua [%]	AP	AP-OH	AP-O ^t Bu	AP-OAc	BP
Laboratmosphäre	3 ± 0	31 ± 0	15 ± 2	5 ± 0	7 ± 1
Entgast	4 ± 2	3 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	9 ± 2

a) Reaktionsbedingungen: [CT-DNA] = 0.100 g/L, [Keton] = 100 µM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), T = 0 °C, λ = 300 nm, t = 20 min.

V-B38: *Einfluss der DNA-Konzentration auf die Oxidation von CT-DNA durch die Keton-photolyse*
(VII-MAA-15)

Es wurden sowohl 100 mg/L (62.5 µM Gua) Lösungen von CT-DNA mit 200 µM Keton in 5.00 mM Phosphatpuffer als auch 1.00 g/L (= 625 µM Gua) Lösungen von CT-DNA mit

2.00 mM Keton in 50.0 mM Phosphatpuffer (pH 7.0): Acetonitril (9:1) angesetzt. Anschließend wurde wie in V-B35 beschrieben verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.49 dargestellt.

Tabelle 9.49: Effekt der DNA-Konzentration auf die Bildung von 8-oxoGua [%]^{a)}

DNA [mg/L]	AP	AP-OH	AP-OMe	AP-O ^t Bu	AP-OAc	BP
1000	1 ± 0	22 ± 1	3 ± 0	16 ± 1	3 ± 0	3 ± 0
100	0 ± 0	28 ± 2	0 ± 0	15 ± 1	1 ± 0	1 ± 1

a) Reaktionsbedingungen: [CT-DNA] = 0.100 g/L, [Keton] = 200 µM in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), T = 0 °C, λ = 300 nm, t = 21:40 min.

V-B39: *Einfluss der Keton-Konzentration auf die Oxidation von CT-DNA durch die Ketonphotolyse*
(VII-MAA-15)

Es wurden 0.100 mg/mL (= 62.5 µM Gua) Lösungen von CT-DNA in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) mit 100 µM oder 200 µM Keton angesetzt und anschließend wie oben beschrieben verfahren. Es wurde für 21:40 min bestrahlt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.50 dargestellt.

Tabelle 9.50: Effekt der Keton-Konzentration auf die Bildung von 8-oxoGua und GRP [%]^{a)}

[%]	AP-OH	AP-OH	AP-O ^t Bu	AP-O ^t Bu
	100 µM	200 µM	100 µM	200 µM
8-oxoGua	19 ± 1	28 ± 2	12 ± 1	15 ± 1
GRP	0 ± 0	2 ± 0	3 ± 1	8 ± 0

a) Reaktionsbedingungen: [CT-DNA] = 0.100 g/L, in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), T = 0 °C, λ = 300 nm, t = 21:40 min.

9.4.9.2 Strangbruchexperimente mit pBR 322 DNA

V-B40: *Quantifizierung der Strangbruchaktivität*
(V-MAA-87, VI-MAA-4, VII-MAA-16)

Um die Induktion von Strangbrüchen zu untersuchen, wurde eine 10.0 mg/L Lösung an pBR 322 DNA in 5.00 mM I_{1/2}-Puffer : Acetonitril (9:1) mit verschiedenen Konzentrationen an Keton versetzt und bei 0 °C für 45 min gemäß AAV-6 bestrahlt (Abbildung 9.29). Die

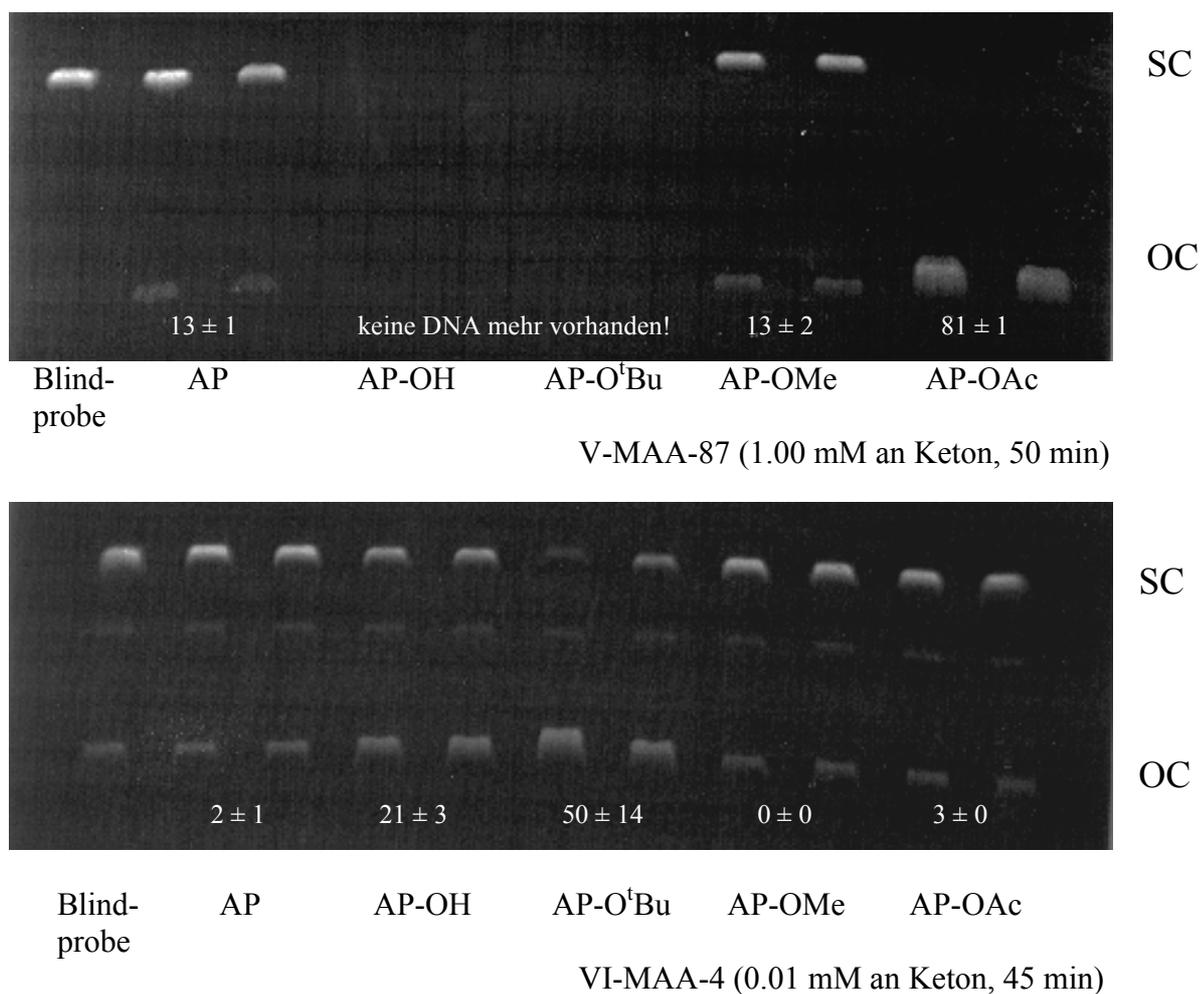
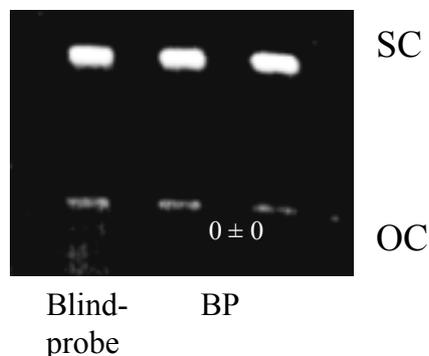


Abbildung 9.29: Durch Photolyse von AP-R induzierte Strangbrüche in pBR 322 DNA (dargestellt ist die Bildung von offenzirkularer DNA [%] im Vergleich zur Blindprobe)

angegebenen Werte beziehen sich auf die Bildung von offenzirkularer DNA im Vergleich zur Blindprobe. Die Daten für BP unter analogen Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 9.30 gezeigt.



VII-MAA-16 (0.01 mM an Keton, 45 min)

Abbildung 9.30: Durch Photolyse von BP induzierte Strangbrüche in pBR 322 DNA (dargestellt ist die Bildung von offenzirkularer DNA [%] im Vergleich zur Blindprobe)

V-B41: *Strangbruchbildung in Gegenwart von Radikalfängern*
(VI-MAA-21)

Um die Induktion der Strangbrüche durch Radikalspezies zu untermauern wurden jeweils geringe Mengen (5.00 μM) der Radikalfänger BHT und DMPO zugegeben. Die Ketonkonzentration betrug 40.0 μM , und es wurde für 15 min bestrahlt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.51 zusammengefasst.

Tabelle 9.51: Einfluss von Radikalfängern auf die Bildung von offenzirkularer DNA [%]^{a)}

Additiv	OC DNA [%]	
	AP-OH	AP-O ^t Bu
ohne	37 ± 11	55 ± 13
BHT (5 μM)	23 ± 4	31 ± 26
DMPO (5 μM)	0 ± 1	1 ± 1

a) Reaktionsbedingungen: [pBR 322 DNA] = 0.010 g/L, [Keton] = 40 μM in 5.00 mM I_{1/2}-Puffer : Acetonitril (9:1), T = 0 °C, λ = 300 nm, t = 15 min.

V-B42: *Abhängigkeit der Strangbruchbildung von der DNA-Konzentration*
(VII-MAA-16)

Um den Einfluss höherer DNA-Konzentrationen auf die Bildung von Strangbrüchen zu überprüfen, wurde eine 200 mg/L Lösung an pBR 322 DNA in 100 mM I_{1/2}-Puffer und 10% Acetonitril als Kosolvens mit 200 µM Keton versetzt und bei 0 °C für 45 min gemäß AAV-6 bestrahlt. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben auf ein Zwanzigstel verdünnt. Die Ergebnisse für die Acetophenonderivate AP-R sind in Abbildung 9.31 gezeigt, die Ergebnisse für BP in Abbildung 9.32.

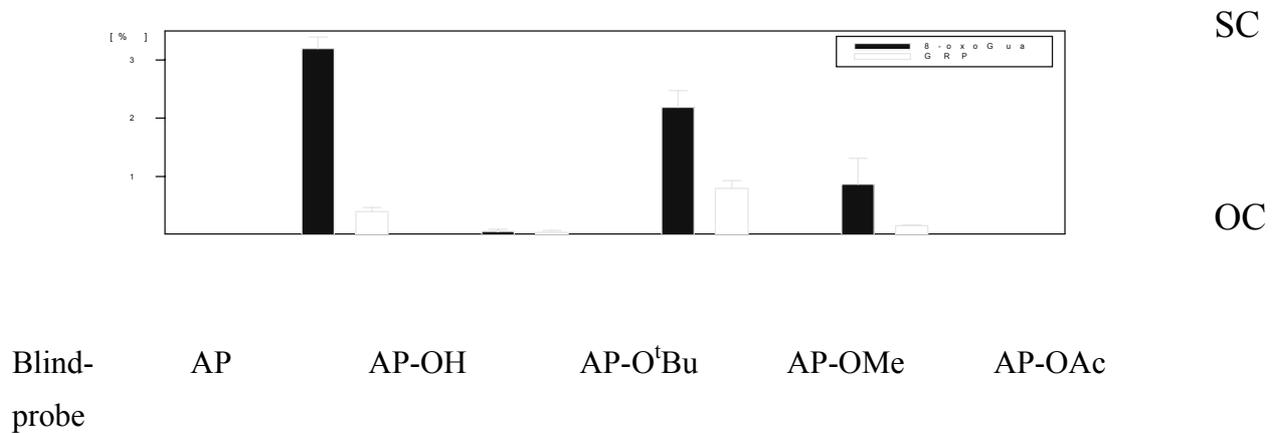


Abbildung 9.31: Durch Photolyse von AP-R induzierte Strangbruchexperimente mit pBR 322 DNA (200 mg pBR 322 DNA/L, dargestellt ist die Bildung von offenzirkularer DNA [%] in Vergleich zur Blindprobe)

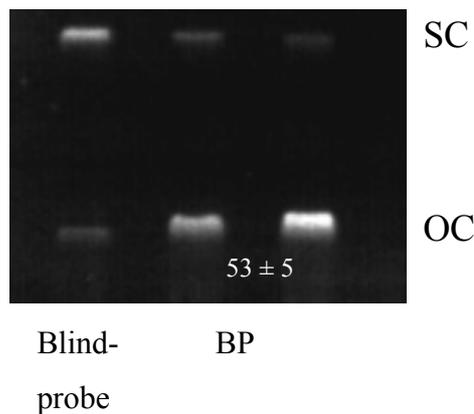


Abbildung 9.32: Durch Photolyse von BP induzierte Strangbruchexperimente mit pBR 322 DNA (200 mg/L pBR 322 DNA, dargestellt ist die Bildung von offenzirkularer DNA [%] im Vergleich zur Blindprobe)

9.4.9.3 Strangbruchbildung versus Basenoxidation

V-B43: Bestimmung des Verhältnisses der Bildung von 8-oxoGua zur Bildung offenzirkularer DNA
(VII-MAA-52)

Um das Verhältnis von Strangbruchbildung versus Basenoxidation abzuschätzen, wurden jeweils Bedingungen ausgewählt, unter denen die Bildung von ca. 50% offenzirkularer DNA induziert wurde; dafür wurden die Proben wie in AAV-1 beschrieben bestrahlt. Für AP-OH und AP-O^tBu wurde eine 10 mg/L Lösung an pBR 322 DNA mit 10 µM Keton in 200 µM Tris-HCl-Puffer (pH 7.6) + 20.0 µM EDTA für 40 min bestrahlt. Für BP wurde eine 100 mg/L Lösung an pBR 322 DNA mit 100 µM Keton in 2.00 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.6) + 200 µM EDTA für 40 min bestrahlt. Aus derselben Proben wurde jeweils die Menge an gebildeter offenzirkularer DNA (nach Verdünnen auf 10 mg/L DNA, AAV-6) sowie die Menge an 8-oxoGua (nach lyophilisieren und verdünnen auf 100 mg/L DNA, AAV-2) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.52 zusammengefasst.

Tabelle 9.52: Verhältnis der Bildung von 8-oxoGua zur Bildung von OC-DNA in der durch Ketone induzierten Photooxidation von pBR 322 DNA^{a)}

	SSB [%]	OC-DNA [nM]	8-oxoGua [µM]	[8-oxoGua]/ [OC-DNA]
	43 ± 5	12 ± 2	1.16 ± 0.07	95 ± 20
	52 ± 7	15 ± 2	0.98 ± 0.00	65 ± 15
	45 ± 4	128 ± 12	0.95 ± 0.95	<15
	7 ± 2	20 ± 6	0.00 ± 0.03	--- ^{b)}
	16 ± 5	45 ± 15	0.00 ± 0.00	--- ^{b)}

a) Reaktionsbedingungen: [pBR 322 DNA] = 10.0 mg/L, [Keton] = 10.0 µM in 200 µM Tris-HCl-Puffer (pH 7.6) + 20.0 µM EDTA für AP-OH, AP-O^tBu; [pBR 322 DNA] = 100 mg/L, [Keton] = 100 µM in 2.00 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.6) + 200 µM EDTA für BP; es wurde für 40 min bestrahlt (300 nm);
b) wegen der geringen Induktion von SSB in pBR 322 DNA wurde auf eine Berechnung des Verhältnisses verzichtet.

9.5 Oxidation von dG durch Dioxetan 1

V-C1: Messung der Dioxetanchemilumineszenzabklingkurven

(VII-MAA 70)

Die Chemilumineszenzabklingkurven wurden im Mitchel Hastings-Photometer in wässriger Lösung (mit 10% Acetonitril als Kosolvens) durchgeführt. Es wurden jeweils 3.00 mL einer 1.00 mM Dioxetanlösung hergestellt und bei der jeweiligen Temperatur thermolysiert. Aus der so erhaltenen Lumineszenzabklingkurve wurde nach einer Kinetik erster Ordnung die Halbwertszeit bestimmt sowie die maximale Lumineszenzintensität gemessen. Sofern nicht anders angegeben, wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt, angegeben sind die Standardabweichungen. Die Werte sind in Tabelle 9.53 zusammengestellt. Als Maß für die freigesetzte Lichtmenge wurde $I_{\max} \cdot t_{1/2}$ (entspricht einer relativen Quantenausbeute) berechnet.

Tabelle 9.53: Lebensdauer und Chemilumineszenzintensitäten in der Thermolyse von Dioxetan 1.

temp [°C] ^{a)}	I_{\max} [mV]	$t_{1/2}$ [h]	$I_{\max} \cdot t_{1/2}$ [mV·h]
37	4.6 ± 0.2	42 ± 10	190
50 ^{b)}	23	17	390
65	310 ± 10	4.1 ± 0.3	500
80	630 ± 30	0.82 ± 0.04	510
80 ^{c)}	550 ± 30	0.86 ± 0.09	480

a) 1.00 mM in H₂O : Acetonitril (9:1); b) Einzelmessung, kein Fehler bestimmt; c) in Gegenwart von 0.500 mM dG und 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0).

V-C2: Radikalabfang-Experimente mit DMPO

(VII-MAA-66)

Eine entgaste (dreimal „freeze-pump-thaw“) 100-mM-Lösung von Dioxetan 1 mit 50.0 mM DMPO in einem Schlenck-Rohr wurde für 15 min bei 80 °C thermolysiert und anschließend EPR-spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.54 zusammengefasst.

Tabelle 9.54: EPR-Daten der DMPO-Addukte in der Thermolyse^{a)}
von Dioxetan **1**.

DMPO-Addukt	α_N [G]	α_H [G]	g-Faktor
$\bullet\text{CH}_2\text{OH}^b$	15.9	22.7	2.0057

a) 100 mM in H_2O : Acetonitril (9:1), 15 min, 80 °C, [DMPO] = 50.0 mM.

V-C3: Oxidation von dG in der Thermolyse von Dioxetan **1**
(VII-MAA-62)

Es wurden 200- μM -Lösungen von dG in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) mit 5.00 Äquiv. (1.00 mM) Dioxetan angesetzt und wie in V-B22 beschrieben verfahren. Es wurde für 3 h bei 80 °C thermolysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.55 dargestellt.

Tabelle 9.55: Photooxidation von dG durch Dioxetan **1** in Gegenwart von Sauerstoff (Laboratmosphäre)^{a)}

Produkt	[%]
dG-Umsatz	23 ± 1
Spiroiminodihydantoin	3 ± 2
GRP	6 ± 4
8-oxodG	0 ± 0

a) Alle Angaben sind bezogen auf die Anfangskonzentration an dG; Reaktionsbedingungen: [dG] = 200 μM , [Dioxetan **1**] = 1.00 mM in 2.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), 80 °C, t = 3 h.

V-C4: Konzentrationsabhängigkeit der dG-Oxidation durch die Thermolyse des Dioxetans **1**
(VII-MAA-65)

Hierzu wurde eine Lösung von dG mit 10.0 Äquiv. Dioxetan **1** in 10.0 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1) hergestellt, die dann mit H_2O : Acetonitril (9:1) auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt wurde. Die Lösungen unterschiedlicher Konzentration wurden dann für 3 h bei 80 °C thermolysiert. Der dG-Umsatz wurde gemäß Methode 2 analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.56 dargestellt. Zum Vergleich wurde HO-TMD eingesetzt (Tabelle 9.57).

Tabelle 9.56: Konzentrationsabhängigkeit der dG-Oxidation in der Thermolyse des Dioxetans **1**^{a)}

[dG] [mM]	dG Umsatz [%]	8-oxodG [%]	Spiroiminodihydantoin [%]	GRP [%]
0.5	16.9 ± 1.8	6.00 ± 0.22	2.15 ± 1.02	3.58 ± 1.04
0.2	22.6 ± 0.7	7.85 ± 0.03	4.55 ± 0.11	6.33 ± 0.61
0.1	21.5 ± 1.6	7.42 ± 0.05	6.72 ± 0.67	8.42 ± 1.25

a) Reaktionsbedingungen: [Dioxetan **1**] = 10.0 Äquiv. in 10.0 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), T = 80 °C, t = 3 h.

Tabelle 9.57: Konzentrationsabhängigkeit der dG-Oxidation in der Thermolyse von HO-TMD^{a)}

dG [mM]	dG-Umsatz [%]	8-oxodG [%]	Spiroiminodihydantoin [%]	GRP [%]
0.5	17.4 ± 0.2	0.86 ± 0.01	3.88 ± 0.31	6.65 ± 0.36
0.2	21.3 ± 4.2	0.53 ± 0.02	4.92 ± 0.07	9.86 ± 0.08
0.1	16.7 ± 0.6	0.45 ± 0.02	4.35 ± 0.88	8.89 ± 0.86

a) Reaktionsbedingungen: [HO-TMD] = 10.0 Äquiv. in 10.0 Äquiv. Phosphatpuffer (pH 7.0) : Acetonitril (9:1), T = 80 °C, t = 3 h.

10 Literatur

- ¹ H. K. Biesalski, U. C. Obermüller-Jevic, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *389*, 1-6.
- ² (a) A. Rauterberg, E. G. Jung, *Therapeutische Umschau* **1993**, *50*, 804-807. (b) G. G. Glass, R. N. Hoover, *J. Am. Med. Assoc.* **1989**, *262*, 2097-2100.
- ³ E. A. Holly, D. A. Aston, R. D. Cress, D. K. Ahn, J. J. Kristiansen, *Am. J. Epidemiology* **1995**, *141*, 923-933. (b) K. C. Farmer, M. F. Naylor, *Ann. Pharmakotherapy* **1996**, *30*, 662-673.
- ⁴ T. P. Coohill in *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology* (Hrsg.: W. M. Horspool, P.-S. Song), CRC Press, Boca Raton, Florida, **1995**, 1267-1275.
- ⁵ A. V. Parisi, J. C. Wong, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *54*, 126-130.
- ⁶ S. Schmitz, C. Garbe, B. Tebbe, C. E. Orfanos, *Hautarzt* **1994**, *45*, 517-525.
- ⁷ (a) M. Pathak, K. Stratton, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *123*, 468-476. (b) P. Brenneisen, J. Wenk, L. O. Klotz, M. Wlaschek, K. Briviba, T. Krieg, H. Sies, K. Scharffetter-Kochanek, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5279-5287.
- ⁸ D. P. Steenvorden, G. M. van Henegouwen, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, *41*, 1-10.
- ⁹ *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*, (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, New York, **1991**.
- ¹⁰ (a) C. L. Greenstock, *Medical Hypothesis* **1993**, *41*, 473-482. (b) A. Gräslund, A. Ehrenberg, A. Ruprecht, G. Ström, *Photochem. Photobiol.* **1979**, *29*, 245-252.
- ¹¹ R. M. Tyrrell, *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 380-382.
- ¹² (a) H. Black, *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 213-221. (b) M. Dalle-Carbonare, M. A. Pathrak, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**, *14*, 105-124. (c) B. A. Jurkiewicz, D. L. Bisset, G. R. Buettner, *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *104*, 484-488. (d) B. A. Jurkiewicz, G. R. Buettner, *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 1-4. (e) J. Taira, K. Mimura, T. Yonega, A. Hagi, A. Murakami, K. Makino, *J. Biochem.* **1992**, *111*, 693-695.
- ¹³ J. P. Kehrer, *Crit. Rev. Toxicol.* **1993**, *23*, 21-48.
- ¹⁴ D. R. Blake, R. E. Allen, J. Lunec, *Br. Med. Bull.* **1987**, *43*, 371-385.
- ¹⁵ K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, P. Brenneisen, M. Schauen, R. Blaudschun, J. Wenk, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1247-1257.
- ¹⁶ M. Martinez-Cayuela, *Biochimie* **1995**, *77*, 147-161.

- ¹⁷ (a) *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, (Hrsg.: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke), Wissenschaftsverlag, Mannheim, **1992**. (b) G. Eisenbrand, M. Metzler In *Toxikologie für Chemiker*, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, **1994**.
- ¹⁸ (a) I. Fridovich, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1983**, *23*, 239-257. (b) P. Palozza, N. I. Krinsky, *Methods Enzymol.* **1992**, *213*, 403-420.
- ¹⁹ (a) *DNA Repair*, (Hrsg.: E. C. Friedberg), Freeman, New York, **1985**. (b) R. M. Story, I. T. Weber, T. A. Seitz, *Nature* **1992**, *355*, 318-325. (c) S. Boiteux, E. Gajewski, J. Laval, M. Dizdaroglu, *Biochemistry* **1992**, *31*, 106-110.
- ²⁰ (a) D. Harman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 7124-7128. (b) B. N. Ames, *Science* **1983**, *221*, 1256-1264. (c) R. S. Sohal, *Adv. Myochem.* **1989**, *2*, 21-34. (d) R. S. Sohal, *Aging Milano* **1993**, *5*, 3-17. (e) F. M. Yakes, B. Van Houten, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 514-519.
- ²¹ K. C. Smith, *Mutat. Res.* **1992**, *277*, 139-162.
- ²² *Free Radicals in Biology and Medicine*, (Hrsg.: B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge), Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- ²³ (a) B. N. Ames, *Mutat. Res.* **1989**, *214*, 41-46. (b) B. N. Ames, M. K. Shigenaga in *DNA and Free Radicals*, (Hrsg.: B. Halliwell, O. I. Arouma), Ellis Horwood, Chichester, England, **1993**, 1-15.
- ²⁴ P. A. Cerutti, *Lancet* **1994**, *344*, 862-863.
- ²⁵ (a) S. Legrand-Poels, M. Hoebecke, D. Vaira, B. Rentier, J. Piette, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **1993**, *17*, 229-237. (b) J. Piette, S. Legrand-Poels, *Chem. Biol. Interact.* **1994**, *91*, 79-89.
- ²⁶ J. Cadet, P. Vigny In *Bioorganic Photochemistry. Photochemistry and Nucleic Acids*, (Hrsg.: H. Morrison), John Wiley & Sons, New York, **1990**, Vol. 1, 1-272.
- ²⁷ K. C. Smith, N. J. Sargentini, *Photochem. Photobiol.* **1985**, *42*, 801-803.
- ²⁸ R. L. Willson in *Oxidative Stress*, (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, New York, **1985**, 41-72.
- ²⁹ J. A. Imlay, S. Linn, *Science* **1988**, *240*, 1302-1309.
- ³⁰ B. Meunier, G. Pratviel, J. Bernadou, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1994**, *131*, 933-943.
- ³¹ W. A. Pryor, *Free Radical Biol. Med.* **1988**, *4*, 219-223.
- ³² J. S. B. Park, P. M. Wood, B. C. Gilbert, A. C. Whitwood, *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 2* **1999**, 923-931.

- ³³ (a) B. N. Ames, M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 7915-7922. (b) B. N. Ames, L. S. Gold, W. C. Willett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5258-5265.
- ³⁴ K. B. Beckman, B. N. Ames, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19633-19636.
- ³⁵ (a) P. M. Cullis, M. E. Malone, L. A. Merson-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2775-2781. (b) L. P. Candeias, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 79-86.
- ³⁶ L. Kittler, G. Löber, F. A. Gollmick, H. Berg, *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *116*, 503-511.
- ³⁷ (a) S. Steenken, *Free Rad. Res. Commun.* **1992**, *16*, 349-379. (b) L. P. Candeias, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2437-2440. (c) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2411-2413. (d) F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, *277*, 673-676.
- ³⁸ W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089-1107.
- ³⁹ (a) A. Gugger, R. Batra, P. Rzadek, G. Rist, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8740-8741. (b) B. Giese, A. Dussy, E. Meggers, M. Petretta, U. Schwitter, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11130-11131.
- ⁴⁰ T. Melvin, S. W. Botchway, A. W. Parker, P. O'Neill *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10031-10036.
- ⁴¹ (a) S. V. Jovanovic, M. G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5968-5972. (b) K. Hildenbrand, G. Behrens, D. Schulte-Frohlinde, J. N. Herak, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1989**, 283-289. (c) H. Catterall, M. J. Davies, B. C. Gilbert, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1992**, 1379-1385.
- ⁴² N. Paillous, P. Vicendo, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **1993**, *20*, 203-209.
- ⁴³ E. Meggers, A. Dussy, T. Schafer, B. Giese, *Chem.-Eur. J.* **2000**, *6*, 485-492.
- ⁴⁴ (a) A. P. Grollman, M. Moriya, *Trends Genet.* **1993**, *9*, 246-249. (b) K. C. Cheng, D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 166-172.
- ⁴⁵ T. J. McBride, J. E. Schneider, R. A. Floyd, L. A. Loeb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 6866-6870.
- ⁴⁶ K. Kino, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7373-7374.
- ⁴⁷ (a) R. A. Floyd, M. S. West, K. L. Eneff, J. E. Schneider, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *273*, 106-111. (b) R. A. Floyd, J. J. Watson, P. K. Wong, D. H. Altmiller, R. C. Rickard, *Free Rad. Res. Commun.* **1986**, *1*, 163-172. (c) R. A. Floyd, M. S. West, K. L. Eneff, J. E. Schneider, P. K. Wong, D. T. Tingey, W. E. Hogsett, *Anal. Biochem.* **1990**, *188*,

- 155-158. (d) R. A. Floyd, M. S. West, K. L. Eneff, W. E. Hogsett, D. T. Tingey, *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *262*, 266-272.
- ⁴⁸ J.-L. Ravanat, T. Douki, M. F. Incardona, J. Cadet, *J. Liquid Chromatogr.* **1993**, *16*, 3185-3202.
- ⁴⁹ S. Raoul, M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, B. Morin, M. Weinfeld, J. Cadet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 371-381.
- ⁵⁰ Y. Kobayashi, H. Kubo, T. Kinoshita, *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 392-398.
- ⁵¹ T. P. Wang, J. Kagan, R. W. Tuveson, G. R. Wong, *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53*, 463-467.
- ⁵² (a) P. J. Boon, P. M. Cullis, M. C. R. Symons, B. W. Wren, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1984**, 75-88. (b) P. J. P. Rao, E. Bothe, D. Schulte-Frohlinde, *Int. J. Radiat. Biol.* **1992**, *61*, 577-91. (c) M. M. Greenberg, M. R. Barvian, G. P. Cook, B. K. Goodman, T. J. Matray, C. Troche, H. Venkatesan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1828-1839. (d) G. P. Cook, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10025-10030.
- ⁵³ J. Cadet, M. Berger, T. Douki, B. Morin, S. Raoul, J. L. Ravanat, S. Spinelli, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1275-1286.
- ⁵⁴ D. J. Moshinsky, G. N. Wogan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2266-2271.
- ⁵⁵ (a) P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4256-4263. (b) I. G. Gut, P. D. Wood, R. W. Redmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2366-2373.
- ⁵⁶ (a) I. E. Kochevar, D. A. Dunn in *Bioorganic Photochemistry*, Volume 1, (Hrsg.: H. Morrison), John Wiley & Sons, New York, **1990**, 273-316. (b) R. O. Rahn in *DNA repair, a laboratory manual of research procedures*, Volume 2, (Hrsg.: E. C. Friedberg, P. R. Hanawalt), Marcel Dekker, New York, **1983**, 75-85.
- ⁵⁷ (a) A. A. Lamola, Y. Yamane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1967**, *58*, 443-446. (b) B. Epe, H. Henzl, W. Adam, C. R. Saha-Möller, *Nucleic Acids Research* **1993**, *21*, 863-869.
- ⁵⁸ (a) E. Ben-Hur, D. Elad, R. Ben-Ishai, *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, *149*, 355-360. (b) C. L. Greenstock, H. E. Johns, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *30*, 21-27.
- ⁵⁹ (a) M. A. Pathak, A. Kornhauser, *Clin. Res.* **1972**, *20*, 641. (b) V. Kilfoil, L. Salter, *Int. J. Chem. Kinet.* **1988**, *20*, 645-660. (c) R. O. Rahn, L. C. Landry, W. L. Carrier, *Photochem. Photobiol.* **1974**, *19*, 75-78.
- ⁶⁰ (a) T. M. G. Köning, J. J. G. Van Soest, R. Kaptein, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *195*, 29-40. (b) M. H. Patrick, J. M. Snow, *Photochem. Photobiol.* **1977**, *25*, 373-384.

- ⁶¹ (a) B. E. Zierenberg, D. M. Kramer, M. G. Geisert, R. G. Kirste, *Photochem. Photobiol.* **1971**, *14*, 515-520. (b) M. Charlier, C. Hélène, *Photochem. Photobiol.* **1972**, *15*, 527-536. (c) K. Hildenbrand, D. Schulte-Frohlinde, *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *71*, 377-385.
- ⁶² M. E. Umlas, W. A. Franklin, G. L. Chan, W. A. Haseltine, *Photochem. Photobiol.* **1985**, *42*, 265-273.
- ⁶³ C. Tanielian, R. Mechin, R. Seghrouchni, C. Schweitzer, *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 12-19.
- ⁶⁴ (a) F. Dall'Acqua, F. Martelli, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1991**, *9*, 235-254. (b) A. Y. Potapenko, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1991**, *9*, 1-33.
- ⁶⁵ J. Piette, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1991**, *11*, 241-260.
- ⁶⁶ J. Cadet, M. Berger, C. Decarroz, J. R. Wagner, J. E. van Lier, Y. M. Ginot, P. Vigny, *Biochimie* **1986**, *68*, 813-834.
- ⁶⁷ E. R. Blazek, J. G. Peak, M. J. Peak, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 607-613.
- ⁶⁸ (a) M. V. M. Lafleur, A. W. Nieuwint, J. M. Aubry, H. Kortbeek, F. Aewert, H. Joenje, *Free Radical Res. Commun.* **1987**, *2*, 343-350. (b) B. Epe, P. Mützel, W. Adam, *Chem.-Biol. Interact.* **1988**, *67*, 149-165. (c) J. E. Schneider, S. Price, M. L. Mardt, J. M. C. Gutteridge, R. A. Floyd, *Nucleic Acid Res.* **1990**, *18*, 631-635.
- ⁶⁹ J. Moan, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1990**, *6*, 343-344.
- ⁷⁰ (a) J.-L. Ravanat, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J. Cadet *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40601-40602. (b) J.-L. Ravanat, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, J. Cadet *J. Biol. Chem.* **2000**, *276*, 6056.
- ⁷¹ (a) P. Di Mascio, H. Wefers, H.-P. Do-Thi, M. V. M. Lafleur, H. Sies, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1007*, 151-157. (b) P. Di Mascio, C. F. M. Menck, R. G. Nigro, A. Sarasin, H. Sies, *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51*, 293-298. (c) T. P. A. Devasagayam, P. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1088*, 409-412.
- ⁷² G. V. Buxton, C. L. Greestock, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513-886.
- ⁷³ (a) B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Biochem. J.* **1984**, *219*, 1-14. (b) H. Sies, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 1061-1075. (c) A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, *18*, 1033-1077. (d) S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503-520. (e) B. Meunier, G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 819-845.
- ⁷⁴ (a) D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag in *Oxidative Stress*, (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, New York, **1985**, 11-40. (b) M. Dizdaroglu, C. von Sonntag, D. Schulte-Frohlinde,

J. Am. Chem. Soc. **1975**, *97*, 2277-2278. (c) D. Schulte-Frohlinde, M. G. Simic, H. Görner, *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 1137-1151.

⁷⁵ M. E. Churchill, A. M. Schmitz, J. G. Peak, M. J. Peak, *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 1017-1023.

⁷⁶ M. Dizdaroglu, *Free Radical Res.* **1998**, *29*, 551-563.

⁷⁷ M. Isildar, M. N. Schumann, D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag, *Int. J. Radiat. Biol.* **1982**, *41*, 525-533.

⁷⁸ M. K. Eberhardt, *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1051-1057.

⁷⁹ D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag in *Ionizing Radiation Damage to DNA: Molecular Aspects*, (Hrsg.: S. S. Wallace, R. B. Painter), Wiley-Liss, New York, **1990**, 31-42.

⁸⁰ R. Téoule, *Int. J. Radiat. Biol.* **1987**, *51*, 573-589.

⁸¹ G. Scholes, R. L. Wilson, M. Ebert, *Chem. Commun.* **1969**, 17-18.

⁸² (a) C. G. Fraga, A. L. Tappel, *Biochem. J.* **1988**, *252*, 893-896. (b) J. W. Park, R. A. Floyd, *Free Radical Biol. Med.* **1992**, *12*, 245-250. (c) H. Kasai, S. Nishimura in *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*, (Hrsg.: O. Hayaishi, E. Niki, M. Kondo, T. Yoshikawa), Elsevier, **1988**.

⁸³ (a) G. N. Grimm, Dissertation, Universität Würzburg, **1998**. (b) W. Adam, M. A. Arnold, G. N. Grimm, C. R. Saha-Möller, F. Dall'Acqua, G. Miolo, D. Vedaldi, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 511-518. (c) W. Adam, G. N. Grimm, S. Marquardt, C. R. Saha-Möller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1179-1185. (d) W. Adam, G. N. Grimm, C. R. Saha-Möller, F. Dall'Acqua, G. Miolo, D. Vedaldi, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1089-1097. (e) W. Adam, G. N. Grimm, C. R. Saha-Möller, *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, *24*, 234-238. (f) H.-C. Mahler, I. Schulz, W. Adam, G. N. Grimm, C. R. Saha-Möller, B. Epe, *Mutat. Res.* **2001**, *461*, 289-299.

⁸⁴ (a) W. Adam, S. Marquardt, D. Kemmer, C. R. Saha-Möller, P. Schreier, *submitted to Org. Lett.*. (b) W. Adam, S. Marquardt, D. Kemmer, C. R. Saha-Möller, P. Schreier, *in preparation*.

⁸⁵ (a) B. C. Gilbert, P. D. R. Marshall, R. O. C. Norman, N. Pineda, P. S. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1981**, 1392-1400. (b) W. Bors, C. Michel, K. Strettmaier, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1992**, 1513-1517. (c) P. Neta, M. Dizdaroglu, M. G. Simic, *Isr. J. Chem.* **1984**, *24*, 25-28. (d) M. Erben-Russ, C. Michel, W. Bors, M. Saran, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 2362-2365.

- ⁸⁶ (a) K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 1-9. (b) W. A. Pryor, *Annu. Rev. Physiol.* **1986**, *48*, 657-667.
- ⁸⁷ M. Martini, J. Termini, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 234-241.
- ⁸⁸ (a) L. A. Harkin, P. C. Burcham, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *237*, 1-5. (b) L. A. Harkin, L. M. Butler, P. C. Burcham, *Chem. Res. Tox.* **1997**, *10*, 575-581.
- ⁸⁹ P. C. Burcham, L. A. Harkin, *Mutagenesis* **1999**, *14*, 135-140.
- ⁹⁰ T. Simandan, J. Sun, T. A. Dix, *Biochem. J.* **1998**, *338*, 233-240.
- ⁹¹ (a) A. G. Krainev, D. J. Bigelow, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 747-754. (b) A. G. Krainev, T. D. Williams, D. J. Bigelow, *J. Magn. Res., Ser. B* **1996**, *111*, 272-280.
- ⁹² T. Paul, M. J. Young, I. E. Hill, K. U. Ingold, *Biochemistry* **2000**, *39*, 4129-4135.
- ⁹³ A. Kurz, Dissertation, Universität Würzburg, **2000**.
- ⁹⁴ A. Kanazawa, T. Sawa, T. Akaik, H. Maeda, *Cancer Lett.* **2000**, *156*, 51-55.
- ⁹⁵ T. Sawa, T. Akaike, K. Kida, Y. Fukushima, K. Takagi, H. Maeda, *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* **1998**, *7*, 1007-1012.
- ⁹⁶ (a) S. I. Dikalov, R. P. Mason, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *7*, 1007-1012. (b) S. I. Dikalov, R. P. Mason, *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 187-197.
- ⁹⁷ S. V. Jovanovic, I. Jankovic, L. Josimovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9018-9021.
- ⁹⁸ (a) J. Salomon, D. Elad, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 3420-3421. (b) M. F. Zacy, J. L. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5096-5101. (c) M. F. Zacy, J. L. Wong, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1450-1454.
- ⁹⁹ (a) O. Augusto, L. E. Netto, L. F. Gomes, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1992**, *25*, 1171-1183. (b) O. Augusto, *Free Rad. Biol. Med.* **1993**, *15*, 329-336. (c) D. H. Murgida, P. F. Aramendia, R. Erra-Balsells, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 487-494. (d) L. E. S. Netto, N. V. S. RamaKrishna, C. Kolar, E. L. Cavalieri, E. G. Rogan, T. A. Lawson, O. Augusto, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21524-21527.
- ¹⁰⁰ (a) M. Maeda, K. Nushi, Y. Kawazoe, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2677-2682. (b) M. F. Zady, J. L. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5096-5101.
- ¹⁰¹ (a) K. Yamamoto, S. Kawanishi, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 440-446. (b) M. Gamberini, M. R. Cidade, L. A. Valotta, M. C. S. Armelin, L. C. C. Leite, *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 147-155.
- ¹⁰² (a) J. R. Shelton, E. E. Borchert, *Can. J. Chem.* **1968**, *46*, 3833-3839. (b) T. Caronna, A. Citterio, M. Bellatti, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 987-988.

- ¹⁰³ K. Hiramoto, H. Johkoh, K. Sako, K. Kikugawa, *Free Rad. Res. Commun.* **1993**, *19*, 323-332.
- ¹⁰⁴ M. Hoshino, R. Konishi, H. Seto, H. Seki, H. Sonoki, T. Yokoyama, *Res. Chem. Intermed.* **2001**, *27*, 189-204.
- ¹⁰⁵ (a) B. P. Roberts, J. N. Winter, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *37*, 3575-3578. (b) F. Bassam, R. G. Jones, C. M. Perrins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1985**, 1767-1771.
- ¹⁰⁶ E. Castagnino, S. Corsano, R. Barbaro, P. Carloni, *J. Chem. Research (S)* **1998**, 384-385.
- ¹⁰⁷ (a) J.-F. Mouret, M. Polverelli, F. Sarrazini, J. Cadet, *Chem.-Biol. Interact.* **1990**, *77*, 187-201. (b) J.-F. Mouret, F. Odin, M. Polverelli, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*, 102-110.
- ¹⁰⁸ (a) R. M. Izatt, J. J. Christensen, J. H. Rytting, *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 439-481. (b) W. F. Blakely, A. F. Fuciarelli, B. J. Wegher, M. Dizdaroglu, *Radiat. Res.* **1990**, *121*, 338-343.
- ¹⁰⁹ (a) R. Meneghini, M. E. Hoffmann, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *608*, 167-173. (b) R. Meneghini, E. L. Martins in *DNA and Free Radicals*, (Hrsg.: B. Halliwell, O. I. Arouma), Ellis Horwood, Chichester, England, **1993**, 83-94. (c) M. Dizdaroglu, Z. Nackerdien, B. C. Chao, E. Gajewski, G. Rao, *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *285*, 388-390. (d) J. A. Imlay, S. M. Chin, S. Linn, *Science* **1988**, *240*, 640-642.
- ¹¹⁰ S. A. Lesko, R. J. Lorentzen, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1980**, *19*, 3023-3028. (b) K. Brawn, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *206*, 414-419.
- ¹¹¹ R. Y. Denq, I. Fridovich, *Free. Rad. Biol. Med.* **1989**, *6*, 123-129.
- ¹¹² T. A. Dix, K. M. Hess, M. A. Medina, R. W. Sullivan, S. L. Tilly, T. L. L. Webb, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4578-4583.
- ¹¹³ J. M. Gebicki, B. H. J. Bielski, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *103*, 7020-7022.
- ¹¹⁴ (a) A. Guidarelli, E. Clementi, L. Brambilla, O. Cantoni, *Biochem. J.* **1997**, *328*, 801-806. (b) A. Guidarelli, P. Sestili, O. Cantoni, *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 1311-1316.
- ¹¹⁵ A. Guidarelli, F. Cattabeni, O. Cantoni, *Free Radical Res.* **1997**, *26*, 537-547. (b) S. A. Altman, T. H. Zastawny, L. Randers, Z. Lin, J. A. Lumpkin, J. Remacle, M. Dizdaroglu, G. Rao, *Mutat. Res.* **1994**, *306*, 35-44.
- ¹¹⁶ W. Treibs, *Chem. Ber.* **1947**, *80*, 423-426.
- ¹¹⁷ (a) D. T. Gibson, J. R. Koch, R. E. Kallio, *Biochemistry* **1968**, *7*, 2653-2662. (b) D. T. Gibson, G. E. Cardini, F. C. Maseles, R. E. Kallio, E. Reino, *Biochemistry* **1970**, *9*, 1631-1635.

- ¹¹⁸ (a) E. Cadenas, H. Sies, *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 221-231. (b) T. I. Quickenden, M. J. Comarmond, R. N. Tilbury, *Photochem. Photobiol.* **1985**, *41*, 611-615.
- ¹¹⁹ E. Cadenas, H. Sies, A. Campa, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.* **1984**, *40*, 661-666.
- ¹²⁰ (a) A. Faljoni, M. Haun, M. E. Hoffmann, R. Meneghini, N. Durán, G. Cilento, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 490-495. (b) E. Rivas-Suarez, O. Augusto, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.* **1981**, *33*, 279-282. (c) W. Adam, W. Baader, G. Cilento, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *881*, 330-336.
- ¹²¹ (a) W. Adam, A. Beinhauer, B. Epe, R. Fuchs, A. G. Griesbeck, H. Hauer, P. Mützel, L. Nassi, D. Schiffmann, D. Wild in *Primary Changes and Control Factors in Carcinogenesis*, (Hrsg.: T. Friedberg, F. Oesch), Deutscher Fachschriften-Verlag, Wiesbaden, **1986**. (b) L. Nassi, B. Epe, D. Schiffmann, W. Adam, A. Beinhauer, A. G. Griesbeck, *Carcinogenesis* **1987**, *8*, 947-953. (c) L. Nassi, D. Schiffmann, A. Favre, W. Adam, R. Fuchs, *Mutat. Res.* **1988**, *198*, 53-60. (d) W. Adam, H. Hauer, T. Mosandl, C. R. Saha-Möller, W. Wagner, D. Wild, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 1227-1236. (e) W. Adam, A. Beinhauer, T. Mosandl, C. R. Saha-Möller, F. Vargas, B. Epe, E. Müller, D. Schiffmann, D. Wild, *Env. Health Persp.* **1990**, *88*, 89-97. (f) W. Adam, O. Albrecht, E. Feineis, I. Reuter, C. R. Saha-Möller, P. Seufert-Baumbach, D. Wild, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 33-40. (g) B. Epe, E. Müller, W. Adam, C. R. Saha-Möller, *Chem.-Biol. Interact.* **1992**, *85*, 265-281. (h) W. Adam, M. Ahrweiler, C. R. Saha-Möller, M. Sauter, A. Schönberger, B. Epe, E. Müller, D. Schiffmann, H. Stopper, D. Wild, *Tox. Lett.* **1993**, *67*, 41-55. (i) S. Emmert, B. Epe, C. R. Saha-Möller, W. Adam, T. M. Rüniger, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 136-141. (j) W. Adam, A. Treiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2686-2693.
- ¹²² K. R. Kopecky, C. Mumford, *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 709-711.
- ¹²³ (a) P. D. Bartlett, M. E. Landis in *Singlet Oxygen*, (Hrsg.: H. H. Wassermann, R. W. Murray), Vol. 40, Academic Press, New York, **1979**, 243-286. (b) A. L. Baumstark in *Advances in Oxygenated Processes* (Hrsg.: A. L. Baumstark), JAI Press, Greenwich, CT, USA, **1988**, 31-84.
- ¹²⁴ D. Leclercq, J.-P. Bats, P. Picard, J. Moulines, *Synthesis* **1982**, 778-779.
- ¹²⁵ (a) T. Wilson, A. M. Halpern, *J. Phys. Org. Chem.* **1995**, *8*, 359-363. (b) W. H. Richardson, M. B. Yelvington, H. E. O'Neal, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1619-1623.

- ¹²⁶ (a) D. R. Kearns, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6554. (b) F. J. McCapra, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, 155-156. (c) D. R. Kearns, *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 395-427. (d) F. McCapra, *Pure Appl. Chem.* **1970**, *24*, 611-629.
- ¹²⁷ N. J. Turro, P. J. Lechtken, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 264-266.
- ¹²⁸ W. Adam, W. J. Baader, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 410-416.
- ¹²⁹ S. Murphy, W. Adam, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12916-12921.
- ¹³⁰ N. J. Turro, P. Lechtken, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2886-2888.
- ¹³¹ W. H. Richardson, D. L. Stiggall-Estberg, Z. Chen, J. C. Baker, D. M. Burns, D. G. Sherman, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3143-3150.
- ¹³² K. A. Horn, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6649-6656.
- ¹³³ P. Lechtken, H.-C. Steinmetzer, *Chem. Ber.* **1975**, *108*, 3159-3175.
- ¹³⁴ W. Adam, S. Andler, D. Ballmaier, S. Emmert, B. Epe, G. Grimm, K. Mielke, M. Möller, T. M. Rüniger, C. R. Saha-Möller, A. Schönberger, H. Stopper, *Recent Results in Cancer Research*, (Hrsg.: H. K. Müller-Hermelink, H. G. Neumann, W. Dekant, Springer-Verlag, Berlin, **1997**, 21-34.
- ¹³⁵ W. Adam, C. R. Saha-Möller, A. Schönberger, M. Berger, J. Cadet, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 231-238.
- ¹³⁶ A. Schönberger, Dissertation, Universität Würzburg, **1995**.
- ¹³⁷ (a) S. Andler, Dissertation, Universität Würzburg, **1997**. (b) W. Adam, S. Andler, W. M. Nau, C. R. Saha-Möller, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3549-3559.
- ¹³⁸ (a) M. A. Arnold, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **1998**. (b) W. Adam, M. A. Arnold, C. R. Saha-Möller, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 597-604.
- ¹³⁹ (a) F. D. Lewis, R. T. Lauterbach, H.-G. Heine, W. Hartmann, H. Rudolph, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1519-1525. (b) H.-G. Heine, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *33*, 3411-3414. (c) H.-G. Heine, *Liebigs Ann. Chem.* **1970**, *732*, 165-180. (d) J. C. Sheehan, R. M. Wilson, A. W. Oxford, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 7222-7228.
- ¹⁴⁰ (a) H. Paul, H. Fischer, *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 1575-1595. (b) M. V. Encinas, A. M. Rufs, E. A. Lissi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1985**, 457-460. (c) M. Salzmann, Y. P. Tsentalovich, H. Fischer, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, 2119-2124.
- ¹⁴¹ S. Steenken, W. Jaenicke-Zauner, D. Schulte-Frohlinde, *Photochem. Photobiol.* **1975**, *21*, 21-26.
- ¹⁴² (a) W. U. Palm, H. Dreeskamp, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1990**, *52*, 439-450. (b) S. Grimme, *Chem. Phys.* **1992**, *163*, 313-330.

- ¹⁴³ (a) P. Yates, A. G. Szabo, *Tetrahedron Lett.* **1965**, *9*, 485-488. (b) F. D. Lewis, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 311-320.
- ¹⁴⁴ (a) R. A. Caldwell, T. Majima, C. Pac, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 629-630. (b) M. V. Encinas, E. A. Lissi, E. Lemp, A. Zanocco, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1856-1860. (c) P. de Mayo, N. Ramnath, *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 1293-1296.
- ¹⁴⁵ M. K. M. Dirania, J. Hill, *J. Chem. Soc. (C)* **1968**, 1311-1316.
- ¹⁴⁶ D. Ly, Y. Kann, B. Armitage, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8747-8748.
- ¹⁴⁷ (a) G. J. Fischer, E. J. Land, *Photochem. Photobiol.* **1983**, *37*, 27-32. (b) C. S. Foote in *Photosensitization*, (Hrsg.: G. Moreno), NATO ASI Series, Vol. H 54, Springer Verlag, Berlin, **1988**, 125-144.
- ¹⁴⁸ E. M. Tuite, J. M. Kelly, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, *21*, 103-124.
- ¹⁴⁹ J. Cadet, C. Decarroz, S. Y. Wang, W. R. Midden, *Isr. J. Chem.* **1983**, *23*, 420-429.
- ¹⁵⁰ D. T. Croke, L. Perrouault, M. A. Sari, J.-P. Battioni, D. Mansuy, C. Hélène, T. Le Doan, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, *18*, 41-50.
- ¹⁵¹ (a) I. Saito, T. Matsuura, K. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3200-3206. (b) I. Saito, R. Nagata, H. Nakagawa, H. Moriyama, T. Matsuura, K. Inoue, *Free Rad. Res. Commun.* **1987**, *2*, 327-336.
- ¹⁵² (a) Y. Yyoshioka, Y. Kitagawa, Y. Takano, K. Yamaguchi, T. Nakamura, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8712-8719. (b) K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10854-10855.
- ¹⁵³ (a) S. Matsugo, S. Kawanishi, K. Yamamoto, H. Sugiyama, T. Matsuura, I. Saito, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1343-1346. (b) H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7063-7068.
- ¹⁵⁴ M. Hutter, T. Clark, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7574-7577.
- ¹⁵⁵ H. Kasai, Z. Yamaizumi, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9692-9694.
- ¹⁵⁶ K. Kasama, A. Takematsu, S. Aral, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 2420-2427.
- ¹⁵⁷ T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B:* **1992**, *15*, 119-213.
- ¹⁵⁸ (a) C. von Sonntag, H.-P. Schuchmann, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1255-1279. (b) A. Marchaj, D. G. Kelley, A. Bakac, J. H. Espenson, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4440-4441.
- ¹⁵⁹ M. Al-Sheikly, *Radiat. Phys. Chem.* **1994**, *44*, 297-301.
- ¹⁶⁰ (a) P. D. Bartlett, G. Guaraldi, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4799-4801. (b) E. Furimsky, J. A. Howard, *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 677-680.
- ¹⁶¹ M. N. Schuchmann, C. von Sonntag, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 1995-2000.

- ¹⁶² J. E. Bennett, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1990**, *86*, 3247-3252.
- ¹⁶³ (a) G. A. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871-3877. (b) J. A. Howard, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1058-1059. (c) S.-H. Lee, G. D. Mendenhall, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4318-4323.
- ¹⁶⁴ E. Bothe, D. Schulte-Frohlinde, *Z. Naturforsch. B* **1978**, *33*, 786-788.
- ¹⁶⁵ G. D. Mendenhall, E. M. Y. Quinga, *Int. J. Chem. Kinet.* **1985**, *17*, 1187-1190.
- ¹⁶⁶ R. N. Goyal, G. Dryhurst, *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *135*, 75-91.
- ¹⁶⁷ M. Dizdaroglu, *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 225-242.
- ¹⁶⁸ B. Giese, M. Spichty, *Chem. Phys. Chem.* **2000**, *1*, 195-198.
- ¹⁶⁹ C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6439-6442.
- ¹⁷⁰ (a) R. P. Hickerson, F. Prat, J. G. Muller, C. S. Foote, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9423-9428. (b) R. P. Hickerson, C. L. Chepanoske, S. D. Williams, S. S. David, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9901-9902.
- ¹⁷¹ C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 474-477.
- ¹⁷² S. Raoul, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1892-1898.
- ¹⁷³ W. Adam, C. R. Saha-Möller, A. Schönberger, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9233-9238.
- ¹⁷⁴ Y. Mikata, M. Kishigami, M. Nishida, S. Yano, T. Kawamoto, Y. Ikeuchi, F. Yoneda, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2141-2144.
- ¹⁷⁵ W. Luo, J. G. Muller, C. J. Burrows, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2801-2804.
- ¹⁷⁶ W. Luo, J. G. Muller, E. M. Rachlin, C. J. Burrows, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 613-616.
- ¹⁷⁷ T. Suzuki, M. Masuda, M. D. Friesen, H. Ohshima, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1163-1169.
- ¹⁷⁸ J. C. Niles, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 963-966.
- ¹⁷⁹ (a) J. Cadet, M. Berger, B. Morin, J.-L. Ravanat, S. Raoul, G. W. Buchko, M. Weinfeld, *Spectrum* **1994**, *7*, 21-24. (b) J.-L. Ravanat, M. Berger, F. Benard, R. Langlois, R. Ouellet, J. E. van Lier, J. Cadet, *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 809-814.
- ¹⁸⁰ G. W. Buchko, J. Cadet, M. Berger, J.-L. Ravanat, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4847-4851.
- ¹⁸¹ M. Charlier, C. Hélène, *Photochem. Photobiol.* **1972**, *15*, 71-87.
- ¹⁸² N. D. Sharma, R. J. H. Davies, D. R. Phillips, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Research* **1989**, *17*, 955-967.
- ¹⁸³ G. W. Buchko, J. Cadet, J. L. Ravanat, P. Labataille, *Int. J. Radiat. Biol.* **1993**, *63*, 669-676.

- ¹⁸⁴ G. Buchko, J. Cadet, *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 1827-1832.
- ¹⁸⁵ (a) C. Vialas, G. Pratviel, A. Meyer, B. Rayner, B. Meunier, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1999**, 1201-1205. (b) B. Morin, J. Cadet, *Photochem. Photobiol.* **1994**, *60*, 102-109.
- ¹⁸⁶ M. V. Encinas, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6393-6397.
- ¹⁸⁷ Y. Xu, C. H. Langford, *Adv. Oxid. Technol.* **1997**, *2*, 408-414.
- ¹⁸⁸ J.-L. Ravanat, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 379-388.
- ¹⁸⁹ C. R. Saha-Möller, W. Adam In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* Vol. 1B; (Hrsg.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven, Elsevier Science Ltd., Oxford, **1996**, Kapitel 1.33, 1041-1082.
- ¹⁹⁰ K. Briviba, C. R. Saha-Möller, W. Adam, H. Sies, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 647-651.
- ¹⁹¹ S. D. Wetmore, R. J. Boyd, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9332-9343.
- ¹⁹² D. Angelov, A. Spassky, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11373-11380.
- ¹⁹³ (a) P. M. Collins, P. Gupta, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1969**, 90-91. (b) J. C. Arnould, J. P. Pete, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 2415-2418.
- ¹⁹⁴ J. C. Dalton, K. Daves, N. J. Turro, D. S. Weiss, J. A. Barltrop, J. D. Coyle, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 7213-7221.
- ¹⁹⁵ J. C. Dalton, N. J. Turro, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1970**, *21*, 499-560.
- ¹⁹⁶ C. P. Casey, R. A. Boggs, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6457-6463.
- ¹⁹⁷ F. D. Lewis, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 311-320.
- ¹⁹⁸ P. F. Mc Garry, C. E. Doubleday, Jr., C.-H. Wu, H. A. Staab, N. J. Turro, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1994**, *77*, 109-117.
- ¹⁹⁹ H. Lutz, E. Bréhéret, L. Lindqvist, *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 1758-1762.
- ²⁰⁰ L. C. Stewart, D. J. Carlsson, D. M. Wiles, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3605-3609.
- ²⁰¹ (a) M. B. Ledger, G. Porter, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **1972**, *68*, 539-553. (b) H. Baumann, H.-J. Timpe, *Z. Chem.* **1984**, *24*, 19-20. (c) P. Colman, A. Dunne, M. F. Quinn, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **1976**, *72*, 2605-2609.
- ²⁰² siehe Kapitel 4 sowie Ref 178.
- ²⁰³ H. Shizuka, E. Kimura, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 2041-2046.
- ²⁰⁴ (a) M. A. J. Rodgers, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6201-6205. (b) R. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6983-6987. (c) J. G. Parker, W. D. Stanbro, *J. Photochem.* **1984**, *25*, 545-547.

- ²⁰⁵ S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618.
- ²⁰⁶ S. Steenken, S. V. Jovanovic, M. Bietti, K. J. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2373-2374.
- ²⁰⁷ M. Maeda, K. Nushi, Y. Kawazoe, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2677-2682.
- ²⁰⁸ J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Mutat. Res.* **1999**, *424*, 9-21.
- ²⁰⁹ C. Vialas, C. Claparols, G. Pratviel, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2157-2167.
- ²¹⁰ S. R. Logan In *Grundlagen der chemischen Kinetik*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**, Kapitel 4.3, 84-91.
- ²¹¹ K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9681-9682.
- ²¹² U. Plappert, K. Raddatz, W. Rieth, T. M. Fliedner, *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* **1995**, *30*, 60-65.
- ²¹³ (a) A. R. Collins, V. L. Dobson, M. Dusinska, G. Kennedy, R. Stetina, *Mutat. Res.* **1997**, *29*, 183-193. (b) C. M. Gedik, S. G. Wood, A. R. Collins, *Free Radic. Res.* **1998**, *29*, 609-615.
- ²¹⁴ (a) P. J. Thornalley, R. J. Trotta, A. Stern, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *759*, 16-22. (b) W. Chamulitrat, M. F. Hughes, T. E. Eling, R. P. Mason, *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *290*, 153-159. (c) J. Ueda, N. Saito, T. Ozawa, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *325*, 65-76. (d) G. M. Rosen, E. J. Rauckman, *Mol. Pharm.* **1980**, *17*, 233-238. (e) M. Kohno, M. Yamada, K. Mitsuta, Y. Mizuta, T. Yoshikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1447-1453. (f) J. van der Zee, *Biochem. J.* **1997**, *322*, 633-639. (g) W. Chalulitrat, N. Takahashi, R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7889-7899.
- ²¹⁵ V. Misik, N. Miyoshi, P. Riesz, *Free Radic. Res.* **1996**, *25*, 13-22.
- ²¹⁶ S. Hünig, G. Märkl, J. Sauer, *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie*, vorläufiges Manuskript, Universität Würzburg, **1988**.
- ²¹⁷ K. B. Schowen, R. L. Schowen, *Methods in Enzymology* **1982**, *87*, 551-606.
- ²¹⁸ (a) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Hrsg.: T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook), Cold Spring Harbour Laboratory, New York, **1982**, 468. (b) J. B. Kalif, H.-Y. Cheng, T. A. Last, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 285-289.
- ²¹⁹ M. F. Shubsda, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1997**, *34*, 73-79.
- ²²⁰ (a) E. Leyva, M. S. Platz, G. Persy, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3783-3790. (b) M. N. Burnett, R. Boothe, E. Clark, M. Gisin, H. M. Hassaneen, R. M. Pagni, G. Persy, R. Smith, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2527-2538.

- ²²¹ M. Tanabe, R. H. Peters, *Organic Syntheses Coll.*, Vol. VII, Hrsg.: J. P. Freeman, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1990**, 386-392.
- ²²² Laborjournaleinträge II beziehen sich auf die Diplomarbeit (Ref 138a).
- ²²³ K. R. Kopecky, J. E. Filby, C. Mumford, P. A. Lockwood, J.-Y. Ding, *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 1103-1122.
- ²²⁴ N. J. Turro, I. E. Kochevar, Y. Noguchi, M.-F. Chow, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3170-3177.
- ²²⁵ R. W. Denny, A. Nickon, *Org. Reactions* **1973**, *20*, 133-336.
- ²²⁶ G. O. Schenck, K. H. Schulte-Elte, *Liebigs Ann. Chem.* **1958**, *618*, 185-193.
- ²²⁷ Hergestellt analog zu *tert*-Butoxy-2-propanon in Ref 138a.
- ²²⁸ Hergestellt analog zu Acetoxy-2-propanon in Ref 137a.
- ²²⁹ (a) F. Sato, T. Jimbo, M. Sato, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2171-2174. (b) A. Krief, M. Clarembeau, P. Barbeaux, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 457-458. (c) H. Labaziewicz, K. R. Lindfors, *Heterocycles* **1989**, *29*, 929-938. (d) K. N. Gurudutt, A. K. Shaw, *Indian J. Chem., Sect. B* **1989**, *28*, 422-423.
- ²³⁰ J. Grimaud, A. Laurent, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 3599-3605.
- ²³¹ Synthese analog Ref 124.
- ²³² D. Crich, C. Chen, J. T. Hwang, H. Yuan, A. Papadatos, R. I. Walter, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8937-8951.
- ²³³ H. G. O. Becker In *Einführung in die Photochemie*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1991**, 448.
- ²³⁴ G. D. Mendenhall, J. D. Protasiewicz, C. E. Brown, K. U. Ingold, J. Luszyk, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1718-1724
- ²³⁵ C. E. Brown, A. G. Neville, D. M. Rayner, K. U. Ingold, J. Luszyk, *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 363-379.

Lebenslauf

Zur Person

Markus Arnold
geboren am 15. Mai 1973 in Flörsheim
ledig

Schulausbildung

Aug. 1979-Mai 1992 Grundschole und Gymnasium in Gerabronn, Abschluß: Abitur

Zivildienst

Aug. 1992-Okt. 1993 Jugendherberge Kirchberg

Hochschulausbildung

Okt. 1993 Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Würzburg,

Okt. 1995 Diplom-Vorprüfung

Sept. 1996-Feb. 1997 Auslandssemester am Institute of Inorganic Chemistry, The National University of Ireland, University College Dublin verbunden mit einem Praktikum in Anorganischer Chemie

Jan. 1998-Sept. 1998 Diplomarbeit in Organischer Chemie, Thema: " α -Alkoxyethylsubstituierte Dioxetane als Radikalquellen zur Untersuchung von DNA-Schäden"

Sept. 1998 Studienabschluß: Diplom-Chemiker

seit Nov. 1998 Promotion am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. h.c. Waldemar Adam, Thema: "Oxidative DNA-Schädigung durch elektronisch angeregte Carbonylverbindungen und daraus gebildete Radikalspezies "

Berufstätigkeit

seit Nov. 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg

Würzburg, den 12. Dezember 2001

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Oxidative DNA-Schädigung durch elektronisch angeregte Carbonylverbindungen und daraus gebildete Radikalspezies“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre ausserdem, daß diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher ausser den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 12. Dezember 2001

(Markus Arnold)

