

DNA-Schädigung durch photochemische Alkoxyradikalquellen

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

vorgelegt von
Stefan Marquardt
aus
Ochsenfurt

Würzburg 2002

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation.

1. Prüfer:
2. Prüfer:
der mündlichen Prüfung.

Tag der mündlichen Prüfung:
Doktorurkunde ausgehändigt am:

*„Ihr müsst mich nicht durch Widerspruch verwirren,
Sobald man spricht, beginnt man schon zu irren.“*

Johann Wolfgang von Goethe

meinen Eltern

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. h. c. W. Adam für die gute Betreuung meiner Arbeit bedanken. Für die Freiheit, die er mir bei meiner Arbeit gewährte und für das schnelle Korrekturlesen von Publikationen und meiner Dissertation bin ich ihm sehr dankbar.

Ein großes Dankeschön gebührt auch Dr. Chantu Saha-Möller, der durch sorgfältiges Korrekturlesen von Manuskripten und zahlreiche Diskussionen mir eine große und geschätzte Hilfe war.

Meine Dissertation hätte nicht ihr jetziges Gesicht, wenn ich nicht die Zusammenarbeit mit anderen hätte genießen können. An erster Stelle möchte ich hier Dr. Hideki Okamoto erwähnen, der im Rahmen eines Post-Doc-Aufenthalts gemeinsam mit mir das Thema der Isopropoxyradikalquellen bearbeitete und durch regen Ideenaustausch und geduldige Diskussionen dieses Thema erst richtig spannend machte. Prof. Dr. Nau möchte ich dafür danken, dass er mir ermöglicht hat, in seinem Arbeitskreis die Laserblitzexperimente durchzuführen, bei denen mich Dr. Uwe Pischel sehr zeitaufwendig und geduldig bis in die späten Abende hinein unterstützte. Bei Diana Kemmer möchte ich mich für die Aufnahme der HPLC-MS-Chromatogramme bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Laborkollegen im Grünen Salon, Ania Kurz und Markus Arnold, die den Grünen Salon, den wir durch interne Kompetenzverteilungen, HPLC-Spielereien und unserem eigenen Sinn für Ordnung den anderen AKAlern zu einem geheimen und unantastbaren Labor machten, zu einem wohnlichen Ort werden ließen.

Dankbar bin ich auch gegenüber Manfred Diederling, Markus Arnold und Rainer Bargon, die meine Dissertation zügig und sorgfältig korrekturgelesen haben und auch sonst immer für eine gute und lustige Laboratmosphäre gesorgt haben. Dabei darf ich auch nicht Konrad Roschmann, mit dem ich das „Projekt“ Zusammenschreiben gemeinsam angepackt habe, und Joachim Bialas, mit dem ich am Anfang meiner Doktorarbeit den Abzug geteilt habe, vergessen. Recht eigentlich hat der ganze Arbeitskreis inklusive Agi und AKI dazu beigetragen, dass mir die Zeit meiner Doktorarbeit als eine schöne in Erinnerung bleibt.

Schließlich und ganz besonders, möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die für mich einfach immer da waren.

Publikationen

Beiträge in Fachzeitschriften

1. “Are Pyridinethiones Reliable Photochemical Oxyl-Radical Sources for Photobiological Studies? The Importance of Secondary Photolysis Products in the Guanine Oxidation of 2'-Deoxyguanosine and Cell-Free DNA”, W. Adam, G. N. Grimm, S. Marquardt, C. R. Saha-Möller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1179-1185.
2. “Oxidative DNA Damage in the Photolysis of *N*-Hydroxy-2-Pyridone, a Specific Hydroxyl-Radical Source”, W. Adam, S. Marquardt, C. R. Saha-Möller, *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 287-291.
3. “2'-Deoxyguanosine (**dG**) Oxidation and Strand-Break Formation in DNA by the Radicals Released in the Photolysis of *N-tert*-Butoxy-2-pyridone. Are *tert*-Butoxyl or Methyl Radicals Responsible for the Photooxidative Damage in Aqueous Media?”, W. Adam, S. Marquardt, D. Kemmer, C. R. Saha-Möller, P. Schreier, *Org. Lett.* **2002**, in press
4. “Photochemistry of *N*-Isopropoxy-Substituted 2(1H)-Pyridone and 4-*p*-Tolylthiazole-2(3H)-thione: Alkoxy-Radical Release (Spin-Trapping, EPR and Transient Spectroscopy) and its Significance in the Photooxidative Induction of DNA Strand Breaks”, W. Adam, J. Hartung, H. Okamoto, S. Marquardt, W. M. Nau, U. Pischel, C. R. Saha-Möller and K. Špehar, *J. Am. Chem. Soc.*, eingereicht
5. “Photobiological Model Studies on *tert*-Butoxyl-Radical Sources (*Photo-Fenton* Reagents): 2'-Deoxyguanosine Modification by Methyl Radicals Generated through Competitive β Cleavage of the *tert*-Butoxyl Radicals in Aqueous Media”, W. Adam, D. Kemmer, S. Marquardt, C. R. Saha-Möller, P. Schreier, *J. Photochem. Photobiol. Science*, in Vorbereitung.

Posterbeiträge

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, Mechanism, Detection and Clinical Relevance”, Würzburg, Deutschland, 5.-7. September 1998.
2. “Oxidative DNA Damage in the Photolysis of *N*-Hydroxy-2-Pyridone, a Specific Photochemical Hydroxyl-Radical Source”, S. Marquardt, W. Adam, C. R. Saha-Möller, 37th IUPAC Congress / 27th GDCh General Meeting, Berlin, 14.-19. August 1999.

Inhaltsverzeichnis

Erläuterungen und Abkürzungen	IV
Zusammenfassung	VI
Summary	X
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 DNA-Schäden durch UV-Strahlung	3
2.1.1 Einteilung der UV-Strahlung	3
2.1.2 Photochemie der Nukleinbasen	3
2.1.3 Photosensibilisierung nach dem Typ-I Mechanismus	5
2.1.4 Photosensibilisierung nach dem Typ-II-Mechanismus	5
2.2 DNA-Schäden durch Radikale	7
2.2.1 Hydroxylradikale	8
2.2.2 Kohlenstoffradikale	11
2.2.3 Peroxylradikale	12
2.2.4 Alkoxyradikale	13
2.3 Photo-Fenton-Reagenzien: Grenzen ihrer Anwendung für photobiologische Studien	15
2.3.1 Das Pyridinthionsystem: Probleme durch Photoprodukte	15
2.3.2 Das Pyridon- und Thiazolthionsystem: spezifische Radikalvorläufer	16
2.4 Methoden der Detektion von DNA-Schäden	17
2.4.1 Detektion von Strangbrüchen in superhelikaler pBR 322 DNA	17
2.4.2 Detektion oxidativer Schäden an dG	18
3 Kapitel 1: Pyridon 2c im Vergleich mit Perester 4 - Photooxidative Schäden an dG und DNA durch tert-Butoxylradikale?	19
3.1 Problemstellung	19
3.2 Ergebnisse	22
3.2.1 Synthese von Pyridon 2c und Perester 4	22
3.2.2 Photochemischer Zerfall von Pyridon 2c	23
3.2.3 Photochemische Radikalfreisetzung von Pyridon 2c	25

3.2.4	Photochemisch induzierte Strangbruchbildung durch Pyridon 2c	26
3.2.5	Photochemisch induzierte Oxidation von dG durch Pyridon 2c und Perester 4	28
3.3	Diskussion	32
3.3.1	Photochemische Zersetzung des Pyridons 2c	32
3.3.2	dG Oxidation und Strangbruchbildung	33
3.3.3	Schlussfolgerung	35
4	Kapitel 2: Photochemie der Isopropoxyradikalquellen Pyridon 2b und Thiazolthion 3b - Einfluss der Chromophore auf Radikalfreisetzung und DNA-Schädigung	37
4.1	Problemstellung	37
4.2	Ergebnisse	39
4.2.1	Synthese der Edukte	39
4.2.2	Absorptionseigenschaften von Pyridon 2b und Thiazolthion 3b	40
4.2.3	Produkte bei der Photolyse von Pyridon 2b und Thiazolthion 3b	41
4.2.4	Detektion von Transienten bei der Laserblitz-Photolyse.....	43
4.2.5	Bestimmung der Quantenausbeuten	44
4.2.6	Photochemische Radikalgenerierung durch Pyridon 2b und Thiazolthion 3b	47
4.2.7	Strangbruchbildung in pBR 322 DNA durch Pyridon 2b und Thiazolthion 3b	52
4.3	Diskussion	54
4.3.1	Spinabfangexperimente	54
4.3.2	Mechanismus der Produktbildung aus Pyridon 2b und Thiazolthion 3b	54
4.3.3	Strangbruchbildung durch Pyridon 2b und Thiazolthion 3b	57
4.3.4	Schlussfolgerung	58
5	Ausblick	59
5.1	Weitere Studien mit dem Pyridon 2c und dem Perester 4	59
5.2	Untersuchungen mit den Isopropoxyradikalquellen 2b und 3b	61
5.3	Derivate des Thiazolthionsystems für mechanistische und photobiologische Studien	62
6	Experimentalteil	64
6.1	Allgemeine Vorbemerkungen	64
6.1.1	Geräte für spektroskopische und analytische Untersuchungen.....	64
6.1.2	Bestrahlungsapparaturen	67

Inhaltsverzeichnis

6.1.3	Dünnschicht- und Säulenchromatographie	67
6.1.4	Reagenzien und Lösungsmittel	67
6.1.5	Arbeitsmethoden	68
6.2	Untersuchung von Pyridon 2c und Perester 4	70
6.2.1	Synthese der Edukte	70
6.2.2	Bestimmung der Quantenausbeute des photochemischen Zerfalls von Pyridon 2c mittels Kaliumferrioxalat-Aktinometrie.....	78
6.2.3	Produkte in der Photolyse des Pyridons 2c	81
6.2.4	Nachweis von Radikalen bei der Photolyse des Pyridons 2c und des Peresters 4 mittels DMPO -Spintrapping und EPR-Spektroskopie	82
6.2.5	Photooxidation von pBR 322 DNA.....	85
6.2.6	Photooxidation von Guanin in 2'-Desoxyguanosin (dG)	90
6.3	Vergleichende Studie der photochemischen Isopropoxyradikalquellen 2b und 3b.....	98
6.3.1	Synthese der Edukte	98
6.3.2	Photozersetzung der <i>Photo-Fenton</i> -Reagenzien 2b und 3b	104
6.3.3	EPR-spektroskopische Untersuchungen (Spin-Trapping mit DMPO).....	117
6.3.4	Photooxidation von pBR 322 DNA.....	120
7	Literaturverzeichnis.....	122
	Lebenslauf.....	130
	Erklärung.....	131
	Ausklapptafel	

Erläuterungen und Abkürzungen

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

Literaturhinweise sind mit hochgestellten arabischen Ziffern gekennzeichnet und beziehen sich auf das Literaturverzeichnis in Kapitel 7. Wichtige chemische Verbindungen sind mit fettgedruckten, arabischen Ziffern oder mit Abkürzungen (z. B. **DMPO**) gekennzeichnet. Am Ende der Arbeit befindet sich eine Ausklapptafel, auf der die entsprechenden Strukturen abgebildet sind.

In den Ergebnisteilen (Kapitel 3.2 und 4.2) wird mit V-... auf die jeweiligen Versuchsnummern im Experimentalteil (Kapitel 6) verwiesen. Bei den im Experimentalteil aufgeführten Versuchen wird mit einem Kürzel (z. B. IV-SFM-49) auf die entsprechende Eintragung im Laborjournal hingewiesen, wobei mit dem drei Buchstaben umfassenden Kürzel der Experimentator (SFM steht für **Stefan Marquardt**, HOK für Dr. **Hideki Okamoto** und LEG für **Lena Grünewald**), mit der römischen Ziffer die entsprechende Laborjournalnummer und mit der arabischen Ziffer die Versuchsnummer in diesem Journal angegeben ist.

Versuche, die von Dr. H. Okamoto in Kooperation durchgeführt wurden, sind im Experimentalteil als solche gekennzeichnet.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

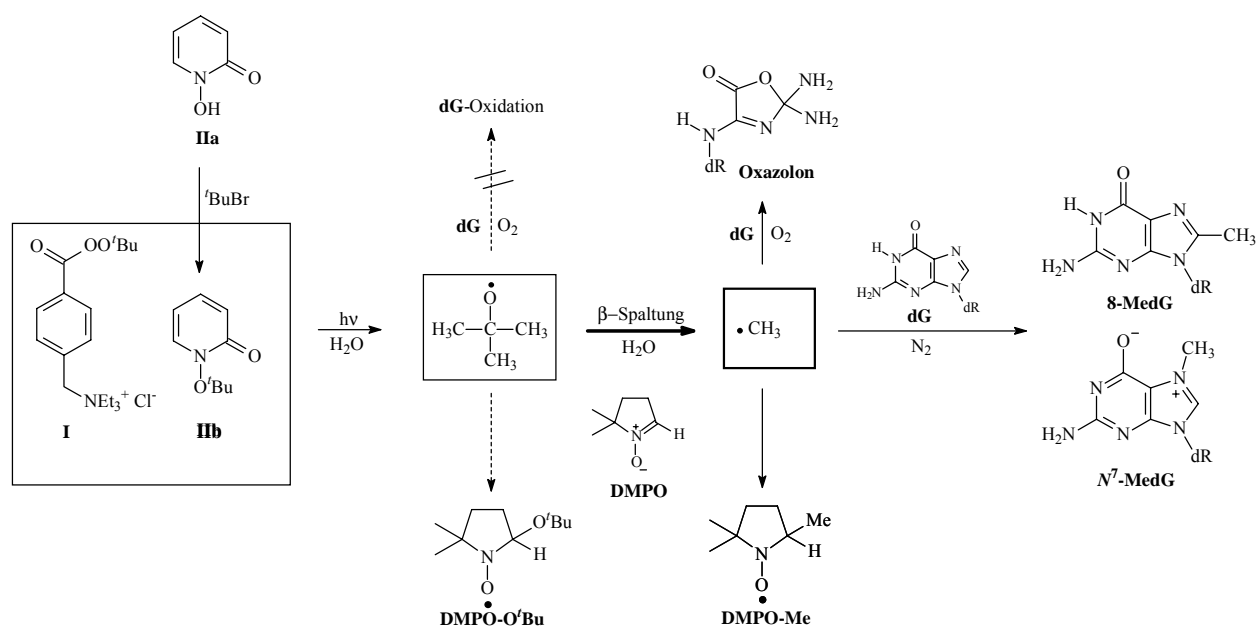
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
BP	Benzophenon
1,3-CHD	1,3-Cyclohexadien
dG	2'-Desoxyguanosin
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin- <i>N</i> -oxid
DMPO-CMe ₂ OH	2,2-Dimethyl-5-(2-hydroxypropyl)-1-pyrrolidin- <i>N</i> -oxyl
DMPO-Me	2,2-Dimethyl-5-methyl-1-pyrrolidin- <i>N</i> -oxyl
DMPO-O ^{<i>i</i>} Pr	2,2-Dimethyl-5-isopropoxy-1-pyrrolidin- <i>N</i> -oxyl

DMPO-O'Bu	2,2-Dimethyl-5- <i>tert</i> -butoxy-1-pyrrolidin- <i>N</i> -oxyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GRP	(Guanidine Releasing Products) Guanidin-freisetzende-Produkte
Gua	Guanin
HMBC	Heteronuclear Multi-Bond Correlation
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Imidazolon	2-Amino-5-[(2-desoxy- β -D- <i>erythro</i> pentofuranosyl)amino]-4H-imidazol-4-on
8-MedG	8-Methyl-2'-desoxyguanosin
<i>N</i> ⁷ -MedG	<i>N</i> ⁷ -Methyl-2'-desoxyguanosin
NQS	1,2-Naphtochinon-4-sulfonat
OC	offen-circular
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-S-2,5'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D- <i>erythro</i> pentofuranosyl)-5-guanidinylliden-2-hydroxy-4-imidazolidin
pBR 322 DNA	ringförmige, superhelikale Plasmid-DNA
Sdp	Siedepunkt
Smp	Schmelzpunkt

Zusammenfassung

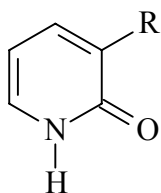
Reaktive Sauerstoffspezies induzieren oxidative DNA-Schäden (Oxidativer Stress) und spielen daher eine entscheidende Rolle bei Mutagenese, Kanzerogenese und Alterung. Durch die zunehmende terrestrische UV-Strahlung, die die Generierung solcher Spezies fördert, ist dieses Thema von besonderer Aktualität. Während die Reaktivität von Hydroxylradikalen gegenüber DNA bereits intensiv erforscht worden ist, sind die photobiologischen Wirkungen von Alkoxyradikalen bisher kaum untersucht. Vor diesem Hintergrund sollten neue photochemische Alkoxyradikalquellen entwickelt und deren Reaktivität gegenüber Nucleinsäuren mit dem bereits etablierten System Perester **I** verglichen werden. Auf diese Weise sollte ein allgemeines DNA-Schadensprofil von Alkoxyradikalen aufgestellt und deren Wirkungsgrad ermittelt werden.

1. Das wasserlösliche Pyridon **IIb** ist aus dem entsprechenden Hydroxyderivat **IIa** durch Alkylierung mit *tert*-Butylbromid unter S_N1-Bedingungen synthetisiert worden (Schema I).



Schema I. dG-Modifikationen durch Methylradikale bei Bestrahlung der *tert*-Butoxyradikalquellen **I** und **IIb**

Seine photolytische Zersetzung führt zu den Produkten 2-Pyridon **IIIa** (30%) und 3-*tert*-Butoxy-2-pyridon **IIIb** (27%). Bei Bestrahlung sowohl in organischen Lösungsmitteln (Benzol) als auch in wässrigem Medium erfolgt Freisetzung von *tert*-Butoxyradikalen, die EPR-spektroskopisch durch Spinabfang mit **DMPO** als **DMPO-O-tBu**-Addukt nachgewiesen



IIIa R = H

IIIb R = O ^tBu

IIIc R = O ^tPr

werden. In wässrigem Medium, unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff werden zusätzlich **DMPO**-Addukte von Methylradikalen (**DMPO-Me**) detektiert. Mit abnehmender Konzentration an eingesetztem **DMPO** entsprechen diese den Hauptradikaladdukten. Auch bei Photolyse der bereits etablierten *tert*-Butoxylradikalquelle Perester **I** werden unter diesen Bedingungen hauptsächlich Methylradikale abgefangen. Letztere werden aus den *tert*-Butoxylradikalen durch β -

Fragmentierung generiert.

In Gegenwart von superhelikaler pBR 322 DNA induzieren die von *tert*-Butoxypyridon **IIIb** photolytisch freigesetzten Radikale Einzelstrangbrüche. 2'-Desoxyguanosin (**dG**) wird durch Pyridon **IIIb** bei Bestrahlung unter aeroben Bedingungen vorwiegend zu Guanidin-freisetzenden Produkten (z.B. **Oxazolone**) oxidiert, während **8-oxodG** in nur vernachlässigbaren Mengen gebildet wird. Der Perester **I** zeigt ein analoges Schadensprofil.

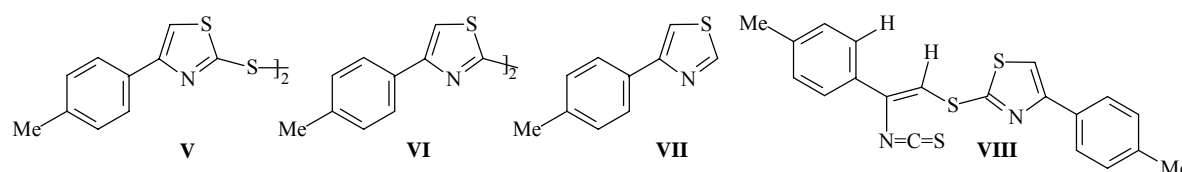
Die Reduktion der DNA- und **dG**-Schädigung durch den Zusatz von Radikalfängern manifestiert, dass die von Pyridon **IIIb** freigesetzten Radikale die Oxidantien sind.

Photosensibilisierte oxidative Schädigung durch die Photoprodukte der Radikalquelle werden durch zeitabhängige Studien ausgeschlossen. Diese ergeben, dass nach vollständiger photolytischer Zersetzung des Pyridons **IIIb** keine Schadensbildung sowohl an **dG** als auch an pBR 322 DNA mehr erfolgt.

Unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff induziert die Photolyse von Pyridon **IIIb** und Perester **I** die Bildung von **8-MedG** (2.3% für Pyridon **IIIb**, 2.0% für Perester **I**) in beachtlichen Ausbeuten. Auch **N⁷-MedG** (0.3%) konnte detektiert werden. Daraus wird auf eine erhebliche Schadensbildung durch Methylradikale geschlossen. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten und der verwendeten **dG**-Konzentration wird ermittelt, dass weniger als 0.3% der aus Perester **I** oder Pyridon **IIIb** freigesetzten *tert*-Butoxylradikale direkt mit **dG** reagieren, während mehr als 99% zu Methylradikale fragmentieren.

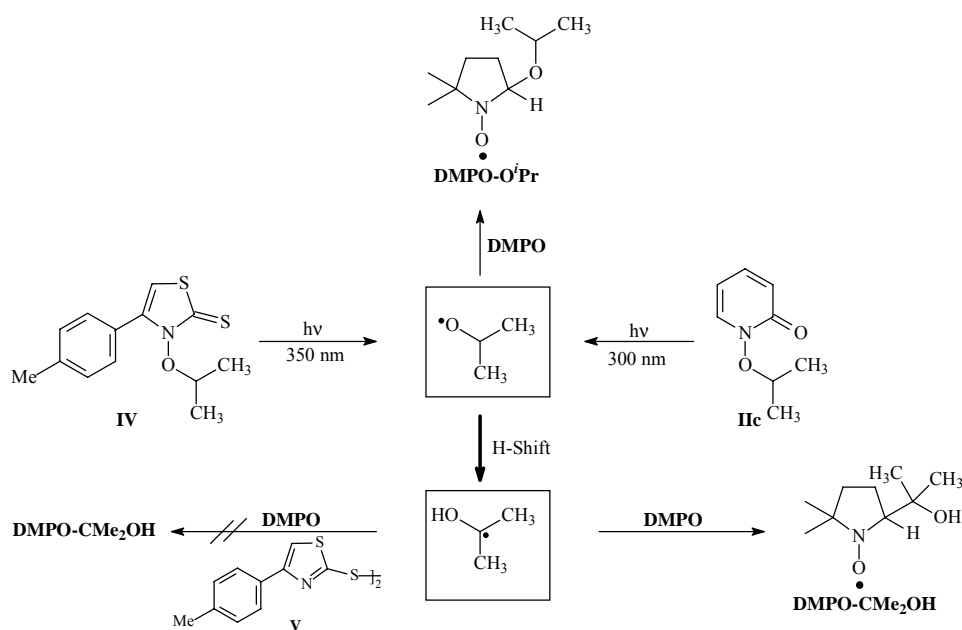
Fazit 1: Das Pyridon **IIIb** ist eine photochemische Quelle für *tert*-Butoxylradikale und zeigt das gleiche Schadensprofil gegenüber **dG** und DNA wie der Perester **I**. Die *tert*-Butoxylradikale können jedoch als schädigende Spezies ausgeschlossen werden, da sie viel effizienter zu Methylradikalen fragmentieren als mit **dG** reagieren. Die aus den Methylradikalen in Gegenwart von Sauerstoff gebildeten Methylperoxyradikale und deren Folgeradikale sind für die beobachteten Schäden verantwortlich.

2. Neben dem *tert*-Butoxypyridon **IIIb** werden auch die Isopropoxyradikalquellen Pyridon **IIc** und Thiazolthion **IV** untersucht. Laserblitz-Studien ergeben, dass für beide Systeme die NO-Bindungsspaltung der dominierende erste photochemische Prozess ist [$\Phi_{\text{N-O}} = (75 \pm 8)\%$ für Pyridon **IIc** und $\Phi_{\text{N-O}} = (65 \pm 7)\%$ für Thiazolthion **IV**]. Im Falle des Thiazolthions **IV** zeigen sowohl Laserblitz-Experimente als auch Produktstudien auf, dass bei der Photolyse zunächst das Disulfid **V** gebildet wird, aus dem dann durch CS-Bindungsspaltung die Produkte **VI-VIII** hervorgehen. Das Isopropoxy-pyridon **IIc** liefert in Analogie zu dem *tert*-Butoxy-



derivat **IIIb** die Photoprodukte 2-Pyridon **IIIa** und 3-Isopropoxy-2-pyridon **IIIc**.

Die photolytische NO-Bindungsspaltung wird für beide *Photo-Fenton*-Reagenzien dadurch weiter bestätigt, dass in Gegenwart von **DMPO** in Benzol die Bildung von Isopropoxyradikal-Addukten EPR-spektroskopisch nachgewiesen wird. In wässrigem Medium ($\text{H}_2\text{O} : \text{MeCN} = 60 : 40$) wird bei Bestrahlung von Pyridon **IIc** eine Mischung von Isopropoxyl- (**DMPO-OⁱPr**) und 2-Hydroxyprop-2-ylradikalen (**DMPO-CMe₂OH**) mit **DMPO** abgefangen. Letztere Radikale gehen aus dem Isopropoxyradikal durch H-Shift hervor und werden bei Einsatz geringer Konzentrationen an **DMPO** EPR-spektroskopisch hauptsächlich detektiert (Schema II). Bei Bestrahlung in reinem Wasser sind diese die einzig abgefangenen Radikalspezies. Im Gegensatz dazu liefert das Thiazolthion **IV** unter jeglichen Bedingungen ausschließlich die **DMPO**-Addukte der Isopropoxyradikale. Kontrollexperimente ergeben, dass im Falle des Thiazolthions **IV** die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale schneller von dem Photoprodukt Disulfid **V** als von **DMPO** abgefangen werden. Deshalb werden diese Kohlenstoffradikale nicht als **DMPO**-Addukte bei der Photolyse des Thiazolthions **IV** im EPR-Spektrum nachgewiesen, sondern ausschließlich die Isopropoxyradikaladdukte **DMPO-OⁱPr**.



Schema II. Radikalabfangexperimente mit **DMPO** bei Bestrahlung von Pyridon **IIc** und Thiazolthion **IV**

Fazit 2: Sowohl das Pyridon **IIc** als auch das Thiazolthion **IV** zerfallen durch photolytischen NO-Bindungsbruch unter Freisetzung von Isopropoxyradikalen, die in wässrigem Medium zu 2-Hydroxyprop-2-ylradikalen umlagern. Im Falle des Thiazolthions **IV** verhindert das Disulfid **V**, dass diese Spezies mit **DMPO** abgefangen werden, im Falle des Pyridons **IIc** sind sie die dominierenden **DMPO**-Radikalspezies im EPR-Spektrum.

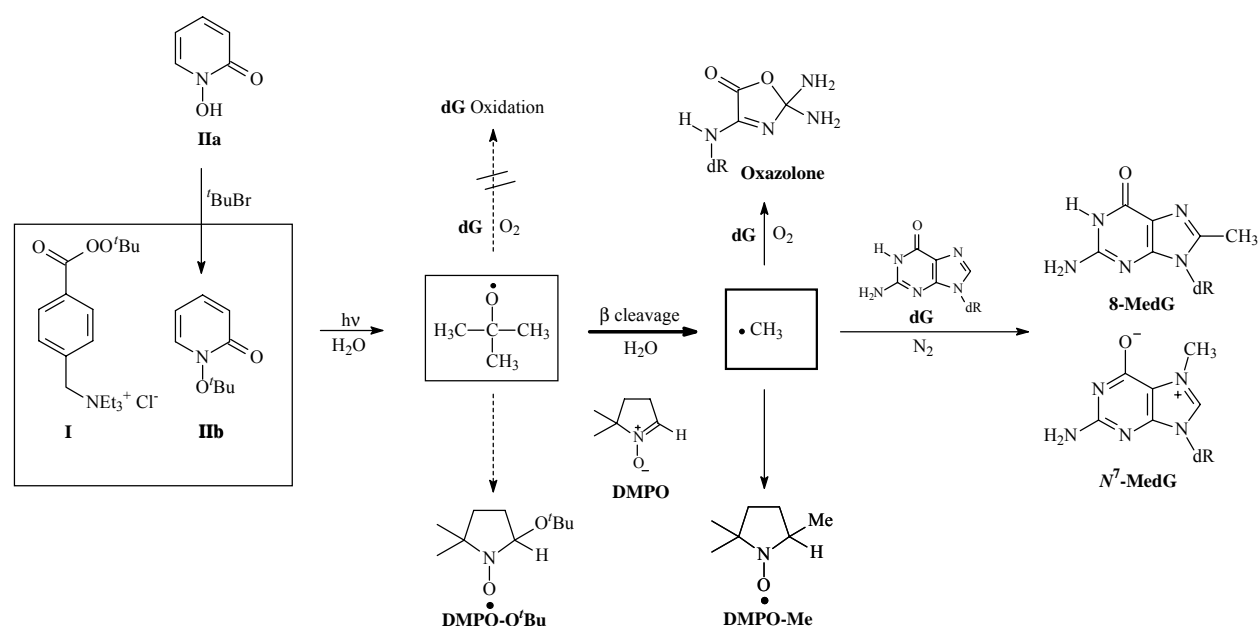
3. Sowohl das Pyridon **IIc** (17%) als auch das Thiazolthion **IV** (12%) induzieren unter Bestrahlung in superhelikaler pBR 322 DNA in einem Lösungsmittelgemisch von H₂O : MeCN = 60 : 40 nur geringe Mengen an offen-circularer DNA. In reinem Wasser hingegen, zeigt das Pyridon **IIc** eine viel höhere Reaktivität zur Strangbruchbildung (32% offen-circularer DNA). Da in diesem Medium die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale als einzige Spezies detektiert worden sind, sollten unter diesen Bedingungen Oxyradikale für die Strangbruchbildung verantwortlich sein, die aus den 2-Hydroxyprop-2-ylradikalen nach Addition von Luftsauerstoff hervorgehen. Die schwache Induktion von Strangbrüchen durch das Thiazolthion **IV** wird auf die Isopropoxyradikale zurückzuführen sein, da diese die einzigen Intermediate sind, die bei Bestrahlung dieses *Photo-Fenton*-Reagenzes detektiert werden.

Fazit 3: Die von Pyridon **IIc** generierten 2-Hydroxyprop-2-ylradikale zeigen nach Addition von molekularem Sauerstoff eine höhere Aktivität zur Strangbruchbildung als die von Thiazolthion **IV** freigesetzten und ausschließlich detektierten Isopropoxyradikale.

Summary

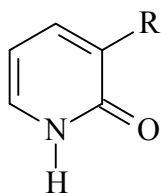
Reactive oxygen species induce oxidative DNA damage (oxidative stress), and consequently, they play a key role in mutagenesis, cancerogenesis and aging. Due to the increasing terrestrial UV radiation, which is generating such aggressive species, this topic is of particular timeliness. The reactivity of hydroxyl radicals towards DNA has been intensively investigated, whereas relatively little is known on the photobiological effects of alkoxy radicals. In this respect, the incentive of the present dissertation has been the development of new and effective photochemical alkoxy-radical sources. Their reactivity towards DNA was to be assessed and compared with that of the perester **I**, which has previously been established as photochemical alkoxy-radical source in our group. Such a photobiological model study should provide a general DNA-damaging profile for alkoxy radicals.

1. The water-soluble pyridone **IIb** has been prepared from the corresponding hydroxy derivative **IIa** through alkylation with *tert*-butyl bromide under S_N1 reaction conditions (Scheme I). Its photochemical decomposition affords 2-pyridone **IIIa** (30%) and 3-*tert*-



Scheme I. Modification of **dG** through Methyl Radicals upon the Photolysis of the *tert*-Butoxy-Radical Sources **I** and **IIb**

butoxy-2-pyridone (**IIIb**, 27%). Upon irradiation in organic solvents (benzene) and aqueous medium, *tert*-butoxy radicals are released which are trapped by **DMPO** and subsequently



IIIa R = H

IIIb R = O ^tBu

IIIc R = O ⁱPr

characterized as **DMPO-O^tBu** adducts by means of EPR spectroscopy. In aqueous medium and under the exclusion of molecular oxygen, the **DMPO** adduct of the methyl radical is also detected and represents the dominant **DMPO**-radical adduct at low **DMPO** concentrations. The methyl radicals result from the β cleavage of the *tert*-butoxyl radicals, which is facilitated in aqueous media.

The photochemically released radicals of the pyridone **IIb** induce strand breaks in supercoiled pBR 322 DNA and oxidize **dG** predominantly to guanidine-releasing products (e. g. **oxazolone**), whereas **8-oxodG** is formed in negligible amounts. The perester **I** displays an analogous damaging profile.

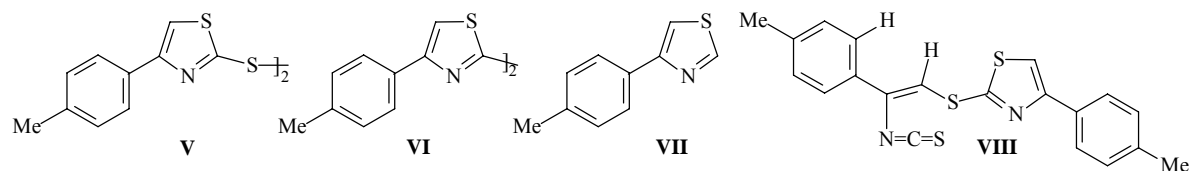
The addition of radical scavengers reduces strand-break formation and **dG** oxidation in the photolysis of the pyridone **IIb**, which manifests that the resulting radicals are the oxidizing agents. The oxidative damage by the photoproducts through photosensitization is excluded, since time-dependent photooxidations reveal that strand-break formation and **dG** oxidation level off once all of the pyridone **IIb** has been consumed.

Under the exclusion of molecular oxygen, the photolysis of the pyridone **IIb** or the perester **I** afford appreciable amounts of **8-MedG** (2.3% for pyridone **IIb**, 2.0% for perester **I**) and also **N⁷-MedG** is detected, which substantiates the involvement of methyl radicals. From the known rate constants for the reaction of *tert*-butoxyl radicals with the guanine base and for the β fragmentation of the *tert*-butoxyl radical into methyl radical, it may be estimated that not more than 0.3% of the generated *tert*-butoxyl radicals react with **dG** (0.10 mM) and, consequently, more than 99% undergo β cleavage to methyl radicals.

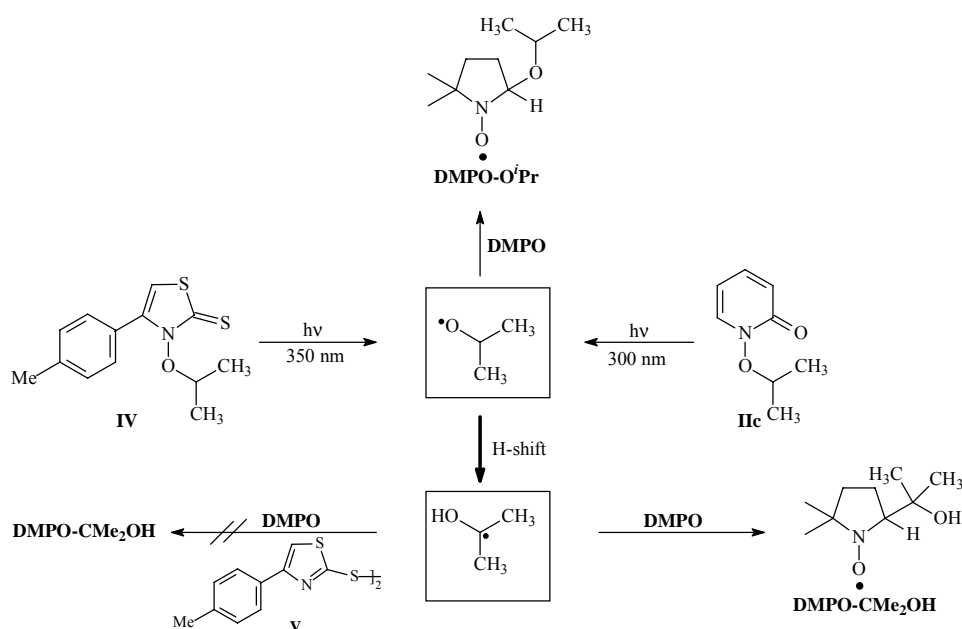
Conclusion 1: *Pyridone **IIb** represents a photochemical source of *tert*-butoxyl radicals and displays the same damaging profile towards DNA and **dG** like perester **I**. The *tert*-butoxyl radicals are ruled out as damaging species, since their β fragmentation into methyl radicals overwhelmingly dominates their reaction with **dG**. The methylperoxyl radicals formed through oxygen trapping by the methyl radicals are responsible for the observed damage.*

2. In addition to the pyridone **IIb**, also the photochemical isopropoxyl-radical sources pyridone **IIc** and thiazolethione **IV** have been investigated. Transient spectroscopy establishes NO-bond scission ($\Phi_{\text{N-O}} = 75 \pm 8\%$ for **IIc** and $65 \pm 7\%$ **IV**) as the dominating primary

photochemical process for both reagents. Product studies and laser-flash experiments reveal that the thiazolethione **IV** leads primarily to the disulfide **V**, from which the products **VI-VIII** are derived through CS-bond breakage. The isopropoxy pyridone **IIc** affords 2-pyridone



IIIa and 3-isopropoxy-2-pyridone **IIc** as photoproducts, analogous to the photochemistry of the *tert*-butoxy derivative. Further evidence for the NO-bond cleavage is provided by the fact that upon irradiation of both reagents in benzene in the presence of **DMPO**, the adducts of the isopropoxyl radicals have been EPR-spectrally detected. Upon photolysis of the pyridone **IIc** in aqueous media ($\text{H}_2\text{O} : \text{MeCN} = 60 : 40$), a mixture of isopropoxyl and 2-hydroxyprop-2-yl radicals are trapped by **DMPO**. The latter radicals result from the isopropoxyl radicals through H shift and are predominantly detected when low concentrations of **DMPO** are used (Scheme II). Moreover, in pure water, exclusively the carbon-centered 2-hydroxyprop-2-yl



Scheme II. Spin-Trapping Experiments with **DMPO** upon Irradiation of Pyridone **IIc** and Thiazolethione **IV**

radicals are trapped by **DMPO**. In contrast, the thiazolethione **IV** affords only the adducts of the isopropoxyl radicals, independent of what **DMPO** concentration is applied. Control experiments reveal that the disulfide **V** photoproduct of the thiazolethione **IV** scavenges the carbon-centered radicals in competition with trapping by **DMPO**.

Conclusion 2: *Both the pyridone **Ic** and the thiazolethione **IV** decompose through NO-bond cleavage under release of isopropoxyl radicals, which rearrange in aqueous media to the carbon-centered 2-hydroxyprop-2-yl radicals. In the case of the thiazolethione **IV** its disulfide photoproduct **V** prevents efficient **DMPO** trapping of the 2-hydroxyprop-2-yl radicals, whereas for the pyridone **Ic**, the **DMPO** adducts of the carbon-centered radicals dominate in the EPR spectrum.*

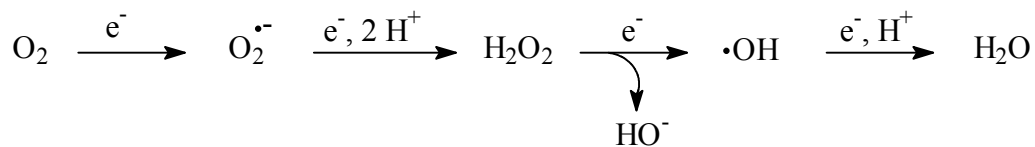
3. In supercoiled pBR 322 DNA, pyridone **Ic** (17%) and thiazolethione **IV** (12%) induce only moderate amounts of open-circular DNA upon irradiation in a 60 : 40 mixture of H₂O-MeCN. In pure water, however, the pyridone **Ic** photoinduces substantially more DNA cleavage (32% open-circular DNA), which is attributed to the oxyl radicals generated from the 2-hydroxyprop-2-yl radicals by oxygen trapping. The lower strand-break activity of the thiazolethione **IV** derives presumably from isopropoxyl radicals, because only these are detected in the photolysis of this *photo-Fenton* reagent.

Conclusion 3: *The carbon-centered 2-hydroxyprop-2-yl radicals generated from pyridone **Ic** in aqueous media and in absence of molecular oxygen display a higher DNA photocleaving reactivity than the isopropoxyl radicals derived from the thiazolethione **IV**.*

1 Einleitung

Der fortschreitende Abbau der Ozonschicht in der Stratosphäre bereitet zunehmend Sorge, weil mit diesem Abbau die Intensität der UV-Strahlung auf der Erde zunimmt^{1,2} und damit das Risiko für Hautkrebserkrankungen ansteigt.³⁻⁵ UVB-Strahlung (290-320 nm), aber auch UVA-Strahlung (320-400 nm) können die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies in Organismen induzieren.⁶ So konnten beispielsweise Hydroxylradikale in der Haut nachgewiesen werden, die zuvor UV-Strahlung ausgesetzt war.^{6d}

Reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale) wird eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Hautmelanomen zugeschrieben⁷. Diese Agentien werden bereits ohne äußere Einwirkung in aeroben Organismen gebildet. Sie treten während der stufenweise ablaufenden Einelektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff auf (Schema 1.1). Eine Vielzahl von biologischen Systemen ist in der Lage durch



Schema 1.1. Generierung reaktiver Sauerstoffspezies im Organismus

Autooxidationsvorgänge Sauerstoff auf diese Weise zu aktivieren. So entstehen die reaktiven Sauerstoffmetabolite z. B. in phagocytierenden Zellen und in der mitochondrialen Elektronentransportkette, aber auch durch lösliche Zellbestandteile, wie Catecholamine, Hydrochinone und Hämproteine.^{8,9} Bei zelleigenen Prozessen werden die reaktiven Sauerstoffspezies aber nur in kleinen Mengen gebildet. In geringen Konzentrationen sind sie sogar beteiligt an der zellulären Signalübertragung und an der Kontrolle des Zellwachstums und der Zellteilung.¹⁰ Ihre Konzentrationen werden durch enzymkatalysierte Reaktionen auf niedrigem Niveau gehalten. Das Superoxidradikalanion wird beispielsweise durch das Enzym Superoxid-Dismutase in H₂O₂ und molekularem Sauerstoff abgebaut,⁸ H₂O₂ wird durch Katalase und Peroxidase zersetzt und das aus H₂O₂ nach Elektronentransfer entstehende Hydroxylradikal¹¹ kann durch Antioxidantien wie α -Tocopherol in der Lipidmembran und Vitamin C im Cytosol zu Wasser reduziert werden.¹² Schädliche Wirkung erfolgt aber nach einer Überproduktion der reaktiven Sauerstoffspezies, bekannt als "oxidativer Stress", wenn also das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der oxidativen Seite verschoben ist.¹² In unkontrolliert hohen Konzentrationen bewirken die reaktiven

Sauerstoffspezies strukturelle Veränderungen an Proteinen, an Lipidmembranen und rufen auch mutagene DNA-Schädigungen hervor.^{10,12} Neuere Studien zeigten, dass reaktive Sauerstoffspezies sogar an allen drei Stufen der Canzerogenese (Initiation, Promotion und Progression) beteiligt sind.¹³ Vor dem Hintergrund der ansteigenden Hautkrebserkrankungen im Zuge der verstärkten UV-Strahlung, ist es verständlich, dass mechanistische Untersuchungen zur Wirkungsweise reaktiver Sauerstoffspezies, insbesondere der Oxyradikale, auf biologisches Material eine beachtliche Bedeutung zukommt.

2 Kenntnisstand

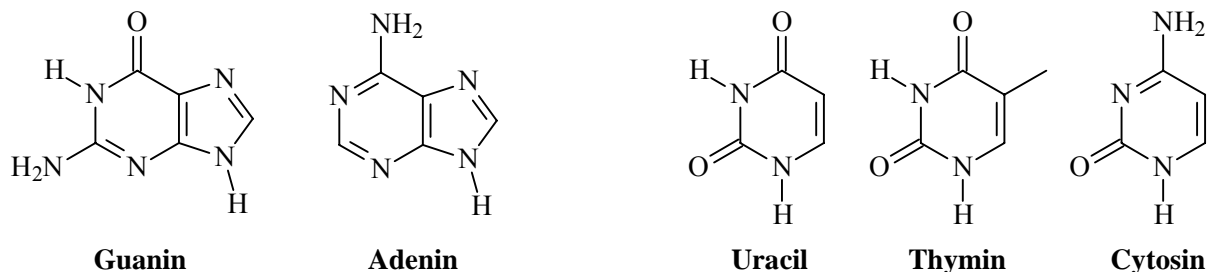
2.1 DNA-Schäden durch UV-Strahlung

2.1.1 Einteilung der UV-Strahlung¹⁴

Das erste Gesetz der Photochemie besagt, dass ein photochemischer Prozess nur dann ablaufen kann, wenn Photonen absorbiert werden. Das gilt auch für biologische Systeme. Photobiologische Prozesse können demnach nur dann ausgelöst werden, wenn das eingestrahlte Licht auch absorbiert wird. Die biologisch relevante UV-Strahlung hat man in drei Banden eingeteilt. Die UV-C Bande umfasst den Bereich von 100-200 nm und wird von allen zellulären Bestandteilen absorbiert. Der Filtereffekt der Ozonschicht bewirkt jedoch, dass das auf die Erde einstrahlende Sonnenlicht kaum UV-C Strahlung enthält. Die UV-B Bande (280-320 nm) wird vor allem von den Nukleinbasen und den aromatischen Aminosäuren absorbiert, während die UV-A Strahlung (Black light, 320-400 nm) zwar auch noch von der DNA absorbiert wird, aber vorwiegend zur Photosensibilisation durch exogene und endogene Substanzen führt. Das sichtbare Licht schließlich ist für die meisten photobiologischen Phänomene wie z. B. die Photosynthese verantwortlich.

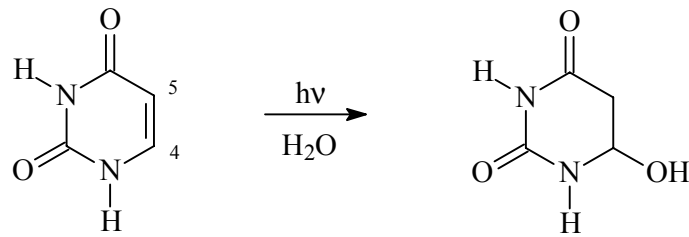
2.1.2 Photochemie der Nukleinbasen

Die Nukleinbasen werden in Purin- (Guanin und Adenin) und Pyrimidinbasen (Thymin, Cytosin und Uracil) eingeteilt. Die Purinbasen sind zehnmal resistenter gegenüber UV-



Strahlung als die Pyrimidinbasen.¹⁵ Gasparro et al. konnten durch die Isolierung eines Adenindimers zeigen, dass sie UV-induzierte Reaktionen eingehen.¹⁶ Auch andere Pyrimidinphotoprodukte konnten detektiert werden.¹⁷

Alle Pyrimidinbasen, insbesondere Uracil bilden bei UV-Bestrahlung sogenannte Pyrimidinhydrate, die innerhalb der DNA zu Mutationen führen (Schema 2.1).¹⁸ Sie entstehen



Schema 2.1. Photohydratation am Beispiel des Uracils

durch photochemische Addition von Wasser an die 4,5-Doppelbindung. Wenn Thymin in wässriger Lösung mit Licht von 254 nm photolysiert wird, bildet sich durch eine [2+2]-Cycloaddition das Thymin-Dimer, das bei Bestrahlung in gefrorenem Zustand das Hauptprodukt darstellt (Abb. 2.1).^{18,19} Auch die anderen Pyrimidinbasen reagieren mit sich

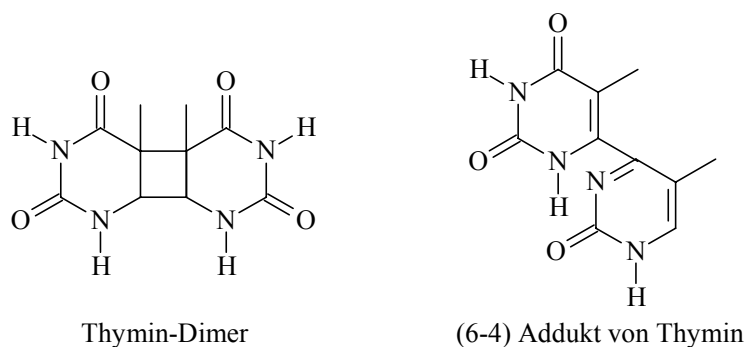


Abbildung 2.1. Photochemische Addukte von Thymin

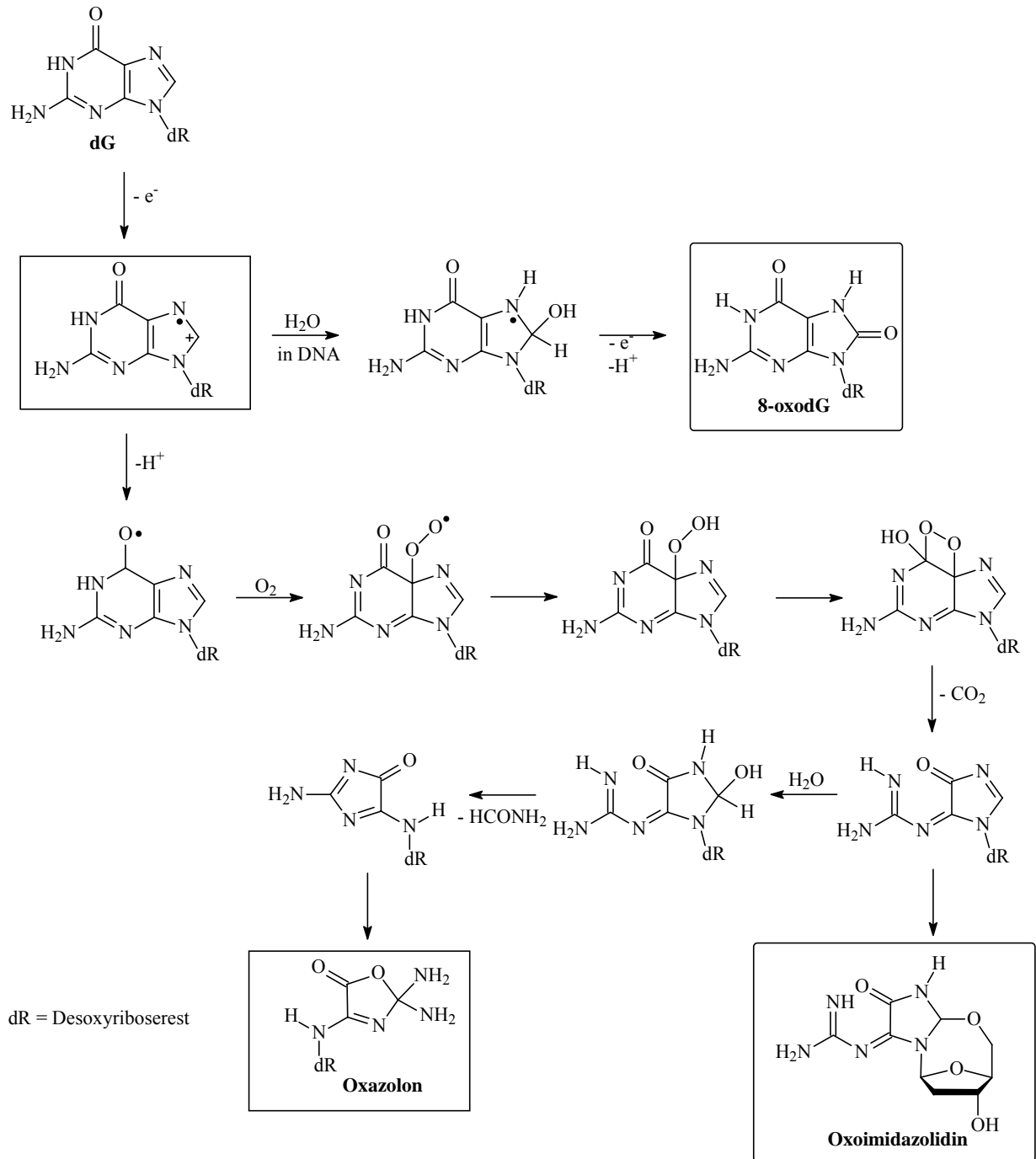
selbst und untereinander in gleicher Weise. Neben den Cyclobutan-Typ-Addukten sind (6-4) Addukte zwischen den Pyrimidinen¹⁹⁻²¹ und Photoaddukte zwischen Purinen und Pyrimidinen²² bekannt. Der Mechanismus der (6-4)-Addukt-Bildung beinhaltet eine [2+2] Photocyclisierung zu einem instabilen Oxetan, das rasch zu dem beobachteten Produkt zerfällt.²³

2.1.3 Photosensibilisierung nach dem Typ-I Mechanismus

Wird nicht die Nukleinbase direkt angeregt, sondern ein exogener oder endogener Sensibilisator, so kann der seine Energie auf die Nukleinbasen übertragen. Organische Photosensibilisatoren gehen durch Absorption eines Photons in den angeregten Zustand unter Spinerhalt (Singulett-Zustand), der aber nur sehr kurzlebig ist (1-100 ns), und gelangen durch Intersystem Crossing unter Spin-Umkehr in den Triplett-Zustand, der in den meisten Fällen eine längere Lebenszeit (μs bis s) hat.¹⁵ Reagiert dieser Triplett-Zustand, der über zwei ungepaarte Elektronen verfügt, mit den Nukleosiden durch Elektronentransfer oder H-Abstraktion, handelt es sich dabei um Typ-I-Sensibilisatoren.²⁴ Unter H-Abstraktion reagieren beispielsweise die Triplett-Zustände von Acetophenon²⁵ oder Benzophenon,²⁶ unter Elektronentransfer Riboflavin und Menadion.²⁷ Da Guanin das niedrigste Oxidationspotential der Nukleinbasen aufweist (1.28 V)²⁸, wird es besonders leicht durch Typ-I-Sensibilatoren oxidiert (Schema 2.2). Das aus dem Elektronentransfer resultierende Guaninradikalkation ist innerhalb der DNA durch die Basenpaarung mit Cytosin zudem besonders stabilisiert.²⁹ Nach Deprotonierung [$\text{pKs (Guaninradikalkation)} = 3.9$]³⁰ erfolgt die Bildung des neutralen Guaninradikals, das nach Addition von molekularem Sauerstoff zu 2,2-Diamino-4-[2-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone (**Oxazolone**)³¹ und 2-(S)-2,5'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-guanidinylliden-2-hydroxy-4-imidazolidin (**Oxoimidazolidin**)³² führt, die somit als typische Produkte von Photo-Typ-I-Reaktionen gelten und als Guanidin-freisetzende Produkte detektiert werden (Abschnitt 2.4.2). Nur bei der Untersuchung von DNA, nicht aber bei der des reinen Nukleosids **dG**, konnten signifikante Ausbeuten an 4,8-Dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-desoxyguanosin (**8-oxodG**) durch Photo-Typ-I-Sensibilatoren erzielt werden. Das beruht darauf, dass innerhalb der DNA das zunächst gebildete Guaninradikalkation so stabilisiert ist, dass neben der Protonabspaltung unter Bildung des neutralen Guaninradikals auch Wasser-Addition unter Bildung von **8-oxodG** stattfindet.³³

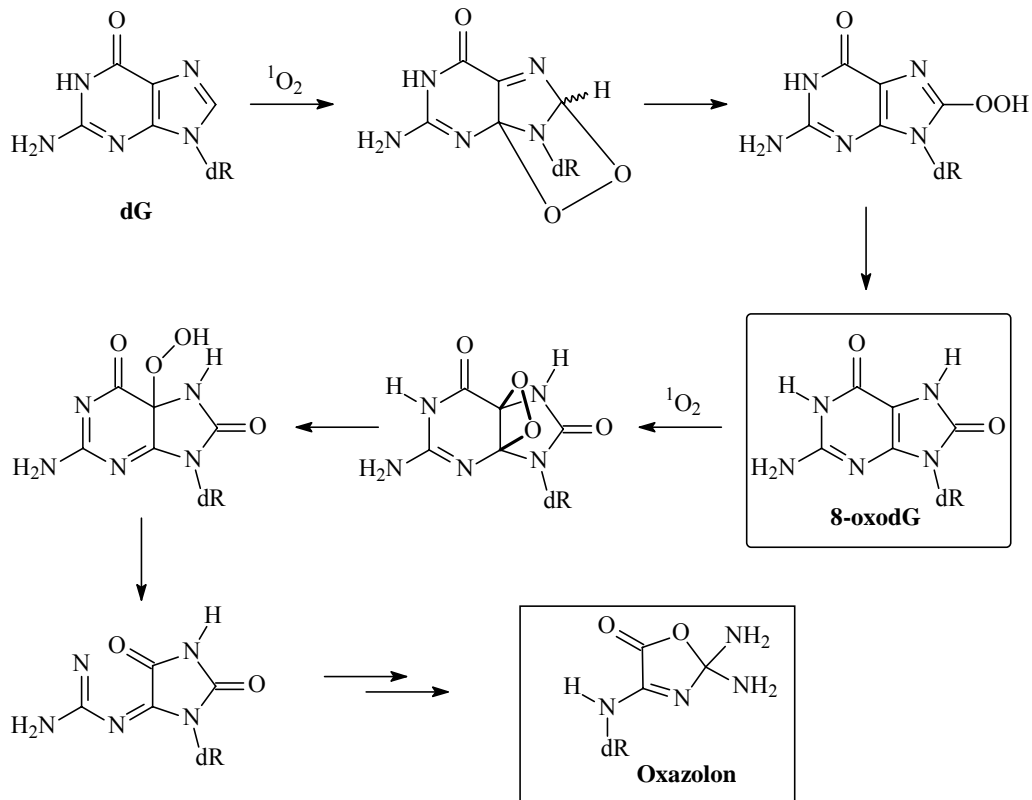
2.1.4 Photosensibilisierung nach dem Typ-II-Mechanismus

Überträgt der angeregte Sensibilisator seine Energie nicht direkt auf das Substrat (z. B. das Nukleosid) sondern auf molekularen Triplett-Sauerstoff, so entsteht elektronisch angeregter Singulett-Sauerstoff. Dieser Energietransfer kann nur dann stattfinden, wenn die Triplett-Energie des Sensibilisators energetisch höher liegt als der Triplett-Zustand des Sauerstoffs (94



Schema 2.2. Oxidationsprodukte von dG durch Typ-I-Photosensibilatoren

kJ mol^{-1}).³⁴ Das ist der Fall bei Metylenblau,³⁵ Bengalrosa³⁶ und auch bei Porphyrin-Derivaten,³⁷ die daher alle vorwiegend als Sauerstoff-Sensibilisatoren reagieren. Man bezeichnet sie auch als Typ-II-Sensibilisatoren.²⁴ Singulett-Sauerstoff stellt eine sehr reaktive Sauerstoff-Spezies dar. Sie reagiert mit Guanin in einer [4+2]-Cycloaddition unter Bildung eines Endoperoxids als Zwischenstufe (Schema 2.3). Durch Reduktion entsteht



Schema 2.3. Oxidationsprodukte von **dG** durch Typ-II-Photosensibilatoren

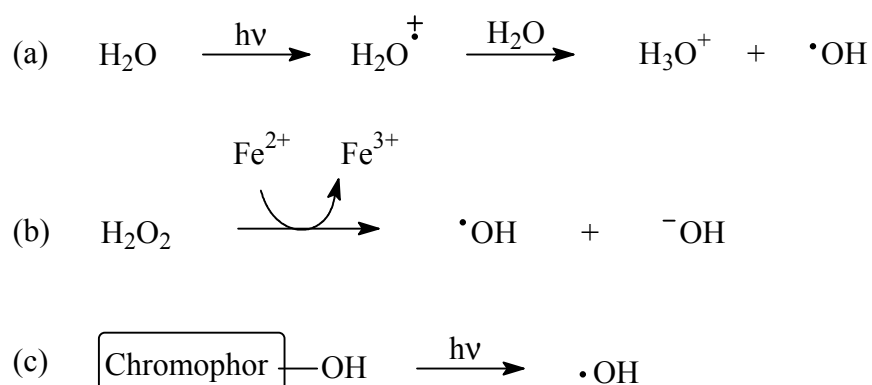
aus diesem **8-oxodG**.³⁸ Es wird berichtet, dass dieses Produkt von Singulett-Sauerstoff weiter umgesetzt werden kann zu **Oxazolone**.³⁹⁻⁴¹ Hierbei wird ein intermediäres Dioxetan gebildet, das dann in einer Kaskade von Prozessen zerfällt.

2.2 DNA-Schäden durch Radikale

Photosensibilisatoren können ihre Energie nicht nur direkt auf die DNA oder auf molekularen Sauerstoff übertragen, sondern können auch unter Freisetzung von Radikalen zerfallen. Radikale treten im Organismus ubiquitär auf, können aber bei unkontrollierter Generierung, induziert beispielsweise durch UV-Strahlung, verheerende Schäden anrichten. Im Folgenden seien die wichtigsten Radikale aufgelistet, die an Schädigungen im Organismus beteiligt sein können. Neben ihrer Reaktivität wird auf die jeweilige Bedeutung und die für photobiologische Untersuchungen angewandten Generierungsmethoden der entsprechenden Radikale näher eingegangen.

2.2.1 Hydroxylradikale

Hydroxylradikale sind die kurzlebigsten und reaktivsten Radikale.⁴² Sie treten im menschlichen Sauerstoffmetabolismus in der Atmungskette auf, bilden sich durch Reduktion von Wasserstoffperoxid,⁴³ das in Zellen generiert wird, aber auch aus Fettsäurehydroperoxiden nach metallkatalytischer oder photochemischer Zersetzung.⁴⁴ Für die Untersuchung der biologischen Effekte der Hydroxylradikale ist es wichtig, diese selektiv zu generieren (Schema 2.4). Die Radiolyse von Wasser stellt nur eine sehr unselektive Methode



Schema 2.4. Methoden der Generierung von Hydroxylradikalen

dar, da die dabei nötige Strahlungsintensität auch zur direkten Zerstörung des zu untersuchenden Materials führt [Schema 2.4(a)]. Die *Fenton*-Reaktion, bei der aus Wasserstoffperoxid durch Elektronenübertragung Hydroxylradikale freigesetzt werden, ist wesentlich milder als die Radiolyse, hat aber das Problem der Gegenwart von Metallionen, die unerwünschte Nebenreaktionen, wie beispielsweise die Komplexbildung von Enzymen, bewirken [Schema 2.4(b)].⁴³ In neuester Zeit ist man dazu übergegangen, Hydroxylradikale über sog. *Photo-Fenton*-Systeme zu generieren [Schema 2.4(c)]. Dabei handelt es sich um Verbindungen, die über einen im UV-Bereich absorbierenden Chromophor verfügen, an den über eine sehr schwache Bindung (N-O oder O-O) die Hydroxylgruppe gebunden ist.⁴⁵⁻⁵¹ Nach Anregung des Chromophors erfolgt intramolekularer Energietransfer, der zur Homolyse der labilen NO- oder OO-Bindung und somit zur Hydroxylradikalfreisetzung führt. In Abbildung 2.2 sind einige Beispiele solcher Reagenzien angegeben.

Die Aggressivität der Hydroxylradikale prägt ihre Reaktivität gegenüber der DNA. Neben den Nukleinbasen, von denen im Gegensatz zu den oben beschriebenen Typ-I und Typ-II photosensibilisierten Reaktionen alle betroffen sind,⁵² wird auch das Zuckergerüst angegriffen

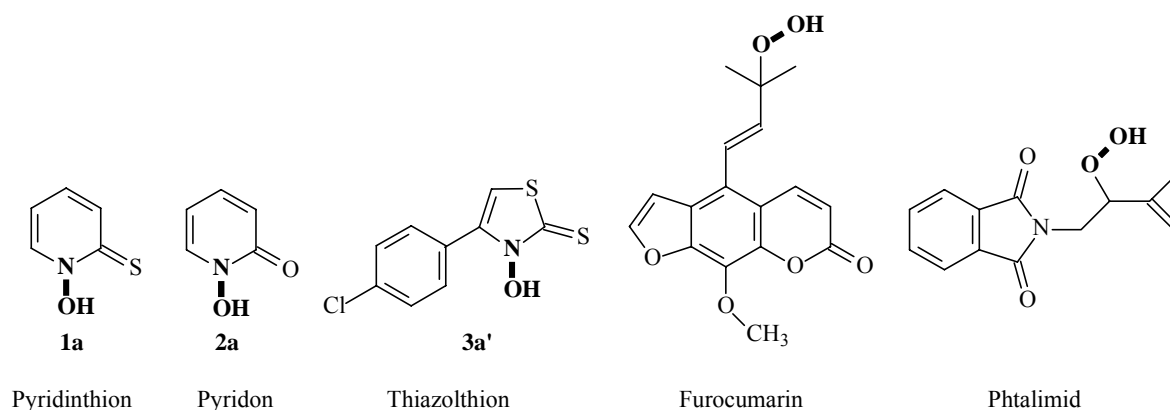
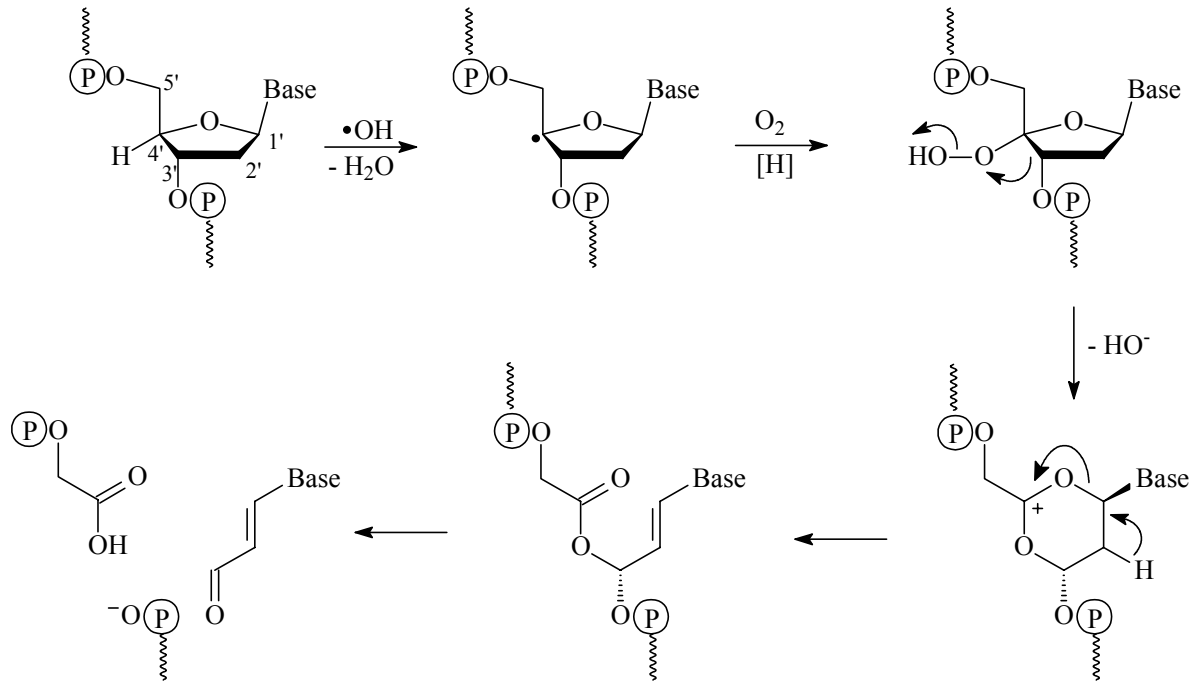


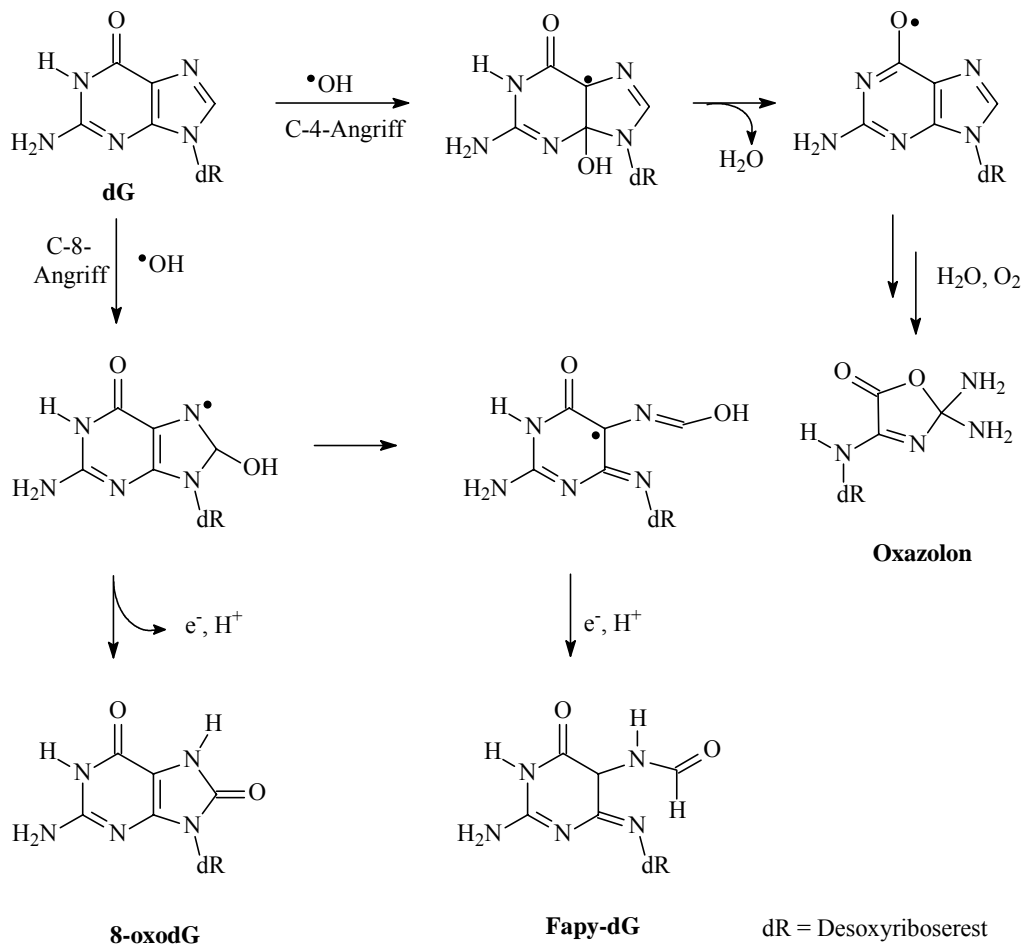
Abbildung 2.2. Beispiele für *Photo-Fenton*-Reagenzien

und zwar durch H-Abstraktionen. Die Desoxyriboseeinheit der DNA verfügt über sieben Wasserstoffatome, die prinzipiell alle abstrahiert werden können. An C-2' und C-5' sind jeweils zwei H-Atome gebunden. Osman et al. haben berechnet, dass die theoretische Abstraktion der Wasserstoffatome an den Positionen C-1' bis C-5', die direkt mit der jeweiligen C-H Bindungsenergie korreliert,⁵³ nur im Fall der an C-2' gebundenen H-Atome aufgrund der größeren Entfernung zum Sauerstoff-Atom energetisch höher liegt.⁵⁴ Markierungsexperimente zeigten jedoch, dass im Falle der superhelikalen DNA Hydroxylradikale zwar alle Wasserstoffatome abstrahieren, aber der Hauptangriff an Positionen C-4' und C-5' erfolgt.⁵⁵ Entscheidend für die Selektivität, die erstaunlich ist in Anbetracht der hochreaktiven und diffusionskontrolliert reagierenden Hydroxylradikale, ist die Zugänglichkeit der Wasserstoffatome innerhalb der DNA.⁵⁶ In Schema 2.5 ist beispielhaft der Zerfallsweg des nach H-4'-Abstraktion entstehenden C-4'-Radikals unter atmosphärischen Bedingungen beschrieben. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff bildet sich ein Hydroperoxid, das über eine Criegee-Umlagerung und anschließende Eliminierungs- und Substitutionsschritte den Bruch der Zucker-Phosphat-Bindung bewirkt, was als Strangbruchbildung bezeichnet wird.⁵⁷

Strangbruchbildung kann nicht nur durch einen direkten Angriff der Hydroxylradikale an der Zuckereinheit erfolgen, sondern auch über Basenschäden vermittelt werden.⁵⁸ Guanin reagiert mit Hydroxylradikalen bevorzugt an Positionen C-4 und C-8, wobei im ersten Fall als Endprodukt **Oxazolone** entsteht, während das C-8-Addukt unter oxidativen Bedingungen zu **8-oxodG** und unter reduktiven Bedingungen zu **Fapy-dG** umgesetzt wird (Schema 2.6). Auch die andere Purinbase Adenin wird bevorzugt an C-8 angegriffen, so dass auch hier vor allem das entsprechende **8-oxodA** beziehungsweise **Fapy-dA** detektiert wird.



Schema 2.5. DNA-Strangbruchbildung durch H-Abstraktion an C-4'



Schema 2.6. Durch Hydroxylradikale erzeugte oxidative Schäden an dG

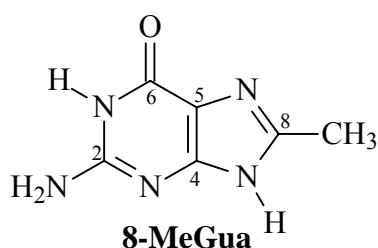
Die Pyrimidinbasen sind mit der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 gegenüber Hydroxylradikalen besonders empfindlich, die an diese Doppelbindung addieren. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff entstehen die entsprechenden Hydroperoxide.⁵⁹

2.2.2 Kohlenstoffradikale

Im normalen Metabolismus werden kohlenstoffzentrierte Radikale kaum in hohen Konzentrationen gebildet, aber unter besonderen pathologischen Bedingungen, wie z. B. beim oxidativen Stress oder bei genetischen Fehlern kann es unter Auftreten erhöhter Konzentrationen an Kohlenstoffradikalen zu einem unkontrollierten Metabolismus von Kohlenhydraten⁶⁰ oder Aminosäuren^{61,62} kommen. Auch die Toxizität einiger Chemikalien, wie der von Tetrachlorkohlenstoff,^{63,64} von Hydrazinderivaten,⁶⁵ von Ethanol,⁶⁶ von Diazochinonen⁶⁷ und organischer Hydroperoxide⁶⁸ beruht auf den bei deren metabolischen Abbau jeweils freigesetzten Kohlenstoffradikalen.

Alkylradikale sind zwar weniger reaktiv als Hydroxylradikale, können aber wie diese ebenfalls Wasserstoffatome abstrahieren und an Doppelbindungen addieren, was zur Strangbruchbildung oder DNA-Basen Alkylierung führt. Purin-Basen werden vorwiegend an Position C-8 angegriffen.^{69,70} Im Falle von Guanin wurde auch in geringen Mengen N7-Alkylierung beobachtet.⁵⁸ Mit Pyrimidinbasen reagieren Kohlenstoffradikale vorwiegend durch Addition an die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6.⁵⁸

Für Kohlenstoffradikale wurden modellhaft Methylradikale untersucht, die vorwiegend zur Bildung von **8-MeGua** führten.^{71,72} Dieses Addukt wurde sogar in vivo nach

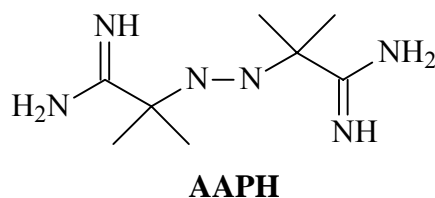


Applikation von *tert*-Butoxylhydroperoxid beobachtet, das nach Reduktion mit Fe(II) zu den gewünschten Methylradikalen zerfällt.⁷³ Als weitere Quelle wurde DMSO eingesetzt, das nach Reaktion mit Hydroxylradikalen ebenfalls Methylradikale generiert.^{58,74}

2.2.3 Peroxylradikale

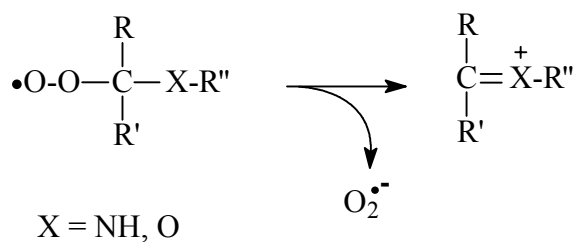
Peroxylradikale sind besonders relevant für die DNA-Schädigung, da sie in den Zellen aus Fettsäurehydroperoxiden hervorgehen, die im Organismus zwar bedeutend sind für den Aufbau von wichtigen Signalverbindungen, aber bei einer Überproduktion unter dem Einfluss von oxidativem Stress verheerend sein können. Die Bildung von Peroxylradikalen aus Hydroperoxiden wird beispielsweise durch die Katalyse von verschiedenen Peroxidasen bewirkt,⁷⁵⁻⁷⁷ sogar in der Rattenleber konnte ein entsprechender Zerfall beobachtet werden.⁷⁸ Im übrigen werden auch aus Kohlenstoffradikalen bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff Peroxylradikale generiert, auf die manche Krankheiten,⁷⁹ selbst das Altern zurückgeführt werden.⁸⁰ Konventionell werden dementsprechend Peroxylradikale in wässrigem Medium durch die *Fenton*-Reaktion dargestellt. Dabei wird Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen reduziert, die ihrerseits mit Substraten durch H-Abstraktion oder Addition an CC-Doppelbindungen zu Kohlenstoffradikalen reagieren, die sodann in Gegenwart von molekularem Sauerstoff zu Peroxylradikalen umgesetzt werden.^{81,82} Auch angeregte Ketone, und Azoverbindungen wurden als Vorläufer für Peroxylradikale eingesetzt.⁸³

Peroxylradikale, generiert aus der Azoverbindung **AAPH**, führten zu Strangbrüchen und



oxidierten alle DNA-Basen, wobei auch **8-oxodG** gebildet wurde.⁸⁴ Das Schadensprofil kann man aber nicht für alle Peroxylradikal-generierende-Systeme verallgemeinern.^{83,85,86}

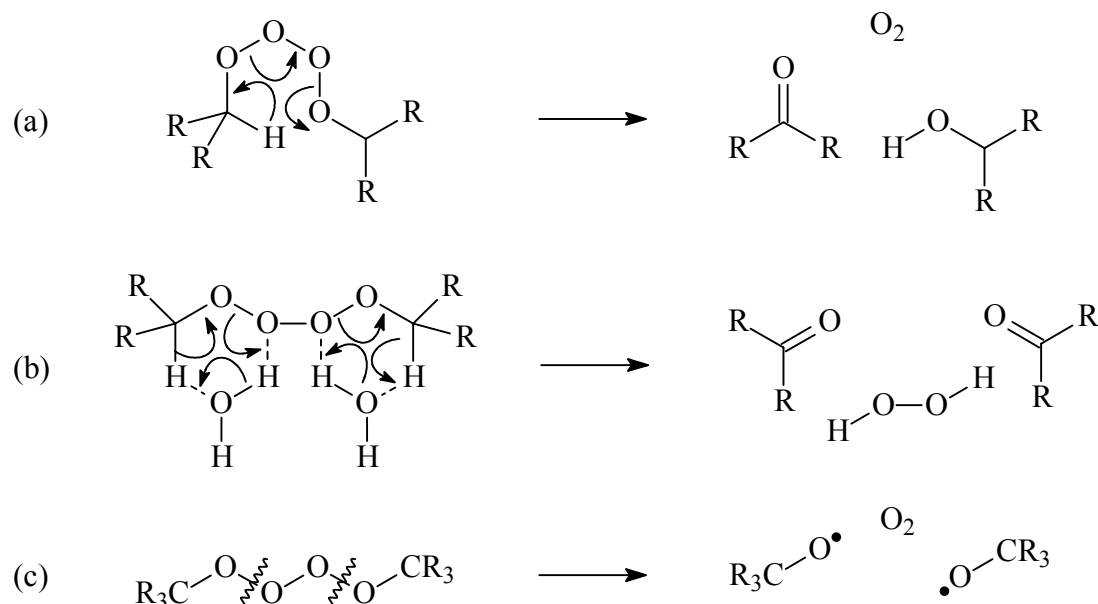
Peroxylradikale zerfallen monomolekular unter Freisetzung von Superoxidradikalanionen, wenn die resultierende positive Ladung am Kohlenstoffatom stabilisiert werden kann (Schema 2.7).⁸⁷



Schema 2.7. Monomolekularer Zerfall von Peroxylradikalen

Ansonsten kombinieren sie aufgrund ihrer relativ langen Lebensdauer in einer bimolekularen Reaktion zu einem Tetraoxid, mit dem sie bei tiefer Temperatur im Gleichgewicht stehen.⁸⁸

Für das Tetraoxid ergeben sich drei prinzipielle Zerfallswege (Schema 2.8). Die wohl



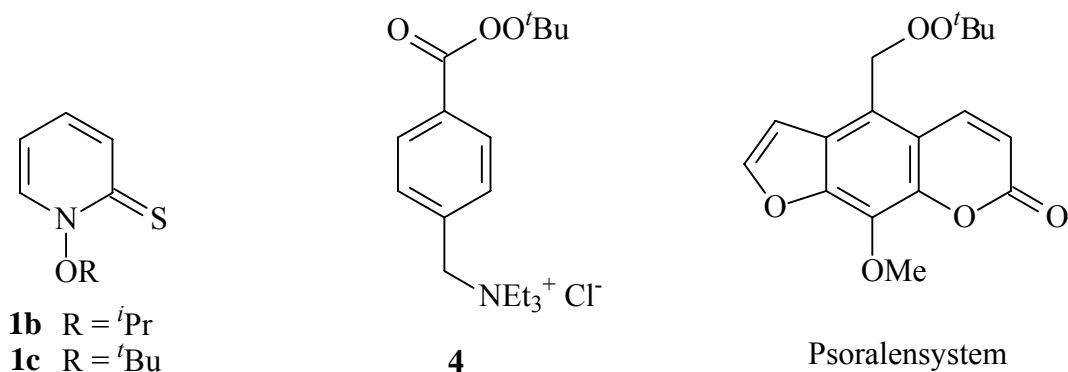
Schema 2.8. Zerfallswege der Peroxylradikale über das Tetraoxid

bekannteste ist die Russell-Reaktion, bei der das aus zwei primären oder sekundären Peroxylradikalen gebildete Tetraoxid in einer electrocyclischen Reaktion ohne Beteiligung freier Radikale als Zwischenstufe in molekularen Sauerstoff, ein Keton und einen Alkohol zerfällt [Schema 2.8 (a)].⁸⁹ Dabei entsteht zur Spinerhaltung entweder das Keton im Triplett-Zustand und der Sauerstoff im Singulett-Zustand oder umgekehrt. Ein weiterer Zerfallsprozess führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid und zwei Carbonylverbindungen, wobei als Übergangszustand zwei Sechsringe unter Beteiligung von zwei Wassermolekülen denkbar ist [Schema 2.8 (b)].⁹⁰ Beim Hydroxymethylperoxyradikal ist dieser Weg die Hauptreaktion.⁹⁰ Schließlich ist der Zerfall des Tetraoxides in molekularen Sauerstoff und zwei Oxyradikale möglich [Schema 2.8 (c)].⁹¹

2.2.4 Alkoxyradikale

Wie die Peroxylradikale gehen auch die Alkoxyradikale aus Fettsäurehydroperoxiden hervor. Sowohl photochemisch als auch durch Beteiligung von Metallionen (*Fenton*-Reaktion) zerfallen diese unter Freisetzung von Alkoxyradikalen.⁴⁴ Als Modell für die Fettsäure

abgeleiteten Alkoxyradikale wurde das *tert*-Butoxyradikal untersucht. Es wurde generiert aus *tert*-Butylhydroperoxid durch *Fenton*-Reaktion, aber vor allem über *Photo-Fenton*-Reagenzien, von denen die wichtigsten in Schema 2.9 aufgeführt sind.⁹²⁻⁹⁶ Den Perester **4**

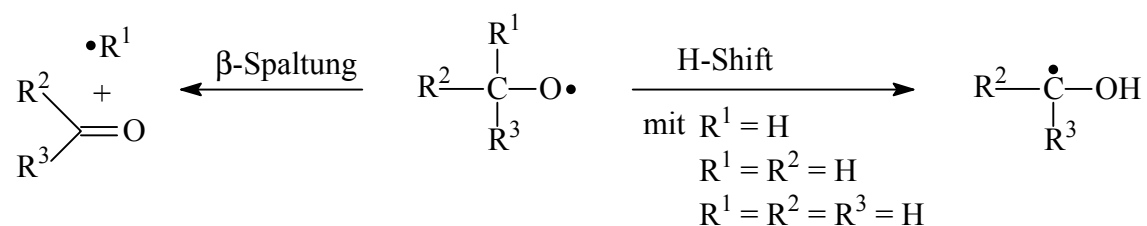


Schema 2.9. Beispiele für *Photo-Fenton*-Reagenzien als Vorläufer für Alkoxyradikale

zeichnete insbesondere seine DNA-bindende Eigenschaft aus,^{92,93} das Psoralensystem die Fähigkeit zwischen die DNA-Basen zu interkalieren.⁹⁴

Sowohl Strangbruchbildung als auch Oxidation der DNA-Base Guanin zu Guanidin-freisetzenden Produkten wurde den *tert*-Butoxyradikalen zugeschrieben.⁹²

Weiterhin ist bekannt, dass Alkoxyradikale unter 1,2-H-Shift (besonders primäre oder sekundäre Alkoxyradikale) oder β -Spaltung (tertiäre Alkoxyradikale) zu Folgeradikalen zerfallen können (Schema 2.10).⁸²

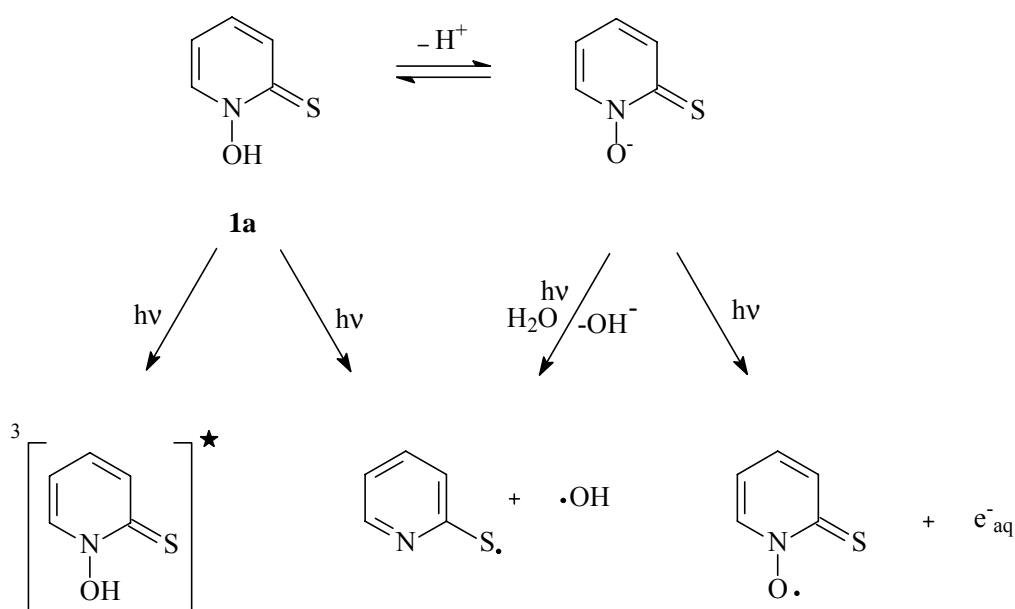


Schema 2.10. Zerfallsmöglichkeiten von Alkoxyradikalen

2.3 Photo-Fenton-Reagenzien: Grenzen ihrer Anwendung für photobiologische Studien

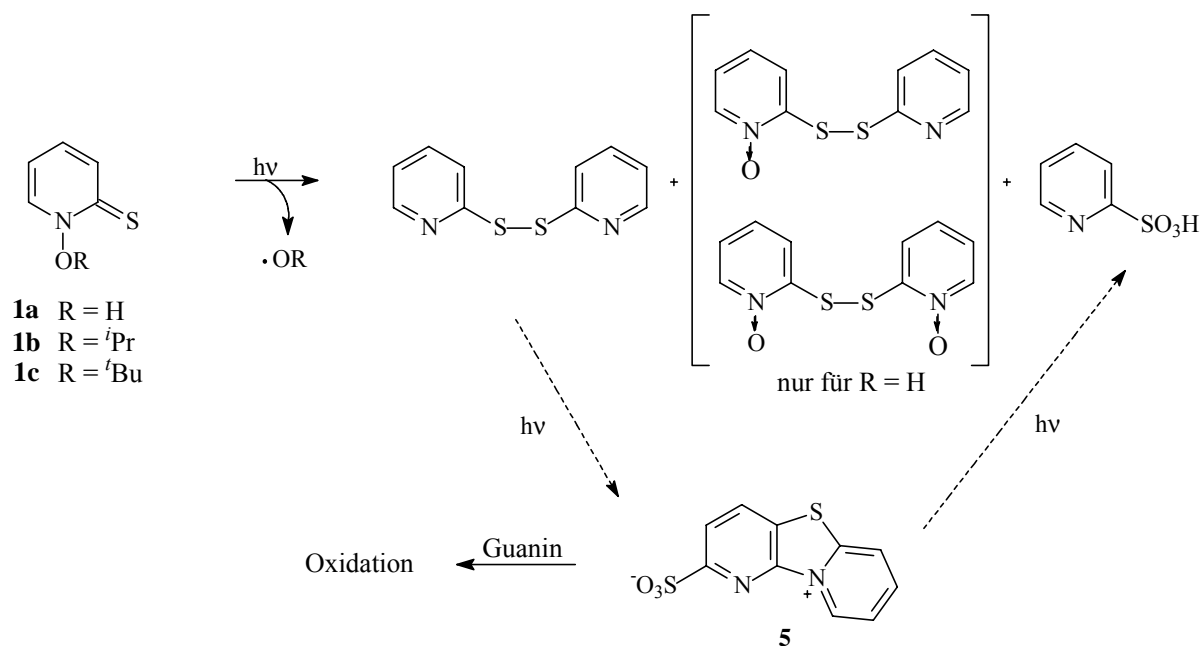
2.3.1 Das Pyridinthionsystem: Probleme durch Photoprodukte

Das Pyridinthionsystem wurde als photochemischer Vorläufer für synthetische Zwecke aber auch für photobiologische Zielrichtungen eingesetzt.^{45,48} Besonders für die Untersuchung der schädigenden Effekte von Hydroxylradikalen auf DNA fand das Pyridinthion **1a** Anwendung, da es die Freisetzung dieser Radikale unter recht milden Bedingungen (350 nm) ermöglichte.⁴⁸ Laserblitz-Experimente zeigten jedoch auf, dass das Pyridinthion **1a** weit davon entfernt ist, eine saubere und spezifische Quelle für Hydroxylradikale zu sein (Schema 2.11).⁹⁷



Schema 2.11. Primäre Photoprozesse des Pyridinthions **1a**

Das Pyridinthion **1a** hat einen pKs-Wert von 4.67 und liegt deshalb in neutralem wässrigem Medium vorwiegend in der deprotonierten Form vor. In dieser Form kann es leicht photoionisiert werden, wobei mit relativ hoher Effizienz nach photochemischer Anregung hydratisierte Elektronen emittiert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das bei der Photolyse des Pyridinthions intermediär entstehende Betain **5** als Elektronenakzeptor wirkt und somit durch Typ-I-Photoprozesse Oxidation von Guanin in **dG** und DNA hervorrufen kann (Schema 2.12).⁹⁵ Dieser Effekt kommt im Falle des Hydroxyderivats **1a**



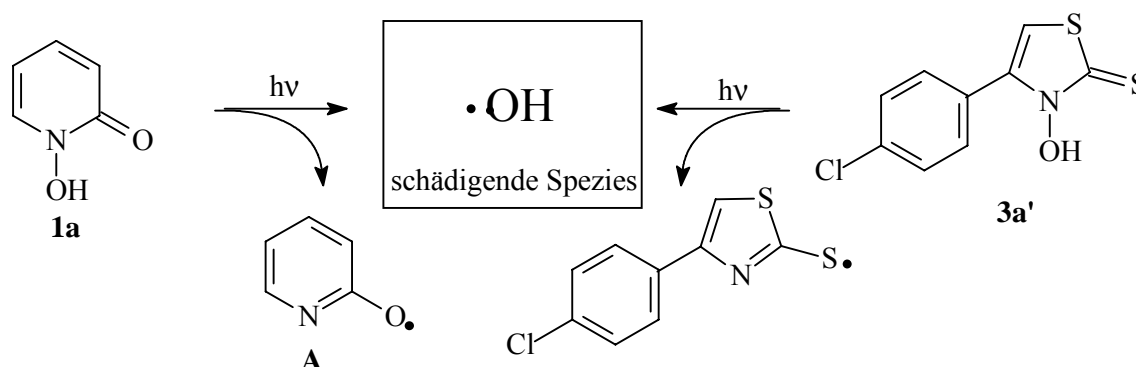
Schema 2.12. Photoprodukte bei der Bestrahlung der Pyridinethione **1a-c**

nicht zum Tragen, da die bei seiner Photolyse ebenfalls gebildeten Photoprodukte 2,2'-Dipyridindisulfid-*N*-oxid und insbesondere 2,2'-Dipyridindisulfid-*N-N'*-dioxid als Quencher wirken und somit die Photooxidation durch das Betain **5** inhibieren. Das dem Pyridinethion **1a** analoge *tert*-Butoxyderivat **1c** hingegen, das mit der Zielrichtung entwickelt wurde, die schädigenden Effekte von Alkoxyradikalen auszuloten, erwies sich zwar als photochemische *tert*-Butoxyradikalquelle, die von dem Betain **5** ausgehenden Photo-Typ-I-Prozesse dominierten aber deutlich die Effekte der *tert*-Butoxyradikale insbesondere bei Langzeitphotolyse, da im Falle der Alkoxyderivate des Pyridinethions die Inhibitoren 2,2'-Dipyridindisulfid-*N*-oxid und 2,2'-Dipyridindisulfid-*N-N'*-dioxid nicht gebildet werden. Zeitabhängige Studien demonstrierten, dass die Guanin-Oxidation bei der Bestrahlung des *tert*-Butoxypyridinethions **1c** erst nach dessen Zersetzung, also durch die Photoprodukte verstärkt induziert wurden. Für das Isopropoxyderivat wurde die gleiche Beobachtung gemacht.⁹⁵ Diese komplexen Photoprozesse, die bei der Photolyse der Pyridinethione **1a-c** die Radikalfreisetzung begleiten, schließen eine spezifische Untersuchung der Oxyradikale als schädigende Spezies aus.

2.3.2 Das Pyridon- und Thiazolthionsystem: spezifische Radikalvorläufer

Sowohl das Pyridon- als auch das Thiazolthionsystem erwiesen sich als photochemische Oxyradikal-Quellen. Thiazolthione zeigten sich unter Ausnutzung dieser Eigenschaft als gute

Vorstufen für den Aufbau von substituierten Tetrahydrofuranen und Pyranen.⁹⁸ Das Pyridon **2a** wurde intensiv über Laserblitz-Studien untersucht, in denen gezeigt werden konnte, dass im Gegensatz zu dem Zerfallsprozess des Pyridinthions **1a** die homolytische NO-Spaltung der einzige Primär-Photoprozess ist, den dieses *Photo-Fenton*-Reagenz durchläuft (Schema 2.13).⁹⁹ Dabei entsteht neben dem Hydroxylradikal das Pyridyloxyradikal **A**, von dem nicht



Schema 2.13. Pyridon und Thiazolthion als saubere photochemische Radikalquellen

zu erwarten ist, dass es biologische Schäden hervorrufen kann. Dies konnte durch photobiologische Studien mit **dG** und DNA bestätigt werden, die den bei Bestrahlung freigesetzten Hydroxylradikalen die beobachteten Schäden zuordneten und Photoprodukte als schädigende Spezies sowie Sensibilisierungsprozesse ausschlossen.⁵⁰ Auch für das Thiazolthion **3a'** ergaben photobiologische Untersuchungen, dass es sich hierbei um eine saubere photochemische Hydroxylradikalquelle handelt, bei der andere Photoprozesse neben dem der Radikalgenerierung keine Rolle für das Schadensprofil dieser Verbindung spielen.⁵¹

2.4 Methoden der Detektion von DNA-Schäden

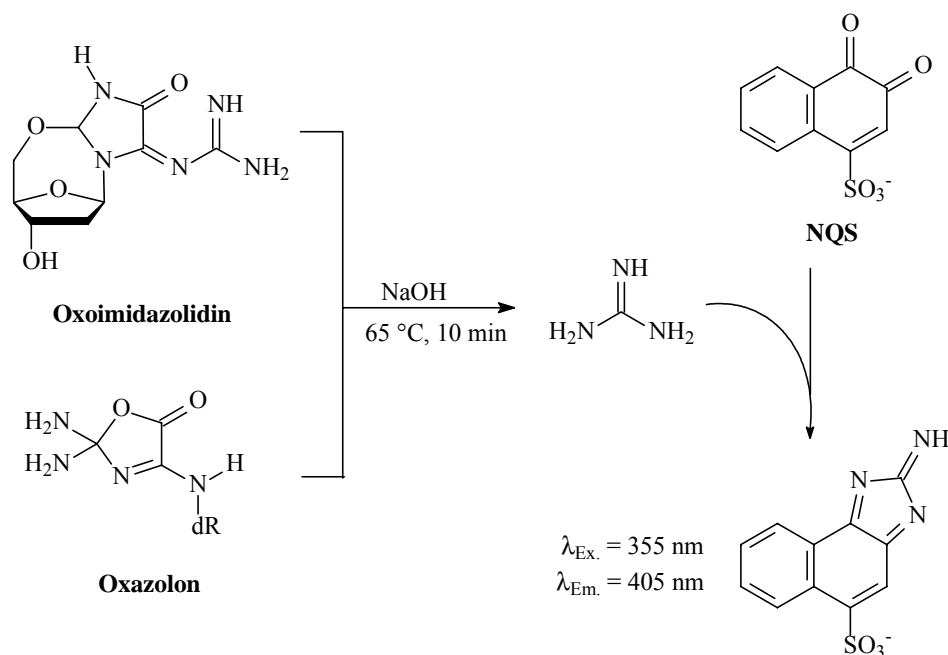
2.4.1 Detektion von Strangbrüchen in superhelikaler pBR 322 DNA

Einzelstrangbrüche können mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden.¹⁰⁰ Man verwendet dafür superhelicale pBR 322 DNA, die sich nach Einzelstrangbruch in die offenkettige Form umwandeln kann. In dieser Form ist die DNA weniger kompakt als in der superhelikalen und läuft deshalb im von außen angelegten elektrischen Feld langsamer durch das Agarosegel. Die entstandenen DNA-Spots werden durch Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden, in die DNA interkalierenden Farbstoff sichtbar gemacht. Das Fluoreszenzbild wird photographiert, und durch Messung der Intensität der Fluoreszenz-

strahlung eines jeden Spots kann das Verhältnis zwischen superhelikaler und offen-circularer DNA quantifiziert werden.

2.4.2 Detektion oxidativer Schäden an dG

Für die Analytik oxidativer Schäden an Guanin in **dG** wird die HPLC angewendet. Zur Untersuchung der Schäden an dem Nucleosid **dG** wird der Umsatz an **dG** über einen UV-Detektor (254 nm) bestimmt. Die Quantifizierung von **8-oxodG** erfolgt über eine elektrochemische Detektion (450 mV).¹⁰¹ Bei der Bestimmung von **Oxazol** und **Oxoimidazolidin** nutzt man deren Eigenschaft aus, in alkalischer wässriger Lösung (pH 13) mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 3$ min bei 65 °C quantitativ Guanidin freizusetzen.¹⁰² Guanidin wird dann mit 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat (**NQS**) zu einer fluoreszierenden Verbindung umgesetzt, die HPL-chromatographisch durch einen Fluoreszenzdetektor quantifiziert wird (Schema 2.14).¹⁰³



Schema 2.14. Indirekte Bestimmung von **Oxazol** und **Oxoimidazolidin** durch Quantifizierung von nach alkalischer Hydrolyse freigesetztem Guanidin mittels **NQS**

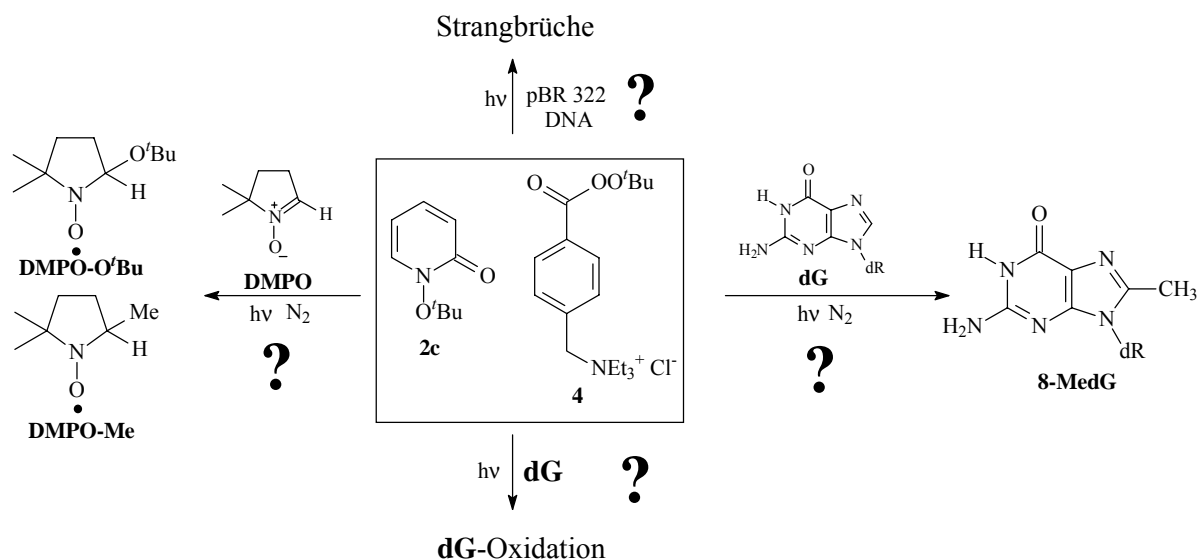
3 Kapitel 1: Pyridon **2c** im Vergleich mit Perester **4** - Photooxidative Schäden an dG und DNA durch *tert*-Butoxylradikale?

3.1 Problemstellung

Es gibt eine Vielzahl von reaktiven Radikalen, die im biologischen System beim Metabolismus exogener Verbindungen, durch UV-Strahlung oder durch oxidativen Stress generiert werden. Von diesen Spezies ist den Hydroxylradikalen ein besonderes Interesse entgegengekommen, da sie die reaktivsten Radikale darstellen.⁴² Für photobiologische Studien dieser Radikale ist man auf deren saubere, selektive aber auch schonende Generierung angewiesen. Bedingt durch die Präsenz Hydroxylradikal-induzierter DNA- und Zellmembran Schäden im Zuge der immer intensiveren terrestrischen UV-Strahlung und durch die hohen Anforderungen, die an das Radikal-generierende System für photobiologischen Studien gestellt werden, ist eine Vielzahl von *Photo-Fenton*-Reagenzien entwickelt worden, die auf sehr milde Weise Hydroxylradikale freisetzen. Neben den Hydroxylradikalen sind aber auch andere im Metabolismus gebildete Oxyradikale für die DNA Schädigung relevant. Die diesbezügliche Untersuchung von Alkoxyradikalen ist noch im Anfang begriffen und die *Photo-Fenton*-Reagenzien, die man zu deren Generierung weiterentwickelt hat, konnten bis auf den Perester **4** nur unzulänglich überzeugen. Insbesondere das Pyridinthion-System **1a**, das als Parade-Reagenz für die Freisetzung von Hydroxylradikalen sowohl für synthetische als auch für photobiologische Zwecke galt,^{45,48} erwies sich in den Pyridinthionen **1b** und **1c** als ungeeignet zur selektiven Untersuchung von Alkoxyradikalen.⁹⁵

Im Gegensatz zu dem Pyridinthion **1a** stellte sich das Pyridon **2a** als saubere photochemische Quelle für Hydroxylradikale heraus.⁵⁰ Es sollte deshalb der vorteilhafte Pyridon-Chromophor ausgenutzt werden, um nach entsprechender Derivatisierung des Pyridons **1a** eine selektive Quelle für *tert*-Butoxylradikale zu entwickeln und sie mit dem Schadensprofil der bereits etablierten Radikalquelle **4** zu vergleichen.

Die Generierung von *tert*-Butoxylradikalen aus Pyridon **2c**, sollte unter Anwendung von **DMPO** als Spin-Trap mit anschließender EPR-Spektroskopie nachgewiesen und durch die Aufklärung der bei der Bestrahlung gebildeten Photoprodukte weiter bestätigt werden, da letztere einen Hinweis darauf geben, ob die photochemische Zersetzung dieser Verbindung über einen NO-Bindungsbruch verläuft (Schema 3.1). Bei den EPR-Studien sollten zur



Schema 3.1. Untersuchung der *tert*-Butoxylradikalquelle **2c** und **4**

besseren Simulierung der Experimente mit biologischem Material Wasser als Medium und möglichst geringe Konzentrationen an Substrat **DMPO** eingesetzt werden. Das ist besonders relevant, da bekannt ist, dass *tert*-Butoxylradikale in wässrigem Lösungsmittel in Methylradikale zerfallen, die ihrerseits auch als schädigende Spezies in Frage kommen.⁸² Die EPR-Experimente sollten Antwort geben, ob die Methylradikale überhaupt in bedeutenden Konzentrationen von **DMPO** abgefangen werden können.

Falls nachgewiesen werden kann, dass das Pyridon **2c** durch photochemisch induzierten NO-Bindungsbruch *tert*-Butoxylradikale freisetzt, sollten dessen Reaktivität gegenüber **dG** (Basenoxidation) und pBR 322 DNA (Strangbruchbildung) untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk sollte darauf gerichtet sein, ob die jeweiligen oxidativen Schäden auf die bei der Bestrahlung generierten Radikale zurückzuführen sind, was durch Anwendung von Radikalfängern überprüft werden sollte, und ob die bei der Bestrahlung gebildeten Photoprodukte durch Sensibilisierung an der Vermittlung oxidativer Schäden durch das Pyridon **2c** beteiligt sind. Letzteres sollte durch detaillierte zeitabhängige Studien geprüft werden, die im positiven Fall keine oxidative Schadensbildung sowohl an pBR 322 DNA als auch an **dG** nach vollständigem photolytischen Verbrauch der Radikalquelle ergeben sollte. Zur Untersuchung, ob auch Methylradikale an der Basenschädigung beteiligt sind, sollte die Bildung von **8-MedG** bei Bestrahlung unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff überprüft werden.

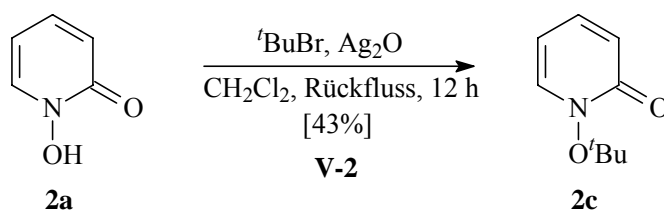
Die Reaktivität des Pyridons **2c** sowohl gegenüber **DMPO** als auch gegenüber **dG** sollte mit der bereits etablierten *tert*-Butoxylradikalquelle **4** verglichen werden. Damit sollte es

ermöglicht werden, ein allgemeines Reaktions- und DNA-Schadensprofil von über *Photo-Fenton*-Reagenzien generierten *tert*-Butoxylradikalen zu entwickeln.

3.2 Ergebnisse

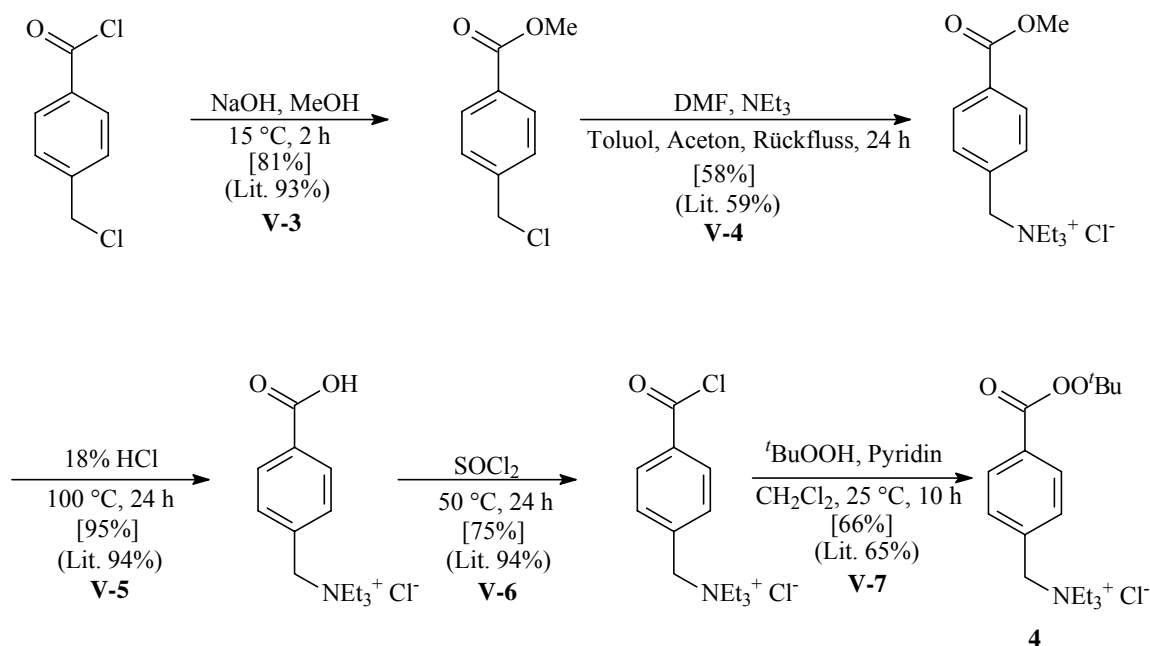
3.2.1 Synthese von Pyridon **2c** und Perester **4**

Das *tert*-Butoxyderivat des Pyridons **2a**, das in dieser Arbeit als photochemische *tert*-Butoxylradikalquelle etabliert werden sollte, wurde ausgehend von der käuflich erhältlichen Hydroxamsäure **2a** durch Alkylierung der Hydroxylgruppe dargestellt. Als Elektrophil wurde *tert*-Butylbromid und zur Unterstützung der dabei ablaufenden S_N1-Reaktion Silberoxid als Katalysator eingesetzt. Das *tert*-Butoxypyridon **2c** wurde auf diese Weise in einer Ausbeute von 43% hergestellt (Schema 3.2, **V-2**).



Schema 3.2. Synthese des *Photo-Fenton*-Reagenzes Pyridon **2c**

Der Perester **4** wurde als vergleichendes System ebenfalls synthetisiert. Die fünfstufige Syntheseroute ist in Schema 3.3 aufgeführt (**V-3** bis **V-7**).^{104,105}



Schema 3.3. Synthese des Peresters **4**

3.2.2 Photochemischer Zerfall von Pyridon **2c**

Nach erfolgreicher Synthese des *tert*-Butoxypyridons **2c** wurde sein Absorptionsverhalten überprüft. Es zeigt ein Absorptionsmaximum bei 300 nm [$\lg \epsilon = 3.70$, (Abb. 3.1)]. Die

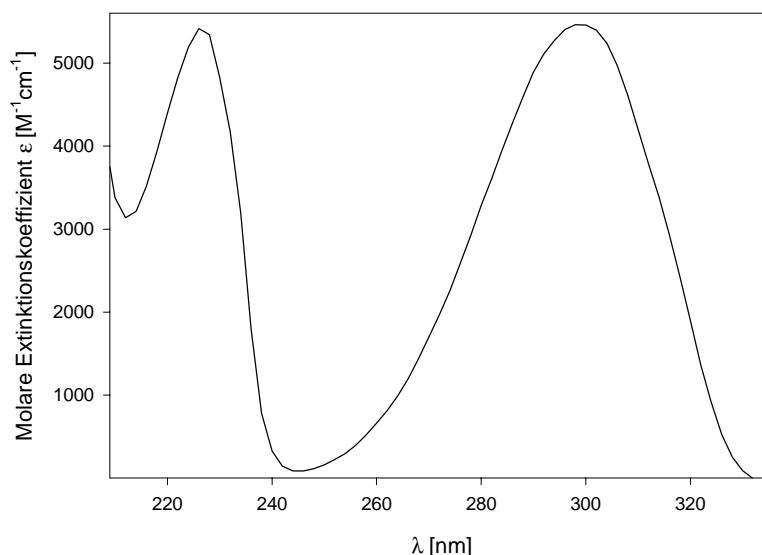


Abbildung 3.1. UV-Spektrum von *tert*-Butoxypyridon **2c**

Photolysen dieser Verbindung wurden deshalb bei 300 nm im Rayonet-Photoreaktor oder bei 312 nm unter einer Blacklightlampe durchgeführt.

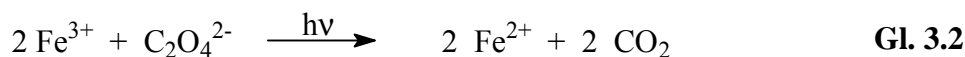
Zur Untersuchung der Photoreaktivität des Hydroxamsäureesters **2c** wurde die Quantenausbeute seines Zerfalls Φ_{dec} bestimmt, das heißt, es wurde festgestellt, ob und wie effizient dieses *Photo-Fenton*-Reagenz photochemisch zersetzt wird.

Die allgemeine Definition der Quantenausbeute ist in Gl. 3.1 gegeben.¹⁰⁶ Sie ist ein Maß für

$$\Phi_{\text{dec}} = \frac{\text{Anzahl der umgesetzten Moleküle}}{\text{Anzahl der absorbierten Photonen}} \quad \text{Gl. 3.1}$$

die Effizienz der lichtinduzierten Zersetzung. Der Umsatz an Pyridon **2c** durch die Photolyse wurde mittels HPLC und UV-Detektion bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass bei der Bestimmung der Quantenausbeute der Umsatz kleiner 10% war, damit ein Einfluss der bei der Bestrahlung gebildeten Photoprodukte ausgeschlossen werden konnte. Zur Messung des Photonenflusses der Bestrahlungsquelle und somit der Anzahl der vom Pyridon **2c** absorbierten Photonen wurde die Ferrioxalat-Aktinometrie angewandt.¹⁰⁷ Grundlage dieser Messmethode ist die photochemisch induzierte Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ (Gl.

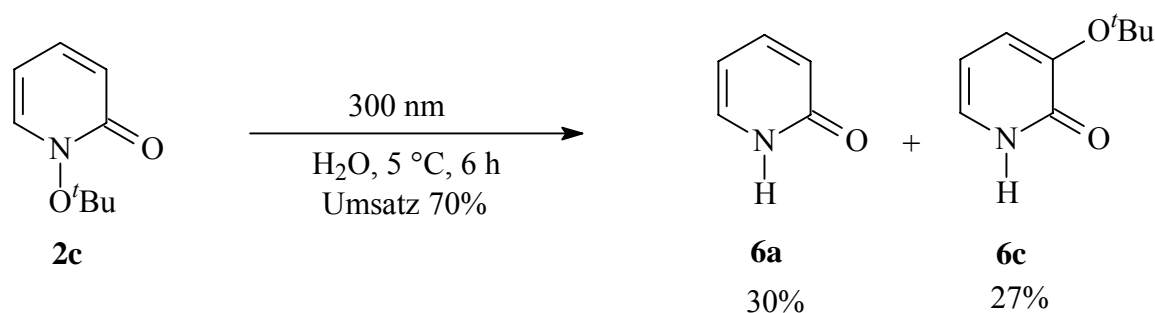
3.2). Das gebildete Fe^{2+} wurde nach Zugabe von Phenanthrolin als Eisen(II)-Phenanthrolin-



Komplex UV-spektrometrisch quantifiziert.¹⁰⁷

Es konnte gezeigt werden, dass das Pyridon **2c** photochemisch zersetzt wird. Die über die Ferrioxalat-Aktinometrie bestimmte Quantenausbeute seines Zerfalls betrug 17% (**V-12**).

Als Produkte der photolytischen Zersetzung in wässriger Lösung wurden 2-Pyridon **6a** (30%) und 3-*tert*-Butoxypyridon **6c** (27%) isoliert (Schema 3.4, **V-13**). Produkt **6a** ist literatur-



Schema 3.4. Produkte bei der Photolyse des Pyridons **2c**.

bekannt,⁹⁹ während Pyridon **6c** durch sein Massenspektrum und über NMR-spektroskopische Methoden eindeutig charakterisiert werden konnte. Das Kopplungsmuster im ^1H -NMR-Spektrum belegte, dass im Pyridon-System die drei aromatischen Wasserstoffatome an drei aufeinanderfolgenden C-Atomen gebunden sind. Durch die HMBC-Methode konnte die Struktur schließlich definitiv aufgeklärt werden, da das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe C-2' sowohl zu H-4' als auch zu H-6' eine starke J^3 -Kopplung aufwies, während eine Kopplung zu H-5' nicht beobachtbar war (Abb. 3.2).

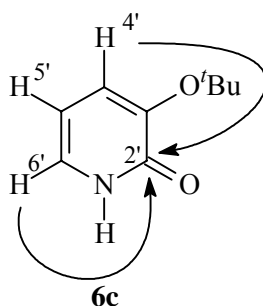


Abbildung 3.2. HMBC-Kopplungen zu C-2' in Photoprodukt **6c**

3.2.3 Photochemische Radikalfreisetzung von Pyridon **2c**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Pyridon **2c** photolabil ist, wurde untersucht, ob bei seiner photochemischen Zersetzung *tert*-Butoxylradikale freigesetzt werden. Alkoxyradikale sind kurzlebige Radikale und können in Lösung nicht unmittelbar detektiert werden. Deshalb wurden Abfangreaktionen mit der Spinsonde 5,5'-Dimethylpyrrolin-*N*-oxid (**DMPO**) durchgeführt. Allgemein entstehen durch Addition radikalischer Spezies an **DMPO** stabile Nitroxylradikale, die mittels EPR-Spektroskopie erfasst werden können. In der Literatur sind eine Vielzahl solcher Addukte und deren EPR-Spektren beschrieben und diskutiert worden.^{108,109} Anhand der Kopplungskonstanten im EPR-Spektrum kann auf die jeweils addierte Spezies geschlossen werden.

Bei der Photolyse des Pyridons **2c** in Gegenwart von **DMPO** wurde in Benzol ein **DMPO**-Addukt gefunden, dessen Kopplungskonstanten mit den in der Literatur für *tert*-Butoxylradikaladdukte zitierten Werten übereinstimmten (Abb. 3.3, **V-14**).^{96,110,111} Bei der

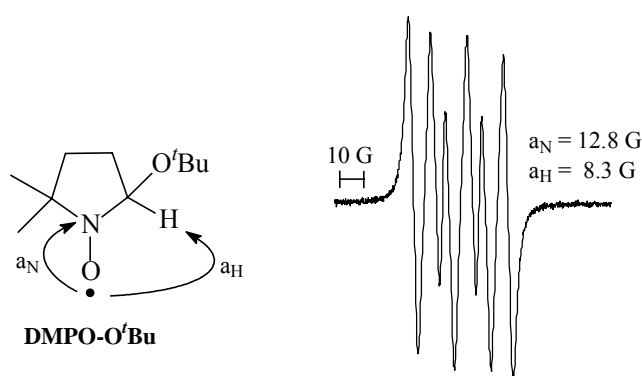


Abbildung 3.3. EPR-Spektrum von **DMPO** nach Bestrahlung (300 nm, 10 °C, 10 min) in Gegenwart von Pyridon **2c** in Benzol.

photolytische Zersetzung des Pyridons **2c** findet also ein NO-Bindungsbruch statt, unter Freisetzung der *tert*-Butoxylradikale.

Da Reaktionen mit biologischem Material zur besseren Simulierung physiologischer Bedingungen im allgemeinen in wässrigem Medium durchgeführt werden, wurde die Photolyse des Pyridons **2c** auch in Wasser EPR-spektroskopisch untersucht. In Gegenwart von 90 mM an **DMPO** und unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff wurde neben dem *tert*-Butoxyladdukt (**DMPO-O'Bu**) auch das **DMPO**-Addukt des Methylradikals (**DMPO-Me**) im EPR-Spektrum identifiziert, wobei ersteres das Hauptaddukt darstellte (Abb. 3.4, **V-15**). Auch

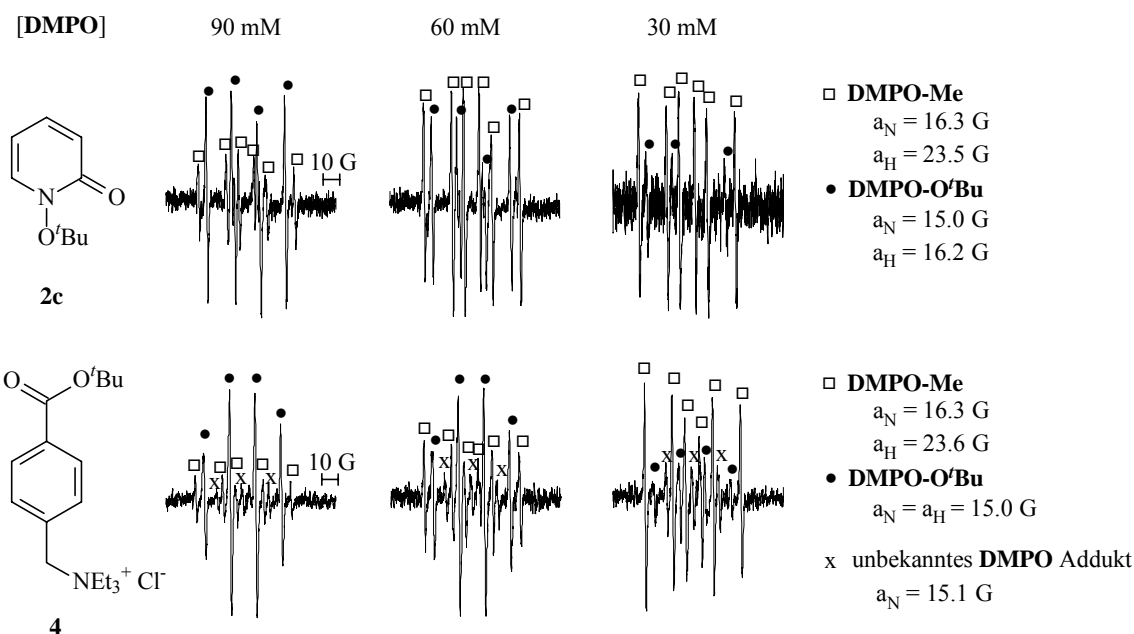


Abbildung 3.4. EPR-Spektren nach der Photolyse (300 nm, 10 °C, 10 min) von Pyridon **3b** (3.00 mM) als Funktion der **DMPO** Konzentration in wässrigem Medium unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff.

der Einsatz geringerer Konzentrationen an **DMPO** führte zur Bildung dieser beiden Addukte (**V-17**). Es wurde jedoch beobachtet, dass mit abnehmender Konzentration an **DMPO** der Anteil des Methylradikaladduktes immer weiter stieg und schließlich bei einer **DMPO**-Konzentration von 30 mM die eindeutig vorherrschende Spezies war.

Die selbe Beobachtung wurde auch bei der bereits etablierten *tert*-Butoxylradikalquelle **4** gemacht. Hier war bei Photolyse in Gegenwart geringerer Konzentrationen an **DMPO** ebenfalls das Methylradikaladdukt die hauptsächlich gebildete Adduktspezies, während nur wenig *tert*-Butoxylradikaladdukte erzeugt wurden (**V-18**). Im EPR-Spektrum der Peresterphotolyse war zudem ein Addukt zu finden, das nur eine Kopplungskonstante zum Stickstoffatom nicht aber zum β -H-Atom aufwies. Es sollte aufgrund des Kopplungsmuster ein oxidatives Zerfallsprodukt von **DMPO** sein, wurde jedoch nicht zweifelsfrei zugeordnet.

3.2.4 Photochemisch induzierte Strangbruchbildung durch Pyridon **2c**

Das Abfangen von *tert*-Butoxylradikalen bei der Photolyse von Pyridon **2c** manifestierte, dass es sich bei diesem Reagenz um eine photochemische Radikalquelle handelt. Es galt nun zu klären, ob diese Verbindung in Analogie zu dem Perester **4** lichtinduziert DNA-Schäden

vermitteln kann, und ob diese den mit **DMPO** abgefangene Radikale zugeschrieben werden können.

Vor diesem Hintergrund wurde das Pyridon **2c** (1.50 mM) in Gegenwart von superhelikaler DNA bestrahlt (312 nm). Dies führte zu Strangbrüchen in der DNA (Bildung von 36% offencirculäre DNA, **V-19**). Da die Photolyse ohne Anwesenheit der Radikalquelle den gleichen Anteil an offencirculärer DNA (20%, Blindprobe, oben bereits abgezogen) aufwies wie die nicht bestrahlte DNA-Probe, konnte die Schadensbildung eindeutig der photolytischen Zersetzung des Pyridons **2c** zugeordnet werden.

In Abb. 3.5 ist das Zeitprofil der Bildung offencirculärer DNA dargestellt (**V-20**). Es zeigt

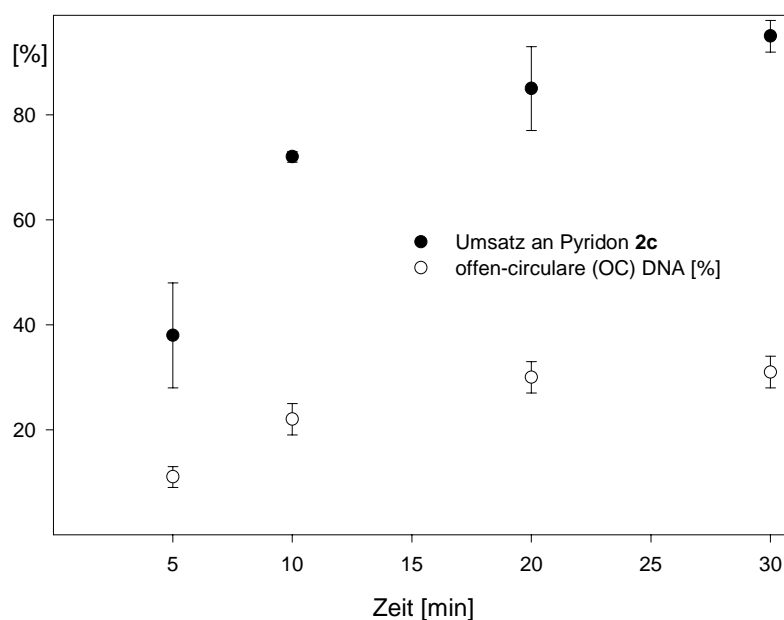


Abbildung 3.5. Zeitprofil der Strangbruchbildung durch die Photolyse (312 nm, 0 °C, 30 min) der superhelikalen pBR 322 DNA (10 mg/L in 0.5 mM KH₂PO₄ Puffer, pH 7.4) in Gegenwart von Pyridon **3b** [Blindprobe (20% OC DNA) ist schon abgezogen].

auf, dass nach vollständiger Zersetzung des Pyridons **2c** auch keine Strangbrüche mehr induziert werden. Damit wurde die Beteiligung von Photoprodukten an der Strangbruchbildung ausgeschlossen.

Die Gegenwart des Radikalfängers Isopropanol (8 Vol%) bei der Photolyse reduzierte signifikant die Bildung geschädigter, offencirculärer DNA von 36% auf 3% (Abb. 3.6, **V-19**).

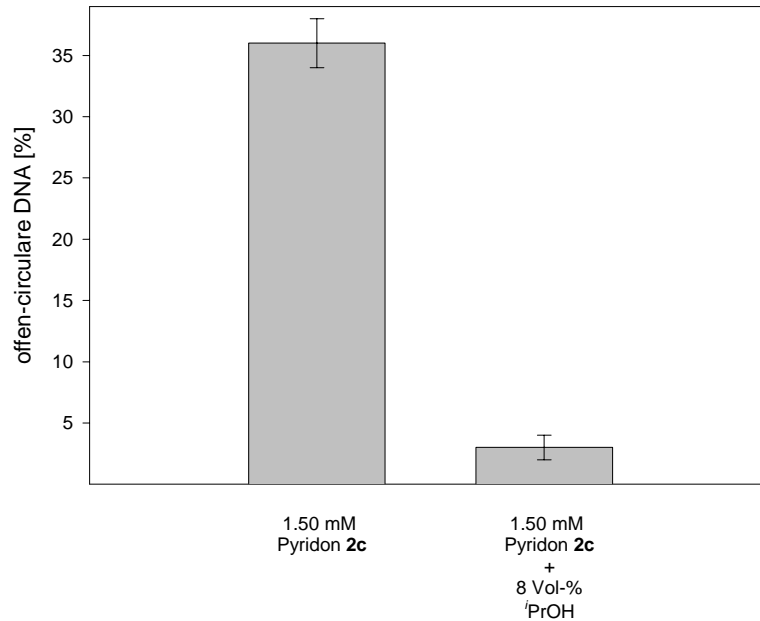


Abbildung 3.6. Einfluss von Isopropanol (8 Vol-%) auf die Strangbruchbildung in superhelikaler pBR 322 DNA (10 mg/L in 0.5 mM KH_2PO_4 Puffer, pH 7.4) bei der Photolyse (312 nm, 0 °C, 30 min) in Gegenwart von Pyridon **2c** (1.50 mM); die Blindprobe (20% OC DNA) ist schon abgezogen.

3.2.5 Photochemisch induzierte Oxidation von dG durch Pyridon **2c** und Perester **4**

Neben dem Bruch des Zuckerrückgrats (Strangbruchbildung) stellt die oxidative Basenmodifikation eine bedeutende Form der DNA-Schädigung dar. Da Guanin die für Oxidationen empfindlichste DNA-Base ist,²⁸ wurde 2'-Desoxyguanosin (**dG**) als Modellsystem für Guanin in der DNA herangezogen und bezüglich oxidativer Basenschäden bei der Bestrahlung in Gegenwart der *tert*-Butoxylradikalquelle **2c** untersucht.

Die Photolyse (300 nm, 10 °C, 30 min) des Pyridons **2c** (0.50 mM) induzierte in Gegenwart von 0.10 mM **dG** einen **dG**-Umsatz von $23\% \pm 3\%$ (Abb. 3.6, **V-22**). Als Hauptoxidationsprodukt wurden Guanidin-freisetzende Produkte, wie z.B. **Oxazol** gebildet ($14\% \pm 2\%$). **8-oxodG** konnte nur in vernachlässigbaren Mengen ($< 0.2\%$) detektiert werden. Ein ähnliches Produktprofil wurde bei der Photolyse der bereits etablierten *tert*-Butoxylradikalquelle Perester **4** beobachtet. Auch der Perester **4** induzierte Oxidation von **dG** ($16\% \pm 2\%$) und zwar hauptsächlich zu Guanidin-freisetzenden Produkten ($1.7\% \pm 0.1\%$), während **8-oxodG** nicht nachgewiesen werden konnte.

Das Zeitprofil der **dG**-Oxidation (Abb. 3.7) durch Pyridon **2c** legt dar, dass nach voll-

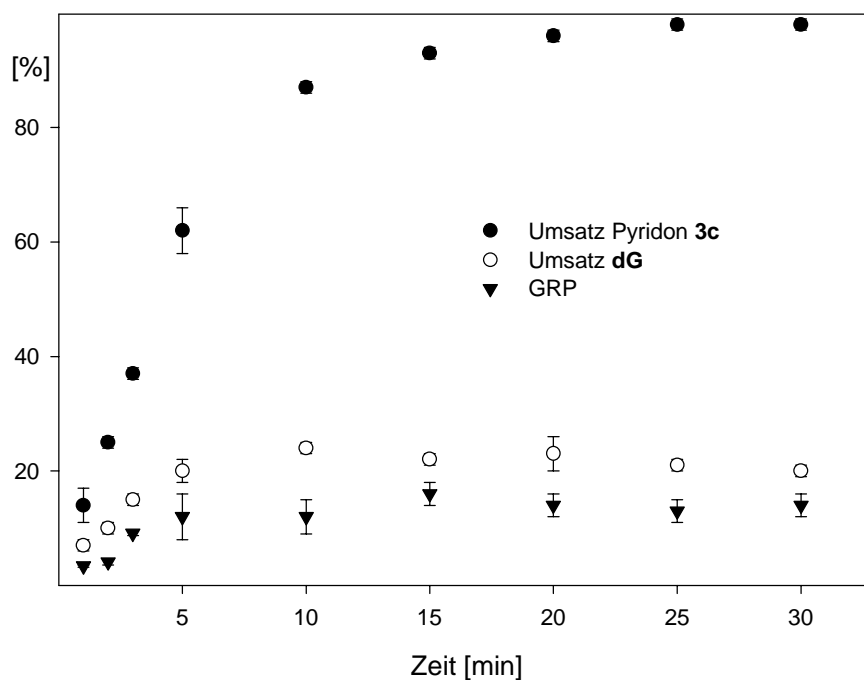


Abbildung 3.7. Zeitabhängigkeit der Oxidation von **dG** (0.10 mM) durch Bestrahlung (300 nm) in Gegenwart des Pyridons **2c** (0.50 mM) in Phosphatpuffer (5 mM, pH 7.0) bei 10° C; die angegebenen Fehler sind auf zwei unabhängig durchgeführten Reaktionen berechnete Standardabweichungen.

ständigem Umsatz der Radikalquelle keine weitere Oxidation von **dG** stattfindet, dass also die Beteiligung von Photoprodukten an der Schadensbildung ausgeschlossen werden kann.

Dass auch die Schäden an **dG** durch Radikale induziert werden, wurde durch Experimente mit dem Radikalfänger Isopropanol aufgezeigt. Die Zugabe von Isopropanol bei der Bestrahlung des Pyridons **2c** unterdrückte deutlich die Umsetzung von **dG**, während *tert*-Butanol, ein typischer Fänger von Hydroxylradikalen keinen reduzierenden Effekt auf die Oxidation von **dG** ausübte (Abb. 3.8, **V-23**).

Zur Untersuchung, ob auch die bei den EPR-Experimenten neben den *tert*-Butoxylradikalen abgefangenen Methylradikale genügend effizient generiert werden, um **dG**-Schäden zu bewirken, wurden die Photolysen auch unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sollte verhindert werden, dass die Methylradikale durch Addition von molekularem Sauerstoff zu Peroxyl- und deren Folgeradikalen umgesetzt werden.

Es ist bekannt, daß Methylradikale an Position N7 und C8 von **dG** addieren unter Bildung von **N⁷-MedG** und **8-MedG**.^{73,112,113} Deshalb wurden diese beiden Methyladdukte nach in der

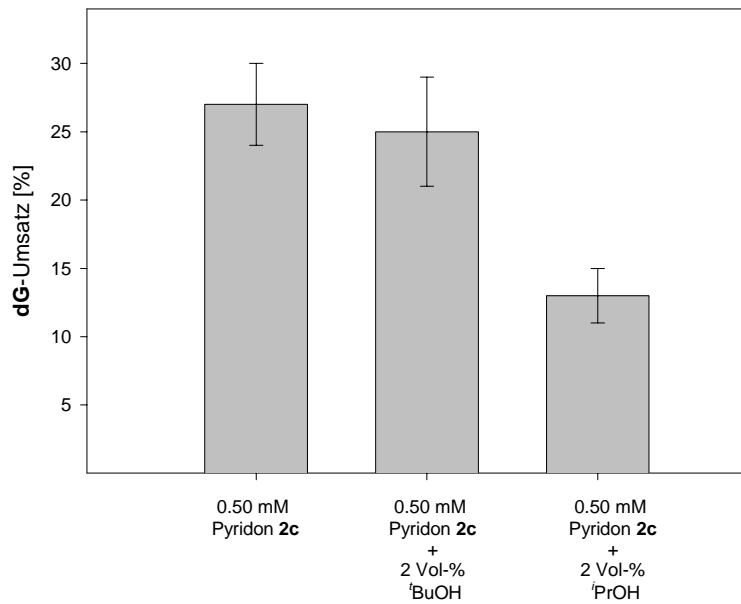
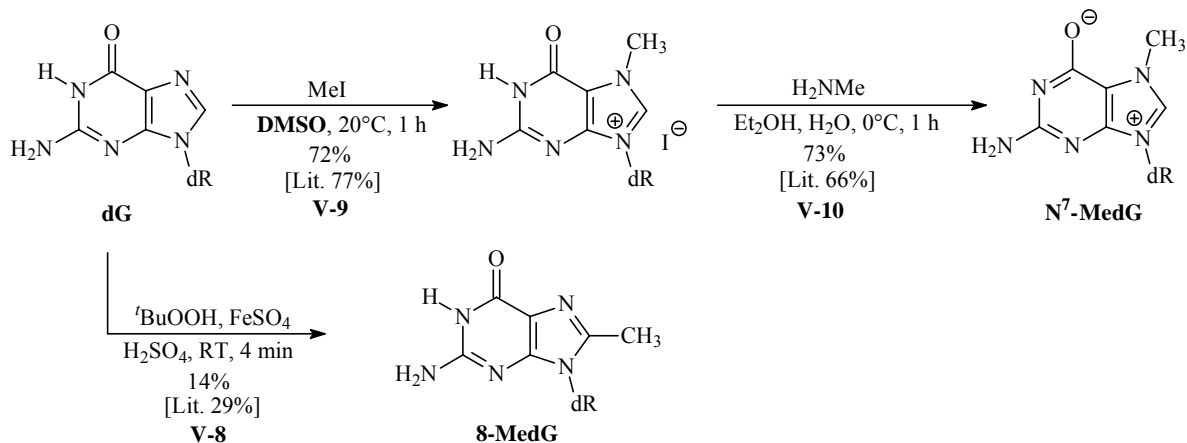


Abbildung 3.8. Einfluss von *tert*-Butanol oder Isopropanol (beide 2 Vol%) auf die Oxidation von **dG** (0.10 mM) bei Bestrahlung (300 nm, 10 °C, 30 min) in Gegenwart von Pyridon **2c** (0.50 mM).

Literatur beschriebenen Verfahren synthetisiert (**V-8**, **10**)^{114,115} und konnten als authentische Standards für den Nachweis dieser Addukte in dem Photolysat der **dG**-Oxidation durch Pyridon **2c** oder Perester **4** verwendet werden (Schema 3.5). Bei der Bestrahlung von Pyri-



Schema 3.5. Synthese der Methyl-**dG**-Addukte *N*⁷- und **8-MedG**

don **2c** in Gegenwart von **dG** unter Ausschluss von Sauerstoff wurden **8-MedG** als Hauptprodukt (2.3% ± 3%), und *N*⁷-**MedG** in wesentlich geringeren Mengen (0.27% ± 0.05%) als Nebenprodukt detektiert (Abb. 3.9, **V-26**). Beide Produkte konnten durch Vergleich

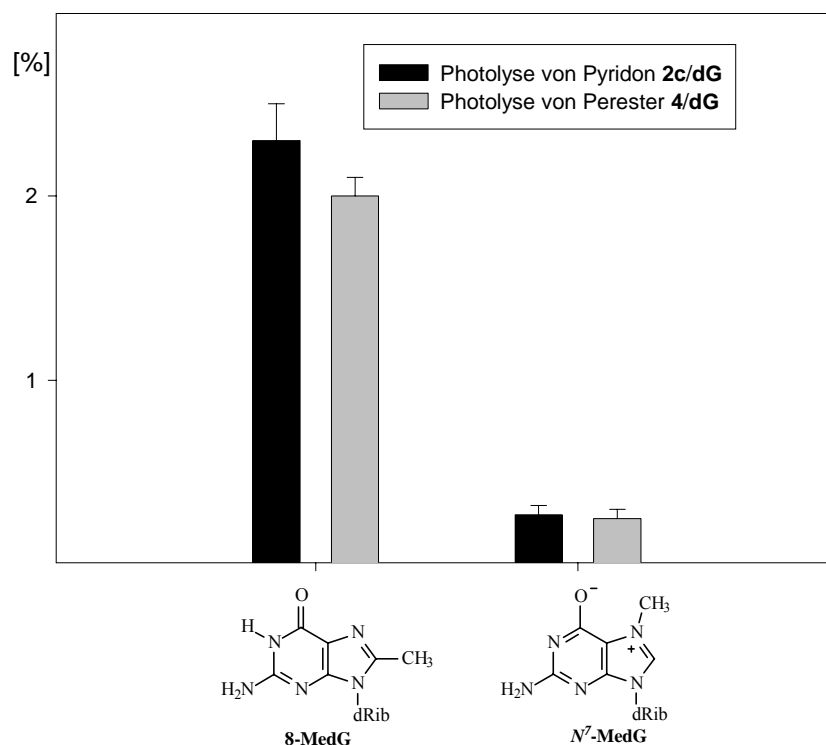
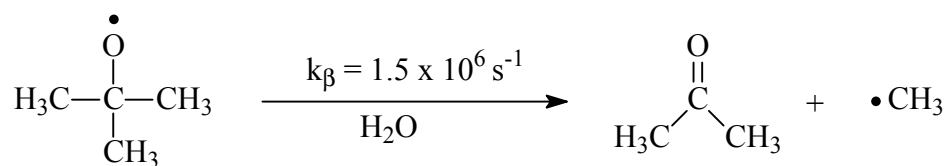


Abbildung 3.9. Methyladdukte von **dG** (0.10 mM) bei Bestrahlung (300 nm, 20 °C, 30 min) dieses Nukleosids in Gegenwart von Perester **4** (0.50 mM) oder Pyridon **2c** (0.50 mM) unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff.

der Retentionszeiten im HPLC-Chromatogramm, aber insbesondere durch Vergleich der Massenspektren mit denen der entsprechenden authentischen Methyl-**dG**-Addukte zugeordnet werden (**V-25**).

Die Bestrahlung des Peresters **4** (**V-27**) führte in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff ebenfalls zu signifikanten Ausbeuten an **8-MedG** (2.0% ± 0.1%). Auch **N⁷-MedG** konnte detektiert werden (0.25% ± 0.05%). Beide photochemischen *tert*-Butoxylradikalquellen zeigten also unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff eine deutliche, durch Methylradikale vermittelte Reaktivität gegenüber **dG**.

Zerfall (β -Spaltung) der zunächst generierten *tert*-Butoxylradikale hervor (Schema 3.7).¹¹⁷



Schema 3.7. β -Fragmentierung der *tert*-Butoxylradikale in wässrigem Medium¹¹⁷

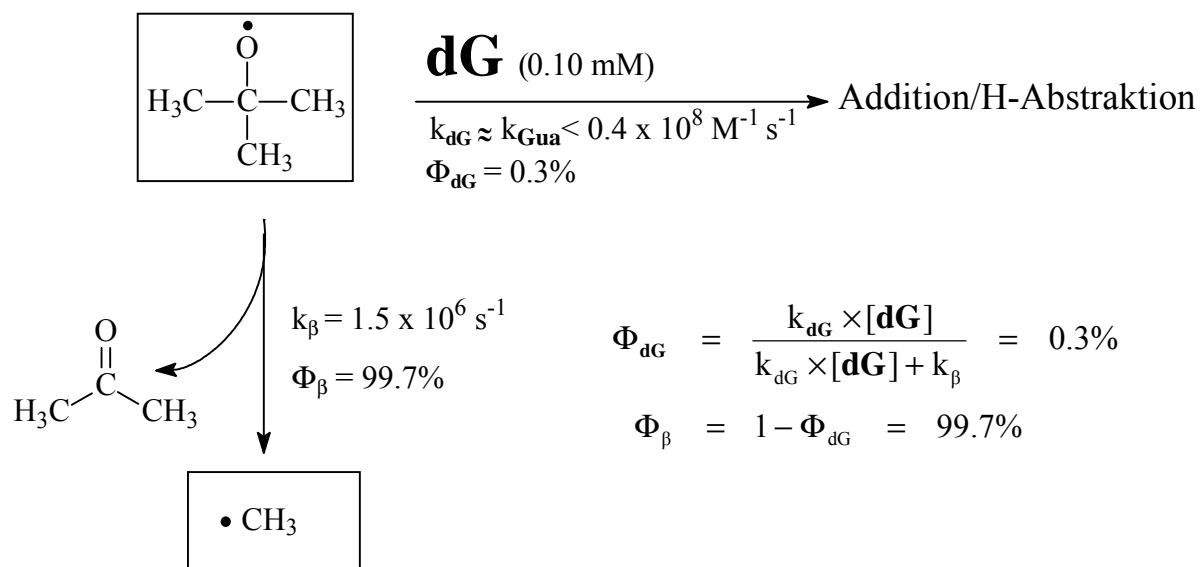
Das konnte zum einen dadurch belegt werden, dass der Anteil der **DMPO-Me** Addukte im EPR-Spektrum nach Photolyse des Pyridons **2c** abhängig von der eingesetzten Konzentration an Radikalfänger **DMPO** war und zum anderen dadurch, dass bei der photolytischen Zersetzung der bereits etablierten *tert*-Butoxylradikalquelle Perester **4** ebenfalls eine Mischung von *tert*-Butoxyl- und Methylradikalen abgefangen werden konnte. Bei einer **DMPO**-Konzentration von 30 mM wurde bei beiden Radikalquellen das **DMPO**-Addukt der Methylradikale als deutlich dominierende Spezies im EPR-Spektrum nachgewiesen.

Die Geschwindigkeitskonstante der β -Fragmentierung ist stark abhängig vom Lösungsmittel in dem die *tert*-Butoxylradikale generiert werden. In Benzol ist sie mit $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ um zwei Größenordnungen langsamer als in wässrigem Medium.¹¹⁸ Das beruht darauf, dass der Übergangszustand der β -Fragmentierung vom unpolaren *tert*-Butoxylradikal zu dem stärker polaren Aceton durch polare Lösungsmittel wie Wasser besser stabilisiert werden kann als von unpolaren Lösungsmitteln wie Benzol.^{119,120} Daher wurde im Gegensatz zu der Photolyse in Wasser in Benzol ausschließlich das Addukt der *tert*-Butoxylradikale (**DMPO-O^tBu**) gebildet.

3.3.2 dG Oxidation und Strangbruchbildung

Die photochemische *tert*-Butoxylradikalquelle **2c** erwies sich in den Reaktionen mit **dG** und mit superhelikaler pBR 322 DNA als saubere Radikalquelle in dem Sinne, dass ihre Photoprodukte keine Aktivität gegenüber den gewählten Substraten zeigten. Die kinetischen Studien belegen eindeutig, dass 2'-Desoxyguanosin (**dG**) und die superhelikale DNA nach vollständigem Umsatz des Pyridons **2c** nicht weiter oxidativ geschädigt wurden, dass also Photoprodukte keine oxidativen Schäden vermitteln.

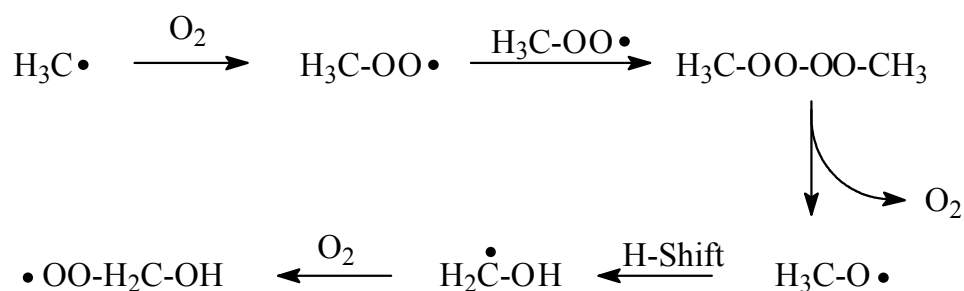
Die effektive Unterdrückung oxidativer Schäden an **dG** und DNA durch den Radikalfänger Isopropanol verdeutlicht zudem, dass Radikale für die Schadensbildung verantwortlich sind. Welche Radikale bewirken aber die Schäden? Um das zu untersuchen, wurden die Photolysen in Gegenwart von **dG** näher untersucht. Da sowohl Pyridon **2c** als auch Perester **4** **dG** hauptsächlich zu Guanidin-freisetzenden Produkten oxidieren, liegt es nahe, dass in beiden Fällen die gleichen Spezies die Oxidationen vermitteln. Frühere Arbeiten mit dem Perester **4** wiesen den *tert*-Butoxylradikalen die Rolle der oxidierenden Spezies zu und die β -Fragmentierung dieser Radikale in Methylradikale wurde vernachlässigt.⁹² Zur Überprüfung, ob die Methylradikale in der Tat außer Acht gelassen werden können, wurden die Photolysen des Peresters **4** und des Pyridons **2c** unter Ausschluss von Sauerstoff untersucht, und es zeigte sich, dass beide Systeme die für Methylradikale charakteristischen **dG**-Methyladdukte **8-MedG** und *N*⁷-**MedG** bilden (Abb. 3.9). Die β -Fragmentierung der *tert*-Butoxylradikale kann also bei der Untersuchung photochemischer *tert*-Butoxylradikalquellen nicht vernachlässigt werden. Berücksichtigt man die Geschwindigkeitskonstante für die monomolekulare β -Fragmentierung der *tert*-Butoxylradikale ($k_{\beta} = 1.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$)¹¹⁷ und vergleicht sie mit der für die Reaktion dieser Radikale mit Guanosin ($k_{\text{Gua}} < 0.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹²¹, die in etwa der für die Reaktion mit **dG** entsprechen sollte, wird das noch offensichtlicher (Schema 3.8). Demnach reagieren bei einer **dG**-Konzentration von 0.10 mM,



Schema 3.8. Effizienz der **dG** Oxidation (Φ_{dG}) gegenüber der β -Fragmentierung (Φ_{β}) der *tert*-Butoxylradikale in Wasser.

wie sie in den durchgeführten Reaktionen verwendet wurde, lediglich 0.3% der *tert*-Butoxylradikale mit **dG**, während mehr als 99% über die β -Fragmentierung in Methylradikale zerfallen. In wässrigem Medium können die von Perester **4** und Pyridon **2c** primär generierten *tert*-Butoxylradikale die oxidativen Schäden an **dG** nicht vermitteln, weil sie viel schneller zu Methylradikalen fragmentieren.

Unter atmosphärischen Bedingungen werden diese Methylradikale von molekularem Sauerstoff unter Bildung von Methylperoxylradikalen abgefangen, so dass diesen Spezies oder deren Folgeradikale die Oxidation von **dG** zugeordnet werden kann. Eine eindeutige Zuordnung der reaktiven Spezies ist nicht möglich, da bei dem Zerfallprozess der primär aus den Methylradikalen in Gegenwart von Sauerstoff gebildeten Peroxylradikalen eine Vielzahl von Oxyradikalen entsteht, die alle an der Schädigung beteiligt sein können (Schema 3.9).^{122,123}



Schema 3.9. Zerfall der Methylradikale in Gegenwart von molekularem Sauerstoff.^{122,123}

Somit können für die beobachteten oxidativen Schäden an **dG** neben den Methylperoxylradikalen selbst verschiedenen Radikale aus deren Zerfallskaskade verantwortlich sein.

3.3.3 Schlussfolgerung

Mit dem *tert*-Butoxypyridon **2c** wurde eine photochemische Radikalquelle etabliert, die im ersten photochemischen Schritt *tert*-Butoxylradikale sauber generiert und ein dem Perester **4** analoges Oxidationsverhalten gegenüber **dG** zeigt. Die Spinabfangexperimente mit **DMPO** und die Photooxidationsexperimente mit **dG** unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff legten jedoch dar, dass für beide *Photo-Fenton*-Systeme die zunächst photolytisch freigesetzten *tert*-Butoxylradikale als aktive Spezies in der **dG** Oxidation ausscheiden, da ihre Reaktivität gegenüber **dG** nicht mit der monomolekularen β -Fragmentierung der Alkoxyradikale unter Bildung von Methylradikalen konkurrieren kann. Wegen der allgemeinen Tendenz von *tert*-Butoxylradikalen, eine β -Spaltung einzugehen, erscheint deren

Beteiligung an der oxidativen Schädigung von Biomolekülen gering. Vermutlich trifft diese Tatsache allgemein für *tert*-Alkoxyradikale zu. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff werden Schäden daher vielmehr durch Peroxyradikale oder daraus gebildeten Folgeradikalen vermittelt.

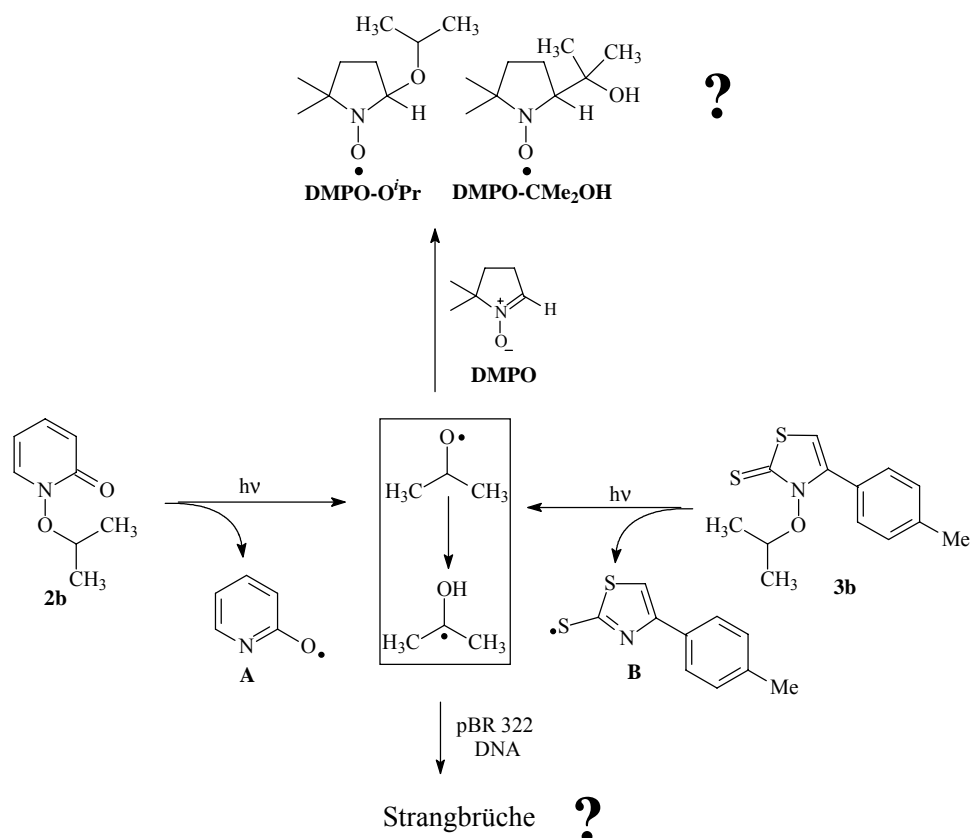
4 Kapitel 2: Photochemie der Isopropoxyradikalquellen Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b** - Einfluss der Chromophore auf Radikalfreisetzung und DNA-Schädigung

4.1 Problemstellung

Bei der Generierung von Oxyradikalen, möchte man, um deren Anwendung für photobiologische Studien gewährleisten zu können, möglichst milde Methoden wählen. *Photo-Fenton*-Reagenzien benötigen zur Freisetzung der gewünschten Radikale weniger harsche Bedingungen, als sie bei der Radiolyse von Wasserstoffperoxid oder Hydroperoxiden angewandt werden, da diese Reagenzien, bedingt durch den Chromophor, im längerwelligen Bereich absorbieren und größere Extinktionskoeffizienten aufweisen. Darauf beruht der Vorteil der *Photo-Fenton*-Reagenzien, der sich aber in vielen Fällen, wie bei den Pyridinthionen **1a-c**, nur durch eine komplizierte, zusätzlich Schäden vermittelnde Photochemie des Chromophors erkaufen lässt.⁹⁵ Es gibt in der Tat nur wenige *Photo-Fenton*-Reagenzien, die eine selektive Radikalgenerierung ermöglichen.

In jüngster Zeit offenbarten sich sowohl der Pyridon-Chromophor mit Pyridon **2a**, als auch der Thiazolthion-Chromophor mit Thiazolthion **3a'** als günstige Systeme für die Generierung von Hydroxylradikalen in photobiologischen Studien.^{50,51} Die bei deren Bestrahlung in Gegenwart von DNA beobachteten Schäden wurden in beiden Fällen lediglich den freigesetzten Hydroxylradikalen zugeordnet. Dieser Vorteil, der beide Reagenzien verbindet, motivierte dazu, diese Systeme zu Alkoxyradikalquellen umzufunktionalisieren, einander gegenüberzustellen und auszuloten, welches der beiden der bessere und schonendere Vorläufer für Oxyradikale in photobiologischen Untersuchungen darstellt. Da sich die Generierung von *tert*-Butoxylradikalen wegen deren konkurrenzlos rasch ablaufenden β -Spaltung in Methylradikale als ungünstig erwies (siehe Abschnitt 3), sollten die entsprechenden Isopropoxyderivate **2b** und **3b** synthetisiert, als Alkoxyradikalquellen überprüft und bezüglich ihrer Induktion von Strangbrüchen in DNA getestet und verglichen werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf den Chromophor gesetzt werden, dessen Einfluss bei der Radikalgenerierung von besonderer Bedeutung war.

Zunächst sollte durch Spinabfangexperimente mit **DMPO** gezeigt werden, dass beide Systeme Isopropoxyradikale freisetzen, wobei es zu klären galt, ob die Umlagerung der Isopropoxyradikale in 2-Hydroxyprop-2-ylradikale eine wichtige Rolle spielt und ob sie abhängig ist von dem sie generierenden System (Schema 4.1). Sollten sich beide Verbindungen als Alkoxy-



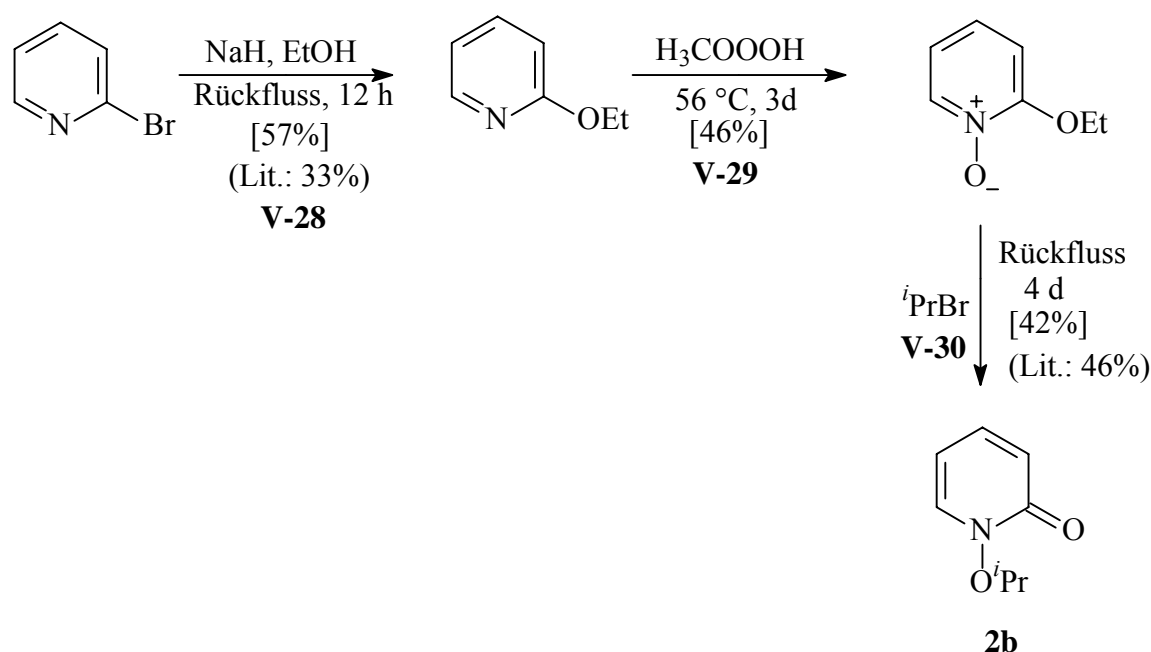
Schema 4.1. Untersuchung der photochemischen Isopropoxyradikalquellen **2c** und **3c**

radikalquellen herausstellen, sollte die Effizienz der Radikalgenerierung beider *Photo-Fenton*-Reagenzien untersucht werden. Hierzu war geplant die Quantenausbeute der photolytischen Zersetzung für beide Systeme zu betimmen, die zwar Auskunft über die jeweilige photochemische Reaktivität gibt, aber sowohl die NO-Bindungsspaltung unter Freisetzung von Isopropoxyradikalen, als auch jegliche andere photochemische Reaktionen umfasst. Um herauszufinden, inwieweit andere Prozesse bei den Photoreaktivitäten involviert sind, sollten auf der einen Seite detaillierte Produktstudien vorgenommen werden und auf der anderen Seite die Radikalgenerierung quantifiziert werden. Für letzteres waren Laserblitz-Experimente geplant, durch die unter Quantifizierung der bei NO-Bindungsspaltung neben den Oxyradikalen generierten Chromophorradikele **A** und **B** die Quantenausbeute der Radikalfreisetzung bestimmt werden kann. Mit Hilfe der genannten Untersuchungen, sollte die Photoreaktivität beider *Photo-Fenton*-Reagenzien qualitativ und quantitativ beschrieben werden. In Bestrahlungsexperimenten mit superhelikaler pBR 322 DNA sollte anschließend ermittelt werden, wie sich die unterschiedlichen Reaktivitäten der Systeme **2c** und **3c** auf deren Fähigkeit auswirkt, Strangbrüche zu induzieren. Hierbei sollte über Radikalfänger überprüft werden, ob in der Tat die freigesetzten Radikale die oxidativen Schäden vermitteln.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Synthese der Edukte

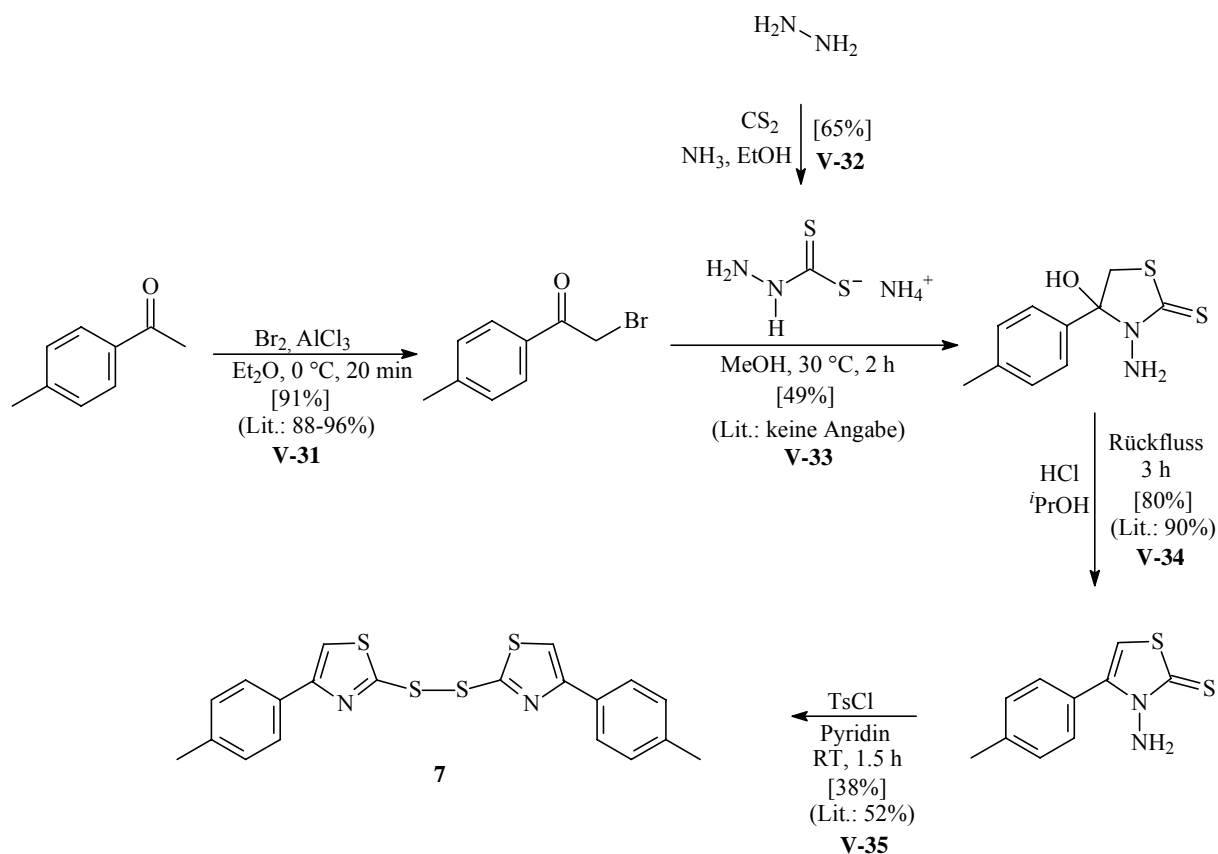
Die Syntheseroute zu Isopropoxyppyridon **2b** ist in der Literatur bekannt. Sie geht aus von 2-Brompyridin. Durch nucleophile Substitution am Aromaten erhielt man 2-Ethoxyppyridin (Schema 4.2).¹²⁴ Nachfolgende Oxidation zum *N*-Oxid und Umsetzung mit Isopropylbromid führte in einer Umlagerungsreaktion zur Bildung von Pyridon **2b** (**V-28** bis **V-30**).¹²⁴⁻¹²⁶



Schema 4.2. Synthese des Pyridons **2b**

Die Thiazolthione **3a** und **3b** wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Hartung im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Die Synthese des Disulfids **7** erfolgte über vier Stufen ausgehend von *p*-Methylbenzophenon. Die Ausbeute über alle Schritte hinweg betrug 14% (Schema 4.3, **V-31** bis **V-35**).¹²⁷⁻¹²⁹



Schema 4.3. Synthese des Disulfids **7**

4.2.2 Absorptionseigenschaften von Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b**

Photobiologische Untersuchungen werden zur Simulation physiologischer Bedingungen in wässrigem Medium durchgeführt. Da das Thiazolthion **3b** aber im Gegensatz zu Pyridon **2b** nicht in reinem Wasser löslich ist, musste Acetonitril als Kosolvens verwendet werden.

In Abbildung 4.1 sind die Absorptionsspektren beider *Photo-Fenton*-Reagenzien in einem Lösungsmittelgemisch von Wasser und Acetonitril (60 : 40) abgebildet. Das Pyridon **2b** weist ein Absorptionsmaximum bei 300 nm ($\lg \epsilon = 3.73$), das Thiazolthion **3b** bei 318 nm ($\lg \epsilon = 3.73$) auf. Letzteres absorbiert also im längerwelligen Bereich und wurde in den Photolysestudien im Rayonet-Photoreaktor (350 nm) oder mit einer Quecksilberhochdrucklampe (< 350 nm) bestrahlt, das Pyridon **2b** hingegen im Rayonet-Photoreaktor (300 nm).

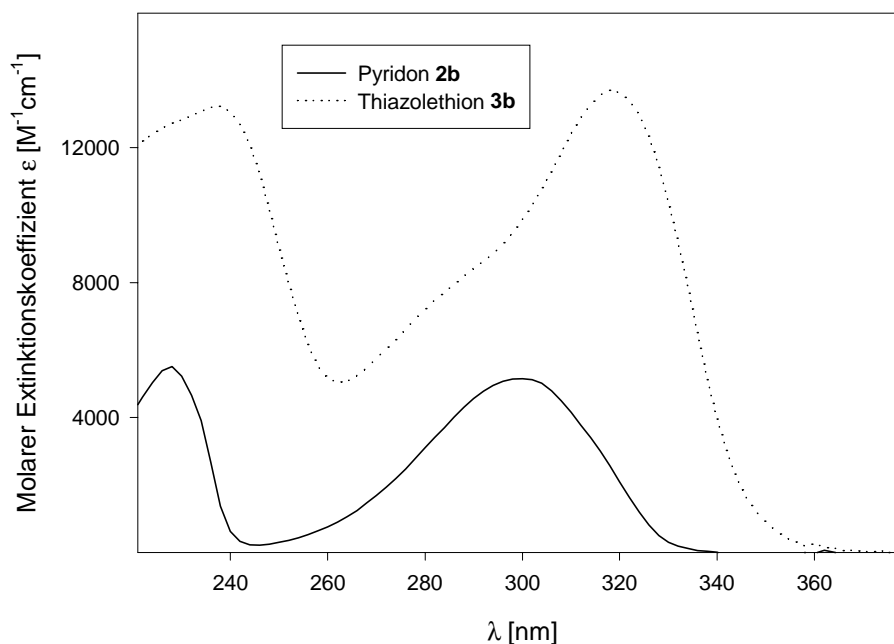
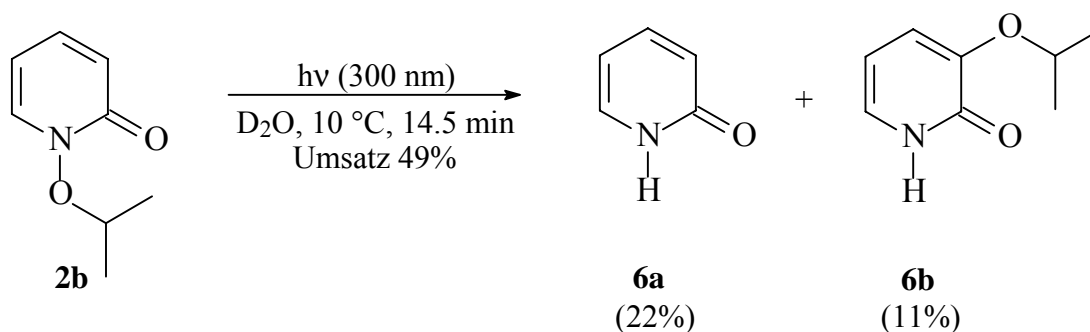


Abbildung 4.1. Absorptionsspektren von Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b** in $H_2O : MeCN$ (60 : 40)

4.2.3 Produkte bei der Photolyse von Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b**

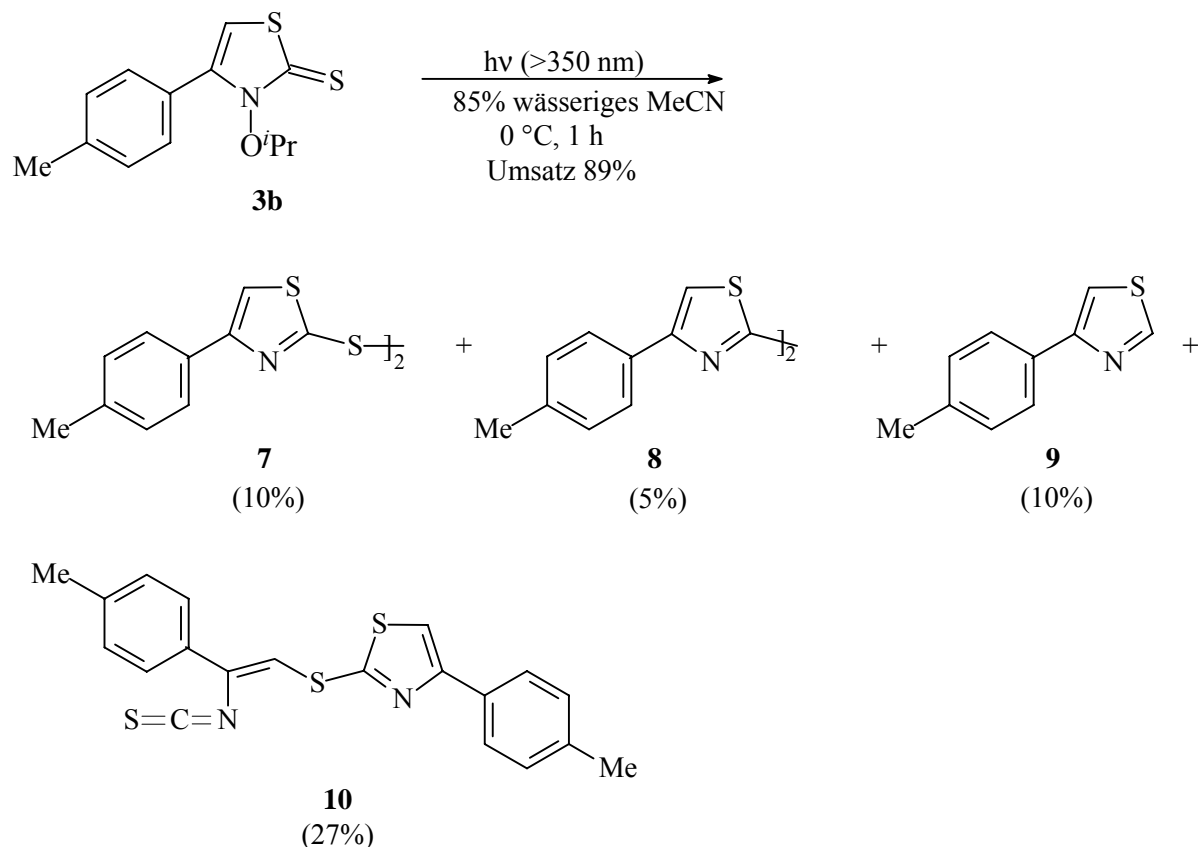
Zur Untersuchung des photochemischen Verhaltens der Isopropoxyverbindungen **2b** und **3b** war die Aufklärung ihrer Photoprodukte nötig. Das Pyridon **2b** führte bei Bestrahlung (300 nm) in Wasser zur Bildung von Pyridon **6a** und Isopropoxypyridon **6c** (Schema 4.4, **V-37**, **38**). Pyridon **6a** ist literaturbekannt und konnte durch Vergleich seines 1H -NMR



Schema 4.4. Produkte bei der Photolyse von Pyridon **2b**

-Spektrums mit dem der authentischen Verbindung eindeutig zugeordnet werden. Auf die Struktur des Umlagerungsproduktes **6c** wurde aufgrund der 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren, insbesondere unter Anwendung der HMBC-Methode, geschlossen.

Bei der Bestrahlung (>350 nm) des Thiazolthions **3b** in einer Lösungsmittelmischung von Wasser und Acetonitril im Verhältnis (85 : 15) wurden das Disulfid **7** (10%), das Bithiyl **8** (5%) und das Thiazol **9** (10 %) isoliert (Schema 4.5, V-39). Die analogen Produkte wurden



Schema 4.5. Photoprodukte bei der Photolyse von Thiazolthion **3b**

bereits bei der Photolyse des hydroxysubstituierten Thiazolthions **3a'** erhalten.⁵¹ Das Disulfid **7** und das Bithiyl **8** konnten nicht chromatographisch aufgetrennt werden. Sie wurden direkt aus der Reaktionsmischung mittels ¹H-NMR- und Massenspektroskopie charakterisiert.

Zusätzlich wurde bei der Photolyse das bislang unbekannte Isothiocyanat **10** gebildet, und zwar als Hauptprodukt (27%). Die Isocyanatgruppe dieses Produkts war im IR-Spektrum sichtbar, da es eine starke Absorptionsbande bei 2074 cm⁻¹ aufwies.¹³⁰ Auch das Massenspektrum, das ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum und die Anwendung der HMBC und HMQC-Technik bestätigten die Struktur dieser Verbindung.

4.2.4 Detektion von Transienten bei der Laserblitz-Photolyse

Mit Hilfe der Laserblitz-Photolyse ist es möglich, kurzlebige, im UV absorbierende Radikale als Transienten zu detektieren.^{131,132} Mit dieser Methode sollte es deshalb möglich sein, den Zerfallsprozess der *Photo-Fenton*-Reagenzien **2b** und **3b** zu beobachten und den Mechanismus der Bildung der in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Produkte aufzuklären.

Das Transientenabsorptionsspektrum nach Laserblitzbestrahlung des Pyridons **2b** ist in Abb. 4.2(a) aufgeführt. Es zeigt eine Absorptionsbande bei 390 nm. Diese Bande wurde dem

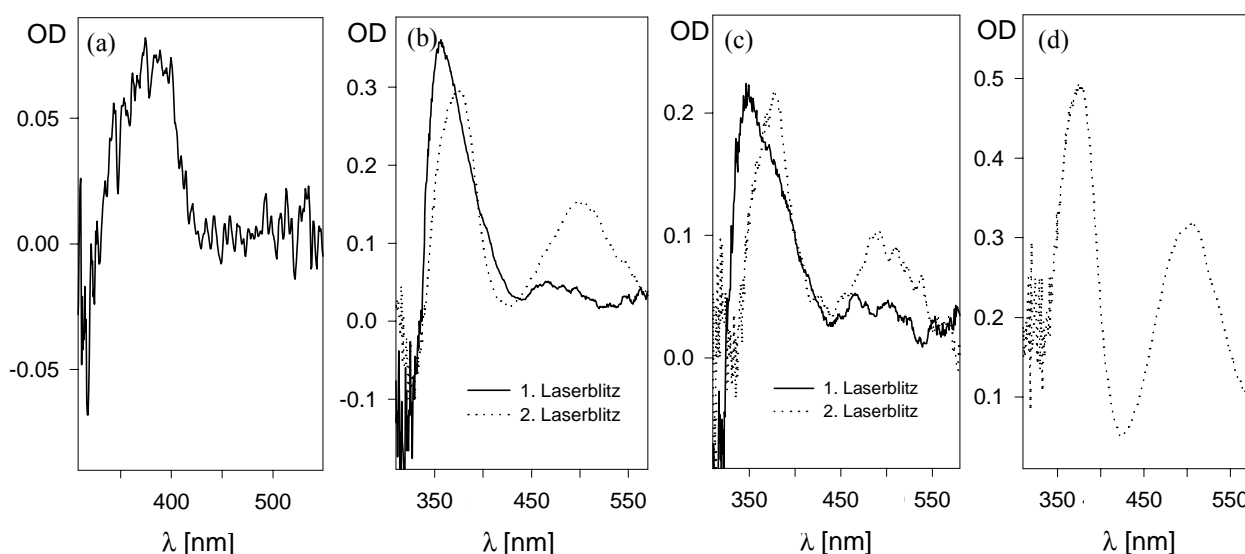
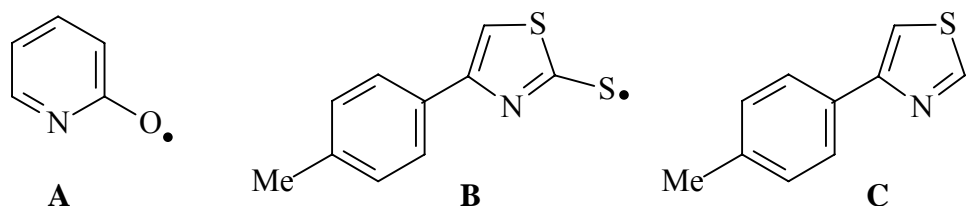


Abbildung 4.2. Beobachtete Transienten-Spektren bei der Laserblitz-Photolyse (308 nm) von Pyridon **2b** [Abb. 4.2(a)] in Wasser, und bei der Laserblitz-Photolyse (308 nm) der Thiazolthione **3a** [Abb. 4.2(c)] und **3b** [Abb. 4.2(b)] und des Disulfids **7** [Abb. 4.2(d)] in Acetonitril; für die Thiazolthione **3a,b** sind jeweils die Absorptionsspektren nach dem ersten und zweiten Laserblitz aufgeführt.

Pyridoxyradikal **A** zugeordnet, da diese Spezies in der Literatur bekannt ist und das gleiche Absorptionsverhalten aufweist wie der hier beobachtete Transient (**V-39**).⁹⁹



Die Laserblitz-Photolyse des Thiazolthions **3b** führte zu einem Transienten mit Absorptionsmaxima bei 350 und 470 nm [Abb. 4.2(b), durchgezogene Linie]. Das gleiche Transientenspektrum wurde auch für das Hydroxyderivat **3a** erhalten [Abb. 4.2(c), durchgezogene Linie] und wurde deshalb dem Thiylradikal **B** zugeordnet, das durch den photochemisch induzierten NO-Bindungsbruch sowohl aus Thiazolthion **3a** als auch aus Thiazolthion **3b** gebildet wird (**V-40, 41**).

Die Absorptionsbande bei 470 nm zeigte ein Abklingverhalten, das durch die Gegenwart von molekularem Sauerstoff nicht beeinflusst wurde. Die Laserblitz-Photolyse des Thiazolthions **3b** in Gegenwart von 1,3-Cyclohexadien (**1,3-CHD**) führte jedoch zu einem rascheren Abklingen dieser 470 nm-Absorptionsbande (**V-43**). Dieses chemische Verhalten ist charakteristisch für aromatische Thiylradikale,^{97,133,134} von denen aus der Literatur zudem bekannt ist, dass sie, generiert beispielsweise aus Thionaphtholen oder Thiophenolen, Absorptionsmaxima bei 300-390 und 460-500 nm aufweisen.¹³⁵

Wurde das Thiazolthion **3b** direkt nach dem ersten Laserblitz noch einmal mit einem zweiten Laserblitz angeregt, so trat ein neuer Transient auf, der Absorptionsmaxima bei 375 und 500 nm aufzeigte [Abb. 4.2(b), punktierte Linie, **V-40**]. Genau der gleiche Transient wurde bei der zweifachen Laserblitz-Photolyse des Hydroxyderivates **3a** [Abb. 4.2(c), punktierte Linie] und bei der Anregung des Disulfids **7**, dem Photoprodukt des Thiazolthions **3b**, beobachtet [Abb. 4.2(d), **V-42**]. Beide Absorptionsbanden (375 und 500 nm) klangen deutlich schneller in Gegenwart von molekularem Sauerstoff ab (**V-45, 46**). Dieser Transient wurde deshalb dem Kohlenstoff-zentrierten Radikal **C** zugeordnet, das aus dem Bruch der CS-Bindung im Disulfid **7** hervorgeht.¹³⁶

4.2.5 Bestimmung der Quantenausbeuten

Die bislang beschriebenen Ergebnisse zeigen auf, dass die *Photo-Fenton*-Reagenzien **2b** und **3b** photolytisch unter NO-Bindungsspaltung zersetzt werden. Um die Photoreaktivität beider Systeme vergleichen zu können, ist es von zentraler Bedeutung, die Quantenausbeute dieser photochemischen Zersetzung, die gleichzeitig ein oberes Maß für die Effizienz der Radikalfreisetzung darstellt, für beide Verbindungen zu bestimmen.

Die Ferrioxalat-Aktinometrie wurde angewandt zur Quantifizierung der von der jeweils benutzten Bestrahlungsquelle emittierten Photonen (siehe Abschnitt 3.2.2.)¹⁰⁷ Für die Bestimmung des durch Photolyse (308 nm) induzierten Umsatzes an Thiazolthion **3b**, wurde

zunächst die Veränderung des UV-Spektrums von Thiazolthion **3b** in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer eingehend untersucht (Abb 4.3, **V-48**). Es zeigte sich, dass die Absorption bei 318 nm während der Photolyse von 0-10 min (308 nm) linear abnimmt. Daraus konnte

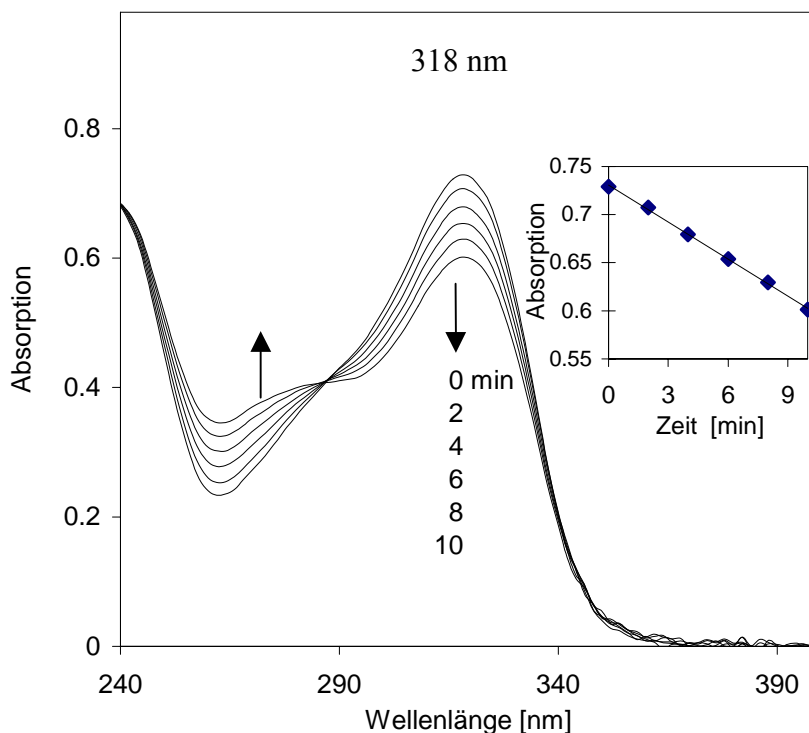


Abbildung 4.3. Zeitprofil der UV-Spektren von Thiazolthion **3b** während der Bestrahlung (308 nm, 20 °C); das Nebenbild zeigt die Abnahme der Absorption bei λ_{\max} 318 nm.

geschlossen werden, dass die bei der Bestrahlung des Thiazolthions **3b** gebildeten Photoprodukte die Absorptionsbande bei 318 nm nicht überlagern. Deshalb wurde über die Abnahme der Absorption bei 318 nm der Umsatz an Thiazolthion **3b** während der Photolyse (308 nm) bestimmt. Im Falle des Pyridons **2b** wurde der durch Bestrahlung (312 nm) bewirkte Umsatz über HPLC-Analyse mit UV-Detektor (300 nm) quantifiziert.

Die auf diese Weise bestimmten Quantenausbeuten für die Photozerersetzung der Radikalquellen **2b** und **3b** sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Die Ergebnisse zeigen, dass das Thiazolthion **3b** ungefähr doppelt so schnell zersetzt wird wie das Pyridon **2b**. Die Gegenwart von Acetonitril in der wässrigen Probe des Pyridons **3b** beeinflusste nicht die Quantenausbeute (**V-47, 49**).

Tabelle 4.1. Quantenausbeute für die Photozersetzung (Φ_{dec})^{a)} und den NO-Bindungsbruch ($\Phi_{\text{N-O}}$)^{b)} des Pyridons **2b** und des Thiazolthions **3b**

Substrat	Solvens	Φ_{dec}	$\Phi_{\text{N-O}}$
2b	H ₂ O-MeCN (60 : 40)	0.36 ± 0.02	
2b	H ₂ O	0.32 ± 0.01	0.75 ± 0.08 ^c
3b	H ₂ O-MeCN (60 : 40)	0.60 ± 0.05	0.65 ± 0.07 ^d

^{a)} Die Ferrioxalat-Aktinometrie wurde verwendet zur Bestimmung des Photonenflusses der Bestrahlungsquellen, die Fehler beruhen auf zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, das Pyridon **2b** wurde mit der Blacklight-Lampe (312 nm), das Thiazolthion **3b** mit der Xe-Lampe des Fluoreszenz-Photometers (308 nm) bestrahlt; ^{b)} bestimmt über Transientenspektroskopie unter Verwendung der Absorption des Triplettzustandes von Benzophenon als Referenz [$\Phi_{\text{T(BP)}} = 1.0$ in Benzol (Ref. 137)]; c) berechnet mit $\epsilon_{\text{A}} = 680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 390 nm (Ref. 99); ^{d)} abgeschätzt unter der Annahme, dass der Extinktionskoeffizient des Transienten **B** (ϵ_{B}) dem des Pyridyl-2-thiylradikals [$\epsilon_{\text{PyS}} = 600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 460 nm (Ref. 97)] entspricht.

Da die Zersetzungsquantenausbeute alle photochemischen Zerfallsprozesse der *Photo-Fenton*-Reagenzien **2b** und **3b** umfasst und nicht nur die photochemische Spaltung der NO-Bindung, stellt sie nur ein oberes Maß für die Quantenausbeute der NO-Bindungsspaltung dar. Deshalb sollte auch die Quantenausbeute der NO-Spaltung ($\Phi_{\text{N-O}}$), die ja identisch ist mit der Effizienz der Alkoxyradikalbildung, direkt bestimmt werden. Dies wurde mittels Transientenspektroskopie erreicht, indem die bekannte Quantenausbeute von Benzophenon, den Triplett-Zustand zu bilden [$\Phi_{\text{T(BP)}}$], als Referenz verwendet wurde (**V-50**, **51**).^{97,138}

Benzophenon, Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b** wurden alle nacheinander unter identischen Bedingungen (gleiche optische Dichten, gleiche Laserphotolysebedingungen) bestrahlt. Die nach Laseranregung (308 nm, 20 ns) generierten Transienten **A** und **B** und das Triplettbenzophenon [T(BP)] wurden über die jeweils erhaltenen Absorptionsspektren bei Kenntnis der entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{A} und ϵ_{B} und $\epsilon_{\text{T(BP)}}$ quantifiziert. Durch Vergleich mit der für Benzophenon bekannten Quantenausbeute $\Phi_{\text{T(BP)}}$ konnte für Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b** die entsprechende Quantenausbeute der Radikalfreisetzung ($\Phi_{\text{N-O}}$) bestimmt werden. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Im Falle des Thiazolthions **3b** handelt es sich dabei nur um einen Schätzwert, da der Extinktionskoeffizient ϵ_{B} des Thiylradikals **B** nicht bekannt war und näherungsweise mit dem des Pyridyl-2-thiylradikals gleichgesetzt wurde.⁹⁷

4.2.6 Photochemische Radikalgenerierung durch Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b**

4.2.6.1 Spinabfangexperimente in Abhängigkeit von Solvens, Radikalquelle und DMPO-Konzentration

In der Absicht zu bestätigen, dass sowohl Pyridon **2b** als auch Thiazolthion **3b** bei Bestrahlung Isopropoxyradikale freisetzen, wurden Spinabfangexperimente mit **DMPO** durchgeführt und die erhaltenen **DMPO**-Addukte EPR-spektroskopisch untersucht. Die Photolyse in Benzol in Gegenwart von **DMPO** (90 mM) führte für beide *Photo-Fenton*-Reagenzien (3.0 mM) zur Freisetzung von Isopropoxyradikalen, die mit **DMPO** abgefangen werden konnten [Abb. 4.4(a), (b)]. Das jeweils resultierende Addukt wies den entsprechenden *g*-Wert und die entsprechenden Hyperfeinkopplungskonstanten des in der Literatur beschriebenen Isopropoxyl-**DMPO**-Adduktes (**DMPO-OⁱPr**) auf (**V-52**, **53**).⁹⁶

In einem Lösungsmittelgemisch von H₂O-MeCN (60 : 40), wurde bei Bestrahlung des Thiazolthions **3b** unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff in Gegenwart von 90 mM **DMPO** wiederum ausschließlich das **DMPO-OⁱPr** Addukt EPR-spektroskopisch detektiert [Abb. 4.4(c)]. Auch der Einsatz geringerer Konzentrationen an **DMPO** führte bei der Photolyse des Thiazolthions **3b** lediglich zur Bildung des Isopropoxyradikaladduktes [Abb. 4.4(e), (g), **V-54**].

Im Falle des Pyridons **2b** hingegen, wurde in diesem Lösungsmittelgemisch [H₂O-MeCN (60 : 40)] neben dem Addukt des Isopropoxyradikals ein weiteres Addukt gefunden. Mit abnehmender Konzentration an **DMPO** stieg der Anteil dieses Adduktes auf Kosten des Isopropoxyradikaladduktes immer mehr an und war bei Anwendung von 9.00 mM an **DMPO** die eindeutig dominierende Spezies im EPR-Spektrum [Abb. 4.4(d), (f), (h), **V-55**].

Wurde die Bestrahlung des Pyridons **2b** (3.0 mM) in wässrigem Medium ohne Zugabe von Acetonitril als Kosolvent durchgeführt, konnte das Isopropoxyradikal überhaupt nicht mehr mit **DMPO** (27 mM) abgefangen werden. Es wurde ausschließlich das bei höheren Konzentrationen an **DMPO** neben dem Isopropoxyradikal-Addukt auftretende Addukt gebildet [Abb 4.4(i), **V-56**].

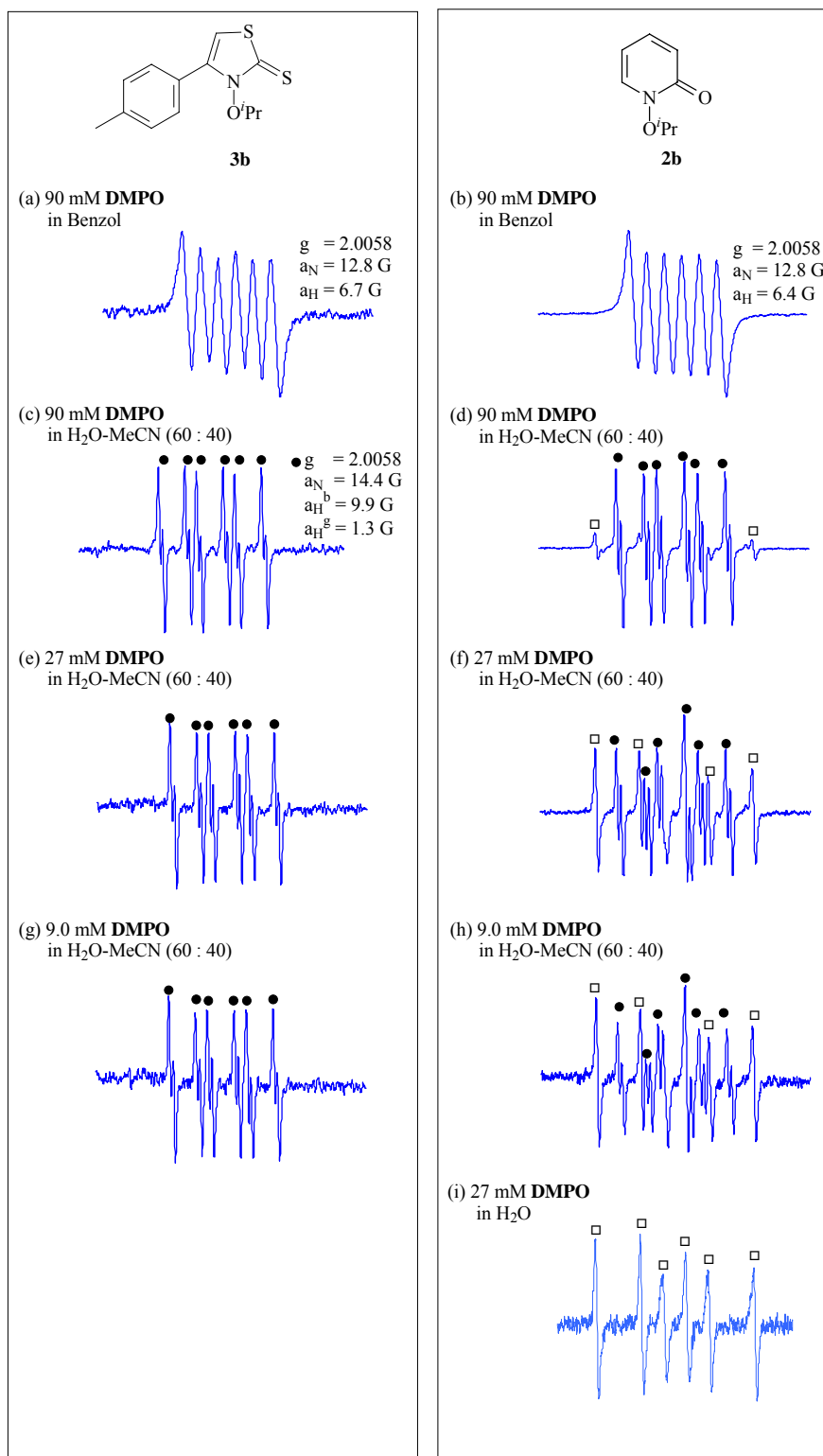
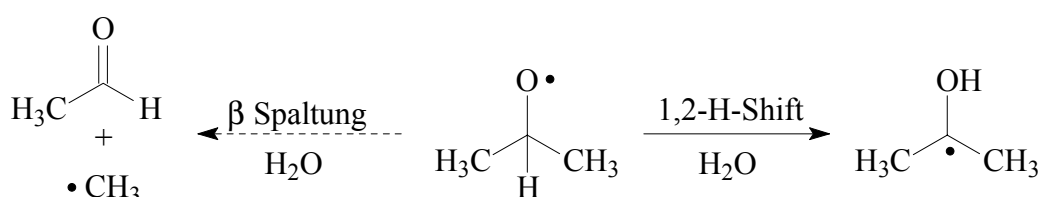


Abbildung 4.4. EPR-Spektren, aufgenommen nach Bestrahlung von Thiazolthion **3b** (350 nm, 10 °C, 5 min) oder Pyridon **2b** (300 nm, 10 °C, 5 min) in verschiedenen Lösungsmitteln in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an DMPO. ● DMPO-OⁱPr □ DMPO-CMe₂OH

4.2.6.2 Analyse der EPR-Spektren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass bei der Bestrahlung des Pyridons **2b** in wässriger Lösung neben dem Isopropoxyradikal ein weiteres Radikal generiert wird, sollte nun aufgeklärt werden, um welche Spezies es sich hierbei handelt.

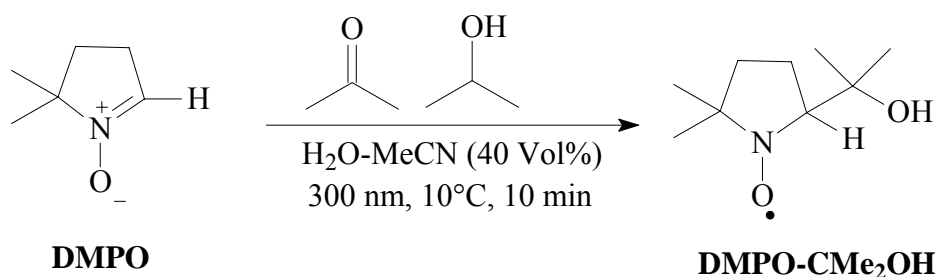
Es ist bekannt, dass primäre und sekundäre Alkoxyradikale leicht unter 1,2-H-Shift in Kohlenstoffradikale zerfallen.^{82,139,140} Im Falle des Isopropoxyradikals ist dieser 1,2-H-Shift unter Bildung des 2-Hydroxyprop-2-ylradikals deutlich bevorzugt gegenüber der β -Spaltung,¹³⁹ die beim *tert*-Butoxyradikal beobachtet wird (Schema 4.6).^{82,117} Vor diesem



Schema 4.6. Zerfall des Isopropoxyradikals

Hintergrund wurde erwartet, dass es sich bei der zusätzlich zu dem Isopropoxyradikal abgefangenen Spezies um das 2-Hydroxyprop-2-ylradikal handelt.

Zur Bestätigung wurde dieses Addukt auf unabhängige Weise hergestellt, indem Aceton und Isopropanol in Gegenwart von **DMPO** photolysiert wurden (Schema 4.7, **V-57**).¹⁴¹ Das



Schema 4.7. Darstellung des **DMPO-CMe₂OH**-Adduktes

resultierende **DMPO-CMe₂OH**-Addukt ist in Abb. 4.5(a) aufgeführt. Die Kopplungskonstanten entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten.¹⁴¹ Sowohl das EPR-Spektrum von **DMPO-OⁱPr**, generiert bei Bestrahlung des Thiazolthions **3b** in H₂O-MeCN (60 : 40), als

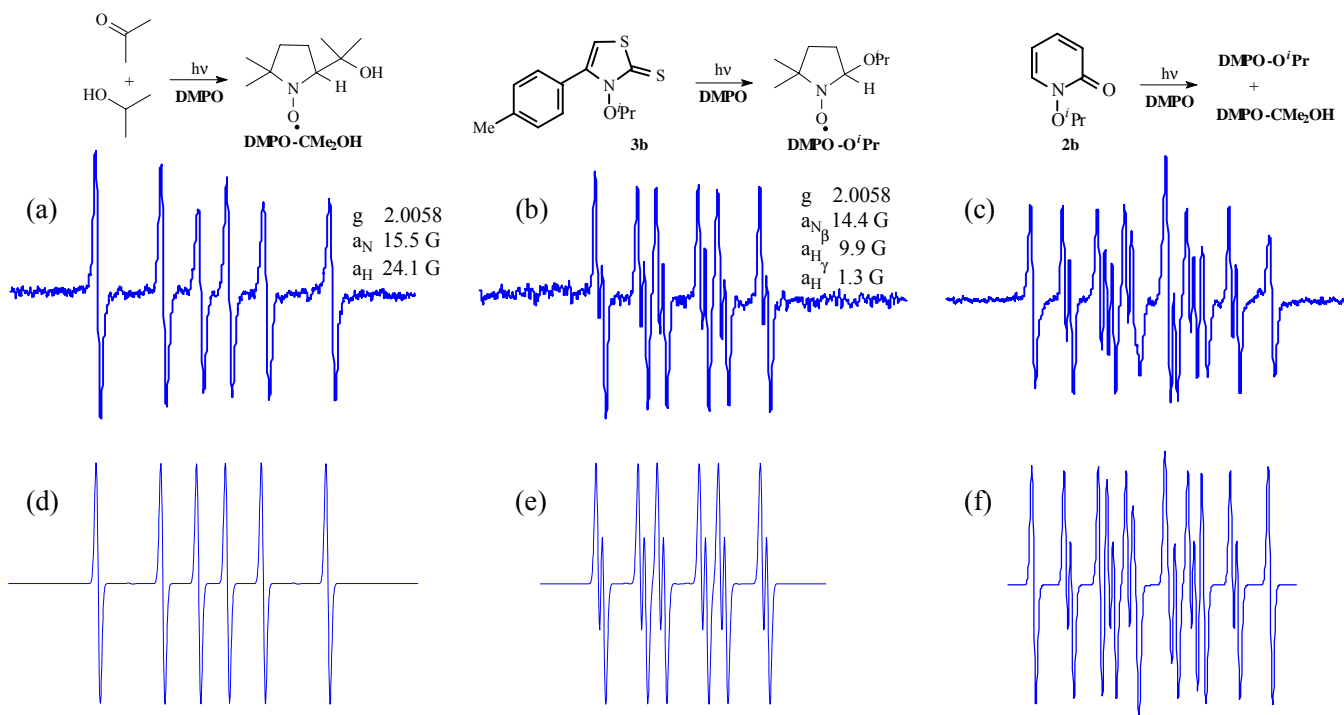


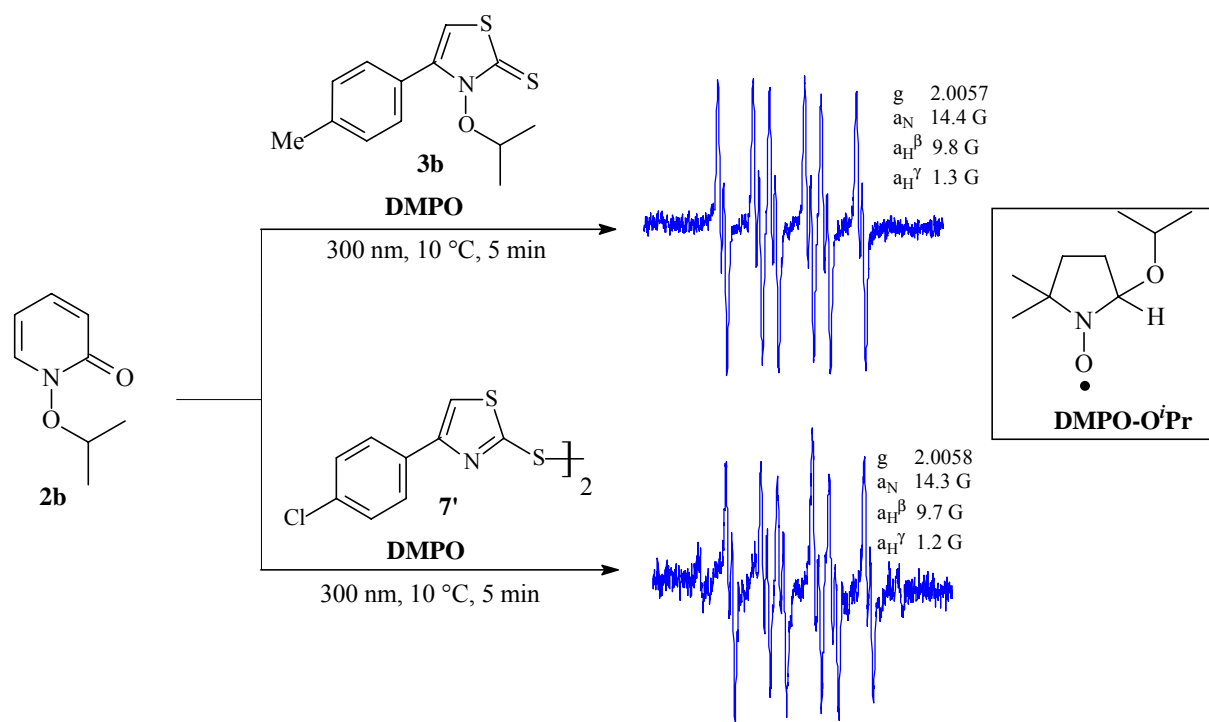
Abbildung 4.5. Experimentelle und simulierte EPR-Spektren der Spinaddukte des Isopropoxyl- und des 2-Hydroxypropyl-2-ylradikals: (a) **DMPO-CMe₂OH**, detektiert bei der Photolyse von Aceton (480 mM) und Isopropanol (600 mM) und **DMPO** (90 mM) in H₂O-MeCN (60 : 40); (b) **DMPO-OⁱPr**, detektiert bei der Photolyse von Thiazolthion **3b** (3.00 mM) und **DMPO** (27 mM); (c) eine Mischung von **DMPO-OⁱPr** und **DMPO-CMe₂OH**, detektiert bei der Photolyse von Pyridon **2b** (3.00 mM) und **DMPO** (27 mM); (d) und (e) die simulierte Spektren von **DMPO-OⁱPr** und **DMPO-CMe₂OH**, berechnet über die Parameter der experimentellen Spektren (a) und (b); (f) die Überlagerung der simulierte Spektren (d) und (e) im Verhältnis 1 : 3.

auch das Spektrum von **DMPO-CMe₂OH** wurden simuliert. Die Überlagerung beider Spektren im Verhältnis von 1 : 3 ergab exakt das experimentelle Spektrum, das bei der Bestrahlung des Pyridons **2b** in Gegenwart von **DMPO** in H₂O-MeCN (60 : 40) erhalten wurde. Das neben dem Isopropoxyradikal abgefangene Radikal konnte daher zweifelsfrei dem 2-Hydroxyprop-2-ylradikal zugeordnet werden.

4.2.6.3 Thiazolthion **3b** und Disulfid **7'** als Radikalfänger

Nachdem gezeigt worden war, dass das bei der Bestrahlung von Pyridon **2b** in wässrigem Medium abgefangene Radikal aus dem Isopropoxyradikal durch 1,2-H-Shift hervorgegangen ist, stellte sich nun die Frage warum dieses Radikal nicht auch bei der Photolyse des Thiazolthions **3b** als **DMPO-CMe₂OH**-Addukt detektiert wurde. Irgendeine Spezies im Photolysat des Thiazolthions **3b** muss mit **DMPO** um die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale erfolgreich konkurrieren können.

Um das zu überprüfen, wurde das Pyridon **2b** (1.0 mM) in Gegenwart des Thiazolthions **3b** (1.0 mM) bestrahlt (**V-58**). Das EPR-Spektrum zeigt, dass ausschließlich Isopropoxyradikale mit **DMPO** abgefangen wurden (Schema 4.8). Das Addukt der 2-Hydroxyprop-2-ylradikale (**DMPO-CMe₂OH**) wurde nicht mehr detektiert. Auch das Disulfid **7'** unterdrückte als Additiv bei der Photolyse des Pyridons **3b** die Bildung dieses Kohlenstoffradikaladduktes (Schema 4.8, **V-59**).



Schema 4.8. Effekt des Thiazolthions **3b** (1.0 mM) und des Disulfids **7'** (< 0.5 mM) auf das EPR-Spektrum von Pyridon **2b** (1.0 mM) bei Bestrahlung in Gegenwart von **DMPO** (27 mM) in H₂O-MeCN (60 : 40).

4.2.7 Strangbruchbildung in pBR 322 DNA durch Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b**

Zur Überprüfung, ob die Radikalquellen **2b** und **3b** Strangbruchbildung induzieren, wurde die Photolyse dieser *Photo-Fenton*-Reagenzien in Gegenwart der superhelikalen pBR 322 DNA durchgeführt, wobei auch ein Augenmerk auf die unterschiedliche Reaktivität beider gerichtet wurde (**V-60**). Wie in Abb 4.6 veranschaulicht, zeigen sowohl das Pyridon **2b** als auch das Thiazolthion **3b** eine geringe Photoaktivität zur Strangbruchbildung. Im Falle des Pyridons **2b** betrug die Ausbeute an offen-circularer DNA [OC DNA] $17\% \pm 1\%$, im Falle des Thiazolthions **3b** lediglich $12\% \pm 1\%$ (die Werte wurden um die Blindprobe korrigiert).

Die Zugabe von Isopropanol unterdrückte vollständig die Induktion von Strangbrüchen durch die beiden *Photo-Fenton*-Reagenzien **2b** und **3b**, was einen deutlichen Hinweis darauf gibt, dass Radikale die an der Schädigung beteiligten Spezies sind. Auch der Effekt des Lösungsmittels auf die Strangbruchbildung durch das Pyridon **2b** wurde untersucht. Es zeigte sich, dass seine Reaktivität zur Strangbruchbildung in reinem Wasser deutlich höher ist als in der Mischung aus MeCN und Wasser (40 : 60).

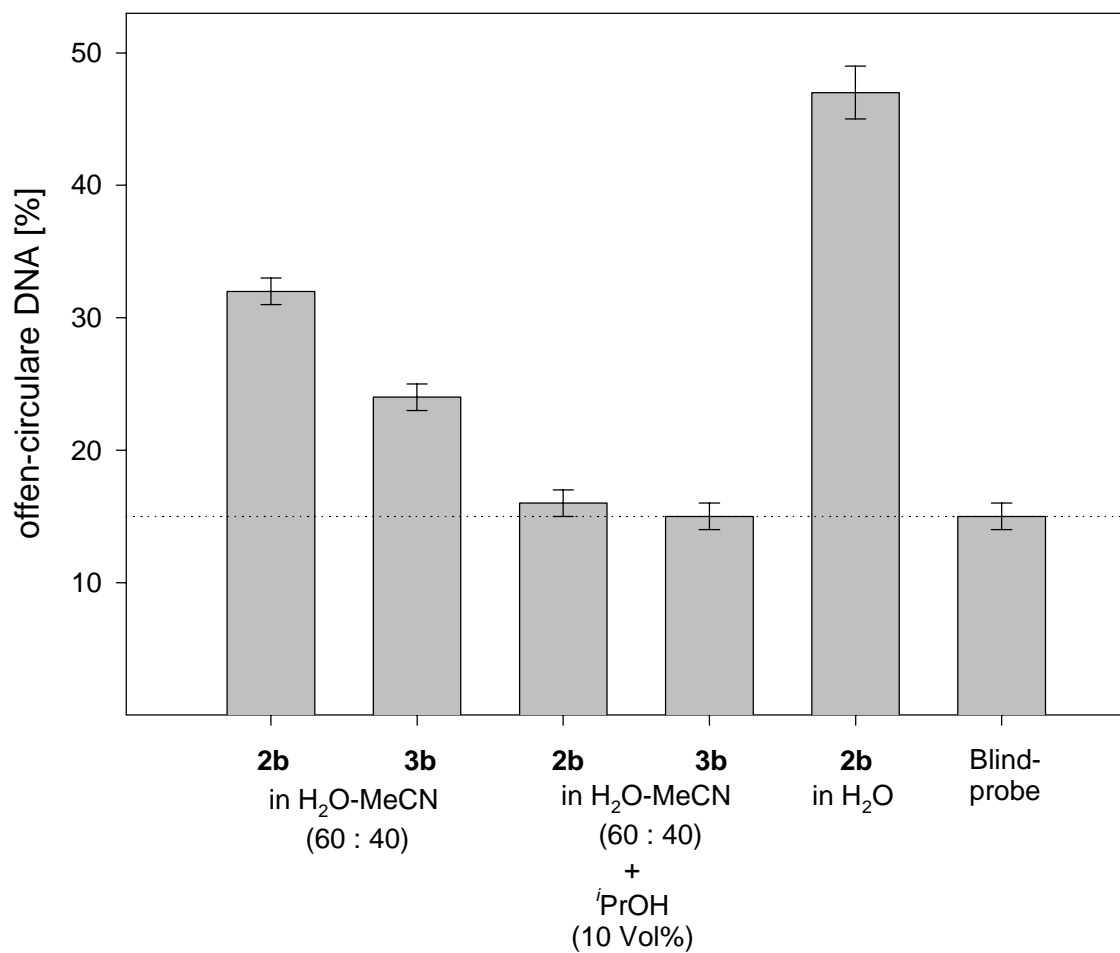


Abbildung 4.6. Strangbruchbildung bei der Photolyse (312 nm, 0 °C, 30 min) des Thiazolthions **3b** (4.00 mM) oder des Pyridons **2b** (4.00 mM) in Gegenwart der pBR 322 DNA (10 g/l) in KH₂PO₄ Puffer (5 mM, pH 7.4) und MeCN (60 : 40).

4.3 Diskussion

4.3.1 Spinabfangexperimente

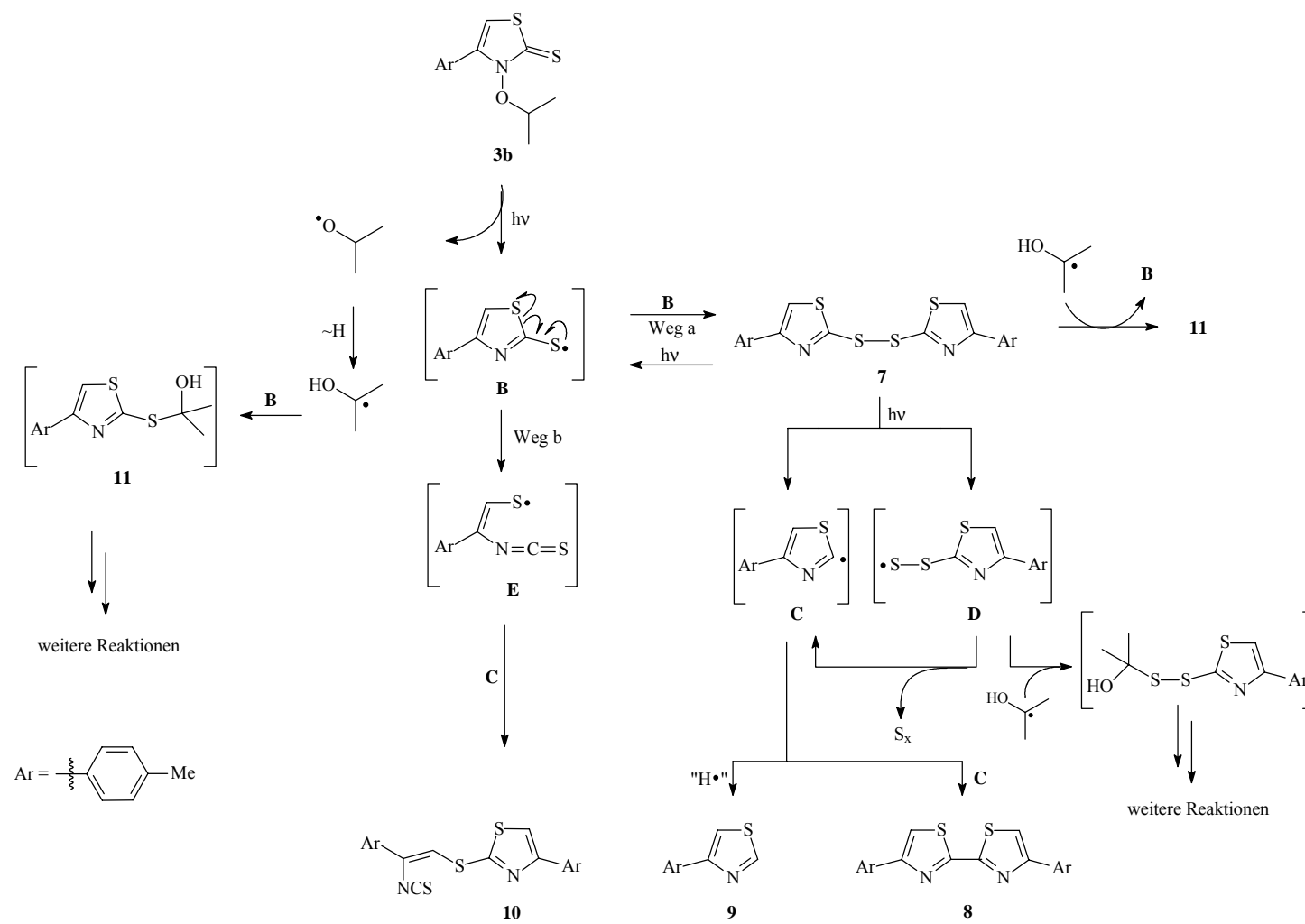
Die Spin-Abfangexperimente (Abb. 4.4, 4.5) dokumentierten zweifelsfrei, dass sowohl Pyridon **2b** als auch Thiazolthion **3b** photolytisch Isopropoxyradikale generieren. Es handelt sich also bei beiden Substanzen um photochemische Isopropoxyradikalquellen.

Der entscheidende Unterschied im photochemischen Verhalten beider *Photo-Fenton*-Reagenzien beruht darauf, dass das Pyridon **2b** in wässrigem Medium neben den Isopropoxyradikalen zusätzlich die kohlenstoffzentrierten 2-Hydroxyprop-2-ylradikale generiert. Letztere entstehen durch 1,2-H-Shift aus den Isopropoxyradikalen (Schema 4.6). Solche Umlagerungen sind für primäre und sekundäre Alkoxyradikale bekannt, insbesondere in Wasser, welches direkt bei dem Umlagerungsprozess involviert ist.¹⁴⁰ Der über die EPR-Experimente beobachtete 1,2-H-Shift der Isopropoxyradikale war also zu erwarten.

Erstaunlicherweise konnte jedoch dieses Kohlenstoffradikal nicht bei der Bestrahlung des Thiazolthions **3b** mit **DMPO** abgefangen werden [Abb. 4.4(g)]. Auch im Falle des Thiazolthions **3b** sollten die zunächst gebildeten Isopropoxyradikale den 1,2-H-Shift unterlaufen und die entsprechenden 2-Hydroxyprop-2-ylradikale bilden. Wenn letztere nicht als **DMPO**-Addukt detektiert wurden, müssen sie von irgendeinem Intermediat oder Photoprodukt des sich während der Bestrahlung zersetzenden Thiazolthions **3b** abgefangen worden sein. In der Tat konnte über Kontrollexperimente mit Pyridon **2b** gezeigt werden, dass bei der Photolyse in Gegenwart des Thiazolthions **3b** und des Disulfids **7'** auch das Pyridon **2b** keine mit **DMPO** abfangbaren 2-Hydroxyprop-2-ylradikale generiert (Schema 4.8). Offensichtlich sind also das Disulfid **7'** oder intermediär bei der Zersetzung des Thiazolthions **3b** auftretende Thiylradikale dafür verantwortlich, dass bei der Photolyse des Thiazolthions **3b** keine kohlenstoffzentrierten Radikale mit **DMPO** abgefangen werden können. Um näheren mechanistischen Einblick hierzu zu gewinnen, war es nötig, den photochemischen Zerfallsprozess der beiden *Photo-Fenton*-Systeme tiefergehend zu untersuchen.

4.3.2 Mechanismus der Produktbildung aus Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b**

Ein möglicher Mechanismus für den photochemischen Zerfallsprozess des Thiazolthions **3b** unter Bildung der isolierten Produkte **7-10** (Abschnitt 4.2.3) ist in Schema 4.9 dargestellt.

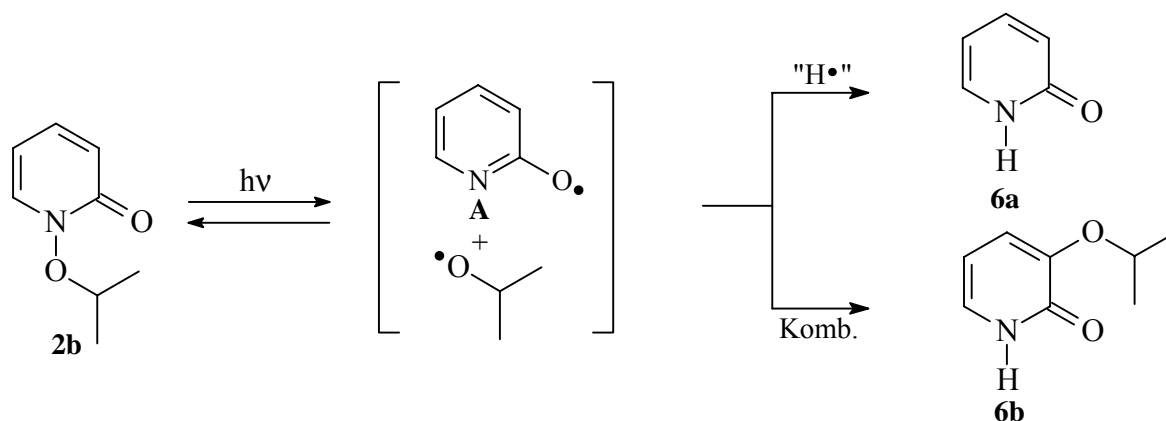


Schema 4.9. Vorgeschlagener Mechanismus für die Bildung der Photoprodukte von Thiazolthion **3b**

Alle Produkte gehen aus von dem Thiylradikal **B**, das durch die photochemische Spaltung der schwachen NO-Bindung generiert wird. Nach Dimerisierung entsteht das Disulfid **7**. Dieses Produkt ist nicht photostabil, sondern wird, was durch die Transientenspektroskopie bestätigt werden konnte [Abb. 4.2(d)], unter CS-Bindungsbruch in die Radikale **C** und **D** gespalten. Radikal **C**, das auch durch Schwefelabspaltung aus dem Radikal **D** hervorgehen kann, abstrahiert ein Wasserstoffatom unter Bildung des Thiazols **9** oder dimerisiert zu Bithiyl **8**. Das Isothiocyanat **10** entsteht mechanistisch wahrscheinlich aus Thiylradikal **B**, das nach Ringöffnung zum Thiylradikal **E** umlagert, um dann mit Radikal **C** zu kombinieren.

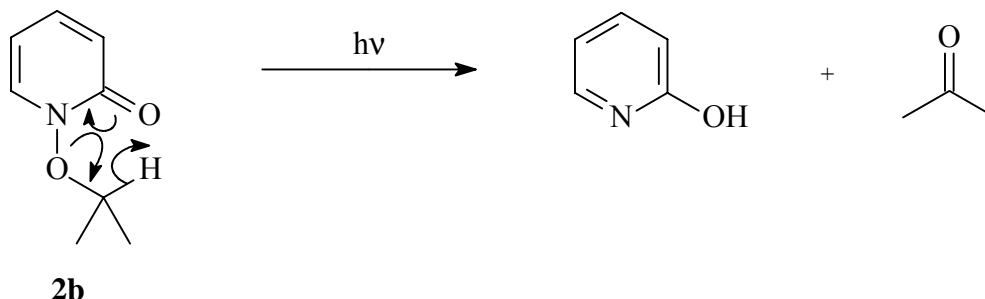
Da bei der Photolyse des Thiazolthions **3b** aber auch bei der Photolyse des Pyridons **2b** in Gegenwart von Disulfid **7'** keine 2-Hydroxyprop-2-ylradikale beobachtet werden konnten, sollte die Disulfidfunktion als Radikalfänger wirken und damit einen weiteren Reaktionsweg für das 2-Hydroxyprop-2-ylradikal eröffnen: Durch Addition des 2-Hydroxyprop-2-ylradikals an die Disulfidfunktion bildet sich das Hemithioacetal **11**, welches nicht photostabil ist und zu weiteren Produkten zerfällt. Auch die bei der Photolyse des Thiazolthions **3b** oder Disulfids **7** gebildeten Thiyl- (**B**) oder Perthiylradikale (**D**) könnten durch Radikal-Radikal-Kombination als Radikalfänger für das 2-Hydroxyprop-2-ylradikal fungieren.

Die Photoprodukte des Pyridons **2b** entsprechen den für *N*-Oxylpyridone nach Bestrahlung beschriebenen Produkten.¹¹⁶ Durch Photoanregung findet die Homolyse der NO-Bindung statt. Das resultierende Radikal **A** abstrahiert ein Wasserstoffatom unter Bildung des Pyridons **6a** oder rekombiniert mit dem Isopropoxyradikal zu Produkt **6b** (Schema 4.10). Die hohe



Schema 4.10. Vorgeschlagener Mechanismus für die Bildung der Photoprodukte von Pyridon **2b**

Quantenausbeute des NO-Bindungsbruchs $\Phi_{\text{N-O}}$ (75%) verdeutlicht, dass diese Spaltung der vorherrschende photochemische Zerfallsprozess für das Pyridon **2b** darstellt. Die mit ihr konkurrierende Norrish-Typ-II-Reaktion spielt eine nur untergeordnete Rolle (Schema 4.11).



Schema 4.11. Norrish-Typ-II-Reaktion des Isopropoxy pyridons **2b**

Weder das Pyridon **2b** noch seine Photoprodukte **6a,b** fangen die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale ab, so dass letztere bei der Photolyse in Gegenwart von **DMPO** als Addukte abgefangen werden konnten.

Da die Quantenausbeute der Radikalfreisetzung $\Phi_{\text{N-O}}$ im Falle des Pyridons **2b** ungefähr doppelt so hoch ist wie die der photochemischen Zersetzung Φ_{dec} , muss innerhalb des Solvenskäfigs eine Rekombination des Pyridoxyradikals **A** mit dem Isopropoxyradikal zurück zu der Ausgangsverbindung Pyridon **2b** stattfinden. Bezüglich der Beurteilung der Effektivität der Radikalfreisetzung aus Pyridon **2b** ist daher die Quantenausbeute der Zersetzung ein besseres Maß.

4.3.3 Strangbruchbildung durch Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b**

Nachdem das unterschiedliche photochemische Verhalten der *Photo-Fenton*-Reagenzien **2b** und **3b** aufgeklärt worden war, war es von besonderer mechanistischer Relevanz, die Reaktivität beider gegenüber der superhelikalen DNA zu untersuchen. In einer Lösungsmittelmischung von H₂O-MeCN (60 : 40) zeigten beide Verbindungen nur eine geringe Tendenz zur Strangbruchbildung. In Gegenwart des Radikalfängers Isopropanol hingegen konnte die Bildung der geschädigten, offen-circularen DNA völlig unterdrückt werden, was einen deutlichen Hinweis dafür gibt, dass radikalische Spezies für die Schädigung verantwortlich sind. Es bleibt aber ungeklärt, welche Radikale die Strangbrüche jeweils bewirken. Bei der Photolyse des Pyridons **2b** in rein wässrigem Medium war das 2-Hydroxyprop-2-ylradikal das alleinig abgefangene Radikal. In diesem Medium zeigte nun

das Pyridon **2b** eine doppelt so hohe Aktivität gegenüber der superhelikalen DNA wie in dem Lösungsmittelgemisch H₂O-MeCN (60 : 40). Da die Reaktionen mit der pBR 322 DNA unter atmosphärischen Bedingungen durchgeführt wurden, sollte das unter Ausschluss von Sauerstoff mit **DMPO** einzig detektierte 2-Hydroxyprop-2-ylradikal mit molekularem Sauerstoff zum entsprechenden Alkylperoxyradikal kombinieren. Die photoinduzierte DNA-schädigende Aktivität des Pyridons **2b** beruht demnach auf den Spezies, die aus der Zerfallskaskade des Isopropoxyradikals unter Beteiligung von Sauerstoff hervorgehen. Auch in der Lösungsmittelmischung von H₂O-MeCN (60 : 40) läuft dieser Zerfallsprozess ab, da auch unter diesen Bedingungen das 2-Hydroxyprop-2-ylradikal aus dem Pyridon **2b** generiert wurde.

Im Falle des Thiazolthions **3b** hingegen wurden unter allen angewandten Bedingungen lediglich die Isopropoxyradikale detektiert, da die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale sehr effizient *in situ* abgefangen werden. Die nur sehr schwache DNA-Strangbrüche induzierende Aktivität bei der Photolyse des Thiazolthions **3b** – das Thiazolthion **3b** ist weniger aktiv als das Pyridon **2b**, obwohl es, vergleicht man die Quantenausbeuten, deutlich effizienter photolysiert wird - ist daher auf die während der Bestrahlung generierten Isopropoxyradikale zurückzuführen.

4.3.4 Schlussfolgerung

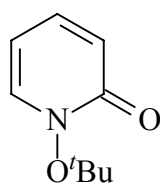
Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass Isopropoxyradikale, die von den *Photo-Fenton*-Reagenzien **2b** und **3b** primär generiert werden, relativ ineffektiv DNA-Strangbrüche induzieren. In wässrigem Medium hingegen, lagern die Isopropoxyradikale unter 1,2-H-Verschiebung zu den 2-Hydroxyprop-2-ylradikalen um, die in Gegenwart von molekularem Sauerstoff zu den entsprechenden Peroxyradikalen umgesetzt werden und schließlich eine höhere Aktivität zur Strangbruchbildung zeigen als ihre Vorläufer, die Isopropoxyradikale.

Die einzigartige Eigenschaft des Thiazolthions **3b**, die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale während der Photolyse *in situ* abzufangen, macht dieses Reagenz zu einer sauberen Alkoxyradikalquelle. Letztere Spezies können aber aufgrund ihrer schnellen Umlagerung zu den 2-Hydroxyprop-2-ylradikalen nur sehr ineffizient DNA-Schäden vermitteln.

5 Ausblick

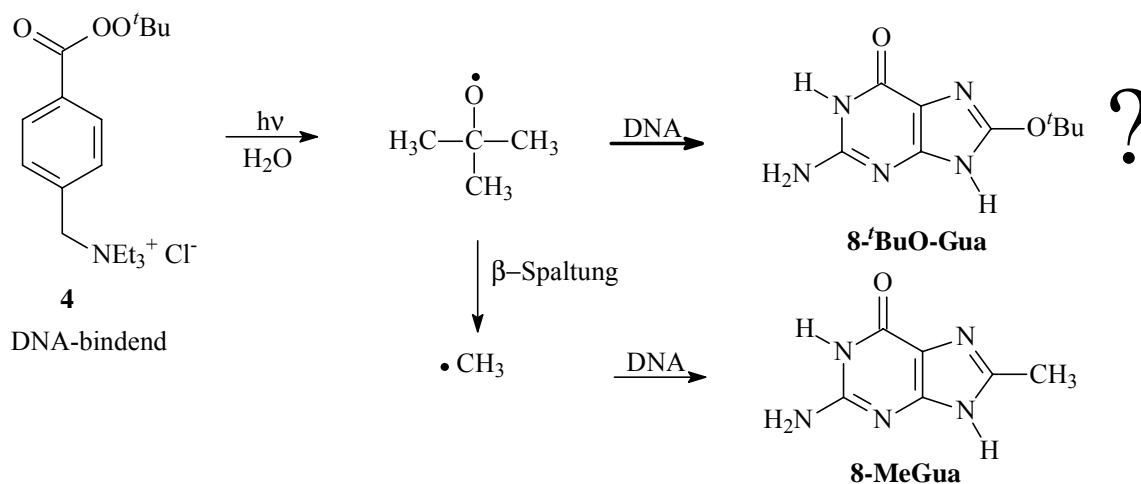
5.1 Weitere Studien mit dem Pyridon **2c** und dem Perester **4**

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass photochemische *tert*-Butoxylradikalquellen oxidative Schäden an **dG** nicht über die primär freigesetzten Alkoxyradikale sondern über Methylradikale vermitteln. *tert*-Butoxylradikale fragmentieren nämlich so effizient zu Methylradikalen, dass ihre Reaktion mit **dG** mit der β -Spaltung nicht



2c

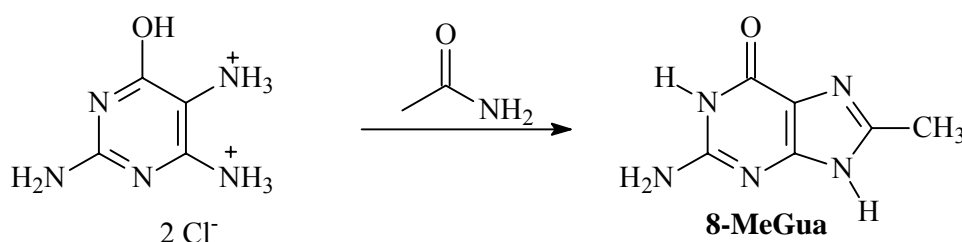
konkurrieren kann. Dies konnte sowohl für das Pyridon **2c** als auch für den Perester **4** gezeigt werden. Um *tert*-Butoxylradikal-induzierte Schäden beobachten zu können, müsste die Konzentration an **dG** mehr als zwei Größenordnungen höher gewählt werden als bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten. Dies ist aber aufgrund der ungenügenden Löslichkeit von **dG** in Wasser nicht verwirklichtbar. Eine erhöhte Reaktivität der *tert*-Butoxylradikale gegenüber Guanin lässt sich aber möglicherweise in der DNA realisieren. Der Perester **4** sollte aufgrund seiner Fähigkeit an die DNA zu binden, die Alkoxyradikale in größerer Nähe zu Guanin freisetzen als das Pyridon **2c**, so dass für die *tert*-Butoxylradikale das Verhältnis von β -Fragmentierung zur Oxidation von Guanin für die letztere begünstigt werden sollte (Schema 5.1). Es wäre also für photobiologische Zwecke wichtig heraus



Schema 5.1. Mögliche Reaktivität des Peresters **4** gegenüber Guanin in der DNA

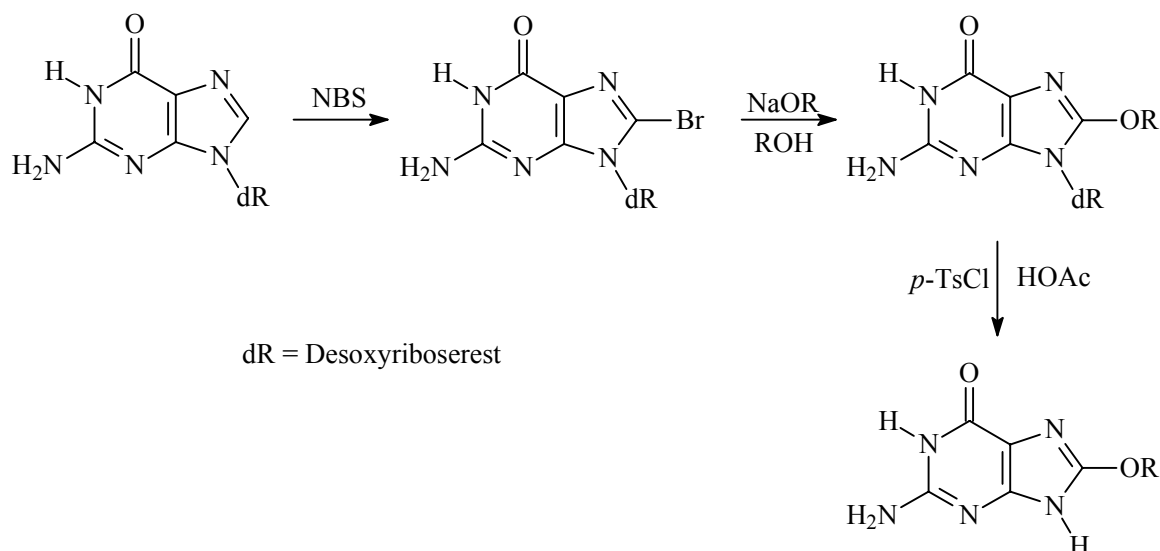
zufinden, ob bei Bestrahlung von DNA in Gegenwart von Perester **4** geringere Ausbeuten an Guanin-Methyladdukten gebildet werden als im Falle des Pyridons **2c**. Zu diesem Zweck

müsste das authentische **8-MeGua** synthetisiert werden, dessen Darstellung in der Literatur bekannt ist (Schema 5.2).¹⁴² Es sollte weiterhin überprüft werden, ob bei der Bestrahlung des



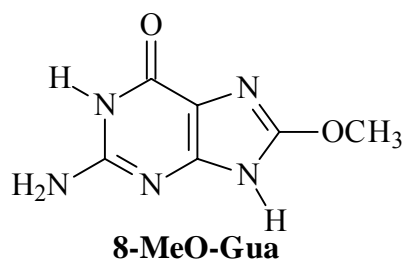
Schema 5.2. Synthese von **8-MeGua**, ausgehend von dem kommerziell erhältlichen 2,5,6-Triaminopyrimidin-4-ol.

DNA-bindenden Peresters **4** in Gegenwart von DNA auch Guanin-Addukte von *tert*-Butoxylradikalen detektiert werden können. Guanin ist an der Position C8 besonders empfindlich gegenüber Radikalen, so dass 8-*tert*-Butoxyguanin (***t*BuO-Gua**) als Standard für den HPLC-analytischen Nachweis solcher Addukte entwickelt werden sollte. Die Synthese dieses potentiellen Guanin-Oxidationsprodukts sollte in Analogie zu dem entsprechenden Methoxyderivat verlaufen, das literaturbekannt ist (Schema 5.3).¹⁴³⁻¹⁴⁵



Schema 5.3. Allgemeiner Synthesepfad für die Darstellung von 8-Alkoxyguanin-Derivaten

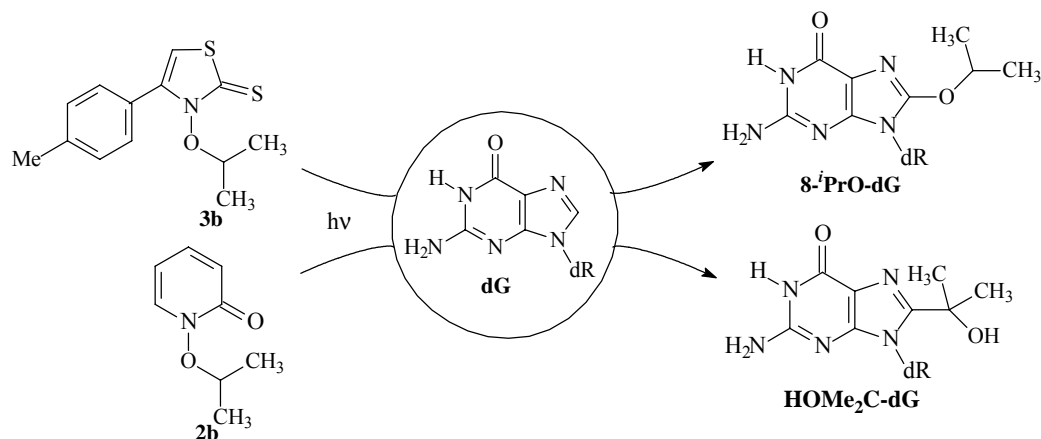
Bei der Oxidation von **dG** während der Photolyse in Gegenwart von Pyridon **2c** unter atmosphärischen Bedingungen sind mehrere Oxyradikale beteiligt, die aus den Methylradikalen nach Sauerstoffaddition und anschließender Weiterzersetzung gebildet werden. In der Zerfallskaskade der Methylradikale bilden sich auch Methoxyradikale. Es



sollte daher auch ermittelt werden, welche Rolle bei der oxidativen Schädigung von **dG** diese Methoxyradikale spielen, deren C-8-Addukt von **dG** (**8-MeO-Gua**) ebenfalls synthetisiert (Schema 5.3) und in den Photooxidationen nachgewiesen werden sollte.

5.2 Untersuchungen mit den Isopropoxyradikalquellen **2b** und **3b**

Das Pyridon **2b** generierte bei Photolyse Isopropoxyradikale, die in wässrigem Medium zu 2-Hydroxyprop-2-ylradikalen umlagern. Letztere sind nach Addition von molekularem Sauerstoff verantwortlich für die von dieser Radikalquelle induzierten Strangbrüche. Um einen Einblick in die Reaktivität dieser Radikale gegenüber der Base Guanin zu gewinnen, sollten auch Photolysen in Gegenwart von **dG** und Kalbsthymus-DNA durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang ist es von photobiologischer Bedeutung zu bestimmen, ob bei Reaktionsdurchführung unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale selbst auch Schäden vermitteln können. Unter sauerstofffreien Bedingungen sollte bei Bestrahlung des Pyridons **2b** in Gegenwart von **dG** das entsprechende C8-Addukt zu erwarten sein (**HOMe₂C-dG**, Schema 5.4). Da bei der Photolyse des Thiazolthions **3b**

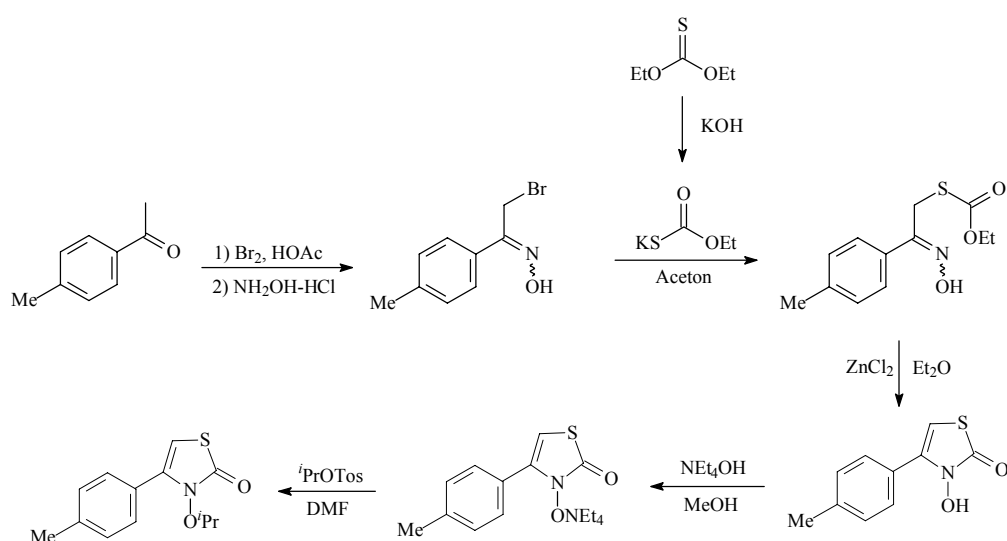


Schema 5.4. Guaninmodifikationen durch Thiazolthion **3b** und Pyridon **2b**

ausschließlich Isopropoxyradikale mit **DMPO** abgefangen wurden, sollte ein **dG**-Addukt des 2-Hydroxyprop-2-ylradikals bei diesem *Photo*-Fenton-Reagenz nicht gebildet werden; vielmehr sollte das Isopropoxyradikal an C-8 addieren (**iPrO-dG**). Das Thiazolthion **3b** und das Pyridon **2b** sollten also auch bezüglich der Guanin-Basenoxidation ein unterschiedliches Schadensprofil aufweisen.

5.3 Derivate des Thiazolthionsystems für mechanistische und photobiologische Studien

In der vorliegenden Arbeit erwies sich das Thiazolthion **3b** als selektive Quelle für Isopropoxyradikale, was auf das Disulfid **7** als Photoprodukt zurückgeführt wurde. Dieses fängt die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale ab und verhindert, dass sie mit **DMPO** oder der DNA reagieren. Zur weiteren Bestätigung, dass dieser Effekt wirklich auf das Disulfid **7** zurückzuführen ist, sollte das dem Thiazolthion **3b** analoge Oxoderivat synthetisiert werden (Schema 5.5).^{98,146,147} Da ein dem Disulfid **7** entsprechendes Produkt nicht entstehen



Schema 5.3. Syntheseroute eines Thiazolons als Isopropoxyradikalquelle

kann, sollte bei Bestrahlung des Thiazolons in Gegenwart von **DMPO**, wie im Falle des Pyridons **2b**, eine Mischung aus Isopropoxy- und 2-Hydroxyprop-2-ylradikalen abgefangen werden. Auf diese Weise könnte man untermauern, dass in der Tat das Disulfid **7** dafür verantwortlich ist, dass die 2-Hydroxyprop-2-ylradikale bei der Photolyse des Thiazolthions **3b** mit **DMPO** nicht abgefangen werden.

Das Thiazolthion **3b** hat den Makel, dass es nur durch Zugabe von erheblichen Mengen an Acetonitril als Kosolvens in wässrigem Medium löslich ist. Für photobiologische Untersuchungen, die in wässrigem Medium durchgeführt werden, ist es jedoch sehr wichtig, den Anteil an Kosolvens so niedrig wie möglich zu halten und so eine bessere Simulation des biologischen Systems zu erreichen. Durch Einführung einer Sulfonsäuregruppe oder einer

Ammoniumgruppe am Arylsubstituenten des Thiazolthions **3b** sollte seine Löslichkeit erheblich verbessert werden können (Abb. 5.1). Diese Verbindungen sollten analog zu dem in

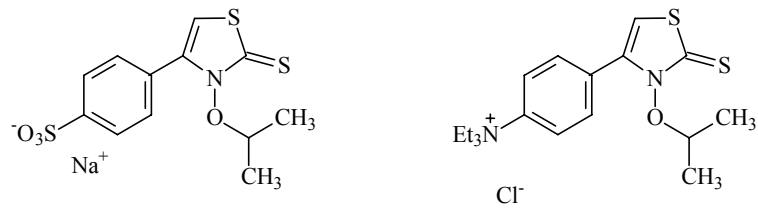


Abbildung 5.1. Beispiele für wasserlösliche Thiazolthione

dieser Arbeit untersuchten Thiazolthion **3b** synthetisiert werden (vgl. Schema 5.3).¹⁴⁷ Es ist zu erwarten, dass bei Bestrahlung auch ausschließlich Isopropoxyradikale abgefangen werden und diese bei der DNA-Basen-Oxidation und Strangbruchbildung als schädigende Spezies wirken. Somit hätte man den Vorteil des Pyridons **2b** (Wasserlöslichkeit) mit dem des Thiazolthions **3b** (langwellige UV-Absorption, ausschließliche Alkoxyradikalgenerierung) zu einem neuen, verbesserten System vereinigt.

6 Experimentalteil

6.1 Allgemeine Vorbemerkungen

6.1.1 Geräte für spektroskopische und analytische Untersuchungen

Spektroskopie

¹ H-NMR-Spektroskopie:	Bruker AC 200 (200 MHz) Bruker AC 250 (250 MHz)
¹³ C-NMR-Spektroskopie:	Bruker AC 200 (50 MHz) Bruker AC 250 (63 MHz)
HMBC-Methode	Bruker Advance 400 (400 MHz)
EPR-Spektroskopie:	Bruker EPR 300
IR-Spektroskopie:	FT-IR-Spektrophotometer (Perkin-Elmer Model 1605)
UV-VIS-Spektroskopie:	Hitachi U-3200 Spektrophotometer
Massenspektrometrie	MAT90 (Fa. Finnigan MAT)

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Probenaufnahme erfolgte zwischen Pumpensystem und analytischer Säule entweder manuell durch eine 20 µl- oder 50 µl-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) über ein Rheodyme-Injektionsventil Modell 7125 (Berkley, CA, USA) oder mit Hilfe eines Autosamplers [Basic-Marathon-Plus (Spark, Emmen, Niederlande)]. Der jeweilige Detektor war über eine möglichst kurze Verbindung an die Säule angeschlossen. Als Verbindungen zwischen dem Pumpensystem und dem Injektionsventil sowie zwischen Injektionsventil und Säule und zwischen Säule und Detektor wurden PEEK-Kapillaren oder Edelstahlkapillaren der Firmen Knauer GmbH (Berlin) und Upchurch verwendet. Folgende drei HPLC-Anlagen wurden eingesetzt:

Anlage 1:

Pumpen: Zwei Pumpen der Firma Bischoff (Leonberg) Modell 2200 (serielle Doppelkolbenpumpen) mit analytischen Pumpenköpfen (0.01 - 5.00 ml/min) und Hinterkolben-spülung kombiniert mit einer Hochdruckmischkammer der Firma Bischoff

UV-Detektion: Waters 994 programmierbarer Photodiodenarray Detektor mit zwei Kanälen

Fluoreszenzdetektion: Bischoff 8450 Fluoreszenz HPLC Monitor (Shimadzu RF 551 Spektrofluorometer)

Datenauswertung: Die Datenaufnahme und -auswertung sowie die Pumpensteuerung erfolgte über einen Personalcomputer mit dem Zweikanal-Chromatographie-Daten-System PEAK-MASTER 3 (Harley Systems) der Firma Harley Systems

Anlage 2:

Pumpen: Zwei Pumpen der Firma Bischoff (Leonberg) Modell 2200 (serielle Doppelkolbenpumpen) mit analytischen Pumpenköpfen (0.01 - 5.00 ml/min)

UV-Detektion: SpectraFlow 600 Diodenarray-Detektor der Firma SunChrom, Friedrichsdorf

Elektrochemische Detektion: ESA Coulochem Modell 5100 A mit "High Sensitive Analytical Cell" Modell 5011

Datenaufnahme: Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte über einen Personalcomputer mit der Software ChromStar 5.0 Release 9.

Anlage 3:

Pumpen: Applied Biosystems 140B Pumpe (bai, Bensheim)

MS-Detektion Finnigan TSQ 7000 Triple Quadrupol-Massenspektrometer LC-MS/MS (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Elektrospray Ionisation-Interface (ESI)

Datenaufnahme: ICIS Data System auf DEC Station 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring) und ICS 8.1 Software (Finnigan MAT, Bremen)

Gelelektrophorese

Elektrophoresekammer:	DNA-Horizontal-Elektrophoresekammer der Firma Pharmacia (GNA 100) mit einem "Gene Power Supply" (GPS 200/400)
Kamera:	Herolab E.A.S.Y. 429 K
UV-Schirm:	$\lambda_{\text{exc.}} = 366 \text{ nm}$
Software Integration:	Herolab E.A.S.Y. Plus enhanced Analysis System, Herolab GmbH Laborgeräte

Weitere Geräte

pH Meter:	pH-Werte wurden mit einem pH-Meter der Firma Wissenschaftliche Technische Werke (WTW, Weilheim) kombiniert mit einer pH-Elektrode LIQ-GLASS der Firma Hamilton bestimmt.
Vakuumkonzentrator:	Das Entfernen der Lösungsmittel aus den Eppendorf-Gefäßen sowie das Gefriertrocknen erfolgten in einem Vakuumkonzentrator der Firma Bachofer mit einem Schwingrotor vom Typ SRQ-Swing-44, kombiniert mit einer Vakuumölpumpe der Firma Bachofer (Saugleistung $5 \text{ m}^3/\text{h}$).
Pipetten:	Einstellbare Mikroliterpipetten der Firma Gilson (2, 20, 100, 200 und $1000 \mu\text{l}$) sowie der Firma Brand (200, 1000 und $5000 \mu\text{l}$)
Reaktionsgefäßschüttler:	GLW L46 (Vortex) der Firma Hartenstein, Würzburg
Zentrifuge:	Hettich-Mikroliter-Zentrifuge mit Rotor für 24 Eppendorf-Reaktionsgefäße

Schmelzpunktbestimmung: Büchi Melting Point B-545

6.1.2 Bestrahlungsapparaturen

Rayonet-Photoreaktoren: Für Bestrahlungen bei 300 oder 350 nm wurden Rayonet-Photoreaktoren der Firma Southern New England Ultraviolet Company, Branford, CT 06405, USA mit 16 UV-Lampen [RPR 3000 (300 nm, je 21 W) oder RPR 3500 (350 nm, 24 W)] eingesetzt.

Blacklight-Lampe: Für Bestrahlungen bei 312 nm wurde eine Blacklight-Lampe (312 nm, 30 W) der Firma Itf Labortechnik (Wasserburg, Deutschland) eingesetzt.

Hg-Lampe: 450-W USHIO UM-Hochdruckquecksilber-Lampe mit TOSHIBA UV-35 (350 nm) Glasfilter

Laser: Für die zeitaufgelösten Laserblitz-Photolysen wurde ein Lambda Physik EMG 101 MSC XeCl-Excimerlaser eingesetzt. Die Datenaufnahme erfolgte über MacFitFlash 2.0.1 von A.H.R.B. Software Corporation Basel.

6.1.3 Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Silicagel-Folien Polygram SIL G/UV₂₅₄ (40 x 80 mm) der Firma Machery-Nagel, Düren verwendet. Die UV-absorbierenden Substanzen wurden mit einer UV-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht. Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Korngröße 63 - 200 µm der Firma Woelm, Erlangen als stationäre Phase eingesetzt. Das Adsorbens-Substratverhältnis betrug 50 bis 100 : 1. Das Elutionsmittel ist bei den einzelnen Versuchen in Klammern angegeben.

6.1.4 Reagenzien und Lösungsmittel

Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Standard-Methoden gereinigt und getrocknet.

Für die Untersuchungen mit DNA und **dG** wurden ausschließlich Reagenzien von höchster Reinheit eingesetzt, die vor allem frei von DNA-schädigenden Verunreinigungen sein müssen. Die folgenden Reagenzien sind kommerziell erhältlich und wurden von den angegebenen Firmen bezogen:

Ethidiumbromid für biochemische Zwecke, **dG** und Borsäure wurden von Merck KGaA (Darmstadt), superhelikale pBR 322 DNA (Form I, MW 2.9×10^6 D, 4365 bp) von Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg) und Agarose von Serva Feinbiochemica GmbH (Heidelberg) erworben. Das Natriumsalz von 1,2-Naphthochinon-4-Sulfonsäure, Bromphenolblau „gel-loading solution“ und Tris(hydroxymethyl)-amino-methan (Trisbase) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) erworben. Ammoniumformiat und 2,2-Dimethylpyrrolin-*N*-oxid (**DMPO**) wurden von Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz) bezogen. Methanol und Acetonitril (beide HPLC-Qualität) wurden bei Fisher Scientific (Nidderau), Zitronensäure (p.a.) bei Riedel de Haën gekauft. Alle wässrigen Lösungen für Reaktionen und Chromatographie wurden mit Milli-Q-Wasser hergestellt. Die Bereitung der Pufferlösungen ist bei den jeweiligen allgemeinen Arbeitsvorschriften aufgeführt. Weitere für die Synthesen benötigten Chemikalien waren kommerziell erhältlich und sind an dieser Stelle nicht extra aufgelistet.

6.1.5 Arbeitsmethoden

Reaktionslösungen wurden mit einem Magnetrührer gerührt. Die angegebenen Reaktionstemperaturen beziehen sich auf das das Reaktionsgefäß umgebende Medium. Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert. Alle in dieser Arbeit photochemisch untersuchten Verbindungen wurden unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert. Reaktionslösungen in Eppendorf-Gefäßen wurden nach der Zugabe der Reagenzien gründlich geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Weitere Angaben bezüglich der Arbeitsmethoden finden sich bei den im Experimentalteil aufgeführten *Allgemeinen Arbeitsvorschriften*.

HPLC-Analytik

Methode 1

Säule: Reversed Phase, Eurosphere C-18, Partikelgröße 7 μm , mittlerer Porendurchmesser 100 \AA , Innendurchmesser 250 x 4.6 mm (Firma Knauer GmbH, Berlin)

Laufmittel: 50 mM Natriumcitratpuffer (pH 5.0)/ Methanol (95 : 5)

Flussgeschwindigkeit: 1.0 ml/min

Detektionsmethode: UV bei $\lambda = 300 \text{ nm}$

Methode 2:

Säule: Reversed Phase, Eurosphere C-18, Partikelgröße 5 μm , mittlerer Porendurchmesser 100 \AA , Innendurchmesser 250 x 4.6 mm (Firma Knauer GmbH, Berlin)

Laufmittel: MeCN/H₂O (95 : 5)

Flussgeschwindigkeit: 1.0 ml/min

Detektionsmethode: UV bei $\lambda = 300 \text{ nm}$

Methode 3:

Säule: Wie unter Methode 1

Laufmittel: 50 mM Natriumcitratpuffer (pH 5.0)/ Methanol (85 : 15)

Flussgeschwindigkeit: 1.0 ml/min

Detektionsmethode: UV bei $\lambda = 254 \text{ nm}$

Methode 4:

Säule: Reversed Phase, Eurosphere C-18, Partikelgröße 5 μm , mittlerer Porendurchmesser 100 \AA , Innendurchmesser 100 x 4.6 mm (Knauer GmbH, Berlin)

Laufmittel: 50 mM Formiatpuffer (pH 5.0)/ Methanol (85 : 15)

Flussgeschwindigkeit: 0.2 ml/min

Detektionsmethode: Electrospray Ionisation (ESI) im positiven Modus

Quarzkapillare 230 °C

ESI-Kapillarspannung: 3.5 kV

Sheatgas:	Stickstoff (50 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff (10 l/ min)
Stoßaktivierung (CID)	Argon, 2.00 mTorr, 8 eV

Methode 5:

Säule:	Wie unter Methode 1
Laufmittel:	50 mM Natriumcitratpuffer (pH 5.0)/ Methanol (80 : 20)
Flussgeschwindigkeit:	1.0 ml/min
Detektionsmethode:	Kanal 1: elektrochemischer Detektor +450 mV für 8-oxodG Kanal 2: UV bei $\lambda = 254$ nm für dG

Methode 6:

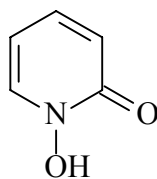
Säule:	Wie unter Methode 2
Laufmittel:	25 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 7.0)/ Methanol (90 : 10)
Flussgeschwindigkeit:	1.0 ml/min
Detektionsmethode:	Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm)

Quantifizierungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, unter Verwendung der authentischen Vergleichsverbindungen als externe Standards.

6.2 Untersuchung von Pyridon 2c und Perester 4

6.2.1 Synthese der Edukte

V-1: *N-Hydroxypyridin-2-on* (II-SFM-6)



2a

Zu 5 ml (5.00 g, 7.52 mmol) der kommerziell erhältlichen 20-%igen wässrigen Lösung von *N*-Oxypyridin-2-on-Natriumsalz wurde vorsichtig tropfenweise 37%ige Salzsäure hinzugegeben. Es bildete sich ein farbloser Feststoff, der durch Filtration getrennt wurde. Das Verfahren wurde mit dem Filtrat wiederholt bis sich kein Feststoff mehr bildete. Der Feststoff wurde mit 2 ml Wasser gewaschen und im Exsikkator über CaCl₂ getrocknet. Nach Umkristallisation aus Essigester wurden 342 mg (3.08 mmol, 41%, Lit.⁹⁹: keine Angabe) eines farblosen kristallinen Feststoffes, Smp.: 148-149 °C (Lit.¹⁴⁸: 148-149 °C) erhalten.

HPLC (Methode 1): $t_R = 10.4$ min

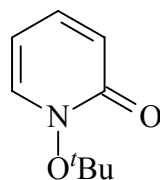
UV (H₂O): $\lambda_{\max} (\log \epsilon) = 298$ nm (3.70).-

IR (KBr): $\nu = 3568$ cm⁻¹ (OH), 3076 (C-H), 2361, 1637 (C-C), 1542 (C=O), 1542, 1369, 1227, 1174.-

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): $\delta = 6.33$ (dt, $J = 6.9$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1 H, arom. H), 6.72 (dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1 H, arom. H), 7.38 (ddd, $J = 9.0$ Hz, $J = 6.9$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1 H, arom. H), 7.78 (dd, $J = 6.9$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1 H, arom. H), 10.4 (s, 1 H, N-OH).-

¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz): $\delta = 110.1, 120.6, 137.8, 141.9, 162.0$ (C=O).-

V-2 Synthese von *N*-tert-Butoxy-2-pyridon (III-SFM-83, 43)



2c

1.00 g (9.00 mmol) Pyridon **2a** wurde in 80 ml Dichlormethan gelöst, und unter Rühren und Rückflusserhitzen wurden 4.73 g (20.4 mmol) Silberoxid und 6.10 g (44.5 mmol) *tert*-Butylbromid innerhalb von 12 h portionsweise hinzugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen (2 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden

mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (4 x 25 ml) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet, und am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel abdestilliert (40 °C, 12 Torr). Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel [Essigester/Petrolether (1:1)] gereinigt. Man erhielt 278 mg (3.87 mmol, 43%) eines farblosen Feststoffes.. Eine analytische Probe wurde aus Essigester/Petrolether umkristallisiert, Smp. 101-102 °C

DC [Essigester/Petrolether (1:1)]: $R_f = 0.17$

HPLC (Methode 2) $t_R = 4.8$ min

IR (KBr): $\nu = 2978$ cm^{-1} , 2363, 1656, 1584, 1528, 1368, 1262, 1150, 1102.-

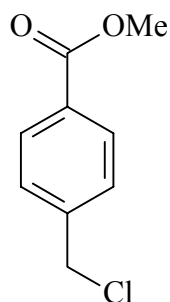
UV (H_2O): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 300 nm (3.75).-

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.40$ (dd, $J = 2.1, 7.2$ Hz, 1H), 7.25 (ddd, $J = 2.1, 7.1, 9.2$ Hz, 1H), 6.64 (dd, $J = 1.8, 9.2$ Hz, 1H), 6.04 (ddd, $J = 1.8, 7.1, 7.2$ Hz, 1H), 1.40 (s, 9H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) $\delta = 26.9$ (CH_3), 87.4 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 104.2, 123.1, 138.5, 139.1, 161.2 ($\text{C}=\text{O}$).-

$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2$ (153.2)	Ber.	C 64.65	H 7.84	N 8.38
	Gef.	C 64.59	H 7.76	N 8.52

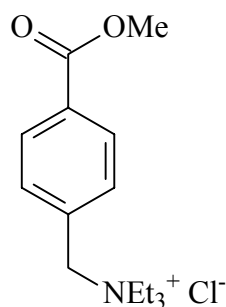
V-3: 4-Chlormethylbenzoesäuremethylester (V-SFM-10)¹⁰⁵



Unter Rühren wurden zu 15 ml abs. Methanol 5.00 g (26.5 mmol) 4-Chlormethylbenzoylchlorid innerhalb von 15 min so zugetropft, dass die Temperatur 30 °C nicht überstieg. Nach weiterem Rühren bei Raumtemperatur für 1 h wurde eine Lösung von 1 g NaOH in 8 ml MeOH bei 15 °C zugetropft. Es wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert (40 °C, 20 Torr), und die verbleibende, teilweise auskristallisierte Flüssigkeit wurde fraktionierend destilliert. Man erhielt 3.88 g (21 mmol, 81%, Lit.¹⁰⁵ 93%) eines farblosen Öls.

¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD) δ = 8.00 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.89 (s, 3H).-

V-4: [4-(*N,N,N*-Triethylammoniummethyl)benzoesäuremethylester]chlorid
(V-SFM-11, II-LEG-85)¹⁰⁴

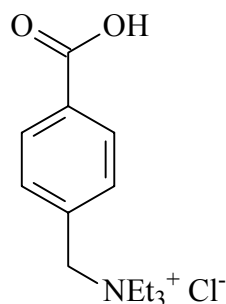


Zu einer Lösung von 3.88 g (21.0 mmol) 4-Chlormethylbenzoesäuremethylester in 12 ml Toluol, 12 ml Aceton und 1.2 ml DMF wurden innerhalb von 1 h bei 50 °C 4.92 ml (35.3 mmol) Triethylamin getropft. Es wurde für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fiel ein farbloser voluminöser Feststoff aus. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels (80 °C, 15 Torr) blieb eine zähe, gelbliche Masse zurück, die in 100 ml Diethylether suspendiert und im Ultraschallbad kristallisiert wurde. Man erhielt 3.45 g (12.1 mmol, 58%, Lit.¹⁰⁴: 59%) eines farblosen, stark hygroskopischen Feststoffs, Smp. 159-161 °C (Lit.¹⁰⁴:73-75 °C), es handelt sich dabei offensichtlich um eine falsche Angabe).

¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD) δ = 1.45 (t, J = 7.0 Hz, 9H), 3.31 (q, J = 7.0 Hz, 6H), 3.93 (s, 3H), 4.60 (s, 2H), 7.70 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.13 (d, J = 8.1 Hz, 2H).-

^{13}C -NMR (50 MHz, CD_3OD) $\delta = 8.8, 53.9, 54.9, 61.6, 132.7, 134.8, 135.1, 135.4,$
169.2 (C=O).-

V-5: [4-(*N,N,N*-Triethylammoniummethyl)benzoesäure]chlorid (V-SFM-12)¹⁰⁴

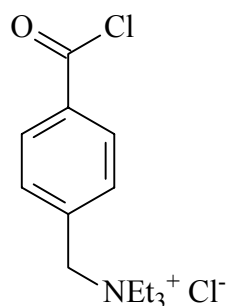


3.45 g (12.1 mmol) [4-(*N,N,N*-Triethylammoniummethyl)benzoesäuremethylester]chlorid wurden in 180 ml 18%-iger Salzsäure für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert (60 °C, 15 Torr). Es blieben 3.12 g (11.5 mmol, 95%, Lit.¹⁰⁴: 94%) eines farblosen Feststoffs (Smp. 210-211 °C, Lit.¹⁰⁴: 127-129 °C, es handelt sich dabei offensichtlich um eine falsche Angabe) zurück.

^1H -NMR (200 MHz, CD_3OD) $\delta = 1.44$ (t, $J = 7.0$ Hz, 9H), 3.29 (q, $J = 7.0$ Hz, 6H), 4.56 (s, 2H), 7.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H).-

^{13}C -NMR (50 MHz, CD_3OD) $\delta = 8.7, 54.9, 61.6, 132.7, 134.9, 135.1, 135.4, 169.2$ (C=O).-

V-6: [4-(*N,N,N*-Triethylammoniummethyl)benzoylchlorid]chlorid (V-SFM-13)¹⁰⁴

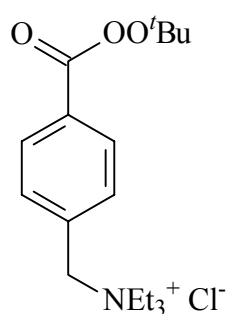


3.12 g (11.5 mmol) [4-(*N,N,N*-Triethylammoniummethyl)benzoesäure]chlorid wurden in 180 ml frisch destilliertem Thionylchlorid gelöst und für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abdestillation des Lösungsmittels (80 °C, 40 Torr) blieb ein öliger Feststoff zurück, der durch

Zugabe von Dichlormethan kristallisiert werden konnte. Man erhielt 2.51 g (9.85 mmol, 75%, Lit.¹⁰⁴: 94%) eines farblosen Pulvers, Smp. 95-100 °C (Lit.¹⁰⁴: keine Angabe)

¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD) δ = 1.44 (t, J = 7.0 Hz, 9H), 3.29 (q, J = 7.0 Hz, 6H), 4.59 (s, 2H), 7.70 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 8.14 (d, J = 8.2 Hz, 2H).-

V-7: [4-(*N,N,N*-Triethylammoniummethyl)benzoesäure-*tert*-butylperester]chlorid
(V-SFM-14)¹⁰⁴



4

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 520 mg (1.79 mmol) [4-(*N,N,N*-Triethylammoniummethyl)benzoylchlorid]chlorid in 6 ml abs. Dichlormethan suspendiert. Bei 0 °C wurden 480 μ l frisch dest. Pyridin und 936 μ l einer 4.5 mM Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in Nonan zugegeben. Bei dieser Temperatur wurde für 6 h, bei Raumtemperatur für weitere 12 h und bei 50 °C schließlich für 5 h gerührt. Der während der Reaktion ausfallende Feststoff wurde abfiltriert, und die Mutterlauge am Rotationsverdampfer eingengt. Der zurückbleibende farblose Feststoff wurde in Chloroform gelöst, mit 2 g NaHCO₃ und 3 Tropfen Wasser versetzt und für 1 h gerührt. Die Suspension wurde filtriert, und das Lösungsmittel des Filtrats abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde mit 40 ml Diethylether versetzt und im Ultraschallbad kristallisiert. Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und der Rückstand im Vakuum (15 Torr) getrocknet. Man erhielt 408 mg (1.19 mmol, 66%, Lit.¹⁰⁴: 65%) eines farblosen kristallinen Feststoffs.

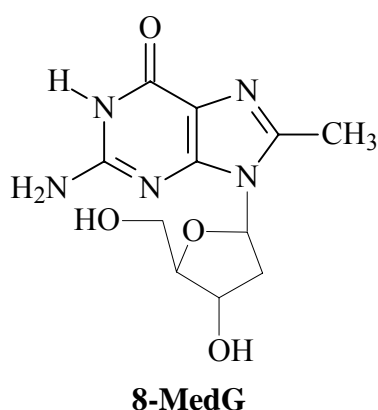
UV (H₂O): λ_{\max} (log ϵ) = 278 (3.00).-

IR (Nujol): ν = 1755 cm⁻¹, 1243, 1184, 1070, 1018, 108.-

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O) δ = 1.25 (t, J = 7.0 Hz, 9H), 3.11 (q, J = 7.0 Hz, 6H), 4.26 (s, 2H), 7.53 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.91 (d, J = 8.1 Hz, 2H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, D_2O) δ = 9.44, 27.7, 55.0, 61.6, 88.7, 130.7, 132.2, 135.4, 135.6, 166.8 (C=O).-

V-8: 8-Methyl-2'-desoxyguanosin (IV-SFM-62)¹¹⁵



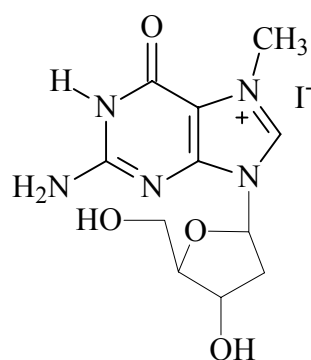
4.15 g (15.0 mmol) $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und 1.00 g (3.74 mmol) 2'-Desoxyguanosin wurden bei 0°C in 200 ml 1N H_2SO_4 gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0°C eine Lösung von 1.51 ml (11.0 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid (70%) in 20 ml Wasser innerhalb von 3 min zugetropft. Nach Neutralisation mit 1 N NaOH wurde das Lösungsmittel abdestilliert (40°C , 15 Torr). Der Rückstand wurde mit heißem Methanol (2 x 100 ml) extrahiert. Nach Abdestillation des Lösungsmittels (40°C , 100 Torr) blieb ein bräunlicher Feststoff zurück, der durch Säulenchromatographie an Kieselgel [300 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9 : 1, 1.5 l $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5 : 1, 300 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 : 1] gereinigt wurde. Man erhielt 73.0 mg (0.26 mmol, 7%, Lit.¹¹⁵: 29%) eines farblosen Feststoffes, Smp. $226\text{-}228^\circ\text{C}$ (Lit.¹¹⁵: $226\text{-}229^\circ\text{C}$).

HPLC (Methode 4): $t_{\text{R}} = 7.3$ min.-

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O (40% CD_3CN) $\delta = 2.46$ (ddd, $J = 13.8$ Hz, $J = 6.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz 1H), 2.65 (s, 3H, CH_3), 3.10 (m, 1H), 3.98 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 6.40 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 6.4$ Hz, 1H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, DMSO) $\delta = 15.8$ (CH_3), 38.5, 62.6, 71.6, 83.9, 88.1, 116.0, 145.4, 152.6, 153.8, 157.2.-

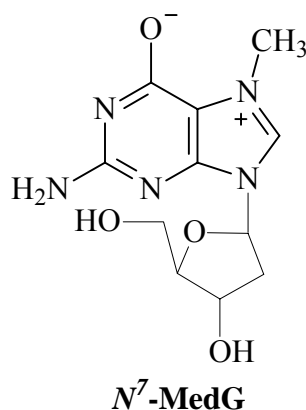
V-9: *N*⁷-Methyl-2'-desoxyguanosiniodid (V-SFM-3)¹¹⁴



2.00 g (7.01 mmol) 2'-Desoxyguanosin x H_2O wurden in 15 ml Dimethylsulfoxid gelöst und nach Zugabe von 2.00 ml (31.5 mmol) Methyljodid wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine rötliche Verfärbung eintrat. Der Überschuss an Methyljodid wurde mit Stickstoff herausgeblasen und die Reaktionslösung mit 120 ml Dichlormethan verdünnt und für 2.5 h bei 0 °C gelagert. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit 10 ml kaltem Ethanol und 10 ml kaltem Diethylether gewaschen. Man erhielt 2.17 g (5.08 mmol, 72%, Lit.^{114b}: 77%) eines farblosen Feststoffes, Smp.: Zersetzung bei 135 °C (Lit.^{114a}: Zersetzung bei 135 °C).

IR (KBr): $\nu = 3300$ cm^{-1} , 3200, 2940, 1700, 1630, 1360, 1180, 1080, 760.-

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O) $\delta = 2.54$ (m, 2H), 3.66 (m, 2H), 3.93 (s, 3H, $\text{N}^7\text{-CH}_3$), 4.02 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 6.23 (m, 1H) 8.93 (s, 1H).-

V-10: *N*⁷-Methyl-2'-desoxyguanosin (V-SFM-4)^{114b}

2.10 g (4.92 mmol) *N*⁷-Methyl-2'-desoxyguanosiniodid wurden in 120 ml Ethanol suspendiert, nach Abkühlung auf 0 °C mit 22 ml Methylamin (40% in Wasser) versetzt und bei gleicher Temperatur für 1 h gerührt. Der farblose Feststoff wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und mit 50 ml kaltem Ethanol und 80 ml kaltem Diethylether gewaschen. Nach Trocknen über Blaugel im Exsikkator erhielt man 1.01 g (3.59 mmol, 73%, Lit.^{114b}: 66%) eines farblosen Feststoffes, Smp. 210-212 °C (Lit.¹⁴⁹: 210 °C).

IR (KBr) : 3440 cm⁻¹, 3310, 2790, 1620, 1550, 1330, 1100.-

¹H-NMR (200 MHz, D₂O) δ = 2.49 (m, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 4.00 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 6.16 (m, 1H).-

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO) δ = 35.1 (C_{CH₃}), 40.0, 61.5, 70.4, 84.9, 88.6, 108.9, 131.9, 149.3, 163.2, 163.5.-

6.2.2 Bestimmung der Quantenausbeute des photochemischen Zerfalls von Pyridon 2c mittels Kaliumferrioxalat-Aktinometrie

V-11: *Synthese von Kaliumferrioxalat* (III-SFM-50)¹⁰⁷

Zu einer 1.50 M wässrigen Lösung von Kaliumoxalat [18.8 g (113 mmol) in 75 ml Wasser] wurde eine 1.50 mM wässrige Lösung von Eisen-(III)-chlorid [6.08 g (37.5 mmol) in 25 ml Wasser] gegeben. Nach 1 h Rührens unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur wurde der

grüne Niederschlag abfiltriert und aus 75 ml heißem Wasser umkristallisiert. Man erhielt 4.57 g (16.9 mmol, 45%, Lit.¹⁰⁷: keine Angabe) eines leuchtend grünen Feststoffs.

V-12: *Bestimmung der Quantenausbeute der photochemischen Zersetzung Φ_{dec} von Pyridon 2c (IV-SFM-47)*

a) Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-1) für die Ferrioxalat-Aktinometrie¹⁰⁷

Stammlösungen:

- (a) Phenanthrolin-Lösung : 0.1 Massenprozent in Wasser (100 mg in 100 ml Lösung)
- (b) Puffer-Lösung: 8.20 g (60.3 mmol) Natriumacetat x 3 H₂O und 1.00 ml konz. Schwefelsäure wurden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- (c) Kaliumeisenoalat-Lösung: 506 mg (1.03 mmol) in 0.1 N Schwefelsäure

Durchführung:

Alle Arbeiten wurden um die UV-Strahlung zu reduzieren in einem dunklen Raum in Gegenwart einer Rotlichtlampe durchgeführt. Jeweils 1.50 ml der Kaliumeisenoalatlösung (c) wurden in eine UV-Küvette und in ein Glasgefäß überführt. Die Lösung im Glasgefäß wurde als Blindprobe unter Ausschluss von Licht verwahrt. Die Lösung in der UV-Küvette wurde für exakt 2.00 min mit einer Blacklightlampe (312 nm) bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) bestrahlt. Die bestrahlte und die unbestrahlte Probe wurden anschließend in gleicher Weise aufbereitet: Je 1.00 ml der Proben wurden zuerst mit 1.00 ml der Pufferlösung (b), dann mit 2.00 ml der Phenanthrolin-Lösung (a) versetzt und mit Wasser auf 10 ml verdünnt. Nach kurzem Schütteln der Lösungen wurden beide Proben für zwei Stunden im Dunkeln aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurde die Differenz der Absorption (ΔE_1) zwischen der bestrahlten (E_1) und der unbestrahlten Probe (E_0) bei 510 nm bestimmt. Die Bestimmung wurde für eine weitere, unabhängig von der ersten durchgeführten Reaktion wiederholt (ΔE_1 , ΔE_2).

$$\Delta E_1 = 0.2873$$

$$\Delta E_2 = 0.3238$$

Daraus wurde die Anzahl der eingestrahnten Photonen nach Gleichung 6.1¹⁰⁷ berechnet:

$$\text{Photonenzahl} = \frac{V_1 \times V_3}{V_2 \times d} \times \frac{\Delta E_{510}}{\epsilon_{510}} \times \frac{1}{\Phi \times t} \quad (\text{Gl. 6.1})$$

mit

- V_1 Volumen der bestrahlten Aktinometer-Lösung (hier: 1.50 ml)
- V_2 Volumen der bestrahlten Aktinometer-Lösung, die von V_1 entnommen wurde (hier: 1.00 ml)
- V_3 Volumen, auf das die bestrahlte Probe bei der Aufbereitung verdünnt wurde (hier: 10.0 ml)
- ΔE_{510} Absorptionsdifferenz bei 510 nm zwischen bestrahlter und nicht-bestrahlter Aktinometerlösung
- ϵ_{510} Extinktionskoeffizient des gebildeten Fe(II)phen₃-Komplexes bei 510 nm ($\epsilon_{510} = 1.11 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁰⁷
- d optische Weglänge bei der UV-Messung (hier: 1 cm)
- Φ Quantenausbeute des Aktinometers bei Bestrahlung (312 nm) Fe(II) zu bilden (1.24)¹⁰⁷
- t Bestrahlungszeit (hier: 2 min)

Nach dieser Gleichung wurde eine Photonenzahl von $(1.67 \pm 0.10) \times 10^{-7} \text{ Einstein min}^{-1}$ ermittelt.

b) Bestrahlung des Pyridons 2c

1.50 ml einer 0.50 mM Lösung von Pyridon **2c** in Wasser wurde unter genau den identischen Bedingungen wie der Aktinometer in einer UV-Küvette bei Raumtemperatur für 2.0 min photolysiert. Der Umsatz an Pyridon **2c** wurde mittels HPLC und UV-Detektor (Methode 2) bestimmt und betrug $7.4 \pm 0.1\%$, das $0.074 \times 0.5 \times 10^{-6} \text{ mol ml}^{-1} \times 1.5 \text{ ml} = 5.5 \times 10^{-8} \text{ mol}$ an umgesetzten Pyridon **2c** entspricht.

Damit wurde die Quantenausbeute der Zersetzung Φ_{dec} nach Gleichung 6.2¹⁰⁶ bestimmt:

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ = 1.39 (s, 1H, CH_3), 6.15 (dd, J = 7.3 Hz, 6.5 Hz, 1H, H-6'), 7.07 (dd, J = 7.3 Hz, 1.8 Hz, 1H, H-4'), 7.14 (dd, J = 6.5 Hz, 1.8 Hz, 1H, H-5').-

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ = 28.1 (t, C-2), 81.2 (s, C-1), 106.2 (d, C-5'), 129.4 (d, C-6'), 131.0 (d, C-4'), 145.9 (s, C-3'), 163.7 (s, C-2').-

Die Kopplungen im HMBC-Spektrum sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

HRMS (EI): berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2$: 167.0946, gefunden: 167.0947.

Tabelle 6.1. 2J - und 3J -Kopplungen aus dem HMBC-Spektrum ^{a)}

H-Atom (δ_{H} in [ppm])	C-Atome (δ_{C} in [ppm]) mit 2J - und 3J -Kopplungen zu den entsprechenden H-Atomen		
H-4' (6.77)	C-6' (129.4)	C-3' (145.9)	C-2' (163.7)
H-5' (6.19)		C-6' (129.4)	C-3' (145.9)
H-6' (7.03)	C-5' (106.2)	C-4' (131.0)	C-2' (163.7)

^{a)} Heteronuclear-Multiple-Bond Correlation;

6.2.4 Nachweis von Radikalen bei der Photolyse des Pyridons 2c und des Peresters 4 mittels DMPO-Spintrapping und EPR-Spektroskopie

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-2) für die Durchführung der EPR-Studien mit 5,5-Dimethylpyrrolin-N-oxid (DMPO):

Für die Spinabfangexperimente wurden 1000 μl Probenlösungen von Pyridon 2c und DMPO in Wasser oder Benzol im Rayonet (300 nm) bestrahlt. Zur Photolyse unter atmosphärischen Bedingungen wurden verschließbare 3-ml-Glasgefäße verwendet, zur Photolyse unter weitgehendem Ausschluss von molekularem Sauerstoff Schlenkrohre. Im letzteren Fall wurden die Proben vor der Bestrahlung durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ entgast und mit Stickstoffgas belüftet. Zur Kühlung diente ein in einem 3-L Becherglas befindliches Ethanolbad, dessen Temperatur durch einen Kryostaten (Typ RKT-20-D, Wobser GmbH, Lauda-Königshofen) auf ca. 10 °C gehalten wurde und in dem die Proben fixiert waren. Die

spektroskopischen Messungen wurden in einer Quarzglasflachzelle mit einem Bruker EPR-300-Spektrometer (Bruker, ER, 160FC) unmittelbar nach der Bestrahlung durchgeführt. Die Spektrometereinstellungen waren wie im folgenden angegeben: microwave power 20 mW, modulation amplitude 0.52 G, time constant 1.28 ms, scan rate 100 G / 83.9 s und receiver gain 2×10^4 . Die genauen Reaktionsbedingungen und die Kopplungskonstanten der detektierten **DMPO**-Addukte sind bei den jeweiligen Versuchen aufgeführt.

V-14: *Bestrahlung von Pyridon 2c in Benzol (III-SFM-33)*

Eine Lösung von Pyridon **2c** (3.00 mM) und **DMPO** (90 mM) in Benzol wurde gemäß AAV-2 für 10 min unter atmosphärischen Bedingungen im Rayonet (300 nm) bestrahlt. Die Kopplungskonstanten der detektierten Addukte sind in Tabelle 6.2 aufgelistet

Tabelle 6.2. Messwerte für den Landé-Faktor (g) und die Hyperfeinkopplungskonstanten (a_H , a_N) der **DMPO**-Abfangprodukte in der Photolyse^{a)} des Pyridons **2c** und des Peresters **4**

V-	Radikalquelle ^{b)}	Solvens	Addukt	g-Wert	a_H [G]	a_N [G]
14	Pyridon 2c	Benzol ^{c)}	DMPO-O^tBu	2.0057	8.3	12.8
15	Pyridon 2c	H ₂ O ^{d)}	DMPO-O^tBu	2.0054	16.2	15.0
			DMPO-Me	2.0051	23.6	16.3
16	Pyridon 2a + DMSO (1 Vol%)	H ₂ O ^{d)}	DMPO-Me	2.0052	23.4	16.4
18	Perester 4	H ₂ O ^{d)}	DMPO-O^tBu	2.0054	15.1	15.1
			DMPO-Me	2.0052	23.6	16.3
			unbekanntes Addukt	2.0054	---	15.1

^{a)} Bedingungen: 300 nm, 10 °C, 10 min; ^{b)} Konzentration jeweils 3.00 mM; ^{c)} unter atmosphärischen Bedingungen; ^{d)} unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff.

V-15: *Bestrahlung von Pyridon 2c in Wasser unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff*
(IV-SFM-79.5)

Eine Lösung von Pyridon **2c** (3.00 mM) und **DMPO** (90 mM) in Wasser wurde gemäß AAV-2 für 10 min unter Ausschluss von Sauerstoff im Rayonet (300 nm) bestrahlt. Die Kopplungskonstanten der detektierten Addukte sind in Tabelle 6.2 aufgelistet.

V-16: *Authentische Generierung des **DMPO-Me**-Adduktes* (IV-SFM-75)^{74,150}

Eine Lösung von *N*-Hydroxy-2-pyridon **2a** (3.00 mM), DMSO (1 Vol%) und **DMPO** (90 mM) in Wasser wurde gemäß AAV-2 für 10 min unter Ausschluss von Sauerstoff im Rayonet (300 nm) bestrahlt. Die Kopplungskonstanten der detektierten Addukte sind in Tabelle 6.2 aufgelistet.

V-17: *Bestrahlung von Pyridon 2c in Abhängigkeit von der **DMPO**-Konzentration*
(IV-SFM-79)

Eine Lösung von Pyridon **2c** (3.00 mM) in Wasser wurde für 10 min in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an **DMPO** (30, 60 und 90 mM) unter Ausschluss von Sauerstoff im Rayonet (300 nm) gemäß AAV-2 bestrahlt. Es wurde eine Mischung von **DMPO-Me** und **DMPO-O'Bu**-Signalen detektiert. Mit abnehmender Konzentration an **DMPO** stieg der Anteil an **DMPO-Me**.

V-18: *Bestrahlung von Perester 4 in Abhängigkeit von der **DMPO**-Konzentration* (V-SFM-16)

Eine Lösung von Perester **4** (3.00 mM) in Wasser wurde für 10 min in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an **DMPO** (30, 60 und 90 mM) unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff im Rayonet (300 nm) gemäß AAV-2 bestrahlt. Es wurde eine Mischung von **DMPO-Me** und **DMPO-O'Bu**-Signalen detektiert. Mit abnehmender Konzentration an **DMPO** stieg der Anteil an **DMPO-Me**. Zusätzlich wurde ein Zersetzungsprodukt von **DMPO** detektiert. Die Kopplungskonstanten der detektierten Addukte sind in Tabelle 6.2 aufgelistet.

6.2.5 Photooxidation von pBR 322 DNA

6.2.5.1 Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen mittels Gelelektrophorese

a) Vorbereitung der Versuche

Sicherheitsvorkehrungen

Der Hautkontakt mit dem zum Anfärben der Gele verwendeten Ethidiumbromid muß strikt vermieden werden. Deshalb wurden alle Arbeiten sorglich mit Handschuhen durchgeführt.

Verwendete Chemikalien

Die eingesetzten Reagenzien sind alle in Abschnitt 6.1.4 aufgeführt.

Verwendete Pufferlösungen

Die Pufferlösungen wurden im Dunkeln bei 5 °C gelagert und regelmäßig erneuert.

Die für die Reaktionen mit pBR-322-DNA ($I_{1/2}$ -Puffer) und die Gelelektrophorese (TBE-Puffer) verwendeten Puffer- und Stammlösungen wurden wie folgt hergestellt:

TBE-Puffer

Der TBE-Puffer besteht aus 17.8 mM Trisbase [Tris(hydroxymethyl)aminomethan], 17.8 mM Borsäure, 0.4 mM EDTA (pH 8.0). Er wurde als 5-fach konzentrierte Stammlösung eingesetzt. Zu seiner Herstellung wurden 54.0 g (89.0 mmol) Trisbase, 27.5 g (89.0 mmol) Borsäure und 10.0 mmol EDTA (20 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0) auf 1000 ml aufgefüllt.

$I_{1/2}$ -Puffer (pH 7.4)

Der $I_{1/2}$ -Puffer (pH 7.4) besteht aus 5.00 mM KH_2PO_4 und 50.0 mM NaCl. Er wurde als 10-fach konzentrierte Stammlösung eingesetzt. Er setzt sich aus 20.0 ml 500 mM KH_2PO_4 (13.6 g KH_2PO_4 in 200 ml H_2O mit 10 N KOH auf pH 7.4 eingestellt), 100 ml 1.0 M NaCl (11.7 g NaCl in 200 ml H_2O) und 80 ml H_2O zusammen.

pBR 322 DNA-Stammösung

Die pBR 322 DNA wurde als Lösung der Konzentration 50.0 mg/l (10% der Konzentration der käuflich erworbenen DNA-Lösung) verwendet. Vor jedem Versuch wurde eine gepufferte

DNA-Stammlösung frisch hergestellt, die mit 24.0 µl pBR 322 DNA (Endkonzentration: 33.3 mg/l) und 12.0 µl I_{1/2}-Puffer (pH 7.4) [Endkonzentration 16.7 mg/l] angesetzt wurde.

b) Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-3) zur Durchführung der Photooxidationen von pBR 322 DNA

Die Reaktionen wurden in Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Die Reaktionslösungen wurden, wie in den jeweiligen Versuchen beschrieben, angesetzt (siehe auch Tab. 6.3). In einer

Tabelle 6.3. Allgemeiner Versuchsansatz zur Durchführung der Reaktionen mit superhelikaler pBR 322 DNA

DNA und Puffer	Reagenz	Wasser
3.00 µl einer Stammlösung aus 16.7 mM I _{1/2} -Puffer und 33.3 mg/l pBR 322 DNA [für einen Reaktionsansatz mit 11 Proben, wurde diese Stammlösung aus 12 µl I _{1/2} -Puffer (10 fach) und 22 µl DNA-Lösung (50 mg/l) hergestellt]	X µl der Stammlösung der jeweiligen Reagenzien (in MeCN oder Wasser wie jeweils bei den einzelnen Versuchen angemerkt.)	(7.00 – X) µl
DNA-Endkonzentration: 10.0 mg/l		
Puffer-Endkonzentration: 5.00 mM		
Reaktionsgesamtvolumen: 10 µl		

Versuchsreihe war der Anteil an Kosolvens, sofern solches eingesetzt wurde, in jeder Probe gleich hoch. Alle Proben in einer Versuchsreihe wurden identischen Bedingungen unterworfen. Nach dem Pipettieren der Reagenzien wurde kurz geschüttelt (Vortex) und zentrifugiert. Die Photolysen wurden in Eppendorf-Gefäßen, die durch ein Eisbad gekühlt wurden, durchgeführt. Die Belichtung der Proben erfolgte von oben durch eine Blacklight-Lampe (312 nm, 30 W, Itf Labortechnik, Wasserburg). Nach der Photolyse wurden jeweils

2.5 µl Ladepuffer (Sigma Molecular Biology Gel Loading Solution) hinzu pipettiert. Es wurde kurz geschüttelt und dann nochmals zentrifugiert.

c) Herstellung der Agarosegele

Zur Herstellung der Agarosegele wurde eine Suspension von 600 mg Agarose in 12 ml TBE-Puffer (5x) und 48 ml Wasser [entspricht 60 ml TBE-Puffer (1x)] für 25 min bei 140 °C in einem Trockenschrank erhitzt. Es entstand eine klare Lösung, die 5 min lang bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) zur Abkühlung stehen gelassen und anschließend mit 30 µl einer Ethidiumbromidlösung der Konzentration 1.0 mg/ml versetzt wurde (die resultierende Konzentration des Ethidiumbromids im Gel betrug 0.50 g/l). Der Gelträger wurde auf beiden Seiten mit einem Klebeband verschlossen, dann wurden 50 ml des heißen Gels eingegossen. Nach einer Stunde wurde das Gel fest, so dass das Klebeband und der Kamm entfernt und der Gelträger in die Elektrophorese-Kammer eingehängt werden konnten. Das Gel musste in der Elektrophorese-Kammer in einer Schichtdicke von mindestens 1 mm mit dem Laufpuffer [TBE-Puffer (1 x) ca. 300 ml] bedeckt sein.

d) Gelelektrophorese

In die Geltaschen wurden jeweils 8.0 µl der nach AAV-3 vorbereiteten Probenlösungen pipettiert. Die Elektrophorese dauerte bei 78 V etwa 1-2 h. Die Lauffront wurde anhand des im Ladepuffer enthaltenen Bromphenolblaus verfolgt. Die kompakte, ungeschädigte superhelikale DNA läuft im elektrischen Feld schneller als die nach Einzelstrangbruchbildung voluminösere, geschädigte, offen-circulare DNA. Die teilweise auch beobachtete lineare Form der DNA, die auf Doppelstrangbrüche zurückzuführen ist, liegt in ihrem Laufverhalten zwischen dem der beiden oben genannten Formen.

e) Auswertung

Zur Quantifizierung der offen-circularen und superhelikalen DNA wurde das Gel auf einem UV-Schirm von unten beleuchtet. Dabei fluoreszieren die beiden DNA-Banden aufgrund der Anregung des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids. Die fluoreszierenden DNA-Banden werden photographiert, und die Fluoreszenz-Intensität der einzelnen Spots bestimmt. Die Ausbeute an offen-circularer DNA wurde jeweils auf die Gesamtmenge an DNA in der Probe bezogen.

6.2.5.2 Induktion von Strangbrüchen in pBR 322 DNA durch Bestrahlung von Pyridon 2c

V-19: Untersuchung der Bildung von Strangbrüchen bei der Photolyse von Pyridon 2c in Gegenwart von superhelikaler DNA (IV-SFM-31)

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift (AAV-3) zur Detektion von Strangbrüchen in superhelikaler pBR 322 DNA wurde Pyridon 2c [1.50 mM (Zugabe von 3 µl einer wässrigen 5.00 mM Stammlösung in Wasser) in Gegenwart von superhelikaler pBR 322 DNA für 30 min bestrahlt (Probe 1). Die Photolyse wurde auch in Gegenwart von 8 Vol % Isopropanol als Radikalfänger durchgeführt (Probe 2). Bei der Kontrollreaktion wurde die pBR 322 DNA in Puffer ohne Zugabe weiterer Reagenzien bestrahlt (Probe 3).

Das nach elektrophoretischer Trennung erhaltene Gel ist in Abb. 6.1 dargestellt.

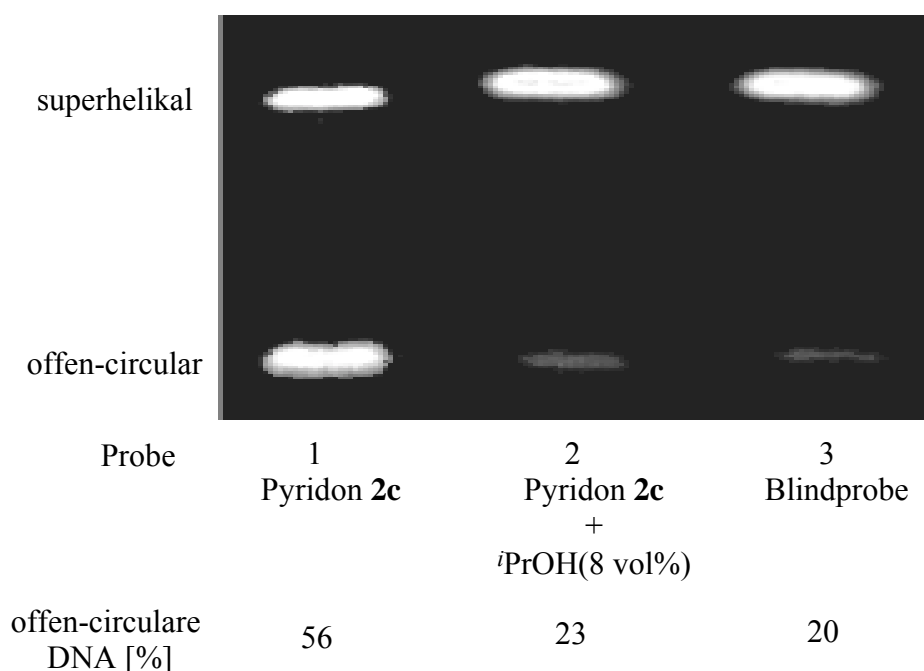


Abbildung 6.1. Gelelektrophoretische Detektion von Einzelstrangbrüchen bei Photolyse (312 nm, 0 °C, 30 min) des Pyridons 2c (1.50 mM) in Gegenwart von superhelikaler pBR 322 DNA (50 mg/l) in Abwesenheit (Probe 1) und in Gegenwart (Probe 2) von Isopropanol (8 Vol%). Bei der Blindprobe (Probe 3) erfolgte die Bestrahlung der DNA ohne Additiv. Der mittlere Fehler betrug $\pm 5\%$ der angegebenen Werte.

V-20: *Strangbruchbildung in pBR 322 DNA in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit des Pyridons 2c (III-SFM-87)*

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift (AAV-3) zur Detektion von Strangbrüchen in superhelikaler pBR 322 DNA wurde Pyridon **2c** [1.50 mM (Zugabe von 3 µl einer wässrigen 5.00 mM Stammlösung in Wasser) in Gegenwart von superhelikaler pBR 322 DNA für 0-30 min (Probe 1-4) bestrahlt. Bei der Kontrollreaktion wurde die pBR 322 DNA in Puffer ohne Zugabe weiterer Reagenzien bestrahlt (Probe 5). Das nach elektrophoretischer Trennung erhaltene Gel ist in Abb. 6.2 dargestellt.

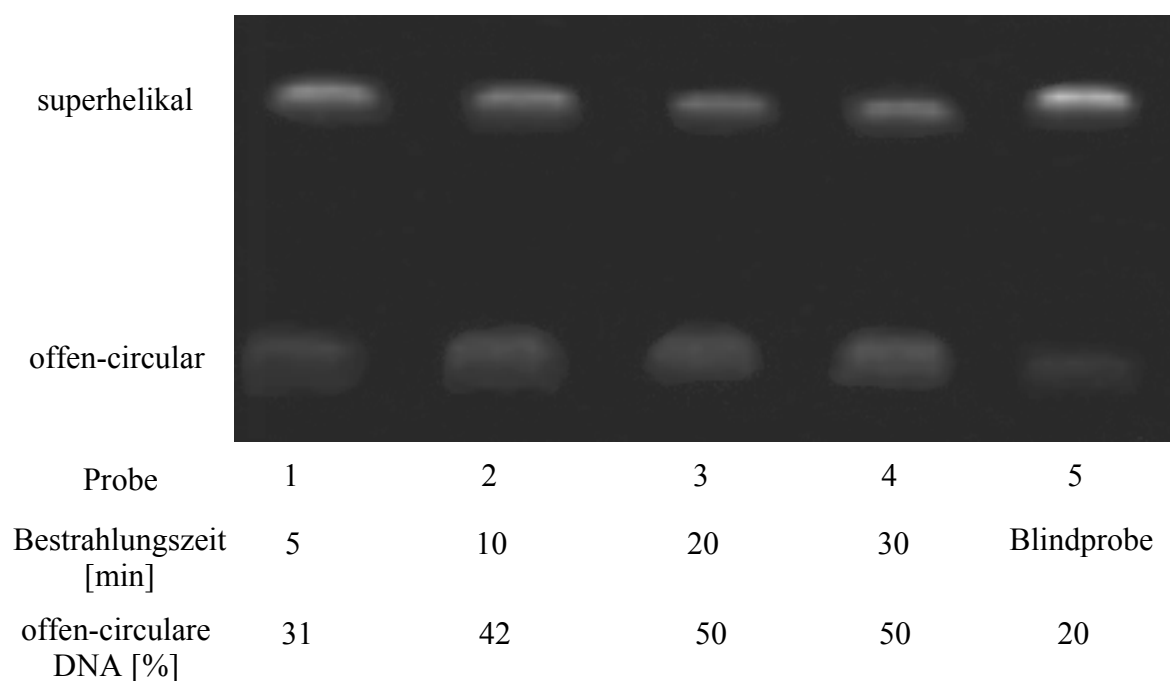


Abbildung 6.2. Gelelektrophoretische Detektion von Einzelstrangbrüchen bei Photolyse (312 nm, 0 °C) des Pyridons **2c** (1.50 mM) in Gegenwart von superhelikaler pBR 322 DNA (50 mg/l) in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit. Bei der Blindprobe (Probe 5) erfolgte die Bestrahlung der DNA ohne Additiv. Der mittlere Fehler betrug $\pm 3\%$ der angegebenen Werte.

V-21: Zeitabhängigkeit der photochemischen Zersetzung des Pyridons 2c (III-SFM-88)

Fünf Proben à 10 µl mit einer 1.50 mM Lösung von Pyridon **2c** in 5.00 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) wurden unter zu **V-20** identischen Bedingungen bestrahlt. Nach 0, 5, 10, 20 und 30 min der Photolyse wurde jeweils eine Probe entnommen. Der Umsatz an Pyridon **2c** wurde per HPLC-Analytik (Methode 2) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.4 aufgeführt.

Tabelle 6.4: Zerfallsgeschwindigkeit des Pyridons **2c** bei Bestrahlung^[a]
(**V-21**)

Bestrahlungszeit [min]	Umsatz an Pyridon 2c [%] ^[b]
0	24 ± 3
5	38 ± 10
10	72 ± 3
20	80 ± 13
30	95 ± 3

^[a] Reaktionsbedingungen: 1.50 mM Pyridon **2c** in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.4), $\lambda = 312$ nm, 0 °C; ^[b] bestimmt durch HPLC-Analytik (Methode 2) die Fehler wurden aus zwei verschiedenen Experimenten ermittelt.

6.2.6 Photooxidation von Guanin in 2'-Desoxyguanosin (dG)

6.2.6.1 Vorbereitung der Versuche

a) Allgemeine Hinweise

In den Experimenten mit **dG** wurden nur Reagenzien von höchstem Reinheitsgrad und ausschließlich Milli-Q-Wasser eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten in 3-ml-Präparatgläsern, indem die Proben in einem Rayonet-Photoreaktor (300 nm) von der Seite bestrahlt wurden. Reaktionen unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff wurden in 5-ml-Schlenkrohren unter Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt, indem die Proben vor der Bestrahlung durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ entgast und mit Stickstoffgas belüftet wurden. Die Reaktionstemperatur wurde generell durch ein extern mit Hilfe eines Kryostaten auf 0 °C gekühltes Ethanolbad auf ca. 10 °C gehalten.

b) Herstellung der verwendeten Stammlösungen

Die bei den Reaktionen mit **dG** für die HPLC-Analytik eingesetzten Lösungsmittel wurden unter ausschließlicher Verwendung von Milli-Q-Wasser hergestellt. Die Pufferlösungen für die HPLC-Analytik wurden gut vermischt und über ein Membranfilter (0.05 µm regenerierte Nitrocellulose) filtriert.

a) Herstellung der Pufferlösungen für die HPLC-Analytik

50 mM Natriumcitratpuffer pH 5.0

Zur Herstellung eines 50.0 mM Natriumcitratpuffers wurden 21.0 g (100 mmol) Citronensäure-1-hydrat in 500 ml Wasser gelöst und mit 5 N NaOH auf pH 5.0 titriert. Anschließend wurde die Lösung auf 2.0 l aufgefüllt. Für die Analytik von **dG** und **8-oxodG** wurden 500 ml (20 Vol-%) Methanol hinzugegeben (HPLC-Methode 5).

25 mM Ammoniumformiat

Zur Herstellung des 25 mM Ammoniumformiatpuffers, der für die HPLC-Analytik Guanidin-freisetzender Produkte (z. B. **Oxazolone**) benötigt wurde, verdünnte man eine 500 mM Stammlösung (31.5 g Ammoniumformiat in 1.0 l H₂O) auf die entsprechende Konzentration. Hierzu wurden 25 ml der Stammlösung auf 500 ml aufgefüllt. Für die Analytik Guanidin-freisetzender Produkte wurden anschließend 55 ml (10 Vol-%) Methanol zugesetzt (HPLC-Methode 6).

50 mM Ammoniumformiatpuffer pH 5.0

Zur Herstellung des 50 mM Ammoniumformiatpuffers pH 5.0, der für die Analytik von **8-MedG** und **N⁷-MedG** durch HPLC-MS gebraucht wurde, verdünnte man eine 500 mM Stammlösung (31.5 g Ammoniumformiat in 1.0 l H₂O) auf die entsprechende Konzentration. Hierzu wurden 100 ml der Stammlösung auf 500 ml verdünnt, mit 260 mM Ameisensäure auf pH 5.0 eingestellt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt (HPLC-Methode 4).

*b) Herstellung der Stammlösungen für die **dG** Reaktionen*

200 mM-Phosphatpuffer (pH 7.0)

Zur Herstellung eines 200 mM Phosphatpuffers wurde eine 200 mM Natriumhydrogenphosphatlösung (7.16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ in 100 ml H_2O) mit einer 200 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (2.72 g KH_2PO_4 in 100 ml H_2O) auf pH 7.0 eingestellt.

dG-Stammlösung

2'-Desoxyguanosin (**dG**) wurde als 4.00 mM Stammlösung (1.07 g/l) eingesetzt.

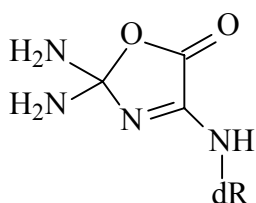
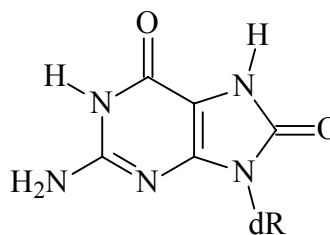
6.2.6.2 Oxidative Schädigung von **dG durch Photolyse in Gegenwart des Pyridons 2c und des Peresters 4**

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-4)

Für die Reaktionen wurden, wie bei den jeweiligen Versuchen vermerkt, Stammlösungen von 200 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) und 4.00 mM **dG** verwendet, die wie unter Abschnitt 6.2.6.1 angegeben, hergestellt wurden. Die Reaktionen wurden in Glasgefäßen bei einer Pufferkonzentration von 5.00 mM (pH 7.0) und einer **dG**-Konzentration von 0.10 mM durchgeführt. Die Konzentrationen an Reagens und Cosolvens sind bei den jeweiligen Versuchen vermerkt.

Die Bestrahlung erfolgte im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) von der Seite in 3-ml-Glasgefäßen. Die Reaktionstemperatur wurde durch ein mittels eines Kryostaten (0 °C) gekühltes Ethanol-Bad auf ungefähr 10 °C gehalten (siehe AAV-2). Der **dG**-Umsatz und die Ausbeuten an **8-oxodG** wurden direkt aus dem Reaktionsansatz mittels HPLC-Analytik bestimmt (Methode 5). Für die Analyse wurden 20 µl der Reaktionslösung in die HPLC injiziert.

Zur Bestimmung von Guanidin-freisetzenden Produkten wurden 100 µl, bei Reaktionen unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff 300 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und zweimal mit doppeltem Volumen Essigester ausgeschüttelt. Anschließend wurden die wässrigen Phasen für 12 h lyophilisiert. Nach Lösen des Rückstandes in 100 µl

**Oxazolone****8-oxodG**

(eines der Guanidin-freisetzenden-Produkte)

H₂O wurden die Reaktionslösungen für 2 h geschüttelt und schließlich für 24 h bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Derivatisierung wurden 37 µl 1 N NaOH und 20 µl einer frisch angesetzten und im Dunkeln aufbewahrten wässrigen Lösung der Naphthochinonsulfonsäure (Natriumsalz, 0.02 M, 5.00 g/l) hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend bei 65 °C unter Lichtausschluss für 10 min erwärmt und dann sofort mit 43 µl 1 N HCl versetzt, wobei sich die Proben entfärbten. Für die Analytik wurden die Proben auf ein Volumen von 600 µl mit Wasser verdünnt, und davon 50 µl über einen Autosampler in die HPLC injiziert. Die Quantifizierung erfolgte gegen einen externen Standard. Zu dessen Darstellung wurden zu 100 µl Guanidinhydrochlorid (10 µM) 37 µl 1 N NaOH und 20 µl Naphthochinonsulfonsäure-Lösung (Natriumsalz, 0.02 M, 5.00 g/l) pipettiert. Nach 10 min unter Lichtausschluss bei 65 °C wurden 43 µl 1 N HCl hinzugegeben, es wurde mit Wasser auf ein Volumen von 600 µl verdünnt und der Standard wie oben für die Reaktionsproben beschrieben mittels HPLC analysiert.

Für die Analytik von **8-MedG** und **N⁷-MedG** wurde ein Volumen von 400 µl aus den Reaktionsproben entnommen. Es wurde viermal mit je 400 µl Essigester ausgeschüttelt und die wässrigen Phasen wurden für 12 h lyophilisiert. Nach Lösen des Rückstandes in 100 µl H₂O wurden 5 µl (Methode 4) oder 20 µl (Methode 1 bzw. 3) in die HPLC injiziert. Zur Quantifizierung wurden jeweils externe Standards von authentischem **8-MedG** (50 µM) und **N⁷-MedG** (50 µM) verwendet.

V-22: Zeitabhängigkeit der *dG*-Oxidation durch Bestrahlung von *dG* in Gegenwart von Pyridon **2c (IV-SFM-30)**

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV-4 wurden zehn 200- μ l-Proben einer 100 μ M Lösung von *dG* in Gegenwart einer 500 μ M Lösung von Pyridon **2c** in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) bei 10 °C im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Nach unterschiedlichen Photolysezeiten (0-30 min) wurde jeweils eine der Proben entnommen, gemäß AAV-4 aufbereitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.5 aufgeführt.

Tabelle 6.5. Zeitabhängigkeit der Oxidation von *dG* bei Bestrahlung von Pyridon **2c** in Gegenwart von *dG*^{a)} (V-22)

Zeit [min]	Umsatz an Pyridon 2c ^{b)} [%]	<i>dG</i> -Umsatz ^{b),c)} [%]	Ausbeute an Guanidin- freisetzenden Produkten ^{b),c)} [%]
0	-	-	-
0.5	5 ± 2	-	2.3 ± 0.4
1	14 ± 3	7 ± 1	3.4 ± 0.2
2	25 ± 1	10 ± 1	4.1 ± 0.5
3	37 ± 1	15 ± 1	9.1 ± 0.4
5	62 ± 4	20 ± 2	12 ± 4.0
10	87 ± 1	24 ± 1	12 ± 3.0
15	93 ± 1	22 ± 1	16 ± 2.0
20	96 ± 1	23 ± 3	14 ± 2.0
30	99 ± 1	20 ± 3	14 ± 2.0

^{a)} Reaktionsbedingungen: [*dG*] = 100 μ M in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), λ = 300 nm, 10 °C, 500 μ M Pyridon **2c**; ^{b)} der angegebene Fehler wurde aus zwei Experimenten einer Versuchsreihe ermittelt; ^{c)} bezogen auf eingesetzte Menge an *dG*; die Ausbeute an **8-oxodG** war < 0.2%.

V-23: Einfluss von Radikalfängern auf die Oxidation von **dG** durch Bestrahlung von Pyridon **2c** (IV-SFM-32, V-SFM-26)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV-4 wurden 200 µl einer 100 µM Lösung von **dG** in Gegenwart einer 500 µM Lösung von Pyridon **2c** in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) bei 10 °C für 30 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Zur Untersuchung des Einflusses von Radikalfängern wurde die Bestrahlung auch in Gegenwart von Isopropanol oder *tert*-Butanol (beide mit Endvolumen von 2 Vol%) durchgeführt. Die Proben wurden gemäß AAV-4 aufbereitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.6 aufgeführt.

Tabelle 6.6. Einfluss von Radikalfängern auf die Oxidation von **dG** bei Bestrahlung von Pyridon **2c** in Gegenwart von **dG**^{a)} (V-23)

Radikalfänger	dG -Umsatz [%] ^{b), c)}	Guanidin-freisetzende Produkte [%] ^{b), c)}
---	27 ± 3	7.7 ± 0.1
<i>tert</i> -Butanol (2 Vol %)	25 ± 4	d)
Isopropanol (2 Vol %)	13 ± 2	2.8 ± 1.0

^{a)} Reaktionsbedingungen: [**dG**] = 100 µM in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), λ = 300 nm, 10 °C, 30 min, 500 µM Pyridon **2c**; ^{b)} der angegebene Fehler wurde aus zwei Experimenten einer Versuchsreihe ermittelt; ^{c)} bezogen auf eingesetzte Menge an **dG**; die Ausbeute an **8-oxodG** war < 0.2%; ^{d)} wurde nicht bestimmt.

V-24: **dG**-Oxidation bei der Photolyse des Peresters **4** (V-SFM-29)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV-4 wurden 900 µl einer 100 µM Lösung von **dG** in Gegenwart einer 500 µM Lösung von Perester in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) bei 10 °C für 30 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Die Proben wurden gemäß AAV-4 aufbereitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.7 aufgeführt.

Tabelle 6.7. Oxidation von **dG** bei der Photolyse von Perester **4** in Gegenwart von **dG**^{a)}
(V-24)

Radikalquelle	Umsatz an dG [%] ^{b), c)}	Guanidin-freisetzende Produkte [%] ^{b), c)}
Perester 4	16 ± 2	1.7 ± 0.1

^{a)} Reaktionsbedingungen: [**dG**] = 100 µM in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), λ = 300 nm, 10 °C, 30 min, 500 µM Perester **4**; ^{b)} der angegebene Fehler wurde aus zwei Experimenten einer Versuchsreihe ermittelt; ^{c)} bezogen auf eingesetzte Menge an **dG**; die Ausbeute an **8-oxodG** war < 0.2%.

V-25: *Qualitative Bestimmung von 8-MedG und N⁷-MedG bei Bestrahlung von dG in Gegenwart von Pyridon 2c oder Perester 4 unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff*
(IV-SFM-67, V-SFM-6)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV-4 wurden in einem Schlenkrohr 900 µl einer 100 µM Lösung von **dG** in Gegenwart einer 500 µM Lösung von Pyridon **2c** oder Perester **4** in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ entgast und anschließend bei 10 °C für 30 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Das Reaktionsgemisch wurde gemäß AAV-4 aufbereitet und mittels HPLC-Methode 4 aufgetrennt (Abb. 6.3.). Durch Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren mit denen der authentischen Verbindungen konnten **8-MedG** und **N⁷-MedG** eindeutig nachgewiesen werden.

8-MedG:

MS (ESI): m/z (relative Intensität) = 165.9 (100), 281.8 (80).-

N⁷-MedG:

MS (ESI): m/z (relative Intensität) = 165.9 (40), 281.8 (100).-

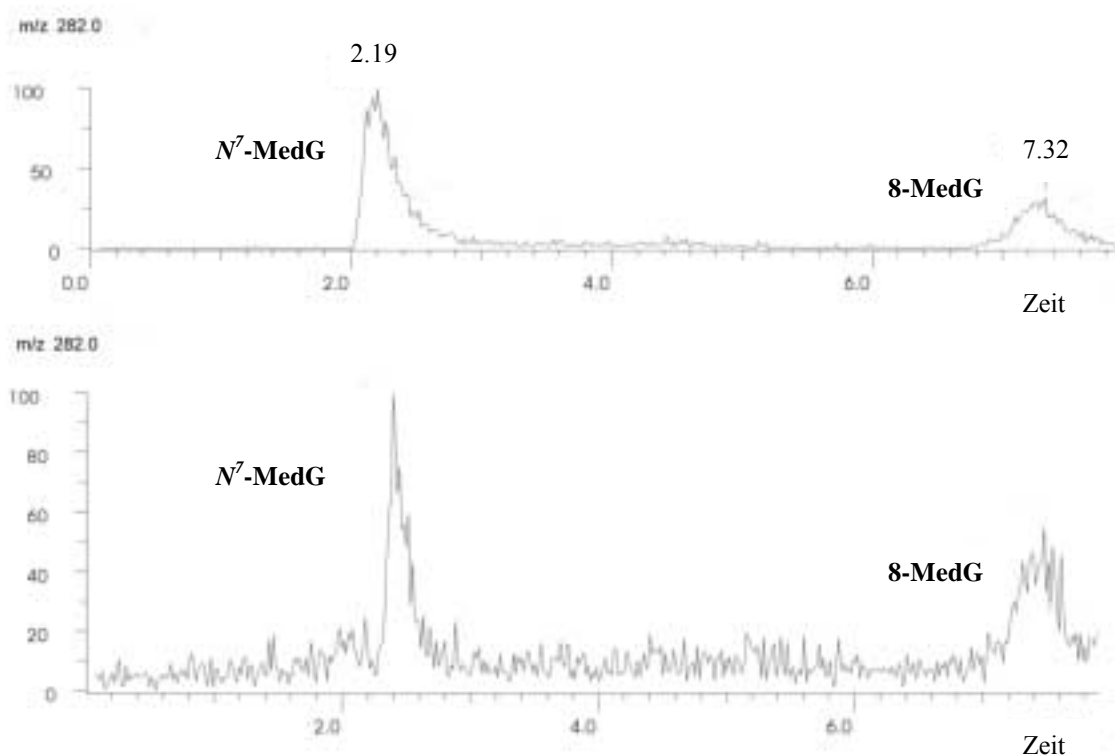


Abbildung 6.3. HPLCMS-Chromatogramm (HPLC-Methode 4) einer Mischung der authentischen Methyladdukte **N⁷-MedG** und **8-MedG** (a) und des Photolysats nach Bestrahlung von Pyridon **2c** (500 μ l) in Gegenwart von **dG** (100 μ l) unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff (b).

V-26: *dG*-Oxidation bei Bestrahlung von Pyridon **2c** in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff (IV-SFM-67, V-SFM-21)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV-4 wurden in einem Schlenkrohr 900 μ l einer 100 μ M Lösung von **dG** in Gegenwart einer 500 μ M Lösung von Pyridon **2c** in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) durch dreimaliges freeze-pump-thaw entgast und anschließend bei 10 °C für 30 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Die Aufbereitung und Analyse der Proben erfolgte gemäß AAV-4. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.8 aufgelistet.

V-27: dG-Oxidation bei Bestrahlung von Perester 4 in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff (V-SFM-20, 29)

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV-4 wurden in einem Schlenkrohr 900 µl einer 100 µM Lösung von **dG** in Gegenwart einer 500 µM Lösung von Perester **4** in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ entgast und anschließend bei 10 °C für 30 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Die Aufbereitung und Analyse der Proben erfolgte gemäß AAV-4. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.8 aufgelistet.

Tabelle 6.8. dG-Oxidation bei Bestrahlung von **dG** in Gegenwart von Pyridon **2c** oder Perester **4** unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff^{a)}

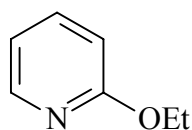
V-	Radikal- quelle	dG - Umsatz [%]	Guanidin frei- setzende Produkte [%] ^{b)}	8-oxodG [%] ^{b)}	8-MedG [%] ^{b)}	N⁷-MedG [%] ^{b)}
26	Pyridon 2c	27 ± 3	1.7 ± 0.2	0.19 ± 0.02	2.3 ± 0.2	0.27 ± 0.05
27	Perester 4	28 ± 1	0.9 ± 0.2	0.22 ± 0.05	2.0 ± 0.1	0.25 ± 0.05

^{a)} Reaktionsbedingungen: [**dG**] = 100 µM, [Pyridon **2c**] = [Perester **4**] = 500 µM in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), λ = 300 nm, 10 °C, 30 min; ^{b)} bezogen auf eingesetztes **dG**, die angegebenen Fehler wurden aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten ermittelt.

6.3 Vergleichende Studie der photochemischen Isopropoxyradikalquellen **2b** und **3b**.

6.3.1 Synthese der Edukte

V-28: 2-Ethoxyipyridin (II-SFM-2, III-SFM-24)¹²⁴



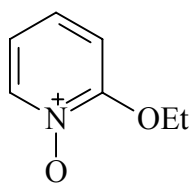
In 190 ml trockenem Ethanol wurden 14.0 g (350 mmol) einer 60%igen Suspension von NaH in Paraffin unter Eiskühlung gelöst. Nach Zugabe von 25 ml (40.5 g, 256 mmol) Brompyridin

wurde die Reaktionslösung über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde fraktionierend destilliert. Es wurden 18.1 g (147 mmol, 57%, Lit.¹²⁴: 33%) eines farblosen Öls erhalten, Sdp. 112 °C, 200 mbar (Lit.¹²⁴: 51 °C / 11 Torr).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.39 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 4.34 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 6.71 (m, 1H, aromat. H), 6.83 (m, 1H, aromat. H), 7.55 (m, 1H, aromat. H), 8.14 (m, 1H).-

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 14.6 (CH₃), 61.5 (CH₂), 111.0, 116.4, 138.4, 146.9, 163.9.-

V-29: 2-Ethoxyppyridin-N-oxid (II-SFM-7)¹²⁴



Zu einer Lösung von 2.46 g (20.0 mmol) 2-Ethoxyppyridin wurden 4.5 ml (27.0 mmol) 40%ige Peressigsäure in Wasser gegeben. Die Lösung wurde bei 56 °C für 3 d gerührt, wobei weitere 4 ml (24.0 mmol) Peressigsäure hinzugefügt wurden. Nach Zugabe von 1 ml gesättigter Na₂SO₃-Lösung wurde das Lösungsmittel entfernt (50 °C, 0.01 mbar). Der Rückstand wurde mit 3N KOH alkalisch gemacht und dreimal mit je 15 ml CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt (30 °C, 20 mbar) und der ölige Rückstand durch Zugabe von Diethylether kristallisiert. Man erhielt 1.27 g (9.13 mmol, 46%, Lit.¹²⁴: keine Angabe) eines farblosen, sehr hygroskopischen Feststoffes, Smp. 69-71 °C (Lit.¹²⁴: 71-73 °C).

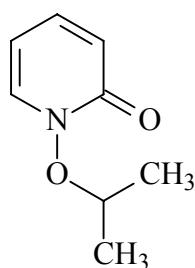
DC (MeOH): R_f = 0.52

IR (KBr): ν = 2360 cm⁻¹, 1617, 1508, 1439, 1400, 1153.-

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.34$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3), 4.13 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 6.74 (m, 2H, arom. H), 7.09 (m, 1H, arom. H), 8.05 (m, 1H, arom. H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.9$ (CH_3), 65.9 (CH_2), 108.9, 117.0, 127.4, 139.7, 157.6.-

V-30: *N*-Isopropoxy-2-pyridon (II-SFM-9, IV-SFM-39/58/74)¹²⁵



2b

900 mg (6.47 mmol) 2-Ethoxypyridin-*N*-oxid wurden in 2.00 ml (21.2 mmol) 2-Brompropan vier Tage lang unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde destilliert, wobei die Fraktionen bei einem Übergang von 90-94 °C (0.9 mbar) gesammelt wurden. Das erhaltene farblose Öl (nach NMR-Spektroskopie bestehend aus 70% *N*-Isopropoxy-2-pyridon **2b** und 30% *N*-Ethoxy-2-pyridon) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt [Hexan / Aceton (3:1)]. Man erhielt 420 mg (2.74 mmol, 42%, Lit.¹²⁵: 46%) eines farblosen Öls.

DC [Hexan / Aceton (3:1)]: $R_f = 0.22$.

HPLC (Methode 2): $t_R = 4.1$ min

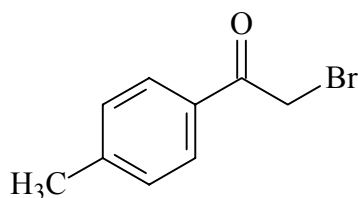
IR (KBr): $\nu = 2980$ cm^{-1} , 1660 (C=O), 1583, 1537, 1384, 1275, 1147, 1097, 912.-

UV [$\text{H}_2\text{O-MeCN}$ (60 : 40)]: λ ($\lg \epsilon$) = 300 nm (3.73).-

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.31$ (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 4.82 (h, $J = 6.3$ Hz), 6.09 (ddd, $J = 6.9$ Hz, 6.9 Hz, 1.5 Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 9.2$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.29 (ddd, $J = 9.2$ Hz, 6.9 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 6.9$ Hz, 2.0 Hz, 1H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 63 MHz): $\delta = 20.7$ (CH_3), 78.8, 104.9, 122.9, 137.8, 138.8, 159.6 ($\text{C}=\text{O}$).-

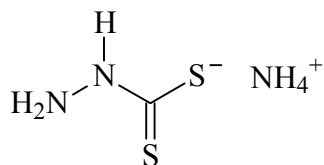
V-31: 2-Brom-1-*p*-tolylethanon (V-SFM-22)¹²⁸



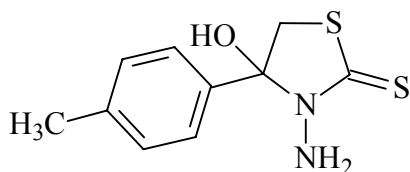
Zu einer Lösung von 10.0 g (74.5 mmol) *p*-Methylbenzophenon in trockenem Diethylether wurden bei 0 °C unter Rühren innerhalb von 10 min 3.82 ml (11.9 g, 74.5 mmol) Brom über eine Spritze getropft. Es wurde für weitere 10 min bei dieser Temperatur gerührt. Es bildete sich ein rötlicher Feststoff, der abfiltriert und mit Wasser und Petrolether gewaschen wurde. Nach Umkristallisation aus Methanol erhielt man 11.3 g (53.0 mmol, 71%, Lit.¹²⁸: 64-66%) eines schwach gelblichen Feststoffs, Smp. 52-53 °C (Lit.¹²⁸: 52 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) $\delta = 2.41$ (s, 3H, CH_3), 4.42 (s, 2H), 7.27 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) $\delta = 21.6$ (CH_3), 31.0 (CH_2), 128.9, 129.4, 131.3, 144.8, 190.8 ($\text{C}=\text{O}$).-

V-32: Ammoniumdithiocarbazat (V-SFM-23)¹²⁷

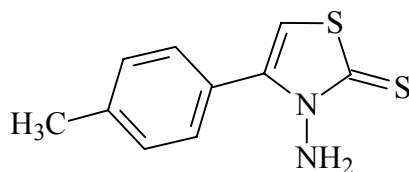
Zu einer Lösung von 1.94 ml (2.00 g, 40.0 mmol) Hydrazinhydrat in 7 ml konz. Ammoniak und 8 ml Ethanol wurden unter Eiskühlung und Rühren 2.42 ml (3.04 g, 40.0 mmol) Schwefelkohlenstoff mittels einer Spritze hinzugegeben. Die Reaktionslösung färbte sich gelb. Durch Zugabe von Diethylether bildete sich ein Feststoff, der abfiltriert und mit Diethylether gewaschen und über Blaugel im Exsikkator getrocknet wurde. Man erhielt 3.26 g (26.0 mmol, 65%, Lit.¹²⁷: keine Angabe) eines gelblichen Feststoffes, Smp. 113-114 °C (Lit.¹²⁷: 114 °C).

V-33: 3-Amino-4-hydroxy-4-(p-methylphenyl)thiazolidin-2-thion (V-SFM-24)¹²⁹

1.70 g (13.6 mmol) Ammoniumdithiocarbazat wurden in 20 ml Methanol suspendiert. Bei einer Temperatur von 20 °C, wurden 2.90 g (13.6 mmol) 2-Brom-1-p-tolyloethanon hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 30 °C für 2 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (30 °C, 40 mbar) wurde der Rückstand mit 10 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Abdestillieren des Solvens (30 °C, 40 mbar) blieb ein gelber Feststoff zurück, der aus Benzol umkristallisiert wurde. Man erhielt 1.60 g (6.66 mmol, 49%, Lit.¹²⁹: keine Angabe) eines farblosen Feststoffes, Smp. 159-161 °C (Lit.¹²⁹: keine Angabe).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ = 2.41 (s, 3H), 3.81 (s, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H).-

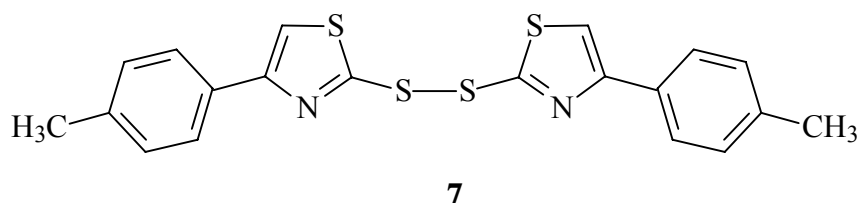
¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ = 21.5 (CH₃), 25.8 (CH₂), 126.7, 129.7, 130.8, 141.7, 147.3, 189.6.-

V-34: 3-Amino-4-hydroxy-4-(*p*-methylphenyl)thiazolin-2-thion (V-SFM-31)¹²⁹

700 mg (2.91 mmol) 3-Amino-4-hydroxy-4-(*p*-methylphenyl)thiazolidin-2-thion wurden in einer Mischung aus 1.3 ml konz. HCl und 3.8 ml Isopropanol suspendiert und für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf 5 °C bildete sich ein Feststoff, der abfiltriert, mit Wasser gewaschen und mit 5% NaOH behandelt wurde. Das in wässriger NaOH unlösliche Material wurde gesammelt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhielt 517 mg (2.33 mmol, 80%, Lit.¹²⁹: 70%) eines schwach gelblichen Feststoffes, Smp. 146-147 °C (Lit.¹²⁹: 147-148 °C).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ = 2.42 (s, 3H, CH₃), 6.51 (s, 1H), 7.28 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 8.3 Hz, 2H).-

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ = 21.3 (CH₃), 105.2, 126.6, 128.8, 129.3, 140.0, 143.5, 183.0.-

V-35: Bis[4-(4-Methylphenyl)-2-thiazyl]disulfide (V-SFM-32)¹²⁹

100 mg (450 μmol) 3-Amino-4-hydroxy-4-(*p*-methylphenyl)thiazolin-2-thion and 86.0 mg (450 μmol) *p*-Tosylchlorid wurden in Pyridin gelöst und für 1.5 h bei 20 °C gerührt. Durch Zugabe von 4.5 ml Wasser bildete sich ein Feststoff, der abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert wurde. Man erhielt 70 mg (170 μmol, 38%) farbloser Kristalle, Smp. 158-160 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ = 2.38 (s, 6H, CH_3), 7.22 (s, 4H), 7.45 (d, J = 8.3 Hz, H-5, 2H), 7.76 (d, J = 8.3 Hz, 4H).-

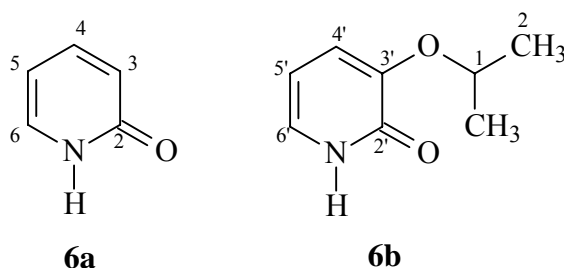
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ = 20.9 (CH_3), 115.1, 126.5, 129.8, 131.3, 138.8, 157.8, 165.2.-

HRMS (EI) m/z berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}_4$ 412.0196, gefunden 412.0197.

6.3.2 Photozerersetzung der *Photo-Fenton*-Reagenzien **2b** und **3b**

6.3.2.1 Produkt-Studien

V-36: *Produkte bei der Photolyse von Pyridon 2b* (IV-SFM-58, 82)



In einem Pyrex-Glasgefäß wurden 260 mg (1.70 mmol) Pyridon **2b** in 50 ml eines Lösungsmittelgemisches von Wasser und Acetonitril im Verhältnis von 60 : 40 gelöst und in einem Rayonet Photoreaktor bei 300 nm und 10 °C für 55 min bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert (40 °C, 20 Torr) und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Essigsäureethylester). 2-Pyridon **6a** (t_R = 0.08) and 3-Isopropoxy-2-pyridon **6b** (t_R = 0.15) wurden als Photoprodukte isoliert. Letzteres wurde in Dichlormethan gelöst und durch Zugabe von Hexan kristallisiert. Die Struktur von 2-Pyridon **6a** wurde durch Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Photoproduktes mit dem der authentischen Verbindung belegt. Die strukturelle Zuordnung von 3-Isopropoxy-2-pyridon **6b** erfolgte über das HMBC-Spektrum (Tabelle 6.9).

2-Pyridon (6a).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.30$ (ddd, $J = 6.6$ Hz, 6.6 Hz, 1.1 Hz, 1H, H-5), 6.59 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-3), 7.45 (m, 2H, H-4, H-6).-

3-Isopropoxy-2-pyridon (6b). Farblose Plättchen, Smp. 210-211 °C.-

IR (KBr): $\nu = 1677$ cm^{-1} (C=O), 1385 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$].-

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.39$ (d, $J = 6.1$ Hz, 6H, H-2), 4.53 (h, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-1), 6.19 (dd, $J = 7.5, 6.6$ Hz, 1H, H-5'), 6.77 (dd, $J = 7.5, 1.6$ Hz, 1H, H-4'), 7.03 (dd, $J = 6.6$ Hz, 1.6 Hz, 1H, H-6').-

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) $\delta = 21.2$ (q, C-2), 70.5 (d, C-1), 106.5 (d, C-5'), 117.6 (d, C-4'), 125.6 (d, C-6'), 148.2 (s, C-3'), 161.3 (s, C-2').-

HRMS (EI) m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2$ 153.079, gefunden 153.079.

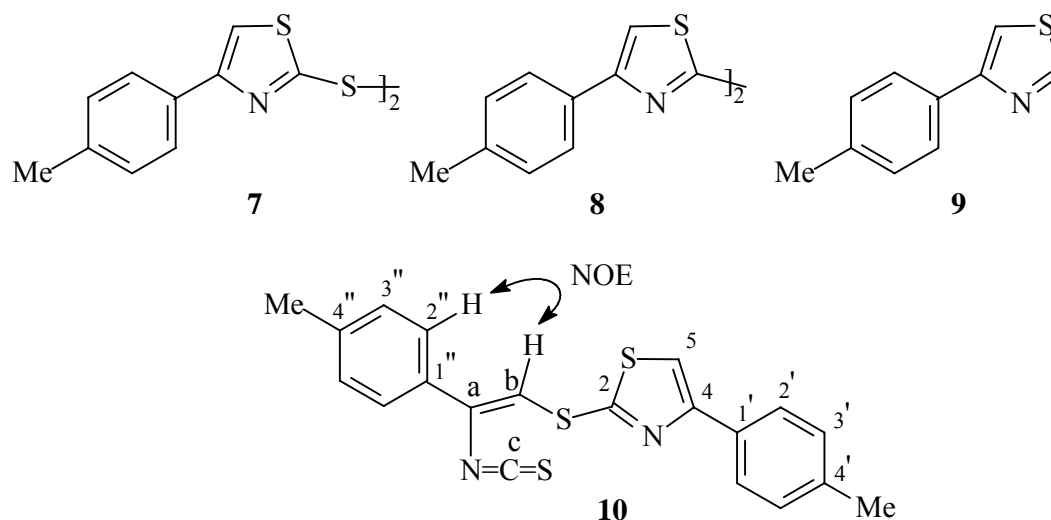
Tabelle 6.9. 2J - und 3J -Kopplungen aus dem HMBC-Spektrum ^{a)}

H-Atom (δ_{H} in [ppm])	C-Atome (δ_{C} in [ppm]) mit 2J - und 3J -Kopplungen zu den entsprechenden H-Atomen		
H-4' (6.77)	C-6' (125.6)	C-3' (148.2)	C-2' (161.3)
H-5' (6.19)	C-4' (117.6)	C-6' (125.6)	C-3' (148.2)
H-6' (7.03)	C-5' (106.5)	C-4' (117.6)	C-2' (161.3)

a) Heteronuclear-Multiple-Bond Correlation.

V-37: Quantifizierung der Photoprodukte von Pyridon **2b** (IV-SFM-59)

14.7 mg (96.0 μmol) von *N*-Isopropoxypyridon **2b** in 1 ml D_2O wurden in einem verschlossenen NMR-Röhrchen im Rayonet Photoreaktor (300 nm) bei 10 °C für 14.5 min bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert (40 °C, 20 Torr), und der Rückstand in CDCl_3 aufgenommen. Der Umsatz (49%) und die Ausbeuten an Produkt **6a** (22%) and **6b** (11%) wurden durch direkt vor der NMR-Analytik hinzupipettiertes Dichlormethan als internen Standard bestimmt.

V-38: Produkte bei der Photolyse von Thiazolthion **3b** (Kooperation mit Dr. H. Okamoto)

Eine Lösung von Thiazolthion **3b** (200 mg, 0.75 mmol) in 100 ml einer Lösungsmittelmischung von Wasser und Acetonitril im Verhältnis von 15 : 85 wurde bei 0 °C für 1 h mit einer 450-W Hochdruckquecksilberlampe unter Einsatz eines Glasfilters (> 350 nm) bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert (35 °C, 20 Torr), und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (1 : 3 bis 1 : 1 Dichlormethan : Petrolether). Nachfolgende Auftrennung mittels MPLC (Kieselgel, 1 : 3 bis 1 : 1 Dichlormethan : Petrolether als Laufmittel) ergab Disulfid **7** (10%), Bithiazyl **8** (5%), Thiazol **9** (10%) und Isothiocyanat **10** (27%) als Photoprodukte. Der Umsatz an Thiazolthion **3b** betrug 89%. Die angegebenen Ausbeuten sind bezogen auf umgesetztes Thiazolthion. Disulfid **7** und Bithiazyl **8** konnten nicht säulenchromatographisch getrennt werden und wurden direkt aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Reaktionsgemisches quantifiziert.

Bis-[4-(4-methylphenyl)-2-thiazyl]disulfid (7**).**

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 2.39 (s, 6H), 7.22 (m, 4H), 7.45 (s, 2H), 7.79 (m, 4H).-

MS (ED): *m/z* (relative Intensität) = 412 (M⁺, 7.5).-

4,4'-(*p*-Tolyl)-2,2-bithiazyl (8**).**

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 2.37 (s, 6H), 7.19 (m, 4H), 7.41 (s, 2H), 7.70 (m, 4H).-

MS (ED): *m/z* (relative Intensität) = 348 (M⁺, 2.2).-

4-(4-Methylphenyl)thiazol (9). Farblose Plättchen, Smp. 55-56 °C

IR (KBr) ν_{\max} 1485 cm^{-1} (C=N).-

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 2.39 (s, 3H), 7.25 (m, 2H), 7.48 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 7.83 (m, 2H), 8.87 (d, 2H, J = 2.0 Hz).-

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 21.3, 111.8, 126.3, 131.5, 138.1, 152.7, 154.4.-

MS (EI): m/z (relative Intensität) = 175 (M^+ , 27).-

(Z)-1-(4-methylphenyl)-2-[4-(4-methylphenyl)-2-thiazylsulfanyl]ethenyl-1-isothiocyanat (10): Schwach gelbe Nadeln, Smp. 85 – 86 °C

IR (KBr) ν_{\max} 2074 cm^{-1} (N=C=S).-

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 2.39 (s, 6H, Me-4',4''), 7.23 (m, 2H, H-3''), 7.24 (m, 2H, H-3'), 7.26 (s, 1H, H-b), 7.40 (s, 1H, H-5), 7.44 (m, 2H, H-2''), 7.79 (m, 2H, H-2').-

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 21.2, 21.3 (q, Me-4',4''), 112.9 (d, C-5), 116.8 (d, C-b), 124.9 (d, C-2'), 126.2 (d, C-2''), 128.6 (s, C-a), 129.5 (d, C-3''), 129.6 (d, C-3'), 131.0, 131.1 (s, C-1', C-1''), 138.4 (s, C-4'), 138.8 (s, C-c), 139.5 (s, C-4''), 156.1 (s, C-4), 160.0 (s, C-2).-

MS (EI): m/z (relative Intensität) = 380 (M^+ , 13), 322 [100, (M-NCS) $^+$].-

HRMS (FAB) m/z berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{S}_3$ 381.0554, gefunden 381.0554.-

Die Z-Konfiguration der Doppelbindung zwischen C-a und C-b wurde aufgrund der NOE-Kopplungen zwischen H-2'' und H-b im NOESY-Spektrum ermittelt.

6.3.2.2 Transientenspektren bei der Photolyse von Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b**

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-5)

Für die Untersuchung der bei Photolyse von Pyridon **2b** und Thiazolthion **3b** entstehenden Transienten wurden Proben mit einem Volumen von ungefähr 5 ml in einer selbstgemachten, mit einem durch einen Teflonschraubverschluss verschließbaren und über eine Hochvakuumpumpe evakuierbaren Kolben direkt verbundenen Quarzzelle ($4 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$) vermessen. Die Proben wurden durch dreimaliges „freeze-pump-thaw“ im Kolben entgast, anschließend in die Quarzzelle überführt und dort bei Raumtemperatur mit der 308 nm-Linie eines Lamda Physik EMG 101 MSC XeCl-Excimerlaser (ca. 25 ns, 9 ± 1 ns Abklingzeit, 75 mJ) angeregt. Direkt nach der Anregung (20 ns) wurde das jeweilige Transientenabsorptionsspektrum aufgenommen.

V-39: *Transientenspektrum bei der Photolyse des Pyridons **2b***

Eine 100 μM Lösung des Pyridons **2b** in Wasser wurde wie in AAV-5 beschrieben bestrahlt und angeregt, wobei bei der Bestrahlung ein Lichtfilter (WG 320 nm) verwendet wurde. Die Absorptionseigenschaften des beobachteten Transienten sind in Tabelle 6.10 aufgeführt.

V-40: *Transientenspektrum bei der Photolyse des Thiazolthions **3b*** (VI-SFM-6, 6b)

Eine 20 μM Lösung des Thiazolthions **3b** in Acetonitril wurde wie in AAV-5 beschrieben bestrahlt und angeregt, wobei bei der Bestrahlung ein Lichtfilter (WG 320 nm) verwendet wurde. Die Absorptionseigenschaften des beobachteten Transienten sind in Tabelle 6.10 aufgeführt. Wurde die gleiche Probe ein zweites Mal durch einen Laserblitz unter identischen Bedingungen angeregt, erhielt man einen Transienten mit anderen Absorptionseigenschaften (Tabelle 6.10).

V-41: *Transientenspektrum bei der Photolyse des Thiazolthions **3a*** (VI-SFM-15c, 15b)

Eine 29 μM Lösung des Thiazolthions **3a** in Acetonitril wurde wie in AAV-5 beschrieben bestrahlt und angeregt, wobei bei der Bestrahlung ein Lichtfilter (WG 320 nm) verwendet

wurde. Die Absorptionseigenschaften des beobachteten Transienten sind in Tabelle 6.10 aufgeführt. Wurde die gleiche Probe ein zweites Mal durch einen Laserblitz unter identischen Bedingungen angeregt, erhielt man einen Transienten mit anderen Absorptionseigenschaften (Tabelle 6.10).

V-42: *Transientenspektrum bei der Photolyse des Disulfids 7 (VI-SFM-5, 5b)*

Eine 60 μM Lösung des Disulfids **7** in Acetonitril wurde wie in AAV-5 beschrieben bestrahlt und angeregt, wobei bei der Bestrahlung ein Lichtfilter (WG 305 nm) verwendet wurde. Die Absorptionseigenschaften des beobachteten Transienten sind in Tabelle 6.10 aufgeführt. Wurde die gleiche Probe ein zweites Mal durch einen Laserblitz unter identischen Bedingungen angeregt, erhielt man den gleichen Transienten mit identischen Absorptionseigenschaften (Tabelle 6.10)

Tabelle 6.10. Absorptionsbanden der bei Anregung^{a)} von Pyridon **2b**, Thiazolthion **3b** und Disulfid **7** beobachteten Transienten

V-	Substrat ^{b)}	Anregung (308 nm)	λ_{max} [nm]
39	Pyridon 2b	1. Laserblitz	390
40	Thiazolthion 3b	1. Laserblitz	355, 470
		2. Laserblitz	375, 500
41	Thiazolthion 3a	1. Laserblitz	355, 470
		2. Laserblitz	375, 500
42	Disulfid 7	1. Laserblitz	375, 500
		2. Laserblitz	375, 500

^{a)} Die Aufnahme der Spektren erfolgte unmittelbar nach der Anregung;

^{b)} Bedingungen: [Pyridon **2b**] = 100 μM , [Thiazolthion **3a**] = 29 μM , [Thiazolthion **3b**] = 20 μM , [Disulfid **7**] = 60 μM .

6.3.2.3 Messung der Abklingkurven von den beobachteten Transienten-Absorptionsbanden

V-43: Kinetik der 470 nm-Transienten-Absorptionsbande bei Anregung (1. Laserblitz) des Thiazolthions **3b** (VI-SFM-8, 11, 32)

Eine 20 μM Lösung des Thiazolthions **3b** in Acetonitril wurde wie in AAV-5 beschrieben bestrahlt und angeregt, wobei bei der Bestrahlung ein Lichtfilter (WG 420 nm) verwendet wurde. Die Absorption des Transienten wurde bei 470 nm zeitaufgelöst verfolgt. Zur Untersuchung des Effektes von molekularem Sauerstoff und von 1,3-Cyclohexadien (**1,3-CHD**) wurde die gleiche Probe unter identischen Bedingungen aber im Unterschied zu der ersten in Gegenwart von molekularem Sauerstoff bzw. 250 μM **1,3-CHD** angeregt. Wiederum wurde jeweils die Absorptionsbande des Transienten bei 470 nm zeitaufgelöst untersucht. Der molekulare Sauerstoff beeinflusste das Abklingverhalten der Absorptionsbande nicht (nicht gezeigt in Abb. 6.4). Die beiden anderen Zeitprofile sind in Abbildung 6.4 aufgeführt.

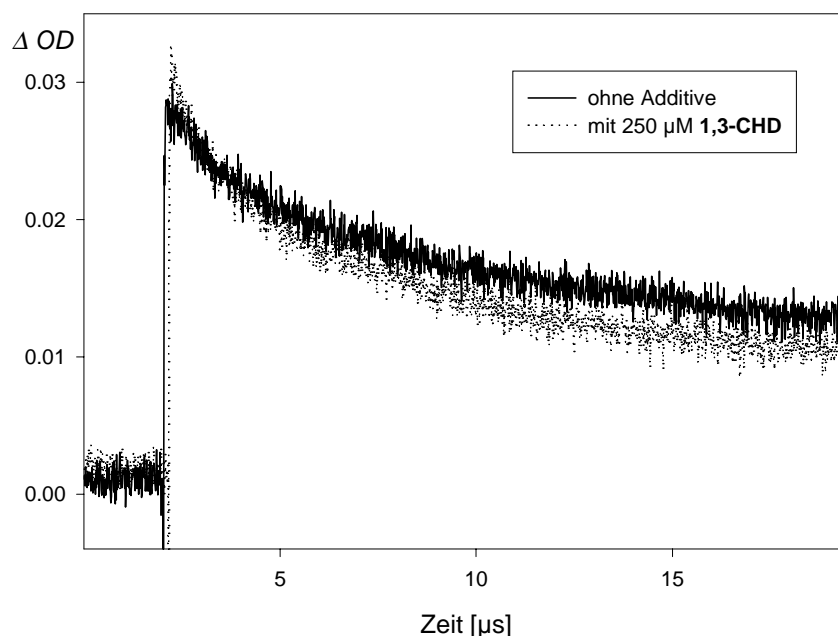


Abbildung 6.4. Ergebnisse von **V-43**: Abklingverhalten der 470 nm-Absorptionsbande nach Anregung (308 nm, 1. Laserblitz) des Thiazolthions **3b** (20 μM in MeCN) unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff (—) und in Gegenwart von 250 μM **1,3-CHD** (.....)

V-44: Kinetik der 500 nm-Transienten-Absorptionsbande bei Anregung (2. Laserblitz) des Thiazolthions **3b** (VI-SFM-9a, 10)

Eine 20 μM Lösung des Thiazolthions **3b** in Acetonitril wurde wie in AAV-5 beschrieben bestrahlt und angeregt, wobei bei der Bestrahlung ein Lichtfilter (WG 420 nm) verwendet wurde. Die Anregung wurde durch einen zweiten Laserblitz wiederholt. Die Absorption des Transienten wurde nach dem 2. Laserblitz bei 520 nm zeitaufgelöst verfolgt. Bei einer weiteren Messung wurde nach dem 1. Laserblitz die Quarzzelle durch Öffnen der Teflonverschraubung belüftet und anschließend mit einem zweiten Laserblitz angeregt. Wiederum wurde die Absorptionsbande des Transienten bei 420 nm zeitaufgelöst untersucht. Die Zeitprofile sind in Abbildung 6.5 aufgeführt.

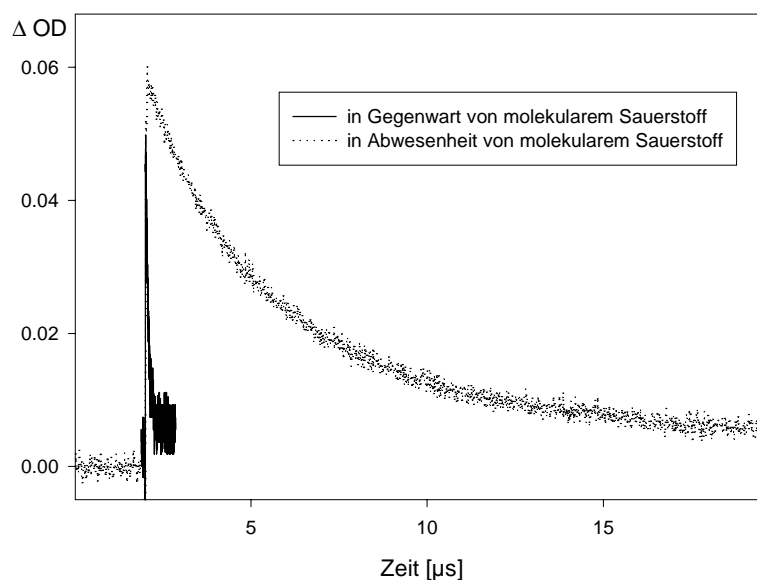


Abbildung 6.5. Ergebnisse von **V-44**: Abklingverhalten der 500-nm-Absorptionsbande nach Anregung (308 nm, 2. Laserblitz) des Thiazolthions **3b** (20 μM in MeCN) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff (—) und unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff (⋯)

V-45: Kinetik der 500 nm-Transienten-Absorptionsbande bei Anregung des Disulfids **7** (VI-SFM-14, 19)

Eine 60 μM Lösung des Disulfids **7** in Acetonitril wurde wie in AAV-5 beschrieben bestrahlt und angeregt, wobei bei der Bestrahlung ein Lichtfilter (WG 420 nm) verwendet wurde. Die Absorption des Transienten wurde bei 495 nm zeitaufgelöst verfolgt. Zur Untersuchung des

Effektes von molekularem Sauerstoff wurde die gleiche Probe unter identischen Bedingungen aber im Unterschied zu der ersteren in Gegenwart von molekularem Sauerstoff angeregt. Wiederum wurde die Absorptionsbande des Transienten bei 495 nm zeitaufgelöst untersucht. Die Zeitprofile sind in Abbildung 6.6 aufgeführt.

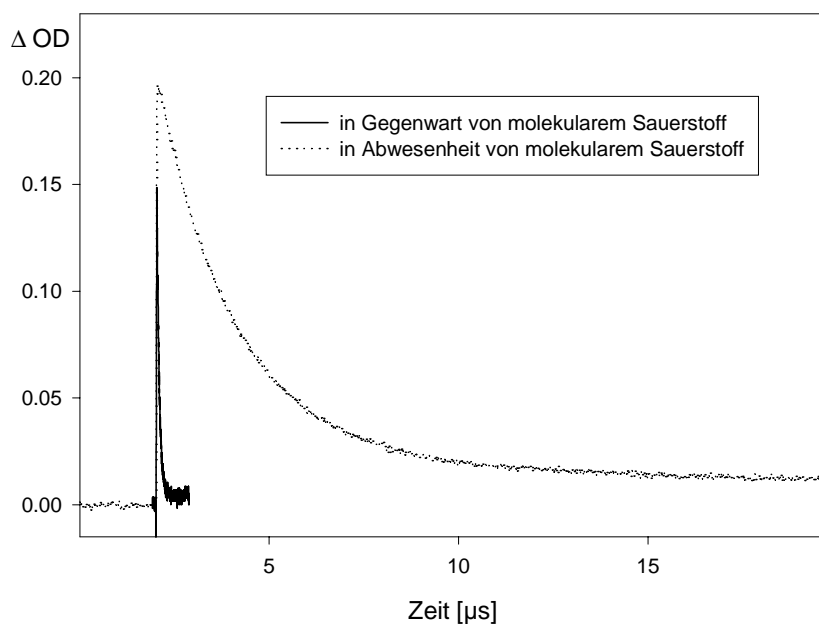


Abbildung 6.6. Ergebnisse von **V-45**: Abklingverhalten der 500 nm-Absorptionsbande nach Anregung (308 nm, 2. Laserblitz) des Disulfids **5** (60 μ M in MeCN) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff (—) und unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff (.....)

V-46: Kinetik der 375-nm-Transienten-Absorptionsbande bei Anregung des Disulfids **7**

Eine 60 μ M Lösung des Disulfids **7** in Acetonitril wurde wie in AAV-5 beschrieben bestrahlt und angeregt, wobei bei der Bestrahlung ein Lichtfilter (WG 420 nm) verwendet wurde. Die Absorption des Transienten wurde bei 375 nm zeitaufgelöst verfolgt. Zur Untersuchung des Effektes von molekularem Sauerstoff wurde die gleiche Probe unter identischen Bedingungen aber im Unterschied zu der ersteren in Gegenwart von molekularem Sauerstoff angeregt. Wiederum wurde die Absorptionsbande des Transienten bei 375 nm zeitaufgelöst untersucht. Die Zeitprofile waren identisch zu denen der 500-nm-Bande (**V-45**, Abb. 6.6)

6.3.2.4 Zersetzungsausbeuten der Radikalquellen 2b und 3b**V-47: Zersetzungsausbeute des Pyridons 2b (IV-SFM-47)**

Die Bestrahlung und anschließende Aufbereitung des Aktinometers (Kaliumferrioxalat) erfolgte gemäß AAV-1. Die nach Gl. 6.1 bestimmte Photonenzahl betrug $(1.67 \pm 0.10) \times 10^{-7}$ Einstein min^{-1} (vgl. **V-13**)

Das Pyridon **2b** (1.50 ml, 500 μM) wurde unter identischen Bedingungen wie der Aktinometer für 1.5 min in Wasser und in Wasser-Acetonitril (60 : 40) bestrahlt. Der Umsatz an Pyridon **2b** wurde jeweils mittels HPLC-Analytik und UV-Detektor (HPLC-Methode 2) bestimmt und betrug in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten in Wasser $10.7\% \pm 0.1\%$ und in Wasser-Acetonitril (60 : 40) $12.0\% \pm 0.5\%$. Daraus wurden gemäß Gl. 6.2 die Zersetzungsausbeuten berechnet:

$$\Phi_{\text{dec}}(\text{H}_2\text{O}) = 0.32 \pm 0.01$$

$$\Phi_{\text{dec}}[\text{H}_2\text{O-MeCN (40\%)}] = 0.36 \pm 0.02$$

V-48: Untersuchung der photochemischen Zersetzung des Thiazolthions 3b mittels UV-Spektroskopie (II-HOK-4)

2 ml einer 50 μM Lösung von Thiazolthion **3b** in einer Lösungsmittel-Mischung von Wasser und Acetonitril (60 : 40) wurde mit 308 nm durch die Xe-Lampe des Fluoreszenz-Photometers (308 nm) bei Raumtemperatur in einer UV-Küvette bestrahlt. Nach 0-10 min wurde die Probe jeweils im UV-Spektrometer vermessen, und die Änderung der Absorption bei 318 nm (Absorptionsmaximum) bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Absorption linear mit der Bestrahlungszeit abnahm (Abb. 6.7).

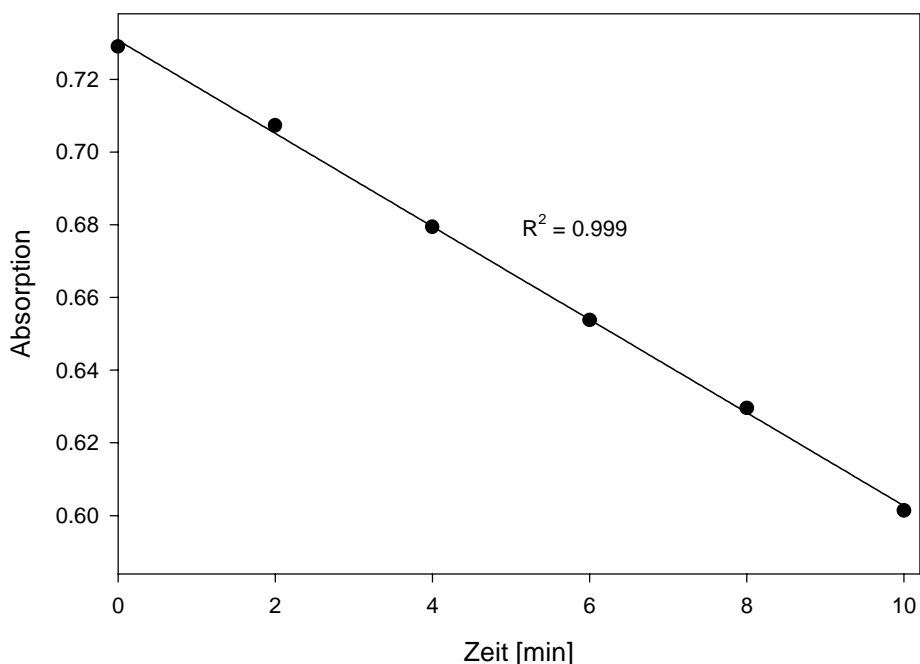


Abbildung 6.7. Abhängigkeit der Absorption (318 nm) des Thiazolthions **3b** von der Bestrahlungszeit bei Photolyse (308 nm, 20 °C, 0-10 min) einer 50 μM Lösung des Thiazolthions **3b** in H_2O -MeCN (40%)

V-49: Zersetzungsquantenausbeute des Thiazolthions **3b** (II-HOK-4)

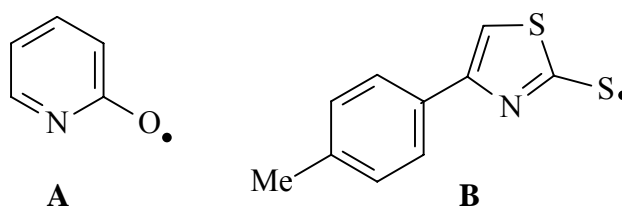
Die Bestrahlung des Aktinometers (Kaliumferrioxalat) erfolgte in Anlehnung an AAV-1. Als Bestrahlungsquelle diente aber im Unterschied zu der AAV-1 die Xe-Lampe eines Fluoreszenz-Photometers ($\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$), und es wurde ein Volumen von 2.00 ml des Aktinometers für 20 min bestrahlt. Die der Photolyse anschließende Aufbereitung des Aktinometers erfolgte gemäß der AAV-1. Die über diesen Aktinometer unter Zuhilfenahme der Gl. 6.1 bestimmte Photonenzahl betrug $(3.16 \pm 0.27) \times 10^{-9} \text{ Einstein min}^{-1}$.

Das Thiazolthion **3b** (2.00 ml, 50 μM) wurde unter identischen Bedingungen wie der Aktinometer für 5:00 min in Wasser-Acetonitril (60 : 40) bestrahlt. Der Umsatz an Thiazolthion **3b** wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt durch Messen der Absorptionsdifferenz bei 318 nm vor und nach der Bestrahlung. Die Anzahl der umgesetzten Thiazolthion-Moleküle betrug in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten: $(9.44 \pm 0.17) \times 10^{-9} \text{ mol}$ (in 2.00 ml bei 5:00 min Bestrahlungszeit). Daraus wurden gemäß Gl. 6.2 die Zersetzungsquantenausbeute berechnet: $\Phi_{\text{dec}} [\text{H}_2\text{O-MeCN (40\%)}] = 0.60 \pm 0.05$.

6.3.2.5 Quantenausbeute für die Radikalfreisetzung der Radikalquellen **2b** und **3b**

Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV-6)

Die Quantenausbeute der Radikalfreisetzung, die identisch ist mit der Quantenausbeute der NO-Bindungsspaltung $\Phi_{\text{N-O}}$ der *Photo-Fenton*-Reagenzien **2b** und **3b**, wurde mittels Transienten-Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurden die bei Anregung (308 nm) durch photolytischen NO-Bindungsbruch gebildeten Chromophorradikale **A** und **B** quantifiziert.



Die Vorbereitung und Anregung der Proben erfolgte analog zu der AAV-5. Vor der Anregung wurden die Proben durch dreimaliges „freeze pump thaw“ entgast.

Die Quantenausbeute der NO-Bindungsspaltung $\Phi_{\text{N-O}}$ wurde unter Verwendung von Benzophenon als Referenz über Gleichung 6.3⁹⁷ bestimmt.

$$\Phi_{\text{N-O}} = \Phi_{\text{T(BP)}} \times [A_{\text{R}} / A_{\text{T(BP)}}] \times [\varepsilon_{\text{T(BP)}} / \varepsilon_{\text{R}}] \quad (\text{Gl. 6.3})$$

Mit:

$\Phi_{\text{T(BP)}}$ Quantenausbeute von Benzophenon, den Triplett-Zustand zu bilden. In Benzol ist

$$\Phi_{\text{T(BP)}} = 1.0^{137}$$

$\varepsilon_{\text{T(BP)}}$ Molare Absorptionskoeffizient des Benzophenon im Triplett-Zustand

$$\varepsilon_{\text{T(BP)}} = 7220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ bei } 530 \text{ nm in Benzol}^{138}$$

$A_{\text{T(BP)}}$ Experimentell bestimmte Absorption des Triplett-Zustandes von Benzophenon in Benzol bei 530 nm nach Anregung durch die 308-nm-Laserlinie.

ε_{R} Molare Absorptionskoeffizient der bei der Anregung der Radikalquellen **2b** oder **3b** freigesetzten Radikale R.

R = Pyridyloxyradikal **A**: $\epsilon_A = 680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 390 nm ⁹⁹

R = Thiylradikal **B**: $\epsilon_B \approx \epsilon$ (Pyridyl-2-thiylradikal) = $600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 460 nm ⁹⁷

A_R Experimentell bestimmte Absorption von
Transient **A** bei 390 nm in Wasser (A_A) und von
Transient **B** bei 460 nm in Acetonitril (A_B)
nach Anregung durch die 308 nm -Laserlinie.

Alle Proben, die gemessen wurden, hatten die gleiche optische Dichte (Absorption bei $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$ war $A_{308} = 0.165$) wie die Referenz Benzophenon, damit gewährleistet werden konnte, dass von den zu untersuchenden Verbindungen die gleiche Photonenzahl wie von der Referenz absorbiert wird.

V-50: Quantenausbeute der Radikalfreisetzung von Pyridon **2b** (VI-SFM-20 bis 22)

Eine $41 \mu\text{M}$ Lösung ($A_{308} = 0.165$) von Pyridon **2b** in Wasser wurde wie in AAV-5 und AAV-6 beschrieben vorbereitet und angeregt. Bei der Bestrahlung wurde ein Glasfilter (420 nm) verwendet. Die Absorption bei 390 nm (A_A) wurde direkt nach der Anregung mit der 308-nm -Laserlinie gemessen. Sie betrug in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten $A_A = 0.021$.

Bereits vor der Pyridon-Lösung wurde die Benzophenon-Lösung in Benzol ($A_{308} = 0.165$) gemessen. Sie wurde wie in AAV-5 und AAV-6 beschrieben vorbereitet und angeregt. Die Absorption $A_{T(\text{BP})}$ bei 530 nm betrug 0.302 ± 0.020 (bestimmt durch sechsmalige Anregung der Benzophenonlösung). Unter Verwendung der Gl. 6.3 konnte die Quantenausbeute der Radikalfreisetzung Φ_{N-O} für das Pyridon **2b** bestimmt werden. Sie betrug Φ_{N-O} (Pyridon **2b**) = $74\% \pm 7\%$.

V-51: Quantenausbeute der Radikalfreisetzung von Thiazolthion **3b** (VI-SFM-23 bis 25)

Eine ca. $13 \mu\text{M}$ Lösung ($A_{308} = 0.165$) von Thiazolthion **3b** in Acetonitril wurde wie in AAV-5 und AAV-6 beschrieben vorbereitet und angeregt. Bei der Bestrahlung wurde ein Glasfilter (420 nm) verwendet. Die Absorption bei 460 nm (A_B) wurde direkt nach der Anregung mit

der 308-nm-Laserlinie gemessen. Sie betrug in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten $A_B = 0.016$.

Unter Verwendung der in **V-50** bestimmten $A_{T(BP)}$ und der Gl. 6.3 konnte die Quantenausbeute der Radikalfreisetzung Φ_{N-O} für das Thiazolthion **3b** abgeschätzt werden. Es handelt sich hierbei nur um eine Abschätzung, da der genaue molare Extinktionskoeffizient des Thiylradikals ϵ_B nicht bekannt ist und nur ein Näherungswert (der des Pyridyl-2-thiylradikals) herangezogen werden konnte.⁹⁷ Mit diesem Näherungswert betrug Φ_{N-O} (Thiazolthion **3b**) = (64 ± 6)%.

6.3.3 EPR-spektroskopische Untersuchungen (Spin-Trapping mit DMPO)

V-52: *Bestrahlung von Thiazolthion 3b in Benzol (I-HOK-80)*

Nach AAV-2 wurde eine Lösung von Thiazolthion **3b** (3.00 mM) und **DMPO** (90 mM) in Benzol für 5 min unter atmosphärischen Bedingungen im Rayonet Photoreaktor (350 nm) bestrahlt. Die Kopplungskonstanten der detektierten Addukte sind in Tabelle 6.11 aufgelistet.

V-53: *Bestrahlung von Pyridon 2b in Benzol (III-SFM-8)*

Nach AAV-2 wurde eine Lösung von Pyridon **2b** (3.00 mM) und **DMPO** (90 mM) in Benzol für 5 min unter atmosphärischen Bedingungen im Rayonet Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Die Kopplungskonstanten der detektierten Addukte sind in Tabelle 6.11 aufgelistet.

V-54: *Bestrahlung von Thiazolthion 3b in H₂O : MeCN (60 : 40) in Abhängigkeit von der Konzentration an DMPO (II-HOK-2, IV-SFM-44)*

Nach AAV-2 wurde eine Lösung von Thiazolthion **3b** (3.00 mM) in H₂O : MeCN (60 : 40) für 5 min unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an **DMPO** (9.00, 27.0, 90.0 mM) im Rayonet-Photoreaktor (350 nm) bestrahlt. Unabhängig von der Konzentration an **DMPO** konnte nur ein **DMPO**-Addukt detektiert werden. Die Kopplungskonstanten des detektierten Adduktes sind in Tabelle 6.11 aufgelistet.

Tabelle 6.11. Messwerte für die Hyperfeinkopplungskonstanten und den Landé-Faktor der **DMPO**-Addukte nach Bestrahlung^{a)} der *Photo-Fenton-Reagenzien* **2b**^{b)} und **3b**^{c)} und Aceton^{b)} in verschiedenen Lösungsmitteln

V-	Solvens	Substrat	Additiv	Addukt	a _H [Gauss]	a _N [Gauss]	g-Wert
52	Benzol	3b	---	DMPO-OⁱPr	6.7	12.8	2.0058
53	Benzol	2b	---	DMPO-OⁱPr	6.4	12.8	2.0058
54	H ₂ O-MeCN	3b	---	DMPO-OⁱPr	9.9 1.3	14.4	2.0058
55	H ₂ O-MeCN	2b	---	DMPO-OⁱPr	9.8 1.3	14.5	2.0059
				DMPO-CMe₂OH	23.9	15.9	2.0058
56	H ₂ O	2b	---	DMPO-CMe₂OH	23.9	15.9	2.0058
57	H ₂ O-MeCN	Aceton ^{d)}	HO ⁱ Pr ^{e)}	DMPO-CMe₂OH	24.1	15.5	2.0058
58	H ₂ O-MeCN	2b	3b	DMPO-OⁱPr	9.8 1.3	14.4	2.0057
59	H ₂ O-MeCN	2b	Disulfid 7^{f)}	DMPO-OⁱPr	9.7 1.2	14.3	2.0058

^{a)} Bedingungen: 10 °C, 5 min; ^{b)} Bestrahlung im Rayonet (300 nm); ^{c)} Bestrahlung im Rayonet (350 nm); ^{d)} [Aceton] = 400 mM; ^{e)} [HOⁱPr] = 800 mM; ^{f)} [Disulfid **7'**] ≤ 0.50 mM

V-55: Bestrahlung von Pyridon **2b** in H₂O : MeCN (60 : 40) in Abhängigkeit von der Konzentration an **DMPO** (IV-SFM-44)

Nach AAV-2 wurde eine Lösung von Pyridon **2b** (3.00 mM) in H₂O : MeCN (60 : 40) für 5 min unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an **DMPO** (9.00, 27.0, 90.0 mM) im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Es konnten zwei **DMPO**-Radikaladdukte detektiert werden (**DMPO-OⁱPr** und **DMPO-CMe₂OH**). Die Kopplungskonstanten der detektierten Addukte sind in Tabelle 6.11 aufgelistet. Mit abnehmender Konzentration an **DMPO** stieg der Anteil an **DMPO-CMe₂OH**.

V-56: *Bestrahlung von Pyridon 2b in Wasser (IV-SFM-51)*

Nach AAV-2 wurde eine Lösung von Pyridon **2b** (3.00 mM) und **DMPO** (90 mM) in Wasser für 5 min unter atmosphärischen Ausschluss von molekularem Sauerstoff im Rayonet Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Die Kopplungskonstanten des detektierten Adduktes sind in Tabelle 6.11 aufgelistet.

V-57: *Authentische Generierung von DMPO-CMe₂OH (II-HOK-9, IV-SFM-52)¹⁴¹*

Nach AAV-2 wurde eine Lösung von Aceton (400 mM) und Isopropanol (800 mM) in Gegenwart von **DMPO** (90 mM) unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff für 10 min im Rayonet Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Die Kopplungskonstanten des detektierten Adduktes sind in Tabelle 6.11 aufgelistet.

V-58: *Bestrahlung von Pyridon 2b in Gegenwart von Thiazolthion 3b (II-HOK-10, IV-SFM-53)*

Nach AAV-2 wurde eine Lösung von Pyridon **2b** (1.00 mM) und Thiazolthion **3b** (1.00 mM) in H₂O : MeCN (60 : 40) in Gegenwart von **DMPO** (27 mM) unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff für 5 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Es konnte ausschließlich das **DMPO-OⁱPr**-Addukt detektiert werden.

V-59: *Bestrahlung von Pyridon 2b in Gegenwart von Disulfid 7' (II-HOK-10, IV-SFM-53)*

Nach AAV-2 wurde eine Lösung von Pyridon **2b** (1.00 mM) und Disulfid **7'** (gesättigte Lösung, < 0.50 mM) in H₂O : MeCN (60 : 40) in Gegenwart von **DMPO** (27 mM) unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff für 5 min im Rayonet-Photoreaktor (300 nm) bestrahlt. Es konnte ausschließlich das **DMPO-OⁱPr**-Addukt detektiert werden.

6.3.4 Photooxidation von pBR 322 DNA

V-60: *Strangbruchbildung durch die Photo-Fenton-Reagenzien 2b und 3b: Einfluss des Lösungsmittels und des Radikalfängers Isopropanol (II-HOK-1, IV-SFM-42)*

Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift (AAV-3) zur Detektion von Strangbrüchen in superhelikaler pBR 322 DNA wurde eine Lösung von Pyridon **2b** (1.50 mM) in [H₂O-MeCN (60 : 40)] (Abb. 6.8, Probe 2 und Abb. 6.9, Probe 5) und in reinem Wasser (Abb. 6.9, Probe 4) jeweils in Gegenwart von superhelikaler pBR 322 DNA für 30 min mit einer Blacklight-Lampe (312 nm) bestrahlt. Unter identischen Bedingungen wurde auch das Thiazolthion **3b** [1.50 mM in H₂O-MeCN (60 : 40)] photolysiert (Abb. 6.8, Probe 3). Die Bestrahlungen wurden auch in Gegenwart von 10 Vol % Isopropanol als Radikalfänger durchgeführt (Probe Abb. 6.9, Proben 2 und 3). Bei der Kontrollreaktion wurde die pBR 322 DNA in Puffer ohne Zugabe weiterer Reagenzien bestrahlt (Probe 1 in Abb. 6.8 und Abb. 6.9). Die nach elektrophoretischer Trennung erhaltenen Gels sind in Abb. 6.8 und Abb. 6.9 dargestellt.

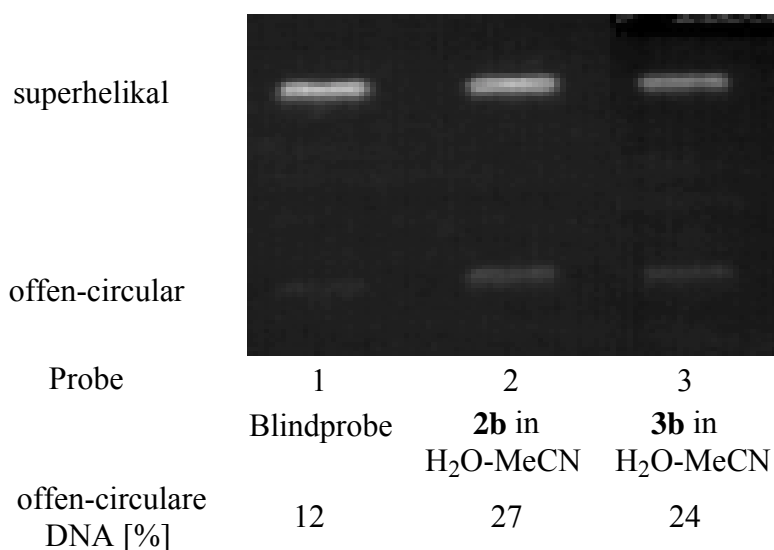


Abbildung 6.8. Gelelektrophoretische Detektion von Einzelstrangbrüchen bei Photolyse (312 nm, 0 °C, 30 min) des Pyridons **2b** (1.50 mM) und des Thiazolthions **3b** (1.50 mM) in Gegenwart von superhelikaler pBR 322 DNA (50 mg/l) in H₂O-MeCN (60 : 40). Bei der Blindprobe erfolgte die Bestrahlung der DNA ohne Additiv. Der mittlere Fehler betrug $\pm 5\%$ der angegebenen Werte.

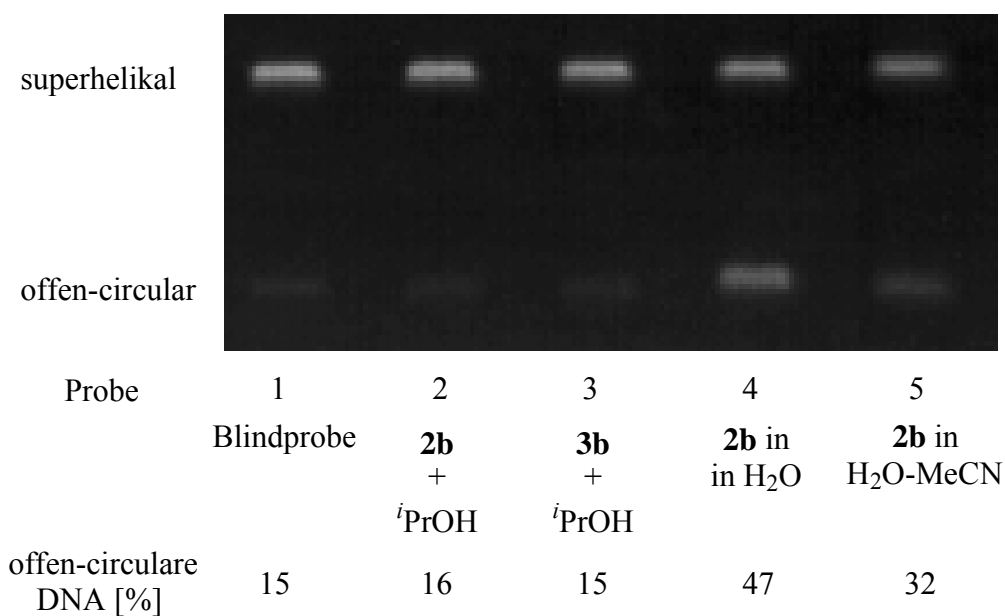


Abbildung 6.9. Gelelektrophoretische Detektion von Einzelstrangbrüchen bei Photolyse (312 nm, 0 °C, 30 min) des Pyridons **2b** (1.50 mM) und des Thiazolthions **3b** (1.50 mM) in Gegenwart von superhelikaler pBR 322 DNA (50 mg/l) in H₂O-MeCN (40%) unter dem Einfluss von Isopropanol (10 Vol%). Das Pyridon **2b** wurde auch ohne Isopropanol in H₂O und in H₂O-MeCN (60 : 40) in Gegenwart der DNA bestrahlt. Bei der Blindprobe erfolgte die Bestrahlung der DNA ohne Additiv. Der mittlere Fehler betrug $\pm 5\%$ der angegebenen Werte.

7 Literaturverzeichnis

- ¹ Coldiron, B. M. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1992**, *27*, 783-785.
- ² Slaper, H.; Velders, G. J.; Daniel, M. J. S.; de Gruijl, F. R.; van der Leun, J. C. *Nature* **1996**, *384*, 256-258.
- ³ Kwa, R. E.; Campano, K.; Moy, R. L. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1992**, *26*, 1-26.
- ⁴ Miller, D. L.; Weinstock, M. A. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1994**, *30*, 774-778.
- ⁵ Scharffetter-Kochanek, K.; Wlaschek, M.; Bolsen, K.; Herrmann, G.; Lehmann, P.; Goerz, G.; Mauch, C.; Plewig, G. *The Environmental Threat of the Skin*, London, 1992; pp 72-82.
- ⁶ a) Black, H. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 213-221. b) Dalle-Carbonare, M.; Pathrak, M. A. *J. Photochem. Photobiol.* **1992**, *B14*, 105-124. c) Jurkiewicz, B. A.; Bisset, D. L.; Buettner, G. R. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *104*, 484-488. d) Jurkiewicz, B. A.; Buettner, G. R. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 1-4. e) Taira, ; Mimura, J. K.; Yoneya, T.; Hagi, A.; Murakami, A.; Makino, K. *J. Biochem.* **1992**, *111*, 693-695.
- ⁷ a) Autier, P.; Doré, J.-F.; Lejeune, F.; Koelmel, K. F.; Geffeler, O.; Hille, P.; Cesarini, J. P.; Liénard, D.; Liaboef, A.; Joarlette, M.; Chemaly, B.; Hakim, K.; Koeln, A.; Kleeberg, U. R. *Melanoma Res.* **1994**, *4*, 79-85. b) Donawho, C.; Wolf, P. *Curr. Opin. Oncol.* **1996**, *8*, 159-166. c) Holly, E. A.; Aston, D. A.; Cress, R. D.; Ahn, D. K.; Kristiansen, J. J. *Am. J. Epidermiol.* **1995**, *141*, 923-933. d) Klein-Szanto, A. J. P.; Silvers, W. K.; Mintz, B. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4569-4572. e) Rohmerdahl, C. A.; Stephens, L. C.; Bucana, C.; Kripke, M. L. *Cancer Commun.* **1989**, *1*, 209-216. f) Setlow, R. B.; Grist, E.; Thompson, K.; Woodhead, A. D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 6666-6670. g) Withman, D.; Green, A. *Cancer Causes Control* **1994**, *5*, 564-572.
- ⁸ Stryer, L. *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, **1987**.
- ⁹ Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Meth. Enzymol.* **1990**, *186*, 1-85.
- ¹⁰ Scharffetter-Kochanek, K.; Wlaschek, M.; Brenneisen, P.; Schauen, M.; Blaudschun, R.; Wenk, J. *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1247-675.
- ¹¹ Darr, D.; Fridovich, I. *J. Invest. Dermatol.* **1994**, *102*, 671-675.
- ¹² Dekant, W.; Vamvakas, S. *Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1994.
- ¹³ Cerutti, P. A. *Lancet* **1994**, *344*, 862-863.
- ¹⁴ Grossweiner, L. I. In *The Science of Photobiology*; Smith, K. C., Ed.; Plenum Press: New York, 1989, pp 1-46.

- ¹⁵ Grossweiner, L. I.; Smith, K.C. In *The Science of Photobiology*; Smith, K. C., Ed.; Plenum Press, New York, 1989, pp 47-78.
- ¹⁶ Gasparro, F. P.; Fresco, J. R. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 4239-4251.
- ¹⁷ Gallagher, P. E.; Duker, N. J. *Molec. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 707-709.
- ¹⁸ Fisher, G. J.; Johns, H. E. In *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*; Wang, S. J., Ed.; Academic Press: New York, 1976, Vol. 1, pp 169-224.
- ¹⁹ Wang, S. Y. In *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*; Wang, S. J., Ed.; Academic Press: New York, 1976, Vol. 2, pp 295-356.
- ²⁰ Varghese, A. J. *Photophysiology* **1972**, 207-274.
- ²¹ Patrick, M. H.; Rahn, R. O. In *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*; Wang, S. J., Ed.; Academic Press: New York, 1976, pp 35-95.
- ²² Cadet, J.; Voituriez, L.; Grand, A.; Hruska, F. E.; Vigny, P.; Kan, L.-S. *Biochimie* **1985**, *67*, 277-292.
- ²³ Cadet, J.; Vigny, P. In *Bioorganic Photochemistry*; Morrison, H., Ed.; Wiley: New York, Vol. 1, 1990.
- ²⁴ Foote, C. S. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 659.
- ²⁵ a) Buchko, G. W.; Cadet, J.; Ravanat, J. L.; Labataille, P. *Int. J. Radiat. Biol.* **1993**, *63*, 669-676. b) Douki, T.; Cadet, J. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**, *15*, 199-213.
- ²⁶ a) Encinas, M. V.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6393-6397. b) Morin, B.; Cadet, J. *Chem. Res. Tox.* **1995**, *8*, 792-799.
- ²⁷ a) Fischer, G. J.; Land, E. J. *Photochem. Photobiol.* **1983**, *37*, 27-32. b) Cadet, J.; Berger, M. *Photochem. Photobiol.* **1985**, *41*, 113S. c) Foote, C. S. In *Photosensitization*; Moreno, G., Ed.; Springer Verlag: Berlin, NATO ASI Series, 1988, Vol. H 54, pp125-144.
- ²⁸ Kittler, L.; Löber, G.; Gollmick, F. A.; Berg, H. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *116*, 503-511.
- ²⁹ Hutter, M.; Clark, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7574-7577.
- ³⁰ Dizdaroglu, M. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 225-242.
- ³¹ Cadet, J.; Berger, M.; Buchko, G. W.; Joshi, P. C.; Raoul, S.; Ravanat, J.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7403-7404.
- ³² Buchko, G. W.; Cadet, J.; Ravanat, J.-L.; Labataille, P. *Int. J. Radiat. Biol.* **1993**, *63*, 669-676.
- ³³ Kasai, H.; Yamaizumi, Z.; Berger, M. Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9692-9694.
- ³⁴ Bonnet, R. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 19-33.

- ³⁵ Floyd, R. A.; West, M. S.; Eneff, K. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *273*, 106-111.
- ³⁶ Cadet, J.; Decarroz, C.; Wang, S. Y.; Midden, W. R. *Isr. J. Chem.* **1983**, *23*, 420-429.
- ³⁷ Croke, D. T.; Perrouault, L.; Sari, M. A.; Battioni, J.-B.; Mansuy, D.; Helene, C.; Le Doan, T. *J. Photochem. Photobiol.* **1993**, *18*, 41-50.
- ³⁸ Sheu, C.; Foote, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6439-6442.
- ³⁹ Adam, W.; Saha-Möller, C. R.; Schönberger, A.; Berger, M.; Cadet, J. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 231-238.
- ⁴⁰ Raoul, S.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1892-1898.
- ⁴¹ Adam, W.; Saha-Möller, C. R.; Schönberger, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9233-9238.
- ⁴² Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 6th ed.; Wissenschaftsverlag: Mannheim, 1992.
- ⁴³ Walling, C. *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 125-131.
- ⁴⁴ Adam, W.; Andler, S.; Saha-Möller, C. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *349*, 261-266.
- ⁴⁵ a) Boivin, J.; Crépon, E.; Zard, S. Z. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6869-6872. b) Boivin, J.; Crépon, E.; Zard, S. Z. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1992**, *129*, 145-150.
- ⁴⁶ a) Saito, I.; Takayama, M.; Matsuura, T.; Matsugo, S.; Kawanishi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 883-884. b) Matsugo, S.; Kawanishi, S.; Yamamoto, K.; Sugiyama, H.; Matsuura, T.; Saito, I. *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1343-1344. c) Matsugo, S.; Kumaki, S.; Shimasaki, C.; Mori, T.; Saito, I. *Chem. Lett.* **1993**, 453-456.
- ⁴⁷ a) Epe, B.; Häring, M.; Ramaiah, D.; Stopper, H.; Abou-Elzahab, M. M.; Adam, W.; Saha-Möller, C. R. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 2271-2276. b) Adam, W.; Cadet, J.; Dall'Acqua, F.; Epe, B.; Frank, S.; Ramaiah, D.; Saha-Möller, C. R.; Vedaldi, D. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 91-93.
- ⁴⁸ a) Adam, W.; Ballmaier, D.; Epe, B.; Grimm, G. N.; Saha-Möller, C. R. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2326-2328. b) Epe, B.; Ballmaier, D.; Adam, W.; Grimm, G. N.; Saha-Möller, C. R. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1625-1631.
- ⁴⁹ Adam, W.; Groer, P.; Mielke, K.; Saha-Möller, C. R.; Kiefer, W.; Nagel, V.; Schneider, C. W.; Ballmaier, D.; Epe, B.; Schleger, Y. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 26-33.
- ⁵⁰ Adam, W.; Marquardt, S.; Saha-Möller, C. R. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 287-291.
- ⁵¹ Adam, W.; Hartung, J.; Okamoto, H.; Saha-Möller, C. R.; Spehar, K. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 619-624.
- ⁵² Paillous, N.; Vicendo, P. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, *20*, 203-209.

- ⁵³ Pardo, L.; Banfelder, J. R.; Osman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2382-2390.
- ⁵⁴ Miaskiewicz, K.; Osman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 232-238.
- ⁵⁵ Pogozelski, W. K.; Tullius, T. D. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089-1107.
- ⁵⁶ Sy, D.; Savoye, C.; Begusova, M.; Michalik, V.; Charlier, M.; Spothem-Maurizot, M. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *72*, 147.
- ⁵⁷ Dussy, A.; Meggers, E.; Giese, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7399-7403.
- ⁵⁸ Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.
- ⁵⁹ Wagner, R. J.; v. Lier, J. E.; Berger, M.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2235-2242.
- ⁶⁰ Thornalley, P. J. *Health Perspect.* **1985**, *64*, 297-307.
- ⁶¹ Soares, C. H. L.; Bechara, E. J. H. *Photochem. Photobiol.* **1982**, *36*, 117-119.
- ⁶² Monteiro, H. P.; Abdalla, D. S. P.; Augusto, O.; Bechara, E. J. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *271*, 206-216.
- ⁶³ Poyer, J. L.; McCay, P. B.; Lai, E. K.; Janzen, E. G.; Davis, E. R. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1980**, *94*, 1154-1160.
- ⁶⁴ Connor, H. D.; Thurman, R. G.; Galizi, M. D.; Mason, R. P. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4542-4548.
- ⁶⁵ Kalyanaraman, B.; Sinha, B. K. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *64*, 219-232.
- ⁶⁶ Knecht, K. T.; Bradford, B. U.; Mason, R. P.; Thurman, R. G. *Mol Pharmacol.* **1990**, *38*, 26-30.
- ⁶⁷ Kato, T.; Kojima, K.; Hiramoto, K.; Kikugawa, K. *Mutat. Res.* **1992**, *268*, 105-114.
- ⁶⁸ Athar, M.; Mukhtar, H.; Bickers, D. R.; Khan, I. V.; Kalayanaraman, B. *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 1499-1503.
- ⁶⁹ Maeda, M.; Nushi, K.; Kawazoe, Y. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2677-2682.
- ⁷⁰ Zady, M. F.; Wong, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2677-2682.
- ⁷¹ Augusto, O. *Free Radical. Biol. Med.* **1993**, *15*, 329-336.
- ⁷² Kwee, J. K.; Armelin, M. S.; Stefani, H. A.; Augusto, O. *Chem.-Biol. Interact* **1998**, *116*, 61-77.
- ⁷³ Hix, S.; Kadiiska, M. B.; Mason, R. P.; Augusto, O. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 1056-1064.
- ⁷⁴ Veltwisch, D.; Janata, E.; Asmus, K. D. *J. Chem. Soc. PT 2* **1980**, 146-153.
- ⁷⁵ Davies, M. J. *Biochem. Biophys. Acta* **1988**, *964*, 28-35.
- ⁷⁶ Kalyanaraman, B.; Mottley, C.; Mason, R. P. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 3855-3858.

- ⁷⁷ Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. *Mol. Pharmacol.* **1980**, *17*, 233-238.
- ⁷⁸ Greenley, T. L.; Davies, M. J. *Biochem. Biophys. Acta* **1992**, *1116*, 192-203.
- ⁷⁹ Elstner, E. F. *Der Sauerstoff, Biochemie, Biologie, Medizin*; Wissenschaftsverlag: Mannheim, 1990, pp 1-529.
- ⁸⁰ Ames, B. N. *Science* **1983**, *221*, 1256-1264.
- ⁸¹ Fenton, H. J. H.; Jackson, H. J. *Chem. Soc. Trans.* **1899**, *75*, 1-11.
- ⁸² von Sonntag, C.; Schuchmann, H.-P. *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1242-1254.
- ⁸³ Adam, W.; Arnold, M. A.; Pischel, U.; Saha-Möller, C. R. *Nucleic Acid Research* **2001**, *29*, 4955-4962.
- ⁸⁴ Simandan, T.; Sun, J.; Dix, T. A. *Biochem. J.* **1998**, *338*, 233-240.
- ⁸⁵ Adam, W.; Arnold, M. A.; Saha-Möller, C. R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 597-604.
- ⁸⁶ Adam, W.; Kurz, A.; Saha-Möller, C. R. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 1199-1207.
- ⁸⁷ Das, S.; Schuchmann, M. N.; Schuchmann, H.-P.; von Sonntag, C. *Chem. Ber.* **1987**, *120*, 319-323.
- ⁸⁸ Furimsky, E.; Howard, J. A. *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 677-680.
- ⁸⁹ Russell, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871-3877.
- ⁹⁰ Bothe, E.; Schulte-Frohlinde, D. *Z. Naturforsch.* **1978**, *B33*, 786-788.
- ⁹¹ Ingold, K. U. *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 1-9.
- ⁹² Adam, W.; Grimm, G. N.; Saha-Möller, C. R.; Dall'Acqua, F.; Miolo, G.; Vedaldi, D. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1089-1097.
- ⁹³ Mahler, H. C.; Schulz, I.; Adam, W.; Grimm, G. N.; Saha-Möller, C. R.; Epe, B. *Mutat. Res.* **2001**, *461*, 289-299.
- ⁹⁴ Adam, W.; Arnold, M. A.; Grimm, G. N.; Saha-Möller, C. R. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 511-518.
- ⁹⁵ Adam, W.; Grimm, G. N.; Marquardt, S.; Saha-Möller, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1179-1185.
- ⁹⁶ Adam, W.; Grimm, G. N.; Saha-Möller, C. R. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *24*, 234-238.
- ⁹⁷ Aveline, B. M.; Kochevar, I. E.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10113-10123.
- ⁹⁸ Hartung, J.; Schwarz, M.; Svoboda, I.; Fuess, H.; Duarte, M. T. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1275-1290.

- ⁹⁹ Aveline, B. M.; Kochevar, I. E.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10124-10133.
- ¹⁰⁰ a) Seawell, P. C.; Ganesan, A. K. In *DNA Repair*; Friedberg, E. C.; Hanawalt, D. C., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1981, Chapter 32. b) Sealey, P. G.; Southern, E. M. In *Gel electrophoresis of DNA, A Practical Approach*; Richwood, D.; Hanes B. D., Eds.; Oxford University Press: London, 1990, Chapter 2.8.2 and 2.8.3.
- ¹⁰¹ a) Floyd, R. A.; Watson, J. J.; Wong, P. K.; Altmiller, D. H.; Rickard, R. C. *Free. Rad. Res. Commun.* **1986**, *1*, 163-172. b) Floyd, R. A.; Hogsett, W. E.; Tingey, D. T. *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *262*, 266-272. c) Floyd, R. A.; West, M. S.; Eneff, K. L.; Schneider, J. E.; Wong, P. K.; Tingey, D. T.; Hogsett, W. E. *Anal. Biochem.* **1990**, *188*, 155-158.
- ¹⁰² Raoul, S.; Berger, M.; Buchko, G. W.; Joshi, P. C.; Morin, B.; Weinfeld, M.; Cadet, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 371-381.
- ¹⁰³ Kobayashi, Y.; Kubo, H.; Kinishita, T. *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 392-398.
- ¹⁰⁴ Lu, M. Y.; Bao, R.; Liu, W.; Li, Y. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5341-5345.
- ¹⁰⁵ Emerson, W. S.; Heimsch, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5152-5154.
- ¹⁰⁶ Atkins, P. W. *Physikalische Chemie*; VCH: Weinheim, 1988.
- ¹⁰⁷ Hatchard, C. G.; Parker, C. A.; *Proc. Roy. Soc. (London)* **1956**, *A235*, 518-536.
- ¹⁰⁸ Janzen, E. G.; McCay, P. B.; Noguchi, T.; Fong, K. L.; Lai, E. K.; Pryor, J. L. In *Free radicals in biology*, Pryor, W. A., Ed.; Academic Press: New York, 1980, Vol. IV.
- ¹⁰⁹ Janzen, E. G. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 31-40.
- ¹¹⁰ Janzen, E.G.; Krygsmann, P. H.; Lindsay, D. A.; Haire, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8279-8284.
- ¹¹¹ Janzen, E. G.; Evans, C. A.; Liu, J. I. *J. Magn. Res.* **1973**, *9*, 513-516.
- ¹¹² Hix, S.; Da Silva Morais, M.; Augusto, O. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19*, 293-301.
- ¹¹³ Hix, S.; Augusto, O. *Chem.-Biol. Interact.* **1999**, *118*, 141-149.
- ¹¹⁴ a) Jones, J. W.; Robins, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 193-201. b) Voegel, J. J.; Altdorfer, M. M.; Benner, S. A. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2061-2069.
- ¹¹⁵ Kohda, K.; Tsunomoto, H. Minoura, Y.; Tanabe, K.; Shibutani, S. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1278-1284.

- ¹¹⁶ a) Katritzky, A. R.; Chapman, A. V., Cook, M.; Millet, G. H. *Chem. Comm.* **1979**, 395-397. b) Katritzky, A. R.; Chapman, A. V., Cook, M.; Millet, G. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1980**, 2743-2754.
- ¹¹⁷ Bors, W.; Michel, C.; Stettmaier, K. J. *Chem. Soc., Perkin Trans.2* **1992**, 1513-1517.
- ¹¹⁸ Weber, M.; Fischer, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7381-7388.
- ¹¹⁹ Walling, C.; Wagner, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *85*, 3368-3375.
- ¹²⁰ Avila, D. V.; Brown, C. E.; Ingold, K. U.; Luszyk, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 466-470.
- ¹²¹ Erben-Russ, M.; Michel, C.; Bors, W.; Saran, M. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 2362-2365.
- ¹²² Adams, G. E.; Willson, R. L. *Trans. Faraday Soc.* **1969**, *65*, 2981.
- ¹²³ Schuchmann, H.-P.; von Sonntag, C. *Z. Naturforsch.* **1984**, *39b*, 217-221.
- ¹²⁴ Newbold, G. T.; Spring, F. S. *J. Chem. Soc.* **1948**, 1864-1866.
- ¹²⁵ Raban, M.; Kost, D. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 499-501.
- ¹²⁶ Paquette, L. A. *Tetrahedron* **1966**, *22*, 25-29.
- ¹²⁷ Losanitch, S. M. *J. Chem. Soc.* **1921**, 763-765.
- ¹²⁸ Cowper, R. M.; Davidson, L. H. *Org. Synth. Coll. Vol 2* **1943**, 480-481.
- ¹²⁹ Usui, Y. *Yakugaku* **1969**, *89*, 689-698.
- ¹³⁰ Williams, D. H.; Fleming, I. *Strukturaufklärung in der organischen Chemie*, 6th ed.; Georg-Thieme-Verlag: Stuttgart, 1991.
- ¹³¹ Norrish, R. G.; Porter, G. *Nature*, **1949**, *164*, 658.
- ¹³² Bonneau, R.; Wirz, J.; Zuberbühler, A. D. *Pure & Appl. Chem.* **1997**, *69*, 979-992.
- ¹³³ Aveline, B. M.; Kochevar, I. E.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9699-9708.
- ¹³⁴ Ito, O.; Matsuda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5871-5874.
- ¹³⁵ Hermann, R.; Dey, G. R.; Naumov, S.; Brede, O. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 1213-1220.
- ¹³⁶ Maillard, B.; Ingold, K. U.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5095-5099.
- ¹³⁷ Inbar, S.; Linschitz, H.; Cohen, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1048-1054.
- ¹³⁸ Bensasson, R. V.; Land, E. J. *Trans. Faraday Soc.* **1971**, *67*, 1904-1915.
- ¹³⁹ Gilbert, B. C.; Holmes, R. G. G.; Norman, R. O. C. *J. Chem. Res.* **1977**(M), *S1*, 0101-0109.

- ¹⁴⁰ Konya, K. G.; Paul, T.; Lin, S.; Luszyk, J.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7518-7527.
- ¹⁴¹ Chiu, T.-M.; Sievierczuk, A.; Wong, S. K.; Bolton, J. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 3343-3347.
- ¹⁴² Pfliederer, W.; Shanshal, M. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1969**, *726*, 201.
- ¹⁴³ Shiro, K.; Kamiya, H.; Inoue, H.; Ohtsuka, E. *Nucleotides Nucleosides* **1994**, *13*, 1517-1434.
- ¹⁴⁴ Fujii, T.; Itaya, T.; Ogawa, K. *Heterocycles* **1997**, *44*, 573-592.
- ¹⁴⁵ Garmet, P. M.; Sura, T. P. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1611-1613.
- ¹⁴⁶ Debus, J. *Ann. Chem.* **1850**, *75*, 130-137.
- ¹⁴⁷ Hartung, J.; Schwarz, M. *Synlett* **2000**, 371-373.
- ¹⁴⁸ Gardner, J. N.; Katritzky, A. R. *J. Chem. Soc.* **1957**, 4375-4387.
- ¹⁴⁹ Farmer, P. B.; Foster, A. B.; Jarman, M.; Tisdale, M. J. *Biochem. J.* **1973**, *135*, 203-213.
- ¹⁵⁰ Dikalov, S. I.; Mason, R. P. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 864-872.

Lebenslauf

Zur Person

Stefan Marquardt

geboren am 16.01.1974 in Ochsenfurt am Main

ledig

Schulbildung

09/80 bis 07/95

Grundschule in Obernburg

09/84 bis 07/90

Gymnasium in Aschaffenburg

09/90 bis 06/93

Gymnasium in Elsenfeld

07/93

Abitur

Hochschulausbildung

11/93 bis 07/95

Grundstudium Chemie, Universität Würzburg

11/95

Vordiplom

11/95-11/97

Hauptstudium Chemie, Universität Würzburg

11/97

Mündlicher Teil des Hauptdiploms

01/98 bis 09/98

Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie, Würzburg, im
Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. h.c. W. Adam:

„*N*-Hydroxypyridin-2-on als photochemische Hydroxylradikalquelle
für photobiologischen Studien“

11/98

Beginn der Dissertation

Berufstätigkeit

seit 01.11.98

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der
Universität Würzburg

Würzburg, den

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „DNA-Schädigung durch photochemische Alkoxyradikalquellen“ 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 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

(Stefan Marquardt)