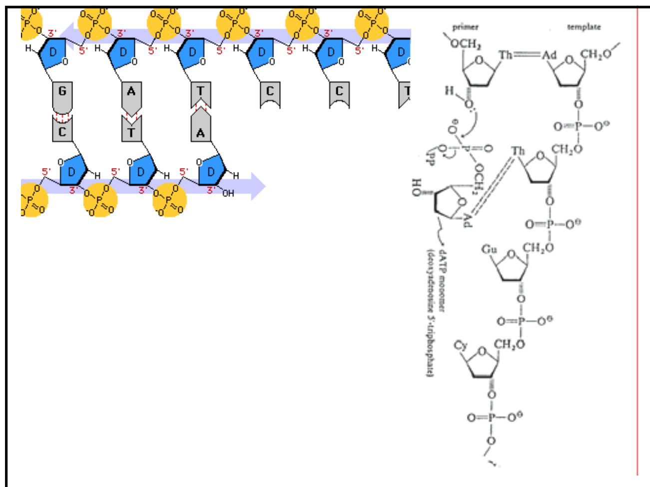
DNA-Polymerasen

Funktionen
Replikation, Transkription
Reparatur von DNA

Voraussetzungen

Startstrang (PRIMER)
Matrize (TEMPLATE)
Substrate (Desoxynucleosid-Triphosphate
Magnesiumionen

Richtung 5´ - 3´
Pyrophosphorolyse



DNA-Polymerase I

Escherichia coli
M: 103 kD, 928 Aminosäuren
400 Moleküle/Zelle
Aktivität: 670 Nucleotide / min
Funktion: Reparatur und Präzision der Basenpaarung
(Fehlerrate 1: 1.000.000)

(DNA-Polymerase III Replikationsenzym: 1000 Nucleotide / s)
Bindungsstellen für Matrize, Starter und Substrate
Zusätzlich Exonuklease-aktivität in 3´-5´und 5´-3´Richtung

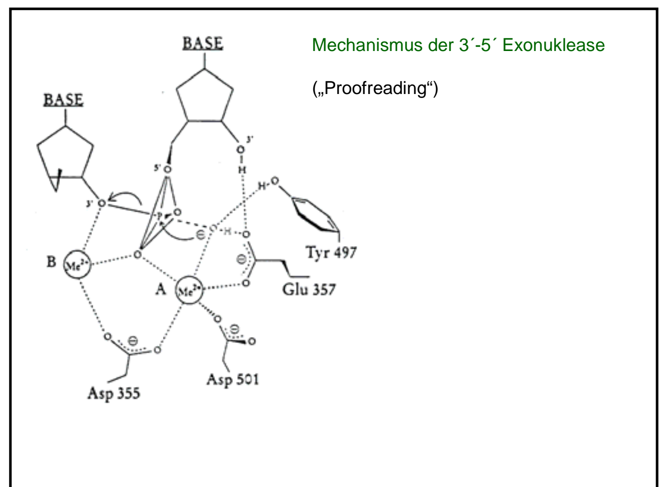
Spaltung mit Subtilisin

Abbau zu Einzelstrang (Startstrang)

Röntgenstruktur des Klenow-Fragments

605 Aminosäuren, PDB: 2KZM

20-24 A



Mechanismus der 3´-5´ Exonuklease

(„Proofreading“)

Einsatz der DNA-Polymerasen zur Sequenzbestimmung

Taq-Polymerase (*Thermophilus aquaticus*)

Chemische Oligonukleotidsynthesen

Aufklärung des genetischen Codes
Synthese von Startsequenzen
Modifikation von DNA und RNA
Linker, Adapter für Klonierungsexperimente
„Antisense“ Oligonukleotide, Hybridisierungsproben für mRNA und cDNA
Gensynthesen

Voraussetzungen:
Bildung des 3´-5´Phosphodiesters, Schutz aller anderen nukleophilen Zentren (Phosphat, Basen, Pentose)
Aktivierung zur Phosphodiesterbildung – Hohe Ausbeuten notwendig

Schutzgruppen: Möglichst quantitative Einführung und Abspaltung
Stabilität unter Synthesebedingungen
Festphasensynthese an polymeren Trägern

Schutzgruppen

Aminogruppen der N-Basen:

Isobutyroyl — Benzoyl — Methoxybenzoyl (Anisoyl)

Schutzgruppen

OH-Gruppen der Pentosen

Triphenylmethyl- (Trityl)
Methoxytrityl-

tert-Butyldimethylsilyl
*t*BDMSi

Methoxytetrahydopyranyl

OH-Gruppen der Phosphate

2-Chlorphenyl-

2-Cyanoethyl- $\xrightarrow{F^-}$ NC⁄⁄ + HOR

Trichlorethyl-

Kopplung

Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)

Mesitylensulfochlorid

Aktivierung als Phosphoramidit

Chloro-N,N-Diisopropylphosphoramidit

Umkehr der enzymatischen Reaktion:
5´-OH als Nukleophil

Phosphotriestermethode

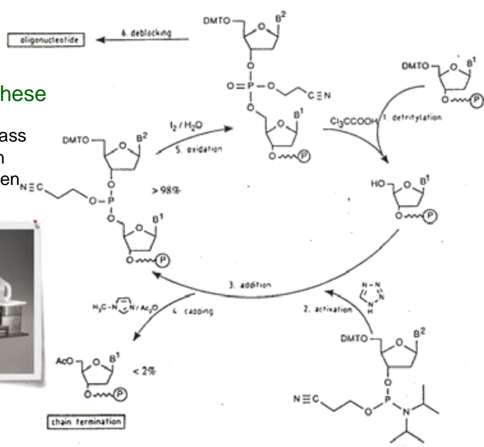
Phosphoramiditmethode

H-Phosphonatmethode

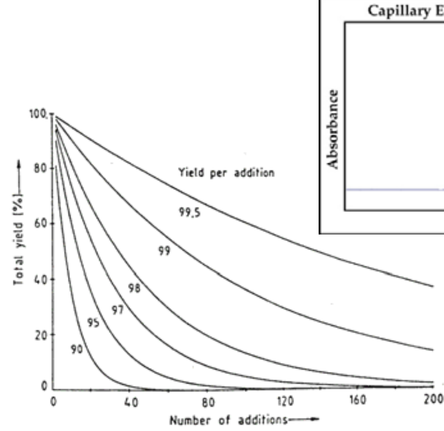
Festphasensynthese

Controlled pore glass
500 A: ~ 80 Basen
1000 A: ~200 Basen

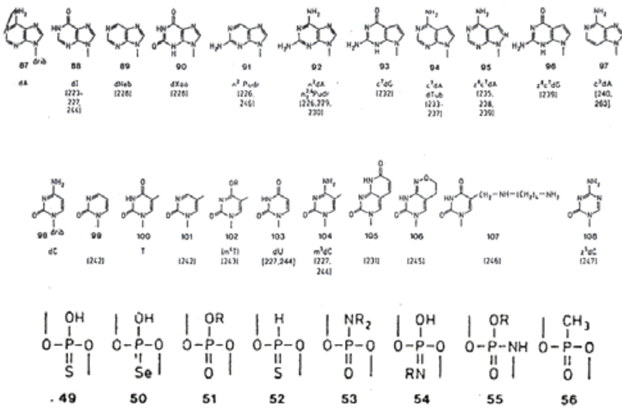
PolyPlex



Gesamtausbeute und Reinheit bei vielstufigen Synthesen

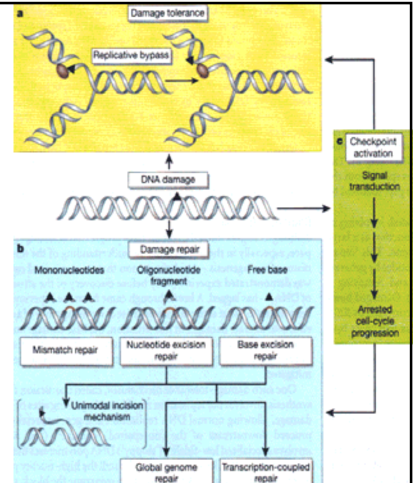


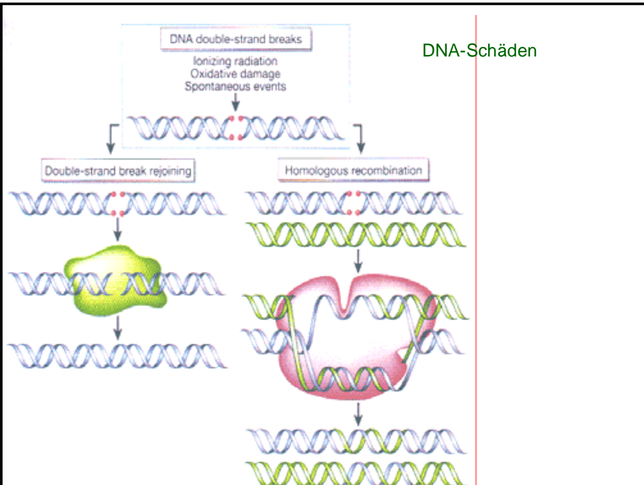
Modifizierte Nukleotide



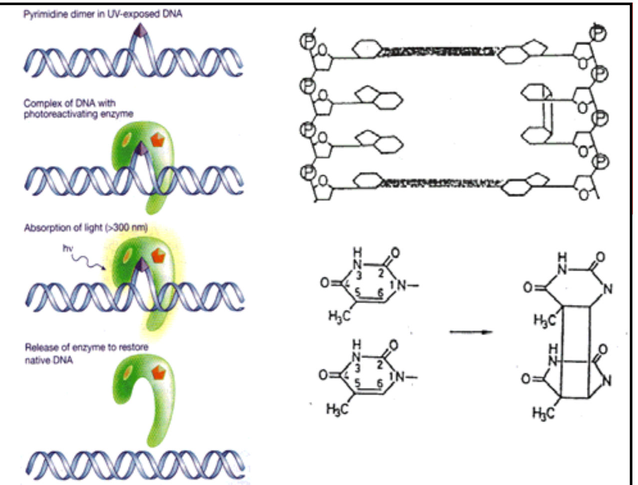
DNA-Schäden

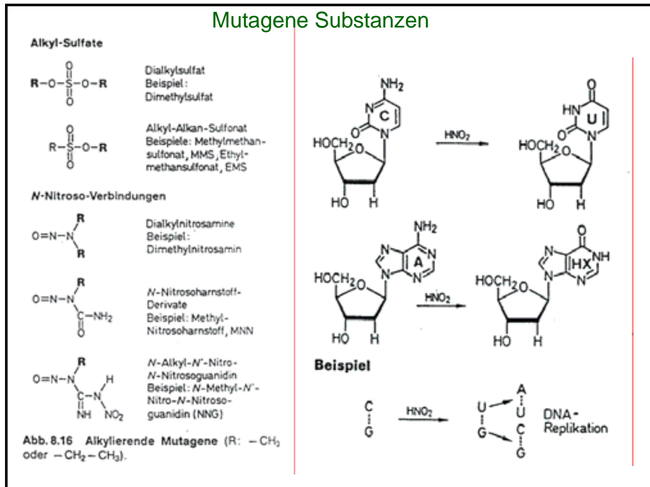
Reparaturmechanismen

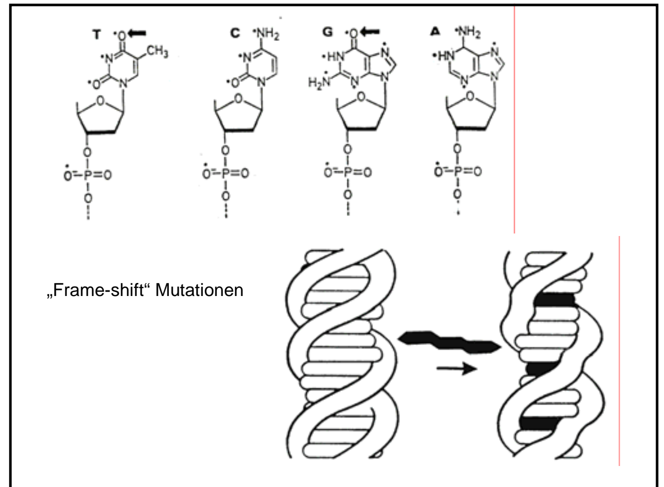


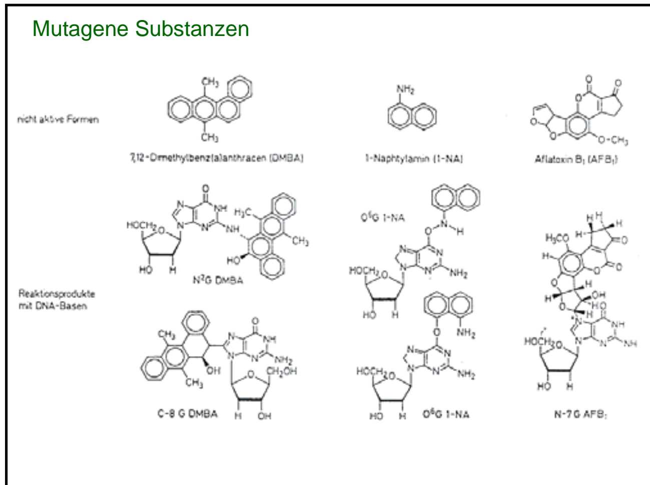


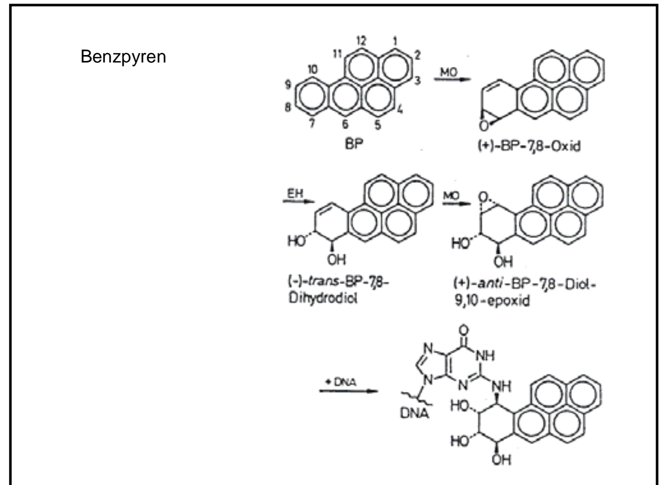
DNA-Schäden

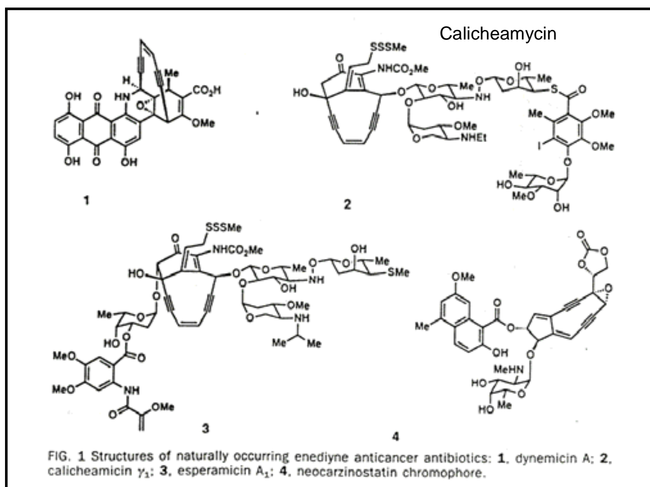


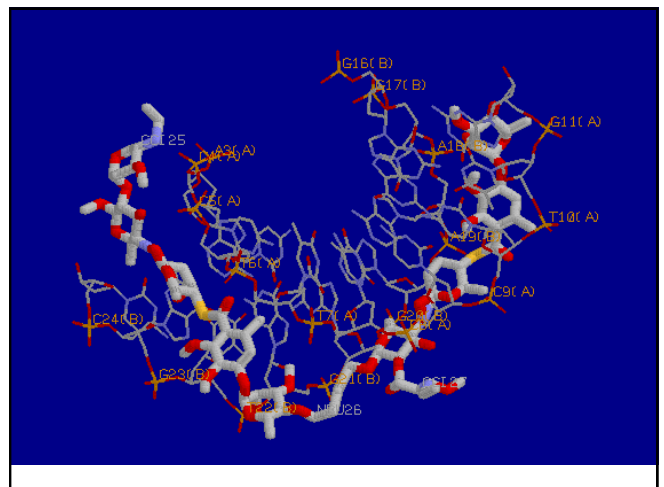

Mutagene Substanzen
Alkyl-Sulfate
Dialkylsulfat
Beispiel:
Dimethylsulfat
Alkyl-Alkan-Sulfonat
Beispiele: Methylmethan-sulfonat, MMS, Ethyl-methansulfonat, EMS
N-Nitroso-Verbindungen
Dialkylnitrosamine
Beispiel:
Dimethylnitrosamin
N-Nitrosoharnstoff-Derivate
Beispiel: Methyl-Nitrosoharnstoff, MNN
N-Alkyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
Beispiel: N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-guanidin (NNG)
Abb. 8.16 Alkylierende Mutagene (R: −CH3 oder −CH2−CH3).
HNO2
Beispiel
DNA-Replikation


T
C
G
A
„Frame-shift“ Mutationen


Mutagene Substanzen
nicht aktive Formen
7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA)
1-Naphtylamin (1-NA)
Aflatoxin B1 (AFB1)
Reaktionsprodukte mit DNA-Basen
N²G DMBA
O⁶G 1-NA
C-8 G DMBA
N-7 G AFB1


Benzpyren
BP
MO
(+)-BP-7,8-Oxid
EH
(-)-trans-BP-7,8-Dihydrodiol
(+)-anti-BP-7,8-Diol-9,10-epoxid
+ DNA
DNA


Calicheamycin
FIG. 1 Structures of naturally occurring enediyne anticancer antibiotics: 1, dynemicin A; 2, calicheamicin γ1; 3, esperamicin A1; 4, neocarzinostatin chromophore.



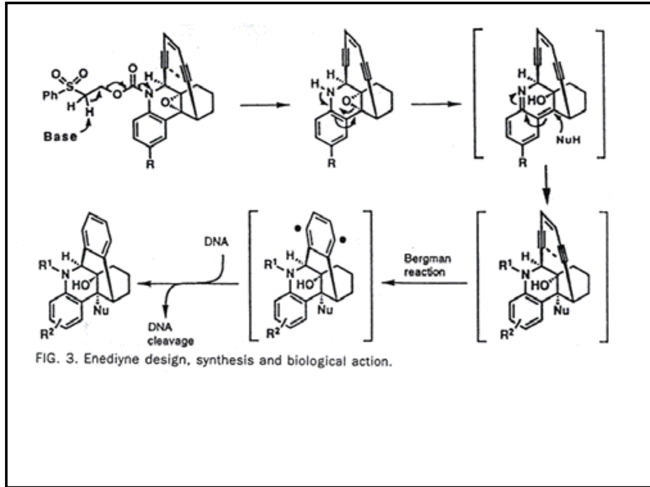


FIG. 3. Enediyne design, synthesis and biological action.

CYTOTOXICITIES OF DESIGNED ENEDIYNE **7** AGAINST 19 TUMOUR CELL LINES (TOP) AND FOUR NORMAL CELL LINES (BOTTOM)

Cell type	Cell line	IC_{50} (M)	Cell type	Cell line	IC_{50} (M)
Melanoma	SK-Mel-28	3.1×10^{-6}	Lung carcinoma	UCLA P-3	9.8×10^{-8}
Melanoma	M-14	1.6×10^{-6}	Pancreatic carcinoma	Capan-1	3.1×10^{-9}
Melanoma	M-21	1.6×10^{-6}	T-cell leukaemia	TCAF	1.1×10^{-9}
Colon carcinoma	HT-29	1.6×10^{-6}	Multidrug resistant T-cell leukaemia	TCAF-DAX	1.7×10^{-9}
Ovarian carcinoma	Ovcar-3	7.8×10^{-7}			
Astrocytoma	U-87 UG	7.8×10^{-7}	Myeloma	RPMI-8226	7.7×10^{-9}
Glioblastoma	U-251 MG	3.9×10^{-7}	Mouse leukaemia	P-388	4.6×10^{-9}
Breast carcinoma	MCF-7	7.8×10^{-7}	Mouse leukaemia	L-1210	1.3×10^{-9}
Lung carcinoma	H-358	2.0×10^{-7}	Promyelocytic leukaemia	HL-60	3.6×10^{-11}
Lung carcinoma	H-522	9.8×10^{-8}	T-cell leukaemia	Molt-4	2.0×10^{-14}
Bone marrow	HNBM	5.0×10^{-5}	Normal human dermal fibroblast	NHDF	5.0×10^{-6}
Human mammary epithelial cells	HMEC	6.3×10^{-6}			
			Chinese hamster ovary	CHO	3.1×10^{-6}