

**2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin : Ein optimierter  
Baustein für die MALDI-TOF Massenspektrometrie  
und biochemische DNA-Analytik**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Silke Atrott**

aus Hamburg

Hamburg 2001

Tag der letzten mündlichen Prüfung : 18.06.2001

Gutachter :

Prof. Dr. H. Köster

Prof. Dr. J. Voß

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1997 bis Februar 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hubert Köster im Institut für organische Chemie am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg und soweit nötig bei der Firma Sequenom - Gesellschaft für Genomanalytik mbH - durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Köster danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft. Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	IV
<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>II</b>	<b>Problemstellung</b>	8
<b>III</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	9
	<b>1. Das Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin und das Furo[3,2-d]-pyrimidinringsystem</b>	9
	<b>2. Einführung</b>	10
	<b>3. Chemische Synthesen</b>	12
	3.1 Darstellung des modifizierten Nucleosids	12
	3.1.1 Synthese der geschützten Ribose	13
	3.1.2 Synthese des Furo[3,2-d]pyrimidinrings an der Ribose	16
	3.1.3 Schützungs- und Entschützungsversuche	26
	3.2 Desoxygenierung	28
	3.2.1 Desoxygenierung von Uridin	31
	3.2.2 Protektion der exozyklischen Aminofunktion vor der Desoxygenierung	33
	3.2.3 Versuch der Desoxygenierung des aminogeschützten, modifizierten Nucleosids	38
	3.2.4 Desoxygenierung von Adenosin	40
	3.2.5 Versuch der Protektion der exozyklischen Aminofunktion während der Desoxygenierung	42
	3.2.6 Desoxygenierung des modifizierten Nucleosids	45
	3.3 Schutzgruppeneinführung in Hinblick auf die Triphosphatsynthese	47
	3.4 Triphosphatsynthese	56
	3.4.1 Triphosphatsynthese mit geschütztem 2'-Desoxyadenosin	58
	3.4.2 Triphosphatsynthese mit ungeschütztem 2'-Desoxyadenosin	60
	3.4.3 Triphosphatsynthese mit dem geschützten 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin	61
	<b>4. Biochemie und Massenspektrometrie</b>	63
	4.1 Voraussetzungen	63
	4.2 PROBE-Reaktion	63
	4.2.1 PROBE-Reaktion mit einer Rohlösung des modifizierten Triphosphates	67
	4.2.2 PROBE-Reaktion mit gereinigter Triphosphatlösung	68
	4.2.3 PROBE-Reaktion mit verschiedenen Primer/Template-Systemen	70
	4.3 Enzymatische Darstellung modifizierter DNA-Fragmente	75
	4.3.1 Die Polymerasekettenreaktion	75
	4.3.2 PCR-Testsystem zum Einbau von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat	78
	4.3.3 Darstellung längerer modifizierter DNA-Fragmente	82
	4.4 Restriktionsspaltung	89
	4.4.1 Restriktionsspaltung eines doppelsträngig modifizierten 122mers aus M13mp18	92
	4.4.2 Restriktionsspaltung des doppelsträngig modifizierten 120mers aus pOM9	95
	4.4.3 Restriktionsspaltung eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes, bei welchem nur ein Strang modifiziert war	97

4.5 Stabilitätsprüfung des modifizierten 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates	107
4.5.1 MALDI-Vermessung des Triphosphates	107
4.5.2 MALDI-Vermessung einer PROBE-Reaktion mit einem C/T-Primer	108
4.5.3 MALDI-Vermessung einer PROBE-Reaktion mit einem T-Primer	110
<b>IV Diskussion</b>	115
<b>V Zusammenfassung</b>	125
<b>VI Summary</b>	129
<b>VII Experimenteller Teil</b>	133
1. Allgemeine Hinweise	133
1.1 Chemikalien	133
1.2 Geräte und Methoden	133
2. Chemische Synthesen	138
2.1 Darstellung des modifizierten Nukleosids	138
2.1.1 Darstellung der geschützten Ribose	138
2.1.2 Aufbau des Furo[3,2-d]pyrimidinrings an der geschützten Ribose	141
2.1.3 Schutzgruppeneinführung an der exozyklischen Aminofunktion und Entschützung der Hydroxylgruppen	155
2.2 Desoxygenierung	160
2.2.1 Desoxygenierung von Uridin	160
2.2.2 Protektion der exozyklischen Aminofunktion vor der Desoxygenierung	164
2.2.3 Versuch der Desoxygenierung von aminogeschütztem modifizierten Adenosin	168
2.2.4 Desoxygenierung von Adenosin	170
2.2.5 Versuch, die Aminofunktion während der Desoxygenierung zu schützen	174
2.2.6 Desoxygenierung des modifizierten Nukleosids	175
2.3 Schutzgruppeneinführung in Hinblick auf die Triphosphatsynthese	179
2.3.1 Versuche mit 2'-Desoxyadenosin	179
2.3.2 Versuche an 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin	182
2.3.3 Protektion der exozyklischen Aminofunktion des 2'-Desoxyadenosins	184
2.3.4 Protektion der exozyklischen Aminofunktion an 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin	186
2.3.5 Protektion des aminogeschützten modifizierten 2'-Desoxynukleosids in Hinblick auf die Triphosphatsynthese	187
2.4 Triphosphatsynthese	189
2.4.1 Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat	189
2.4.2 Triphosphatsynthese mit 2'-Desoxyadenosin	190
2.4.3 Triphosphatsynthese mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin	192
3. Biochemie	194
3.1 Enzyme und Puffer	194
3.1.1 DNA-Polymerasen	194
3.1.2 Restriktionsendonukleasen	196

3.2 Allgemeine Methoden	197
3.2.1 Polyacrylamidelektrophorese (PAGE)	197
3.2.2 Agarosegele	201
3.2.3 Aufreinigung von PCR-Ansätzen mit dem QIAquick PCR-Purification Kit	202
3.2.4 Restriktionsspaltung	202
3.2.5 PROBE-Protokoll	203
3.3 Biochemische Experimente	206
3.3.1 PROBE-Reaktion	206
3.3.2 PCR	212
3.3.3 Restriktionsspaltung	220
3.3.4 Stabilitätsprüfung des modifizierten 2'-Desoxy-7,9-dideaza- 7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates	227
3.3.5 Amplifikation von Mikrosatelliten	232
<b>VIII Literaturverzeichnis</b>	<b>235</b>
<b>IX Anhang</b>	<b>254</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\delta$	chemisch Verschiebung
$\mu$ l	Mikroliter
18-Krone-6	Kronenether, 1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ppm	<i>parts per million</i>
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
3-HPA	3-Hydroxypikolinsäure
A	Adenosin / 2'-Desoxyadenosin
abs.	absoluiert
AIBN	$\alpha,\alpha'$ -Azobisobutyronitril, 2,2'-Azo(2-methyl)propionitril
Alu	<i>Arthrobacter luteus</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-O-triphosphat
B/W	<i>Binding and Wash</i>
Bam	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Bz	Benzoyl-
C	Cytidin, 2'-Desoxycytidin
$c^7$ dATP	2'-Desoxy-7-deazaadenosin-5'-O-triphosphat
CDCl <sub>3</sub>	deutertes Chloroform
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
d. Th	der Theorie
Da	Dalton
dA*TP	2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat
DBN	5-Diazabicyclo[4,3,0]non-5-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-O-triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-O-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl-
DeepVent	aus <i>Pyrococcus species</i> isolierte und in <i>E.coli</i> klonierte und exprimierte DNA-Polymerase
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-O-triphosphat
DHU	Dicyclohexylharnstoff
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl- (Dimethoxytrityl-)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-O-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-O-triphosphat
DyNAzyme	aus <i>Thermus brockianus</i> isolierte und in <i>E.coli</i> klonierte und exprimierte DNA-Polymerase
Eco	Restriktionsendonuklease aus <i>Escherichia coli</i> BS5
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>
g	Gramm

G	Guanosin, 2-Desoxyguanosin
HCl	Salzsäure
Hin	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
IR	Infrarot
KBr	Kaliumbromid
KCl	Kaliumchlorid
KF	Kaliumfluorid
konz.	konzentriert
LDA	Lithiumdiisopropylamid
M	mol/l
m/z	Quotient aus Masse und Ladung
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
Mhz	Megahertz
min.	Minuten
ml	Milliliter
MPC	<i>Magnetic Particle Collector</i>
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
Oligo	Desoxyoligoribonukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PROBE	<i>Primer Oligo Base Extension</i>
Pwo	DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i>
RF	replikative Form
R <sub>f</sub> -Wert	<i>Ratio of Fronts</i> (Retentionsfaktor)
RP	reverser Sequenzierprimer
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunden
Sma	Restriktionsendonuklease aus <i>Serratia marcescens</i> S
T	Thymidin, 2'-Desoxythymidin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TEAB	Triethylammoniumhydrogencarbonat
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tfl	<i>Thermus litoralis</i>
ThermoSequenase	in <i>E.coli</i> klonierte und exprimierte DNA-Polymerase
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tr	Triphenylmethyl-, Trityl-
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
U	<i>Unit</i>
UITma	aus <i>Thermotoga maritima</i> isolierte DNA-Polymerase
USP	universeller Sequenzierprimer
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vent	aus <i>Tfl</i> isolierte und in <i>E.coli</i> klonierte und exprimierte DNA-Polymerase
VIS	<i>visible</i> (Bereich des sichtbaren Lichtes)
Xba	Restriktionsendonuklease

## I Einleitung

Die Entschlüsselung des menschlichen Erbgutes ist das große Ziel des internationalen Human-Genom-Projektes (*human genom organization* HUGO)<sup>[1-6]</sup>. Das menschliche Erbgut besteht aus ca. 3 Milliarden Nukleotiden<sup>[7]</sup>, die in 23 Chromosomen angeordnet sind. Um die großen Mengen an DNA zu sequenzieren, sind schnelle und effektive Analyseverfahren notwendig. Die DNA-Sequenzierung nach Verfahren von Maxam/ Gilbert<sup>[8]</sup> und besonders von Sanger<sup>[9]</sup> mit anschließender Analyse per Gelelektrophorese unter Verwendung von Fluoreszenzmarkern wurden benutzt, um die Mehrheit der heute verfügbaren Sequenzdaten zu generieren. Konventionelle Detektionstechnik erfolgt dabei stets indirekt und erfordert daher die Anwesenheit von Reporterfunktionen wie zum Beispiel Radioaktivität, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz. Dabei stellt insbesondere die Gelelektrophorese eine große Fehlerquelle dar, weil die Größe bzw. das Molekulargewicht kürzerer DNA-Sequenzen nicht direkt mit der Mobilität korreliert, die jedoch als Meßgröße herangezogen wird<sup>[10]</sup>. Die Mobilität wird dabei durch eine Vielzahl sequenzspezifischer Effekte, Sekundärstrukturen und anderer Interaktionen mit der Gelmatrix beeinflusst.

Eine Alternative zur herkömmlichen Sequenzierung stellt die Verwendung von DNA-Arrays<sup>[11-14]</sup> - miniaturisierten Trägern, auf deren Oberflächen DNA-Moleküle in einem geordneten Raster immobilisiert sind - zur Sequenzierung durch Hybridisierung<sup>[15-18]</sup> dar.

Die Kenntnis der Sequenz eines menschlichen Genoms allein ermöglicht aber noch keine Aussage über die Bedeutung. Daher muß sich an die erste Sequenzierungsphase des Human-Genom-Projektes eine zweite, vergleichende und diagnostische Phase anschließen<sup>[19]</sup>. Innerhalb dieser zweiten Phase ergibt sich ein noch größerer Bedarf für schnelle und insbesondere zuverlässige und preiswerte Verfahren zur DNA-Analytik mit möglichst hohem Probendurchsatz.

Einen vielversprechenden Ansatz, die zeitaufwendige, klassische Gelelektrophorese zu ersetzen, liefert die Massenspektrometrie, die seit den sechziger Jahren zu den wichtigsten Analysemethoden in der organischen Chemie zählt. Mit Hilfe dieser Methode gelingt die Charakterisierung und Identifizierung unterschiedlichster Substanzen bis in den Spuren-bereich durch die Bestimmung der relativen Molekülmasse - dem „Wägen“ von Molekülen - und durch den Erhalt eines

Fragmentierungsmusters, welches zusätzliche Rückschlüsse auf die Struktur des Moleküls ermöglicht.

Die massenspektrometrische Bestimmung der relativen Molekülmasse mit Hilfe der klassischen Elektronenstoß-Ionisation oder der chemischen Ionisation, bei denen die Ionisation unter reduziertem Druck in der Gasphase erfolgt, erfordert die Verdampfbarkeit der Substanzprobe. Diese Eigenschaft eines Stoffes ist der Polarität und der Molekülgröße entgegengerichtet. Bei komplexen, hochmolekularen Verbindungen wie Proteinen, Kohlenhydraten und Oligonukleotiden steigt mit der relativen Molekülmasse die Zahl der funktionellen Gruppen und damit die Stärke der inter- und intramolekularen Wechselwirkungen. Durch diese Wechselwirkungen und der damit verbundenen Thermolabilität ist der Molekülmassenbestimmung solcher Verbindungen eine natürliche Grenze gesetzt.

Auf Grund der zunehmenden Bedeutung der Biochemie und Biotechnologie in den letzten Jahren wurde versucht, durch neue Ionisationstechniken - wie zum Beispiel die FAB-Ionisation (Fast-Atom Bombardement Ionisation) - bei denen die Proben nicht vor der Ionisation in der Dampfphase vorliegen müssen, den Einsatzbereich der Massenspektrometrie auf biochemisch relevante Substanzklassen zu erweitern. Mittels der FAB-Ionisation, bei der die Desorption durch den Beschuß mit Ionen oder neutralen Teilchen hoher kinetischer Energie erreicht wird und anderer Ionisationstechniken - zum Beispiel der Plasma-Ionisation - gelang die Bestimmung der relativen Molekülmasse von einigen kleinen Peptiden und Nukleotiden<sup>[20,21,22]</sup>. Das Ziel der massenspektrometrischen Molekulargewichtsbestimmung von Polymer-Verbindungen konnte mit diesen Methoden aber nicht verwirklicht werden.

Seit den 70er Jahren<sup>[23]</sup> werden Laser zur Desorption/Ionisation in der Massenspektrometrie eingesetzt. Die Laserdesorption war jedoch nur bei kleinen Molekülen bis etwa 1500 g/mol<sup>[24]</sup> anwendbar und erlangte kaum praktische Bedeutung. Erst die Einführung der Matrix-unterstützten Laserdesorption (MALDI Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation) durch Hillenkamp und Karas<sup>[25]</sup> im Jahre 1988 eröffnete einen Massenbereich von bis zu 500 000 g/mol<sup>[26]</sup> bei Proteinen und bis zu 1,5 Millionen g/mol bei Biopolymeren<sup>[27]</sup>. Zahlreiche Modifikationen der ursprünglich zur Protein- und Peptidanalytik entwickelten Technik haben eine Ausdehnung auf eine Vielzahl anderer organischer Biopolymere ermöglicht<sup>[28,29]</sup>.

Für die Probenpräparation wird dabei die zu untersuchende Substanz mit einem bis zu 10.000 fachen molaren Überschuß einer Matrixlösung vermischt, und auf einem metallischen Probenträger zur Kristallisation gebracht. Zur Vermessung wird die Probe dann im Hoch-vakuum einem intensiven Impuls kurzweiliger Laserstrahlung von ca. fünf Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Anwendung finden hierbei häufig Impulsfestkörperlaser (Nd-YAG-Laser im Wellenbereich von 355 bzw. 266 nm) oder Stickstoff-Gaslaser (mit einem Wellenbereich von 337 nm). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich MALDI-Massenspektrometer mit Stickstoff-Gaslasern verwandt.

Obwohl der Mechanismus der Desorption und Ionisation zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht bis ins Detail aufgeklärt ist, existieren doch relativ gute Vorstellungen über die Rolle der Matrix und das Geschehen während der Messung. Die Aufgabe der Matrixmoleküle liegt neben der Energieaufnahme des Laserlichtes und der Energieübertragung auf die Proben-moleküle auch darin, die Assoziation der zu analysierenden Moleküle zu verhindern<sup>[30]</sup>. Dazu muß die Matrix grundsätzlich eine große Löslichkeit für das Lösungsmittel der zu untersuchenden Substanz aufweisen. Außerdem sollte die Matrix keine chemischen Reaktionen mit der Analytsubstanz eingehen. Als Matrixmoleküle werden typischerweise kleine, aromatische Verbindungen verwendet, die bei der entsprechenden Laserwellenlänge eine hohe Absorption besitzen. Die zur Desorption der Ionen benötigte Energie wird von den Matrixmolekülen zunächst in Form elektronischer Anregungsenergie gespeichert und nach extrem kurzer Zeit in das Gitter des Festkörpers relaxiert. Es erfolgt ein Phasenübergang weit außerhalb des thermischen Gleichgewichts. Im Zuge der explosionsartigen Auflösung<sup>[31]</sup> eines Mikrobereiches des Probenfestkörpers werden sowohl Matrixmoleküle als auch unzersetzte Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt. Erst jetzt entstehen durch Protonentransfer der photoionisierten Matrixmoleküle elektrisch geladene Probenmoleküle.

Die generierten Ionen werden mit Hilfe eines elektrischen Feldes - ausgehend von der Probenoberfläche hin zum Analysator - beschleunigt. Die Ermittlung des Masse-Ladungs-Verhältnisses erfolgt mit Hilfe von Flugzeitmassenspektrometern ( TOF = time of flight ) durch Messungen der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle und dem Eintreffen im Detektor vergeht. Diese Methode zur Molekülmassebestimmung basiert auf der Tatsache, daß die verschieden schweren Ionen bei gleicher kinetischer Energie eine unterschiedliche Geschwindigkeit besitzen. Aus der Zeit, die vergeht, bis ein Ion auf dem Detektor eintrifft, kann somit die Masse ermittelt werden. Eine deutliche Verbesserung der Massenauflösung erhält man durch orthogonale

Injektion<sup>[32]</sup>, Verwendung eines Ionen-reflektors zur Verlängerung der Flugstrecke und durch eine verzögerte Ionenextraktion<sup>[33-35]</sup> (DE delayed ion extraction) zur Energie-Fokussierung der Ionen. Einen weiteren entscheidenden Einfluß auf die Ergebnisse hat die Wahl der verwendeten Matrix, welche mit der Analytlösung kokristallisiert wird<sup>[36]</sup>.

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie hat sich inzwischen zu einer überaus wertvollen Methode in der instrumentellen Analytik von Biopolymeren entwickelt. Durch die Erweiterung des zugänglichen Massenbereichs auf 500 000 g/mol<sup>[26]</sup> bei Proteinen und das hohe Auflösungsvermögen übertrifft die MALDI-TOF-Massenspektrometrie bei weitem die etablierten Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung von Biopolymeren. Während bei der Molekulargewichtsbestimmung durch Gelelektrophorese ein Vergleich der Mobilität der Analysesubstanz mit einer Mixtur von Molekülen bekannten Molekulargewichts stattfindet<sup>[10]</sup>, erhält man bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wesentlich detailliertere Informationen. Erstens repräsentiert der im Massenspektrum erkennbare Molekülionenpeak das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, welches eine eindeutige physikalische Eigenschaft des zu analysierenden Moleküls darstellt, und zweitens sind auch eindeutige Strukturaussagen möglich. Die neue Methode zeichnet sich außerdem durch folgende Vorteile aus:

- einfache Probenvorbereitung und kurze Analysendauer
- minimaler Probenbedarf
- hohe Massengenauigkeit und Auflösung
- Separation von Probengemischen und Detektion in einem Arbeitsgang
- einfach zu interpretierende und leicht reproduzierbare Massenspektren
- hohes Automatisierungspotential

Dieses Verfahren, zunächst vor allem zur Untersuchung von Peptiden und Proteinen eingesetzt, wird seit einigen Jahren auch sehr erfolgreich in der Analytik von DNA-Fragmenten angewandt. Mit Hilfe eines Matrixgemisches aus 3-Hydroxypikolinsäure (3-HPA)<sup>[37]</sup> und Pikolinsäure ist es gelungen, DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 500 Basenpaaren zu detektieren<sup>[38]</sup>.

Seit der Einführung der MALDI-TOF-MS von Karas und Hillenkamp vor 12 Jahren ist es durch eine Vielzahl von Verbesserungen gelungen, diese Analysenmethode in der DNA-Untersuchung zu etablieren. Durch die Verwendung von piezoelektrischen Pipetten<sup>[39]</sup> gelingt es, Nanolitermengen der zu untersuchenden Proben im Array-Format auf einen Siliciumchip aufzubringen. Mit Hilfe dieser semiautomatisierten Technik können einige beim manuellen Auftragen entstehende Probleme gelöst werden. Außerdem werden die kleinen Spots beim Laserbeschuß komplett abgedeckt, so daß Inhomogenitäten innerhalb des Spots kompensiert werden können und die Suche nach „sweet spots“ - wie vorher in der Makropräparation üblich - entfällt. Auf diese Weise ergibt sich auch eine gute Reproduzierbarkeit der Spektren.

Eine Weiterentwicklung in Hinblick auf den enormen Sequenzierungsbedarf durch das Human-Genom-Projekt stellt die Entwicklung von MALDI-kompatiblen DNA-Chip-Systemen dar<sup>[40]</sup>. Auf diese Weise können die Geschwindigkeitsvorteile der Massenspektrometrie, das große Automatisierungspotential und die parallele Prozessierung in einem Analysesystem, das auf hohen Probendurchsatz ausgerichtet ist, zusammengefaßt werden<sup>[41]</sup>.

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wird heute zum Beispiel zur Sequenzierung<sup>[42-46]</sup>, Analyse<sup>[47,48]</sup>, Detektion<sup>[49,50]</sup> und zur Diagnostik<sup>[51,52]</sup> von Oligonukleotiden eingesetzt.

Der Erweiterung der praktischen Anwendung dieser Technik, insbesondere im Hinblick auf die Untersuchung längerer DNA-Fragmente und komplexerer Probengemische, stehen, wie auch die oben erwähnten Arbeiten<sup>[42-52]</sup> zeigen, noch einige Schwierigkeiten im Weg. Denn neben der Wahl einer geeigneten Matrix, dem Proben-Matrix-Verhältnis und der eingesetzten Laserenergie wird das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse vor allem durch Adduktbildung des ionisierten DNA-Fragmentes mit Matrixmolekülen, durch das Auftreten mehrfach geladener Molekülonen und durch Fragmentierungsreaktionen - wie zum Beispiel der Depurinierung - beeinflusst. Um den zugänglichen Massenbereich bei der Analyse von DNA-Fragmenten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie auszuweiten, ist diesen Faktoren verstärkt Rechnung zu tragen. Neben der Verbesserung der MALDI-TOF-Massenspektrometer kann dies - wie im Rahmen dieser Arbeit näher beschrieben wird - auch durch den Einsatz chemisch modifizierter Nukleosidtriphosphatanaloga zur Stabilisierung der zu untersuchenden DNA-Fragmente versucht werden.

Die Depurinierung ist vor allem auf die begrenzte Stabilität bzw. die Hydrolyse-empfindlichkeit der N-glykosidischen Bindung zwischen Purinbase und dem Zucker zurückzuführen. In Lösung wird die säurekatalysierte Hydrolyse von Purinnukleosiden durch die Protonierung am N-7 Atom der Purinbase eingeleitet. Anschließend dissoziiert das protonierte Nukleosid im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zum freien Purin und einem Carbanion, welches mit Wasser zur freien Desoxyribose reagiert <sup>[53,54]</sup>. Die Substitution des N-7 Stickstoffatoms durch eine Methingruppe bewirkt - wie Seela et al. gezeigt haben - eine deutliche Stabilitätssteigerung solcher 7-Deazapurinnukleoside gegenüber einer sauren Hydrolyse <sup>[55]</sup>.

Die Depurinierung von DNA bei der Desorption und Ionisation im MALDI-Prozeß wird auch durch die Protonierung der Base eingeleitet <sup>[56]</sup>. Es folgt der Bruch der N-glykosidischen Bindung unter Freisetzung der Base und anschließend die Spaltung des Phosphatrückgrats <sup>[57]</sup>.

RNA zeigt bei MALDI-TOF-MS Untersuchungen gegenüber DNA eine signifikant höhere Stabilität <sup>[58]</sup>. Diese Beobachtung stimmt mit der allgemeinen Regel überein, daß Glykoside von 2-Hydroxyzuckern im Gegensatz zu 2-Desoxyzuckern wesentlich schwerer in 1-Stellung durch Hydrolyse gespalten werden. Offensichtlich übt die 2-Hydroxygruppe durch ihren induktiven Effekt einen hemmenden Einfluß auf die Glykosidspaltung aus <sup>[59]</sup>.

Eine Stabilisierung der N-glykosidischen Bindung von Nukleosiden im MALDI-Prozeß kann daher durch Modifikation der Desoxyribose erreicht werden, indem der 2'-Wasserstoff durch eine stärker elektronenziehende Gruppe - wie zum Beispiel Fluor - ausgetauscht wird oder durch Modifikation der Base, das heißt Substitution des N-7 Stickstoffatoms durch eine Methingruppe <sup>[60]</sup>.

Bei MALDI-TOF-MS Untersuchungen erfahren 2'-Fluor- <sup>[61]</sup> und 7-Deazanukleotide <sup>[49, 62]</sup> enthaltende DNA-Fragmente eine deutlich geringere Depurinierung und besitzen daher eine verbesserte Massenauflösung. Das Problem der Depurinierung ist daher durch den Einsatz von 7-Deazapurinnukleosidtriphosphaten zufriedenstellend gelöst worden. Allerdings erfolgt der Einbau der modifizierten Nukleosidtriphosphate durch die gängigen Polymerasen innerhalb einer PCR nicht problemlos <sup>[49]</sup>, denn die Ausbeuten liegen im Vergleich zum unmodifizierten Amplifikationsprodukt nur bei ca. 50 %. Der entscheidende Nachteil, der bei der Verwendung der 7-Deazapurinnukleosidtriphosphate zur Unterdrückung der Depurinierung auftritt, besteht aber darin,

daß DNA-Fragmente, in denen dGTP und dATP durch die 7-Deazaanaloga ersetzt worden sind, nicht mehr von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden können<sup>[63]</sup>.

Die sehr hohe Spezifität der Protein-DNA-Wechselwirkung beruht auf der Bildung von genau ausgerichteten Wasserstoffbrückenbindungen, wobei das N-7 eine entscheidende Rolle spielt. Die Veränderung der Elektronenverteilung bei der Substitution von dATP und dGTP durch die 7-Deazaanaloga bewirkt den Verlust der Wasserstoffakzeptorfunktion in Position 7 des Purinrings und verhindert somit die spezifische Enzym-DNA-Wechselwirkung, die für die Restriktionsendonukleasen zum Schneiden der DNA unerlässlich ist<sup>[64, 65]</sup>.

Der DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen kommt in der Diagnostik und in molekularbiologischen Techniken aber eine große Bedeutung zu. Bei der Suche nach Veränderungen / Mutationen auf der Ebene der Nukleotidsequenz, zum Beispiel bei der Detektion von RFLP's (Restriktion Fragment Length Polymorphism)<sup>[66]</sup> oder beim Screenen von cDNA's auf sogenannte EST's (Expressed Sequence Tags)<sup>[67, 68]</sup>, spielen Restriktions-endonukleasen eine entscheidende Rolle. Die Erhaltung der Wasserstoffakzeptorfunktion in Position 7 des Purinrings zur Gewährleistung der spezifischen Protein-DNA-Wechselwirkungen ist daher neben der Vergrößerung der Bindungsstabilität zwischen Purinbase und Zucker im Sinne der massenspektrometrischen Analyse zwingend erforderlich.

## II Problemstellung

Bei der Analyse von DNA mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie sinkt mit steigender Länge der zu untersuchenden DNA-Fragmente die Massenauflösung und damit die Massengenauigkeit<sup>[69]</sup>. Dies liegt hauptsächlich an der schon erwähnten Depurinierung<sup>[70]</sup>.

Die zur Verminderung der Depurinierung eingesetzten 7-Deazaanaloga der natürlichen Nukleosidtriphosphate führen aber zu Oligonukleotiden, die aufgrund der fehlenden Wasserstoffakzeptorfunktion in Position 7 des Purinrings - durch die Substitution des Stickstoffatoms durch eine Methingruppe - nicht mehr von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden.

Zielsetzung ist die Synthese eines optimierten Nukleosidtriphosphates, welches sowohl die Depurinierung vermindern als auch zu DNA führen soll, die noch von Restriktionsendonukleasen gespalten werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Synthese eines 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates ausgearbeitet, welches beiden Anforderungen genügen soll:

- Die säurelabile N-glykosidische Bindung zwischen Purinbase und Zucker wird durch eine stabilere C-glykosidische Bindung ersetzt, um die Depurinierung zu verhindern.
- Durch Substitution des N-7 Stickstoffatoms durch ein Sauerstoffatom wird im Gegensatz zu den herkömmlichen c<sup>7</sup>-Purinnukleotiden in dieser Position eine Wasserstoffakzeptorfunktion erhalten, durch welche spezifische Wechselwirkungen mit Restriktionsendonukleasen ermöglicht werden sollten.

Zur Überprüfung dieser Ziele wird zuerst eine Polymerase zu suchen sein, welche in der Lage ist, die Modifikation einzubauen. Anschließend sollen dann Restriktionsexperimente mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und Stabilitätstests bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie folgen.

## III Allgemeiner Teil

### 1 Das Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin- und das Furo[3,2-d]-pyrimidinringsystem

Die Benennung des Pyrrolo[2,3-d]pyrimidins und des Furo[3,2-d]pyrimidins beruhen auf der Vorstellung, daß ein heterozyklischer Fünfring - Pyrrol oder Furan - an eine Seite des Pyrimidinrings anelliert ist. Die Bezifferung des Pyrrolo[2,3-d]- und des Furo[3,2-d]-pyrimidins weichen von der des Purinringsystems ab. Beim Purinring werden alle Atome gleichwertig durchnummeriert, während beim Pyrrolo[2,3-d]- und beim Furo[3,2-d]-pyrimidin die C-Atome in den Anellierungspositionen die Ziffer des vorangegangenen peripheren Atomes mit Zusatz eines kleinen Buchstabens erhalten.

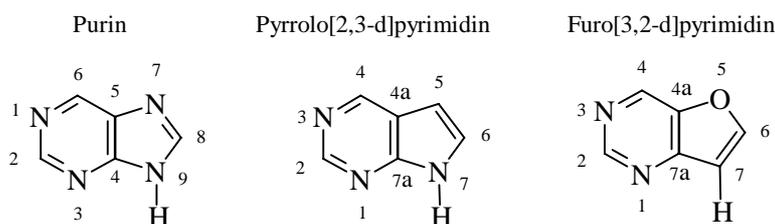


Abbildung 1

Zur Wahrung der Konformität mit der vorhandenen Literatur wird in dieser Arbeit die unterschiedliche Numerierung der Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-, Furo[3,2-d]pyrimidin- und Purinderivate bis zur Fertigstellung des modifizierten Ringsystems und durchgehend bei der Interpretation der NMR-Spektren beibehalten. Nach dem Aufbau des Ringsystems wird, um die Synthesewege besser vergleichen zu können, das Furo[3,2-d]pyrimidinderivat als 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin und das Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinderivat als 7-Deaza-adenosin bezeichnet.

## 2 Einführung

Die intensive Suche nach Chemotherapeutika gegen Krebs und andere, viralbedingte Krankheiten hat zur Entdeckung einer Vielzahl von biologisch aktiven Nucleosidanaloga, wie den carbozyklischen Nucleosiden<sup>[71]</sup> - bei denen der Sauerstoff im Ribosering durch eine Methylengruppe ersetzt worden ist - und den C-Nucleosiden<sup>[72]</sup> - bei denen die N-glykosidische Bindung durch eine C-glykosidische Bindung substituiert worden ist - geführt. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der chemischen Synthese neuer Nucleosidanaloga und deren Aktivitätsbestimmung. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, daß 9-Deazaadenosin antibakterielle Eigenschaften besitzt<sup>[73, 74]</sup> und cytotoxisch gegen Tumorzellen der Maus und des Menschen wirkt<sup>[74]</sup>. Ein anderes Adenosinanalogon - das d-APTR (4-Amino-8- $\beta$ -D-ribofuranosylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin) - zeigt Wirkung gegen Leukämie<sup>[75,76]</sup>.

Viele der untersuchten C-Nucleoside ähneln den natürlichen Nucleosiden sehr, so daß eine biologische Aktivität nicht überraschte. Erstaunlich hingegen war die biologische Aktivität der sehr stark modifizierten Thiono[3,2-d]pyrimidin-C-nucleoside, denn diese Nucleosidanaloga zählen zu den wirksamsten Cytotoxika der Purinreihe<sup>[77]</sup>. Daher wurde 1986 von Klein die Darstellung einer weiteren, noch weiter vom Original entfernten, Nucleosidmodifikation - dem Furo[3,2-d]pyrimidin-C-nucleosid - publiziert<sup>[78]</sup>. Die Idee war, auszutesten, wie weit die Modifikation des Nucleosids gehen kann, bis das Analogon von den Enzymen nicht mehr als Purin erkannt wird.

Der chemische Teil dieser Arbeit befaßt sich - wie nachfolgend dargestellt - mit der de novo Synthese des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates (modifiziertes Desoxyribonucleosidtriphosphat) **50**. Dazu wurde ausgehend von Ribose an dieser in einer neunstufigen Synthese der modifizierte Heterozyklus aufgebaut und so das 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin (modifiziertes Ribonucleosid) **11** hergestellt. Es folgte eine vierstufige Desoxygenierungsprozedur zum modifizierten 2'-Desoxynucleosid **32**. Anschließend wurde dann, nach der Einführung der notwendigen Schutzgruppen, das 2'-Desoxynucleosid **32** durch eine Triphosphatsynthese in das modifizierte Desoxyribonucleosidtriphosphat **50** überführt.

Im biochemischen Teil dieser Arbeit wurden zuerst verschiedene Enzyme auf ihre Fähigkeit hin überprüft, das modifizierte Triphosphat **50** innerhalb einer Polymerasekettenreaktion (PCR) zu inkorporieren. Im weiteren Verlauf wurden dann die erfolgreichsten Enzyme auf

ihre Inkorporationsfähigkeit bei steigender Templatelänge hin geprüft. Außerdem wurde versucht, die doppelsträngig modifizierte DNA-Doppelhelix und die nur einzelsträngig modifizierte DNA-Doppelhelix mit Hilfe verschiedener Restriktionsendonukleasen zu schneiden, und es wurden Experimente durchgeführt, um die erhöhte Stabilität des modifizierten Nukleotids zu beweisen. Die Analytik dieser Versuche erfolgte entweder durch Gelelektrophorese oder mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

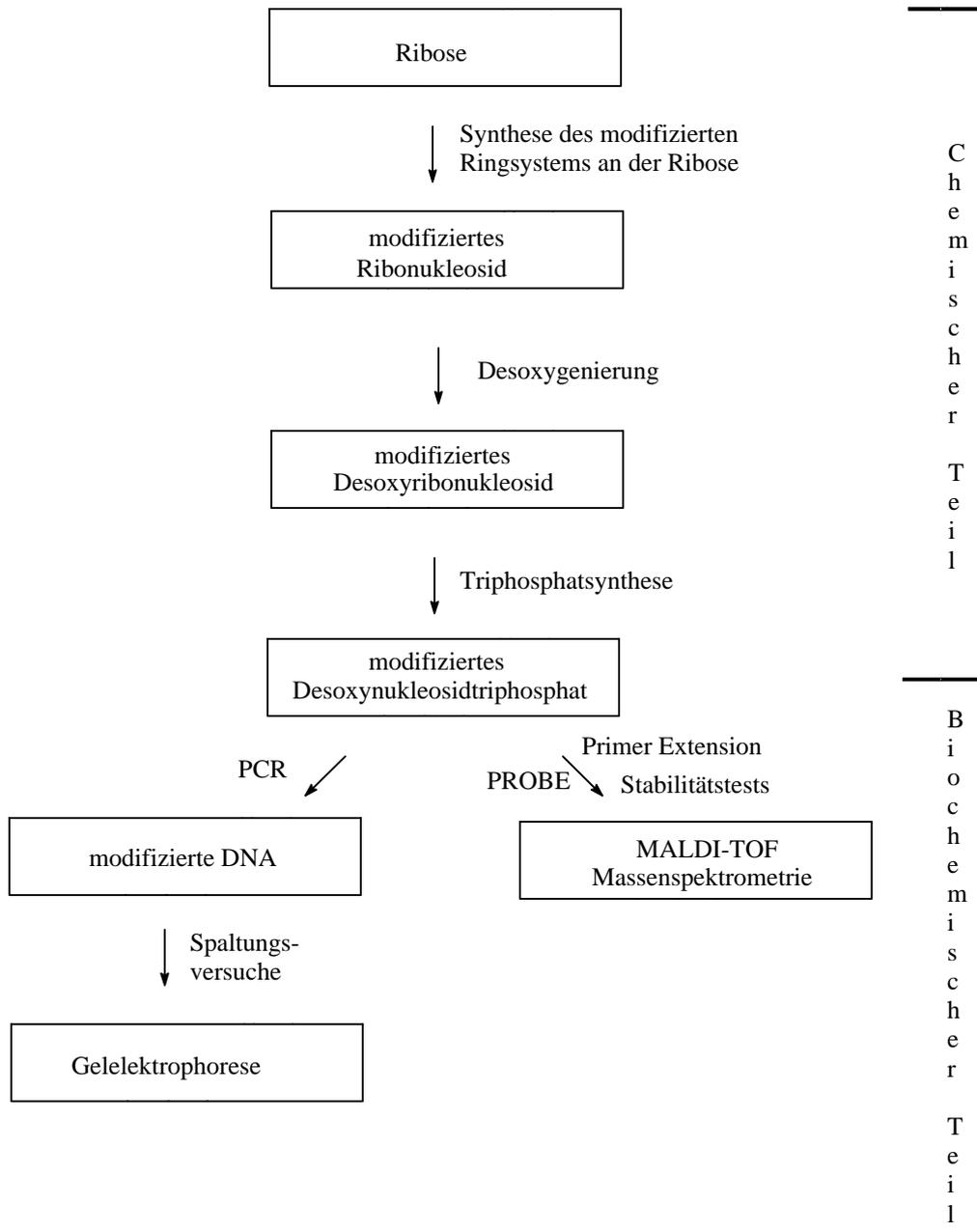


Abbildung 2

### 3 Chemische Synthesen

#### 3.1 Darstellung des modifizierten Nucleosids

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Syntheseschritte bis zum modifizierten Nucleosid.

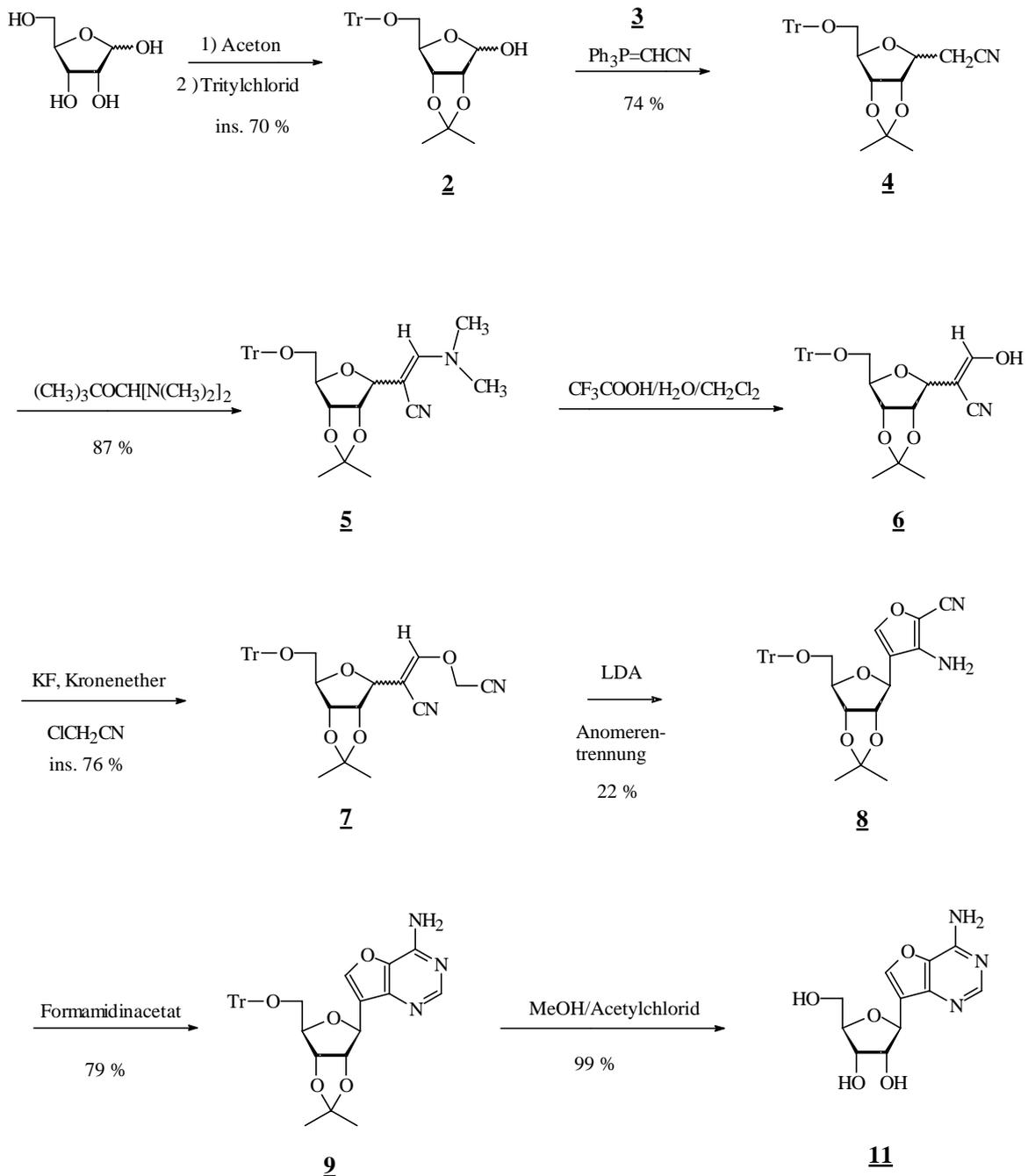


Abbildung 3: Syntheseschema zur Darstellung von 7,9-Dideoza-7-oxadenosin

Zur Darstellung des 4-Amino-7- $\beta$ -D-ribofuranosylfuro[3,2-d]pyrimidins **11** wurde - wie in Abbildung 3 dargestellt - an der 1-Position der Ribose, welche in der 2- und 3-Position mit der Isopropylidengruppe und in der 5-Position mit der Tritylgruppe geschützt war, schrittweise der Heterozyklus aufgebaut. Dazu wurde zuerst die C-glykosidische Bindung geknüpft und anschließend in drei Stufen ein Cyanomethylether **7** hergestellt, aus welchem durch Zyklisierung der Furanfünfring gebildet wurde. An dieser Stelle wurden die beiden Anomeren getrennt. Es folgte der Aufbau des Pyrimidinsechsrings am Furanring. Im letzten Schritt wurden alle vorhandenen Schutzgruppen abgespalten und das freie Nukleosid **11** erhalten.

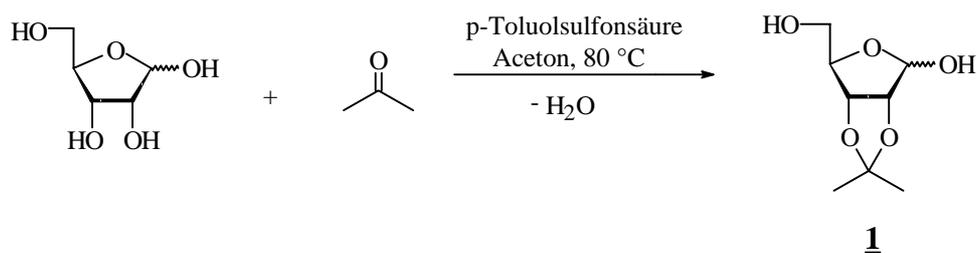
### 3.1.1 Synthese der geschützten Ribose

Als Schutzgruppe für die 2-OH- und die 3-OH-Gruppe der Ribose bot sich die basen- und bedingt säurestabile Isopropylidenschutzgruppe an, da im Verlauf der Synthese des Furo[3,2-d]pyrimidin-Derivats stark basische aber nur mäßig saure Reaktionsbedingungen vorherrschten.

Außerdem war bei der Wahl der 2- und 3-OH-Schutzgruppe noch wichtig, daß sie sich in Hinblick auf weiterführende Synthesen, wie zum Beispiel der 2'-Desoxygenierung, in einem Reaktionsschritt mit der Schutzgruppe der 5-OH-Gruppe entfernen ließ, um möglichst wenige Reaktionsschritte und Aufreinigungen, die jeweils einen Ausbeuteverlust bedeuten, durchführen zu müssen. Die 5-OH-Gruppe der Ribose wurde mit der für primäre OH-Gruppen selektiven, aber recht säurestabilen Tritylgruppe geschützt. Die in der Nukleosidchemie sonst oft verwandte 4,4'-Dimethoxytritylether-Bindung (DMT-Gruppe) wäre unter den - im Verlaufe der Synthese auftretenden - sauren Bedingungen nicht stabil gewesen.

Zur Einführung der Isopropylidenschutzgruppe wurden zwei Synthesewege miteinander verglichen.

Bei der ersten Methode wurde die in Aceton gelöste Ribose mit p-Toluolsulfonsäure versetzt und in Anwesenheit von Molekularsieb durch Kochen unter Rückfluß zur 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose **1** umgesetzt<sup>[79]</sup>.

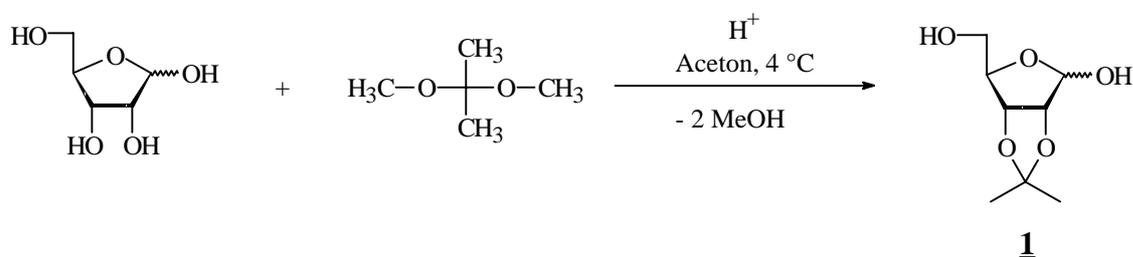


**Abbildung 4:** Erste Methode zur Darstellung von 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose **1**

Durch die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion konnte beobachtet werden, daß neben dem gewünschten Produkt **1** noch zwei Nebenprodukte entstanden. Bei den Nebenprodukten <sup>[80]</sup> handelte es sich, wie durch <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte, um 1,2-O-Isopropyliden-D-ribofuranose, die noch leicht mit disubstituierter 1,2:3,4-di-O-Isopropyliden-D-ribopyranose verunreinigt war, und um 3,4-Isopropyliden-D-ribopyranose.

Da das gewünschte Produkt zuerst entstand und die Nebenproduktbildung im Laufe der Reaktionszeit verstärkt anstieg, wurde die Reaktion nach einer Stunde abgebrochen, obwohl noch nicht das gesamte Edukt umgesetzt war. Die 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose **1** konnte nach der säulenchromatographischen Reinigung in 40,2 %iger Ausbeute erhalten und durch <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie durch Massen- und IR-Spektroskopie charakterisiert werden.

Beim zweiten Darstellungsweg wurde die in Aceton gelöste Ribose mit 2,2-Dimethoxypropan und einem Tropfen konz. Schwefelsäure bei 0 °C 24 Stunden gerührt. Nach der Neutralisation und der säulenchromatographischen Reinigung konnte das gewünschte Produkt in 69,2 %iger Ausbeute erhalten werden <sup>[81]</sup>.

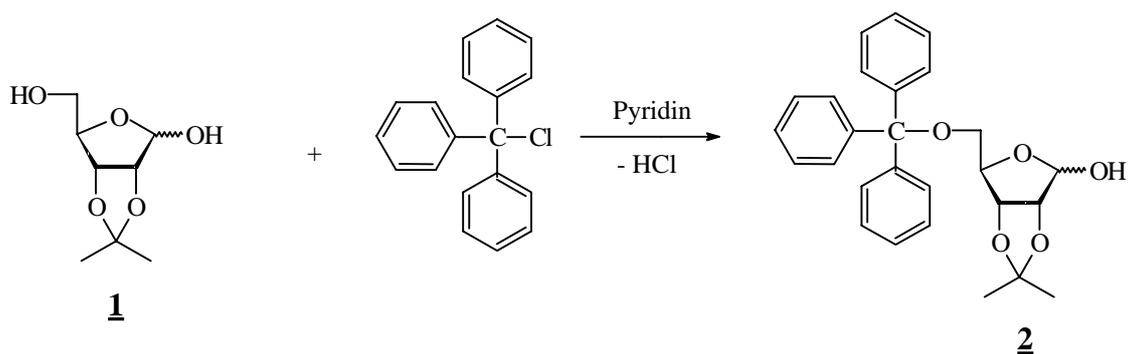


**Abbildung 5:** Zweiter Syntheseweg zur Darstellung von 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose **1**

Durch die veränderten Versuchsbedingungen konnte die Ausbeute von 40,2 auf 69,2 % gesteigert werden. Außerdem entstanden bei der zweiten Methode vergleichsweise wenige

Nebenprodukte und zusätzlich mußte auch kein Reagenz - wie die *para*-Toluolsulfonsäure beim ersten Syntheseweg - bei der säulenchromatographischen Reinigung entfernt werden. Daher war es möglich, das Rohprodukt der 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose **1** ohne Aufreinigung gleich per Tritylierung weiter umzusetzen und so einen Reinigungsschritt zu sparen.

Durch Umsetzung der 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose **1** mit Tritylchlorid in Pyridin gelang das Schützen der primären 5-OH-Gruppe<sup>[82]</sup>.



**Abbildung 6:** Synthese von 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranose **2**

2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranose **2** konnte in 69 %iger Ausbeute dargestellt werden. Die Charakterisierung erfolgte durch <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR-, Massen- und IR-Spektroskopie.

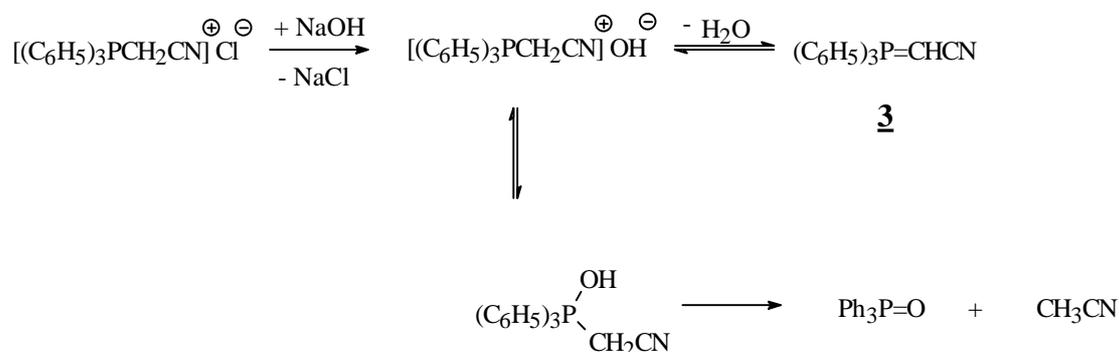
Durch eine Kombination der ersten beiden Stufen konnte die Ausbeute noch einmal gesteigert werden. Dadurch, daß 2,3-O-Isopropylidenribose **1** nicht mehr durch Kochen von Ribose in Aceton mit äquimolaren Mengen an *p*-Toluolsulfonsäure und in Gegenwart von Molekularsieb sondern durch Rühren von in Aceton gelöster Ribose mit 2,2-Dimethoxypropan bei 4 °C unter Zusatz eines Tropfens konzentrierter Schwefelsäure hergestellt wurde, entstanden erstens weniger Nebenprodukte und zweitens ließ sich das zur Neutralisation der Schwefelsäure verwendete feste Natriumcarbonat im Gegensatz zum Pyridiniumsalz der *p*-Toluolsulfonsäure, welches bei der Neutralisation der *p*-Toluolsulfonsäure mit Pyridin entstand, problemlos abtrennen. Das Rohprodukt der Isopropylidenribose **1** konnte daher ohne Aufreinigung als Edukt in die Tritylierung eingesetzt werden. Die Ausbeute über die ersten beiden Stufen konnte damit von 48 % auf 70 % gesteigert werden.

### 3.1.2 Synthese des Furo[3,2-d]pyrimidinrings an der Ribose

Nachdem alle reaktiven Hydroxylfunktionen der Ribose - bis auf die OH-Gruppe in der Position 1 - geschützt worden waren, wurde der Aufbau des Heterozyklus an dieser Stelle mit der Bildung eines C-Glykosides begonnen.

Die weitere Synthesestrategie sah zunächst den Aufbau des Furanrings vor. Im ersten Schritt zur Synthese des Heterozyklus, der Bildung eines C-Glykosids, wurde das Halbacetal **2** mit Cyanomethyltriphenylphosphoran **3** umgesetzt.

Cyanomethyltriphenylphosphoran **3** konnte durch Ausfällung aus einer wässrigen Lösung von Cyanomethyltriphenylphosphoniumchlorid mit 1 mol/l Natronlauge dargestellt werden. Bei dieser Reaktion entstand zuerst aus dem Cyanomethyltriphenylphosphoniumchlorid mit Natronlauge das Cyanomethyltriphenylphosphoniumhydroxid. Aus diesem bildete sich dann in Konkurrenz entweder über die Zwischenstufe des Hydroxycyanomethyltriphenylphosphorans durch Abspaltung von Acetonitril Phosphinoxid, oder es entstand direkt unter Abspaltung von Wasser Cyanomethyltriphenylphosphoran **3** <sup>[83, 84]</sup>.



**Abbildung 7:** Darstellung von Cyanomethyltriphenylphosphoran **3**

Anhand der massenspektrometrischen Analyse und des zügig aufgenommenen <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums konnte eine geringe Verunreinigung des Cyanomethyltriphenylphosphorans **3** durch Phosphinoxid nachgewiesen werden.

Aufgrund der Tatsache, daß die Umsetzung zum Acetonitril-Derivat **4** auch ohne weitere Aufreinigung des Phosphorans **3** erfolgte und die Dünnschichtchromatographie und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie eine Umsetzung des Ylids **3** zum Phosphinoxid in Lösung zeigten, wurde auf

eine aufwendige Reinigung des Rohproduktes von **3** verzichtet.

Hierbei mußte aber immer mit einem großen Überschuß an Reagenz gearbeitet werden, da der genaue Anteil an Phosphinoxid nicht bekannt war <sup>[85]</sup>. Außerdem entstand bei der Reaktion des Ylids **3** mit der 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranose **2** auch Phosphinoxid, so daß zugesetztes Phosphinoxid das Gleichgewicht der Reaktion zu den Edukten hin verschob und so eine Verschlechterung der Ausbeute bewirkte.

Im Verlauf dieser Arbeit war Cyanomethyltriphenylphosphoran **3** dann käuflich zu erwerben. Mit dem gekauften Reagenz konnte die Ausbeute noch leicht gesteigert - von 67,5 <sup>[85]</sup> auf 73,9 % - und zusätzlich der Reagenzüberschuß halbiert werden. Dies führte wiederum zu einer verbesserten säulenchromatographischen Reinigung, da weniger Phosphinoxid abgetrennt werden mußte.

Die 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranose **2** wurde mit Cyanomethyltriphenylphosphoran **3** (Ylid) zum 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril **4** umgesetzt <sup>[86, 87]</sup>. Das Produkt wurde nach der säulenchromatographischen Reinigung in einer Ausbeute von 73,9 % erhalten und mittels <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR-, Massen- und IR-Spektroskopie charakterisiert.

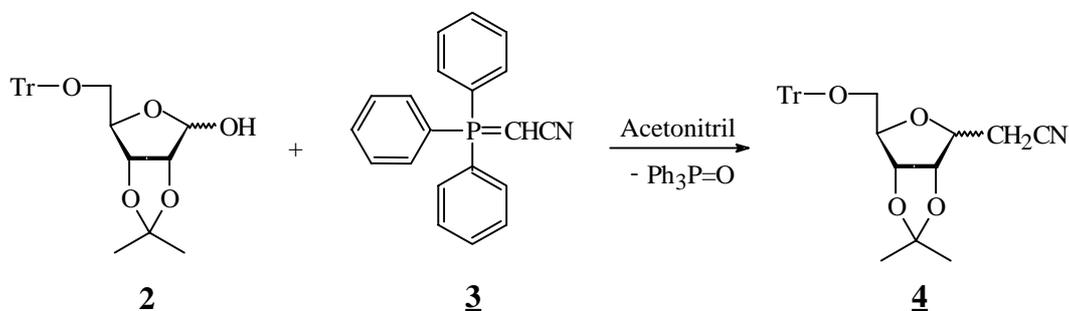


Abbildung 8: Synthese des C-Glykosides

Bei dieser Darstellung reagierte das Ylid **3** mit der Aldehydgruppe der offenkettigen Form der Furanose in einer Wittig-Reaktion. Dieses erste Reaktionsprodukt enthielt eine aktivierte Doppelbindung, welche in einer der Michael-Addition ähnlichen Reaktion mit der 4-OH-Gruppe unter Furanoseringschluß reagierte.

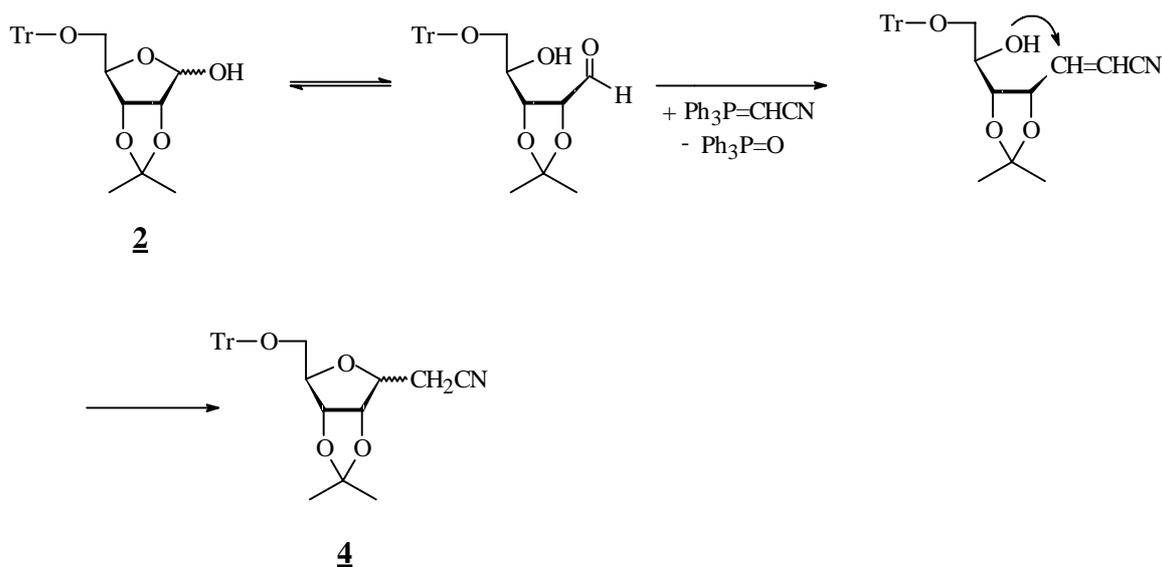
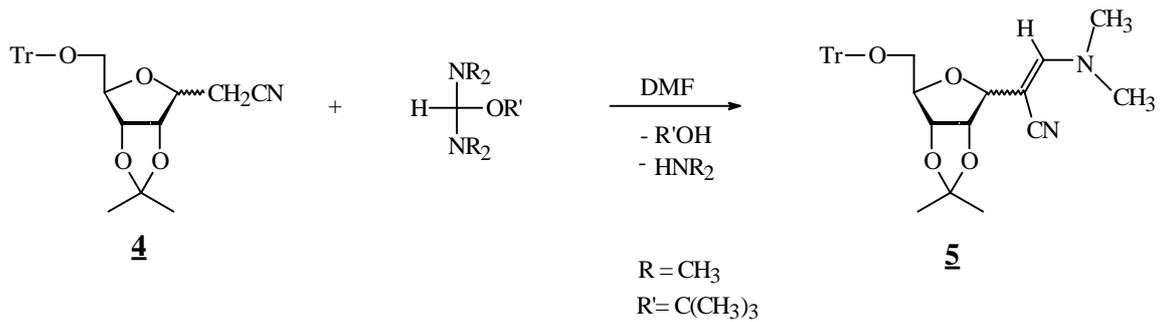


Abbildung 9

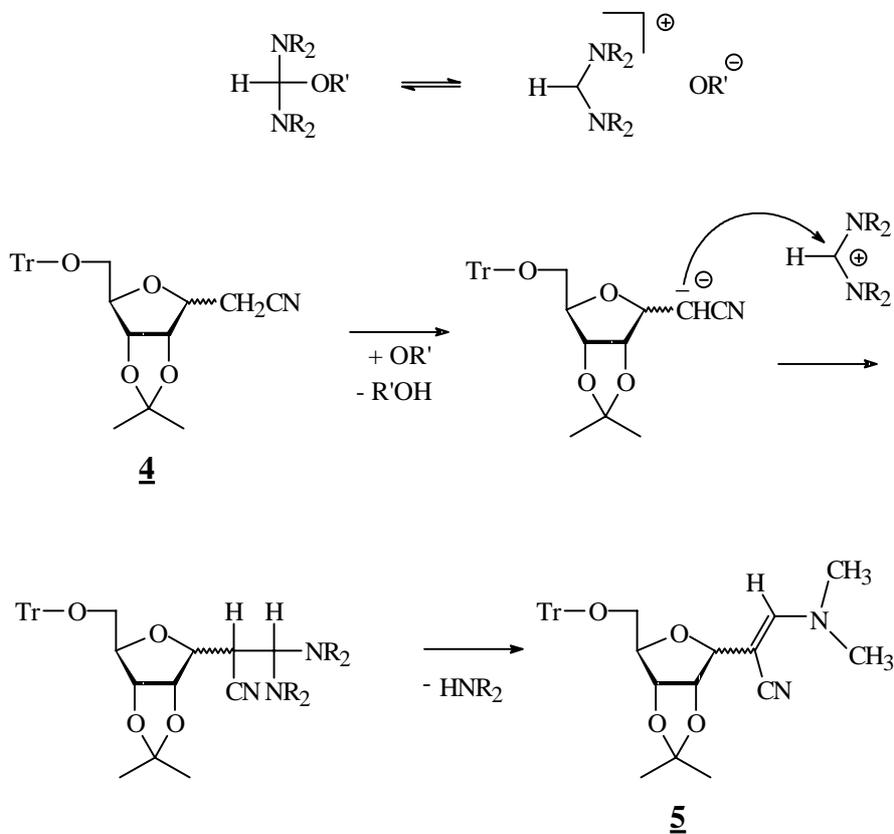
Aufgrund der in Lösung langsam und bei der Zyklisierung schnell eintretenden Mutarotation - der Umwandlung der beiden Anomere ineinander - war die Stereochemie bis zur Synthese des 3-Amino-2-cyano-4-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-D-ribofuranosyl)furans **8** nicht ausschlaggebend für die Darstellung des modifizierten Nukleosids **11**. Daher konnte die Reaktionszeit bei der Darstellung des 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl-acetonitrils **4** durch die Reaktion von 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranose **2** mit dem Wittig-Reagenz **3** bis zur quantitativen Umsetzung des Eduktes ausgedehnt werden, obwohl sich das kinetisch begünstigte  $\beta$ -Anomer, welches eigentlich zur Darstellung des modifizierten Purinnukleosids benötigt wurde, im Laufe der Reaktionszeit in das thermodynamisch stabilere  $\alpha$ -Anomer umgewandelte.

Das Nitril **4** wurde mit Bis(dimethylamino)*tert.*-butoxymethan (Bredereck's Reagenz) in 87,4 %iger Ausbeute zum 3-Dimethylamino-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitril **5** umgesetzt und durch  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ -, Massen- und IR-Spektroskopie charakterisiert<sup>[75, 88]</sup>. Eine Trennung der beiden Anomere, die auf dieser Stufe erstmals gelang, war aber aufgrund der Mutarotation nur im Rahmen der Charakterisierung von Nutzen.



**Abbildung 10:** Darstellung von 3-Dimethylamino-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitril **5**

Das zur Enaminierung von aktivierten Methylengruppen verwendete Bis(dimethylamino)*tert.*-butoxymethan unterlag - wie in der nachfolgenden Abbildung dargestellt ist - in geringem Umfang einer Dissoziation in ein Amidinium-Ion und ein Alkoholat-Ion <sup>[89]</sup>. Das *tert.*-Butanolat-Ion überführte das 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril **4** unter Abspaltung eines Protons in das Carbanion, welches das Amidiniumion angriff. Durch Eliminierung von Dimethylamin entstand das Dimethylaminopropennitril-Derivat **5**.



**Abbildung 11**

Im nächsten Schritt erfolgte die kontrollierte Hydrolyse des Enamines **5** unter milden Bedingungen in einem Zweiphasensystem zum 3-Hydroxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitril **6** <sup>[78]</sup>. Dazu wurde das in Chloroform gelöste Dimethylaminopropennitril-Derivat **5** bei Raumtemperatur mit einer 2,5 %igen, wässrigen Trifluoressigsäurelösung gerührt.

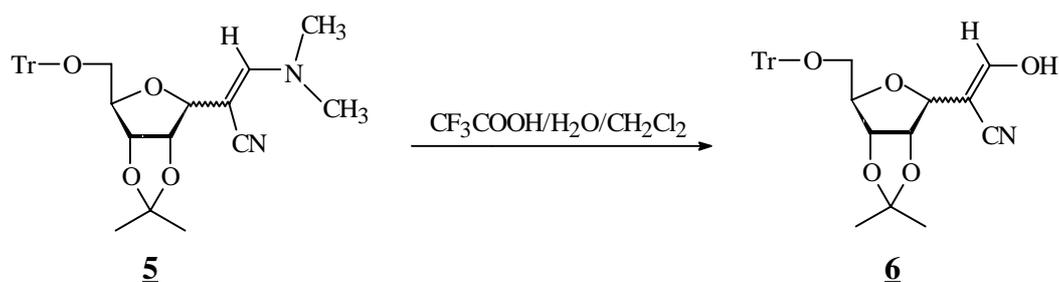


Abbildung 12: Hydrolyse des Enamines **5**

Durch eine dünnschichtchromatographische Verfolgung des Reaktionsverlaufes konnte die erfolgreiche Umsetzung beobachtet werden. Die säulenchromatographische Aufreinigung des Enols gelang jedoch nicht ohne Schwierigkeiten. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum konnte aufgrund der Möglichkeit der Keto-Enol-Tautomerie, der daraus resultierenden Möglichkeit der Umwandlung der cis/trans-Isomere, und der beiden Anomere kein einheitliches Produkt nachgewiesen werden. Die Charakterisierung des Produktes erfolgte daher nur massenspektrometrisch und durch IR-Spektroskopie. Um den Anteil des Aldehyds so gering wie möglich zu halten, wurde das entstandene Produkt **6** zügig aufgearbeitet und ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Die weitere Synthesestrategie sah nun die Umsetzung des 3-Hydroxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitrils **6** mit Chloracetonitril zum 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-ribofuranosyl)propennitril **7** vor <sup>[78]</sup>.

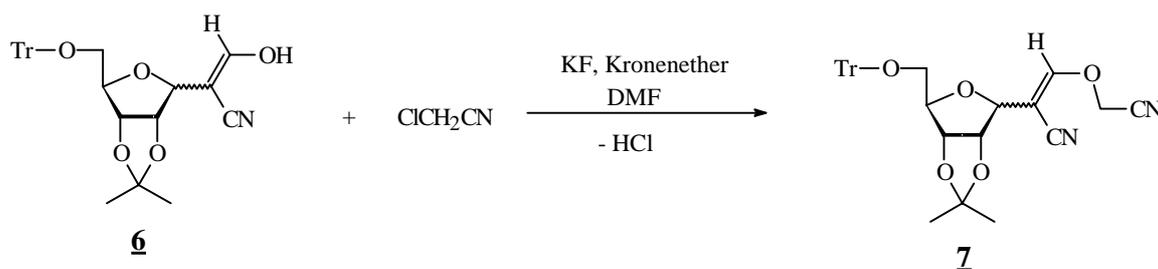


Abbildung 13: Überführung des Enols **6** in den Cyanoether **7**

Die Reaktion erforderte die Gegenwart von Kronenether und Kaliumfluorid. Der Kronenether 18-Krone-6 diente als Agens zur Lösung von Kaliumfluorid in polaren, aprotischen, organischen Lösungsmitteln durch Komplexbildung des Kaliumions<sup>[90]</sup>. Das dabei entstandene „nackte“ Fluoridion ist sowohl ein starkes Nukleophil als auch eine starke Base und ermöglichte die Abspaltung eines Protons aus der Hydroxylgruppe des Enols **6**. Das nun vorliegende Enolat anion reagierte mit dem Chloracetonitril zum Cyanomethylether **7**. In der dünnschichtchromatographischen Verfolgung der Reaktion konnten die vier erwarteten Produkte (cis-, trans-,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isomer) beobachtet werden. Aufgrund der Tatsache, daß es bei der Mutarotation zu einer Verschiebung der Doppelbindung und dadurch zu einer Umwandlung der Isomeren kommen konnte<sup>[88]</sup>, war aber auch die Verwendung des trans-Produktes für die anschließende Zyklisierung möglich. Deshalb wurden die vier Produkte nicht bei der säulenchromatographischen Reinigung isoliert.

Bei der Synthese des Cyanoethers **7** wurden drei verschiedene Varianten miteinander verglichen. Zuerst wurden bei der Durchführung der Reaktion 18-Krone-6 und Kaliumfluorid durch einstündiges Rühren in DMF gelöst. Anschließend wurde diese Lösung zum Enol **6** gegeben und zehn Minuten später das Chloracetonitril hinzugefügt. Das Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 26,9 % erhalten werden.

Durch die direkte Zugabe von 18-Krone-6 und Kaliumfluorid zu einer Lösung des 3-Hydroxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitrils **6** in DMF und dem Hinzufügen des Chloracetonitrils nach einer Stunde konnte die Ausbeute nach der säulenchromatographischen Reinigung auf 59 % gesteigert werden.

Bei der dritten Variante wurde zu einer Lösung von 18-Krone-6 und Kaliumfluorid in DMF eine Lösung des 3-Hydroxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribo-furanosyl)propennitrils **6** in DMF gegeben. Nach einer Stunde wurde Chloracetonitril hinzugefügt. Das Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in 76 %iger Ausbeute erhalten werden.

Die Fluorierung von organischen Substanzen mit Hilfe einer Lösung von Kronenether und Kaliumfluorid in Acetonitril ist in der Literatur<sup>[90]</sup> beschrieben, aber während dort das Fluoridion direkt mit dem Edukt zum fluorierten Produkt reagiert, diente das Fluoridion hier bei der Umsetzung des Enols **6** nur als Base zur Überführung in das Enolat. Erst dieses Enolat

setzte sich dann anschließend mit Chloracetonitril zum Cyanomethylether **7** um. Die Übertragung der Vorschrift zur Fluorierung organischer Verbindungen auf die Reaktion des 3-Hydroxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitril-Rohproduktes **6** in DMF mit Chloracetonitril in Gegenwart von Kronenether und Kaliumfluorid zum 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribo-furanosyl)propennitril **7** erforderte daher eine Variation der Reaktionsbedingungen. Ein Vergleich der zur Darstellung von 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitril **7** verwendeten Methoden zeigte, daß die Zeit, die zur Bildung des Enolats zur Verfügung stand, und die Reihenfolge der Reagenzzugabe ausschlaggebend für die Synthese des Cyanomethylethers **7** war.

Bei der ersten Darstellungsform konnten sich während des Rührens durch Komplexierung der Kaliumionen zwar die „nackten“ Fluoridionen bilden, aber die Zeitdauer zwischen der Zugabe des Eduktes und dem Hinzufügen des Chloracetonitrils war - wie die geringe Ausbeute von nur 27 % vermuten läßt - für die Bildung des Enolats, welches dann mit dem Chloracetonitril weiterreagieren sollte, zu kurz.

Bei der zweiten Synthesemöglichkeit war durch die direkte Zugabe des Kronenethers und des Kaliumfluorids zu einer Lösung des Enols **6** in DMF während des Rührens neben der Bildung der „nackten“ Fluoridionen auch deren Reaktion mit dem Enol **6** zum Enolat möglich. Dieses so gebildete Enolat konnte anschließend nach einer Stunde mit dem hinzugefügten Chloracetonitril in 59 %iger Ausbeute zum Cyanomethylether **7** umgesetzt werden.

Der dritte Weg zur Herstellung vereinigte die beiden vorangegangenen Versuche. Die „nackten“ Fluoridionen wurden durch Komplexierung der Kaliumionen beim Rühren von Kaliumfluorid und Kronenether in DMF hergestellt, dann erfolgte die Zugabe des in DMF gelösten Enols **6** zu der Kaliumfluorid/Kronenether-DMF-Lösung, und anschließend wurde nach einer Stunde das Chloracetonitril hinzugefügt. Auf diese Weise war einmal die Zeit zur Bildung der Fluoridionen beziehungsweise zur Enolatbildung verdoppelt worden und zum anderen wurde das Enol **6** gleich einer hohen Fluoridionenkonzentration ausgesetzt. Diese beiden Faktoren waren ausschlaggebend für die Steigerung der Ausbeute auf nunmehr 76 % und trugen erheblich zur Verbesserung der Gesamtausbeute bei.

Die Charakterisierung des Produktes erfolgte mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie sowie durch Massen- und IR-Spektroskopie.

Im 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribfuranosyl)propennitril **7** waren schon alle Atome des Furanrings vorhanden. Der letzte Schritt der Furanringsynthese bestand daher in der Zyklisierung des Cyanomethylethers **7**. Dazu mußte eine starke Base ein Proton aus der Cyanomethoxygruppe entfernen. Das dabei entstandene Carbanion griff das Kohlenstoffatom der Nitrilgruppe unter Bildung des Furanrings an.

Für die Ringbildung standen verschiedene Basen zur Auswahl. Laut Literatur<sup>[78]</sup> können Zyklisierungen zu Pyrrolen und Thiophenen mit Basen wie Natriumethanolat, 5-Diazabicyclo[4,3,0]non-5-en (DBN), Kalium*tert.*-butanolat, Butyllithium oder LDA durchgeführt werden. Doch obwohl ähnliche Moleküle, wie zum Beispiel N-Cyanomethyl-N-carboethoxyamin mit Hilfe von DBN<sup>[73, 74, 91]</sup> und N-Carboethoxy-N-essigsäure-ethylesteramin<sup>[92]</sup> und N-Benzyl-N-essigsäureethylesteramin<sup>[93]</sup> mittels Natriumethanolat erfolgreich umgesetzt wurden, funktionierte die Ringbildung mit diesen beiden Basen beim Cyanomethylether **7** nicht. Die Furanringsynthese gelang ausschließlich mit Hilfe von Lithiumdiisopropylamid (LDA)<sup>[94]</sup> zum 3-Amino-2-cyano-4-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-D-ribofuranosyl)furan **8**<sup>[78]</sup>.

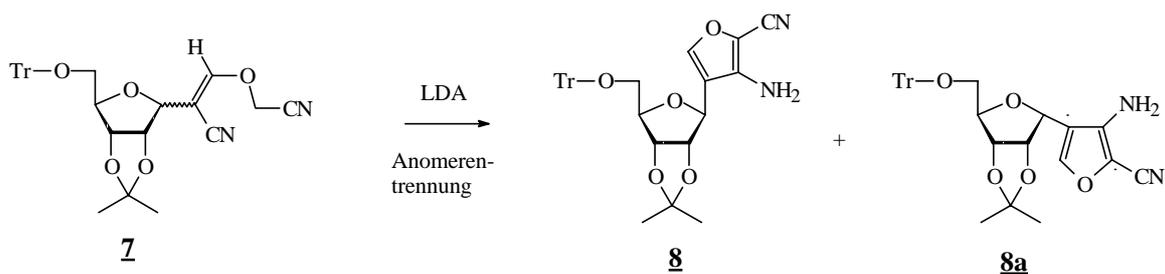


Abbildung 14: Zyklisierung des Cyanoethers **7** zum Furan **8**

Anfangs wurde das in THF gelöste Edukt mit einem 10 fachen Überschuß an 2 mol/l LDA-Lösung innerhalb kürzester Zeit versetzt. Durch die Zugabe einer mit THF verdünnten LDA-Lösung im 1,5 fachen Überschuß zu dem in THF gelösten Edukt über einen Zeitraum von einer halben Stunde konnte die Ausbeute nach säulenchromatographischer Reinigung und Trennung der Anomeren von 13,2 auf 21,9 %  $\beta$ -Anomer und von 5,3 auf 11,9 %  $\alpha$ -Anomer gesteigert werden. Eine zu große Konzentration der starken Base führte wahrscheinlich zu

Nebenreaktionen, welche durch die langsame, stark verdünnte Zugabe des Reagenzes unterdrückt werden konnten. Die Charakterisierung der beiden Anomere erfolgte mittels  $^1\text{H}$ -NMR-,  $^{13}\text{C}$ -NMR-, Massen- und IR-Spektroskopie.

Die insgesamt niedrige Ausbeute bei der Darstellung des modifizierten Nucleosids **11** war vor allem auf die Zyklisierung von 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitril zum 3-Amino-2-cyano-4-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-D-ribofuranosyl)furan **8** mittels LDA zurückzuführen. Daher wurde versucht, die Ausbeute dieser Synthese durch die Verwendung einer frisch zubereiteten LDA-Lösung, durch Variation der Reaktionstemperatur und der Reaktionsdauer und durch den Einsatz anderer Zyklisierungsreagenzien zu erreichen. Dabei wurde festgestellt, daß sowohl eine frisch zubereitete LDA-Lösung als auch die Verlängerung der Reaktionsdauer und eine Variation der Reaktionstemperatur keinen nennenswerten Einfluß auf die Ausbeute hatten.

Der Ringschluß wird bei der Bildung von Pyrrolen, Thiophenen und Furanen bei allen drei Verbindungen durch eine Deprotonierung in  $\alpha$ -Stellung zum Heteroatom eingeleitet und es bildet sich bevorzugt das  $\beta$ -Anomer. Dies lag wahrscheinlich an der sterischen Hinderung durch die Isopropylidengruppe, welche die Unterseite des Riboserings abschirmte und auf diese Weise den zur Bildung des  $\alpha$ -Anomers nötigen Angriff von unten erschwerte.

Ein Grund für das oben schon erwähnte unterschiedliche Verhalten bei der Zyklisierung von Thiophenen, Pyrrolen und Furanen liegt in den verschiedenen Elektronegativitätsdifferenzen von Kohlenstoff-Sauerstoff-, Kohlenstoff-Stickstoff- und Kohlenstoff-Schwefel-Bindungen. Die stärkere Polarisierung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung führt dazu, daß nukleophile Basen bevorzugt den besonders stark positiv polarisierten Kohlenstoff angreifen anstatt ein Proton zu abstrahieren. Ein Vergleich der untersuchten Basen zeigt, daß n-Butyllithium die stärkste der verwendeten Basen ist. Die  $\alpha$ -Deprotonierung ist aber aufgrund der großen Nukleophilie erst bei Temperaturen, die unter  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  liegen, gegenüber dem nukleophilen Angriff bevorzugt. Kalium-*tert.*-butanolat in THF scheint trotz der geringen Nukleophilie genau wie DBN als Base schon zu schwach zu sein für die Deprotonierung in  $\alpha$ -Stellung zum Sauerstoff, und Natriumethanolat gilt sogar als gutes Substrat für die nukleophile Substitution an Nitrilen<sup>[95]</sup>. Damit stellt LDA unter den getesteten Basen die stärkste nicht nukleophile Base dar.

Nur sie ist in der Lage, die Protonenabstraktion in  $\alpha$ -Stellung zum Sauerstoff durchzuführen, aber auch hier sind die Ausbeuten niedrig.

Zur Darstellung des Pyrimidinrings wurde das  $\beta$ -Anomer des 3-Amino-2-cyanofuran-C-nukleosids **8** mit Formamidinacetat umgesetzt<sup>[78]</sup>

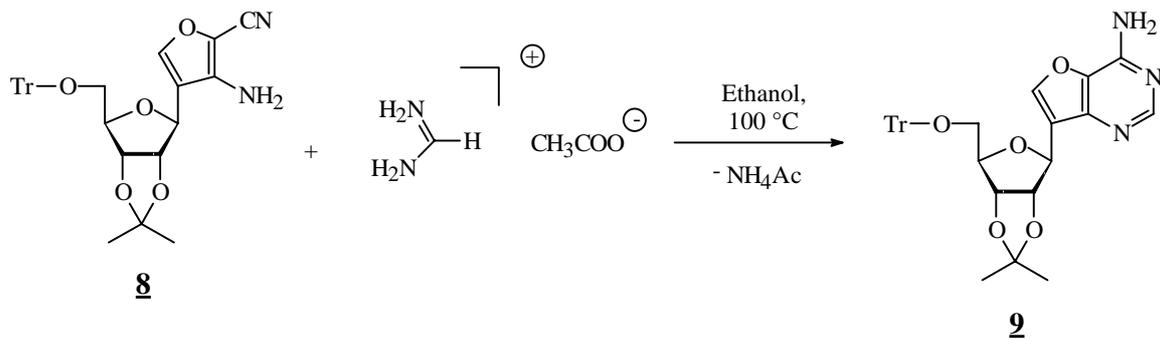


Abbildung 15: Fertigstellung des Furo[3,2-d]pyrimidinringsystems

Das bei dieser Umsetzung entstandene 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidin **9** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel in 78,8 %iger Ausbeute erhalten und mittels  $^1\text{H-NMR}$ -,  $^{13}\text{C-NMR}$ -, Massen- und IR-Spektroskopie charakterisiert.

### 3.1.3 Schützungs- und Entschützungsversuche

Im späteren Verlauf der Synthese, bei der Überführung des 2'-Desoxynucleosids **32** in das Triphosphat **50**, war die Blockierung der reaktiven exozyklischen Aminofunktion eine Voraussetzung für eine eindeutig ablaufende Reaktion. Deshalb mußte diese funktionelle Gruppe geschützt werden. An dieser Stelle bot sich die Einführung der Aminoschutzgruppe an, da mit der Isopropylidengruppe und der Tritylschutzgruppe die anderen reaktiven Hydroxylgruppen alle geschützt waren (Abb. 16) und so selektiv die Aminofunktion blockiert werden konnte.

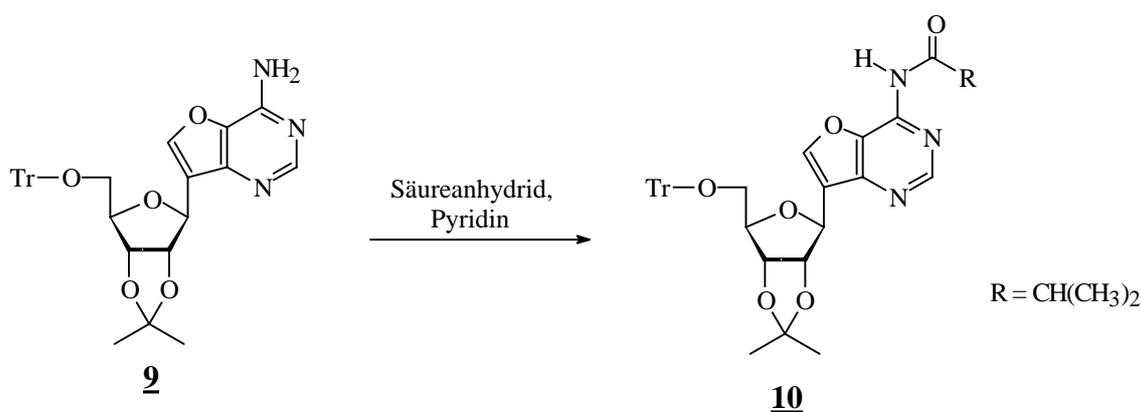
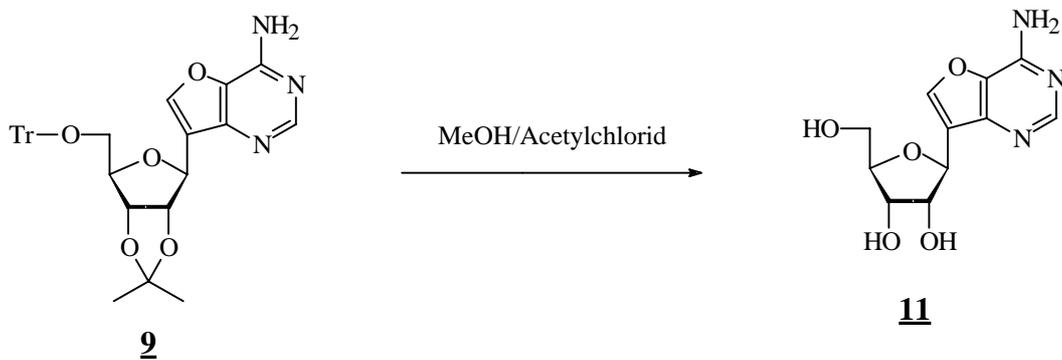


Abbildung 16: Protektion der exozyklischen Aminofunktion

Die Einführung einer Aminoschutzgruppe an 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-β-D-ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidin **9** gelang mit Isobuttersäureanhydrid in Pyridin in einer Ausbeute von 98,3 % <sup>[96]</sup>. Bei dem Versuch, aus diesem jetzt total geschützten Nucleosid **10** die Isopropyliden- und die Tritylschutzgruppe zu entfernen, mußte das Molekül so drastischen Reaktionsbedingungen (Acetylchlorid in Methanol <sup>[78]</sup>) ausgesetzt werden, daß auch die Aminoschutzgruppe vollständig entfernt wurde. Daraus folgte, daß die Blockierung der exozyklischen Aminofunktion erst an einem späteren Zeitpunkt der Gesamtsynthese erfolgen konnte.

Zur Überführung des 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-β-D-ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidins **9** in das 4-Amino-7-β-D-ribofuranosylfuro[3,2-d]pyrimidin (7,9-Dideaza-7-oxoadenosin) **11** mußte die Isopropylidenschutzgruppe entfernt und gleichzeitig detrityliert werden. Zum Austesten der besten Reaktionsbedingungen wurde das 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril **4** als Proband verwendet. 80 %ige Essigsäure, die

standardmäßig zum Abspalten der Dimethoxytritylschutzgruppe verwendet wird <sup>[97]</sup>, konnte auch nach Erhitzen erstaunlicherweise weder die Isopropyliden- noch die Tritylschutzgruppe aus dem Molekül entfernen. Die Abspaltung beider Schutzgruppen gelang an diesem Probemolekül jedoch mit Hilfe einer methanolischen Bortrifluoridlösung <sup>[98]</sup>. Als nächste Stufe wurde die Entschützung an dem 3-Amino-2-cyano-4-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-D-ribofuranosyl)furan **8** ausprobiert. Hierbei erwies sich das Bortrifluorid aber als zu reaktiv, so daß kein gewünschtes Produkt nachgewiesen werden konnte. Die dritte Möglichkeit der Entschützung bestand in der Umsetzung mit methanolischer HCl <sup>[78]</sup>. Diese Methode war bei dem 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril **4** erfolgreich und konnte auch - wie in Abbildung 17 dargestellt ist - auf 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-β-D-ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidin **9**, welches nach Präzipitation in Ether in 98,8 %iger Ausbeute erhalten wurde, übertragen werden.



**Abbildung 17:** Entschützung des modifizierten Nucleosids

### 3.2 Desoxygenierung

Das nächste Ziel nach der Herstellung des ungeschützten Nucleosids **11** war nun - der Synthesestrategie folgend - die Umwandlung des modifizierten Nucleosids in das entsprechende 2'-Desoxynucleosid **32**.

Grundsätzlich gab es für die Darstellung von 2'-Desoxynucleosiden zwei Ansätze:

- Glykosidierung von Heterozyklen mit 2'-Desoxyribose
- Desoxygenierung von Ribonucleosiden

Die Synthese von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32** über die erste Methode - die Glykosidierung - wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht ausprobiert, weil der Heterozyklus nach einer in der Literatur beschriebenen Synthese<sup>[78]</sup> an der Ribose aufgebaut worden war, während für die Darstellung des modifizierten freien Purinrings in der Literatur keine Vorschrift gefunden wurde. In diesem Fall kam daher nur eine Desoxygenierung des Ribonucleosids in Frage.

Die Entfernung der 2'-Hydroxylgruppe eines Nucleosids wird schon seit vielen Jahren untersucht. Anfangs wurde dazu das Pyrimidinnucleosid über eine Anhydrozwischenstufe in das 2'-Desoxynucleosid überführt<sup>[99]</sup>. Die Desoxygenierung der Purinnucleoside gelang auf diese Weise kaum, da sich 2',8-oxo-Brücken bildeten. Beim Versuch, die Desoxygenierung über ein verbrücktes 2',3'-Acyloxoniumion zu erzielen, stellte sich heraus, daß bei Purinnucleosiden bevorzugt (Verhältnis ca. 8:1)<sup>[100]</sup> und bei 7-Deazaadenosin ausschließlich das 3'-Desoxynucleosid entstand<sup>[101]</sup>. 1979 gelang Robins dann die erste bevorzugte Darstellung von 2'-Desoxyadenosin über einen nukleophilen Austausch an C-2'<sup>[102]</sup>. Aber alle Versuche, 2'-Desoxynucleoside über S<sub>N</sub>2-Austausch und Reduktion zu erhalten, erfolgten nur in schlechten Ausbeuten. Eine S<sub>N</sub>1-Reaktion war aufgrund des Elektronendefizites an C-2', bedingt durch die Nähe zum N,O-Acetal an C-1', ausgeschlossen<sup>[102]</sup> und ein Versuch, die Elektronendichte an C-2' zu erhöhen, führte zur Eliminierung des Heterozyklus und zu ungesättigten Zuckern<sup>[103]</sup>.

Die regiospezifische 2'-Desoxygenierung von Ribonucleosiden wurde behindert durch die Schwierigkeit, zwischen den beiden zueinander cis-ständigen, sekundären Hydroxylgruppen an C-2' und C-3' zu differenzieren. Eine Lösung lag in der selektiven 3',5'-Schützung. Dies wurde zuerst über zyklische Monophosphate<sup>[104]</sup> oder Isolierung von 3',5'-Di-O-acylderivaten versucht<sup>[105]</sup>.

Markiewicz gelang schließlich die selektive Schützung der 3'- und 5'-Hydroxylgruppe in hohen Ausbeuten durch die Umsetzung des Nucleosids mit 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan. Grundlage für das Design der neuen Schutzgruppe war, daß Triisopropylchlorid 1000 mal schneller mit einer primären als mit einer sekundären Alkoholfunktion reagiert. Im Falle von 3',5'-Dihydroxynucleosiden wurde mit 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan daher zuerst die 5'-Position silyliert. Anschließend kam es dann durch eine intramolekulare Reaktion mit der 3'-OH-Gruppe zu doppelt silylierten Produkten<sup>[106]</sup>. Die Abspaltung dieser Schutzgruppe erfolgte mit Tetra-n-butylammoniumfluorid<sup>[107]</sup> oder mit Kaliumfluorid und Kronenether<sup>[108]</sup>.

Nachdem eine gute Methode für die selektive 3',5'-Schützung und Entschützung gefunden worden war, galt das Interesse der Entfernung der 2'-OH-Gruppe.

Die Generierung von 2'-Desoxynucleosiden aus halogenierten Vorstufen mittels Tri-n-butylzinnhydrid<sup>[100, 102]</sup> war ebenso bekannt, wie die Desoxygenierung von sekundären Alkoholen über Thiobenzoate<sup>[109]</sup>, S-Methyldithiocarbonate<sup>[110]</sup>, Thiocarbonate<sup>[111]</sup> und Thiocarbonyldiimidazole<sup>[112]</sup>. Die basischen Reaktionsbedingungen für die Darstellung von S-Methyldithiocarbonaten waren aber nicht mit den 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]nucleosiden vereinbar, da die zyklische Silylschutzgruppe unter den basischen Bedingungen nicht stabil genug war. Ebenso waren alle anderen bisherigen Verfahren zur Desoxygenierung nicht auf Nucleoside übertragbar, die an der 3'- und 5'-Position mit 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan geschützt waren.

Robins et al. suchten daher 1983 nach einem Thiocarbonylreagenz, welches mit Alkoholen unter milden Bedingungen reagierte und dessen Ester durch eine homolytische Hydrogenolyse zu spalten war. Das Phenoxythiocarbonylchlorid erfüllt alle diese Kriterien. Es besitzt eine moderate Aktivität und überführt unbehinderte, sekundäre Alkohole im Lösungsmittel

Pyridin/Dichlormethan in die Phenoxythiocarbonylester. Behinderte Alkohole, wie die mit 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan an der 3'- und 5'-Position geschützten Nucleoside, benötigten hingegen die Katalyse von 4-Dimethylaminopyridin in Acetonitril [113].

Die 2'-Desoxynucleoside wurden dann nach homolytischer Hydrogenolyse in Toluol mit Tri-n-butylzinnhydrid unter AIBN-Katalyse und anschließender Entschützung der 3'- und 5'-Hydroxylgruppe erhalten [113].

Ribonucleoside wurden durch diese milde, generell anwendbare und auch in neuerer Literatur verwendete vierstufige Synthese in die entsprechenden 2'-Desoxynucleoside überführt [114 - 117].

Aufgrund der Tatsache, daß das 4-Amino-7- $\beta$ -D-ribofuranosylfuro[3,2-d]pyrimidin **11** nach der neunstufigen Synthese in nur geringen Mengen vorlag und deshalb für das Austesten der besten Reaktionsbedingungen zu wertvoll war, wurde die Desoxygenierung zunächst an Uridin ausprobiert. Dies ist in Abbildung 18 dargestellt.

### 3.2.1 Desoxygenierung von Uridin

Das Konzept zur Desoxygenierung sah vor, die 3'- und 5'-Hydroxylgruppe selektiv zu schützen und die 2'-OH-Gruppe in einen Ester zu überführen, der durch homolytische Hydrogenolyse glatt gespalten werden konnte. Abschließend mußte die zyklische Silylschutzgruppe entfernt werden <sup>[113, 118 - 121]</sup>.

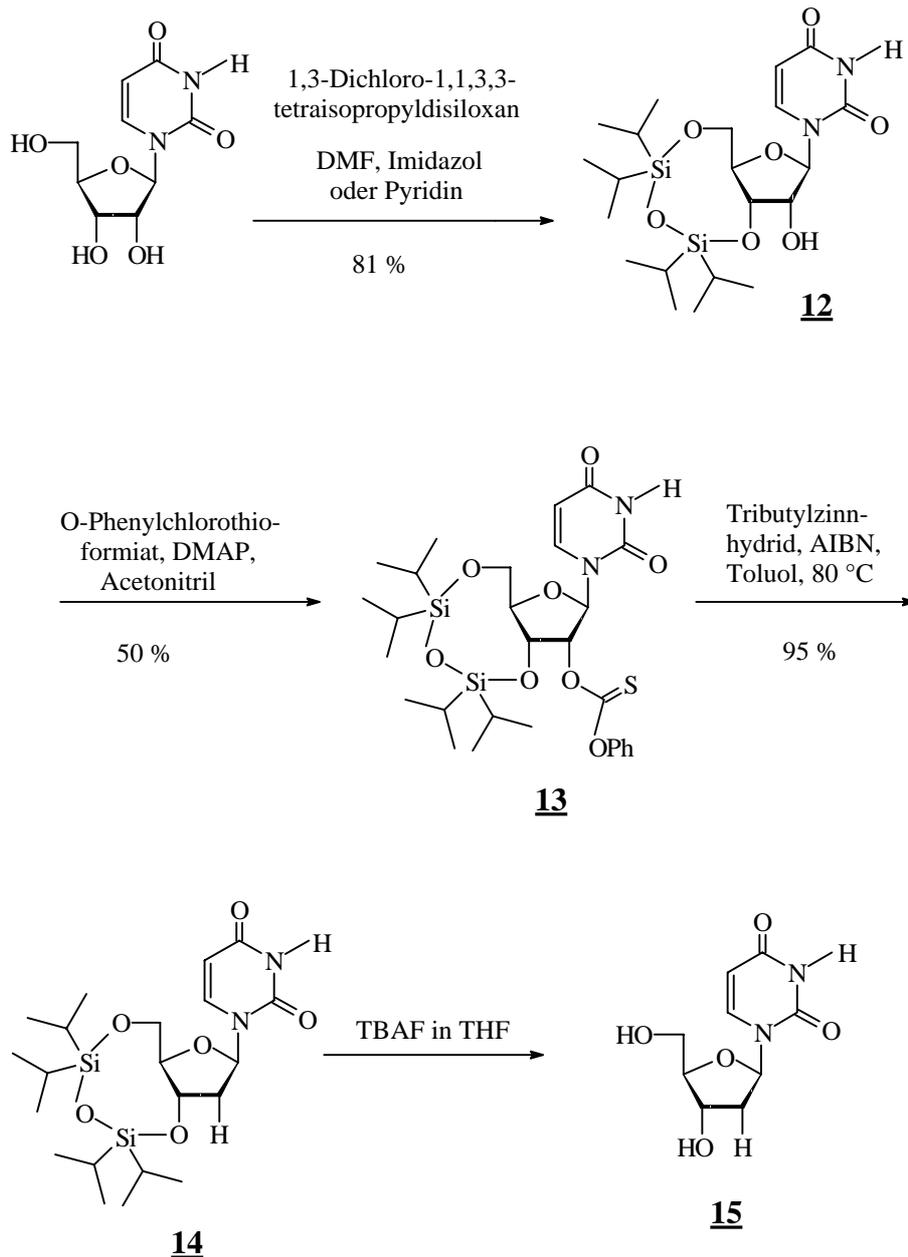


Abbildung 18: Übersichtsplan für die Umwandlung von Uridin in 2'-Desoxyuridin **15**

Der erste Schritt zur Entfernung der 2'-OH-Gruppe bestand in der Schützung der 3'- und 5'-OH-Gruppe mit der zyklischen Silylschutzgruppe. Dazu wurde Uridin mit 1,3-Dichloro-

1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan versetzt. Die Umsetzung wurde einmal in DMF unter Zusatz von Imidazol als basischer Katalysator und einmal in Pyridin, welches selbst basisch ist, durchgeführt. Eine dünnschichtchromatographische Verfolgung zeigte, daß grundsätzlich in beiden Ansätzen eine Reaktion zu beobachten war. Die Umwandlung in DMF lief aber langsamer und unter Bildung mehrerer Nebenprodukte ab. Deshalb wurde die Synthese in Pyridin durchgeführt. 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]uridin **12** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in 81 %iger Ausbeute erhalten und mittels <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie charakterisiert werden.

Nach der Einführung der zyklischen Silylschutzgruppe mußte die 2'-Hydroxygruppe in einen Ester, der gut homolytisch zu spalten war, überführt werden. Dazu wurde 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]uridin **12** in Acetonitril unter Zusatz des basischen Katalysators Dimethylaminopyridin mit O-Phenylchlorothioformiat versetzt. Durch diese Reaktion konnte 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyluridin **13** nach Aufarbeitung, säulenchromatographischer Reinigung und Trocknung in 49,8 %iger Ausbeute synthetisiert und mittels <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie und durch Massenspektrometrie charakterisiert werden.

Es folgte die reduktive Entfernung der 2'-Hydroxylfunktion mit Tributylzinnhydrid in Anwesenheit von  $\alpha,\alpha'$ -Azobis(2-methyl)propionitril (AIBN) in Toluol in 95,5 %iger Ausbeute. Durch <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie wurde das 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyuridin **14** eindeutig identifiziert.

Der letzte Schritt in dem Desoxygenierungsprozeß war, wie Abbildung 18 zeigt, die Abspaltung der zyklischen Silylschutzgruppe. Hierzu wurde 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetra-isopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyuridin **14** in THF mit einer Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung zum 2'-Desoxyuridin **15** umgesetzt. Die Reaktion wurde dünnschicht-chromatographisch verfolgt und das unaufgereinigte Produkt mit gekauftem 2'-Desoxyuridin verglichen. Hierbei störten die Tetrabutylammoniumionen. Daher wäre ein anderes Abspaltungsreagenz, dessen Ionen die weitere Aufarbeitung nicht behindern, vorteilhafter. Dies wurde im folgenden ausprobiert. Die Identifizierung des 2'-Desoxyuridins **15** erfolgte zusätzlich über den Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren und durch die Massenspektrometrie

### 3.2.2 Protektion der exozyklischen Aminofunktion vor der Desoxygenierung

Die Desoxygenierung an Uridin zum 2'-Desoxyuridin **15** verlief erfolgreich. Bei dieser Desoxygenierung waren aber auch keine freien, reaktiven funktionellen Gruppen vorhanden. Aufgrund der Tatsache, daß die Schützung der exozyklischen Aminofunktion des modifizierten Nukleosids vor der Entfernung der Isopropyliden- und der Tritylschutzgruppe nicht erfolgen konnte, mußte entweder die Desoxygenierung des modifizierten Nukleosids **11** mit der freien exozyklischen Aminofunktion durchgeführt werden oder die Aminofunktion mußte nach der Entfernung der Isopropyliden- und der Tritylschutzgruppe und vor der Desoxygenierung geschützt werden.

Um die verschiedenen Schutzgruppenstrategien auszuprobieren, wurde wieder mit einem Testmolekül - dem Adenosin - gearbeitet.

Als erstes wurde ausprobiert, die exozyklische Aminofunktion vor der Desoxygenierung zu schützen. Dafür hat sich die seit langem verwandte, basenlabile Benzoylschutzgruppe bewährt [122, 123]. Bei besonders empfindlichen Verbindungen kann die exozyklische Aminofunktion auch mit den besonders basenlabilen 4-*tert.*-Butylphenoxyacetyl- [124, 125] oder Phenoxyacetylschutzgruppen protektiert werden. Aufgrund der Tatsache, daß im Verlauf der gesamten chemischen Synthese des modifizierten Nukleosidtriphosphates **50** oft recht drastische Reaktionsbedingungen herrschten, wurde hier erst einmal auf die bewährte und oft in der Literatur beschriebene Benzoylschutzgruppe zurückgegriffen. Für den Fall, daß die Entschützung der exozyklischen Aminofunktion nicht funktioniert hätte, wären die eben erwähnten besonders basenlabilen Schutzgruppen zum Einsatz gekommen.

Für die Benzoylierung standen zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung:

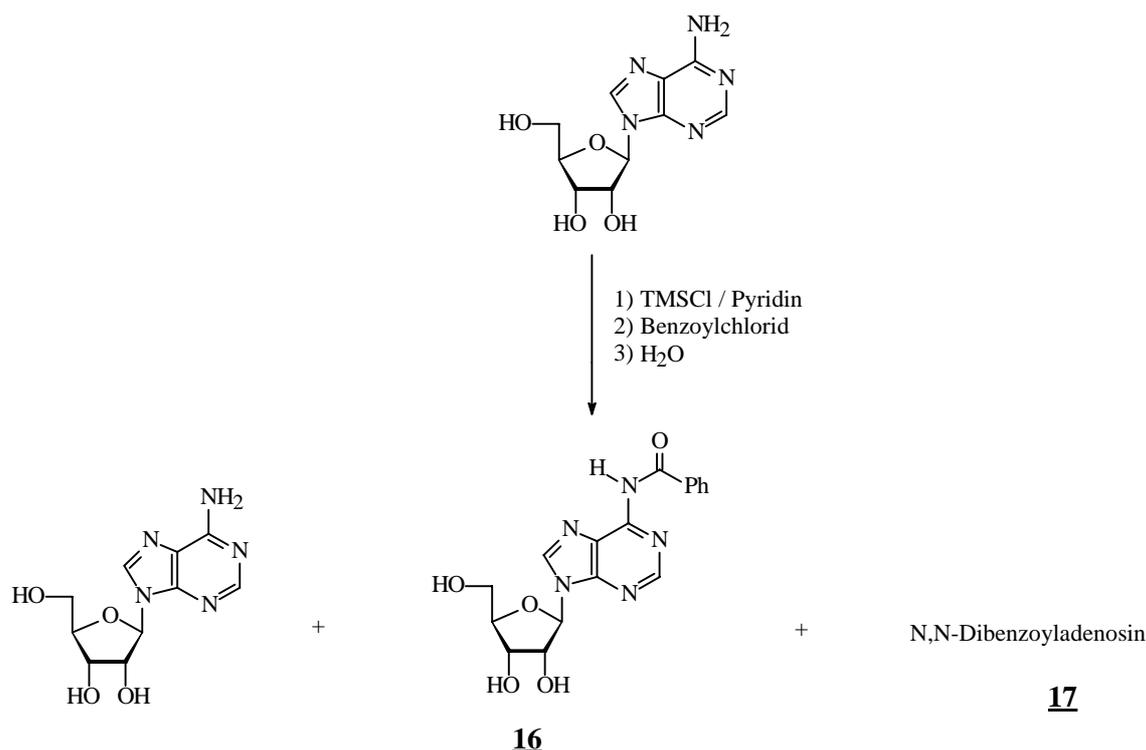
- Temporäre Schützung
- Peracylierung / selektive Verseifung

Bei der 1982 von Jones vorgestellten temporären Schützung handelt es sich um eine Eintopfreaktion zur Darstellung von N-Benzoylgeschützten 2'-Desoxynukleosiden (Abb. 19) . Die in Pyridin gelösten Desoxynukleoside werden zunächst mit Trimethylchlorsilan versetzt,

um die Hydroxylgruppen als Trimethylsilylester zu schützen. Das nicht isolierte Produkt wird danach mit Benzoylchlorid umgesetzt, und abschließend werden die Trimethylsilylgruppen durch Hydrolyse entfernt. Auch das als Nebenprodukt entstehende N,N-Dibenzoyl-desoxyadenosin kann durch Behandlung mit Ammoniak in das gewünschte monobenzoylierte Produkt überführt werden<sup>[126]</sup>.

Bei der 1963 von Khorana<sup>[127]</sup> eingeführten und von Narang et al.<sup>[128]</sup> weiterentwickelten Methode der Peracylierung mit anschließender selektiver Verseifung wird das zu schützende Adenosin zunächst mit Benzoylchlorid peracyliert. Die größere Reaktivität von Estern gegenüber Säureamiden - bedingt durch die größere Elektronegativität von Sauerstoff gegenüber Stickstoff - und ferner die Stabilisierung von aromatischen Amiden unter diesen stark basischen Bedingungen wird dann gezielt ausgenutzt, um durch selektive Verseifung der Esterbindungen und der Hydrolyse der einen N-Acylbindung mit Natronlauge das mono-N-acylierte Produkt zu erhalten. Dabei ist entscheidend, daß während der Verseifung der Esterbindungen und der basischen Hydrolyse der einen Amidbindung des peracylierten Ausgangsproduktes ein pH-Wert von über 12 vorliegt, denn nur dann erfolgt die Deprotonierung des Amidstickstoffatoms. Erst diese Deprotonierung ermöglicht zusätzlich zur Amid-Mesomerie eine weitere Stabilisierung der verbleibenden Amidbindung.

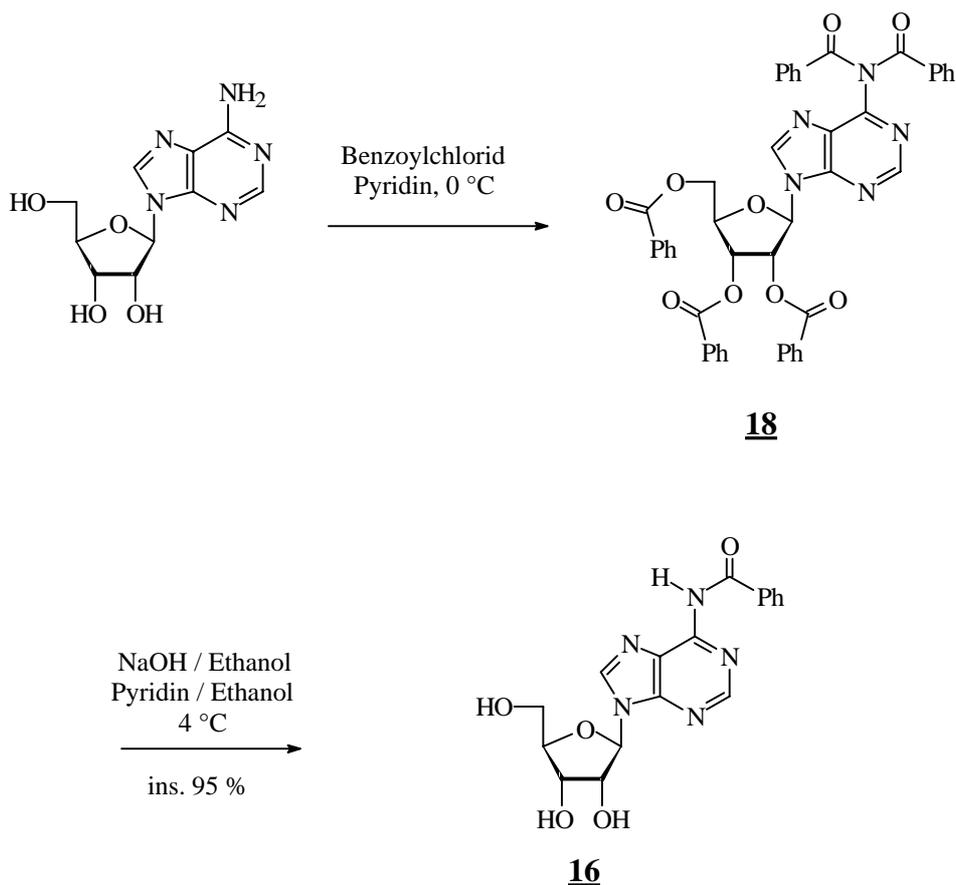
Zur Einführung der Benzoylschutzgruppe an der exozyklischen Aminofunktion wurden nach der Methode von Jones die funktionellen Gruppen des Adenosins alle mit Trimethylchlorsilan geschützt. Anschließend erfolgte dann bei 0 °C die Zugabe von Benzoylchlorid im 1,4 fachen Überschuß bezogen auf die eine Aminofunktion. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Benzoylchloridüberschuß zerstört und die Trimethylsilylschutzgruppen wurden entfernt.



**Abbildung 19:** Beim Versuch, die exozyklische Aminofunktion des Probanden Adenosin nach der Methode der temporären Schützung zu protektieren, entstanden mindestens drei Produkte.

Nach Aufarbeitung und Reinigung konnten drei Produkte zu etwa gleichen Teilen isoliert und durch <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie identifiziert werden. Dabei handelte es sich zum einen um das Edukt. Da aber während der Reaktion zwischenzeitlich kein Edukt mehr zu sehen war, deutet dies darauf hin, daß die Trimethylsilylschutzgruppe auch die Aminofunktion schützte und nicht so leicht durch einen geringen Benzoylchloridüberschuß zu verdrängen war oder, daß das gewünschte Produkt wieder entschützt wurde. Das andere unerwünschte Produkt war zweifach benzoiliertes Adenosin **17**. Außerdem wurde das gewünschte N<sup>6</sup>-Benzoyladenosen **16** gefunden. Die Ausbeute an N<sup>6</sup>-Benzoyladenosen **16** könnte durch Variation der Reaktionsbedingungen sicherlich noch gesteigert werden und das zurückgewonnene Edukt könnte erneut umgesetzt werden. Insgesamt verlief die Einführung der Schutzgruppe aber nicht erfolgreich, da trotz des geringen Reagenzüberschusses neben unumgesetztem auch schon mehrfach benzoiliertes Produkt gebildet wurde.

Eine weitere Möglichkeit zur Einführung der Benzoylschutzgruppe an der exozyklischen Aminofunktion bestand darin, zunächst alle funktionellen Gruppen des Adenosins mit Benzoylchlorid zu schützen und dann selektiv die reaktiveren Esterbindungen zu spalten, während die unreaktivere Amidbindung bestehen blieb (Abb. 20).



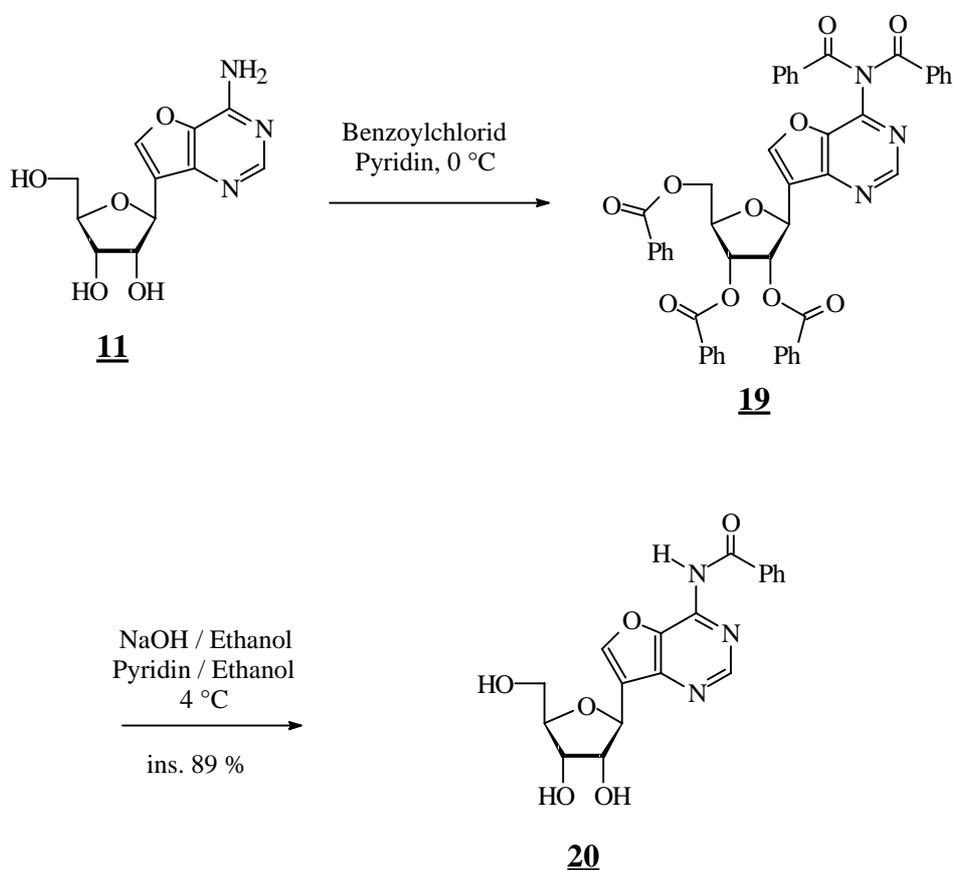
**Abbildung 20:** Protektion der exozyklischen Aminofunktion nach der Methode der Peracylierung mit anschließender selektiver Verseifung am Probanden Adenosin

Dazu wurde Adenosin in Pyridin bei 0 °C mit einem Überschuß an Benzoylchlorid pro reaktiver funktioneller Gruppe versetzt. Durch dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion konnte die Umwandlung gut beobachtet werden. Nach Beendigung der Umsetzung und der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt **18** ungereinigt zur selektiven Esterspaltung eingesetzt. Hierbei erfolgte die Verseifung der Esterbindungen und die Spaltung der einen N-Acylbindung des 2',3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Pentabenzoyladenosins **18**, welches in Pyridin/Ethanol (1:1) gelöst worden war, durch Zugabe von Natronlauge unter Eiskühlung bei zu einem pH-Wert von über 12. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe eines Ionenaustauschers neutralisiert und nach der Aufarbeitung konnte das N<sup>6</sup>-Benzoyladenosin **16** durch Kristallisation aus Diethylether in 94,6 %iger Ausbeute gewonnen werden. Die Identifizierung erfolgte durch <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie.

Diese zweite Methode der Schutzgruppeneinführung hatte gegenüber der ersten Methode (Abb. 19) so erhebliche - 94,6 % gegenüber ca. 33 % Ausbeute - Vorteile, daß die Schützung der exozyklischen Aminofunktion des modifizierten Adenosins nur noch nach der Methode

der Peracylierung mit anschließender selektiver Deacylierung <sup>[128]</sup> (Abb. 20) durchgeführt wurde.

Die Übertragung der Peracylierung auf 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin **11** gelang ohne Probleme.

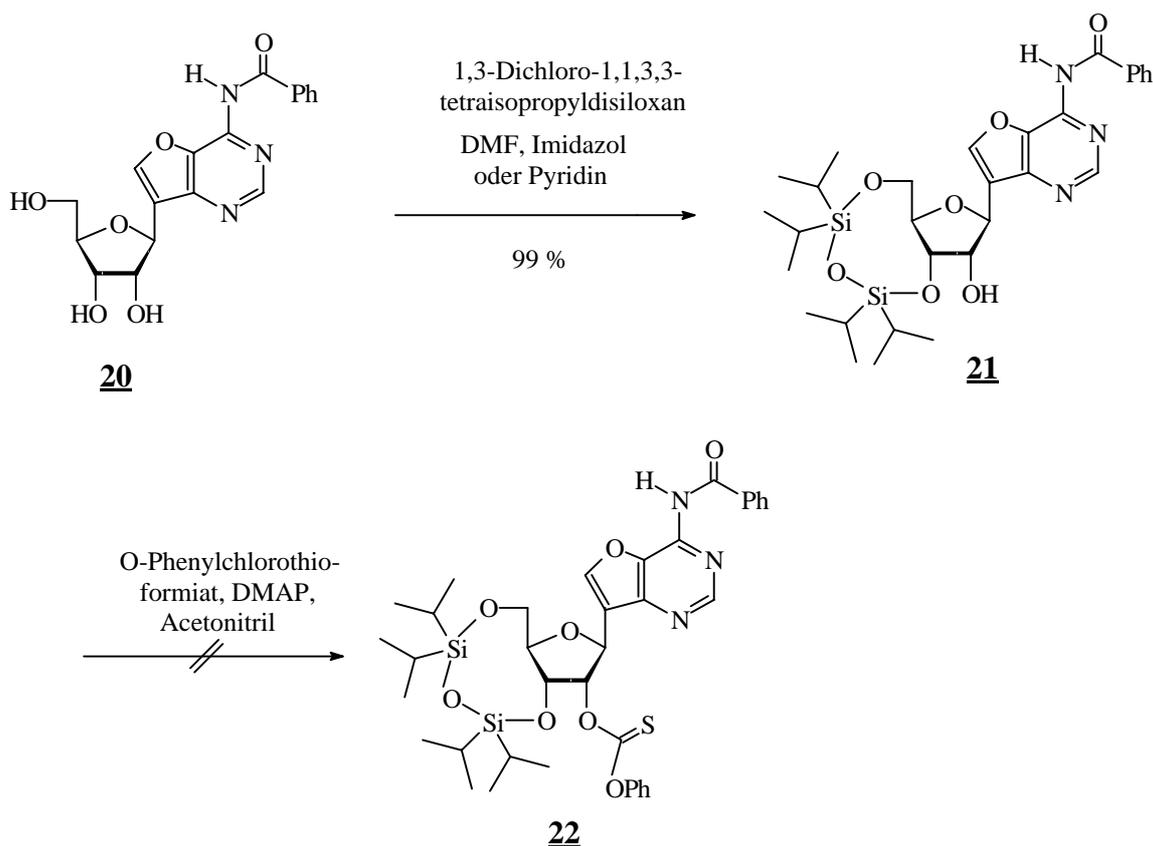


**Abbildung 21:** Protektion der exozyklischen Aminofunktion des modifizierten Nucleosids nach der Methode der Peracylierung mit anschließender selektiver Verseifung

Das Rohprodukt **19** wurde dann wieder ohne vorherige Reinigung unter Kontrolle des pH-Wertes und dünnschichtchromatographischer Verfolgung der Reaktion selektiv an den reaktiveren Esterbindungen und der einen N-Acylgruppe durch Natronlauge bei einem pH-Wert von über 12 bei niedriger Temperatur unter Erhalt der einen Amidbindung verseift. Im Gegensatz zur Synthese von N<sup>6</sup>-Benzoyladenosen **16** kristallisierte das N<sup>6</sup>-Benzoyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **20** nach Neutralisation und Aufarbeitung nicht aus. Daher wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt und in 89,2 %iger Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung erfolgte durch <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie.

### 3.2.3 Versuch der Desoxygenierung des aminogeschützten, modifizierten Nucleosids

Nachdem die Aminofunktion des modifizierten Nucleosids geschützt war, wurde die Desoxygenierungsprozedur begonnen <sup>[113, 118, 119, 121, 129]</sup>.



**Abbildung 22:** Versuch der Desoxygenierung des aminogeschützten, modifizierten Nucleosids

Dazu wurden zuerst die 3'- und die 5'- Hydroxylfunktion des N<sup>6</sup>-Benzoyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosins **20** mit 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan in 98,6 %iger Ausbeute geschützt. Anschließend wurde versucht, die noch freie Hydroxylfunktion des N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-7,9-dideaza-7-oxoadenosins **21** mit O-Phenylchlorothioformiat zum N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **22** umzusetzen. Bei dieser Reaktion ließ sich aber bei der säulenchromatographischen Reinigung - entgegen allen Erwartungen - kein Produkt isolieren.

Dies konnte keine sterischen Gründe haben, denn die Schutzgruppe an der exozyklischen Aminofunktion war zu weit entfernt. Daher waren die Gründe für die nicht stattfindende Reaktion zwischen der Hydroxylfunktion und dem O-Phenylchlorothioformiat in der veränderten Anordnung der Elektronen zu suchen. Beim Übergang von Adenosin zum geschützten 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin wurde einmal durch die Schutzgruppe an der exozyklischen Aminofunktion und zum andern durch die Substitution des Stickstoffatoms durch das stärker elektronegative Sauerstoffatom der Elektronenzug auf die 2'-Hydroxylgruppe erhöht. Dadurch wurde die Reaktivität der 2'-Hydroxylgruppe wahrscheinlich so stark gesenkt, daß eine Reaktion mit dem nicht besonders starken elektrophilen O-Phenylchlorothioformiat nicht stattfand.

Die Umsetzung mit O-Phenylchlorothioformiat war auch schon bei der Desoxygenierung des 3',5'-geschützten Uridins (Abb. 18) die Stufe mit der schlechtesten Ausbeute, aber immerhin lag diese noch bei ca. 50 %. Auch beim Uridin war der Elektronenzug auf die 2'-OH-Gruppe durch die beiden Ketogruppen in der Base erhöht und daher die Reaktivität erniedrigt.

## 3.2.4 Desoxygenierung von Adenosin

Die Desoxygenierung mit einem an der Aminofunktion geschützten, modifizierten Nucleosid **20** war - wie oben diskutiert wurde - mit Schwierigkeiten verbunden. Daher wurde, der Strategie folgend, nun versucht, die Desoxygenierung mit der freien exozyklischen Aminofunktion - entsprechend Abb. 23 - durchzuführen und anschließend die Benzoylschutzgruppe einzuführen. Auch an dieser Stelle wurde wieder mit einem Probanden - dem Adenosin - gearbeitet, um erst einmal die Reaktionsbedingungen auszutesten <sup>[113, 118, 119, 121, 129]</sup>.

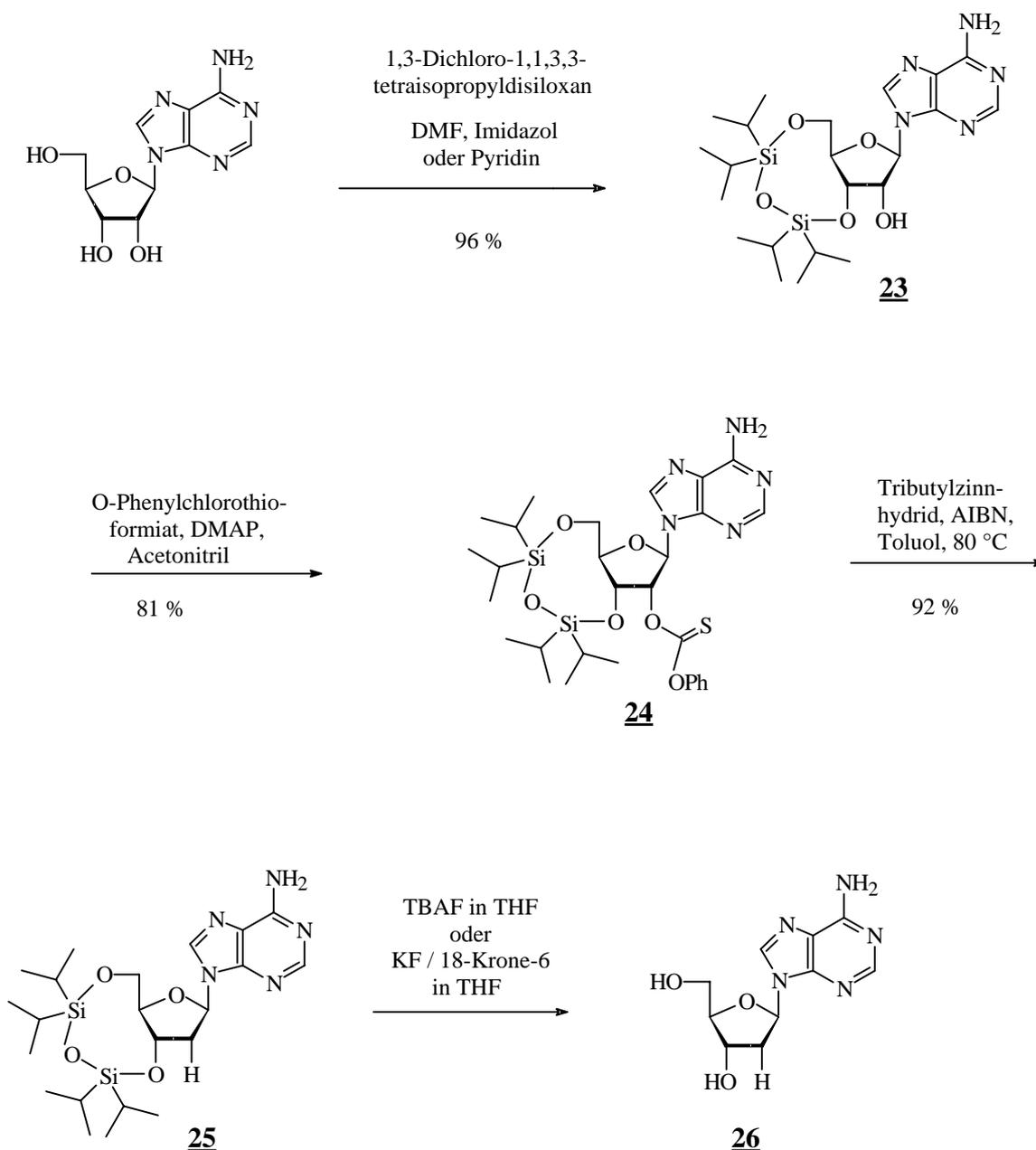


Abbildung 23: Übersicht zur Desoxygenierung von Adenosin

3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]adenosin **23** wurde im ersten Schritt des Desoxygenierungsprozesses aus Adenosin und 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan in 96,3 %iger Ausbeute hergestellt. Es folgte der kritische Schritt der vorangegangenen Desoxygenierung des an der exozyklischen Aminofunktion geschützten, modifizierten Nucleosids. Die Umsetzung der 2'-Hydroxylfunktion mit O-Phenylchloro-thioformiat zum 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythio-carbonyladenosin **24** gelang aber in 81,3 %iger Ausbeute. Die gegenüber der Umsetzung des 3',5'- und an der Aminofunktion- geschützten, modifizierten Nucleosids und des 3',5'-geschützten Uridins gesteigerte Ausbeute ließ sich - wie oben schon erwähnt - durch die größere Elektronendichte an der 2'-Hydroxylgruppe beim 3',5'-geschützten Adenosin erklären. Das gewünschte Produkt konnte auch eindeutig durch  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Die befürchtete Mehrfacheinführung der Phenoxythiocarbonylgruppe an der exozyklischen Aminofunktion blieb aus. Dies ist ein weiterer Beweis für die recht geringe Elektrophilie des O-Phenylchlorothioformiates.

Anschließend wurde 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyladenosin **24** in Toluol unter Einwirkung von  $\alpha,\alpha'$ -Azobis(2-methyl)propionitril mit Tributylzinnhydrid durch Kochen unter Rückfluß in das 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosin **25** überführt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurde das Produkt in 92,5 %iger Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung erfolgte durch  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie.

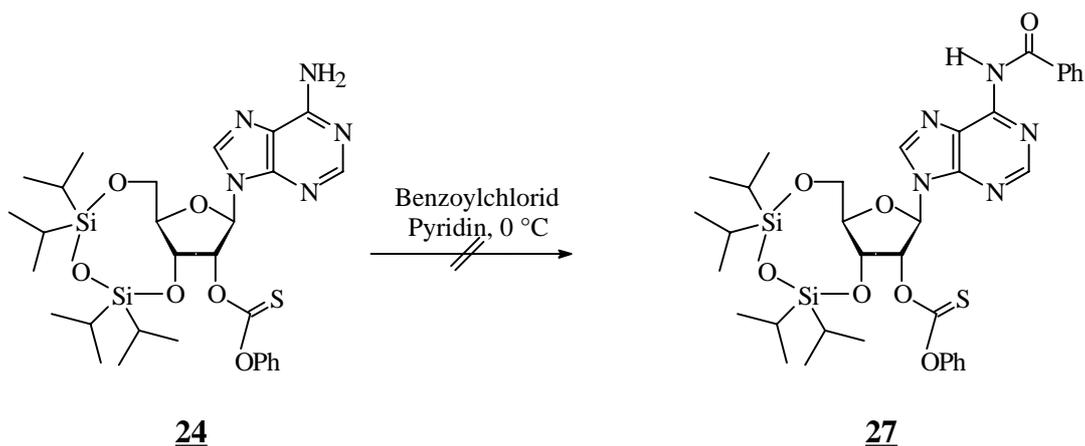
Für die Darstellung des 2'-Desoxyadenosins **26** aus 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosin **25** wurden - wie in Abbildung 23 dargestellt - zwei verschiedene Möglichkeiten, die zyklische Silylschutzgruppe zu entfernen, miteinander verglichen. Bei der ersten Methode wurde, wie bei der Synthese des 2'-Desoxyuridins **15**, das 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosin **25** in THF mit einer Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur gerührt<sup>[103]</sup>. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz aufgeteilt. Ein Teil wurde ohne weitere Reinigungsschritte eingengt. Zum zweiten Teil wurde festes Natriumcarbonat zur Neutralisation hinzugefügt, dieses wurde wieder abfiltriert und die Lösung wurde eingengt. Bei beiden Teilansätzen störten die großen Tetrabutylammoniumionen die Identifizierung und Isolierung des Produktes, da sie säulenchromatographisch kaum von 2'-Desoxyadenosin **26** getrennt werden

konnten.

Bei der zweiten Methode wurde das 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosin **25** in THF gelöst und mit Kaliumfluorid, dem Kronenether 18-Krone-6 und ein wenig Wasser bei Raumtemperatur gerührt<sup>[108]</sup>. Nach beendeter Reaktion wurde der Feststoff abfiltriert, gewaschen und das Eluat wurde eingengt. Bei dieser Entschützung traten keine störenden großen Ionen auf, die in ihrem Laufverhalten dem 2'-Desoxyadenosin **26** ähnelten. Daher ließ sich auf diese Weise das Produkt leicht isolieren und durch <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie durch Massenspektrometrie identifizieren. Die Desoxygenierung an Adenosin gelang damit ohne Probleme, obwohl mit der exozyklischen Aminofunktion eine reaktive Gruppe während der Reaktionen ungeschützt vorlag.

### **3.2.5 Versuch der Protektion der exozyklischen Aminofunktion während der Desoxygenierung**

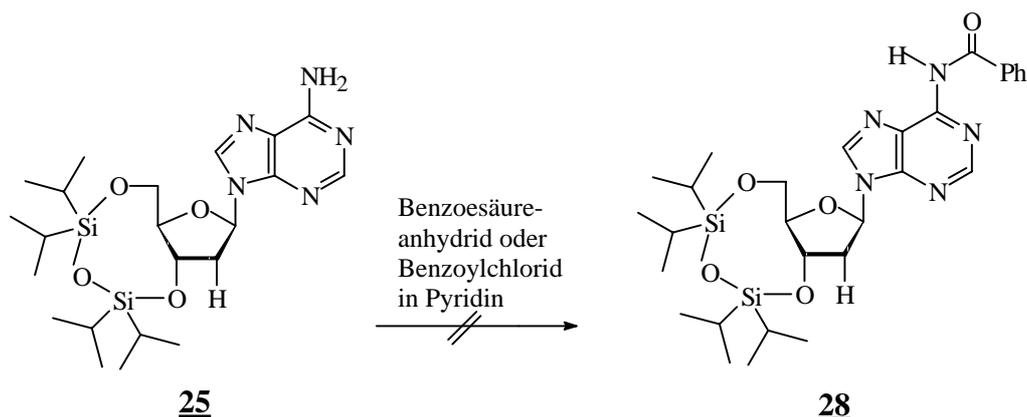
Eine Schützung der Aminofunktion mit Benzoylchlorid war, wie anhand der Desoxygenierung von ungeschütztem Adenosin bewiesen wurde, vor der Entfernung der 2'-Hydroxylfunktion nicht notwendig. Trotzdem wäre es sinnvoll gewesen, die Aminofunktion auf einer Stufe zu protektieren, auf der die anderen reaktiven Gruppen sowieso geschützt waren. Dies würde Reaktionsschritte einsparen und damit Verluste bei der Reaktion und Aufreinigung verhindern. Deshalb wurde versucht, die Benzoylschutzgruppe während des Desoxygenierungsprozesses einzuführen. Diese Versuche wurden wieder mit einem Probemolekül - dem entsprechend geschützten Adenosin - durchgeführt (Abb. 24 und 25). Der kritische Schritt in der Desoxygenierungsprozedur des aminogeschützten Nukleosids lag bei der Umsetzung der 2'-OH-Gruppe mit O-Phenylchlorothioformiat. Daher erschien es sinnvoll, die Aminofunktion nach dieser Reaktion nämlich auf der Stufe des 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyladenosins **24** zu schützen.



**Abbildung 24:** Erster Versuch, die exozyklische Aminofunktion während der Desoxygenierung zu schützen

Bei der dünnschichtchromatographischen Verfolgung eines Testansatzes, bei dem 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyladenosen **24** in Pyridin unter Kühlung mit frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt wurde<sup>[96]</sup>, konnte aber nicht die Bildung einer unpolaren Verbindung, welche dem N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyladenosen **27** entsprochen hätte, beobachtet werden. Stattdessen entstand eine polarere Verbindung, die im dünnschichtchromatographischen Vergleich eher dem 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]adenosen **23** entsprach. Beim Versuch, die Aminofunktion zu schützen, wurde wahrscheinlich die Phenoxythiocarbonylgruppe wieder abgespalten. Dies könnte durch eine Hydrolyse mittels des stark sauren Pyridiniumhydrochlorids stattgefunden haben.

Eine weitere Möglichkeit, die Aminofunktion während der Desoxygenierungsprozedur zu schützen, war auf der Stufe des 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosins **25** gegeben.



**Abbildung 25:** Zweiter Versuch zur Protektion der exozyklischen Aminofunktion während der Desoxygenierung

Bei der Versetzung von 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosin **25** mit Benzoessäureanhydrid und anschließendem Kochen des Ansatzes unter Rückfluß trat jedoch kaum Umsetzung zu **28** ein. Auch die Zugabe von Benzoylchlorid unter Eiskühlung konnte die Ausbeute nicht verbessern, sondern es trat eine Zersetzung ein. Insgesamt erwies sich die Einführung der Benzoylschutzgruppe während der Desoxygenierung als problematisch. Bei diesen nur in sehr kleinem Maßstab zur dünn-schichtchromatographischen Verfolgung durchgeführten Reaktionen wurde jeweils mit einem großen Überschuß an Benzoylchlorid gearbeitet. Dies könnte zur Entstehung eines großen Pyridiniumhydrochlorid-Überschusses geführt haben, der aufgrund seiner stark sauren Eigenschaften die Hydrolyse begünstigt haben könnte. Eine Variation der Reaktionsbedingungen bzw. eine maßstabsgetreue Versuchsdurchführung könnten daher vielleicht die Einführung der Schutzgruppe an der exozyklischen Aminofunktion während der Desoxygenierung bewirken. Da jedoch die exozyklische Aminofunktion nach der Methode der Peracylierung mit anschließender selektiver Verseifung auch nach Abschluß der Desoxygenierung in guten Ausbeuten selektiv geschützt werden konnte, wurde die Einführung der Schutzgruppe während der Desoxygenierung nicht weiter verfolgt.

## 3.2.6 Desoxygenierung des modifizierten Nukleosids

Die Durchführung der Desoxygenierung mit dem Probanden Adenosin zeigte, daß die Entfernung der 2'-OH-Gruppe ohne vorheriges Schützen der exozyklischen Aminofunktion gelang, die Einführung einer Schutzgruppe für die exozyklische Aminofunktion während der Desoxygenierung aber nicht erfolgreich verlief. Daher mußte die Schützung nach Abschluß der Desoxygenierung erfolgen. Nachdem diese Erkenntnisse vorlagen, wurde die Desoxygenierung im folgenden an 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin **11** durchgeführt<sup>[113, 118, 119, 121, 129]</sup>.

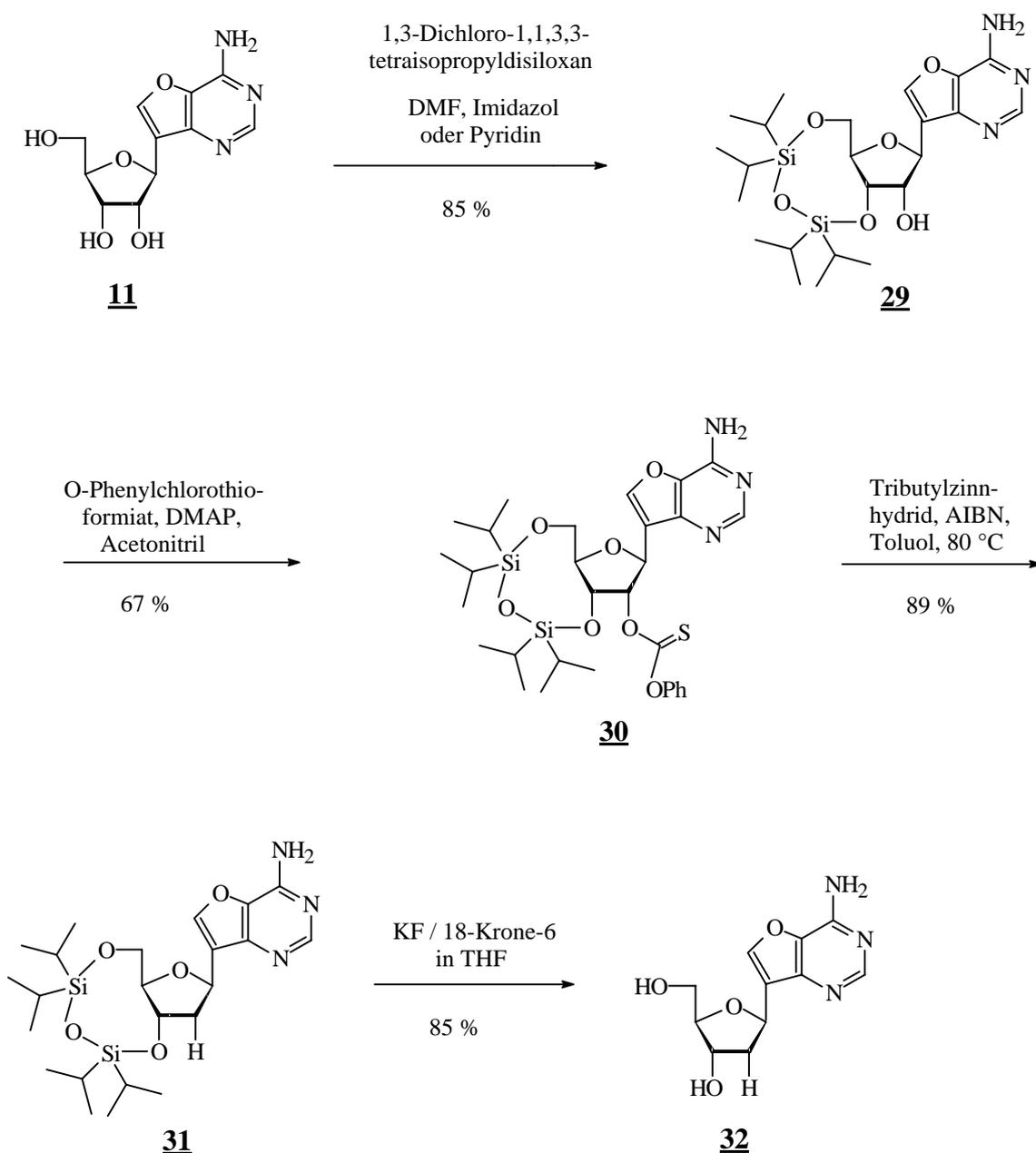


Abbildung 26: Übersichtsplan für die Desoxygenierung von 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin **11**

Der erste Schritt, die Einführung der zyklischen Silylschutzgruppe, erfolgte durch Umsetzung von in Pyridin suspendiertem 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin **11** mit 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan. Nach Aufarbeitung, säulenchromatographischer Reinigung und Trocknung wurde 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **29** in 85 %iger Ausbeute erhalten und mittels  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie sowie Massenspektrometrie identifiziert.

Nachdem die 3'- und die 5'-Hydroxylfunktion geschützt worden waren, wurde die 2'-OH-Gruppe des 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-7,9-dideaza-7-oxoadenosins **29** mit O-Phenylchlorothioformiat zum 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **30** in 67,2 %iger Ausbeute umgesetzt. Auch längere Reaktionszeiten und größere Reagenzüberschüsse konnten diese Ausbeute nicht in die Nähe der 80 % bringen, bei welcher sie beim Adenosin lag. Allerdings war die Ausbeute deutlich höher als bei der Umsetzung des entsprechenden Uridinderivats. Diese Beobachtung war im Einklang mit den bei der Desoxygenierung des aminogeschützten, modifizierten Nukleosids diskutierten Elektronenverteilung innerhalb des Heterozyklus. Wie dort schon erwähnt, führt die Substitution des N-7 durch ein Sauerstoffatom zu einem stärkeren Elektronenzug von der 2'-Hydroxygruppe weg und damit zu einer geringeren Reaktivität dieser Gruppe. Im Gegensatz zum aminogeschützten, modifizierten Nukleosid ist hier aber aufgrund der nicht vorhandenen Aminoschutzgruppe der Elektronenzug nicht ganz so stark, sodaß wie beim 3',5'-geschützten Uridin eine Reaktion eintreten konnte.

Im folgenden wurde die 2'-O-Phenoxythiocarbonylgruppe des 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosins **30** in Anwesenheit des Radikalstarters  $\alpha,\alpha'$ -Azobis(2-methyl)propionitril in Toluol mittels Tributylzinnhydrid in 89 %iger Ausbeute reaktiv entfernt. Die Identifizierung des 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosins **31** erfolgte durch  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie sowie mittels Massenspektrometrie.

Im letzten Schritt wurde die zyklische Silylschutzgruppe des 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosins **31** durch Umsetzung mit Kaliumfluorid, Kronenether und Wasser in THF entfernt<sup>[108]</sup>. Das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32** wurde in 85,5 %iger Ausbeute hergestellt und mittels  $^1\text{H-NMR}$ -,  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert.

### **3.3 Schutzgruppeneinführung in Hinblick auf die Triphosphatsynthese**

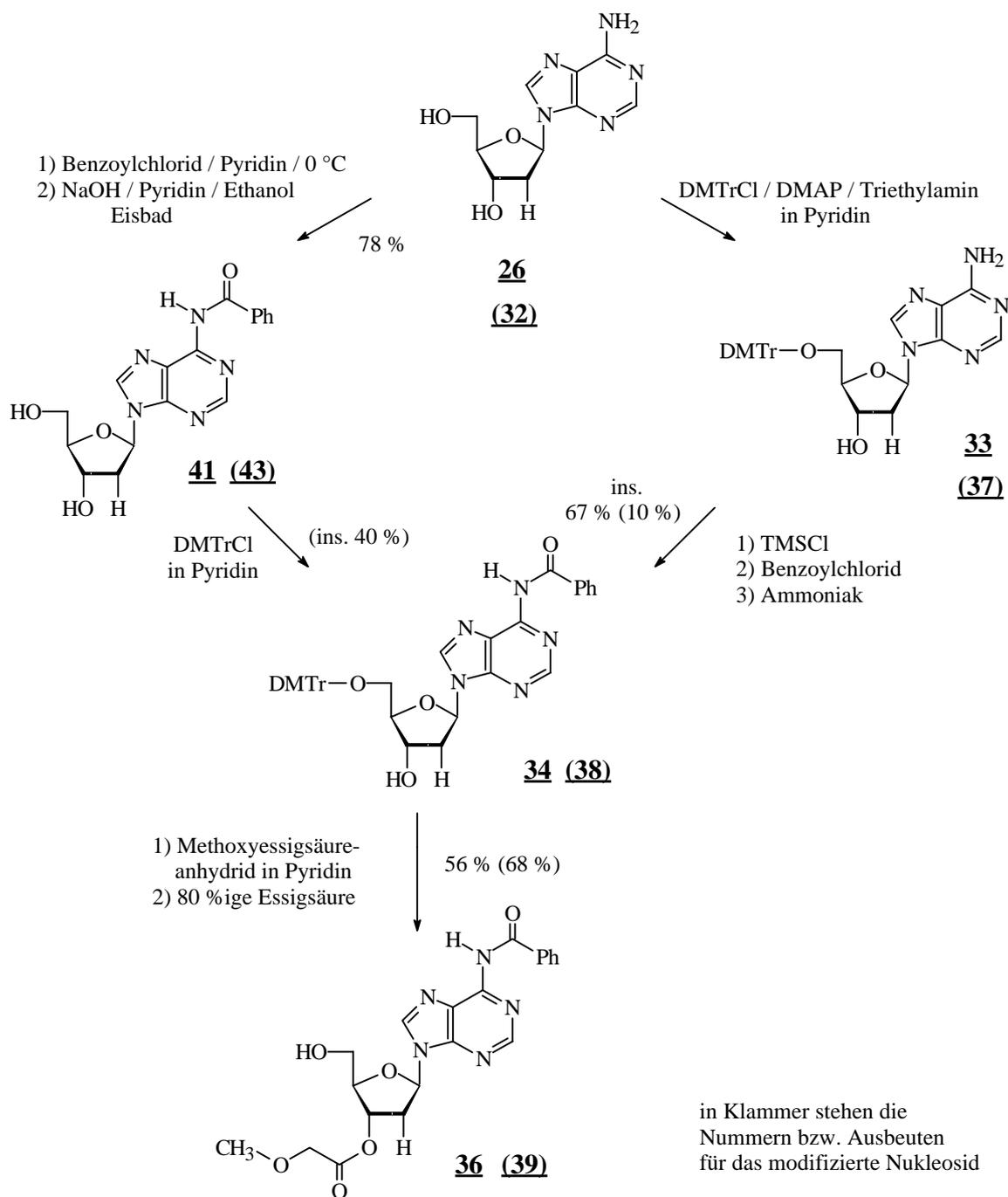
Nachdem das modifizierte 2'-Desoxynukleosid **32** hergestellt worden war, sah die weitere Synthesestrategie jetzt die Einführung der Schutzgruppen in Hinblick auf die Triphosphatsynthese vor.

Dafür standen, wie Abbildung 27 zeigt, wieder zwei Wege zur Verfügung:

- temporäre Schützung
- Peracylierung / selektive Verseifung

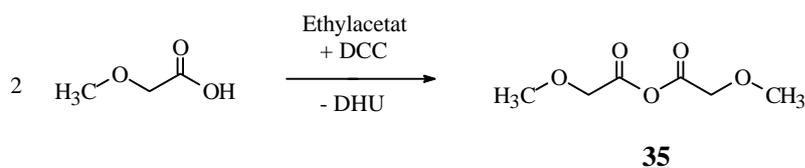
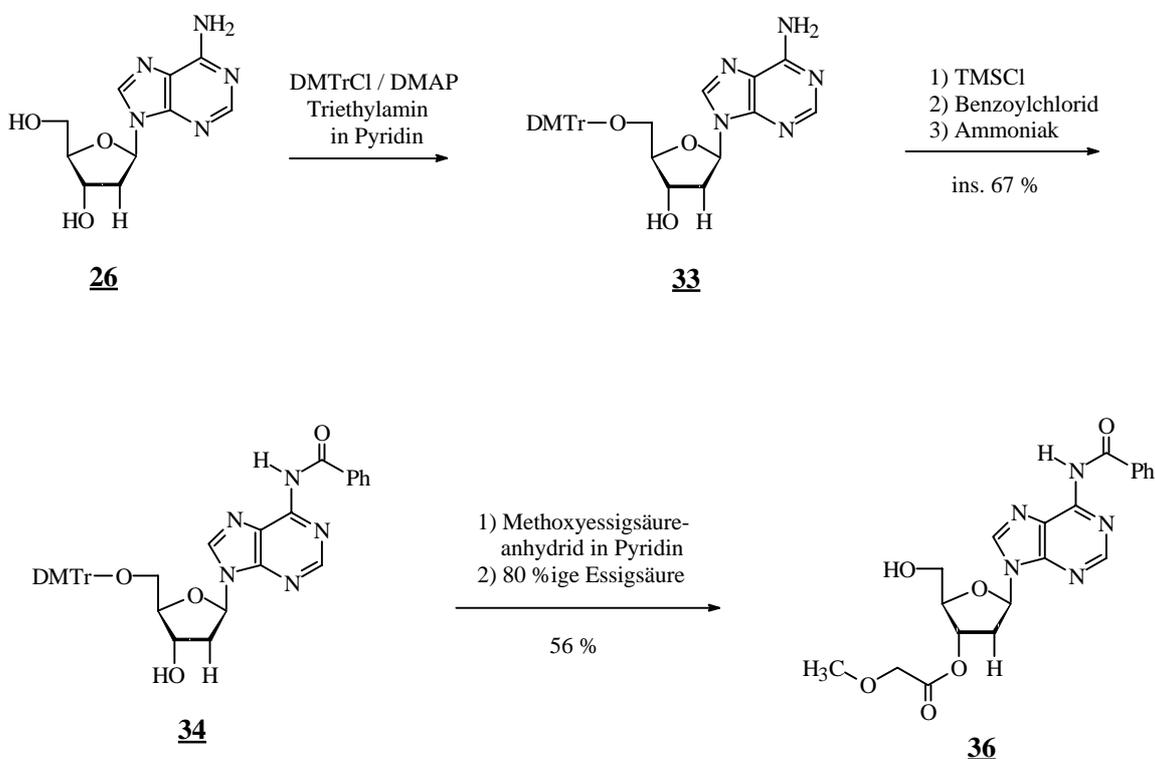
Bei der einen Synthese wurde nach dem Prinzip der temporären Schützung von Jones<sup>[126]</sup> in einer Eintopfreaktion zuerst die 5'-Hydroxylfunktion des 2'-Desoxynukleosids mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid, anschließend die restlichen OH-Gruppen mit Trimethylsilylchlorid und dann die exozyklische Aminofunktion mit Benzoylchlorid geschützt.

Auf dem anderen Weg - der Peracylierung mit anschließender selektiver Verseifung nach Khorana<sup>[127]</sup> und der Weiterentwicklung von Narang<sup>[128]</sup> - wurden zuerst alle funktionellen Gruppen des 2'-Desoxynukleosids benzyliert und anschließend die Esterbindungen selektiv verseift, während die Amidbindung bestehen blieb. Dann wurde die 5'-OH-Gruppe mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid geschützt. Abschließend erfolgte auf beiden Wegen die Umsetzung der 3'-OH-Gruppe mit Methoxyessigsäureanhydrid und die Entfernung der 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe<sup>[97]</sup>. Als Proband, um auszutesten, welcher Weg besser funktionierte, diente wieder 2'-Desoxyadenosin **26**.



**Abbildung 27:** Gegen\u00fcberstellung der beiden Darstellungswege von N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxyadenosin. Der linke Weg zeigt die Sch\u00fctzung der reaktiven Gruppen nach der Methode der Peracylierung mit anschlie\u00dfender selektiver Verseifung. Rechts ist die Protektion der funktionellen Gruppen nach dem Verfahren der tempor\u00e4ren Sch\u00fctzung abgebildet.

Im ersten Schritt der temporären Schützung <sup>[126]</sup> wurde in Pyridin suspendiertes 2'-Desoxyadenosin **26** in Anwesenheit von Dimethylaminopyridin mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid versetzt, um selektiv die primäre 5'-OH-Gruppe zu protektieren (Abb. 28). Als Nebenprodukt dieser Umsetzung entstand dabei sicherlich auch an der exozyklischen Aminofunktion geschütztes 2'-Desoxyadenosin. Diese unerwünschte Nebenreaktion führte zwar zu Ausbeuteverlusten, aber störte den weiteren Syntheseablauf nicht. Daher wurde das Rohprodukt des 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosins **33** gleich weiter zur Benzoylierung eingesetzt. Dazu wurden zuerst alle funktionellen Gruppen mit Trimethylchlorsilan blockiert und dann die Aminofunktion durch Benzoylchlorid selektiv geschützt. Danach wurde überschüssiges Benzoylchlorid zerstört und die Hydroxyfunktionen wurden wieder entschützt.



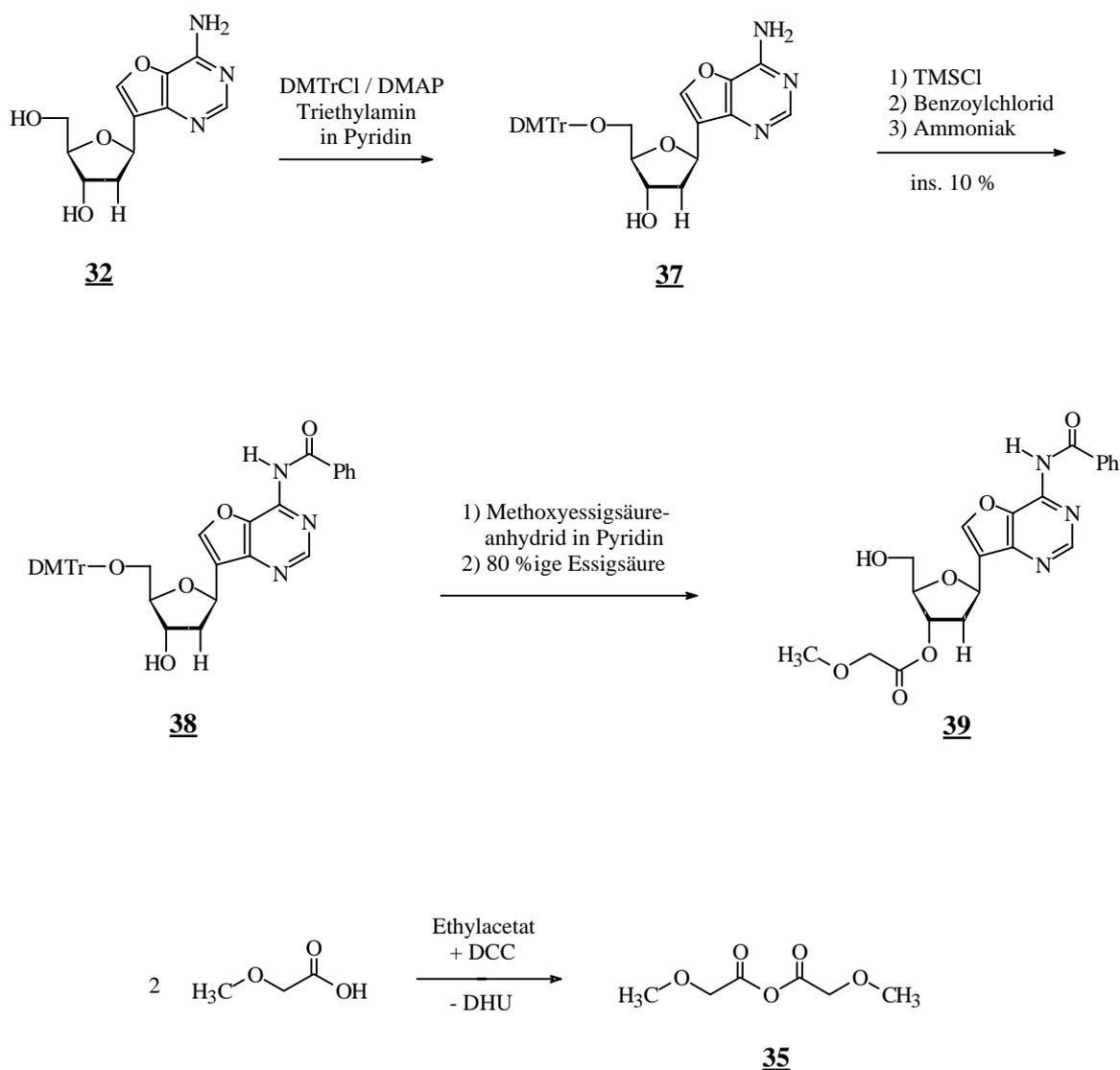
**Abbildung 28:** oben Darstellung des N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxyadenosins **36** nach dem Verfahren der temporären Schützung .  
unten Darstellung von Methoxyessigsäureanhydrid **35**

Nach der säulenchromatographischen Reinigung konnte das N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin **34** in 67,2 %iger Ausbeute bezogen auf das 2'-Desoxyadenosin **26** erhalten werden. Die Identifizierung des Produktes gelang mittels <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

Das zum Schutz der 3'-OH-Gruppe benötigte Methoxyessigsäureanhydrid **35** wurde aus Methoxyessigsäure unter Einwirkung von Dicyclohexylcarbodiimid hergestellt und zur Reinigung im Ölpumpenvakuum destilliert<sup>[97]</sup>. Den Beweis der geglückten Synthese lieferte ein Vergleich der IR-Spektren und der Siedepunkte.

Mit dem frisch hergestellten Methoxyessigsäureanhydrid **35** wurde die 3'-Hydroxylfunktion des N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosins **34** verestert. Nach Abschluß der Umsetzung wurde die 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe mit Essigsäure entfernt. Das so in 56 %iger Ausbeute erhaltene N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxyadenosin **36** wurde mit Hilfe von <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert.

Dieser über zwei Eintopfreaktionen verlaufende Syntheseweg war erfolgreich. Daher wurde, wie die nachfolgende Abbildung zeigt, versucht, 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32** auf diesem Wege zu schützen<sup>[97, 126]</sup>.



**Abbildung 29:** oben Übertragung des Verfahrens der temporären Schützung auf das modifizierte 2'-Desoxynucleosid  
 unten Darstellung von Methoxyessigsäureanhydrid

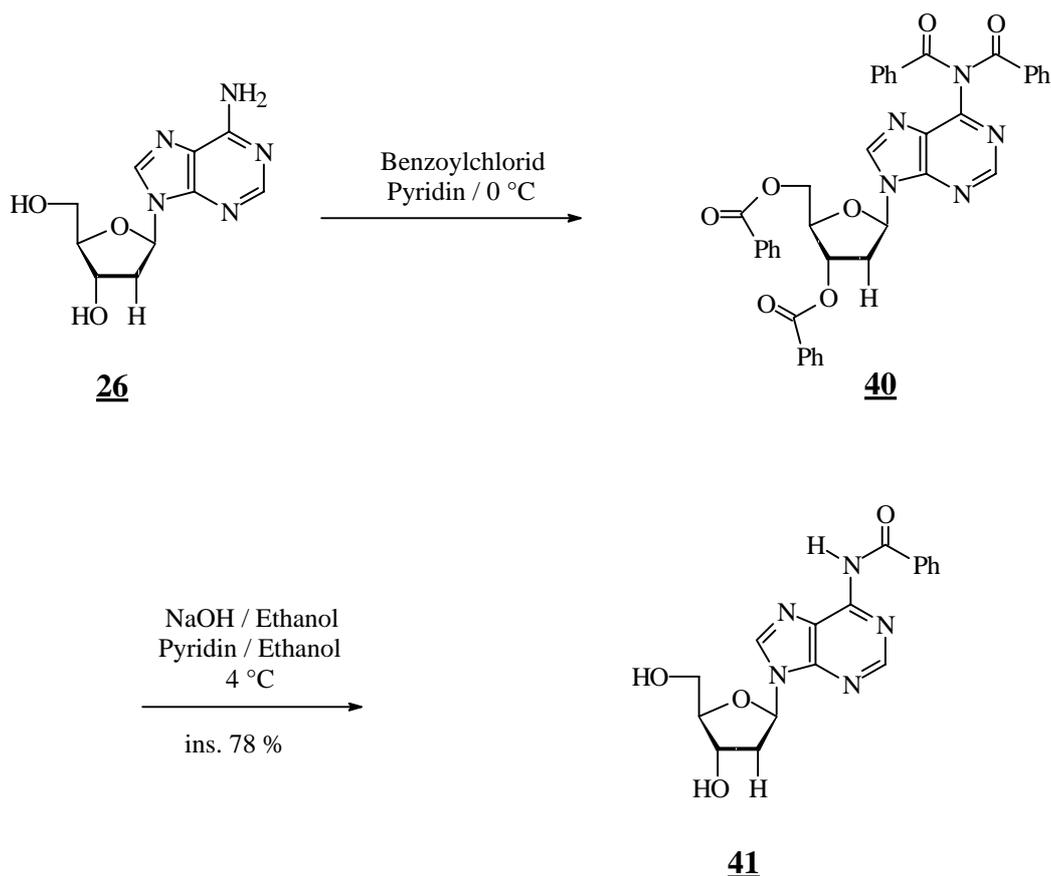
Zur Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **37** wurde 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32** in Pyridin mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid versetzt. Das Rohprodukt wurde dann weiter mit Trimethylchlorsilan umgesetzt, um alle reaktiven Gruppen zu schützen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Benzoylchlorid und die Entschützung der Hydroxylgruppen. Das N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **38** konnte in 10,3 %iger Ausbeute dargestellt werden. Eine Charakterisierung erfolgte massenspektrometrisch und mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie.

Die Umsetzung der 3'-Hydroxylfunktion mit Methoxyessigsäureanhydrid **35** und die Entfernung der Dimethoxytritylschutzgruppe konnten dünnenschichtchromatographisch verfolgt werden. Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde auf die Reinigung verzichtet.

Im Vergleich zum 2'-Desoxyadenosin **26** verlief die Einführung und die Entfernung der Schutzgruppen am 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32** nicht so erfolgreich. Während das N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin **34** in 67,2 %iger Ausbeute hergestellt werden konnte, gelang die Darstellung des N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosins **38** nur zu 10,3 %. Ein so geringer Umsatz vor Abspaltung der 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe war in Hinblick auf die im Syntheseplan noch folgenden Stufen und die Schwierigkeit, größere Mengen des Eduktes zu produzieren, nicht tragbar.

Abgesehen davon, daß sich die beiden 2'-Desoxynukleoside in ihrer Reaktivität unterschieden, war bei der Synthese mit dem modifizierten 2-Desoxynukleosid im kleineren Maßstab gearbeitet worden. Hier traten die Verluste bei der Aufarbeitung und durch Nebenreaktionen besonders zutage. Außerdem wurde bei der Benzoylierung der exozyklischen Aminofunktion nach dem Verfahren von Jones <sup>[126]</sup> am Probanden Adenosin gezeigt, daß Trimethylsilylchlorid wahrscheinlich nicht nur die Hydroxylfunktionen, sondern auch die Aminofunktion blockiert und zugesetztes Benzoylchlorid dieses nicht vollständig verdrängen konnte. Zusätzlich entstand bei dieser Reaktion trotz eines geringen Benzoylüberschusses auch zweifach benzoyliertes Produkt. Diese Benzoylierung zeigte die vielen möglichen Fehlerquellen bei der Darstellung eines N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-dimethoxy-2'-desoxynukleosids über den von Jones <sup>[126]</sup> vorgeschlagenen Weg auf. Eine weitere Fehlerquelle lag bei der der Benzoylierung vorgeschalteten Dimethoxytritylierung selbst. Dimethoxytritylchlorid schützt zwar selektiv primäre Hydroxylfunktionen, aber bei dem verwendeten Überschuß wäre sicherlich auch die Reaktion mit der primären exozyklischen Aminofunktion denkbar.

Die Ausbeuten bei der temporären Schützung nach Jones <sup>[126]</sup> waren unbefriedigend, daher wurde der alternative Reaktionsweg, bei dem all die eben erwähnten Fehlerquellen umgangen wurden, eingeschlagen. Die Perbenzoylierung mit anschließender selektiver Verseifung der Esterbindungen unter Erhalt der Amidbindung wurde an 2'-Desoxyadenosin **26** getestet <sup>[127, 128]</sup> (Abb. 30). Diese Vorgehensweise war schon auf der Stufe der Ribonukleoside an Adenosin und 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin **11** erfolgreich ausprobiert worden.

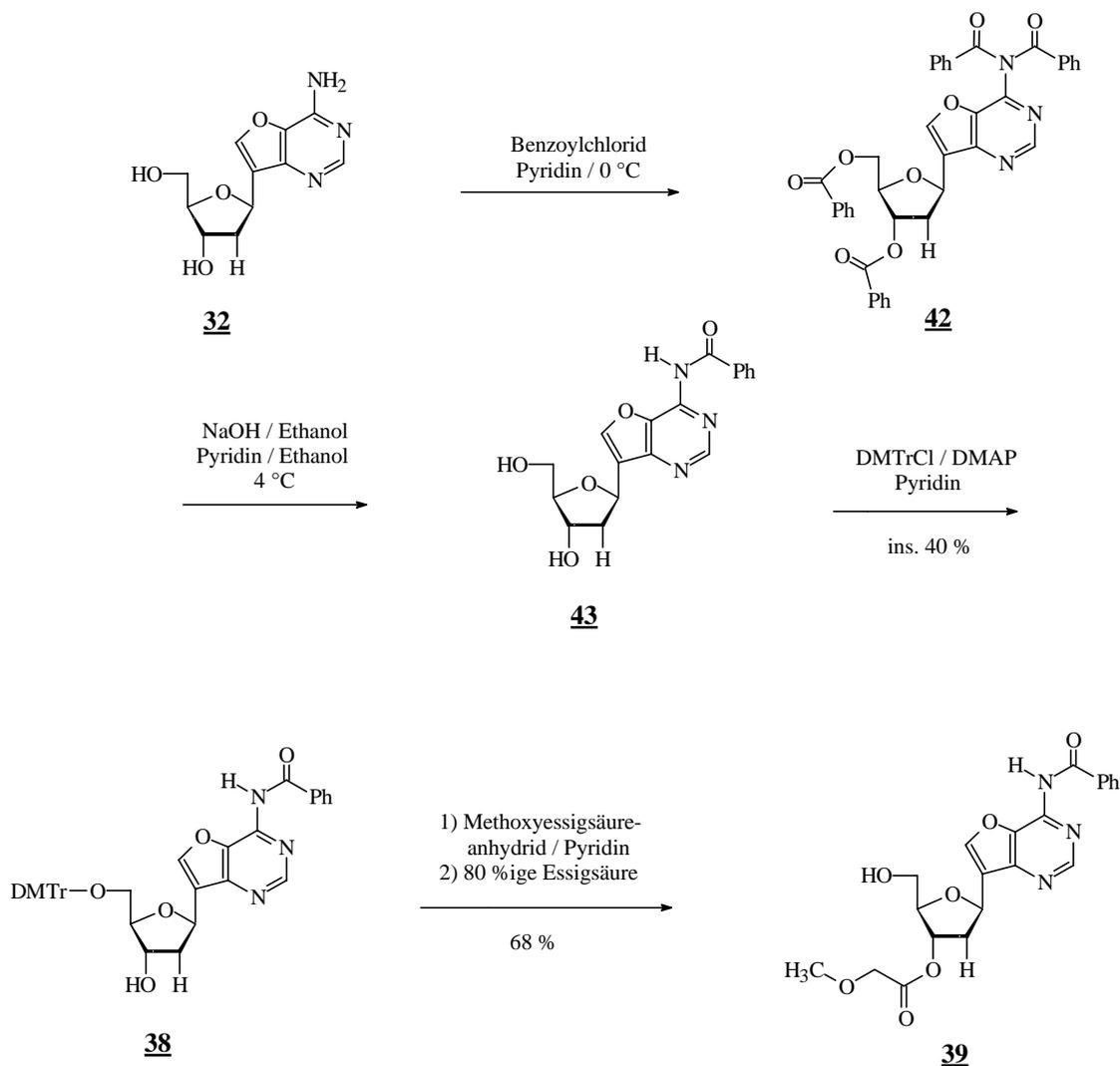


**Abbildung 30:** Protektion der exozyklischen Aminofunktion von 2'-Desoxyadenosin nach dem Verfahren der Peracylierung mit anschließender selektiver Verseifung

Zur Synthese von 3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Tetrabenzoyl-2'-desoxyadenosin **40** wurde 2'-Desoxyadenosin **26** unter Eiskühlung in Pyridin mit Benzoylchlorid versetzt. Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt ohne Reinigung weiter umgesetzt. Die Verseifung der Esterbindungen und der zweiten N-Acylgruppe wurde durch Zugabe von Natronlauge unter Eiskühlung erreicht. Das N<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-desoxyadenosin **41** konnte durch Kristallisation aus Ethanol in 77,8 %iger Ausbeute - bezogen auf das 2'-Desoxyadenosin **26** - erhalten werden.

Die Identifizierung erfolgte durch <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie und mit Hilfe von Massenspektrometrie.

Nachdem die Perbenzoylierung und Verseifung an 2'-Desoxyadenosin **26** erfolgreich getestet worden waren, wurde das Konzept<sup>[127, 128]</sup> - wie in Abbildung 31 dargestellt - auf 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32** übertragen.



**Abbildung 31:** Darstellung von N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **39**, wobei die exozyklische Aminofunktion nach dem Verfahren der Peracylierung mit anschließender selektiver Verseifung eingeführt wird

Dazu wurde das modifizierte 2'-Desoxynucleosid **32** in Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit einem Überschuß an frisch destilliertem Benzoylchlorid pro zu schützender Gruppe versetzt. Das nach der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt **42** wurde ohne Reinigung zur selektiven Verseifung mit Natronlauge unter Eiskühlung eingesetzt. Wie schon bei der Synthese des an der Aminofunktion geschützten Ribonucleosids kristallisierte das modifizierte Nucleosid wieder nicht aus. Daher wurde das N<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxo-adenosinrohprodukt **43** eingengt und an der Ölpumpe getrocknet. Die Charakterisierung erfolgte mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

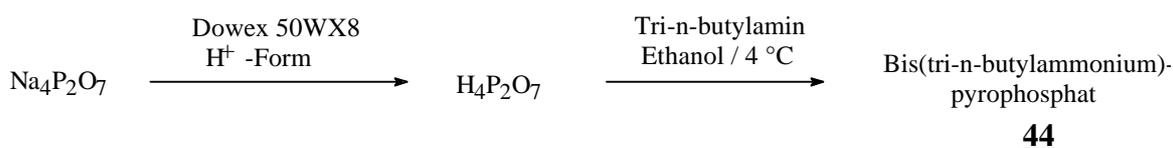
Das N<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosinrohprodukt **43** wurde nach längerem Trocknen an der Ölpumpe in Pyridin gelöst und mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid versetzt (Abb. 31). Die Darstellung von N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **38**, welches mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert wurde, gelang in knapp 40 %iger Ausbeute bezogen auf das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32**. Das Ergebnis des alternativen Reaktionsweges (Abb. 31) war damit viel besser als das des ersten Syntheseweges (10,3 % Ausbeute, Abb. 29).

Anschließend wurde die 3'-OH-Gruppe des N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosins **38** mit Methoxyessigsäureanhydrid **35** verestert und dann die 5'-OH-Gruppe mittels Essigsäure entschützt<sup>[97]</sup>. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **39** in 67,7 %iger Ausbeute erhalten und <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch charakterisiert.

Das so geschützte modifizierte 2'-Desoxynukleosid **39** konnte nun der Synthesestrategie folgend zur Triphosphatsynthese eingesetzt werden.

### 3.4 Triphosphatsynthese

Für die Darstellung von Triphosphaten wurde das Reagenz Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat **44** benötigt. Dieses wurde hergestellt, indem Tetranatriumdiphosphat-decahydrat, welches in Wasser gelöst worden war, über eine mit Ionenaustauscher in der H<sup>+</sup>-Form beladene Säule gegeben und das Eluat in einer tri-n-butylaminhaltigen Ethanollösung aufgefangen wurde.



**Abbildung 32**

Nach der Trocknung des Reagenzes **44** an der Ölpumpe wurde dieses in DMF aufgenommen und bei -20 °C unter Argon kurzfristig gelagert<sup>[130]</sup>.

Die Überführung von Nucleosiden und analogen Verbindungen in die entsprechenden 5'-Triphosphate ist heute eine gängige Prozedur.

Das ungeschützte 2'-Desoxynucleosid wird auch in der neueren Literatur meistens nach Yoshikawa<sup>[131]</sup> mit Phosphorylchlorid in Triethylphosphat bei tiefen Temperaturen in das Monophosphat umgewandelt. Dies wird dann nach Hoard und Ott<sup>[132]</sup> mittels Tri-n-butylammoniumpyrophosphat **44** zum 5'-Triphosphat umgesetzt. Die damals bei diesen Synthesen beschriebenen Ausbeuten von 70 - 100 % bei beiden Reaktionsschritten erschienen angesichts der vielen freien reaktiven Gruppen und der daher erwarteten großen Zahl an Nebenprodukten ziemlich hoch. Neuere Ergebnisse haben das Bild etwas relativiert. Bei der Überführung von 8,2-Thioanhydroadenosin in das 5'-Triphosphat erzielten Tusa und Reed<sup>[133]</sup> in Anlehnung an Yoshikawa<sup>[131]</sup> und Hoard/Ott<sup>[132]</sup> nur eine Ausbeute von 15 %. Sogenannte fette Nucleoside, die einen Siebenring anstelle des Sechsrings im Purinringsystem tragen, wurden von Bretner et al.<sup>[134]</sup> zu 17,5 % in das entsprechende 5'-Triphosphat überführt. Seela<sup>[63]</sup> gelang die Darstellung von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin-5'-O-triphosphat in 50 %iger Ausbeute. Insgesamt schwanken die Ausbeuten bei diesem Syntheseweg zwischen 8 und 50 %.

1985 wurde von Whitesides <sup>[135]</sup> eine Methode zur Synthese von 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat beschrieben. Hierbei wird das Monophosphat enzymatisch mit Hilfe von Adenylatkinase und dATP in das Triphosphat überführt. Dieser Ansatz kam für die Synthese des modifizierten Triphosphates nicht in Frage, da das synthetisierte Triphosphat in Hinblick auf eindeutige biochemische Experimente auf keinen Fall mit dATP verunreinigt sein durfte.

Nukleosidtriphosphate können außerdem hergestellt werden, indem das an der 5'-OH-Gruppe ungeschützte, ansonsten vollständig geschützte Nukleosid mit einem monofunktionalen Triphosphat zur Reaktion gebracht wird <sup>[136]</sup>.

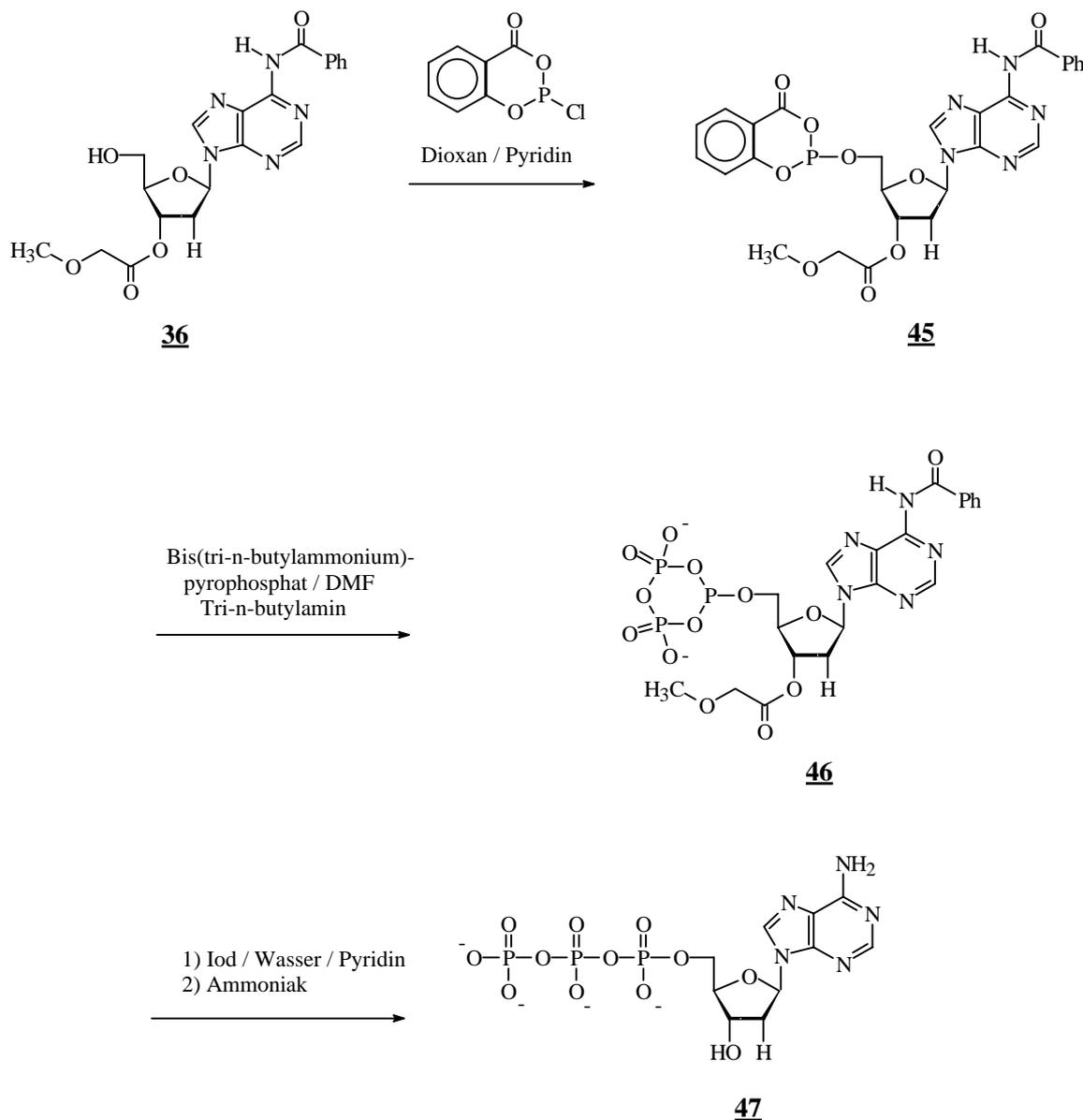
Ein weiterer oft verwandter Weg Triphosphate herzustellen, ist die 1989 von Ludwig und Eckstein veröffentlichte Methode über ein - bis auf an der 5'-Hydroxylgruppe - vollständig geschütztes 2'-Desoxynukleosid <sup>[137]</sup>. Dabei wird das 3'- und N-geschützte 2'-Desoxynukleosid mit 2-Chlor-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on <sup>[138]</sup> bei Raumtemperatur zum Monophosphit umgesetzt, welches dann in situ mit Tri-*n*-butylammoniumpyrophosphat **44** zum P<sup>2</sup>,P<sup>3</sup>-dioxo-P<sup>1</sup>-5'-nukleosidylcyclotriphosphit weiterreagiert. Anschließend wird das Phosphit zum Phosphat oxidiert. Für diese Triphosphatsynthese wurden von Eckstein und Ludwig Ausbeuten im Bereich von 60 - 75 % beschrieben, und die Darstellung von Thiotriphosphaten gelang sogar in Ausbeuten bis zu 86 % <sup>[139]</sup>. Dahingegen lagen die Ausbeuten bei den Synthesen von 5'-( $\alpha$ -P-Borano)triphosphaten nach dieser Methode nur zwischen 7 - 52 % <sup>[140]</sup>. Benner gelang 1999 die Herstellung eines C-nukleosidischen Triphosphates, des Pseudothymidins, in 14 %iger Ausbeute <sup>[141]</sup> und Trevisiol et al. <sup>[142]</sup> stellten nach der Methode von Ludwig und Eckstein an der exozyklischen Aminofunktion modifizierte 5'-Triphosphate in 25 %iger Ausbeute her.

Matulic-Adamic et al. <sup>[143]</sup> stellten fest, daß viele Triphosphate, deren Synthese mit POCl<sub>3</sub> und dem Pyrophosphatreagenz **44** nach Yoshikawa <sup>[131]</sup> und Hoard/Ott <sup>[132]</sup> nicht gelang, mit der Methode nach Ludwig und Eckstein <sup>[137]</sup> hergestellt werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Triphosphatsynthesen untersucht: Einmal nach Yoshikawa <sup>[131]</sup> und Hoard / Ott <sup>[132]</sup> ( Abb. 34) und dann der Syntheseweg nach Ludwig und Eckstein <sup>[137]</sup> (Abb. 33 und 35).

## 3.4.1 Triphosphatsynthese mit geschütztem 2'-Desoxyadenosin

Die Reaktionsbedingungen der Triphosphatsynthese nach Ludwig und Eckstein <sup>[137]</sup> wurden wieder an einem Probanden - dem N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxyadenosin **36** - ausgetestet.



**Abbildung 33:** Triphosphatsynthese am Probanden N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxyadenosin **36** nach der Methode von Ludwig und Eckstein

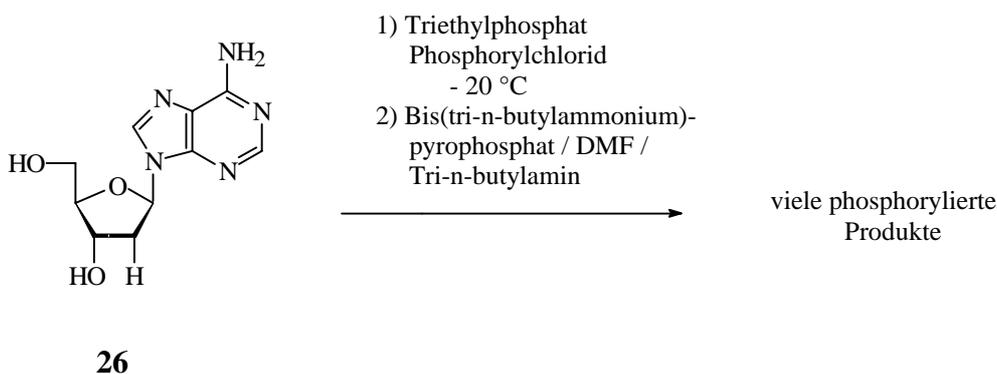
Zur Vorbereitung wurde das geschützte 2'-Desoxynukleosid **36** zuerst mit Pyridin an der Ölpumpe lyophilisiert und dann über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Für die Reaktion wurde das gut getrocknete Nukleosid in Pyridin/Dioxan gelöst und mit einem knapp 6 fachen Überschuß an 2-Chlor-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on versetzt. Dieses

Phosphorinreagenz ist zwar genauso wie Phosphorylchlorid in der Lage, drei nukleophile Substitutionen einzugehen, aber aufgrund der reaktiveren Phosphor-Chlor-Bindung gegenüber den Phosphor-Sauerstoff-Bindungen findet zuerst nur selektiv die Reaktion mit der 5'-OH-Gruppe zum bifunktionellen nukleosidischen Phosphit statt. Dank der insgesamt geringeren Reaktivität und der beiden unterschiedlichen Bindungstypen stellt das Phosphorinreagenz damit gegenüber dem Phosphorylchlorid eine Verbesserung zur Synthese von Monophosphaten dar. Im nächsten Schritt erfolgte die schnelle Zugabe einer Lösung aus dem Pyrophosphatreagenz **44** und Tri-n-butylamin. Das bifunktionelle nukleosidische Phosphit reagierte dann in zwei nukleophilen Substitutionsreaktionen mit dem Pyrophosphat zum P<sup>2</sup>,P<sup>3</sup>-Dioxo-P<sup>1</sup>-5'-nukleosidylcyclotriphosphit. Anschließend wurde das Phosphit mit Jod zum Phosphat oxidiert und im folgenden der Jodüberschuß mit Natriumhydrogensulfit zerstört. Nachdem die Lösung zur Trockne eingeeengt und der zyklische Phosphatring durch Rühren in Wasser zum Triphosphat geöffnet worden war, wurde die exozyklische Aminofunktion freigesetzt, und das triphosphathaltige Rohprodukt **47** wurde durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel mittels TEAB-Puffer gereinigt. Die vollständige Entschützung der Aminofunktion gelang erst nach der Ionenaustauschchromatographie durch mehrstündiges Rühren der Lösung mit Ammoniak bei 60 °C. Eine Behandlung des Rohproduktes mit Ammoniak bei Raumtemperatur führte nur zu einer teilweisen Abspaltung der Schutzgruppe, wie sowohl dünnschichtchromatographisch als auch bei der UV-Detektion der Aufreinigung nachgewiesen werden konnte.

Zur Überprüfung der Synthese wurde das erhaltene 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat **47** dünnschichtchromatographisch in einem Laufmittelgemisch aus Isopropanol/Wasser/ Ammoniak (3:1:1) mit gekauftem 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat verglichen und zusätzlich in einer PCR anstelle des gekauften Triphosphates eingesetzt. Da die PCR mit dem selbst hergestellten Triphosphat einwandfrei funktionierte und das Laufverhalten des selbst synthetisierten Triphosphates **47** dem des gekauften 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphates entsprach, wurde die Umsetzung als erfolgreich betrachtet. Außerdem erfolgte die Charakterisierung mittels <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR- und <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie.

### 3.4.2 Triphosphatsynthese mit ungeschütztem 2'-Desoxyadenosin

Die Einführung der vielen Schutzgruppen für die oben beschriebene Synthese war recht zeitaufwendig und durch die vielen Schritte ging auch Produkt verloren. Daher wurde versucht, das 5'-Triphosphat an ungeschütztem 2'-Desoxyadenosin **26** einzuführen<sup>[131, 132]</sup>.



**Abbildung 34:** Triphosphatsynthese nach Yoshikawa und Hoard/Ott am Probanden 2'-Desoxyadenosin

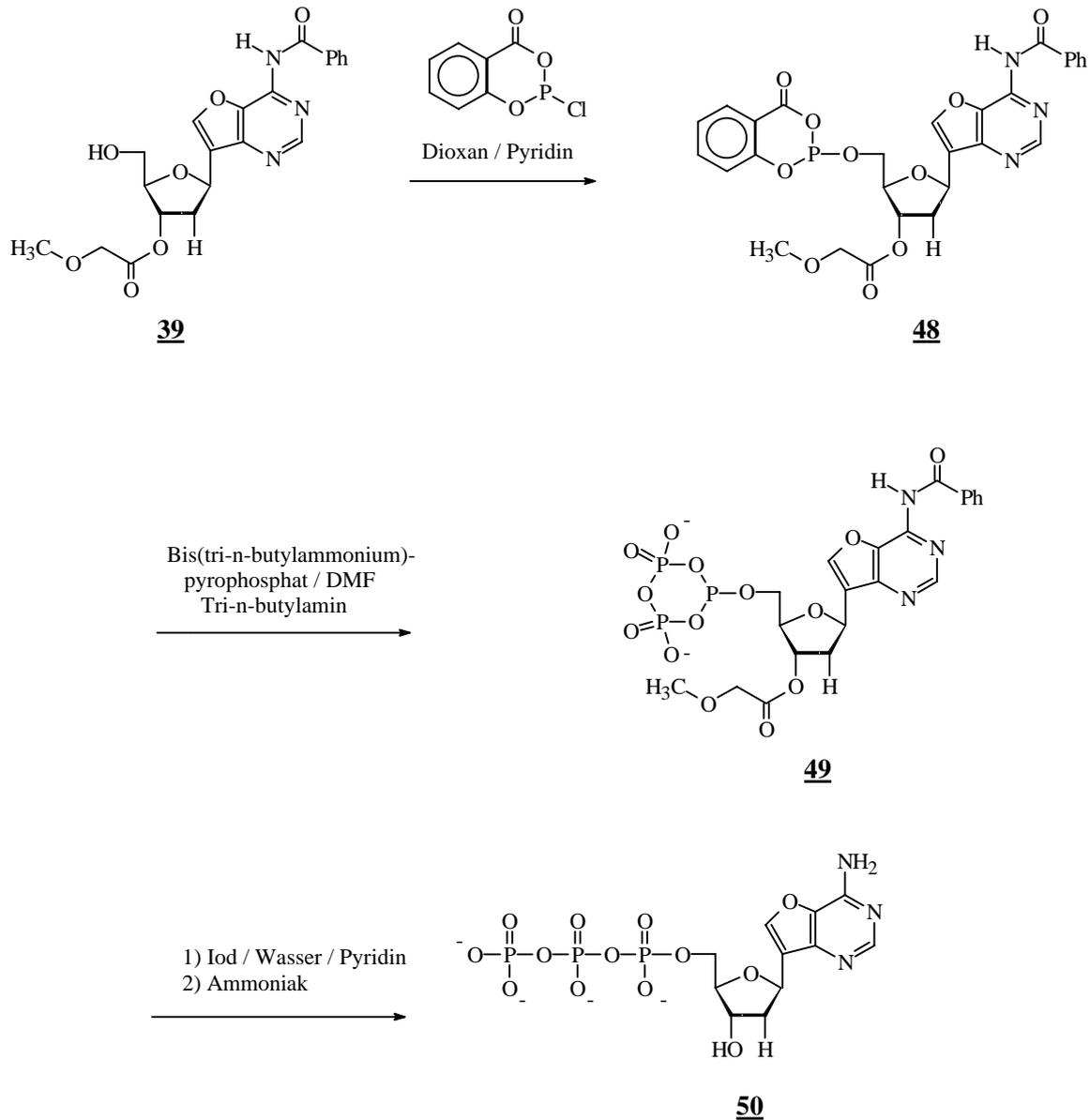
Hierzu wurde durch Lyophilisation und über Phosphorpentoxid getrocknetes 2'-Desoxyadenosin **26** in Triethylphosphat gelöst und bei - 20 °C mit einem 1,6 fachen Überschuß an Phosphorylchlorid versetzt. Anschließend wurden zu der Mixtur das schon oben beschriebene Pyrophosphatreagens **44** , Tributylamin und wenig später etwas TEAB-Puffer hinzugefügt.

Eine dünnschichtchromatographische Kontrolle der Reaktion zeigte sehr viele Produkte an. Bei der trotzdem durchgeführten Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel mit TEAB-Puffer konnte kein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat **47** isoliert werden.

Ein Vergleich der beiden Triphosphatsynthesen zeigt, daß ohne die aufwendige Schutzgruppeneinführung keine geordnete Triphosphatsynthese möglich war.

### 3.4.3 Triphosphatsynthese mit dem geschützten 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin

Die erfolgreich an 2'-Desoxyadenosin getestete Triphosphatsynthese nach Ludwig und Eckstein<sup>[137]</sup> wurde nun auf das geschützte, modifizierte 2'-Desoxynukleosid **39** übertragen.



**Abbildung 35:** Triphosphatsynthese mit N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **39** nach der Methode von Ludwig und Eckstein

Nach ausführlicher Trocknung wurde das N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **39** in Pyridin/Dioxan gelöst und 2-Chlor-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung mit dem Pyrophosphatreagenz **44** und Tributylamin versetzt. Zur Oxidation wurde eine Jodlösung zugegeben und der

Überschuß durch langsames Zutropfen von Natriumsulfit zerstört. Nachdem die Lösung zur Trockne eingedunstet worden war, wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und bei Raumtemperatur gerührt, um den Phosphatring zum Triphosphat zu öffnen. Abschließend wurde dann die Aminofunktion durch fünfstündiges Rühren mit Ammoniak bei 60 °C entfernt. Das Rohprodukt **50** wurde wieder mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel gereinigt. Die Überprüfung der Trennung erfolgte mittels UV-Detektion und mittels dünnschichtchromatographischen Vergleichs mit 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat in einem Laufmittelgemisch aus Isopropanol/Wasser/Ammoniak (3:1:1).

Auch der Erfolg dieser Triphosphatsynthese wurde mit einer PCR mit dem 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** (dA<sup>\*</sup>TP) bestätigt. Außerdem wurde das modifizierte Triphosphat **50** durch <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR- und <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie charakterisiert.

## 4 Biochemie und Massenspektrometrie

### 4.1 Voraussetzungen

Ein Nukleosidtriphosphatanalogon, welches in enzymatischen Reaktionen Einsatz finden soll, muß folgende Bedingungen erfüllen:

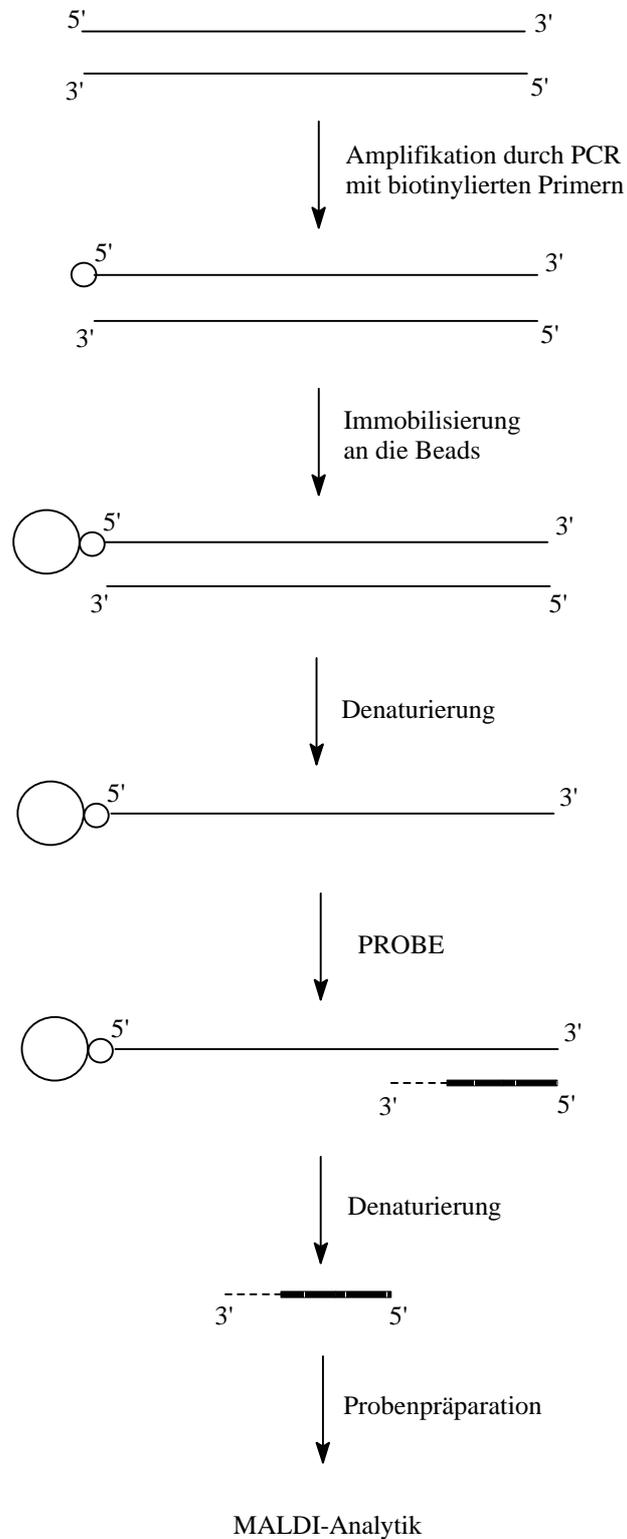
- Die Basenpaarungen nach Watson und Cricks müssen bei den iterativen Zyklen des Informationstransfers erhalten bleiben.
- Das modifizierte Nukleosidtriphosphat muß Substrat für mindestens eine DNA-Polymerase sein.
- Die Modifikation muß das natürliche Nukleotid in jeder Position der vorgegebenen Sequenz spezifisch ersetzen können.
- Einzelsträngige DNA, welche die Modifikation enthält, muß als Template in einer Polymerasekettenreaktion fungieren können.

In den nun folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die oben beschriebenen Ansprüche vom modifizierten Nukleosidtriphosphat 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxo-adenosin-5'-O-triphosphat **50** (dA\*TP) erfüllt werden.

### 4.2 PROBE-Reaktion

Das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat wurde, um die Inkorporation in einen DNA-Strang mittels MALDI-TOF und so die Möglichkeit einer Verwendung in enzymatischen Reaktionen nachweisen zu können, exemplarisch in eine Primeroligo-Basenverlängerungsreaktion (**Primer Oligo Base Extension (PROBE)**)<sup>[144,145]</sup> eingesetzt. Die PROBE-Reaktion hat sich bei der Verwendung von MALDI-TOF-MS zur Analytik als geeignetes Verfahren zur Detektion von Mutationen<sup>[146-149]</sup> etabliert. Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung<sup>[9,150,151]</sup>, bei welcher ein statistischer Abbruch der Kettenverlängerungsreaktion durch den Zusatz eines Didesoxynukleosidtriphosphates<sup>[152]</sup> erreicht werden soll, wird bei der PROBE-Reaktion ein Desoxynukleosidtriphosphat vollständig durch das entsprechende Didesoxynukleosidtriphosphat substituiert. Dieses Didesoxynukleosidtriphosphat wirkt in beiden Reaktionen als Terminator. So führt der

Austausch des Desoxynukleosidtriphosphates gegen einen Terminator bei der PROBE-Reaktion zur kontrollierten Unterbrechung der enzymatischen Elongation eines an ein Template hybridisierten Primers.



**Abbildung 36 :** Schematische Übersicht der vorbereitenden Schritte und der PROBE-Reaktion selbst.

Durch Verwendung eines biotinylierten Primers in der PCR konnte das Amplifikationsprodukt über das Streptavidin-Biotin-System <sup>[153,154]</sup> aufgereinigt werden. Das Prinzip dieses Aufreinigungssystems besteht darin, daß Biotin eine sehr große Affinität zu Streptavidin, einem bakteriellen Protein, besitzt, obwohl der gebildete, reversible Streptavidin-Biotin-Komplex nur durch nicht-kovalente Bindungen stabilisiert ist.

Wenn Streptavidin selbst zusätzlich an Kunststoffoberflächen, welche einen magnetischen Kern umschließen, immobilisiert wird, dann besitzt man ein effektives und einfach anwendbares System zur Isolierung und Reinigung von DNA aus biochemischen Reaktionsansätzen <sup>[155,156]</sup>.

Die Aufreinigung und Konditionierung der Reaktionsprodukte hat einen entscheidenden Einfluß auf die Sensitivität und Massengenauigkeit, mit der DNA-Fragmente in der MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert werden. Die Bestandteile der Reaktionspuffer, welche in molekularbiologischen Reaktionen, wie zum Beispiel einer PCR, eingesetzt werden, haben in der MALDI-TOF-MS einen störenden Effekt. Shaler et al. konnten zum Beispiel zeigen, daß bei Magnesiumsalzen die tolerierbare Verunreinigungsgrenze bei  $10^{-4}$  mol/l, bei Kalium oder Natriumsalzen bei  $10^{-2}$  mol/l und bei Ammoniumsalzen bei 0,25 mol/l lag <sup>[157]</sup>.

Die biotinylierten, über den Biotin-Streptavidin-Komplex an die feste Phase gebundenen, über PCR amplifizierten DNA Doppelstränge konnten so mit Hilfe eines Magneten von der Reaktionslösung separiert und gereinigt werden. Anschließend wurde durch Denaturierung des Doppelstranges der Templatestrang freigesetzt und an den Beads die PROBE-Reaktion durchgeführt. Dabei wurde bei allen in dieser Arbeit durchgeführten PROBE-Reaktionen die thermostabile DNA-Polymerase *ThermoSequenase* verwendet. Der verlängerte Primer wurde durch Denaturierung von den Beads abgespalten und mittels MALDI-TOF vermessen.

Zur Freisetzung von biotinylierten Nukleinsäuren hatte sich ein Verfahren etabliert, bei welchem der Biotin-Streptavidin-Komplex mit Phenol, Harnstoff und Formamid behandelt wurde <sup>[158]</sup>. Diese Methode hatte jedoch den Nachteil, daß die verwendeten Reagenzien den Kristallisationsvorgang, welcher einen entscheidenden Schritt bei der MALDI-TOF Analyse darstellt, extrem negativ beeinflussten.

Als vorteilhaft erwies sich dagegen, die Freisetzung der zu untersuchenden DNA durch Einwirkung von Ammoniak zu erwirken <sup>[159,160]</sup>. Dabei werden störende Kationen durch das für die MALDI-TOF Analyse günstigere „flüchtige“ Ammoniumion substituiert <sup>[161]</sup> und so auch noch die Kationenheterogenität minimiert, ohne daß ein zusätzlicher Schritt zum Ionenaustausch nötig ist. Eine Behandlung des Biotin-Streptavidin-Komplexes mit 2 mol/l Ammoniak bei 80 °C bewirkt eine Destabilisierung des Komplexes, welche zur Resolubilisierung des biotinylierten Stranges führt.

Außerdem können doppelsträngige DNA-Fragmente, die über den Biotin-Streptavidin-Komplex an die feste Phase gebundenen worden sind, mit konzentriertem Ammoniak bei Raumtemperatur oder mit 50 mM Ammoniak bei 60 °C denaturiert werden, ohne den Biotin-Streptavidin-Komplex zu destabilisieren. Auf diese Weise kann selektiv der nicht biotinylierte Strang für weitere MALDI-TOF Untersuchungen freigesetzt werden.

Zur Durchführung einer PROBE-Reaktion wurde das über das Streptavidin-Biotin-System immobilisierte PCR-Produkt denaturiert. Der an die Beads gebundene, leicht zu reinigende Einzelstrang diente dann als Template für die PROBE-Reaktion. Nach der PROBE-Reaktion wurde durch Einwirkung von Ammoniak selektiv der nicht biotinylierte Strang zur Analyse freigesetzt.

#### 4.2.1 PROBE-Reaktion mit einer Rohlösung des modifizierten Triphosphates

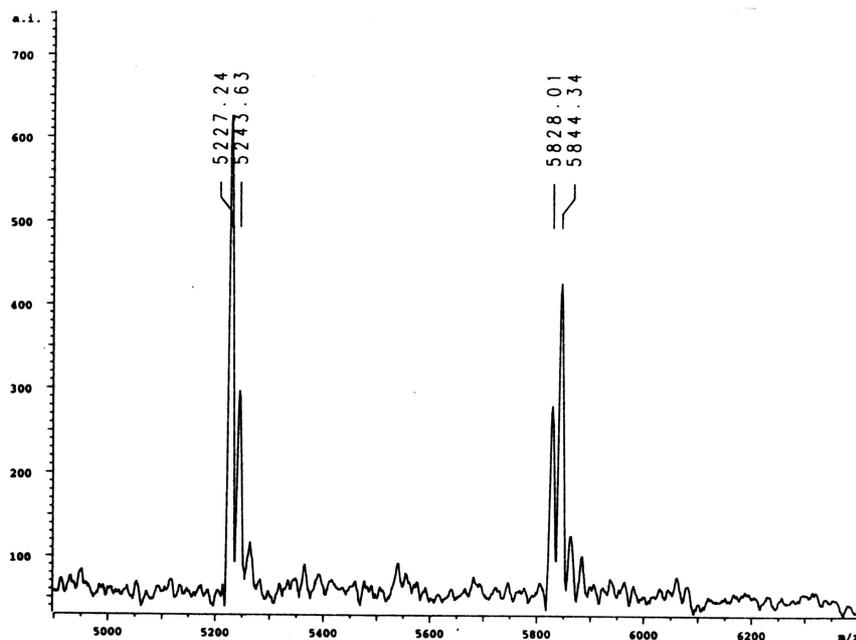
Zuerst wurde getestet, ob auch schon die unaufgereinigte Triphosphatlösung in diese enzymatische Reaktion eingesetzt werden konnte oder ob das Monophosphat und die während der Triphosphatsynthese verwendeten Reagenzien störend wirkten.

Während der Triphosphatsynthese wurde zur Reaktionslösung Sulfid getropft. Dieses Reagenz störte - wie in Vorversuchen festgestellt worden war - die enzymatischen Reaktionen. Daher wurde der Triphosphatrohlösung BSA (*bovine serum albumin* (Rinderserumalbumin) zugesetzt, um das Sulfid zu binden. Dazu wurde in einer Versuchsreihe die unaufgereinigte Triphosphatlösung mit BSA vorinkubiert und in einer zweiten Versuchsreihe die PROBE-Reaktion in Anwesenheit von BSA durchgeführt.

Bei der hier untersuchten PROBE-Reaktion wurde ein 16mer mit einer Masse von 4914 Da als Primer verwendet werden. Dieser Primer sollte am heterozygoten Template mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase *ThermoSequenase* um ein Adenosin oder Guanosin, ein Adenosin und das Didesoxythymidin verlängert werden .

PROBE-Primer:                    5'-CATGAATGCAACCGAG                    4914 Da  
erwartetes Produkt:            5'-CATGAATGCAACCGAGG/AAddT        5844 / 5828 Da  
Template für die PROBE: ...3'-GAGTACTTACGTTGGCTCC/TTA-5'...

Die Masse des erwarteten Terminationsproduktes betrug 5828 (A) bzw. 5844 (G) Da. Bei der Positivkontrolle, die mit dem natürlichen, gekauften dATP durchgeführt wurde, war im Massenspektrum der Primer nicht mehr zu erkennen, und das Hauptprodukt stellte das erwartete Terminationsprodukt dar. Als Nebenprodukt war im Massenspektrum der um ein Nukleotid verlängerte Primer in sehr geringem Anteil zu sehen. Auch bei der Verwendung des selbst synthetisierten dATPs wurde bei beiden Methoden der Sulfidbindung in etwa das gleiche Ergebnis erzielt wie beim gekauften dATP. Im Vergleich dazu trat beim Einsatz der unaufgereinigten, mit BSA behandelten Lösung des modifizierten Triphosphates hauptsächlich der nur um ein Nukleotid verlängerte Primer im Massenspektrum auf.

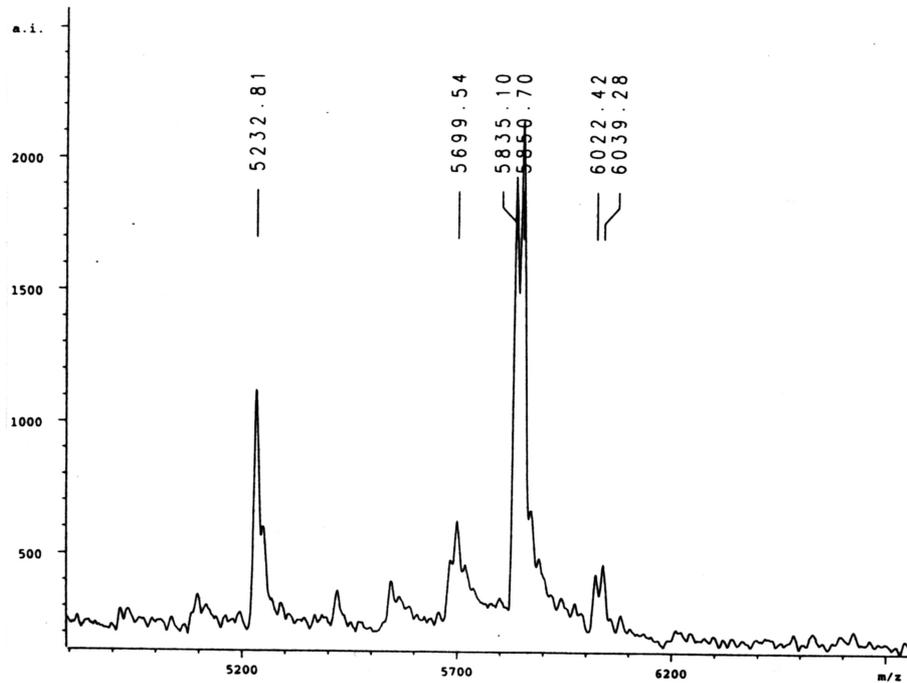


**Abbildung 37** : MALDI-TOF-Massenspektrum der PROBE-Reaktion unter Verwendung des unaufgereinigten modifizierten Triphosphates. Das Signal bei 5227 Da repräsentiert den um ein A, das Signal bei 5243 Da den um ein G verlängerten Primer. Weiterhin sind die erwarteten Terminationsprodukte mit einer Masse von 5828 Da bei einer Verlängerung um AAddT und 5844 Da bei einer Verlängerung um GAddT zu sehen.

Um auszuschließen, daß das modifizierte Nucleosidtriphosphat als eine Art Terminator wirkt, mußte die Triphosphatrolösung gereinigt und das Experiment mit der gereinigten Lösung wiederholt werden.

#### 4.2.2 PROBE-Reaktion mit gereinigter Triphosphatlösung

Die gleiche Reaktion - wie oben beschrieben - wurde mit dem gereinigten Triphosphat durchgeführt. Hierbei wurde die Inkorporation des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates mit der des natürlichen dATPs und des  $c^7$ dATPs verglichen. Im Gegensatz zum obigen Ergebnis wiesen die Massenspektren dieses Mal keine signifikanten Unterschiede auf, denn bei allen drei untersuchten Proben stellte das erwartete Terminationsprodukt das Hauptprodukt dar. Das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat stellte also keineswegs einen Terminator dar, sondern konnte gut eingebaut werden. Daraus folgt, daß die Ergebnisse des ersten Experimentes im wesentlichen durch Verunreinigungen des Rohproduktes verursacht worden waren.



**Abbildung 38** : MALDI-TOF-Massenspektrum der PROBE-Reaktion unter Verwendung des gereinigten modifizierten Triphosphates. Dieses Mal stellt der um nur ein Nukleotid verlängerte Primer (Masse 5232 Da) das Nebenprodukt dar, und das Hauptprodukt ist der um A oder G, A und ddT verlängerte Primer (Masse 5835 bei AAddT und 5850 bei GAddT).

Im folgenden wurde in anderen PROBE-Reaktionen die Inkorporation des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates weiter untersucht.

### 4.2.3 PROBE-Reaktionen mit verschiedenen Primer/Template-Systemen

Im oben beschriebenen PROBE-Experiment wurde der eingesetzte Primer um zwei Nukleotide (AA oder GA) und Didesoxythymidin verlängert. In den nun folgenden Experimenten sollten obige Ergebnisse bestätigt werden und außerdem mehr als zwei Nukleotide inkorporiert werden.

Für das erste PROBE-Experiment wurde ein Abschnitt des Methylentetrahydrofolat-reduktasegens amplifiziert, an Dynabeads immobilisiert, der Doppelstrang denaturiert und anschließend als Template in die PROBE-Reaktion eingesetzt. Dieser Versuch diente der Bestätigung der obigen Resultate, denn der eingesetzte Primer sollte in diesem Fall nur um ein Nukleotid (G oder A) sowie das Didesoxycytidin verlängert werden.

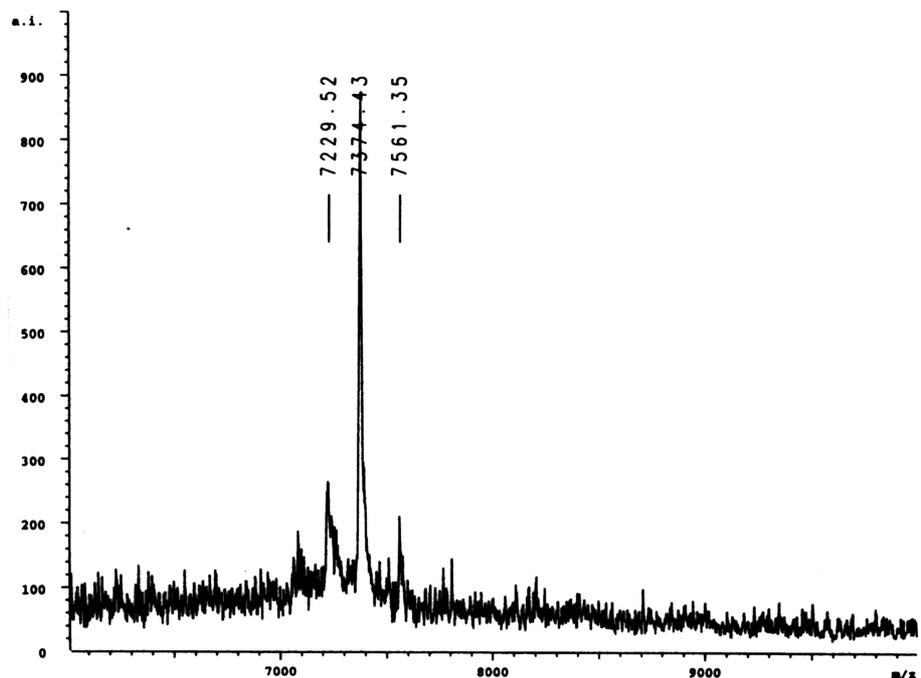
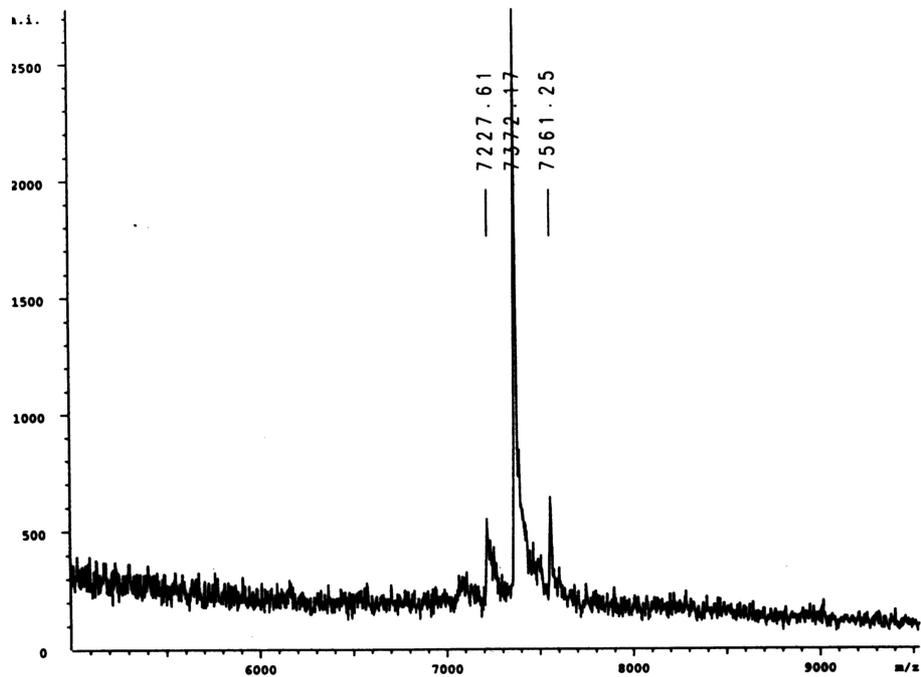
PROBE-Primer:                    5'-GCTGCGTGATGATGAAATCG                    6181 Da  
 erwartetes Produkt:            5'-GCTGCGTGATGATGAAATCGG/*AddC* 6799 (G) Da  
 Template für die PROBE: ...3'-TTTTCGACGCACTACTACTTTAGCC/TG-5'...

Diese Verlängerung um ein Nukleotid funktionierte bei dieser - wieder heterozygoten - Probe sowohl mit dem  $c^7$ dATP als auch mit dem 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat genauso gut wie mit dem natürlichen dATP.

Für das zweite PROBE-Experiment zur Ergebnisbestätigung wurde ein Abschnitt des Lipoprotein-Lipasegens, wie in der ersten PROBE-Reaktion beschrieben, als Template für die PROBE-Reaktion vorbereitet. Der Primer (Masse 6767 Da) sollte wieder nur um ein Nukleotid (A) und Didesoxythymidin, dieses Mal aber an einer homozygoten Probe, verlängert werden.

PROBE-Primer:                    5'-AACAATCTGGGCTATGAGATCA                    6767 Da  
 erwartetes Produkt:            5'-AACAATCTGGGCTATGAGATCA *AddT* 7384 Da  
 Template für die PROBE: ...3'-CGTTGTTAGACCCGATACTCTAGTTA-5'...

Auch bei diesem Experiment wurde die erwartete Masse sowohl mit dATP als auch mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat und  $c^7$ dATP erzielt.



**Abbildung 39:** MALDI-TOF-Massenspektrum der zweiten PROBE-Reaktion (Lipoprotein-Lipase-Genabschnitt) unter Einsatz von dATP als Positivkontrolle (oben) und von dA\*TP (unten). Das Signal bei 7227 Da entsteht durch Depurinierung und die Masse 7561 Da wird durch Citrataddition gebildet. Das Hauptprodukt mit einer Masse von 7372 bzw. 7374 Da repräsentiert den um dA bzw. dA\* und ddT verlängerten Primer.

Die Inkorporation eines 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates konnte damit per MALDI bestätigt werden.

Im dritten PROBE-Experiment wurde ein Abschnitt des Prothrombingens als Template für die PROBE-Reaktion vorbereitet. Dieses Mal sollte der Primer innerhalb der PROBE-Reaktion um drei Nukleotide (homozygot, GAG) und Didesoxycytidin verlängert werden.

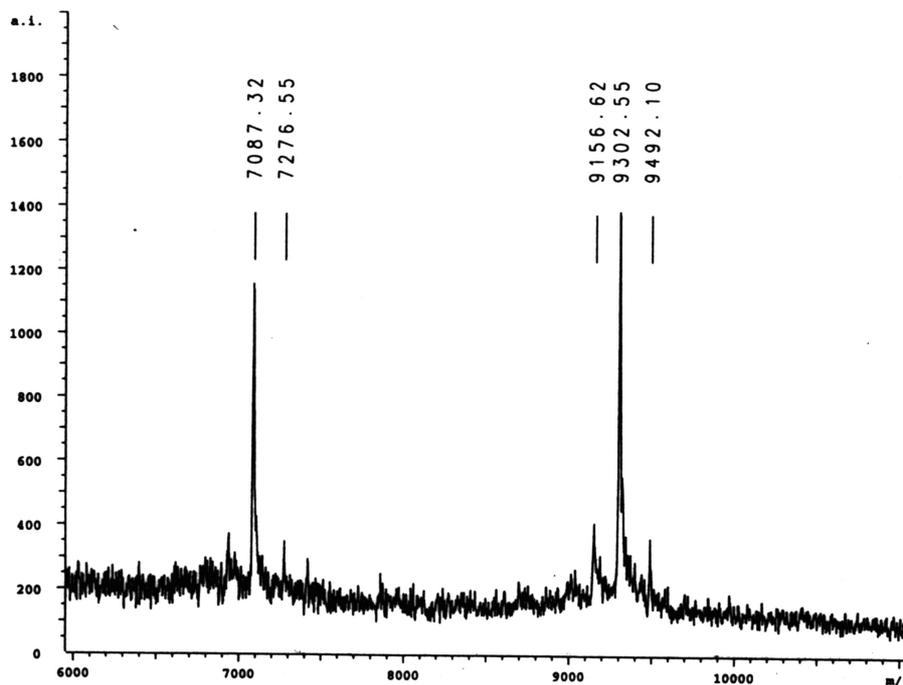
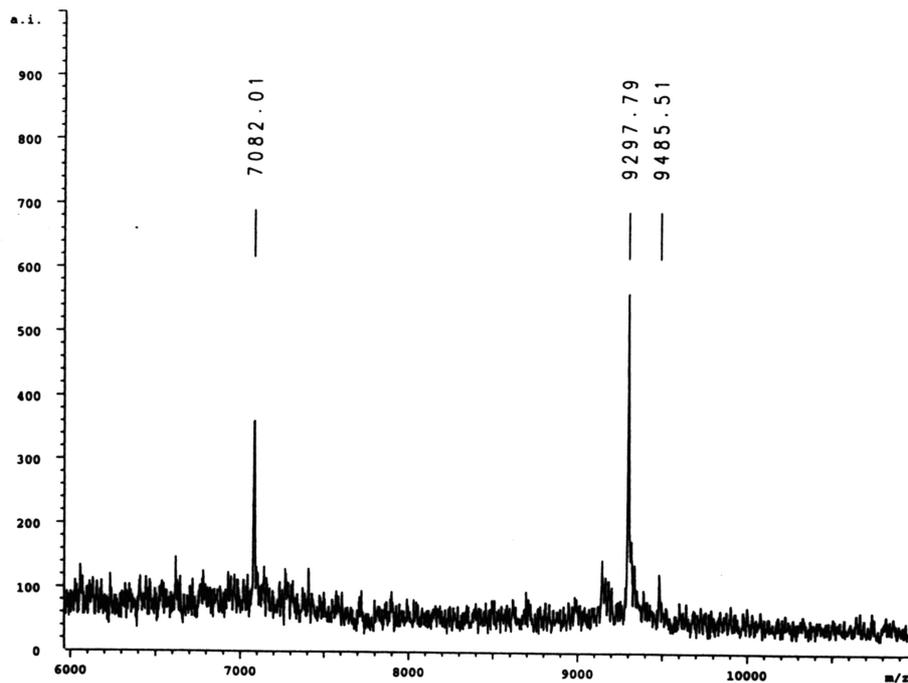
PROBE-Primer:            5'-TTCCCAATAAAAGTGACTCTCAGC            7280 Da  
erwartetes Produkt        5'-TTCCCAATAAAAGTGACTCTCAGC **GAGddC**    8540 Da  
PROBE-Template:    ...3'-CCAAGGGTTATTTTCACTGAGAGTCGCTCG-5' ...

Auch hier konnte die erwartete Masse bei den beiden Modifikationen und dem natürlichen dATP erzielt werden. In Gegensatz zu den obigen Experimenten konnte hier bei Verwendung des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates jedoch noch nicht umgesetzter Primer und um ein Nukleotid verlängerter Primer nachgewiesen werden. Die PROBE-Reaktion lief in diesen Fall mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat nicht ganz so vollständig wie mit dATP ab.

Bei dem letzten PROBE-Experiment wurde ein Abschnitt des Faktor V Gens als Template für die PROBE-Reaktion vorbereitet. Diesmal wurde der Primer gleich um sechs Nukleotide und Didesoxythymidin verlängert. Dabei waren vier der sechs einzubauenden Nukleotide Adenosine, wobei zweimal zwei nebeneinander lagen (AAGGAA).

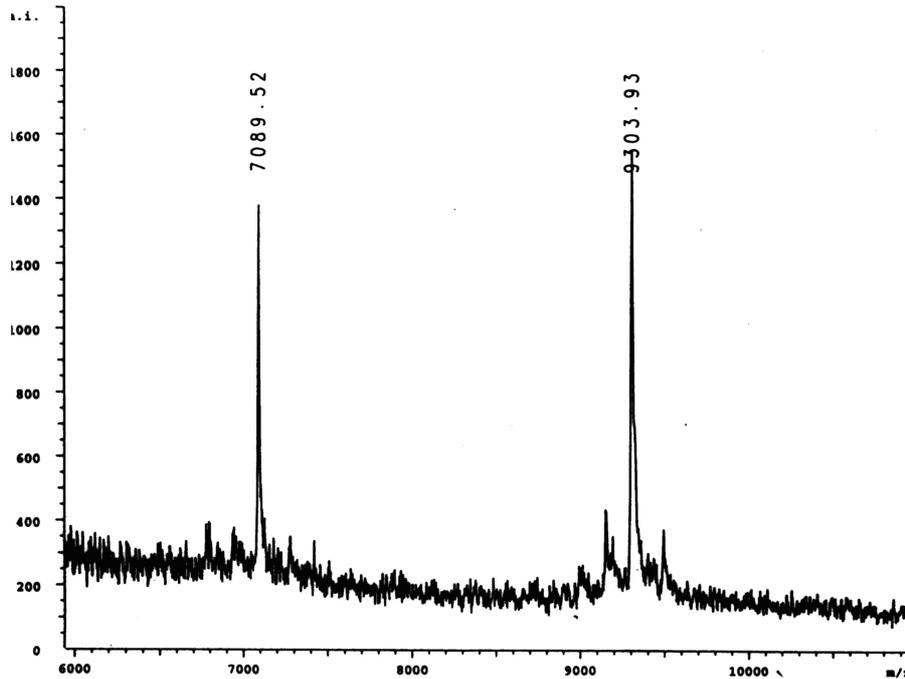
PROBE-Primer:            5'-TAAGAGCAGATCCCTGGACAGGC            7082 Da  
erwartetes Produkt:        5'-TAAGAGCAGATCCCTGGACAGGC **AAGGAAAddT** 9296 Da  
PROBE-Template: ...3'-ACATTCTCGTCTAGGGACCTGTCCGTTCCTTA-5' ...

Anschließend wurde wieder die Inkorporation von dATP mit der von  $c^7$ dATP und von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat verglichen. Mit allen drei Triphosphaten konnte die erwartete Masse erzielt werden, aber bei allen konnte auch noch unverlängerter Primer per MALDI nachgewiesen werden.



**Abbildung 40** : MALDI-TOF-Massenspektrum der vierten PROBE-Reaktion (Faktor V-Genabschnitt)

Oben: Positivkontrolle unter Verwendung von dATP. Unten: Reaktion unter Einsatz von dA\*TP. Der unumgesetzte Primer wird durch das Signal von 7082 Da repräsentiert und das Hauptprodukt (Masse 9297 bzw. 9302 Da) wird von dem Depurinierungssignal und dem Signal für die Citrataddition eingerahmt.



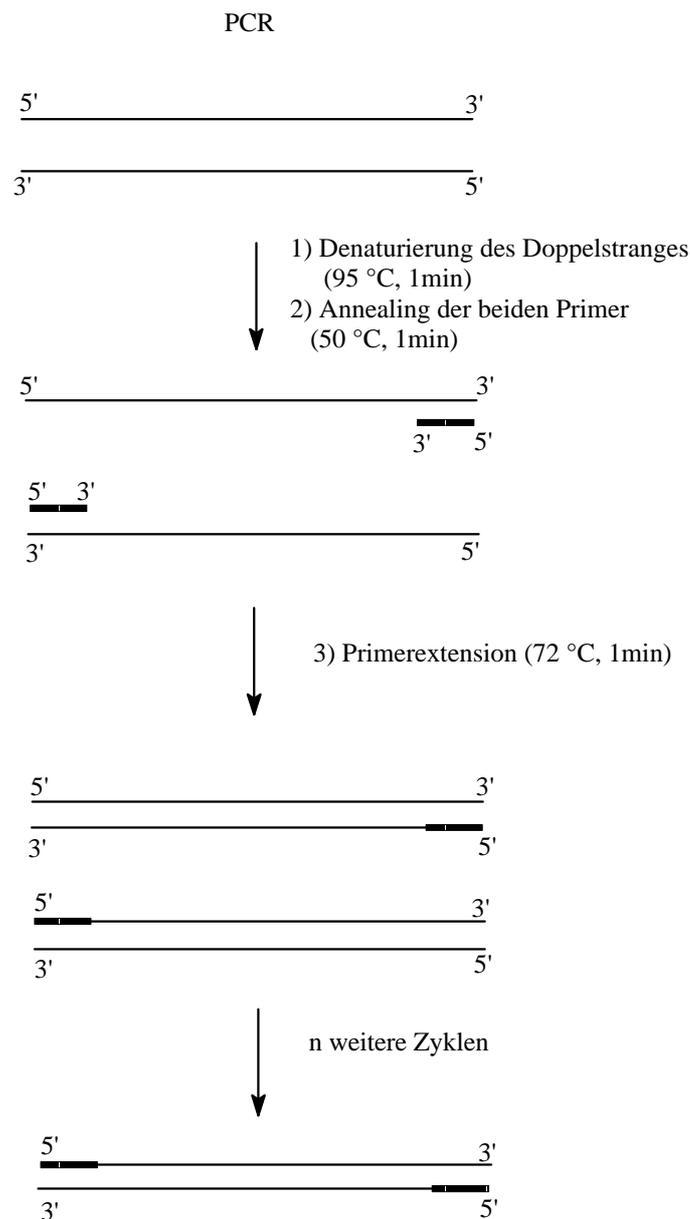
**Abbildung 41** : Massenspektrum der vierten PROBE-Reaktion (Faktor V-Genabschnitt) unter Verwendung von  $c^7$ dATP. Wie schon bei der Positivkontrolle zu beobachten war, wurde der Primer (Masse 7089 Da) nicht vollständig elongiert. Das um dAdAdGdGdAdAddT verlängerte Produkt (Masse 9303 Da) ist wieder von dem Signal, welches durch Depurinierung hervorgerufen wird und dem Signal, welches durch Citrataddition gebildet wird, eingerahmt.

Insgesamt wurde mit diesen PROBE-Reaktionen - wie schon oben erwähnt - die Inkorporation des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates eindeutig bewiesen. Zusätzlich zeigte das letzte PROBE-Experiment, daß nicht nur ein, sondern gleich mehrere modifizierte Nukleotide nebeneinander eingebaut werden konnten.

## 4.3 Enzymatische Darstellung modifizierter DNA-Fragmente

### 4.3.1 Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) <sup>[162-164]</sup> erlaubt, beliebige DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Restriktionsendonukleasen, Vektoren und Wirtszellen d.h. in vitro zu amplifizieren.



**Abbildung 42 :** Schematische Darstellung des Ablaufes der Polymerasekettenreaktion

Neben einem DNA-Fragment als Matrize (Template) werden hierzu nur eine spezielle, hitzebeständige DNA-Polymerase <sup>[165]</sup> sowie die vier Desoxynukleosidtriphosphate und zwei Oligonukleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes hybridisieren, benötigt.

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang im ersten Schritt eines PCR-Zyklus durch Hitze-denaturierung in zwei einzelsträngige Matrizen zerlegt. Diese Einzelstränge dienen der thermostabilen DNA-Polymerase als Vorlage für die Synthese eines neuen komplementären Stranges. Die DNA-Polymerase ist aber nicht in der Lage, de novo einen Strang aufzubauen, sondern sie benötigt einen kurzen doppelsträngigen DNA-Abschnitt. Dieser wird im zweiten Schritt eines PCR-Zyklus bei verringerter Temperatur gebildet. Aufgrund der Tatsache, daß die DNA-Polymerase einen DNA-Strang nur in 5' → 3'-Richtung aufbauen kann, werden hierzu zwei komplementäre Oligonukleotide (Primer) benötigt, die mit den beiden 3'-Enden der DNA-Zielsequenz hybridisieren (annealing). Durch die Auswahl der Primer wird das zu amplifizierende DNA-Fragment bestimmt.

Die Wahl der Annealingtemperatur ist entscheidend für den erfolgreichen Verlauf der PCR. Eine zu niedrige Annealingtemperatur kann dazu führen, daß der Primer auch an Stellen, die nicht komplementär zu seiner Sequenz sind, hybridisiert. Die Folge sind viele falsche Amplifikate, welche die Ausbeute beeinträchtigen. Liegt die Annealingtemperatur zu hoch, so wird der Primer-Template-Komplex nicht gebildet bzw. gleich wieder denaturiert und es kommt nicht zur Kettenverlängerung.

Im dritten Schritt eines PCR-Zyklus werden die beiden Primer von der DNA-Polymerase mit den 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten zu zwei doppelsträngigen DNA-Fragmenten verlängert, welche mit dem zu amplifizierenden DNA-Fragment identisch sind.

Bei jeder Wiederholung des Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Zahl der entstehenden DNA-Fragmente. Daraus folgt, daß nach n Zyklen  $2^n$  doppelsträngige DNA-Fragmente vorhanden sind. In der Praxis hat sich gezeigt, daß häufig nach ca. 25 Zyklen ein Plateau mit einer Vervielfachung der Zielsequenz um den Faktor  $10^6$  erreicht ist. <sup>[166]</sup>

#### 4.3.1.1 Asymmetrische PCR

Biotinylierte PCR-Produkte können über das Biotin-Streptavidin-System, welches bei der PROBE-Reaktion ausführlich beschrieben wurde, effizient und einfach gereinigt werden. Bei den dabei verwendeten biotinylierten Primern in der PCR ist es wichtig, einen vollständigen Einbau dieses Primers zu gewährleisten, da Streptavidin eine höhere Affinität zu Oligonukleotiden kürzerer Länge besitzt. Hier hat sich die asymmetrische PCR<sup>[167,168]</sup> als Methode der Wahl etabliert, bei welcher der nicht biotinylierte Gegenprimer mit einem deutlichen Überschuß in die PCR eingesetzt und so die vollständige Umsetzung garantiert wird.

Untersuchungen von Siegert<sup>[169]</sup> ergaben, daß bei der Amplifikation eines 103mers aus M13mp18 in einer symmetrischen PCR nur der biotinylierte Primer im Spektrum zu erkennen war, während bei einer asymmetrischen PCR ( Verhältnis 2:5 ) das PCR-Produkt neben dem dominanten biotinylierten Primer schon zu detektieren war. Eine Erhöhung des Gegenprimerüberschusses auf 1:5 bewirkte schließlich, daß das Signal des PCR-Produktes zum Hauptprodukt wurde, wobei aber immer noch der nicht umgesetzte, biotinylierte Primer zu erkennen war.

#### 4.3.2 PCR-Testsystem zum Einbau von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat

Die Inkorporation von Nukleosidtriphosphatanaloga mit verschiedenen DNA-Polymerasen ist schon häufig untersucht und beschrieben worden<sup>[170-176]</sup>. Die Synthese eines C-Nukleosid-5'-O-triphosphates und dessen Einbau in die DNA mittels PCR gelang zum Beispiel mit Pseudo-Thymidin. Die Inkorporationsfähigkeit dieses Desoxynukleosidtriphosphates wurde von Lutz et al.<sup>[141]</sup> zuerst in einer Primer Extension Reaktion unter Austestung verschiedener thermostabiler DNA-Polymerasen überprüft. Dabei zeigte sich, daß fast alle der neun untersuchten Polymerasen die Modifikation gut einbauten. Unter PCR-Bedingungen wurden dann nur noch *Tth* und *Taq* getestet, wobei hier nur die *Taq*-DNA-Polymerase gute Ergebnisse lieferte.

Verschiedene DNA-Polymerasen sollten im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Fähigkeit hin überprüft werden, das modifizierte Desoxynukleosidtriphosphat einzubauen. Zu diesem Zweck fand ein möglichst einfaches und schon vielfach ausgetestetes PCR-System Verwendung<sup>[177]</sup>. Als Template dieses PCR-Systems fungierte ein chemisch synthetisiertes einzelsträngiges 87mer (CFTR-T87). Mit Hilfe dieses Templates und des Einsatzes von zwei synthetischen, unmodifizierten 19meren als Primer wurde durch die PCR ein doppelsträngiges 48mer amplifiziert.

PCR-System:

5'-AT TCA

5'-TCT TCT AGT TCG CAT GCT TTG ATG ACG CTT CTG TAT CTA TAT TCA

*Primer R48 (19mer)*

TCA TAG GAA ACA CC-3'

TCA TAG GAA ACA CCA AAG ATG ATA TTT TCT TTA ATG GTG CCA-3'

3'-AAA AGA AAT TAC CAC GGT C-bio-5'

*Primer bioF48 (19mer)*

Zehn verschiedene DNA-Poylmerasen wurden anhand dieses PCR-Systems auf ihre Inkorporationsfähigkeit bezüglich des modifizierten Triphosphates getestet. In der nachfolgenden Tabelle sind die getesteten Enzyme und die entsprechenden Ergebnisse aufgelistet.

### III. Allgemeiner Teil – Biochemie und Massenspektrometrie

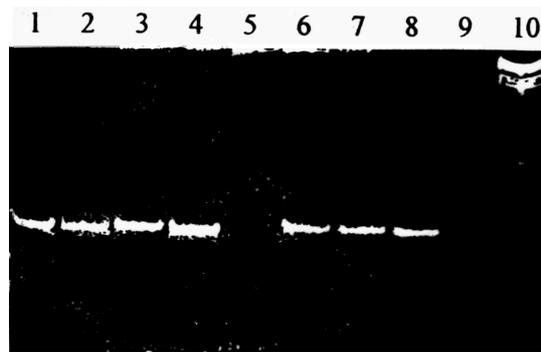
Enzym	$c^7dATP$	$dA^*TP$	Bemerkung
<i>Taq</i>	+	-	Inkorporation von $dA^*TP$ im Ampli Taq-Puffer etwas verbessert
(exo-) <i>Pfu</i>	+	(+)	Inkorporation von $dA^*TP$ erfolgt erst bei erhöhter Enzymkonz.
(exo-) <i>Vent</i>	+	+	Inkorporation von $dA^*TP$ erfolgt erst bei erhöhter Enzymkonz. gut
(exo-) <i>DeepVent</i>	+	+	
<i>ThermoSequenase</i>	+	+	
<i>Pwo</i>	+	+	
<i>Tth</i>	-	-	Inkorporation erfolgt trotz einer Variation der Mg-Konz. nicht
<i>Tfl</i>	-	-	Inkorporation erfolgt trotz einer Variation der Mg-Konz. nicht
<i>UITma</i>	+	+	nicht mehr lieferbar
<i>DyNAzyme</i>	(+)	-	

**Tabelle 1** : Übersicht der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerasen und ihrer Inkorporationsfähigkeit.

Die *Taq*-Polymerase baute das modifizierte Desoxynukleosidtriphosphat ( $dA^*TP$ ) auch bei erhöhter Enzymkonzentration (5U statt 2,5 U) nicht ein. Eine Veränderung des Puffersystems bewirkte bei diesem Testsystem auch keine drastische Veränderung der Inkorporation. Allerdings gelang Matthies <sup>[178]</sup> die Inkorporation des modifizierten Triphosphates mittels *Taq*-DNA-Polymerase unter Verwendung des AmpliTaq-Puffers bei einem Testsystem, welches plasmidische DNA als Template benutzte. Wahrscheinlich waren bei dem hier gewählten Template (CFTR-87) die Anforderungen an das Enzym besonders hoch, da gleich drei oder sogar vier modifizierte Nukleotide hintereinander inkorporiert werden mußten.

Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase konnte bei der Verwendung von (exo-)*Pfu* die Einbaurrate für das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat durch eine Steigerung der Enzymkonzentration deutlich verbessert werden (5 U statt 2,5 U), aber sie war immer noch schlechter als beim  $c^7dATP$ .

Die DNA-Polymerase (exo-)Vent konnte - wie die nachfolgende Abbildung 43 zeigt - beide getesteten Modifikationen inkorporieren. Die Einbaurate von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat ließ sich durch eine Verdoppelung der Enzymkonzentration (4 U statt 2 U) noch stark verbessern. Daher wurde (exo-)Vent in allen weiteren Tests immer in erhöhter Konzentration hinzugefügt.



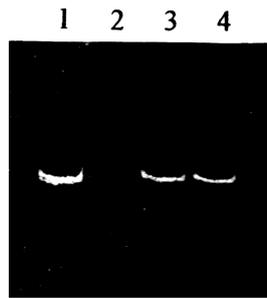
**Abbildung 43 :** Polyacrylamid-Gelelektrophorese von den PCR-Produkten unter Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerasen (exo-)Vent (Bahn 1-5) und (exo-)DeepVent (Bahn 6-9). Bahn 1: mit  $c^7$ dATP modifiziertes 48mer, Bahn 2: mit dA\*TP modifiziertes 48mer unter Einsatz von 2 Units Enzym, Bahn 3: mit dA\*TP modifiziertes 48mer unter Verwendung von 4 Units des Enzyms, Bahn 4 und 5: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 6: mit  $c^7$ dATP modifiziertes 48mer, Bahn 7 mit dA\*TP modifiziertes 48mer, Bahn 8 und 9: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 10: Längenstandard

Die DNA-Polymerase (exo-)DeepVent war, wie Abbildung 43 zeigt, in der Lage, sowohl  $c^7$ dATP als auch dA\*TP bei einer Enzymkonzentration von 2 U gut einzubauen.

Die Inkorporation beider Modifikationen gelang in diesem Testsystem mit den DNA-Polymerasen *ThermoSequenase* und *Pwo* gut.



**Abbildung 44 :** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der PCR-Produkte unter Verwendung von *ThermoSequenase*. Bahn 1 und 2 Negativ- und Positivkontrolle, Bahn 3: Längenstandard, Bahn 4: mit dA\*TP modifiziertes 48mer, Bahn 5: mit  $c^7$ dATP modifiziertes 48mer.



**Abbildung 45 :** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der PCR-Produkte unter Verwendung von *Pwo*. Bahn 1 und 2 Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 3: mit  $c^7$ dATP modifiziertes 48mer, Bahn 4: mit dA\*TP modifiziertes 48mer.

Der Einbau beider Modifikationen mit *Tth* und *Tfl* innerhalb dieses Testsystems war dagegen trotz einer Variation der Magnesium- und Enzymkonzentration nicht zu erreichen.

Die DNA-Polymerase *UITma* war zwar in der Lage, die beiden getesteten Modifikationen zu inkorporieren, da der Hersteller sie aber nicht mehr lieferte, konnte sie bei weiteren Tests nicht berücksichtigt werden. Die verwendete DNA-Polymerase *DyNAzyme* zeigte - dem allgemein erkannten Trend folgend -, daß die Inkorporation von  $c^7$ dATP mit den meisten der untersuchten Enzyme etwas besser verlief als mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat.

Insgesamt konnten von den 10 getesteten Enzymen fünf ((*exo*-)*DeepVent*, (*exo*-)*Vent*, *Pwo*, *ThermoSequenase* und *UITma*) das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat gut einbauen, wobei mit *UITma* aus dem oben genannten Grund nicht weitergearbeitet werden konnte.

### 4.3.3 Darstellung längerer modifizierter DNA-Fragmente durch PCR

Die vier Polymerasen, die beim 48mer-Testsystem die beste Inkorporationsfähigkeit in bezug auf 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat zeigten {(exo-)Deep Vent (2 U), (exo-)Vent (4 U), Pwo (2,5 U) und ThermoSequenase (2,5 U)}, wurden in weiteren Polymerasekettenreaktionen eingesetzt.

Unter Beibehaltung der PCR-Bedingungen (Zyklenzahl, Temperaturprogramm und Enzymkonzentrationen) wurden durch geeignete Wahl von Primer-Template-Systemen doppelsträngige DNA-Fragmente von 121 bis zu knapp 800 Basenpaaren konstruiert, um die Einbaufähigkeit beziehungsweise die Schnelligkeit der Polymerasen in bezug auf steigende Templatelängen hin zu untersuchen. Als Vergleich diente immer der Einbau des natürlichen Nucleosidtriphosphates und des  $c^7$ dATPs.

#### 4.3.3.1 Darstellung eines modifizierten 122mers aus M13mp18

Als Template diente zunächst der Bakteriophage M13mp18 mit einer Länge von 7250 bp. Mittels geeigneter, unmodifizierter Primer wurde ein 122 Basenpaare langes, doppelsträngiges DNA-Fragment amplifiziert.

*RP-122 Primer (22mer)*

5'-AGCGGATAACAATTTACACACAG-3'

....5'-AGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATT

.....3'-TCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCCTTTGTCGATACTGGTACTAATGCTTAA

CGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT

GCTCGAGCCATGGGCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCGAA

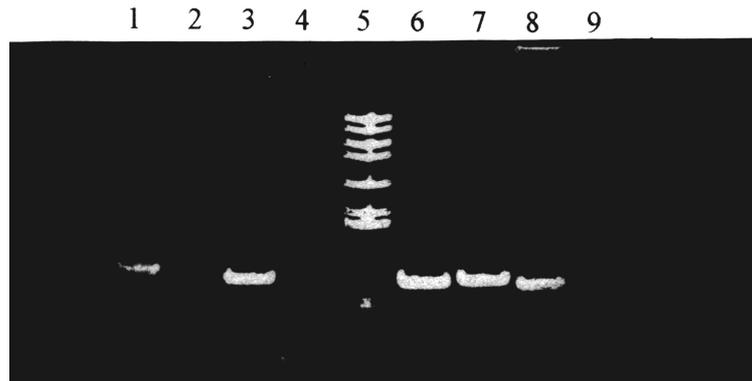
GGCACTGGCCGTCGTTTTAC-3' ...

CCGTGACCGGCAGCAAAATG-5' ...

3'-TGACCGGCAGCAAAATG-5'

*USP-Primer (17mer)*

Von den vier getesteten Enzymen konnten (*exo*-)*DeepVent*, (*exo*-)*Vent* und *Pwo* das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat einbauen, während bei Verwendung von *ThermoSequenase* das gewünschte DNA-Fragment nicht generiert wurde. Ein Vergleich mit  $c^7$ dATP zeigte, daß alle vier Enzyme das 122mer amplifizieren konnten. Für den Einbau des natürlichen Desoxynukleosidtriphosphates war die Enzymkonzentration sogar so hoch, daß hochpolymere Nebenprodukte zu erkennen waren.



**Abbildung 46 :** Gelelektrophorese des 122mers, welches unter Verwendung von *ThermoSequenase* (Bahn 1-4) und *Pwo* (Bahn 6-9) amplifiziert wurde. Bahn 1: mit  $c^7$ dATP modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 2: mit  $dA^*TP$  modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 3 und 4: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 5: Längenstandard, Bahn 6: mit  $c^7$ dATP modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 7: mit  $dA^*TP$  modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 8 und 9: Positiv- und Negativkontrolle.



**Abbildung 47 :** Gelelektrophorese des 122mers, welches unter Verwendung von (*exo*-)*Vent* (Bahn 1-4) und (*exo*-)*DeepVent* (Bahn 5-8) amplifiziert wurde. Bahn 1: mit  $c^7$ dATP modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 2: mit  $dA^*TP$  modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 3 und 4: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 5: mit  $c^7$ dATP modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 6: mit  $dA^*TP$  modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 7 und 8: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 9: Längenstandard. Bei den Positivkontrollen ist deutlich die Anwesenheit von hochpolymeren Nebenprodukten zu erkennen.

#### 4.3.3.2 Darstellung eines modifizierten 121mers aus pOM9

Die vier oben verwendeten thermostabilen DNA-Polymerasen wurden an einem weiteren Primer-Template-System getestet. Diesmal diente die Plasmid-DNA von pOM9 als Template. Mit Hilfe geeigneter, unmodifizierter Primer wurde die Multilinkersequenz des Plasmids amplifiziert.

*RP-Primer (17mer)*

5'-CAGGAAACAGCTATGA-3'

....5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAATTGGCTGCAGGTCGACGGA

....3'-GTCCTTTGTCGATACTGGTACTAATGCGGTTAACCGACGTCCAGCTGCCT

TCCAAGCTTCTTCTAGAGGTACCGCATGCGATATCGAGCTCTCCCGGGAA  
AGGGTTCGAAGAAGATCTCCATGGCGTACGCTATCGCTCGAGAGGGCCCTT

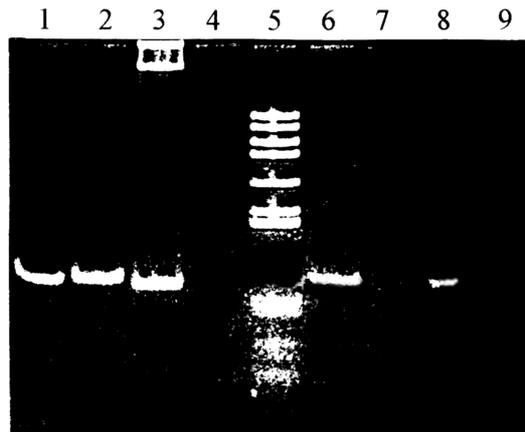
TTCACTGGCCGTCGTTTTAC-3'...

AAGTGACCGGCAGCAAATG-5'...

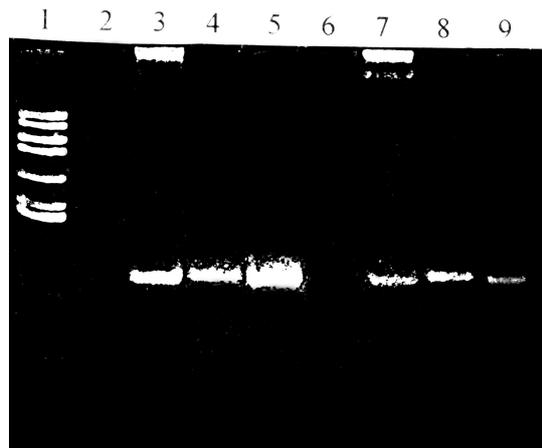
3'-TGACCGGCAGCAAATG-5'

*USP-Primer (17mer)*

Als Bestätigung des ersten Versuchs wurde auch in diesem Primer-Template-System nur mit (exo-)DeepVent, (exo-)Vent und Pwo ein schneller Einbau des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates verzeichnet (Abbildung 48 und 49). Im Gegensatz dazu wurde 2'-Desoxy-7-deazaadenosin-5'-O-triphosphat (c<sup>7</sup>dATP) von allen vier getesteten Polymerasen gut inkorporiert. (exo-)DeepVent, (exo-)Vent und Pwo erzeugten beim Einsatz des natürlichen Desoxynukleosidtriphosphates hochpolymere Nebenprodukte, während der Einbau bei Verwendung von ThermoSequenase ohne Nebenproduktbildung ablief.



**Abbildung 48** : Gelelektrophorese des 121mers, welches unter Einsatz von *Pwo* (Bahn 1-4) und *ThermoSequenase* (Bahn 6-9) amplifiziert wurde. Bahn 1: mit  $c^7dATP$  modifizierter DNA-Abschnitt, Bahn 2: mit  $dA^*TP$  modifizierter DNA-Abschnitt, Bahn 3 und 4: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 5: Längenstandard, Bahn 6: mit  $c^7dATP$  modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 7: mit  $dA^*TP$  modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 8 und 9: Positiv- und Negativkontrolle. Bei der Positivkontrolle unter Verwendung von *Pwo* ist deutlich die Anwesenheit hochpolymerer Nebenprodukte zu erkennen.



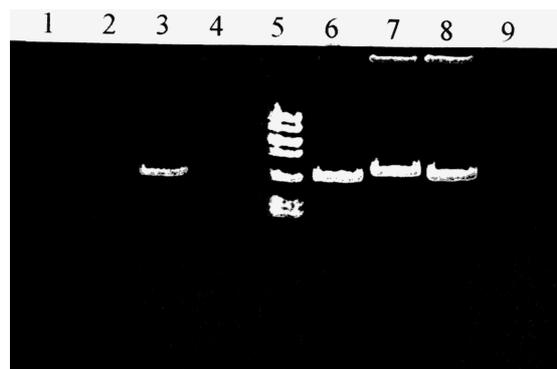
**Abbildung 49** : Gelelektrophorese des 121mers, welches unter Einsatz von *(exo-)DeepVent* (Bahn 2-5) und *(exo-)Vent* (Bahn 6-9) amplifiziert wurde. Bahn 1: Längenstandard, Bahn 2 und 3: Negativ- und Positivkontrolle, Bahn 4: mit  $dA^*TP$  modifiziertes 120mer, Bahn 5: mit  $c^7dATP$  modifiziertes 120mer, Bahn 6 und 7: Negativ- und Positivkontrolle, Bahn 8: mit  $dA^*TP$  modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 9: mit  $c^7dATP$  modifiziertes DNA-Fragment. Bei beiden Positivkontrollen sind hochpolymere Nebenprodukte zu beobachten.

#### 4.3.3.3 Darstellung eines modifizierten 391mers aus p9UTR

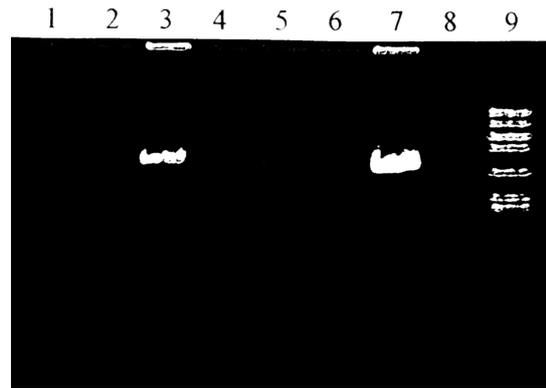
Mit Hilfe der vier ausgewählten DNA-Polymerasen {(exo-)DeepVent, (exo-)Vent, Pwo und ThermoSequenase} und entsprechender, unmodifizierter Primer wurde versucht, ein 391 Basenpaare langes, doppelsträngiges DNA-Fragment aus der Plasmid-DNA von p9UTR zu amplifizieren.

Gelelektrophoretische Untersuchungen mittels eines Agarosegels und eines Acrylamidgels zeigten, daß das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat von (exo-)DeepVent und ThermoSequenase zu langsam, von (exo-)Vent etwas besser und von Pwo gut inkorporiert wurde. Ein Vergleich mit  $c^7$ dATP ergab, daß auch diese Modifikation von ThermoSequenase zu langsam, von (exo-)DeepVent sehr langsam, von (exo-)Vent etwas schneller und von Pwo gut eingebaut wurde. Beim Einsatz von ThermoSequenase waren mit  $c^7$ dATP auch kleinere DNA-Fragmente zu sehen, welche Rückschlüsse auf einen langsameren Einbau beziehungsweise eine Pausierung oder gar den Abfall des Enzyms und daher eine unvollständige Verlängerung des Primers zulassen.

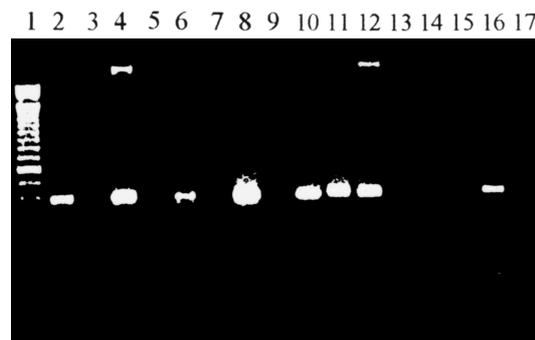
Die Positivkontrolle mit dATP verlief mit allen getesteten Enzymen wie erwartet, aber auch bei dieser Amplifikation traten vor allem bei Verwendung des natürlichen dATPs wieder hochpolymere Nebenprodukte auf.



**Abbildung 50 :** Polyacrylamid-Gelelektrophorese des 391mers, welches unter Einsatz von ThermoSequenase (Bahn 1-4) und Pwo (Bahn 6-9) amplifiziert wurde. Bahn 1: mit  $c^7$ dATP modifiziertes DNA-Fragment (wurde nicht amplifiziert), Bahn 2: mit dA\*TP modifiziertes DNA-Fragment (wurde nicht amplifiziert), Bahn 3 und 4: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 5: Längenstandard, Bahn 6: mit  $c^7$ dATP modifiziertes 391mer, Bahn 7: mit dA\*TP modifiziertes 391mer, Bahn 8 und 9: Positiv- und Negativkontrolle.



**Abbildung 51** : Polyacrylamid-Gelelektrophorese des 391mers, welches unter Verwendung von (*exo*-)*Vent* (Bahn 1-4) und (*exo*-)*DeepVent* (Bahn 5-8) hergestellt wurde. Bahn 1: mit  $c^7$ dATP modifiziertes 391mer und Bahn 2: mit dA\*TP modifiziertes 391mer (wurden nicht amplifiziert), Bahn 3 und 4: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 5: mit  $c^7$ dATP modifiziertes DNA-Fragment und Bahn 6: mit dA\*TP modifiziertes DNA-Fragment (wurden nicht amplifiziert), Bahn 7 und 8: Positiv- und Negativkontrolle, Bahn 9: Längenstandard.



**Abbildung 52** : 1,5 %iges Agarosegel des 391mer-PCR-Produktes unter Verwendung von (*exo*-)*Vent* (Bahn 2-5), (*exo*-)*DeepVent* (Bahn 6-9), *Pwo* (Bahn 10-13) und *ThermoSequenase* (Bahn 14-17), Bahn 1: Längenstandard, Bahn 2, 6, 10 und 14: mit  $c^7$ dATP amplifiziertes 391mer, Bahn 3, 7, 11 und 15: mit dA\*TP modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 4, 8, 12 und 16: Positivkontrolle, Bahn 5, 9, 13 und 17: Negativkontrolle

#### 4.3.3.4 Darstellung eines modifizierten 729mers aus pG3

Die vier thermostabilen DNA-Polymerasen {(exo-)DeepVent, (exo-)Vent, Pwo und ThermoSequenase} wurden zur Amplifikation eines 729mers aus der Plasmid-DNA von pG3 herangezogen. Eine Analyse der PCR mittels Gelelektrophorese ergab, daß 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat von Pwo noch gut, von den anderen Polymerasen aber zu langsam eingebaut wurde. Dagegen entstand mit  $c^7$ dATP zusätzlich auch bei Verwendung von (exo-)DeepVent und (exo-)Vent das 729mer, wenn auch in deutlich niedrigerer Konzentration. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen an p9UTR erfolgte der Einbau mit ThermoSequenase bei beiden Modifikationen so langsam, daß kein 729mer zu erkennen war.



**Abbildung 53 :** Agarosegelelektrophorese des 729mers, welches unter Verwendung von (exo-) Vent (Bahn 2-5), (exo-)DeepVent (Bahn 6-9), Pwo (Bahn 10-13) und ThermoSequenase (Bahn 14-17) amplifiziert wurde. Bahn 1: Längenstandard, Bahn 2, 6, 10 und 14: mit  $c^7$ dATP modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 3, 7, 11 und 15: mit dA\*TP modifiziertes DNA-Fragment, Bahn 4, 8, 12 und 16: Positivkontrolle, Bahn 5, 9, 13 und 17: Negativkontrolle.

Die verschiedenen Tests führten zu dem Ergebnis, daß die thermostabile DNA-Polymerase Pwo bei der Inkorporation des modifizierten Nukleosidtriphosphates am schnellsten und damit am universellsten war.

#### **4.4 Restriktionsspaltung**

Die Synthese des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates geschah mit dem Ziel, ein Desoxynukleosidtriphosphat zu entwickeln, das von DNA-Polymerasen für PCR und PROBE-Reaktion akzeptiert wurde, das zu DNA-Fragmenten führte, die von Restriktionsendonukleasen gespalten werden konnten und das der Depurinierung entgegenwirkte. In der folgenden Untersuchung wurde überprüft, ob ein doppelsträngig modifiziertes PCR-Produkt von verschiedenen Restriktionsendonukleasen (*Alu* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Sma* I und *Xba* I) gespalten werden konnte.

Restriktionsendonukleasen des Typs II sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA sequenzspezifisch an Palindromen - einem kurzen DNA-Abschnitt, in dem Strang und Gegenstrang in 5' → 3' Richtung gelesen dieselbe Sequenz haben - erkennen und spalten. Im folgenden sind die Restriktionsschnittstellen der eingesetzten Enzyme und die Art der Spaltung dargestellt:

***Alu* I**

5'-AG↓CT-3'

3'-TC↑GA-5'

***Bam*H I**

5'-G↓GATCC-3'

3'-CCTAG↑G-5'

***Eco*R I**

5'-G↓AATTC-3'

3'-CTTAA↑G-5'

***Hind* III**

5'-A↓AGCTT-3'

3'-TTCGA↑A-5'

***Sma* I**

5'-CCC↓GGG-3'

3'-GGG↑CCC-5'

***Xba* I**

5'-T↓CTAGA-3'

3'-AGATC↑T-5'

Wie zu erkennen ist, wurden sowohl Restriktionsendonukleasen verwendet, die eine sechs-Nukleotid-lange Erkennungssequenz haben, als auch eine Restriktionsendonuklease, die eine vier-Nukleotid-lange Restriktionsspaltstelle erkennen. Außerdem spalten einige Enzyme den

Doppelstrang glatt, während die anderen überhängende Enden produzieren. Ein weiterer Unterschied in den Erkennungssequenzen ist die Stellung und Häufigkeit des Adenosins. *Alu* I erkennt eine vier-Nukleotid-lange Sequenz, die nur ein außen liegendes Adenosin enthält und spaltet diese glatt und mittig. Die sechs-Nukleotid-lange Restriktionsschnittstelle von *Bam*H I enthält auch nur ein Adenosin, welches aber mittig liegt. Eine Spaltung zwischen den beiden Guanosinen produziert in diesem Fall überhängende Enden. Die Erkennungssequenz von *Eco*R I ist auch sechs Nukleotide lang, enthält aber zwei Adenosine nebeneinander. Die Spaltung erfolgt zwischen dem Adenosin und dem Guanosin. Auch die palindrome, sechs-Nukleotid-lange Sequenz, die von *Hind* III erkannt wird, beinhaltet zwei Adenosine, welche nebeneinander am Rand liegen. In diesem Fall verläuft die Restriktionsspaltung zwischen den beiden Adenosinen. Die Restriktionseendonuklease *Sma* I spaltet doppelsträngige DNA im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Enzymen an einer Sequenz, die gar kein Adenosin enthält. Dies diente zur Überprüfung, ob Adenosinmodifikationen die gesamte dreidimensionale Struktur eines DNA-Stranges so verändern, daß eine Spaltung insgesamt verhindert wird. Die sechs-Nukleotid-lange Restriktionsschnittstelle des letzten untersuchten Enzyms *Xba* I enthält zwei Adenosine. Diese liegen aber nicht nebeneinander, sondern sind durch ein Nukleotid voneinander getrennt. Die Spaltung erfolgt jeweils am anderen Ende der Erkennungssequenz.

Restriktionsexperimente an modifizierten, kurzen Oligonukleotiden mit *Eco*R I wurden schon 1987 von Seela und Kehne<sup>[179]</sup> durchgeführt. Sie präparierten Octa- und Dodecanukleotide, die 2'-Desoxy-7-deazaadenosin in der Erkennungssequenz von *Eco*R I (GAATTC) enthielten. Die Substitution eines Adenosins durch 2'-Desoxy-7-deazaadension in der Erkennungssequenz führte zu einer Verlangsamung der Spaltung, während der Austausch beider Adenosine gegen 2'-Desoxy-7-deazaadension das Oligomer vor einer Spaltung schützte. Daraus folgerten sie, daß der Stickstoff in beiden Purinen als Protonenakzeptorstelle für die Wechselwirkungen mit dem Enzym (*Eco*R I) diene und daß zwar nicht beide Bindungsstellen für die Spezifität des Enzyms notwendig waren, jedoch mit beiden der Vorgang beschleunigt wurde.

Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Modifikationen<sup>[180, 181]</sup> innerhalb der Erkennungssequenz von *Eco*R I, die durch Entfernung, Vertauschung und Umordnung der funktionellen Gruppen erhalten wurden, ergaben unter anderem, daß das Enzym zwischen dem inneren A und dem äußeren A innerhalb der Erkennungssequenz GAATTC

unterscheidet. Dabei führte die Entfernung der exozyklischen Aminofunktion am äußeren A zu einer drastischeren Verlangsamung der Enzymaktivität als am inneren A, obwohl McClarin et al. <sup>[64]</sup> durch Röntgenstrukturanalyse eines *EcoR* I/DNA-Kokristallisates nachgewiesen hatten, daß beide exozyklischen Aminofunktionen mit dem Protein interagieren.

Bei *EcoR* IV ergab sich im Vergleich mit *EcoR* I bei dem Ersatz von dATP durch  $c^7$ dATP ein ganz anderes Bild <sup>[182]</sup>. Die Substitution des ersten Adenosins in der Erkennungssequenz (GATATC) durch 2'-Desoxy-7-deazaadenosin führte zur Verhinderung der Spaltung, während der Ersatz des zweiten Adenosins die Hydrolyse nicht beeinflusste. Daraus wurde insgesamt gefolgert, daß das Stickstoffatom in Position 7 des Purinrings in einigen Fällen eine Bindungsstelle für eine bestimmte Aminosäure des aktiven Zentrums des Enzyms darstellt und in anderen Fällen nicht.

Genauere Untersuchungen über die Wechselwirkungen der Restriktionsendonuklease *EcoR* IV mit der Erkennungssequenz wurden von Newman et al. <sup>[183]</sup> unternommen. Sie synthetisierten einen kompletten Satz von Adenosin- und Thymidin-Modifikationen, bei denen Positionen mit dem Potential zur Interaktion mit dem Protein durch Wasserstoff oder Kohlenstoff ersetzt wurden. Durch Inkorporation jeweils einer Modifikation in die Restriktionsschnittstelle konnten alle essentiellen Positionen für die Protein-DNA-Wechselwirkung identifiziert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Synthese von Modifikationen und ihr Einbau in Oligonukleotide für das Verständnis der Protein- DNA-Wechselwirkung ist.

Restriktionsexperimente an langen Oligonukleotiden, in welche mittels PCR  $c^7$ dATP oder  $c^7$ dGTP inkorporiert werden konnte, wurden von Holaway et al. <sup>[184]</sup> und Seela und Röling <sup>[63]</sup> durchgeführt. Sie zeigten, daß die Substitution von dGTP durch  $c^7$ dGTP die Spaltung der DNA-Fragmente durch die meisten der getesteten Restriktionsendonukleasen verhinderte. *Hind* III und *Xba* I waren aber in der Lage, die DNA trotz Modifikation zu schneiden.

Daraus folgte wieder, daß das Stickstoffatom in Position 7 des Purinrings in einigen Fällen als Bindungsstelle benötigt wurde und in anderen nicht.

Seela et al. [63] untersuchten außerdem die Auswirkung der Inkorporation von  $c^7$ dATP in die DNA-Fragmente. Da es ihnen aber nur partiell gelang,  $c^7$ dATP mittels PCR in DNA-Abschnitte einzubauen, waren die Ergebnisse dieser Restriktionsexperimente nicht so aussagekräftig. In den hier durchgeführten Restriktionsexperimenten wurde dATP dagegen vollständig durch  $c^7$ dATP oder  $dA^*TP$  ersetzt.

#### 4.4.1 Restriktionsspaltung eines doppelsträngig modifizierten 122mers aus M13mp18

Nachfolgend ist das PCR-Produkt mit den unterschiedlichen Restriktionsspaltstellen abgebildet:

*Alu I* *EcoR I*

5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTC  
3'- TCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCCTTTGTCGATACTGGTACTAATGCTTAAG

*Alu I*

*Alu I*      *Sma I* *BamH I*      *Xba I* *Hind III*

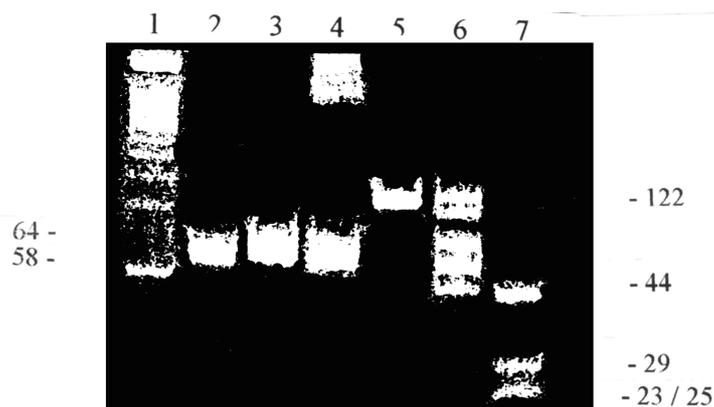
GAGCTCGGTACCCGGGGATCC TCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT  
CTCGAGCCATGGGCCCTAGG AGATCTCAGCTGGACGTCCTACGTTTCGAA

GGCACTGGCCGTCGTTTTAC-3'  
CCGTGACCGGCAGCAAATG-5'

In dieser Untersuchung wurden PCR-Produkte, die natürliches Adenosin enthielten, verglichen mit PCR-Produkten, bei denen in der PCR-Reaktion das dATP einmal durch 7-Deaza-dATP und einmal durch 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat vollständig substituiert wurde.

Nach der Behandlung des PCR-Produktes mit *Alu I* wurden vier DNA-Abschnitte mit einer Länge von 29, 25, 44 und 23 Basenpaaren erwartet. Eine Gelelektrophorese (siehe Abbildung 54) bestätigte, daß das nicht modifizierte PCR-Produkt vollständig, das mit  $c^7$ dATP

modifizierte PCR-Produkt überhaupt nicht gespalten wurde. Das mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat modifizierte PCR-Produkt konnte von *Alu* I gespalten werden, allerdings waren die vier Spaltungen noch nicht vollständig, denn im Gel waren neben dem 44-mer auch noch Edukt und drei dazwischenliegende DNA-Fragmente zu erkennen. Diese drei Fragmente entsprechen einer einfachen Spaltung des Stranges an einer endständigen Restriktionsspaltstelle und einer Spaltung des PCR-Produktes innerhalb der mittleren Erkennungssequenz.

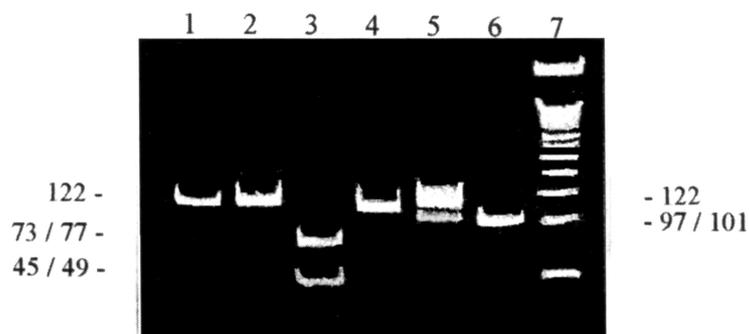


**Abbildung 54 :** Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Restriktionsspaltung unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Alu* I (Bahn 5-7) und *Sma* I (Bahn 2-4). Bahn 1: Längenstandard, Bahn 2: mit  $c^7dATP$  modifiziertes Edukt, Bahn 3: mit  $dA^*TP$  modifiziertes Edukt, Bahn 4: Positivkontrolle, Bahn 5: mit  $c^7dATP$  modifiziertes Edukt, Bahn 6: mit  $dA^*TP$  modifiziertes Edukt, Bahn 7: Positivkontrolle

Bei der Behandlung der modifizierten und unmodifizierten PCR-Produkte mit der Restriktionsendonuklease *Sma* I, die kein A in der Schnittstelle aufweist, wurden Fragmente von 58 und 64 Basenpaaren erwartet, die auch bei allen drei PCR-Produkten im Gel (Abbildung 54) zu erkennen waren. Eine Erkennungssequenz, die kein Adenosin enthielt, konnte also trotz des Einbaus von Modifikationen außerhalb der Restriktionsschnittstelle noch von der Endonuklease erkannt und gespalten werden. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen vom Seela et al. <sup>[63]</sup> und Grime et al. <sup>[184]</sup>.

Der Einbau von einem Adenosin- und einem Thymidinanalogon bewirkte hingegen bei Untersuchungen von Perrin et al. <sup>[176]</sup>, daß selbst in einem Heteroduplex, in der nur ein Strang modifiziert war, dieser modifizierte Strang nicht von einer Restriktionsendonuklease gespalten werden konnte, die kein Adenosin und Thymidin in der Erkennungssequenz benötigt.

Die Zugabe der Restriktionsendonukleasen *Bam*H I, *Eco*R I und *Xba* I zu den mit  $c^7$ dATP, mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat oder mit dATP hergestellten PCR-Produkten bewirkte, daß nur das nicht modifizierte DNA-Fragment von den Enzymen gespalten wurde. Bei der Behandlung der drei PCR-Produkte mit *Hind* III wurde ein 97 bzw. 101 und ein 25 bzw 21 Basenpaare langes DNA-Fragment erwartet. Das unmodifizierte PCR-Produkt wurde vollständig in diese beiden Fragmente gespalten, während das mit  $c^7$ dATP modifizierte DNA-Fragment gar nicht geschnitten wurde. Bei dem mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat modifizierten PCR-Produkt war im Gel eine partielle Spaltung zu erkennen.

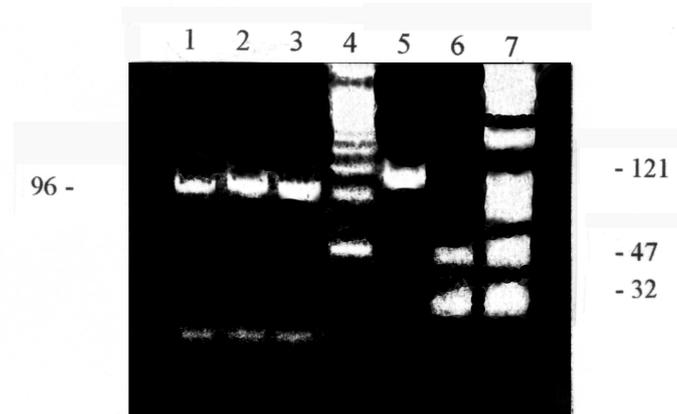


**Abbildung 55** : Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Restriktionsspaltung unter Zusatz von *Xba* I (Bahn 1-3) und *Hind* III (Bahn 4-6). Bahn 1: mit  $c^7$ dATP modifiziertes Edukt, Bahn 2: mit dA\*TP modifiziertes Edukt, Bahn 3: Positivkontrolle, Bahn 4: mit  $c^7$ dATP modifiziertes Edukt, Bahn 5: mit dA\*TP modifiziertes Edukt, Bahn 6: Positivkontrolle, Bahn 7: Längenstandard

Insgesamt betrachtet konnte mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat modifizierte DNA durch drei der sechs untersuchten Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Bei *Alu* I und *Hind* III verlief die Umsetzung aber nur partiell. Das mit  $c^7$ dATP modifizierte PCR-Produkt konnte im Gegensatz dazu nur von dem einen Enzym (*Sma* I), welches kein Adenosin in der Erkennungssequenz trägt, geschnitten werden.



*Sma* I, welches kein Adenosin in der Erkennungssequenz enthält, war auch hier in der Lage, alle drei untersuchten PCR-Produkte zu spalten. Die Gelelektrophorese (Abbildung 57) bestätigte, daß die PCR-Stränge in die erwarteten DNA-Abschnitte von 96 und 25 Basenpaaren getrennt wurden.



**Abbildung 57 :** Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Kontrolle der Restriktionsspaltung des 121mers unter Verwendung von *Sma* I (Bahn 1-3) und *Alu* I (Bahn 5-7). Bahn 1: mit  $c^7dATP$  modifiziertes Edukt, Bahn 2: mit  $dA^*TP$  modifiziertes Edukt, Bahn 3: Positivkontrolle, Bahn 4: Längenstandard, Bahn 5: mit  $c^7dATP$  modifiziertes Edukt, Bahn 6: mit  $dA^*TP$  modifiziertes Edukt, Bahn 7: Positivkontrolle

Beim Vergleich der Einwirkung des Restriktionsenzym *Alu* I auf die drei unterschiedlichen PCR-Produkte zeigte sich, daß das mit  $c^7dATP$  modifizierte PCR-Produkt nicht in die erwarteten DNA-Abschnitte von 47, 32 und 10 Basenpaaren geschnitten wurde, während diese Fragmente beim mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat und mit  $dATP$  hergestellten PCR-Produkt deutlich zu sehen waren.

Aus diesen Vergleichen ging eindeutig hervor, daß ein mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat modifiziertes PCR-Produkt im Gegensatz zum mit  $c^7dATP$  modifizierten PCR-Produkt zum Beispiel von der Restriktionsendonuklease *Alu* I gespalten werden konnte. Bei der Vielzahl zur Verfügung stehender Restriktionsendonukleasen könnten durchaus noch weitere Enzyme gefunden werden, die in der Lage sind, mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat modifizierte DNA zu schneiden.

#### **4.4.2.1 Spaltungsversuch mit unaufgereinigter, doppelsträngig modifizierter DNA aus pOM9**

Um auszuschließen, daß Bestandteile der Pufferlösungen, welche bei der Reinigung der PCR-Produkte mittels QIAquick-Säulen verwendet wurden, oder das Säulenmaterial selbst die Restriktionsspaltung störten, wurde diese am unaufgereinigten, doppelsträngig modifizierten PCR-Produkt wiederholt. Für dieses Experiment wurde einmal eine mit bio-USP als Primer amplifizierte DNA aus pOM9 und außerdem das mit USP als Primer und dATP bzw. c7dATP oder dA\*TP hergestellte PCR-Produkt aus pOM9 verwendet. Das PCR-Produkt wurde dann sofort unaufgereinigt in die Restriktionsspaltung eingesetzt. Hierbei zeigte sich keinerlei Veränderung gegenüber der Untersuchung mit der aufgereinigten, doppelsträngig modifizierten DNA. Daraus folgte, daß die Restriktionsspaltung nicht von der Reinigung abhängig war, sondern von der Inkorporation des modifizierten Desoxynukleosidtriphosphates beeinflußt wurde.

#### **4.4.3 Restriktionsspaltung eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes, bei welchem nur ein Strang modifiziert war**

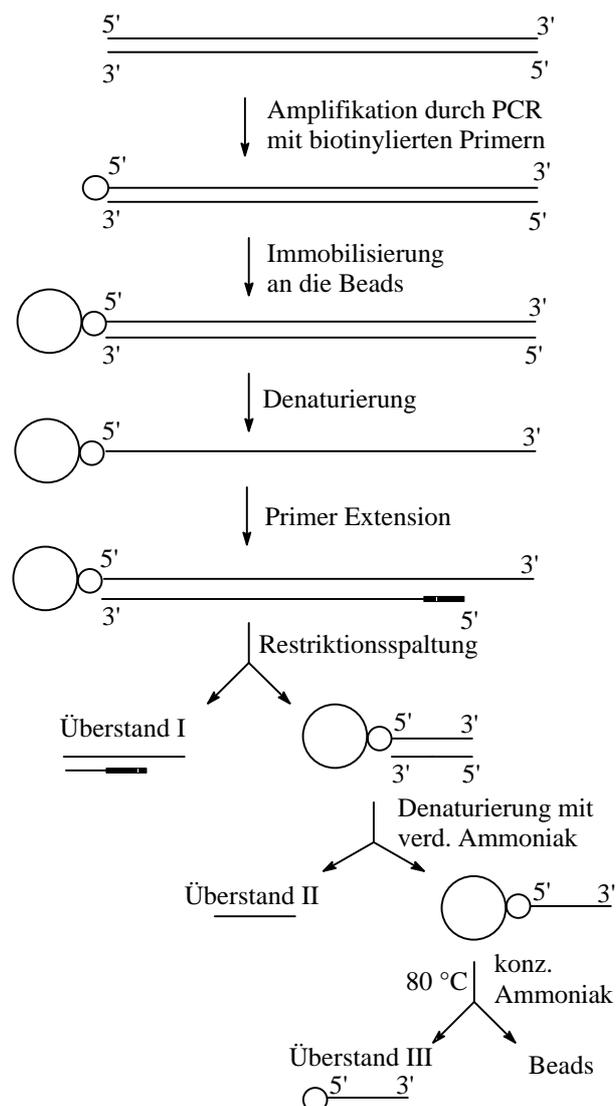
Nachdem die Restriktionsspaltung am doppelsträngig modifizierten DNA-Fragment untersucht worden war, blieb die Frage, welche Auswirkungen die Modifikation nur eines Stranges auf die Restriktionsendonukleasen haben würde. Zur Beantwortung wurde zuerst das doppelsträngig modifizierte 121mer aus pOM9 unter Verwendung des Primers bio-USP anstelle von USP amplifiziert. Der Einsatz des biotinylierten Primers ermöglichte die Aufreinigung des PCR-Produktes über das Streptavidin-Biotin-System.

Nach der Amplifikation des 121mers wurde dieses an die mit Streptavidin beladenen Dynabeads gebunden. Anschließend wurde der DNA-Doppelstrang durch Inkubation mit Natronlauge denaturiert und der nicht biotinylierte Strang durch Waschen entfernt. Der an den Beads verbleibende modifizierte Einzelstrang diente als Template für die nachfolgende Primerelongation unter Verwendung der vier natürlichen Desoxynukleosidtriphosphate. Um den Erfolg der Denaturierung und Elongation beobachten zu können, mußte der zur Primer Extension Reaktion eingesetzte Primer (SilCut-Primer) so an das Template binden, daß der neu entstehende DNA-Strang einen im Gel sichtbaren Massenunterschied zum ursprünglich



PCR-Produkt entsprach, aber auch nach dreimaliger Wiederholung der Denaturierung nicht verschwand, wurde angenommen, daß durch Einwirkung des verdünnten Ammoniaks bei 60 °C nicht nur eine Denaturierung des Doppelstranges eintrat, sondern zum Teil auch der biotinylierte Strang von den Beads abgespalten wurde.

Für die eigentliche Restriktionsspaltung wurde jeweils ein Zehntel des Ansatzes der Primer Extension Reaktion mit *Alu* I, *Bam*H I, *Hind* III oder *Eco*R I an den Beads inkubiert. Diese vier Restriktionsendonukleasen wurden ausgewählt, da *Alu* I und *Hind* III schon bei dem doppelsträngig modifizierten DNA-Fragment teilweise erfolgreich waren, die Restriktionsschnittstelle von *Eco*R I besonders anspruchsvoll - Schnitt neben zwei Adenosinen - und die von *Bam*H I besonders einfach - Schnittstelle zwischen zwei Guanosinen - erschien.



**Abbildung 58 :** Schematische Darstellung des Restriktionsexperiments

Nach der Spaltung wurde der Überstand I, der die doppelsträngigen Spaltprodukte enthalten sollte, separiert. Die Beads wurden mit verdünntem Ammoniak inkubiert, um den letzten Teil des Heteroduplexes zu denaturieren. Auch der Überstand II wurde separiert. Die Beads wurden abschließend mit 2 mol/l Ammoniak bei 80 °C erhitzt, um den biotinylierten Strang, soweit noch vorhanden, von den Beads abzuspalten. Der hierbei entstandene Überstand III wurde wieder separiert und das Ammoniak anschließend entfernt. Die Überstände wurden mittels eines denaturierenden Polyacrylamidgels auf die erhaltenen Spaltprodukte hin überprüft.

Aufgrund der Tatsache, daß sich unmodifizierte DNA-Fragmente von modifizierten DNA-Fragmenten in ihrem Laufverhalten unterscheiden und zwar dadurch, daß die modifizierten DNA-Fragmente im allgemeinen langsamer laufen und außerdem durch die Tatsache, daß ein DNA-Fragment biotinyliert war, wurde die Auswertung der Spaltungsmuster erschwert.

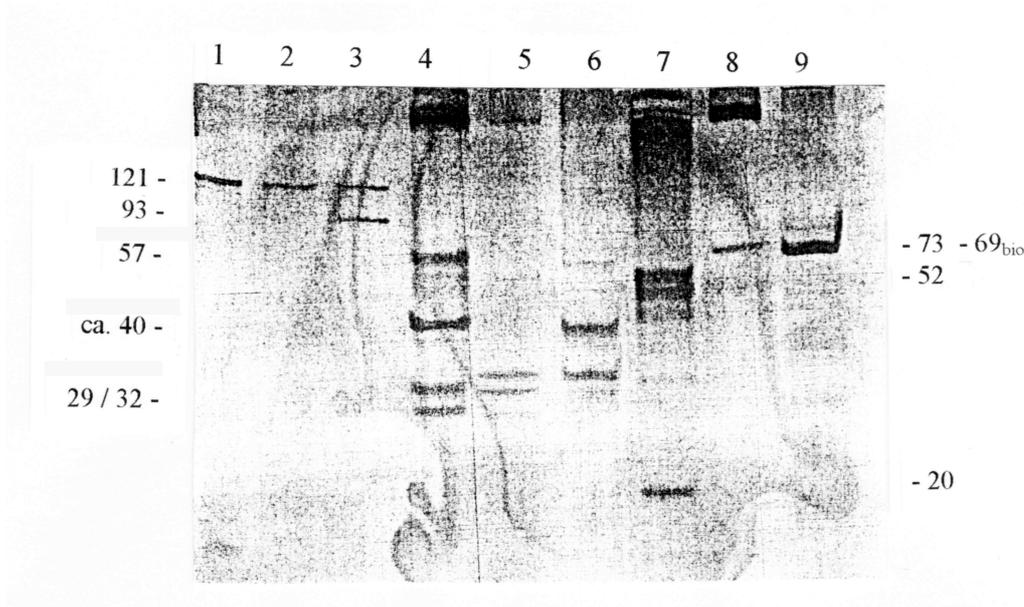
Bei der Restriktionsspaltung mit *Alu I* war nach der Inkubationszeit von drei Stunden kein ungespaltenes Edukt mehr zu erkennen. Die Spaltung war also vollständig.

<i>Alu I</i>	erwartete Spaltprodukte (Bp)	gefundene Spaltprodukte (Bp)
Überstand I	57 <sub>m</sub> , 32 <sub>m</sub> , 29, 32	57 <sub>m</sub> , 32, 29, ca.40
Überstand II	32	32 <sub>m</sub> , 32
Überstand III	32 <sub>m, bio</sub>	32 <sub>m, bio</sub> , ca. 40

**Tabelle 2 :** Erwartete und gefundene Spaltprodukte bei der Restriktionsspaltung mit *Alu I*

Im ersten Überstand, der direkt nach der Restriktionsspaltung abgenommen wurde, waren die erwarteten Banden bei 57 Basenpaaren, bei 32 und 29 Basenpaaren deutlich zu erkennen. Zusätzlich trat aber noch eine nicht zu interpretierende Bande mit einer Länge von ca. 40 Basenpaaren auf. Der Überstand nach der Denaturierung mit verdünntem Ammoniak wies zwei sehr schwache Banden auf, wovon die eine dem erwarteten unmodifizierten 32mer , die andere wahrscheinlich dem modifizierten 32mer entsprach.

Auch im Überstand nach der Abspaltung des letzten DNA-Abschnittes mit 2 mol/l Ammoniak waren im Polyacrylamidgel zwei Banden zu erkennen, von denen die untere dem biotinylierten 32mer entsprach. Die zweite, auch wieder ca. 40 Basenpaar lange DNA-Sequenz, konnte nicht interpretiert werden.



**Abbildung 59 :** Denaturierendes Polyacrylamidgel nach der Silberfärbung zur Kontrolle der Restriktionsspaltung beim Einsatz von *Alu I* (Bahn 4-6) und *BamH I* (Bahn 7-9). Bahn 1: unaufgereinigtes, ungespaltenes PCR-Produkt, Bahn 2: gereinigtes, ungespaltenes PCR-Produkt, Bahn 3: Edukt vor der Restriktionsspaltung (die langsam laufendere Bande stellt den biotinylierten, modifizierten Strang des PCR-Produktes dar, die schneller laufende Band markiert den verlängerten, unmodifizierten neu elongierten Strang), Bahn 4: Spaltung mit *Alu I*, Bahn 5: Spaltung mit *Alu I* und Denaturierung mit verdünntem Ammoniak, Bahn 6: Spaltung mit *Alu I* und Abspaltung von den Beads mit 2 M Ammoniak, Bahn 7: Spaltung mit *BamH I*; Bahn 8: Spaltung mit *BamH I* und Denaturierung mit verdünntem Ammoniak, Bahn 9: Spaltung mit *BamH I* und Abspaltung von den Beads mit 2 M Ammoniak.

Dadurch, daß bei den anderen getesteten Restriktionsendonukleasen - im Gegensatz zu *Alu I* - jeweils nur ein Schnitt durchgeführt wurde, waren die folgenden Bandenmuster etwas leichter interpretierbar.

Alle Überstände der *BamH I*-Spaltung wiesen keine Spuren des ungespaltenen Eduktes mehr auf. Im Gegensatz zu dem doppelsträngig modifizierten DNA-Fragment konnte dieses doppelsträngige, aber nur einzelsträngig modifizierte DNA-Fragment also von *BamH I* vollständig gespalten werden.

<b><i>BamH I</i></b>	erwartete Spaltprodukte (Bp)	gefundene Spaltprodukte (Bp)
Überstand I	52 <sub>m</sub> , 20	52 <sub>m</sub> , 20
Überstand II	73	73
Überstand III	69 <sub>m, bio</sub>	69 <sub>m, bio</sub>

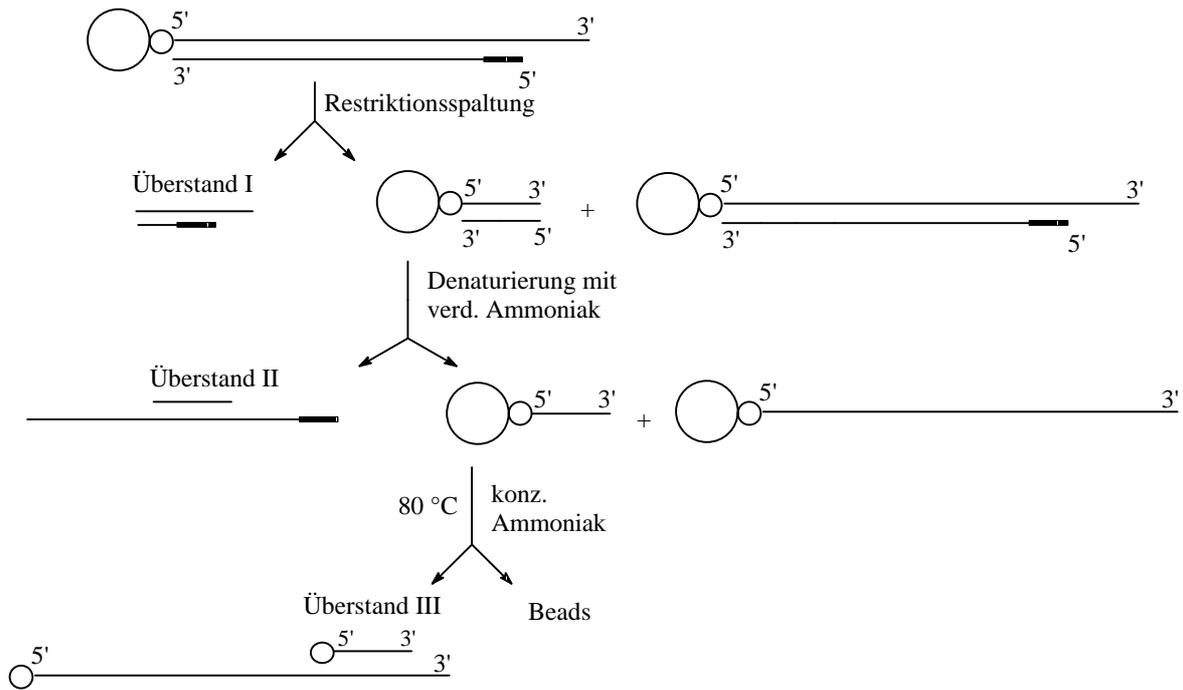
**Tabelle 3 :** Erwartete und gefundene Spaltprodukte bei der Restriktionsspaltung mit *BamH I*

Die Analyse des direkt nach der Restriktionsspaltung mit *BamH* I entnommenen Überstandes im Gel zeigte die beiden erwarteten DNA-Abschnitte von 52 und 20 Basenpaaren deutlich an. Auch der mit verdünntem Ammoniak hergestellte zweite Überstand der *BamH* I Spaltung wies das eine erwartete Fragment mit einer Länge von 73 Basenpaaren auf, welches durch Denaturierung des letzten noch an den Dynabeads gebundenen DNA-Fragmentes gewonnen wurde. Der dritte Überstand enthielt auch nur die eine Bande, welche dem biotinylierten 69mer entsprach, das durch den 2 mol/l Ammoniak von den Beads abgelöst wurde. Aufgrund der Biotinylierung laufen die beiden Banden des 72mers und 69mers ungefähr auf gleicher Höhe.

<i>Hind</i> III	erwartete Spaltprodukte (Bp)	gefundene Spaltprodukte (Bp)
Überstand I	59 <sub>m</sub> , 27	59 <sub>m</sub> , 27
Überstand II	66	66
Überstand III	62 <sub>m, bio</sub>	62 <sub>m, bio</sub> und die beiden ungespaltenen Stränge des Eduktes

**Tabelle 4 :** Mögliche und gefundene Spaltprodukte bei der Restriktionsspaltung mit *Hind* III unter der Annahme, daß die Spaltung vollständig abläuft.

Der sofort nach der Restriktionsspaltung mit *Hind* III abgenommene Überstand enthielt die beiden erwarteten 59 und 27 Basenpaare langen DNA-Fragmente. Das 59mer war modifiziert. Daher war die relative Lage (lief höher als das 66mer) zum im zweiten Überstand gefundenen 66mer zu erklären. Auch das im dritten Überstand vorhandene, modifizierte und biotinylierte 62mer lief auf der gleichen Höhe wie das unmodifizierte 66mer. Zusätzlich waren im dritten Überstand, welcher durch Zugabe von 2 mol/l Ammoniak gewonnen wurde, auch noch die beiden ungespaltenen Stränge des Eduktes zu sehen. Dieser Befund konnte am besten mit dem nachfolgend dargestellten Verlauf der Restriktionsspaltung erklärt werden.



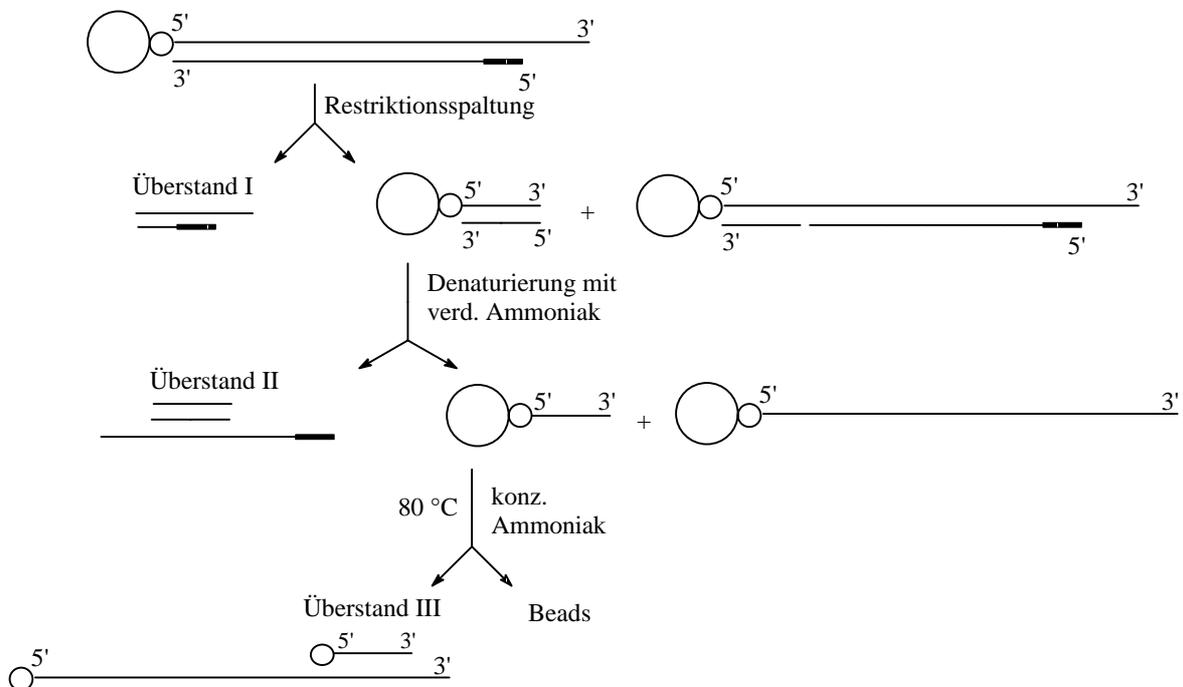
**Abbildung 60 :** Vermuteter Verlauf der Restriktionsspaltung bei Verwendung von *Hind* III.

Das bedeutet, daß die Spaltung beider Stränge des Heteroduplexes mit *Hind* III im Gegensatz zum doppelsträngig modifizierten PCR-Produkt zwar stattfand, aber nur partiell. Teilweise wurden also beide Stränge des Heteroduplexes geschnitten und teilweise trat bei beiden Strängen keine Spaltung ein.

<i>EcoR</i> I	erwartete Spaltprodukte (Bp)	gefundene Spaltprodukte (Bp)
Überstand I	103 <sub>m</sub> , 71	103 <sub>m</sub> , 71
Überstand II	22	103 <sub>m</sub> , 71
Überstand III	18 <sub>m</sub> , bio	71 und der ungespaltene modifizierte Strang des Eduktes

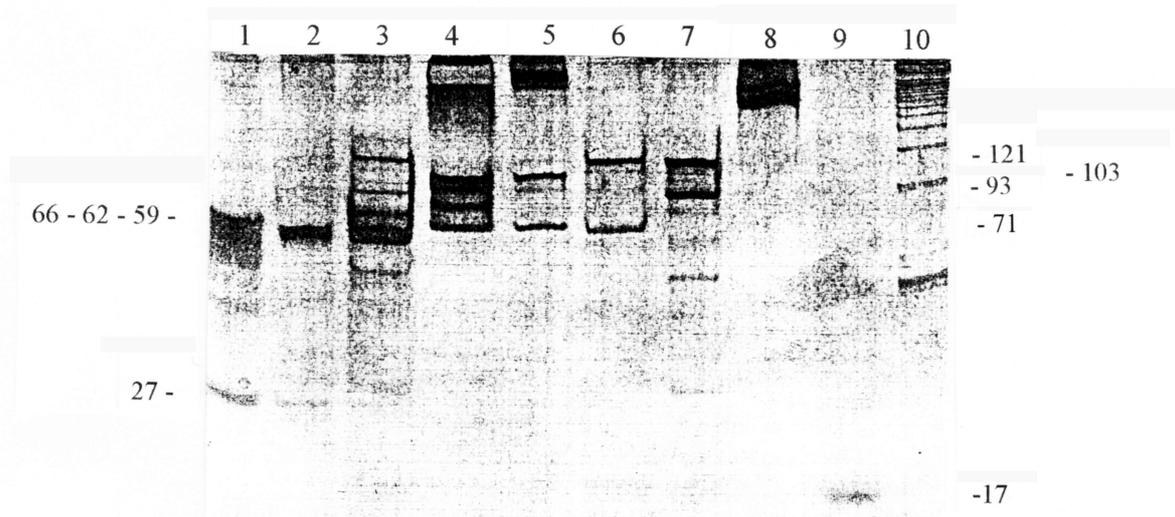
**Tabelle 5 :** Mögliche und gefundene Spaltprodukte bei der Restriktionsspaltung mit *EcoR* I unter der Annahme, daß die Restriktionsspaltung vollständig abläuft.

Die letzte Untersuchung mit *EcoR* I wies im ersten Überstand (nach der Spaltung entnommen) die beiden 103 und 71 Basenpaare langen DNA-Fragmente auf. Diese beiden Fragmente waren aber auch im zweiten Überstand zu finden. Hier war die Separierung des ersten Überstandes wahrscheinlich nicht vollständig gelungen. Das im zweiten Überstand erwartete Fragment von 22 Basenpaaren konnte nicht identifiziert werden. Diese kleinen Fragmente waren aber auch bei den anderen Spaltungen schon nur sehr schwach zu erkennen gewesen. Der dritte Überstand enthielt neben dem 71mer auch noch den ungespaltenen, modifizierten Einzelstrang des Eduktes. Dies konnte am besten mit dem nachfolgend dargestellten Verlauf der Restriktionsspaltung erklärt werden.



**Abbildung 61 :** Vermuteter Verlauf der Restriktionsspaltung unter Verwendung von *EcoR* I

Die erhaltenen Spaltprodukte deuten darauf hin, daß im Gegensatz zum doppelsträngig modifizierten PCR-Produkt hier beim doppelsträngigen, aber nur einzelsträngig modifizierten Edukt teilweise beide Stränge des Heteroduplexes geschnitten und teilweise nur der unmodifizierte Strang genickt wurde.



**Abbildung 62 :** Denaturierendes Polyacrylamidgel nach der Silberfärbung zur Kontrolle der Restriktionsspaltung des einzelsträngig modifizierten DNA-Fragmentes unter Verwendung von *Hind* III (Bahn 1-3) und *EcoR* I (Bahn 4-6). Bahn 1: Spaltung mit *Hind* III, Bahn 2: Spaltung mit *Hind* III und Denaturierung mit verdünntem Ammoniak, Bahn 3: Spaltung mit *Hind* III und Abspaltung von den Beads mit 2 M Ammoniak, Bahn 4: Spaltung mit *EcoR* I, Bahn 5: Spaltung mit *EcoR* I und Denaturierung mit verdünntem Ammoniak, Bahn 6: Spaltung mit *EcoR* I und Abspaltung von den Beads mit 2 M Ammoniak, Bahn 7: Edukt vor der Restriktionsspaltung (die langsam laufendere Bande markiert den modifizierten biotinylierten Strang des PCR-Produktes, die schneller laufende Bande stellt den verlängerten, unmodifizierten neu elongierten Strang dar), Bahn 8: 0,5 µl Restriktionsendonuklease *Alu* I, Bahn 9: biotinylierter Universal-Sequenzierungs-Primer (17mer) als Längenstandard, Bahn 10: 50 bp Längenstandard

Es war vermutet worden, daß beim Übergang vom doppelsträngig modifizierten PCR-Produkt zum nur einzelsträngig modifizierten DNA-Doppelstrang die Restriktionsendonukleasen, die das doppelsträngig modifizierte PCR-Produkt nicht spalten konnten, in diesem Versuch nur den unmodifizierten Strang schneiden würden und der modifizierte ungespalten aus dem Experiment hervorgehen würde. Diese Hypothese konnte aber nicht bestätigt werden, da *BamH* I, welches nicht dazu in der Lage war, das doppelsträngig modifizierte PCR-Produkt zu schneiden, beide Stränge des Heteroduplexes spalten konnte. Auch bei Verwendung der Restriktionsendonuklease *Hind* III war im ersten Überstand ein Fragment mit einer Länge gefunden worden, die nur mit der Spaltung des modifizierten Stranges zu erklären war. Zusätzlich trat auch bei der Spaltung mit *EcoR* I ein ca. 103 Basenpaar langes Fragment auf,

welches sich deutlich von den 93 und 121 Basenpaar langen Ausgangs-Strängen abzeichnete. Dieses 103mer konnte nur durch die Spaltung des modifizierten Stranges entstanden sein. Daraus ließe sich schließen, daß die Anwesenheit eines unmodifizierten Stranges die Spaltung des modifizierten Stranges erleichtert. Beim Einsatz von *EcoR* I war im Überstand III aber auch der ungespaltene modifizierte Ausgangs-Strang noch deutlich zu erkennen. Das bedeutet, daß die Restriktionsendonukleasen den einen modifizierten Strang viel langsamer spalten können als den unmodifizierten Strang.

Insgesamt konnte der nur einzelsträngig modifizierte Doppelstrang von den getesteten Restriktionsendonukleasen wesentlich besser gespalten werden als das doppelsträngig modifizierte PCR-Produkt.

Restriktionsexperimente an einer Heteroduplex-DNA, bei welcher der modifizierte Strang zwei Nukleotidanaloga - für Adenosin und Thymidin - enthielt, wurden schon von Perrin et al. <sup>[176]</sup> durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, daß sich die beiden Modifikationen in ihren Möglichkeiten zur Wasserstoffbrückenbindung von den natürlichen Nukleotiden unterscheiden, war es nicht verwunderlich, daß der modifizierte Strang nicht von *Hind* III und *Xba* I geschnitten wurde. Erstaunlich war aber, daß auch *Xma* I, eine Restriktionsendonuklease, die kein Adenosin und Thymidin in der Erkennungssequenz enthält, im Gegensatz zu den hier gewonnenen Erkenntnissen und den Experimenten von Seela et al. <sup>[63]</sup> und Grime et al. <sup>[184]</sup> bei Perrin et al. <sup>[176]</sup> nicht in der Lage war, den modifizierten Strang zu spalten.

## **4.5 Stabilitätsprüfung des modifizierten 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates**

Die Darstellung des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates erfolgte, um ein Nukleosidtriphosphat zu synthetisieren, welches zunächst von DNA-Polymerasen in enzymatischen Tests - wie zum Beispiel PROBE, Primer Extension oder PCR - akzeptiert werden konnte, welches aber außerdem zu DNA-Fragmenten führte, die trotz Modifikation von Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden und welches wegen der C-glykosidischen Bindung der Depurinierung von DNA-Fragmenten im Verlauf der MALDI-TOF massenspektrometrischen Analyse entgegenwirken konnte.

Die nachfolgenden Untersuchungen beschäftigten sich alle mit der Frage, ob ein Einbau von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat bei der MALDI-TOF massenspektrometrischen Analyse wirklich zu stabileren DNA-Produkten führt als die Inkorporation des natürlichen 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphates.

### **4.5.1 MALDI-Vermessung des Triphosphates**

Es wurde versucht, die Stabilitätsunterschiede von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat, 2'-Desoxy-7-deazaadenosin-5'-O-triphosphat und 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat allein durch Vermessung der Triphosphate per MALDI zu erhalten. Hierbei konnten aber keine Unterschiede im Depurinierungsverhalten festgestellt werden. Um Aussagen über die Stabilität machen zu können, mußten daher längere DNA-Abschnitte verglichen werden.

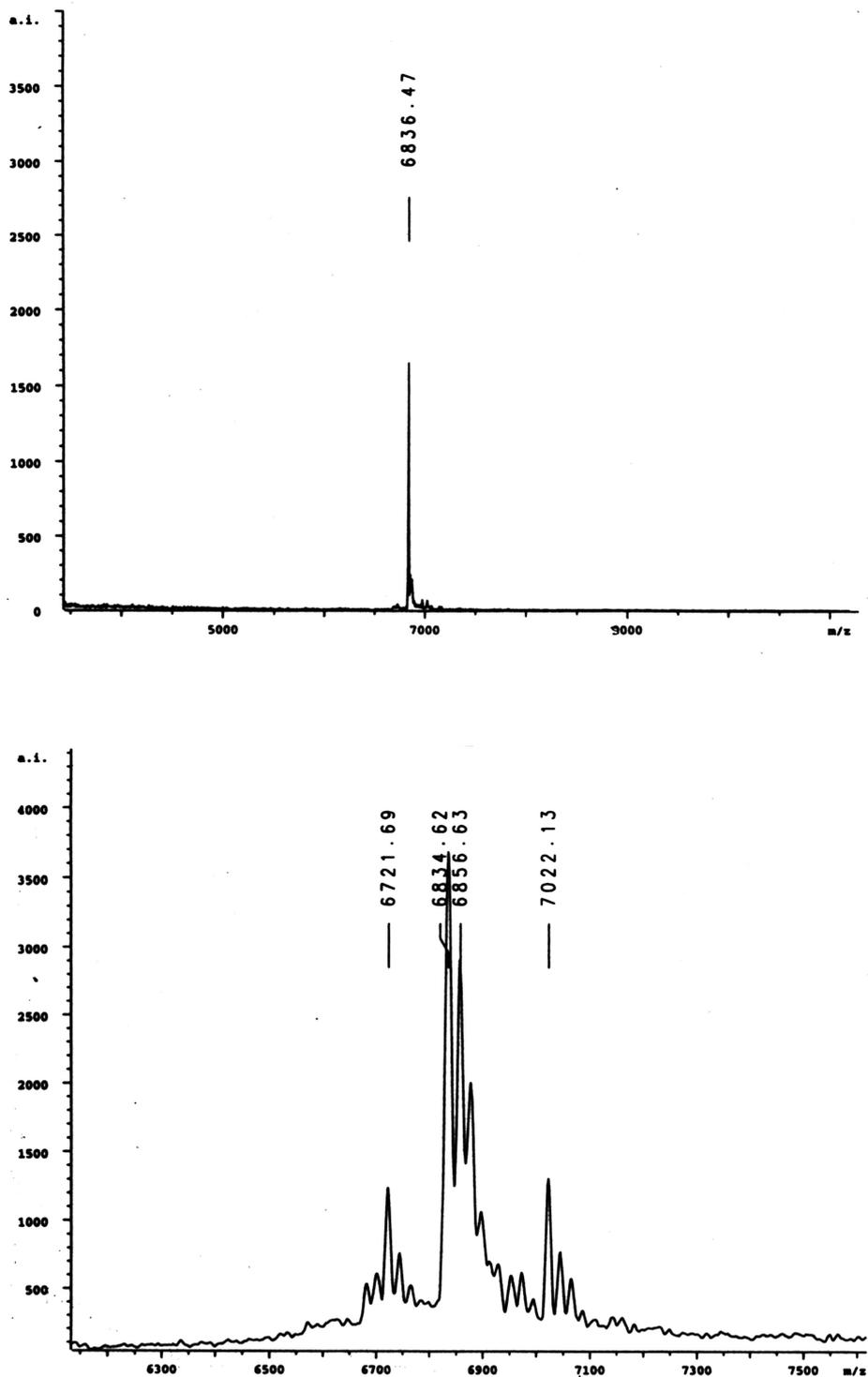
#### 4.5.2 MALDI-Vermessung einer PROBE-Reaktion mit einem C/T-Primer

Es wurde ein Primer-Template-System kreiert, bei welchem der nur aus Cytidin und Thymidin bestehende Primer mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase *Thermo-Sequenase* unter Verwendung einer ddTTP-Stopplösung um zwei Desoxyadenosinmonophosphate und ddTMP, bei Verwendung einer ddCTP-Stopplösung um AATA und ddC und mit einer ddGTP-Stopplösung um AATACAA und ddG verlängert werden sollte. Es wurde dabei bei jeder Stopplösung ein Mix der vier natürlichen Nukleosidtriphosphate, ein Mix mit  $c^7$ dATP und ein Mix mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat verwendet. Nachfolgend sind das Template, der eingesetzte Primer und die mit der jeweiligen Stopplösung entstandenen DNA-Fragmente abgebildet.

C TCT CTT CTC CCT CC	4366 Da	Primer
C TCT CTT CTC CCT CCA <i>AddT</i>	5280 Da	ddTTP-Stop
C TCT CTT CTC CCT CCA <i>ATA ddC</i>	5882 Da	ddCTP-Stop
C TCT CTT CTC CCT CCA <i>ATA CAA ddG</i>	6837 Da	ddGTP-Stop
3'-CTG <u>CCG AGA GAA GAG GGA GGT</u> TAT GTT CGA AGA AGA TC-bio-5' 38mer		

Bei diesem nur aus Cytidin und Thymidin gebildeten Primer wurde kein Basenverlust erwartet. Wenn durch die Verlängerung um zwei, drei oder fünf Adenosinmonophosphate ein Basenverlust beobachtet würde, wäre er auf die Depurinierung des Adenosins zurückzuführen.

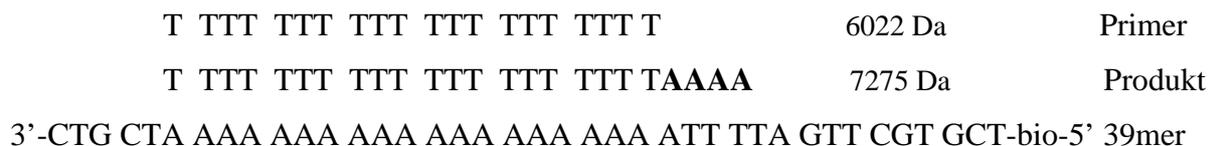
Zuerst wurden die erhaltenen Proben bei geringer Laserenergie per MALDI-TOF vermessen, um den Erfolg der PROBE-Reaktion zu überprüfen. Dabei konnten alle erwarteten Massen nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Laserenergie führte bei allen untersuchten Proben zu einer Abspaltung der Cytosinbase (Abbildung 63), so daß kein Stabilitätsvergleich möglich war. Dieses Experiment zeigte, daß nicht nur die Purinbasen leicht abgespalten werden können, sondern daß auch die N-glykosidische Bindung des Cytidins bei der MALDI-TOF massenspektrometrischen Analyse labil ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse mußte - um die unterschiedlichen Stabilitäten von dATP,  $c^7$ dATP und dA\*TP nachzuweisen - ein weiteres Experiment mit einem Primer, der nur Tymidin enthielt, durchgeführt werden.



**Abbildung 63** : *oben* MALDI-TOF-Massenspektrum der Positivkontrolle des mittels einer PROBE-Reaktion um dAdAdTdAdCdAdAddG verlängerten Primers (Masse 4366 Da) bei der Vermessung mit niedriger Laserenergie. *unten* MALDI-TOF-Massenspektrum der gleichen Probe bei höherer Laserenergie. Die erwartete Masse des Produktes von 6837 Da wurde verifiziert, aber bei höherer Laserenergie konnte vor allem der Basenverlust des Cytosins (6721 Da) beobachtet werden. Zusätzlich trat eine Addition von einem, zwei oder mehreren Natriumionen (+22) und die Adduktbildung mit Citrat (7022 Da) auf.

### 4.5.3 MALDI-Vermessung einer PROBE-Reaktion mit einem T-Primer

Bei dieser PROBE-Reaktion sollte ein Poly-T-Primer eines Primer-Template-Systems durch Zugabe von dATP,  $c^7$ dATP oder dA\*TP mit Hilfe der DNA-Polymerase *ThermoSequenase* um vier Nukleotide verlängert werden. Nachfolgend ist das Primer-Template-System und das erwartete Produkt dargestellt:

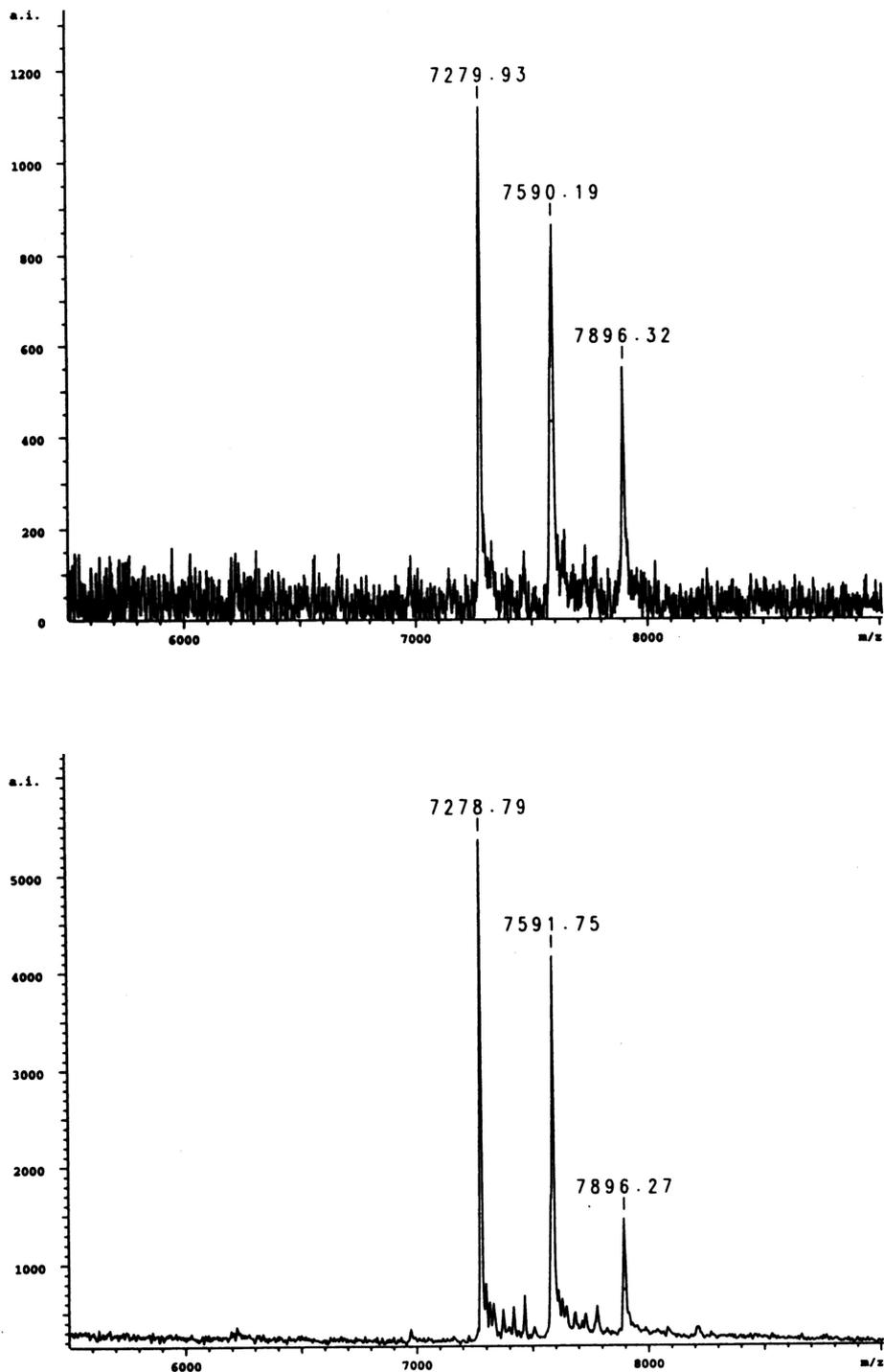


Aufgrund der vielen Möglichkeiten für eine Fehlhybridisierung wurde mit keiner großen Ausbeute bei diesem Versuch gerechnet. Die Fehlhybridisierungen sollten aber von der DNA-Polymerase auch nicht verlängert werden, so daß nur ein Produkt erwartet wurde. Es zeigte sich aber bei Vermessung der Proben bei normaler Laserenergie, daß der Primer nicht nur um vier, sondern auch um fünf Nukleotide verlängert wurde. Der Einbau eines „extra“ Nukleotids wurde schon bei vielen Polymerasen - besonders bei *Taq* - beobachtet und tritt besonders häufig in Anwesenheit von dATP auf <sup>[141, 164, 185]</sup>. Bei diesem Experiment fand der Einbau eines „extra“ Nukleotids bei Verwendung der *ThermoSequenase* statt.

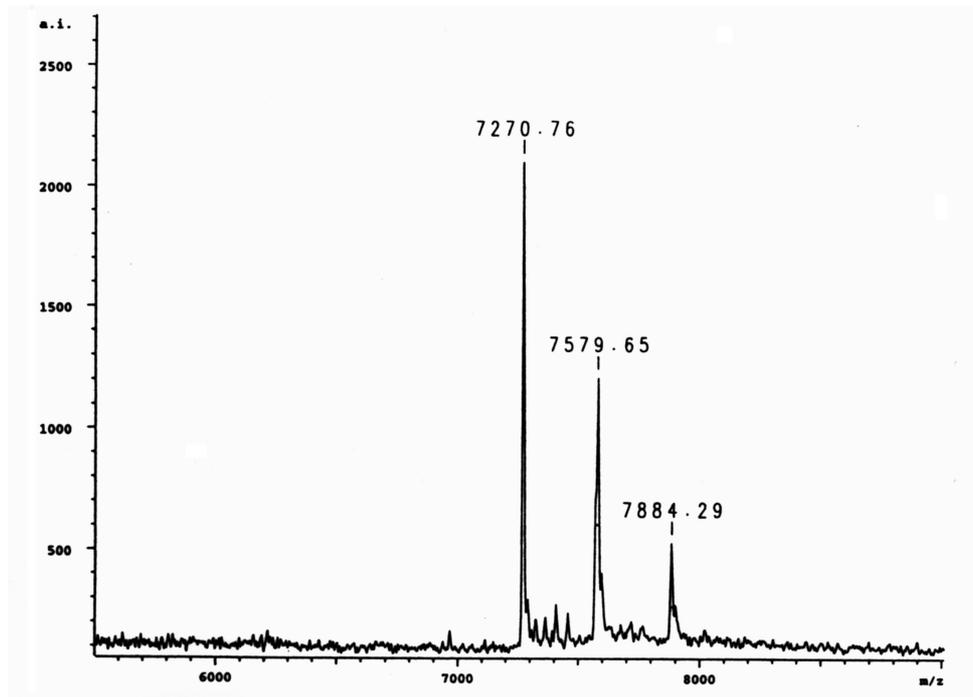
Da das zusätzlich auftretende Produkt die Intensität des erwarteten Produktes verringerte und bei Vermessung unter erhöhter Laserenergie zu einer Komplexierung des erwarteten Depurinierungsspektrums führen würde und um den zusätzlichen Nukleotideinbau zu minimieren, wurden die Reaktionsbedingungen der PROBE-Reaktion variiert. Die Annealingtemperatur wurde in 5 °C-Schritten von 40 °C bis 55 °C verändert. Eine zu hohe Annealingtemperatur bewirkt, daß der Primer-Template-Komplex gespalten wird, ohne daß eine Verlängerung stattgefunden hat. Eine zu niedrige Annealingtemperatur ermöglicht die unspezifische Anlagerung des Primers. Gleichzeitig wurde die Zyklenzahl zwischen fünf und zehn Zyklen variiert. Bei 55 °C war kaum noch eine Verlängerung des Primers zu beobachten. Das bedeutete, daß bei dieser Temperatur der Primer-Template-Komplex zu schnell wieder gespalten wurde.

Bei allen untersuchten Variationen waren mindestens zwei Produkte - seltener auch drei Produkte - durch den Anhang von einem und zwei zusätzlichen Nukleotiden zu sehen, aber die zufriedenstellendste Kombination trat bei 40 °C und 10 Zyklen und zum Zweiten bei 45 °C

und 10 Zyklen auf. Diese beiden Variationen wurden bei der PROBE-Reaktion ausprobiert. Die erhaltenen Proben wurden zuerst mit normaler Laserenergie vermessen.



**Abbildung 64** : *oben* MALDI-TOF-Massenspektrum der Positivkontrolle des mittels dATP um vier (7279 Da), fünf (7590 Da) und sechs (7896 Da) Nukleotide verlängerten Primers (Masse 6022 Da). *unten* MALDI-TOF-Massenspektrum des unter Verwendung von dA\*TP um vier (7278 Da), fünf (7591 Da) und sechs (7896 Da) Nukleotide verlängerten Primers.

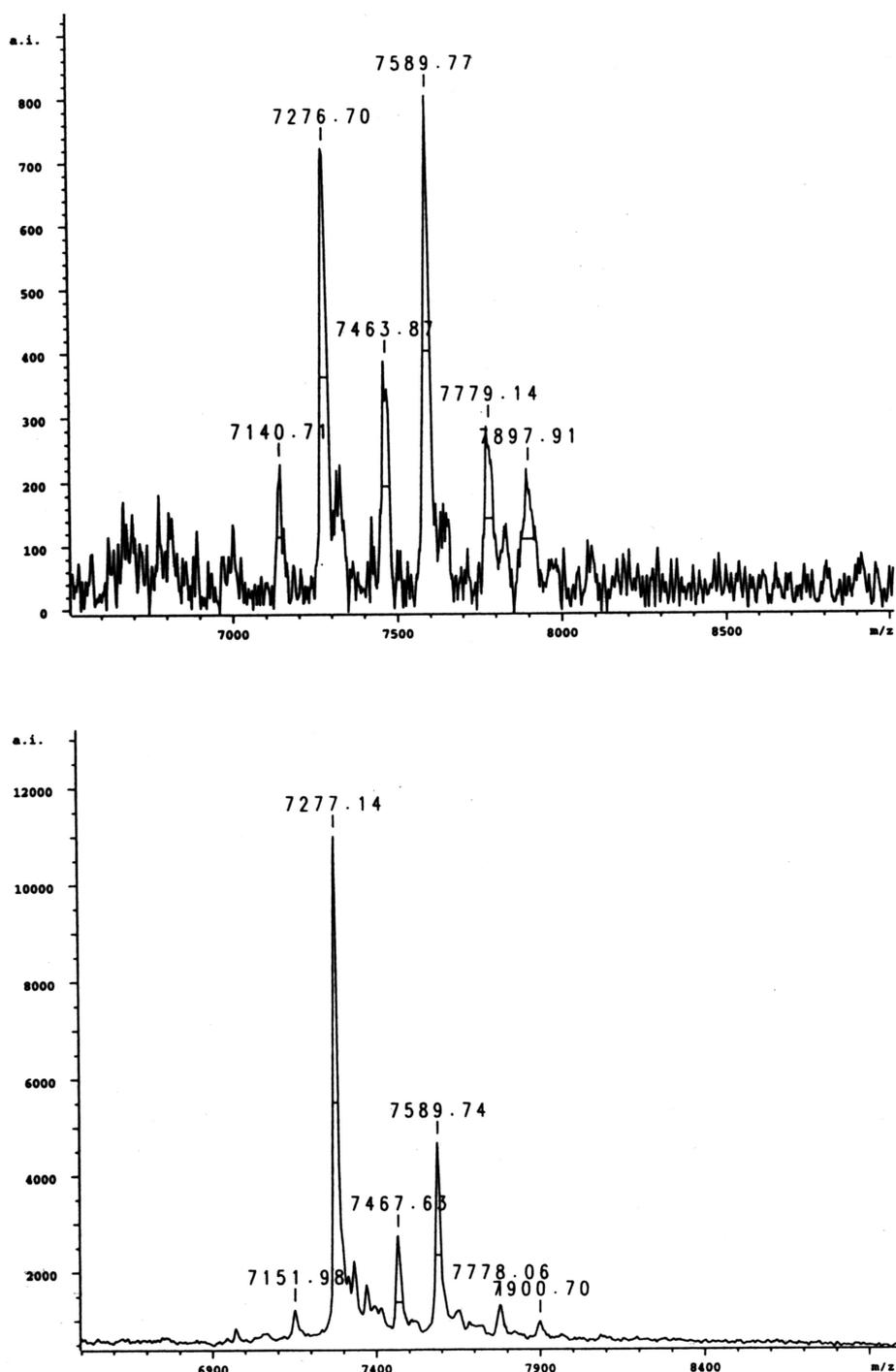


**Abbildung 65 :** MALDI-TOF-Massenspektrum des unter Einsatzes von  $c^7$ dATP um vier (7270 Da), fünf (7579 Da) und sechs (7884 Da) Nukleotide verlängerten Primers.

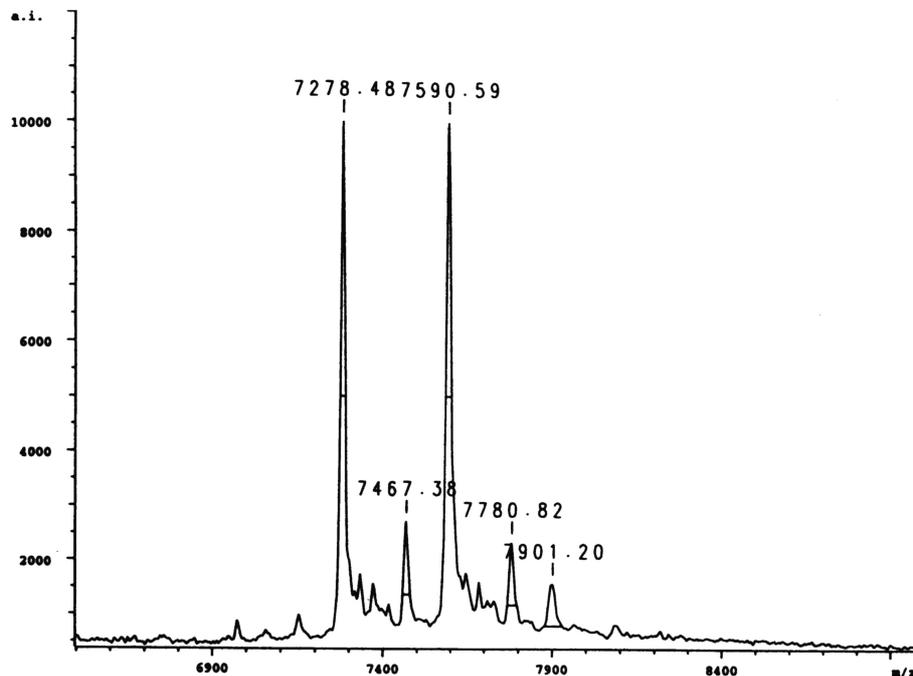
Nachdem sich ergeben hatte, daß der Versuch erfolgreich verlaufen war, wurden die Proben mit erhöhter Laserenergie untersucht. Dabei konnte trotz der zusätzlich eingebauten Nukleotide eindeutig gezeigt werden, daß die mit  $dA^*TP$  und  $c^7$ dATP hergestellten Proben im Gegensatz zur dATP-Probe wesentlich stabiler gegenüber einer Depurinierung waren.

Die Massendifferenz von 136 Da zwischen dem mittels dATP um vier Nukleotide verlängerten Poly-T-Primers (7276 Da) und dem ersten Signal bei 7140 Da (Abbildung 66 oben) wiesen deutlich auf eine Depurinierung hin. Eine Depurinierung des um fünf und sechs Nukleotide verlängerten Primers, welche Signale bei 7454 Da und 7762 Da ergeben würde, war nicht sichtbar, da die möglichen Peaks von den durch Citrataddition entstandenen Signalen überlagert wurden.

In den MALDI-Spektren des mittels  $dA^*TP$  (Abbildung 66 unten) oder  $c^7$ dATP verlängerten Primers (Abbildung 67) traten neben den Peaks für die Verlängerung um vier, fünf und sechs Nukleotide nur die Citrataddukte auf. Eine deutliche Depurinierung des um vier Nukleotide elongierten Primers war nicht sichtbar.



**Abbildung 66** : *oben* MALDI-TOF-Massenspektrum der Positivkontrolle bei der Vermessung mit erhöhter Laserenergie. Die Signale bei 7276,7 Da, 7589,8 Da und 7897,9 Da kennzeichnen den um vier, fünf und sechs Nukleotide verlängerten Primer. Das Signal bei 7140,7 Da zeigt die Depurinierung des um vier Nukleotide verlängerten Primers an. Die Depurinierungsspeaks des um fünf und sechs Nukleotide elongierten Primers, die bei 7455 Da und 7763 Da liegen, sind von Citratadditionsspeaks überlagert und deshalb nicht sichtbar. *unten* MALDI-TOF-Massenspektrum des mittels dA\*TP um vier (7277 Da), fünf (7589 Da) und sechs (7900 Da) Nukleotide verlängerten Primers bei Vermessung mit höherer Laserenergie. Das im obigen Spektrum deutlich sichtbare Depurinierungssignal des um vier Nukleotide verlängerten Primers mit einer Masse von 7142 Da ist hier nicht zu erkennen. Die beiden kleinen vorgelagerten Signale (7151 Da) ergeben sich aufgrund von Verunreinigungen und sind nicht auf eine Depurinierung zurückzuführen. Die weiteren möglichen Depurinierungsspeaks (7454 Da und 7765 Da) wären auch hier wieder durch die Signale der Citrataddition (7467 Da) verdeckt.



**Abbildung 67** : MALDI-TOF-Massenspektrum des mittels  $c^7$ dATP um vier (Masse 7278 Da), fünf (Masse 7590 Da) und sechs (7901 Da) Nucleotide verlängerten Primers bei der Vermessung mit höherer Laserenergie. Wie in Abbildung 66 unten ist auch hier kein Signal für die Depurinierung des um vier Nucleotide elongierten Primers (erwartete Masse 7143 Da) zu erkennen. Die beiden kleinen vorgelagerten Signale ergeben sich aufgrund von Verunreinigungen und sind nicht auf eine Depurinierung zurückzuführen. Die möglichen weiteren Depurinierungspeaks bei 7455 Da und 7766 Da wären auch hier von den Signalen, welche durch Citrataddition (+ 190 Da) auftreten, verdeckt.

Mit Hilfe der hier durchgeführten Versuche wurde insgesamt gezeigt, daß

- das modifizierte Desoxynucleosidtriphosphat in DNA inkorporiert werden konnte.
- die Wechselwirkungen mit den Restriktionsendonucleasen so weit verbessert werden konnten, daß zum Beispiel *Alu I* in der Lage war, DNA-Fragmente, die das modifizierte Nucleotid enthielten, zu schneiden.
- DNA-Abschnitte, die das modifizierte Nucleotid enthielten, gegenüber einer Depurinierung stabiler waren als unmodifizierte DNA-Fragmente.

## IV Diskussion

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie stellt eine zukunftsweisende, schnelle, einfache und genaue Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von polymeren Verbindungen dar. Auch in der Detektion und Analytik von DNA hat sich die MALDI-TOF Massenspektrometrie bewährt und bietet in zahlreichen Fällen, insbesondere in Bereichen mit hohem Probenaufkommen, bereits eine ernsthafte Alternative zur Gelelektrophorese. Im Vergleich zu gelelektrophoretischen Verfahren ist die Zeitdauer einer Messung in der Massenspektrometrie zur Dauer der enzymatischen Reaktion vernachlässigbar. Außerdem ist bei der Gelelektrophorese ein Markieren oder Färben der Probe zur Detektion notwendig und die Molekulargewichtsinformation wird nur indirekt über den Vergleich von Mobilitäten von Vergleichsmolekülen gewonnen, während in der Massenspektrometrie der Analyt direkt und unmittelbar über seine Masse mit einer hohen Genauigkeit detektiert wird. Um das Auflösungsvermögen und damit die Massengenauigkeit weiter zu erhöhen, kann einmal der MALDI-Prozeß selbst durch die Entwicklung neuer Geräte optimiert werden. Daneben bietet die Suche nach neuen Matrices und der Einsatz von Nukleosidtriphosphatanaloga zur Stabilisierung des zu untersuchenden DNA-Fragmentes eine weitere Möglichkeit der Verbesserung. Durch chemische Modifikationen ist es möglich, Fragmentierungen von DNA unter Bedingungen der MALDI-TOF Massenspektrometrie zu unterbinden. So stellt zum Beispiel die Verwendung von N<sup>7</sup>-Deazapurintriphosphaten zur Synthese von modifizierten Nukleinsäuren eine sehr einfache Methode dar, die Qualität der Spektren auch auf bereits vorhandenen MALDI-TOF Massenspektrometern erheblich zu verbessern.<sup>[169]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wird die lineare Synthese von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat (dA<sup>\*</sup>TP) und der biochemische Einsatz des Desoxynukleosidtriphosphatanalogons zur DNA-Analytik und MALDI-TOF Massenspektrometrie beschrieben.

Bei der Nukleosiddarstellung wurde die Ausbeute innerhalb der achtstufigen, linearen Synthese bis zum 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-β-D-ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidin **9** (geschütztes Nukleosid) zwar von 1,55 %<sup>[85]</sup> auf 5,94 % gesteigert, aber in Hinblick auf die noch folgende Desoxygenierung, Schützung und Triphosphatsynthese verliefen diese ersten acht Stufen der 22 stufigen, linearen Synthese bis zum Triphosphat mit geringer Ausbeute. Daher wäre eine Änderung der Synthesestrategie, indem die lineare

Synthese durch eine konvergente ersetzt wird, zur Darstellung des modifizierten Desoxynukleosids zu diskutieren.

Die lineare Synthese der Purinderivate entspricht dem Weg der de novo Purinbiosynthese. Auch hier wird der Heterozyklus schrittweise an der Ribose aufgebaut. Eine konvergente Synthese - in diesem Fall die Synthese eines geschützten Zuckers und eines Heterozyklus mit anschließender Glykosidierung - entspricht dagegen dem Salvage Pathway. Bei dieser Wiederverwertungsreaktion können Purinnukleotide aus freien Purinbasen, die durch den hydrolytischen Abbau von Nukleinsäuren entstanden sind, zurückgewonnen werden.

Die konvergente Synthese gelang bei der Darstellung der 7-Deazanukleoside durch Glykosidierung der Pyrrolo[2,3-d]pyrimidinderivate <sup>[186]</sup>, aber die Glykosidierungsreaktion der modifizierten Base war der Engpaß dieser Synthese. So wurde neben zahlreichen Verbesserungen der Reaktionsbedingungen auch der Zugang zu den 7-Deazanukleosiden über den Aufbau des Ringsystems an dem Zucker versucht <sup>[187]</sup>. Diese 7-Deazapurine enthielten aber noch die N-glykosidische Bindung, während das erste Zielmolekül dieser Arbeit, das 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin, eine C-glykosidische Bindung besitzt.

Die Synthese von 9-Deazanukleosiden, welche eine C-glykosidische Bindung enthalten, wurde zuerst von Klein und Lim durch Synthese des Heterozyklus an der geschützten Ribose beschrieben <sup>[74, 188]</sup>. 1990 veröffentlichten Girgis et al. eine konvergente Synthese für die 9-Deazaguanosindarstellung <sup>[189]</sup>. Entscheidend für die direkte elektrophile C-Glykosidierung war dabei die Elektronendichte an C-9, die im Falle des 9-Deazaguanins groß genug war. Die direkte Glykosidierung von 7,9-Dideaza-7-oxoadenin wurde in der Literatur noch nicht erwähnt. Diese konvergente Synthese wäre auch nur dann von Vorteil, wenn die Darstellung des Heterozyklus relativ schnell und in guten Ausbeuten gelänge.

Bei den bisher erwähnten chemischen Nukleosidsynthesen wurde das Purinnukleosid entweder durch Glykosidierung einer Base mit geschützter Desoxyribose oder durch den Aufbau des Heterozyklus an der Ribose und anschließender 2'-Desoxygenierung erhalten. Die de novo Purinbiosynthese verläuft dagegen am 5-Phosphoribosyl-1-amin und führt daher direkt zu den Monophosphaten. Diese Monophosphate werden durch Kinasen in die entsprechenden Di- und Triphosphate überführt. Auf chemischem Wege stehen haupt-sächlich

zwei Wege zur Triphosphatsynthese zur Verfügung. Nach Hoard/Ott <sup>[132]</sup> und Yoshikawa <sup>[131]</sup> sowie nach Ludwig <sup>[190]</sup> können 2'-Desoxynukleoside ohne vorherige Schützung in die Triphosphate überführt werden. Dies gelang, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, aber nicht bei allen 2'-Desoxynukleosiden. Matulic-Adamic et al. <sup>[143]</sup> fanden heraus, daß sich einige Triphosphate aus ungeschützten 2'-Desoxynukleosiden synthetisieren ließen und andere auf diesem Wege nicht herstellbar waren. Ein Darstellungsweg, der dagegen immer funktionierte, war der nach Ludwig und Eckstein <sup>[137]</sup>, welcher vom 3'- und an der Aminofunktion geschützten 2'-Desoxynukleosid ausgeht. Bei beiden Wegen wurde in Anlehnung an die Purinbiosynthese erst das Monophosphat hergestellt, welches dann durch ein Pyrophosphatreagenz gleich in das Triphosphat überführt wurde.

Im biochemischen Teil dieser Arbeit wurde das selbst synthetisierte, modifizierte Nukleotid zuerst in PROBE-Reaktionen (**P**rimers **O**ligo **B**ase **E**xtension-Reaktion) eingesetzt. Der Ergebnisvergleich zweier PROBE-Reaktionen - eine mit einer mit BSA behandelten Triphosphatrolösung, eine mit gereinigtem Triphosphat durchgeführt - zeigte deutlich, daß auf die gründliche Reinigung in diesem Fall nicht verzichtet werden konnte. Nachdem in weiteren PROBE-Reaktionen die Inkorporation des modifizierten Nukleosidtriphosphates **50** bestätigt worden war, wurden verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das modifizierte Nukleosidtriphosphat einzubauen. Dies geschah an einem schon vielfach ausgetesteten PCR-System, bei welchem an einem 87mer Template mittels zweier 19 Basenpaar langer Primer ein doppelsträngiges 48mer amplifiziert wurde <sup>[177]</sup>. Von den 10 getesteten Polymerasen bauten fünf ( (exo-)Vent, (exo-)DeepVent, Thermo-Sequenase, Pwo und UITma ) das modifizierte Nukleotid gut ein. Erstaunlich war dabei, daß die DNA-Polymerase Pwo, obwohl sie eine Proofreading-Aktivität besitzt, die Modifikation einbaute, während (exo-)Taq und (exo-)Pfu, welche keine solche 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzen, 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** kaum inkorporierten.

Lutz et al. <sup>[141]</sup> hatten neun verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen innerhalb einer Primer-Extension auf ihre Fähigkeit hin getestet, dATP gegenüber von Pseudothymidin, welches im Template eingebaut war, zu inkorporieren. Sie stellten fest, daß Polymerasen mit Proofreading-Aktivität dazu neigen, den Primer abzubauen anstatt dATP gegenüber von Pseudothymidin einzubauen. Außerdem erwies sich an dieser Stelle (exo-)Taq als die DNA-

Polymerase, welche am besten geeignet war, Pseudothymidin während einer PCR zu inkorporieren. In einem anderen Experiment untersuchten Lutz et al. <sup>[191]</sup> die Fähigkeit verschiedener DNA-Polymerasen PNA-Primer während einer Primer-Extension zu elongieren. Hier war *Pwo* der (exo-)*Taq*-Polymerase weit überlegen.

Eine weitere Untersuchung, in welcher Ono et al. <sup>[61]</sup> den Einbau von 2'-Fluor-2'-desoxynukleosidtriphosphaten in einer Primer-Extension unter Verwendung verschiedener DNA-Polymerasen testeten, ergab, daß (exo-)*Pfu*, (exo-)*Vent*, (exo-)*DeepVent* und *UITma* diese Modifikationen am besten einbauten. Ein potentiell wichtiger Faktor für die effiziente Extension eines Primers durch DNA-Polymerasen ist die An- bzw. Abwesenheit der 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche ein schon eingebautes, modifiziertes Nukleotid wieder ausschneiden kann. In einem Vergleich der Wildtyp-DNA-Polymerasen mit ihren (exo-)-Varianten zeigten Ono et al. <sup>[61]</sup>, daß die Polymerasen ohne Proofreading-Aktivität die 2'-Fluor-2'-desoxynukleosidtriphosphate viel besser inkorporierten als die Wildtyp-DNA-Polymerasen. Der Verlust der 3'-5'-Exonukleaseaktivität führt aber auch zu einem Anstieg der Fehlinkorporationen während einer PCR. Ein Anstieg der Misinkorporation während einer PCR wird auch durch Zugabe von  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -Ionen beobachtet. Ono et al. <sup>[61]</sup> folgerten daraus, daß eine erhöhte Magnesiumkonzentration die Proofreadingaktivität erniedrigt und damit den besseren Einbau von 2'-Fluor-dNTPs durch Wildtyp-DNA-Polymerasen mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität ermöglicht. Diese Vermutung wurde anhand von *UITma*, *Pfu*, *Vent* und *DeepVent* bestätigt.

Von den 5 DNA-Polymerasen, die in der Lage waren, 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** gut einzubauen, besaßen *ThermoSequenase*, (exo-)*Vent* und (exo-)*DeepVent* keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. *UITma* und *Pwo* haben eine 3'-5'-Proofreading-Aktivität, aber die Magnesiumionenkonzentration im mitgelieferten Reaktionspuffer lag bei 2 mM und damit in dem Bereich, in dem - wie Ono et al. <sup>[61]</sup> gezeigt haben - die Proofreading-Aktivität eingeschränkt ist.

Unter Beibehaltung der PCR-Bedingungen (Zyklenzahl und Temperatur) wurde die Länge des zu amplifizierenden Templates erhöht und damit die Schnelligkeit der DNA-Polymerasen untersucht. Eine Erhöhung der Länge des zu amplifizierenden Templates bis hin zu 729 Basenpaaren zeigte, daß nur noch *Pwo* die Modifikationen schnell - und ohne danach zu

pausieren - inkorporieren konnte. Das Enzym mit Proofreading-Aktivität und einer Fehlerrate von ungefähr  $2 \times 10^{-4}$  Fehlern/Base<sup>[192]</sup> war damit im Einbau der Modifikation schneller als (exo-) *DeepVent* ohne 3'-5'-Exonukleaseaktivität, (exo-) *Vent* mit einer Fehlerrate von  $190 \times 10^{-6}$  Fehlern/Base<sup>[193]</sup> und ohne 3'-5'-Exonukleaseaktivität und *ThermoSequenase* ohne Exonukleaseaktivität und mit einer Genauigkeit von 98,5 %<sup>[194]</sup>.

Die Synthese von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat erfolgte mit dem Ziel, eine unter MALDI-Bedingungen stabilere und von Restriktionsendonukleasen spaltbare DNA amplifizieren zu können. Eine deutliche Verbesserung der Stabilität von zu untersuchender DNA war schon Siegert et al.<sup>[49]</sup> durch den Einsatz von 7-Deazanukleosid-5'-triphosphaten und Ono et al.<sup>[61]</sup> durch die Verwendung von 2'-Fluornukleosidtriphosphaten gelungen. Jetzt sollte mit der neuen Modifikation neben der später noch diskutierten Stabilität vor allem die Spaltbarkeit so modifizierter DNA-Fragmente durch Restriktionsendonukleasen bewiesen werden.

Bei dem gelelektrophoretischen Vergleich der unmodifizierten und modifizierten DNA-Fragmente war deutlich zu erkennen, daß sich die 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** enthaltenden DNA-Fragmente durch eine geringere Mobilität auszeichneten. Dieses auch von Li et al.<sup>[195]</sup> bei der Inkorporation von N<sup>7</sup>-Cyanoboran-2'-desoxyguanosin-5'-O-triphosphat beobachtete Phänomen könnte durch eine größere Rigidität der modifizierten DNA aufgrund der etwas längeren C-glykosidischen Bindung, der sp<sup>2</sup>-Hybridisierung des Kohlenstoffes und der daraus resultierenden leicht veränderten Lage der Base erklärt werden.

Durch die Inkorporation von dA<sup>\*</sup>TP oder c<sup>7</sup>dATP, die den natürlichen 2'-Desoxy-nukleosid-5'-O-triphosphaten von der äußeren Gestalt ziemlich ähnlich sind, wurde die Geometrie der DNA aber nicht vollständig verändert, denn wie auch schon Seele et al.<sup>[63]</sup> und Grime et al.<sup>[184]</sup> mit c<sup>7</sup>dATP und c<sup>7</sup>dGTP gezeigt hatten, ließen sich die modifizierten Fragmente mit Restriktionsendonukleasen, welche kein A bzw. G in der Erkennungssequenz enthielten, schneiden. So wurde zum Beispiel die mit dA<sup>\*</sup>TP modifizierte DNA durch *Sma* I, einer Restriktionsendonuklease, die die Erkennungssequenz CCCGGG besitzt, vollständig gespalten. Perrin et al.<sup>[176]</sup> beobachteten dahingegen, daß durch den Einbau von zwei Modifikationen, die noch größere Reste an der Base trugen, die so veränderte DNA auch von Restriktionsendonukleasen, die keine Modifikation in der Erkennungssequenz haben, nicht

mehr geschnitten werden konnte. Als Begründung gaben sie an, daß die Erkennungssequenz wahrscheinlich von den Modifikationen flankiert und daher die Bindung des Enzyms inhibiert und/oder die Erkennungssequenz verzerrt worden war.

Das vollständig in beiden Strängen - bis auf die kurzen Primerregionen - mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** modifizierte DNA-Fragment wurde in weiteren Experimenten auch mit Restriktionsendonukleasen inkubiert, welche eine sechs-Nukleotid-lange Erkennungssequenz haben, die die Modifikation enthielt, und bei denen die Spaltung neben der Modifikation (*EcoR* I), zwischen zwei modifizierten Nukleotiden (*Hind* III) oder ein bzw. zwei Nukleotide entfernt (*BamH* I und *Xba* I) stattfand. Außerdem wurde mit *Alu* I eine Restriktionsendonuklease mit einer nur vier-Nukleotid-langen Erkennungssequenz verwendet, welche nicht direkt neben der Modifikation schneidet. Während keines der fünf untersuchten Enzyme die mit  $c^7$ dATP modifizierte DNA, aber alle die unmodifizierte DNA als Positivkontrolle spalteten, ergab sich bei der mit  $dA^*TP$  modifizierten DNA ein gemischtes Bild. Mit *Xba* I und *BamH* I konnte unter den Testbedingungen keine Spaltung registriert werden, obwohl die Schnittstelle nicht direkt neben der Modifikation lag. Auch bei *EcoR* I waren keine Spaltprodukte zu erkennen.

Um so erstaunlicher war die Tatsache, daß die mit  $dA^*TP$  modifizierte Polylinkersequenz aus M13mp18 mit *Hind* III, welches zwischen zwei Modifikationen spaltet, partiell geschnitten werden konnte. Entweder war an dieser Stelle die Verzerrung der DNA nicht so ausgeprägt oder die Nachbarschaft der beiden Adenosinanaloga bewirkte im Rahmen der gesamten Struktur eine gleichmäßigere - dem Original ähnlichere - Anordnung der Positionen, mit denen das Enzym in Wechselwirkung trat.

Außerdem konnte die mit  $dA^*TP$  modifizierte DNA von *Alu* I, einer Restriktionsendonuklease mit einer nur vier-Nukleotid-langen Erkennungssequenz, gespalten werden. Dies könnte daran liegen, daß die durch die Modifikation entstandene Veränderung der Gesamtstruktur bei dieser kürzeren Erkennungssequenz nicht so stark ausgeprägt war wie bei einer sechs-Nukleotid-langen Erkennungssequenz.

Um die Auswirkungen des Modifikationseinbaues besser studieren zu können, wurde ein nur in einem Strang modifiziertes DNA-Fragment aus pOM9 hergestellt und wieder mit den schon getesteten Restriktionsendonukleasen untersucht. *Alu* I konnte beide Stränge dieser

Hybrid-DNA wie erwartet spalten, aber auch mit *BamH* I gelang dieses Mal die vollständige Spaltung beider Stränge. *Hind* III, welches das doppelsträngig modifizierte, aus pOM9 amplifizierte 121mer nicht gespalten hatte, war in der Lage, teilweise die beiden Stränge der Hybrid-DNA zu schneiden. Beim anderen Teil der Hybrid-DNA wurden beide Stränge gar nicht gespalten. Dies bedeutet, daß die Spaltung sehr viel langsamer ablief als mit unmodifizierter DNA und daß wahrscheinlich beide Stränge relativ gleichzeitig geschnitten wurden, da kein genicktes Intermediat bzw. nur die beiden ungespaltenen Stränge zu beobachten waren. Auch *EcoR* I konnte die beiden Stränge der Hybrid-DNA teilweise schneiden und teilweise war deutlich zu erkennen, daß nur der unmodifizierte Strang vollständig genickt wurde. Abgesehen davon, daß die Restriktionsspaltung auch hier stark verlangsamt war, implizierte dieser Befund, daß die Restriktionsendonuklease die beiden Stränge unabhängig voneinander gespalten hat. Dieser Spaltungsmechanismus wurde auch von Eckstein et al.<sup>[196]</sup> bei der Untersuchung von DNA-Fragmenten, welche Phosphorthioate enthielten, für *EcoR* I aufgezeigt. Er konnte in einer zeitabhängigen Analyse der Spaltungsprodukte einzelsträngig modifizierter, doppelsträngiger DNA von M13mp9 zeigen, daß bei Inkubation mit *EcoR* I zuerst nur genickt, später dann vollständig gespalten wurde.

Neben dem Ziel, daß eine mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** modifizierte DNA noch von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden sollte, mußte die so modifizierte DNA auch eine erhöhte Stabilität gegenüber der Depurinierung aufweisen, um Vorteile im Vergleich mit den schon bekannten Modifikationen zu besitzen. Denn die Inkorporation von  $c^7$ dATP und  $c^7$ dGTP oder von den 2'-Fluoranaloga der natürlichen Desoxynukleosid-5'-O-triphosphate führte - wie schon erwähnt - zu DNA-Fragmenten, welche keine Depurinierung bei der MALDI-TOF massenspektrometrischen Analyse zeigten.

Die Depurinierung unter MALDI-TOF massenspektrometrischen Bedingungen wird durch die Protonierung der Base eingeleitet und führt dann zum Bruch der labilen N-glykosidischen Bindung. Bis jetzt wurden eine ganze Reihe von Modifikationen hergestellt, um die Depurinierung zu unterdrücken. Zum Beispiel erfolgte die Synthese der 7-Dezaanaloga der natürlichen Desoxynukleosidtriphosphate, um die Protonierung der Base zu verhindern. Die 2'-Fluoranaloga der natürlichen dNTPs wurden eingesetzt, da Fluor durch den Elektronenzug die N-glykosidische Bindung stabilisiert und die Nukleophilie am Stickstoffatom in Position 7 reduziert und so der Depurinierung entgegenwirkt. Auch der Einsatz von

Ribonukleosidtriphosphaten geschah aus dem gleichen Grund. Die C-Glykosidanaloga der dNTPs haben durch die C-glykosidische Bindung eine erhöhte Stabilität. Gemein ist allen Modifikationen, daß zwar die Depurinierung unterdrückt wurde, aber die enzymatischen Reaktionen nicht problemlos abliefen. Der Einsatz von 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat bewies aber, daß einige Restriktionsspaltungen auch mit modifizierter DNA gelingen.

Der Stabilitätstest - zum Nachweis der Depurinierungsunterdrückung - wurde durchgeführt, indem mit Hilfe einer Primer-Extension Reaktion ein Poly-T-Primer unter Verwendung eines Desoxynukleosidtriphosphatmixes, bestehend aus dATP, dGTP, dCTP und dTTP, oder  $c^7$ dATP und den restlichen natürlichen Desoxynukleosidtriphosphaten, oder  $dA^*TP$  und den restlichen natürlichen Desoxynukleosidtriphosphaten, um vier A verlängert wurde. Ein Vergleich der Extensionsprodukte per MALDI-TOF Massenspektrometrie ergab eindeutig, daß beim Einsatz der neuen Modifikation genauso wenig Depurinierung zu beobachten war wie bei Verwendung von  $c^7$ dATP. Damit konnten die beiden Erwartungen, die an das modifizierte 2'-Desoxynukleosid-5'-O-triphosphat gestellt worden waren, von diesem erfüllt werden.

Zusätzlich wurde bei der MALDI-TOF massenspektrometrischen Analytik der modifizierten DNA eine größere Intensität der Peaks gegenüber der unmodifizierten DNA bemerkt. Ein solcher Befund könnte durch die bessere Desorbierbarkeit von mit  $dA^*TP$  und  $c^7$ dATP modifizierter DNA erklärt werden. Um die Vermutung zu bestätigen, wurden zwei Mikrosatellitensequenzen amplifiziert und anschließend unter Verwendung von dATP bzw.  $c^7$ dATP oder  $dA^*TP$  in eine PROBE-Reaktion eingesetzt <sup>[197, 198]</sup>. Die erhaltenen MALDI-TOF-Spektren ließen keine eindeutige Aussage zu, was eventuell darauf zurückzuführen ist, daß bei dem Standardverfahren für PROBE-Reaktionen mit der DNA-Polymerase *Thermo-Sequenase* gearbeitet wurde und daß gerade dieses Enzym  $dA^*TP$  nicht sonderlich schnell einbaut. Zur genaueren Bestimmung, ob die Modifikation tatsächlich die Desorption verbessert, müßten im Anschluß an diese Arbeit zahlreiche Proben unter standardisierten Bedingungen, am besten durch automatisierte Probenauftragung auf einen Silicium-Chip und automatisierte Vermessung per MALDI-TOF Massenspektrometrie, untersucht und statistisch ausgewertet werden.

Neben der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Modifikation müßten zur Verhinderung des Basenverlustes unter MALDI-Bedingungen auch noch das entsprechend modifizierte dG\*TP und dC\*TP hergestellt werden. Denn wie bei der Untersuchung eines mit Adenosin verlängerten C/T-Primers festgestellt wurde, ist auch bei Cytosin die N-glykosidische Bindung unter MALDI-TOF massenspektrometrischen Bedingungen nicht stabil. Dieser Befund zeigt, daß die säurekatalysierte Hydrolyse der Nucleoside doch kein so gutes Modell für die Erklärung der Depurinierung unter MALDI-TOF massenspektrometrischen Bedingungen - bei welchen die Reaktionen in der Gasphase stattfinden - darstellt. Während A und G bei der säurekatalysierten Hydrolyse säurelabil sind, ist C säurestabil. Eine Übertragung des Modells auf den MALDI-Prozeß müßte daher eine Stabilität von C und T gegenüber einer Labilität von A und G ergeben. Experimente zeigen aber, daß unter MALDI-TOF massenspektrometrischen Bedingungen nur T stabil ist.

Außer den hier diskutierten Modifikationen wird auch der Einsatz von massenmodifizierten Nucleotiden zur Vergrößerung des Massenunterschiedes zwischen A und T zur besseren massenspektrometrischen Sequenzierung von DNA angestrebt <sup>[199]</sup>. Für eine optimale Inkorporation all dieser modifizierten Nucleosidtriphosphate laufen Versuche, die Substratspezifität vorhandener Enzyme zu modulieren <sup>[178, 200]</sup>.

Der Einsatz von modifizierten Nucleinsäuren ist mit hohen Kosten verbunden. Deshalb sollte einerseits die Synthese der Modifikationen verbessert werden und andererseits könnten durch eine weitere Miniaturisierung die benötigten Substanzmengen reduziert werden. So gelang zum Beispiel durch den Einsatz von Nanotechnologie die Dosierung von Probenmengen im Pikoliterbereich <sup>[201]</sup>. Mit Hilfe der Miniatur-Durchfluß-PCR <sup>[202, 203]</sup> könnte es gelingen, den gesamten Prozeß einer enzymatischen Reaktion, samt Probenkonditionierung und abschließender Detektion, auf einem Chip durchzuführen.

Eine solche Miniaturisierung gelingt aber nur bei gleichzeitiger Verbesserung der massenspektrometrischen Nachweisempfindlichkeit. Ein positiver Effekt wurde bei der Kristallisation des Matrix-Analyt-Gemisches auf hydrophoben Oberflächen, zum Beispiel bei der Verwendung von mit Teflon, Parafilm oder Tesafilm beschichteten Probentellern beobachtet <sup>[204, 205]</sup>. Außerdem ist die Wahl der richtigen Matrix entscheidend für die massenspektrometrische Analyse. Die Suche nach neuen Matrices, die bisher rein empirisch

erfolgte, könnte durch eine systematische Untersuchung des Kristallisationsvorganges sicherlich erleichtert werden.

Die entscheidenden Vorteile der massenspektrometrischen DNA-Analytik mittels MALDI-TOF liegen neben der einfachen Probenvorbereitung, der hohen Geschwindigkeit des Meßvorganges und dem daraus resultierenden hohen Probendurchsatz, der durch Kombination der MALDI-TOF-MS mit der DNA-Chip-Technologie noch enorm gesteigert werden könnte, vor allem in dem hohen Automatisierungspotential. Durch die Entwicklung optimierter enzymatischer Verfahren speziell für die Massenspektrometrie (PROBE-Reaktion und DNA-Sequenzierung mittels Endo- und Exonukleasen <sup>[206]</sup> ) bietet sich die Methodik für kommerzielle Anwendungen an. Außerdem erwies sich die Analyse von SNPs <sup>[207-209]</sup> und Short-Tandem-Repeats <sup>[144, 210]</sup> mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie als nützlich zur Lokalisierung, Identifizierung und Charakterisierung der Funktionen spezifischer Gene. Ein zukünftiges Einsatzgebiet der massenspektrometrischen DNA-Analytik könnte daher in der Pharmakogenomics, einer Wissenschaft, die die Zusammenhänge zwischen Medikament und genetischer Situation eines Patienten zum Einsatz maßgeschneiderter Arzneimittel untersucht, liegen <sup>[211, 212]</sup>.

## V Zusammenfassung

Bei Untersuchungen von Oligonukleotiden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie stellt die mit steigender Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente abnehmende Massenauflösung und Massengenauigkeit den limitierenden Faktor dar, ausgelöst durch die Adduktbildung des ionisierten DNA-Fragmentes und Fragmentierungsreaktionen wie zum Beispiel die Depurinierung.

Die bisher zur Verhinderung der Depurinierung verwendeten 7-Deazamodifizierten DNA-Fragmente besitzen den entscheidenden Nachteil, daß Restriktionsendonukleasen nicht mehr in der Lage sind, sie zu spalten, da das N-7-Stickstoffatom an der Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz beteiligt ist. Diese Enzyme spielen jedoch in der DNA-Diagnostik und in molekularbiologischen Techniken eine bedeutende Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Synthese eines 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates **50** (dA\*TP) durch den Aufbau des Ringsystems an der geschützten Ribose, eine 2'-Desoxygenierung und eine Umwandlung des 2'-Desoxynukleosids in das entsprechende 2'-Desoxynukleosid-5'-O-triphosphat entwickelt. Dieses Molekül, welches eine C-glykosidische Bindung und ein Sauerstoffatom in Position 7 besitzt, sollte von DNA-Polymerasen akzeptiert werden und zu DNA-Fragmenten führen, die sowohl eine erhöhte Stabilität im Sinne der massenspektrometrischen Analyse aufweisen als auch von Restriktionsendonukleasen gespalten werden.

Die Darstellung des 7,9-Dideaza-7-oxoadenosins **11** gelang in einer neunstufigen linearen Synthese durch den Aufbau des modifizierten Ringsystems an der freien 1-OH-Gruppe einer ansonsten vollständig geschützten Ribose und die abschließende Entschützung der Hydroxylfunktionen mit einer Ausbeute von insgesamt 5,87 % über alle Schritte.

Nachdem die vierstufige Desoxygenierung der 2'-OH-Gruppe sowohl an Uridin als auch an Adenosin erfolgreich getestet worden war, wurde das modifizierte Nukleosid **11** desoxygeniert und das 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **32** in 43,5 %iger Ausbeute erhalten.

Eine probeweise durchgeführte Triphosphatsynthese von 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat **47** unter Verwendung von ungeschütztem 2'-Desoxyadenosin **26** als Ausgangsmaterial war nicht erfolgreich und führte zu der Erkenntnis, daß das 2'-Desoxynukleosid vor der Triphosphatsynthese in das entsprechende N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxynukleosid umgewandelt werden mußte.

Die Darstellung von N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **39** verlief am erfolgreichsten, wenn zuerst die exozyklische Aminofunktion nach der Methode der Peracylierung mit abschließender selektiver Verseifung protektiert wurde. Anschließend wurde die 5'-OH-Gruppe temporär mit Dimethoxytritylchlorid geschützt, die 3'-Hydroxylfunktion mit Methoxyessigsäureanhydrid **35**, welches durch Umsetzung von Methoxyessigsäure mit Dicyclohexylcarbodiimid gewonnen worden war, verestert und abschließend die 5'-OH-Gruppe wieder entschützt. Die Ausbeute dieser fünfstufigen Synthese lag dann bei 27 %.

Im Rahmen der Triphosphatsynthese nach Ludwig und Eckstein wurde das geschützte 2'-Desoxynukleosid unter Verwendung von 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on und Bis(tri-*n*-butylamin)pyrophosphat, der Entschützung der exozyklischen Aminofunktion und der 3'-OH-Gruppe in das Triphosphat umgewandelt und abschließend durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die probeweise durchgeführte Synthese von 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat **47** gelang in 30 %iger Ausbeute, die vierstufige Darstellung von 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** in 44,7 %iger Ausbeute.

Insgesamt wurde 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50** in einer zweiundzwanzigstufigen, linearen Synthese mit einer Ausbeute von 0,3 % hergestellt. Die Synthese erfolgte, um ein Nukleosidtriphosphat zu entwickeln, welches als Grundvoraussetzung von DNA-Polymerasen in enzymatischen Tests akzeptiert werden konnte, welches dann aber vor allem zu DNA-Fragmenten führen sollte, die trotz Modifikation von Restriktionsendonukleasen gespalten werden und die nicht so leicht der Depurinierung unterliegen.

Im biochemischen Teil dieser Arbeit wurde das modifizierte Triphosphat **50** daher zuerst exemplarisch in PROBE-Reaktionen (**P**rimers **O**ligo **B**ase **E**xtension) eingesetzt. Hiermit konnte die Inkorporation in einen DNA-Strang mittels MALDI-TOF und die Verwendbarkeit des Nucleosid-5'-O-triphosphates **50** für enzymatische Reaktionen nachgewiesen werden.

Anschließend wurden 10 verschiedene DNA-Polymerasen auf ihre Inkorporationsfähigkeit in bezug auf das modifizierte 2'-Desoxynucleosid-5'-O-triphosphat **50** an einem bestehenden PCR-System mit einem kurzen DNA-Abschnitt als Template untersucht. Die Hälfte der getesteten thermostabilen DNA-Polymerasen - nämlich *ThermoSequenase*, (exo-) *DeepVent*, (exo-) *Vent*, *UITma* und *Pwo* - waren in der Lage, die Modifikation gut einzubauen.

In den nächsten Versuchen wurden (exo-) *DeepVent*, (exo-) *Vent*, *ThermoSequenase* und *Pwo* auf ihre Einbaufähigkeit für das modifizierte 2'-Desoxynucleosid-5'-O-triphosphat **50** bzw. die Schnelligkeit der Inkorporation in bezug auf steigende Templatelängen unter Beibehaltung der PCR-Bedingungen hin untersucht. Dazu wurden durch geeignete Primer/Template-Systeme doppelsträngige DNA-Fragmente von 121 bis 729 Basenpaaren dargestellt. Die Versuche wurden parallel mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat **50**, 2'-Desoxy-7-deazaadenosin-5'-O-triphosphat und 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat durchgeführt. Bei Verwendung des 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates **50** konnten ein 121mer und 122mer von (exo-) *DeepVent*, (exo-) *Vent* und *Pwo* - nicht aber von *ThermoSequenase* -, ein 391mer und ein 729mer nur noch von *Pwo* gut amplifiziert werden. Die so gewonnenen doppelsträngigen DNA-Abschnitte enthielten an allen Positionen in der Sequenz - mit Ausnahme der kurzen Primersequenzen - anstelle des 2'-Desoxyadenosins das modifizierte Desoxynucleosid.

Nachdem mit *Pwo* eine thermostabile DNA-Polymerase gefunden worden war, die das modifizierte Nucleosidtriphosphat **50** sehr gut inkorporierte, wurden an den doppelsträngig mit dA\*TP **50** oder mit  $c^7$ dATP modifizierten oder den mit natürlichem dATP hergestellten 121meren und 122meren Restriktionsexperimente unter Verwendung von sechs Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Restriktionsendonuklease *Sma* I, welche kein A in der Erkennungssequenz enthält, schnitt alle untersuchten DNA-Abschnitte. Mit *Alu* I gelang die Spaltung der unter Verwendung von dATP oder dA\*TP **50** hergestellten DNA-Abschnitte, während die mit  $c^7$ dATP amplifizierten DNA-Abschnitte nicht geschnitten wurden.

Außerdem war *Hind* III in der Lage, das mit dA\*TP **50** hergestellte 122mer partiell zu spalten. Aus diesen Vergleichen ging hervor, daß unter Verwendung von dA\*TP **50** hergestellte DNA-Fragmente besser von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden als unter Einsatz von  $c^7$ dATP amplifizierte DNA-Abschnitte.

Um die Auswirkung der Modifikationsinkorporation auf die Restriktionsendonukleasen weiter zu untersuchen, wurde ein doppelsträngiges DNA-Fragment, bei welchem nur ein Strang mit dA\*TP **50** modifiziert war, synthetisiert. Von den vier getesteten Restriktionsendonukleasen waren *Alu* I und *Bam*H I dazu in der Lage, den Heteroduplex vollständig zu schneiden, während *Hind* III die Spaltung beider Stränge des Heteroduplexes nur partiell gelang. Beim Einsatz von *Eco*R I konnte beobachtet werden, daß teilweise beide Stränge des Heteroduplexes geschnitten und teilweise nur der unmodifizierte Strang genickt wurde. Insgesamt wurde der nur einzelsträngig modifizierte Doppelstrang wesentlich besser gespalten als das doppelsträngig modifizierte PCR-Produkt.

Nach den Restriktionsexperimenten wurde die Stabilität von DNA-Abschnitten, die durch dA\*TP **50** oder  $c^7$ dATP modifiziert worden waren, im Vergleich zu natürlichen DNA-Fragmenten untersucht. Dazu wurde ein Poly-T-Primer durch Zugabe von dATP oder  $c^7$ dATP oder dA\*TP **50** verlängert. Mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie konnte bei erhöhter Laserenergie gezeigt werden, daß sowohl mit dA\*TP **50** als auch mit  $c^7$ dATP deutlich weniger Depurinierungsprodukte zu beobachten waren als beim Einsatz des natürlichen Nukleosidtriphosphates.

Insgesamt wurde im Rahmen dieser Arbeit ein modifiziertes Nukleosidtriphosphat **50** synthetisiert und in biochemische Experimente eingesetzt. Mittels gezielter Tests wurde gezeigt, daß die an die Modifikation gestellten Erwartungen, nämlich die Amplifikation von DNA-Abschnitten, die eine erhöhte Stabilität gegenüber der Depurinierung aufweisen und von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden können, erfüllt wurden.

---

## VI Summary

Today MALDI-TOF analysis of DNA is still limited by the decrease of mass accuracy and mass resolution with increasing length of the nucleic acid. The achievable mass resolution is reduced by adduct formation of the ionized DNA fragment and by fragmentations such as depurination.

7-Deaza-modified DNA fragments, which are used to prevent depurination, have the disadvantage of not being cleaved by restriction endonucleases, because the N-7 nitrogen atom is involved in the base specific recognition of the DNA sequence.

This thesis documents the synthesis of a 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50** (dA\*TP) by constructing the corresponding hetero cycle at the protected ribose ring, followed by 2'-deoxygenation and transformation of the 2'-deoxynucleoside into the corresponding 2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate. This molecule, which possesses a C-glycosidic bond and an oxygen in position 7, should be accepted by DNA polymerases and restriction endonucleases and should lead to DNA fragments exhibiting increased stability for the purposes of MALDI-TOF mass spectrometry.

Preparation of 7,9-dideaza-7-oxoadenosine **11** was achieved by a linear nine-step synthesis via a modified ring system at the nonprotected 1-hydroxyl group of an otherwise fully protected D-ribose ring and the subsequent deprotection of the hydroxyl functions in 5.87 % overall yield.

The four-step deoxygenation of the 2'-hydroxyl group was first tested with uridine and adenosine. With that experience the modified nucleoside **11** was deoxygenated and the 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine **32** was obtained in 43.5 % yield.

The triphosphate synthesis of 2'-deoxyadenosine-5'-O-triphosphate **47** using the unprotected 2'-deoxyadenosine **26** as starting material proved unsuccessful, and lead to the conclusion that the 2'-deoxynucleoside must be transformed into the N<sup>6</sup>-benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-deoxynucleoside before the triphosphate synthesis.

## VI. Summary

---

Preparation of N<sup>6</sup>-benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine **39** proceeded most successfully upon initial protection of the exocyclic amino function of the modified 2'-deoxynucleoside via peracylation followed by selective saponification. The 5'-OH group was subsequently protected with dimethoxytritylchloride, the 3'-hydroxyl function was esterified with methoxyacetic acid anhydride **35**, which was obtained via treatment of methoxyacetic acid with dicyclohexylcarbodiimide, and finally the 5'-OH group was deprotected. The resulting product was obtained after five steps in 27 % overall yield.

Within the framework of the triphosphate synthesis of Ludwig and Eckstein, the protected 2'-deoxynucleoside was converted into the triphosphate by use of 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one and bis(tri-*n*-butylamino)pyrophosphate, deprotection of the exocyclic amino function and of the 3'-OH group, followed by purification via ion exchange chromatography. The analogous four-step conversion of 2'-deoxyadenosine into 2'-deoxyadenosine-5'-O-triphosphate **47** succeeded with 30 % yield and 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50** was obtained in 44.7 % overall yield.

The final product, 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50**, was obtained after a twenty-two-step linear synthesis in 0.3 % overall yield. The synthesis was carried out to develop a nucleoside triphosphate, that is a substrate for DNA polymerases and restriction endonucleases and that is more stable against depurination.

In the biochemical part of this thesis, the modified triphosphate **50** was first used in a PROBE-reaction (Primer Oligo Base Extension). The successful incorporation into a DNA strand has proven that the modified 2'-deoxynucleoside triphosphate **50** is a substrate for a primer extension reaction as verified by MALDI-TOF mass spectrometry.

Subsequently, the incorporation of the modified 2'-deoxynucleoside triphosphate **50** with ten different DNA polymerases on a well known PCR system with a short template was tested. Half of the thermostable DNA polymerases examined were able to incorporate the modified deoxyadenosine triphosphate **50**.

## VI. Summary

---

In follow-up experiments, the ability of the modified nucleoside triphosphate **50** to be incorporated and the speed of incorporation with respect to the increasing length of the template under standard PCR conditions were investigated. To this end, double-stranded DNA fragments with 121 to 729 basepairs have been prepared via suitable primer/template systems. The experiments with 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50**, 2'-deoxy-7-deazaadenosine-5'-O-triphosphate and 2'-deoxyadenosine-5'-O-triphosphate were performed in parallel. In the case of 2'-deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-O-triphosphate **50**, a 121mer and a 122mer could be amplified with (*exo*-)*DeepVent*, (*exo*-)*Vent* and *Pwo* but not with *ThermoSequenase* and a 391mer and a 729mer could only be obtained with *Pwo*. The double-stranded DNA fragments generated contained the modified nucleoside instead of deoxyadenosine in every position of the sequence, with the exception of the short primer sequences.

Since the thermostable *Pwo* DNA polymerase incorporates the modified nucleoside triphosphate **50** very successfully, restriction experiments were performed using six restriction endonucleases on double-stranded 121 and 122mer DNA fragments, which were produced with dA\*TP **50**,  $c^7$ dATP or dATP. The restriction endonuclease *Sma* I, which contains no A in the recognition sequence, cuts all DNA sections examined. The cleavage of DNA fragments that were obtained using dATP or dA\*TP **50** was successful with *Alu* I, whereas  $c^7$ dATP-amplified DNA was not cleaved. In addition *Hind* III was able to partially cleave the 122mer generated by the use of dA\*TP **50**. From this observation it follows that dA\*TP-prepared DNA was more easily cleaved by restriction endonucleases than the  $c^7$ dATP-amplified DNA.

To further investigate the effect of modifications upon restriction endonucleases, a double-stranded DNA fragment was synthesised, in which only one strand was modified with dA\*TP **50**. Of the four restriction endonucleases tested, *Alu* I and *Bam*H I were able to totally cleave the heteroduplex, whereas *Hind* III only partially succeeded in splitting both strands of the heteroduplex. It could be shown that *Eco*R I cleaved both strands of the heteroduplex in some molecules, while in others only the unmodified strand was nicked. In general, the double strands modified in only one strand could be cleaved much more easily than the double-stranded PCR products in which both strands were modified.

## VI. Summary

---

After the restriction experiments, the stability of DNA fragments modified by dA\*TP **50** or  $c^7$ dATP in comparison with the natural DNA sequence was examined. To this end, a poly-T-primer was elongated via addition of dATP,  $c^7$ dATP or dA\*TP **50**. MALDI-TOF mass spectrometry with increasing laser energy showed that depurination was significantly lower where dA\*TP **50** or  $c^7$ dATP was used instead of dATP.

Within the framework of this thesis, a modified 2'-deoxynucleoside triphosphate was synthesised and used in biochemical experiments. The hypotheses suggesting that the modification of DNA fragments, *i.e.*, their amplification, would increase their stability against depurination and allow the modified fragments to be cleaved by restriction endonucleases could be confirmed.

## VII Experimenteller Teil

### 1 Allgemeine Hinweise

- Grundsätzlich wurden alle chemischen Reaktionen unter Feuchtigkeitsausschluß und - sofern nötig - unter Argon durchgeführt.
- Der Verlauf jeder Umsetzung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt.
- Das Einengen der Reaktionsprodukte erfolgte bei Temperaturen  $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.1 Chemikalien

- Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisterhofen), Aldrich (Steinheim), Fluka (Deisterhofen), Lancaster (Mühlheim am Main)

#### **Lösungsmittel**

- Für alle chemischen Synthesen wurden ausschließlich absolutierte Lösungsmittel der Firmen Fluka und Aldrich verwendet.
- Es wurde gereinigtes Wasser aus einer Reinstwasseranlage Milli-Q UF Plus der Firma Millipore (Eschborn) eingesetzt.

#### 1.2 Geräte und Methoden

##### *Photometrische Messungen/ UV- und VIS-Spektrometrie*

Die Vermessung der Fraktionen aus der Triphosphatreinigung zur Erstellung der Eluationsprofile erfolgte ohne Verdünnung bei 260 nm mit einem GeneQuant-Photometer (Fa. Pharmacia) in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

UV/VIS-Spektren wurden mit einem Biochrom LBK 4060 UV/VIS-Photometer (Fa. Pharmacia) in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm aufgenommen.

### *NMR-Spektrometrie*

$^1\text{H}$ -NMR-Spektren (500 MHz) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (126 MHz) wurden mit einem Spektrometer Typ DRX 500,  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (400 MHz) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (100,62 MHz) mit einem Spektrometer Typ AMX 400 der Firma Bruker Daltonik (Bremen) erstellt. Die Erstellung der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren erfolgte ebenfalls an einem Spektrometer des Typs AMX400 der Firma Bruker Daltonik. Zur eindeutigen Zuordnung der Signale wurde neben dem  $^1\text{H}$ - und dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum für fast alle Verbindungen ein  $^{13}\text{C}$ -DEPT-NMR-Spektrum aufgenommen, und es wurden  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Cosy-Experimente durchgeführt. Für die eindeutige Identifizierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Anomeren wurde einmal auch ein NOSY-Spektrum aufgenommen.

Als interner Standard in den deuterierten Solventien (Fa. Merck) diente eine 0,5 % Tetramethylsilanlösung bzw. das Signal des nicht deuterierten Anteils des verwendeten Lösungsmittels.

### *Massenspektrometrie*

EI-Massenspektren wurden im Direkteinlaßverfahren mit einem Massenspektrometer der Firma Finnegan Modell MAT 311 A aufgenommen.

FAB-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma Finnegan Modell MAT 911 A unter Verwendung der Matrix m-Nitrobenzylalkohol erstellt.

### *MALDI-TOF-Massenspektren*

Die Spektren wurden an einem Biflex III und einem Reflex III der Firma Bruker Daltonik GmbH im "positiv ion linear mode" mit einer Beschleunigungsspannung von ca. 20 kV und mit einer um 500 ns verzögerten Ionenextraktion aufgenommen.

Dabei wurden die Massenspektren mit einem Gemisch, bestehend aus 3 Oligonukleotiden unterschiedlicher Länge, extern kalibriert. Als Matrix diente eine Lösung von 0,7 mol/l 3-Hydroxypikolinsäure und 0,07 mol/l Diammoniumcitrat in Acetonitril/Wasser 1:1 (v/v).

### *Thermocycler*

PCR-Reaktionen wurden in einem Omni-Gene Hybaidcycler von MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. PROBE-Reaktionen, Primer Extension sowie Ammoniak-Denaturierungen und das Aufkochen der Proben mit einem Formamidpuffer zur Denaturierung vor der Gelelektrophorese erfolgten in einem Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen).

### *Gelelektrophorese*

Elektrophoresen von Polyacrylamidgelen wurden in einer Gelkammer der Firma Keutz (Gießen) durchgeführt.

### *Geldokumentation*

Zur Aufnahme von Gelen aus der PCR wurde die CCD-Videokamera der DocuGel 1000 Station der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) verwendet. Gele nach Restriktionsspaltungen und die denaturierten Gele wurden mit einer Geldokumentationsstation der Firma Biozym (Hess. Oldendorf) aufgenommen.

### *IR-Spektrometrie*

Die IR-Spektren wurden an einem Genesis Series Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometer der Firma ATI-Mattson aufgenommen. Die Feststoffe wurden als KBr-Preßlinge vermessen.

### *Schmelzpunkte*

Die Schmelzpunkte wurden mit Hilfe eines Electrothermal-Schmelzpunkt-bestimmungsapparates ermittelt. Die Werte sind unkorrigiert.

### *Dünnschichtchromatographie*

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Reaktionskontrolle erfolgte auf Kieselgel-Fertigfolie (Kieselgel 60 F<sub>245</sub>, Fa. Merck) unter Verwendung der jeweils angegebenen DC-Laufmittel. Proben aus Ansätzen, die Pyridin oder DMF enthielten, wurden entweder mit Toluol koevaporiert oder in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser gewaschen und erst dann im Laufmittelsystem entwickelt.

Die Detektion erfolgte 1) visuell unter UV-Licht

- 2) nach Abdampfen der flüchtigen Komponenten (z.B.: Pyridin) mit einem Heißluftfön nochmals unter UV-Licht zur Unterscheidung flüchtiger und nichtflüchtiger UV-aktiver Verbindungen
- 3) durch Besprühen mit einem Anisaldehyd-Zucker-Sprühreagenz (4 ml Anisaldehyd, 2 ml konz. Schwefelsäure und 0,5 ml Eisessig in 80 ml Ethanol ) und anschließender thermischer Behandlung mit einem Heißluftfön.

In der Wärme entwickeln nukleosidische bzw. zuckerhaltige Verbindungen eine Blau- bzw. Braunfärbung, während DMT-haltige Verbindungen bereits bei Raumtemperatur orangefarben und tritylierte Komponenten auch bereits bei Raumtemperatur gelb erscheinen.

### *Säulenchromatographie*

Präparative chromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel 60 ( Korngröße 0,040 - 0,063 mm der Firma Merck) mit ca. 0,2 bar Überdruck (Flash-Chromatographie). Die jeweils verwendeten Laufmittel sind bei den einzelnen Synthesen aufgeführt.

### *Ionenaustauschchromatographie (IEC) (präparativ)*

Für die präparative Ionenaustauschchromatographie zur Trennung der Nukleosidtriphosphate von den Monophosphaten wurde eine Anlage verwendet, die sich aus einem einfachen, aus zwei verbundenen Kammern bestehenden Gradientenmischer, einer Schlauchpumpe, der Säule und einem Fraktionssammler zusammensetzt.

### *Darstellung des Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffers (TEAB-Puffer)*

Alle verwendeten Glasgeräte wurden mit 18  $\Omega$  Wasser gespült. Für die Herstellung eines 1 mol/l Puffers wurde eine 1 mol/l wässrige Triethylaminlösung so lange unter Rühren mit Trockeneis versetzt, bis der pH-Wert zwischen 7,9 und 8,4 lag. Abschließend wurde der Puffer steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

### *Beschickung der Säule*

120 g Diethylaminoethyl-Sephacel (DEAE-Sephacel) wurden in 1,8 l einer 0,5 mol/l HCl eingerührt und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ionenaustauscher - nachdem Schwebeteilchen abdekantiert worden waren - filtriert, mit Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats bei ungefähr 4 lag, dann in 1,8 Litern 0,5 mol/l Natronlauge aufgenommen und wieder 1,5 Stunden inkubiert. Nach dem erneuten Abdekantieren der Schwebeteilchen wurde der Ionenaustauscher wieder filtriert und mit 18,2  $\Omega$  Wasser so lange gewaschen, bis das Eluat neutral war. Der so konditionierte DEAE-Sephacel-Ionenaustauscher wurde in 400 ml 0,7 mol/l Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer aufgenommen und bei 4 °C in die Säule eingefüllt.

Alle Trennungen mittels Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel wurden in einem Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Vor jeder Trennung wurde die Säule mit 0,025 mol/l Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer equilibriert. Das zu trennende Rohprodukt wurde dann in ca. 120 ml 0,025 mol/l Puffer über einen Zeitraum von 3 Stunden aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0,025 mol/l - 0,6 mol/l Puffer bei einer mittleren Flußrate von ca. 0,4 ml pro Minute. Anschließend wurde die Säule regeneriert (Spülung mit 0,6 mol/l Puffer und anschließend erneute Einstellung mit 0,025 mol/l Puffer). Bei einer längeren Lagerung wurde die Säule unter 0,1 mol/l Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer unter Zusatz von 0,02 % Natriumazid gesetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

### *Konditionierung von Ionenaustauschern*

Für die Neutralisation saurer oder basischer Ansätze und zur Synthese des Pyrophosphatreagenzes wurden weitere Ionenaustauscher verwendet.

Der Ionenaustauscher Dowex Serva 1 x 2 ( Korngröße 200 - 400) in der Chloridform wurde mit 1 mol/l Natronlauge gespült und anschließend mit Methanol neutral gewaschen. Um zu testen, ob die Beladung mit Hydroxydionen erfolgreich verlaufen war, wurde etwas Ionenaustauscher in eine Natriumchloridlösung gegeben. Die Natriumchloridlösung wurde daraufhin basisch. Zur Regeneration wurde der Ionenaustauscher erneut mit Natronlauge gespült und mit Methanol gewaschen.

Der Ionenaustauscher Dowex 50 WX8 (Korngröße 100 - 200) in der H<sup>+</sup>-Form wurde mit Pyridin gewaschen und anschließend mit Ethanol gespült, bis die Lösung neutral war. Der auf diese Weise in die Pyridiniumform überführte Ionenaustauscher wurde in die Reaktion eingebracht. Zur Regeneration wurde der Ionenaustauscher zuerst mit 1 mol/l Salzsäure, dann mit Pyridin und zum Abschluß mit Ethanol gespült, bis das Eluat neutral war.

Der Ionenaustauscher Dowex 50 WX8 wurde auch in der H<sup>+</sup>-Form verwendet. Dafür wurde das Harz in Wasser aufgeschlämmt und mit Wasser gewaschen. Zur Regeneration wurde der Ionenaustauscher mit 1 mol/l Salzsäure gespült und anschließend wieder so lange mit Wasser gewaschen, bis das Eluat neutral war.

## 2 Chemische Synthesen

### 2.1 Darstellung des modifizierten Nukleosids

#### 2.1.1 Darstellung der geschützten Ribose

##### 2.1.1.1 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose 1

###### *Methode A*

Unter Rühren wurden zu 50 ml Aceton 5 g Molekularsieb (4 A, in der Mikrowelle ausgeheizt), 2,056 g (13,7 mmol) Ribose und 2,02 g (10,62 mmol) p-Toluolsulfonsäure gegeben und eine Stunde unter Rückfluß gekocht.

Nach dem Abkühlen und der Molekularsiebentfernung durch Filtration wurde die Lösung durch Zugabe von 0,5 ml Pyridin neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>3</sub>Cl/MeOH 10:1 R<sub>f</sub>: 0,38

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 72 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 97:3

Ausbeute: 1,04 g (5,505 mmol); 40,2 % d. Th. ( Lit.: 80 % <sup>[79]</sup> )

###### *Methode B*

Zu einer gerührten Lösung von 10 g (66 mmol) Ribose und 8,6 g (82,6 mmol) 2,2-Dimethoxypropan in 250 ml Aceton wurde bei 0 °C 0,01 ml konz. Schwefelsäure hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei 5 °C gerührt, durch Zugabe von Natriumcarbonat neutralisiert. Das überschüssige Natriumcarbonat wurde abfiltriert und mit Aceton ausgewaschen. Nach dem Einengen erfolgte die Trocknung des gelben, sirupartigen Rohproduktes im Ölpumpenvakuum.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>3</sub>Cl/MeOH 10:1 R<sub>f</sub>: 0,39

Das Rohprodukt wurden säulenchromatographisch an 250 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 97:3

Ausbeute: 8,76 g leicht gelblicher Sirup (46,2 mmol) ; 69,2 % d. Th (Lit.: 83 % <sup>[81]</sup> )

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$

$\delta$  [ppm] = 1,32 und 1,48 (2s, 6H, 2CH<sub>3</sub>); 3,73 (dd, 2H, H-5<sub>a</sub> und H-5<sub>b</sub>);  
 4,41 (pseudo-s, 1H, H-4); 4,58 (d, 1H, H-2); 4,84 (d, 1 H, H-3);  
 5,43 (s, 1H, H-1); 7,28 (s, CDCl<sub>3</sub>)  
 $^2J_{5a,5b} = 17,36$  Hz;  $^3J_{4,5a} = 2,25$  Hz;  $^3J_{4,5b} = 3,15$  Hz;  $^3J_{2,3} = 5,94$  Hz

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl}_3\text{)}$

$\delta$  [ppm] = 24,72 (CH<sub>3</sub>); 26,37 (CH<sub>3</sub>); 63,62 (C-5); 76,38-77,39 (CDCl<sub>3</sub>);  
 81,69 (C-3); 86,85 (C-2); 87,79 (C-4); 102,94 (C-1); 111,99 (CMe<sub>2</sub>)

IR-Spektrum (KBr-Preßling)

$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3409,52; 3399,88; 3369,03 (O-H-Valenzschwingung);  
 2985,26; 2940,91 (aliphatische C-H-Valenzschwingung);  
 1782 (C=O-Valenzschwingung); 1376,92 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Valenzschwingung);  
 1068,37; 1043,30 (C-O-Valenzschwingung)

Massenspektrum (Elektronenstoß-Ionisation)

M = 190,2 g/mol; C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>  
 m/z [Da] (%) = 175 (M<sup>+</sup> -CH<sub>3</sub>, 19); 157 (M<sup>+</sup> -CH<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O, 6); 73 (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, 83);  
 59 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O, 100)

**2.1.1.2 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranose 2**

8,36 g (43,95 mmol) 2,3-O-Isopropyliden-D-ribofuranose 1 wurden bei Raumtemperatur in 17,6 ml Pyridin gelöst und mit 14,7 g (52,8 mmol) Triphenylmethylchlorid unter Rühren versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden wurde die orangefarbene Lösung in 220 ml Wasser eingerührt, die überstehende wässrige Phase abdekantiert, der zurückbleibende hellbraune Sirup nach dreimaligem Waschen mit Wasser in 130 ml Dichlormethan gelöst und dreimal mit jeweils 60 ml Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde zur Klärung filtriert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der orangefarbene Sirup wurde zweimal mit Toluol ko-evaporiert und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

DC-Kontrolle: Laufmittel Toluol/ Ethylacetat 5:1

$R_f$  : 0,44

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Säulenchromatographie an 350 g Kieselgel 60.

Laufmittel: Toluol/Ethylacetat 10:1

Ausbeute: 13,13 g (30,37 mmol) Anomerengemisch; 69 % d. Th.

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\alpha$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,01 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>); 3,45 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>);  
 3,99 (d, 1H, OH); 4,19 (pseudo-t, 1H, H-4); 4,58 (dd, 1H, H-3);  
 4,74 (dd, 1H, H-2); 5,75 (dd, 1H, H-1);  
 7,18-7,32 (m, 15 H, CH<sub>arom.</sub> und CDCl<sub>3</sub>)  
 $^2J_{5a,5b} = 10,21$  Hz;  $^2J_{1,OH} = 11,32$  Hz;  $^3J_{4,5a} = 2,77$  Hz;  $^3J_{4,5b} = 2,99$  Hz;  
 $^3J_{2,3} = 6,2$  Hz;  $^3J_{1,2} = 4,03$  Hz

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,35 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>); 3,42 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>)  
 3,90 (d, 1H, OH); 4,35 (pseudo-t, 1H, H-4); 4,66 (d, 1H, H-2);  
 4,79 (d, 1H, H-3); 5,33 (d, 1H, H-1);  
 7,18-7,32 (m, 15H, CH<sub>arom.</sub> und CDCl<sub>3</sub>)  
 $^2J_{5a,5b} = 10,34$  Hz;  $^2J_{1,OH} = 9,25$  Hz;  $^3J_{4,5a} = 3,66$  Hz;  $^3J_{4,5b} = 3,53$  Hz;  
 $^3J_{2,3} = 5,95$  Hz

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\alpha$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 24,74 (CH<sub>3</sub>); 26,16 (CH<sub>3</sub>); 65,46 (C-5); 76,46-77,47 (CDCl<sub>3</sub>);  
 79,41 (C-2); 80,07 (C-4); 82,18 (C-3); 88,13 (CPh<sub>3</sub>); 98,02 (C-1);  
 112,18 (CMe<sub>2</sub>); 127,02-129,03 (CH<sub>arom.</sub>); 143,41 (C<sub>q,arom.</sub>)

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 25,09 (CH<sub>3</sub>); 26,51 (CH<sub>3</sub>); 65,06 (C-5); 76,46-77,47 (CDCl<sub>3</sub>); 81,89 (C-3);  
 86,07 (C-4); 87,08 (C-2); 87,45 (CPh<sub>3</sub>); 103,54 (C-1); 113,05 (CMe<sub>2</sub>);  
 127,02-129,03 (CH<sub>arom.</sub>); 142,74 (C<sub>q, arom.</sub>)

IR-Spektrum (KBr-Preßling)

$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3435,61 (O-H-Valenzschwingung);  
3085,03; 3058,46; 3030,73 (Aryl-H-Valenzschwingung);  
2985,01; 2939,30; 2876,69 (aliphatische C-H-Valenzschwingung)  
1593,85; 1491,95; 1448,20 (aromatische C=C-Valenzschwingung)  
1371,88 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -Valenzschwingung); 1073,49 (C-O-Valenzschwingung);  
705,39 (Aryl-H-Deformationsschwingung)

Massenspektrum (Elektronenstoß-Ionisation)

$M = 432,5$  g/mol;  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_5$

$m/z$  [Da] (%) = 432 ( $M^+$ , 0,2); 430 ( $M^+ - 2\text{H}$ , 0,2); 417 ( $M^+ - \text{CH}_3$ , 0,3),  
414 ( $M^+ - \text{H}_2\text{O}$ , 0,4); 243 (Tr, 100); 165 (Tr -  $\text{C}_6\text{H}_6$ , 42);  
105 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$ , 22); 59 ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$ , 38)

## 2.1.2 Aufbau des Furo[3,2-d]pyrimidinrings an der geschützten Ribose

### 2.1.2.1 Cyanomethyltriphenylphosphoran 3

12 g (35,52 mmol) Cyanomethyltriphenylphosphoniumchlorid wurden in 240 ml Wasser gelöst und unter starkem Rühren durch die Zugabe von ca. 40 ml einer 1 mol/l Natronlauge auf einen pH-Wert von ca. 10 gebracht. Der dabei entstandene weiße Niederschlag wurde zügig abgesaugt, mit Wasser gewaschen, mit Dioxan lyophilisiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es entstanden 10,36 g eines weißen Feststoffes als Rohprodukt. Dieses Rohprodukt war leicht durch Triphenylphosphinoxid verunreinigt.

DC-Kontrolle: Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  90:10  $R_f$  : 0,3

$R_{f \text{Oxid}}$  : 0,56

Ein kleiner Teil wurde zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter säulenchromatographisch gereinigt.

Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  96:4

Schmelzpunkt : 196 °C

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  [ppm] = 2,00 (s, 1H, CH); 7,26 ( $\text{CDCl}_3$ ); 7,43-7,71 (m, 19H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ );

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  [ppm] = 76,65-77,67 ( $\text{CDCl}_3$ ); 77,37 (CH); 100,51 (CN); 128,53-129,11 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ );  
131,88-132,30 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ )

IR-Spektrum (KBr-Preßling)

$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3056,61 (Aryl-H-Valenzschwingung); 2140,59 (CN-Valenzschwingung);  
1436,70 (P-Phenyl-Valenzschwingung); 1261,21 (P=O-Valenzschwingung)  
723,17 und 694,24 (Aryl-H-Deformationsschwingung)

Massenspektrum (Elektronenstoß-Ionisation)

$M = 301,3$  g/mol;  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{NP}$

$m/z$  [Da] (%) = 301 ( $M^+$ , 0,3); 300 ( $M^+ - \text{H}$ , 0,6); 277 ( $M^+ - \text{CN} + 2\text{H}$ , 100); 76 ( $\text{C}_6\text{H}_4$ , 30)

**2.1.2.2 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril 4**

Eine Lösung von 16,49 g (38,13 mmol) 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranose 2 in 250 ml Acetonitril wurde mit 22,5 g (74,67 mmol) Cyanomethyltriphenylphosphoran 3 versetzt und 12 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das beim Abkühlen ausfallende Phosphinoxid wurde abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das entstandene Rohprodukt mit Toluol koevaporiert.

DC-Kontrolle: Laufmittel Toluol/ Ethylacetat 5:1  $R_f$   $\alpha$ -Anomer : 0,68

$R_f$   $\beta$ -Anomer : 0,63

Das gelblich-weiße Rohprodukt wurde an 250 g Kieselgel 60 säulenchromatographisch gereinigt.

Laufmittel: Toluol/ Ethylacetat 14:1

Ausbeute: 12,84 g (28,18 mmol); 73,9 % d.Th. (Lit.: 92% [86])

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\alpha$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,68 und 2,80 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>);  
 3,15 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>); 3,36 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>); 4,24 (pseudo-t, 1H, H-4);  
 4,52 (m, 1H, H-1); 4,75 (dd, 1H, H-3); 4,80 (dd, 1H, H-2);  
 7,22-7,50 (m, 15H, CH<sub>arom.</sub> und CDCl<sub>3</sub>)  
 $^2\text{J}_{5a,5b} = 10,33$  Hz;  $^3\text{J}_{5a,4} = 3,91$  Hz;  $^3\text{J}_{5b,4} = 3,62$  Hz;  $^3\text{J}_{4,3} = 0,89$  Hz;  
 $^3\text{J}_{3,2} = 6,1$  Hz;  $^3\text{J}_{2,1} = 4,1$  Hz;  $^3\text{J}_{\text{CH2a},1} = 6,17$  Hz;  $^3\text{J}_{\text{CH2b},1} = 5,31$  Hz

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,72 und 2,76 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>);  
 3,26 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>); 3,32 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>); 4,15 (m, 1H, H-1);  
 4,19 (m, 1H, H-4); 4,55 (dd, 1H, H-2); 4,66 (dd, 1H, H-3);  
 7,22-7,50 (m, 15H, CH<sub>arom.</sub> und CDCl<sub>3</sub>)  
 $^2\text{J}_{5a,5b} = 10,27$  Hz;  $^3\text{J}_{5a,4} = 4,61$  Hz;  $^3\text{J}_{5b,4} = 3,59$  Hz;  $^3\text{J}_{4,3} = 3,53$  Hz;  
 $^3\text{J}_{3,2} = 6,58$  Hz;  $^3\text{J}_{2,1} = 4,74$  Hz;  $^3\text{J}_{\text{CH2a},1} = 6,23$  Hz;  $^3\text{J}_{\text{CH2b},1} = 5,28$  Hz

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\alpha$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 18,94 (CH<sub>2</sub>); 24,82 (CH<sub>3</sub>); 26,07 (CH<sub>3</sub>); 64,93 (C-5); 76,41-77,42 (CDCl<sub>3</sub>);  
 77,69 (C-1); 81,19 (C-2); 83,49 (C-3); 83,88 (C-4); 87,36 (CPh<sub>3</sub>);  
 112,99 (CMe<sub>2</sub>); 116,499 (CN); 127,16-128,67 (CH<sub>arom.</sub>); 143,34 (C<sub>q, arom.</sub>)

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 22,25 (CH<sub>2</sub>); 25,49 (CH<sub>3</sub>); 27,37 (CH<sub>3</sub>); 64,05 (C-5); 76,41-77,42 (CHCl<sub>3</sub>);  
 79,83 (C-1); 82,30 (C-3); 83,76 (C-2); 84,13 (C-4); 86,87 (CPh<sub>3</sub>);  
 114,69 (CMe<sub>2</sub>); 116,5 (CN); 127,16-128,67 (CH<sub>arom.</sub>); 143,50 (C<sub>q, arom.</sub>)

IR-Spektrum (KBr-Preßling)

$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3085,18; 3058,56; 3017,11 (Aryl-H-Valenzschwingung);  
 2988,20; 2934,29; 2874,53 (aliphatische C-H-Valenzschwingung)  
 2252,99 (CN-Valenzschwingung)  
 1591,84; 1491,73; 1447,99 (aromatische C=C-Valenzschwingung)  
 1381,86 (C(CH<sub>3</sub>)-Valenzschwingung); 1079,51 (C-O-Valenzschwingung);  
 705,54 (Aryl-H-Deformationsschwingung)

Massenspektrum (Elektronenstoß-Ionisation)

M = 455,5 g/mol; C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>N

m/z [Da] (%) = 455 (M<sup>+</sup>, 5); 243 (Tr, 100); 165 (Tr -C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 26); 105 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, 18);  
 91 (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>, 10)

**2.1.2.3 3-Dimethylamino-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitril 5**

3,37 g (7,40 mmol) 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril **4** wurden in 25 ml DMF gelöst und schnell mit 7,5 ml (36,15 mmol,  $\sigma = 0,84$  g/ml) Bis(dimethylamino)*tert.*-butoxymethan versetzt, wobei sofort eine Gelbfärbung eintrat. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch eingeeengt, der dunkelrote sirupöse Rückstand in 40 ml Dichlormethan aufgenommen, dreimal mit einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel Toluol/Ethylacetat 5:1  $R_f$   $\alpha$ -Anomer : 0,39

$R_f$   $\beta$ -Anomer : 0,45

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 100 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: Toluol/Ethylacetat 5:1

Ausbeute: 3,31 g (6,47 mmol); 87,4 % d. Th. (Lit.: 79,2 %<sup>[88]</sup>)

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\alpha$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,12 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>);  
 3,17 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>); 3,26 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>); 4,24 (pseudo-t, 1H, H-4);  
 4,59 (d, 1H, H-2); 4,67 (s, 2H, H-1 und H-3); 6,60 (s, 1H, CH);  
 7,20-7,50 (m, 15H, CH<sub>arom.</sub> und CDCl<sub>3</sub>)  
 $^2\text{J}_{5a,5b} = 10,08 \text{ Hz}$ ;  $^3\text{J}_{5a,4} = 4,64 \text{ Hz}$ ;  $^3\text{J}_{5b,4} = 4,32 \text{ Hz}$ ;

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,09 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>);  
 3,28 (d, 2H, H-5); 4,06 (m, 1H, H-4); 4,16 (d, 1H, H-1);  
 4,52 (dd, 1H, H-3); 4,68 (dd, 1H, H-2); 6,57 (s, 1H, CH);  
 7,20-7,50 (m, 15H, CH<sub>arom.</sub> und CDCl<sub>3</sub>)  
 $^3\text{J}_{5,4} = 5,02 \text{ Hz}$ ;  $^3\text{J}_{4,3} = 4,14 \text{ Hz}$ ;  $^3\text{J}_{3,2} = 6,96 \text{ Hz}$ ;  $^3\text{J}_{2,1} = 5,41 \text{ Hz}$

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\alpha$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 24,60 (CH<sub>3</sub>); 25,78 (CH<sub>3</sub>); 42,23 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 64,46 (C-5); 68,68 (C=CH);  
 76,57-77,59 (CDCl<sub>3</sub>); 82,03 (C-1 oder 3); 82,22 (C-4); 82,77 (C-2);  
 83,09 (C-3 oder 1); 87,27 (CPh<sub>3</sub>); 112,72 (CMe<sub>2</sub>); 121,37 (CN);  
 126,95-128,79 (CH<sub>arom.</sub>); 143,64 (C<sub>q, arom.</sub>); 152,02 (C=CH);

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 25,29 (CH<sub>3</sub>); 27,32 (CH<sub>3</sub>); 42,08 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 64,02 (C-5); 72,02 (C=CH);  
 76,36-77,38 (CDCl<sub>3</sub>); 82,01 (C-3); 82,48 (C-4); 83,15 (C-2); 86,23 (C-1);  
 86,55 (CPh<sub>3</sub>); 114,47 (CMe<sub>2</sub>); 119,81 (CN); 126,81-128,89 (CH<sub>arom.</sub>);  
 143,71 (C<sub>q, arom.</sub>); 151,61 (C=CH);

IR-Spektrum (KBr-Preßling)

$\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3057,75; 3020,84 (Aryl-H-Valenzschwingung);  
 2986,14; 2930,40; 2870,99 (aliphatische C-H-Valenzschwingung)  
 2184,25 (CN-Valenzschwingung)  
 1636,30 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -Valenzschwingung, C=C-Valenzschwingung von Enaminen)  
 1491,02; 1447,58 (aromatische C=C-Valenzschwingung)  
 1395,31; 1383,96 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -Valenzschwingung);  
 1075,28 (C-O-Valenzschwingung); 706,91 (Aryl-H-Deformationsschwingung)

Massenspektrum (Elektronenstoß-Ionisation)

$M = 510,6 \text{ g/mol}$ ;  $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{N}_2$   
 $m/z$  [Da] (%) = 267 ( $\text{M}^+$  -Tr, 11); 243 (Tr, 12); 165 (Tr - $\text{C}_6\text{H}_6$ , 20); 105 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$ , 42);  
 91 ( $\text{C}_7\text{H}_7$ , 100); 76 ( $\text{C}_6\text{H}_4$ , 28)

**2.1.2.4 3-Hydroxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)-propennitril 6**

2,14 g (4,18 mmol) 3-Dimethylamino-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)-propennitril 5 wurden in 50 ml Dichlormethan gelöst und unter starkem Rühren bei Raumtemperatur mit 10 ml einer 2,5 %igen, wässrigen Trifluoressigsäurelösung versetzt. Nach einer Stunde und nach insgesamt 5 Stunden Reaktionszeit erfolgte die Zugabe von jeweils weiteren 5 ml Trifluoressigsäurelösung. Durch Hinzufügen von 30 ml Wasser wurde die Reaktion nach 6 Stunden beendet. Die Dichlormethanphase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und mit Dioxan lyophilisiert. Es wurden 2,13 g eines weißen Feststoffes als Rohprodukt erhalten.

DC-Kontrolle: Laufmittel Toluol/Ethylacetat 2:1  $R_f$  : 0,43

Ein kleiner Teil wurde zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter säulenchromatographisch an Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  99:1



*Methode B*

2,69 g (5,55 mmol) 3-Hydroxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribo-furanosyl)propennitril-Rohprodukt **6** wurden in 30 ml DMF bei Raumtemperatur gelöst. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von 4,13 g (15,61 mmol) 18-Krone-6 und 328 mg (5,65 mmol) Kaliumfluorid. Nach einer Stunde wurden 3,5 ml (55,63 mmol) Chloracetonitril hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und - wie unter Methode A beschrieben - aufgearbeitet.

Ausbeute: 1,71 g (3,27 mmol) weißer Feststoff; 59 % d.Th. (über beide Stufen)

*Methode C*

4,5 g (17,03 mmol) 18-Krone-6 und 510 mg (8,78 mmol) Kaliumfluorid wurden in 30 ml DMF bei Raumtemperatur gelöst und eine Stunde gerührt.

Das 3-Hydroxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosyl)propennitril-Rohprodukt **6** (3,8 g (78,52 mmol)) wurde in 20 ml DMF aufgenommen und zu der Kaliumfluorid/Kronenether-Lösung gegeben. Nach einer Stunde erfolgte die Zugabe von 4,5 ml (71,52 mmol) Chloracetonitril. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 22 Stunden gerührt.

Der Reaktionsansatz wurde - wie unter Methode A beschrieben - aufgearbeitet.

Ausbeute: 3,38 g (6,46 mmol) weißer Feststoff; 76 % d.Th. (über beide Stufen)

 $^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$  *$\alpha$ -Anomer*

$\delta[\text{ppm}] = 1,31$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,15 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>);

3,46 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>); 4,34 (pseudo-t, 1H, H-4); 4,62 (s, 2H, CH<sub>2</sub>);

4,69 (dd, 1H, H-3); 4,87 (dd, 1H, H-2); 5,30 (dd, 1H, H-1); 6,89 (d, 1H, CH);

7,23-7,40 (m, 15H, CH<sub>arom.</sub> und CDCl<sub>3</sub>)

$^2\text{J}_{5\text{a},5\text{b}} = 10,34$  Hz;  $^3\text{J}_{5\text{a},4} = 3,30$  Hz;  $^3\text{J}_{5\text{b},4} = 3,4$  Hz;  $^3\text{J}_{4,3} = 0,73$  Hz;

$^3\text{J}_{3,2} = 6,11$  Hz;  $^3\text{J}_{2,1} = 4,33$  Hz;  $^4\text{J}_{1,\text{CH}} = 1,1$  Hz

*β-Anomer*

$\delta$ [ppm] = 1,32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,26 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>); 3,33 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>);  
 3,70 (s, Dioxan); 4,13 (m, 1H, H-4); 4,58 (dd, 1H, H-3); 4,61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>);  
 4,65 (s, 1H, H-2); 4,76 (s, 1H, H-1); 6,95 (d, 1H, CH);  
 7,20-7,50 (m, 15H, CH<sub>arom.</sub> und CDCl<sub>3</sub>)  
<sup>2</sup>J<sub>5a,5b</sub> = 10,23 Hz; <sup>3</sup>J<sub>5a,4</sub> = 5,31 Hz; <sup>3</sup>J<sub>4,5b</sub> = 4,04 Hz; <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub> = 4,07 Hz;  
<sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 6,74 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2,1</sub> = 5,25 Hz; <sup>4</sup>J<sub>1,CH</sub> = 0,7 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

*α-Anomer*

$\delta$  [ppm] = 24,66 (CH<sub>3</sub>); 25,55 (CH<sub>3</sub>); 58,03 (CH<sub>2</sub>); 65,31 (C-5); 75,54 (C-1);  
 76,71-77,35 (CDCl<sub>3</sub>); 81,95 (C-2); 83,30 (C-3); 83,52 (C-4); 87,57 (CPh<sub>3</sub>);  
 97,66 (C=CH); 113,33 (CMe<sub>2</sub>, CN); 116,06 (CN); 127,27-128,56 (CH<sub>arom.</sub>);  
 143,43 (C<sub>q, arom.</sub>); 155,05 (C=CH)

*β-Anomer*

$\delta$  [ppm] = 25,50 (CH<sub>3</sub>); 27,46 (CH<sub>3</sub>); 58,01 (CH<sub>2</sub>); 63,71 (C-5); 67,09 (Dioxan);  
 76,45 (C-1); 76,36-77,38 (CDCl<sub>3</sub>); 81,95 (C-3); 83,67 und 83,70 (C-2 und C-4);  
 87,143 (CPh<sub>3</sub>); 97,873 (C=CH); 112,857 (CN); 115,14 (CMe<sub>2</sub>); 115,714 (CN);  
 127,05 - 128,74 (CH<sub>arom.</sub>); 143,72 (C<sub>q, arom.</sub>); 157,19 (C=CH)

IR-Spektrum (KBr-Preßling)

$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3059,45 (Aryl-H-Valenzschwingung);  
 2988,54; 2936,45 (aliphatische C-H-Valenzschwingung)  
 2224,83 (CN-Valenzschwingung)  
 1650,44 (C=C-Valenzschwingung in Enolethern)  
 1491,22; 1448,89 (aromatische C=C-Valenzschwingung)  
 1382,33 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Valenzschwingung)  
 1078,92 (C-O-Valenzschwingung); 706,61 (Aryl-H-Deformationsschwingung)

Massenspektrum (Elektronenstoß-Ionisation)M = 522,6 g/mol; C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>m/z [Da] (%) = 522 (M<sup>+</sup>, 0,3); 482 (M<sup>+</sup> -CH<sub>2</sub>CN; 0,1); 243 (Tr, 28); 91 (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>, 100)**2.1.2.6 3-Amino-2-cyano-4-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-D-ribofuranosyl)furan 8***Methode A*

In einen ausgeheizten 50 ml Langhalskolben wurden im Argongegenstrom 2,74 g (5,24 mmol) 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribo-furanosyl)-propennitril 7, welche in 30 ml abs. THF gelöst worden waren, vorgelegt. Die Lösung wurde mit Hilfe einer Ethanol/Trockeneis-Mischung auf -70 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur mit 27 ml (54 mmol) einer LDA-Lösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von sechs Stunden wurde das Gemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt und mit verd. Essigsäure auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Das entstandene Zweiphasengemisch wurde dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttet, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach dem Lyophilisieren mit Dioxan wurde ein dunkelroter Feststoff als Rohprodukt erhalten.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3  $R_f$  α-Anomer : 0,80 $R_f$  β-Anomer : 0,85

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 120 g Kieselgel 60 gereinigt. Bei dieser Reinigung erfolgte auch die Trennung der beiden Anomeren.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99,5 : 0,5

Ausbeute: 360 mg (0,69 mmol) β-Anomer; 13,2 % d,Th

146 mg (0,28 mmol) α-Anomer; 5,3 % d.Th.

*Methode B*

3,8 g (7,28 mmol) 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-D-ribo-furanosyl)-propennitril 7 wurden in einem ausgeheizten 250 ml Langhalskolben in 60 ml THF gelöst und mit Hilfe einer Ethanol/Trockeneis-Mischung auf -70 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden innerhalb von 30 Minuten 5,5 ml ( 10,91 mmol ) LDA-Lösung, die in 70 ml THF

gelöst waren, zugetropft. Nach einer Reaktionszeit von vier Stunden wurde das Gemisch - wie unter Methode A beschrieben - aufgearbeitet.

Ausbeute: 832 mg (1,59 mmol)  $\beta$ -Anomer; 21,9 % d.Th

433 mg (0,83 mmol)  $\alpha$ -Anomer, 11,4 % d.Th.

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\alpha$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,50 (s, 1H, CH<sub>3</sub>); 3,25 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
 3,37 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 4,25 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 4,31 (pseudo-t, 1H, H-4' );  
 4,81 (dd, 1H, H-3' ); 4,91 (dd, 1H, H-2' ); 5,16 (d, 1H, H-1' );  
 7,18 (s, 1H, CH<sub>arom., Furan</sub>); 7,22-7,48 (m, 15 H, CH<sub>arom., Trityl und CDCl</sub><sub>3</sub>);  
 $^2J_{5a',5b'}$  = 10,33 Hz;  $^3J_{5a',4'}$  = 4,32 Hz;  $^3J_{5b',4'}$  = 3,72 Hz;  $^3J_{4',3'}$  = 0,93 Hz;  
 $^3J_{3',2'}$  = 6,01 Hz;  $^3J_{2',1'}$  = 3,91 Hz

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,33 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
 3,45 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 3,7 (Dioxan); 4,22 (m, 3H, H-4' und NH<sub>2</sub>);  
 4,72 (t, 1H, H-2' ); 4,75 (dd, 1H, H-1' ); 4,83 (dd, 1H, H-3' );  
 7,22 (d, 1H, CH<sub>arom., Furan</sub>); 7,25-7,41 (m, 15 H, CH<sub>arom., Trityl und CDCl</sub><sub>3</sub>);  
 $^2J_{5a',5b'}$  = 10,46 Hz;  $^3J_{5a',4'}$  = 3,62 Hz;  $^3J_{5b',4'}$  = 3,18 Hz;  $^3J_{4',3'}$  = 3,66 Hz;  
 $^3J_{3',2'}$  = 6,52 Hz;  $^3J_{2',1'}$  = 5,66 Hz;  $^4J_{1',C=CH}$  = 0,73 Hz

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\alpha$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 24,04 (CH<sub>3</sub>); 25,71 (CH<sub>3</sub>); 64,21 (C-5' ); 76,25-76,89 (CDCl<sub>3</sub>); 76,26 (C-1' );  
 82,44 (C-2' ); 82,69 (C-3' ); 83,01 (C-4' ); 87,14 (CPh<sub>3</sub>); 112,45 (CN);  
 114,28 (CMe<sub>2</sub>); 126,73-128,21 (CH<sub>arom., Trityl und C</sub><sub>q, arom., Furan</sub>);  
 142,96 (C<sub>q, arom., Trityl</sub> ); 144,38 (CH<sub>arom., Furan</sub> )

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 25,55 (CH<sub>3</sub>); 27,50 (CH<sub>3</sub>); 63,17 (C-5' ); 67,096 (s, Dioxan);  
 76,7-77,3 (CDCl<sub>3</sub>); 78,871 (C-1' ); 81,69 (C-3' ); 83,61 (C-4' ); 84,28 (C-2' );  
 87,122 (CPh<sub>3</sub>); 112,64 (CN); 115,24 (CMe<sub>2</sub>);

127,37-128-67 (CH<sub>arom.</sub>, Trityl und C<sub>q, arom.</sub>, Furan); 143,15 (CH<sub>arom.</sub>, Furan);

143,26 (C<sub>q, arom.</sub>, Trityl)

#### IR-Spektrum (KBr-Preßling)

$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3445,41; 3365,09 (NH<sub>2</sub>-Valenzschwingung)

über 3000 (Aryl-H-Valenzschwingung)

2986,28; 2934,46; 2886,13 (aliphatische C-H-Valenzschwingung)

2213,19 (CN-Valenzschwingung); 1639,51 (NH<sub>2</sub>-Deformationsschwingung)

1490,91; 1447,52 (aromatische C=C-Valenzschwingung)

1381,95 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Valenzschwingung); 1079,13 (C-O-Valenzschwingung)

705,27 (Aryl-H-Deformationsschwingung)

#### Massenspektrum (Elektronenstoß-Ionisation)

M = 522,6 g/mol; C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>

m/z [Da] (%) = 280 (M<sup>+</sup> -Tr, 0,3); 243 (Tr, 100); 165 (Tr -C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 30); 105 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, 15)

### 2.1.2.7 Verschiedene Zyklisierungsmethoden

#### **Versuch der Darstellung von 3-Amino-2-cyano-4-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-β-D-ribofuranosyl)furan 8**

##### *Methode A*

500 mg (0,96 mmol) 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl-β-D-ribofuranosyl)propennitril 7 wurden in wenig THF gelöst und mit 10 ml einer 20 %igen Natriumethanolat-Lösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, einmal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt.

DC-Kontrolle: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3

R<sub>f</sub>: 0.83

Das Rohprodukt wurde an 40 g Kieselgel 60 säulenchromatographisch gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1

Ausbeute: 463 mg, die, wie durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie festgestellt wurde, nicht dem gewünschten Produkt entsprachen

*Methode B*

533 mg (1,019 mmol) 3-O-Cyanomethoxy-2-(2,3-O-isopropyliden-5-O-trityl- $\beta$ -ribofuranosyl)propennitril **7** wurden in 5 ml Dichlormethan gelöst, unter Rühren mit 0,4 ml (3,35 mmol) 5-Diazabicyclo[4,3,0]non-5-en (DBN) versetzt und nach einer Stunde eingengt.

DC-Kontrolle:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH 97:3  $R_f$ : 0,84

Das Rohprodukt wurde an 50 g Kieselgel 60 säulenchromatographisch gereinigt.

Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH 99,5:0,5

Ausbeute: 179 mg die, wie durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie festgestellt wurde, nicht dem gewünschten Produkt entsprachen.

**2.1.2.8 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-furo[3,2-d]pyrimidin **9****

678 mg (1,23 mmol) 3-Amino-2-cyano-4-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)furan **8** wurden in 100 ml abs. Ethanol aufgenommen, in der Wärme mit 2,9 g (30,12 mmol) Formamidinacetat versetzt und 7 Tage unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde das Ethanol entfernt, der dunkelbraune Rückstand in Dichlormethan gelöst und dreimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, eingengt und mit Dioxan lyophilisiert.

DC-Kontrolle: Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH 95:5  $R_f$   $\beta$ -Anomer : 0,29

Das Rohprodukt wurde an 60 g Kieselgel 60 säulenchromatographisch gereinigt.

Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH 97:3

Ausbeute: 533 mg (0,97 mmol); 78,8 % d.Th.

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 1,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,26 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
 3,31 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 4,37 (m, 1H, H-4' ); 4,77 (dd, 1H, H-3' );  
 5,13 (dd, 1H, H-2' ); 5,18 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,23 (dd, 1H, H-1' );  
 7,19-7,25 und 7,40-7,43 (m, 15 H, CH<sub>arom., Trityl</sub>); 7,26 (CDCl<sub>3</sub>);  
 7,73(d, 1H, H-6); 8,46 (s, 1H, H-2)  
 $^2\text{J}_{5\text{a}', 5\text{b}'} = 10,04$  Hz;  $^3\text{J}_{5\text{a}', 4'} = 4,38$  Hz;  $^3\text{J}_{5\text{b}', 4'} = 5,53$  Hz;  $^3\text{J}_{4', 3'} = 3,69$  Hz;  
 $^3\text{J}_{3', 2'} = 6,55$  Hz;  $^3\text{J}_{2', 1'} = 4,04$  Hz;  $^4\text{J}_{1', 6} = 0,77$  Hz

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$

*$\beta$ -Anomer*

$\delta$  [ppm] = 25,66 (CH<sub>3</sub>); 27,53 (CH<sub>3</sub>); 64,24 (C-5' ); 67,10 (Dioxan);  
 76,70-77,34 (CDCl<sub>3</sub>); 78,78 (C-1' ); 82,68 (C-3' ); 84,19 (C-4' );  
 84,49 (C-2' ); 86,70 (CPh<sub>3</sub>); 114,36 (CMe<sub>2</sub>); 120,99 (C-7);  
 126,28-128,69 (CH<sub>arom., Trityl</sub>); 134,41 (C-4a); 143,78 (C<sub>q, arom., Trityl</sub>);  
 146,530 (C-6); 148,21 (C-7a); 148,95 (C-4); 153,802 (C-2)

IR-Spektrum (KBr-Preßling)

$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3435,60 (NH<sub>2</sub>-Valenzschwingung); über 3000 (Aryl-H-Valenzschwingung)  
 2922,55 (aliphatische C-H-Valenzschwingung)  
 1647,74 (NH<sub>2</sub>-Deformationsschwingung)  
 1489,90; 1447,97 (aromatische C=C-Valenzschwingung)  
 1382,97 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Valenzschwingung)  
 1079,19 (C-O-Valenzschwingung);  
 706,90 (Aryl-H-Deformationsschwingung)

Massenspektrum (Elektronenstoß-Ionisation)

M = 549,6 g/mol; C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] (%) = 534 (M<sup>+</sup> -NH<sub>2</sub>, 3); 306 (M<sup>+</sup> -Tr, 100); 243 (Tr, 56); 165 (Tr -C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 40);  
 105 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, 13)

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

$m/z$  [Da] = 550 (M+H)<sup>+</sup>, 243 (Tr<sup>+</sup>)

### 2.1.3 Schutzgruppeneinführung an der exozyklischen Aminofunktion und Entschützung der Hydroxylgruppen

#### 2.1.3.1 4-(N-Isobutyro)amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-β-D- ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidin 10

In 4 ml Pyridin wurden 290 mg (0,53 mmol) 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-β-D-ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidin **9** unter Rühren gelöst und mit 100 mg (0,82 mmol) Dimethylaminopyridin und 2,9 ml (2,76 g; 17,41 mmol) Isobuttersäureanhydrid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden wurden unter Eiskühlung 2 ml Ammoniak zugetropft, wobei der pH-Wert auf ungefähr 10 anstieg. Anschließend wurden 10 ml Toluol zu der Lösung hinzugefügt, um das Pyridin durch Kodestillation zu entfernen. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, dreimal mit Wasser gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt mit Dioxan an der Ölpumpe getrocknet.

DC-Kontrolle: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5

R<sub>f</sub> : 0,73

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 100 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3

Ausbeute: 322 mg (0,52 mmol); 98,3 % d. Th.

#### <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 1,19 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, Isobuttersäure); 1,22 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, Isobuttersäure);

1,33 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, Isobutyrylgruppe); 1,34 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, Isobutyrylgruppe);

1,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, Isopropylgruppe); 1,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, Isopropylgruppe);

2,89 (quintett, 1H, CH<sub>Isobutyrylgruppe</sub>); 3,27 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>'); 3,33 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>');

4,35 (q, 1H, H-4'); 4,78 (dd, 1H, H-3'); 5,09 (dd, 1H, H-2'); 5,27 (d, 1H, H-1');

7,2 - 7,5 (CH<sub>arom., Trityl</sub>); 7,95 (d, 1H, H-6); 8,03 (s, 1H, NH); 8,72 (s, 1H, H-2)

<sup>2</sup>J<sub>5a',5b'</sub> = 10,09 Hz; <sup>3</sup>J<sub>5',4'</sub> = 4,42 Hz; <sup>3</sup>J<sub>4',3'</sub> = 4,1 Hz; <sup>3</sup>J<sub>3',2'</sub> = 6,62 Hz;

<sup>3</sup>J<sub>2',1'</sub> = 4,1 Hz; <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>3</sub>,CH</sub> = 6,94 Hz

$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  [ppm] = 19,683 ( $\text{CH}_3$ , Isobutyrylgruppe); 26,093 ( $\text{CH}_3$ , Isopropylgruppe); 27,980 ( $\text{CH}_3$ , Isopropylgruppe);  
36,476 (CH); 64,507 (C-5'); 78,935 (C-1'); 82,965 (C-3'); 84,574 (C-4');  
84,946 (C-2'); 86,718 ( $\text{CPh}_3$ ); 114,531 ( $\text{C}_q$ , Isopropylgruppe); 120,000 (C-7a);  
127,430 - 129,097 ( $\text{Ch}_{\text{arom.}}$ , Trityl); 132,000 (C-7); 141,549 (C-4a);  
143,772 ( $\text{C}_q$ , Trityl); 149,239 (C-6); 153,173 (C-2); 175,00 (C=O)

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

$M = 619,7 \text{ g/mol}$ ;  $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{N}_3$

$m/z$  [Da] = 620 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 243 ( $\text{Tr}^+$ )

**2.1.3.2 Vorversuche zur Abspaltung der Isopropyliden - und Tritylschutzgruppe***Methode A*

Eine Spatelspitze 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril **4** wurde in wenig THF gelöst und mit 2 ml 80 %iger Essigsäure zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da keine Umsetzung zu erkennen war, wurde die Lösung eine Stunde unter Rückfluß gekocht und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Es konnte mittels dünnschichtchromatographischer Verfolgung der Reaktion in Toluol/Ethylacetat 5:1 keine Umsetzung beobachtet werden.

*Methode B*

0,87 mg (1,91 mmol) 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril **4** wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst, mit 5 ml einer Bortrifluorid-Methanol-Lösung versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion in Toluol/Ethylacetat 5:1 zeigte eine deutliche Umsetzung an.

Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand an der Ölpumpe getrocknet und anschließend an 80 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 - 7:3

Ausbeute: 288 mg (1,66 mmol); 87,3 % d. Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

$\delta$  [ppm] = 2,74 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>); 2,90 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>); 3,44 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>);  
3,48 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>); 3,70 (dd, 1H, H-2); 3,77 (dd, 1H, H-4);  
3,83 (dd, 1H, H-1); 3,89 (dd, 1H, H-3)  
 $^2J_{5a,5b} = 11,66$  Hz;  $^2J_{CH_2, CH_2} = 17,04$  Hz;  $^3J_{5a,4} = 4,7$  Hz;  $^3J_{3,2} = 5,37$  Hz;  
 $^3J_{CH_2, 1} = 4,26$  Hz

Eine Übertragung dieser Abspaltungsreaktion auf das 3-Amino-2-cyano-4-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-D-ribofuranosyl)furan **8** führte jedoch zu einer Zerstörung des Moleküls.

*Methode C*

Eine Spatelspitze 2,3-O-Isopropyliden-5-O-trityl-D-ribofuranosylacetonitril **4** wurde in 2 ml einer 1,5 mol/l methanolischen HCl gelöst und bei Raumtemperatur 24 Stunden gerührt.

Eine dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion in Toluol/Ethylacetat 5:1 zeigte eine Umsetzung an. Diese Abspaltungsreaktion konnte auf 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidin **9** übertragen werden.

**2.1.3.3 Versuch der Darstellung von 4-(N-Isobutyro)amino-7- $\beta$ -D-ribofuranosylfuro[3,2-d]pyrimidin 20a  
(N<sup>6</sup>-Isobutyro-7,9-dideaza-7-oxoadenosin)**

Unter starkem Rühren wurden 180 mg (0,29 mmol) 4-(N-Isobutyro)amino-7- $\beta$ -D-ribofuranosylfuro[3,2-d]pyrimidin **10** in 2 ml Methanol gelöst und unter Eiskühlung mit 0,4 ml einer 6 %igen methanolischen HCl-Lösung versetzt. Die Lösung wurde viereinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Zugabe von Dowex 1x2 Ionenaustauscher in der OH-Form unter Eiskühlung neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde durch Filtration und mehrmaliges Waschen mit Methanol wieder aus dem Ansatz entfernt. Das Filtrat wurde eingengt, in wenig Methanol aufgenommen und in 200 ml Petrolether/Diethylether (1:1) präzipitiert. Der Ether wurde abdekantiert, der Niederschlag in Methanol gelöst, eingengt und getrocknet. Der abdekantierte Ether wurde eingengt, der

auftretende Niederschlag in Methanol aufgenommen, eingengt und nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung mit der ersten Fraktion vereinigt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 R<sub>f</sub>: 0,1

Ausbeute: 67 mg (0,25 mmol); 86,5 % d. Th. berechnet auf das entstandene 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin, da die Isobutyrylschutzgruppe auch abgespalten wurde.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 3,37 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>'); 3,51 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>'); 3,73 (q, 1H, H-4');  
 3,87 (m, 1H, H-3'); 4,17 (m, 1H, H-2'); 4,61 (d, 1H, H-1');  
 4,73 (d, 1H, 3'-OH); 4,89 (d, 1H, 2'-OH); 5,63 (m, 1H, 5'-OH);  
 7,12 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 8,06 (2s, 2H, H-2 und H-6)

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 62,814 (C-5'); 72,579 (C-3'); 75,085 (C-2'); 75,975 (C-1'); 86,115 (C-4');  
 120,806 (C-7); 135,000 (C-4a); 147,700 (C-7a); 147,708 (C-6); 150,123 (C-4);  
 153,274 (C-2)

**2.1.3.4                    4-Amino-7-β-D-ribofuranosylfuro[3,2-d]pyrimidin**  
**( 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin) 11**

In 7 ml Methanol wurden 616 mg (1,12 mmol) 4-Amino-7-(2',3'-O-isopropyliden-5'-O-trityl-β-D-ribofuranosyl)furo[3,2-d]pyrimidin **9** gelöst und unter Eiskühlung mit 6 ml methanolischer HCl versetzt. Nach einer Reaktionszeit von viereinhalb Stunden bei Raumtemperatur wurde die Lösung unter Eiskühlung durch Zugabe von Dowex 1x2 Ionenaustauscher (OH<sup>-</sup>-Form) neutralisiert. Anschließend wurde der Ionenaustauscher abfiltriert und gut mit Methanol gewaschen. Die Lösung wurde eingengt und in ca. 600 ml Petrolether/Diethylether (1:1) getropft. Der Ether wurde abdekantiert, der Niederschlag in Methanol gelöst und nach der Lösungsmittelentfernung an der Ölpumpe getrocknet.

Die Etherphase wurde eingengt, der entstandene Niederschlag in Methanol aufgenommen, vom Lösungsmittel befreit und mit der ersten Fraktion vereinigt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 R<sub>f</sub>: 0,1

Ausbeute: 293 mg (1,11 mmol); 98,8 % d. Th.

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400MHz, CDCl}_3\text{)}$

$\delta$  [ppm] = 3,37 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' ); 3,51 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 3,73 (q, 1H, H-4' );  
3,87 (m, 1H, H-3' ); 4,17 (m, 1H, H-2' ); 4,61 (d, 1H, H-1' );  
4,73 (d, 1H, 3'-OH); 4,89 (d, 1H, 2'-OH); 5,63 (m, 1H, 5'-OH);  
7,12 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 8,06 (2s, 2H, H-2 und H-6)

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl}_3\text{)}$

$\delta$  [ppm] = 62,814 (C-5' ); 72,579 (C-3' ); 75,085 (C-2' ); 75,975 (C-1' ); 86,115 (C-4' );  
120,806 (C-7); 135,000 (C-4a); 147,700 (C-7a); 147,708 (C-6); 150,123 (C-4);  
153,274 (C-2)

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 267,24 g/mol; C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] = 268 (M+H)<sup>+</sup>

## **2.2 Desoxygenierung**

### **2.2.1 Desoxygenierung von Uridin**

#### **2.2.1.1 Vergleich der Reaktionsbedingungen beim Einführen der zyklischen Silylschutzgruppe**

##### *Methode A*

Eine Spatelspitze Uridin wurde in 1 ml DMF gelöst und mit einer Spatelspitze Imidazol versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 ml (1,6 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan.

##### *Methode B*

Eine Spatelspitze Uridin wurde in 1 ml Pyridin gelöst und anschließend mit 0,5 ml (1,6 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan versetzt.

Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden wurden beide Ansätze dünnschichtchromatographisch untersucht.

DC-Kontroll: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 93:7

#### **2.2.1.2 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]uridin 12**

Zu einer Lösung von 541 mg (2,22 mmol) Uridin in 7 ml Pyridin wurde unter Rühren ein 1,2-fachen Überschuß an 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan (0,77 ml = 2,47 mmol) gegeben. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 ml Dichlormethan gestoppt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 93:7 R<sub>f</sub> : 0,46

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 70 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5

Ausbeute: 879 mg (1,81 mmol); 81 % d.Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 1,0 (m, 26H, CH und CH<sub>3</sub> aus der Silylschutzgruppe); 3,20 (d, 1H, 2'-OH);  
 3,94 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>'); 4,06 (dt, 1H, H-4'); 4,12 (s, 1H, H-2');  
 4,14 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>'); 4,29 (dd, 1H, H-3'); 5,64 (d, 1H, H-5); 5,68 (s, 1H, H-1');  
 7,66 (d, 1H, H-6); 9,01 (s, 1H, NH);  
<sup>2</sup>J<sub>5a',5b'</sub> = 13,23 Hz; <sup>3</sup>J<sub>4',3'</sub> = 4,77 Hz; <sup>3</sup>J<sub>CH,CH</sub> = 8,11 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 11,485 - 12,363 (CH<sub>Silylschutzgruppe</sub>); 15,802 - 16,438 (CH<sub>3</sub>, Silylschutzgruppe);  
 59,273 (C-5'); 67,947 (C-3'); 74,170 (C-2'); 80,934 (C-4'); 89,924 (C-1');  
 100,951 (C-5); 138,980 (C-6); 148,997 (C<sub>2</sub>=O); 162,248 (C<sub>4</sub>=O);

M = 486,71 g/mol; C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>

**2.2.1.3      3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-  
 2'-O-phenoxythiocarbonyluridin 13**

603 mg (1,24 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]uridin 12 und 1 g (8,18 mmol) Dimethylaminopyridin wurden in 10 ml Acetonitril gelöst und unter Rühren mit 0,3 ml (0,38 mg; 2,22 mmol) O-Phenylchlorothioformiat versetzt. Die Reaktionslösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Zugabe von 100 ml Dichlormethan, einmaliges Waschen mit kalter 1 mol/l Salzsäurelösung, einmaliges Waschen mit Wasser und abschließendes Waschen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung aufgearbeitet. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 97:3 R<sub>f</sub>: 0,47

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 65 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 96:4

Ausbeute: 384 mg (0,62 mmol); 49,8 % d.Th.

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400MHz, CDCl}_3\text{)}$

$\delta$  [ppm] = 1,00 (m, 26H, CH und CH<sub>3</sub> aus der Silylschutzgruppe); 3,96 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
 4,03 (d, 1H, H-4'); 4,18 (d, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 4,48 (dd, 1H, H-3'); 5,65 (d, 1H, H-5);  
 5,86 (s, 1H, H-1'); 5,94 (d, 1H, H-2'); 7,04-7,34 (m, 5H, CH<sub>arom.</sub>, Phenyl);  
 7,65 (d, 1H, H-6); 7,19 (CDCl<sub>3</sub>); 8,87 (s, 1H, NH);

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl}_3\text{)}$

$\delta$  [ppm] = 13,193-13,789 (CH<sub>Silylschutzgruppe</sub>); 17,178-17,855 (CH<sub>3</sub>, Silylschutzgruppe);  
 59,894 (C-5'); 68,561 (C-3'); 82,675 (C-4'); 84,181 (C-2'); 89,018 (C-1');  
 102,712 (C-5); 122,182 (CH<sub>arom.</sub>, ortho.); 127,119 (CH<sub>arom.</sub>, para);  
 129,992 (CH<sub>arom.</sub>, meta); 139,970 (C-6); 49,958 (C<sub>2</sub>=O); 156,155 (C<sub>q</sub>, Phenyl);  
 163,469 (C<sub>4</sub>=O); 194,155 (C=S);

M = 606,87 g/mol; C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>S

**2.2.1.4 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyliden-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyuridin 14**

Zu einer Lösung aus 100 mg (0,16 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyluridin 13 in 5 ml Toluol wurden unter Rühren 6,5 mg (0,04 mmol) 2,2'-Azobis(2-methyl)propionitril ( $\alpha,\alpha'$ -Azoisobutyronitril; AIBN) und 0,3 ml (0,96 mmol) Tributylzinnhydrid hinzugefügt. Nachdem die Lösung 10 Minuten gerührt worden war, wurde sie für zweieinhalb Stunden auf 70 °C erhitzt, anschließend langsam abgekühlt und das Lösungsmittel entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15

R<sub>f</sub>: 0.68

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 50 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15

Ausbeute: 75 mg (0,15 mmol); 95,5 % d.Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 1,0 (m, CH und CH<sub>3</sub> aus der Silylschutzgruppe, 32H); 2,26 (ddd, 1H, H-2<sub>a</sub>' );  
 2,52 (ddd, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,78 (dt, 1H, H-4' ); 4,02 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
 4,14 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 4,45 (m, 1H, H-3' ); 5,69 (dd, 1H, H-5);  
 6,04 (dd, 1H, H-1' ); 7,78 (d, 1H, H-6); 8,24 (s, 1H, NH);  
<sup>2</sup>J<sub>2a',2b'</sub> = 13,35 Hz; <sup>2</sup>J<sub>5a',5b'</sub> = 13,26 Hz; <sup>3</sup>J<sub>CH,CH</sub> = 8,14 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2a',1'</sub> = 1,40 Hz;  
<sup>3</sup>J<sub>2b',1'</sub> = 6,96 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 11,417-12,414 (CH<sub>Silylschutzgruppe</sub>); 15,795-16,474 (CH<sub>3</sub>, Silylschutzgruppe);  
 38,908 (C-2' ); 58,987 (C-5' ); 66,024 (C-3' ); 83,344 (C-1' ); 84,096 (C-4' );  
 100,641 (C-5); 138,655 (C-6); 148,000 (C<sub>2</sub>=O); 161,811 (C<sub>4</sub>=O)

M = 470,71 g/mol; C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>

**2.2.1.5 2'-Desoxyuridin 15**

0,6 ml ( 0,6 mmol ) einer 1 mol/l Tetrabutylammoniumfluoridlösung in THF wurden zu 60 mg (0,123 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyuridin **14** , welche in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst worden waren, gegeben und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das entstandene Produkt wurde dünnschichtchromatographisch mit gekauftem 2'-Desoxyuridin verglichen.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH R<sub>f</sub>: 0,25

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

δ [ppm] = 2,15 (m, 2H, H-2<sub>a</sub>' und H-2<sub>b</sub>' ); 3,44 (m, 2H, H-5<sub>a</sub>' und H-5<sub>b</sub>' );  
 3,66 (m, 1H, H-4' ); 4,12 (m, 1H, H-3' ); 4,90 (t, 1H, 5'-OH);  
 5,14 (d, 1H, 3'-OH); 5,53 (d, 1H, H-5); 6,05 (t, 1H, H-1' ); 7,75 (d, 1H, H-6)  
<sup>3</sup>J<sub>5',5'-OH</sub> = 5,18 Hz; <sup>3</sup>J<sub>CH,CH</sub> = 8,1 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO )

δ [ppm] = 40,041 (C-2' ); 61,647 (C-5' ); 70,770 (C-3' ); 84,475 (C-1' ); 87,766 (C-4' );  
 102,110 (C-5); 140,861 (C-6); 150,801 (C<sub>2</sub>=O); 163,471 (C<sub>4</sub>=O)

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

$M = 228,20 \text{ g/mol}$ ;  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_2$

$m/z [\text{Da}] = 229 (\text{M}+\text{H})^+$

## 2.2.2 **Protektion der exozyklischen Aminofunktion vor der Desoxygenierung**

### *Versuche mit Adenosin*

#### 2.2.2.1 **N<sup>6</sup>-Benzoyladenosin 16**

##### *Methode A*

500 mg (1,87 mmol) Adenosin, welche vorher an der Ölpumpe mit Dioxan und Pyridin lyophilisiert worden waren, wurden in 5 ml Pyridin suspendiert und bei 0 °C mit 2,4 ml (18,7 mmol) frisch destilliertem Trimethylchlorsilan versetzt. Die Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Da nach einer Stunde die Reaktion noch nicht vollständig abgeschlossen war, wurde noch 1 ml (7,8 mmol) Trimethylchlorsilan hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von insgesamt zwei Stunden war die Umsetzung mit Trimethylchlorsilan beendet und die Lösung wurde mit 0,3 ml (0,36 g; 2,58 mmol) Benzoylchlorid bei 0 °C versetzt, drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann unter Eiskühlung mit 8 ml Wasser verdünnt. Anschließend wurde die Mischung in 30 ml Dichlormethan aufgenommen, die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt und mit Methanol und Toluol koevaporiert.

DC-Kontrolle: Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85:15  $R_f: 0,47$

Ein Teil des Rohproduktes wurde säulenchromatographisch an 60 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95:5 - 85:15

Ausbeute: Es konnten drei Produkte mit jeweils gleichen Anteilen isoliert werden, sodaß die Ausbeute bei ca. 30 % lag. Als Nebenprodukte entstanden mehrfach benzoyliertes Adenosin und unbenzoyliertes Adenosin.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

δ [ppm] = 3,52 (m, 1H, H-5<sub>a</sub>' ); 3,63 (m, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 3,92 (q, 1H, H-4' ); 4,13 (q, 1H, H-3' );  
 4,59 (q, 1H, H-2' ); 5,08 (t, 1H, 5'-OH); 5,20 (d, 1H, 3'-OH);  
 5,51 (d, 1H, 2'-OH); 5,99 (d, 1H, H-1' ); 7,48 (t, 2H, H<sub>arom., meta, Benzoyl</sub>);  
 7,58 (t, 1H, H<sub>arom., para, Benzoyl</sub>); 7,98 (d, 2H, H<sub>arom., ortho, Benzoyl</sub>); 8,66 (s, 1H, H-8);  
 8,69 (s, 1H, H-2)  
<sup>3</sup>J<sub>3', 3'-OH</sub> = 4,58 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2', 1'</sub> = 5,59 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

δ [ppm] = 61,691 (C-5' ); 70,734 (C-3' ); 74,035 (C-2' ); 86,096 (C-4' ); 87,965 (C-1' );  
 126,243 (C-5); 128,841 - 132,825 (CH<sub>arom., Benzoyl</sub>); 133,700 (C<sub>q, arom., Benzoyl</sub>);  
 143,523 (C-8); 150,763 (C-6); 151,995 (C-2); 152,590 (C-4); 165,997 (C=O)

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

M = 371,3 g/mol; C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub>

m/z [Da] = 372,3 (M+H)<sup>+</sup>

*Methode B*

**2.2.2.2 2',3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Pentabenzoyladenosin 18**

500 mg (1,87 mmol) Adenosin wurden an der Ölpumpe mit Pyridin lyophilisiert und anschließend in 5 ml Pyridin suspendiert. Die Suspension wurde mittels eines Eisbades abgekühlt, langsam mit 1,2 ml (10,33 mmol) Benzoylchlorid versetzt und 20 Minuten bei 0 °C und dann drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktionslösung wurde auf 50 ml Eis gegossen und das unlösliche Produkt durch Extraktion mit Dichlormethan herausgelöst. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden mit Wasser gewaschen, eingengt und der Rückstand wurde ohne Reinigung weiter umgesetzt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15

R<sub>f</sub> : 0,8

**2.2.2.3 N<sup>6</sup>-Benzoyladenosin 16**

Das Rohprodukt des 2',3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Pentabenzoyladenosins **18** wurde in 50 ml Pyridin/Ethanol (3:1) gelöst und unter pH-Wertkontrolle im Eisbad mit gekühlter 2 mol/l Natronlauge/Ethanol (1:1) bis zu einem pH-Wert von 12,5 versetzt. Nach zwei Stunden zeigte die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion nahezu nur noch Produkt an, so daß die Lösung durch Zugabe von Dowex-Ionenaustauscher 50 WX8 (Pyridiniumform) neutralisiert wurde. Der Ionenaustauscher wurde anschließend durch Filtration wieder entfernt und mit reichlich Wasser ausgewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether gewaschen. Dabei fiel schon ein satter weißer Niederschlag aus, der abfiltriert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und dann an der Ölpumpe getrocknet wurde.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15

R<sub>f</sub> : 0,37

Ausbeute: 656 mg (1,77 mmol); 94,6 % d. Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

δ [ppm] = 3,52 (m, 1H, H-5<sub>a</sub>'); 3,63 (m, 1H, H-5<sub>b</sub>'); 3,92 (q, 1H, H-4'); 4,13 (q, 1H, H-3');  
 4,59 (q, 1H, H-2'); 5,08 (t, 1H, 5'-OH); 5,20 (d, 1H, 3'-OH);  
 5,51 (d, 1H, 2'-OH); 5,99 (d, 1H, H-1'); 7,48 (t, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, Benzoyl);  
 7,58 (t, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Benzoyl); 7,98 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Benzoyl);  
 8,66 (s, 1H, H-8); 8,69 (s, 1H, H-2)  
<sup>3</sup>J<sub>3', 3'-OH</sub> = 4,58 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2', 1'</sub> = 5,59 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

δ [ppm] = 61,691 (C-5'); 70,734 (C-3'); 74,035 (C-2'); 86,096 (C-4'); 87,965 (C-1');  
 126,243 (C-5); 128,841 - 132,825 (C<sub>Benzoyl</sub>); 133,700 (C<sub>q</sub>, Benzoyl);  
 143,523 (C-8); 150,763 (C-6); 151,995 (C-2); 152,590 (C-4); 165,997 (C=O)

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

M = 371,3 g/mol; C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub>

m/z [Da] = 372,3 (M+H)<sup>+</sup>

**Versuch mit 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin****2.2.2.4 2',3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Pentabenzoyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 19**

129 mg (0,48 mmol) 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin 11 wurden, nachdem sie mit Pyridin an der Ölpumpe getrocknet worden waren, in 4 ml Pyridin gelöst und unter Eiskühlung langsam mit 0,31 ml (0,38 g; 2,27 mmol) Benzoylchlorid unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde eine halbe Stunde bei 0 °C und anschließend vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Mischung auf Eis gegossen und das wasserunlösliche Produkt wurde mittels viermaliger Extraktion mit Dichlormethan in diesem Lösungsmittel aufgenommen. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15                      R<sub>f</sub>: 0,92

**2.2.2.5 N<sup>6</sup>-Benzoyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 20**

Das Rohprodukt des 2',3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Pentabenzoyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosins 19 wurde in 10 ml Pyridin / Ethanol (3:1) gelöst und im Eisbad mit gekühlter 2 mol/l Natronlauge / Ethanol - Lösung (1:1) unter pH-Wertkontrolle versetzt, bis der pH-Wert über pH = 12 lag. Nach einer Reaktionszeit von vier Stunden wurde die Lösung durch Zugabe von Dowex-Ionenaustauscher 50 WX 8 (Pyridiniumform) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde anschließend durch Filtration entfernt und gründlich mit Wasser nachgewaschen.

Die vereinigte Wasserphase wurde leicht eingengt, mit Diethylether zweimal ausgeschüttelt und erneut eingengt. Der Rückstand wurde in wenig Ethanol aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Da keine Kristallisation beobachtet werden konnte, wurde die Lösung zur Trockne eingengt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15                      R<sub>f</sub>: 0,48

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 25 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 90:10

Ausbeute: 160 mg (0,43 mmol); 89,2 % d. Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, d<sub>5</sub>-Pyridin)

δ [ppm] = 3,91 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' ); 4,09 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 4,51 (q, 1H, H-4' );  
 4,73 (dd, 1H, H-3' ); 4,99 (dd, 1H, H-2' ); 5,46 (d, 1H, H-1' );  
 8,13 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, Benzoyl); 8,19 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>, Benzoyl); 8,30 (s, 1H, H-6);  
 8,70 (s, 1H, H-2)  
<sup>2</sup>J<sub>5a',5b'</sub> = 12,17 Hz; <sup>3</sup>J<sub>5',4'</sub> = 2,86 Hz; <sup>3</sup>J<sub>3',2'</sub> = 5,03 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2',1'</sub> = 6,77 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, d<sub>5</sub>-Pyridin)

δ [ppm] = 64,580 (C-5' ); 74,465 (C-3' ); 77,423 (C-2' ); 78,470 (C-1' ); 88,141 (C-4' );  
 127,937 und 128,808 (CH<sub>arom.</sub>); 150,733 (C-6); 153,699 (C-2)

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 371,3 g/mol; C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] = 372,2 (M+H)<sup>+</sup>

## 2.2.3 Versuch der Desoxygenierung von aminogeschütztem modifizierten Adenosin

### 2.2.3.1 N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 21

In 5 ml Pyridin wurden 160 mg (0,43 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 20 unter Rühren gelöst und im Argongegenstrom mit 0,2 ml (0,20 g; 0,64 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan versetzt. Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden wurde die Lösung mit 50 ml Dichlormethan verdünnt, dreimal mit je 80 ml Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 30 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3

R<sub>f</sub>: 0,82

Ausbeute: 260 mg (0,43 mmol); 98,6 % d. Th.

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$ 

$\delta$  [ppm] = 3,66-3,70 (m, 2H, H-5<sub>a</sub>' und H-5<sub>b</sub>'); 4,00 (m, 1H, H-4'); 4,36 (m, 1H, H-3');  
4,67 (t, 1H, H-2'); 5,10 (d, 1H, H-1'); 7,48 (t, 2H, H<sub>arom., meta, Benzoyl</sub>);  
7,57 (t, 1H, H<sub>arom., para, Benzoyl</sub>); 7,95 (d, 2H, H<sub>arom., ortho, Benzoyl</sub>); 7,97 (s, 1H, H-6);  
8,49 (s, 1H, NH); 8,73 (s, 1H, H-2)

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 613,9 g/mol; C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>

m/z [Da] = 614,4 (M+H)<sup>+</sup>

**2.2.3.2 Versuch der Darstellung von N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 22**

250 mg (0,41 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 21 wurden, nachdem sie an der Ölpumpe mit Dioxan koevaporiert worden waren, mit 564 mg (4,6 mmol) Dimethylaminopyridin, welches ebenfalls frisch getrocknet worden war, in 10 ml Acetonitril gelöst und unter Rühren im Argonstrom mit 0,2 ml (1,39 mmol) O-Phenylchlorothioformiat versetzt. Die Lösung wurde 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit ca. 30 ml Dichlormethan verdünnt, zweimal mit kalter 1 mol /l Salzsäurelösung, einmal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumcarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und dann eingengt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3

Das Rohprodukt wurde an 50 g Kieselgel 60 säulenchromatographisch gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/n-Hexan 9:1

Ausbeute: Es konnte kein Produkt identifiziert werden

## 2.2.4 Desoxygenierung von Adenosin

### 2.2.4.1 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]adenosin 23

In 10 ml Pyridin wurden 500 mg (1,87 mmol) Adenosin unter Rühren gelöst und mit 0,7 ml (2,24 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan versetzt. Nach einer Reaktionszeit von zweieinhalb Stunden wurde die Reaktionslösung mit ca. 70 ml Dichlormethan verdünnt, zweimal mit Wasser und einmal mit einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend eingeengt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 R<sub>f</sub> : 0,54

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 80 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel für die Säule : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 90:10

Ausbeute: 0,92 g (1,89 mmol); 96,3 % d.Th. (Lit:85 % <sup>[113]</sup>)

#### <sup>1</sup>H-MNR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 1,0 (m, 28 H, CH und CH<sub>3</sub> aus der Silylschutzgruppe); 3,24 (d, 1H, 2'-OH);  
3,94-4,08 (m, 3H, H-5<sub>a</sub>' , H-5<sub>b</sub>' und H-4'); 4,53 (d, 1H, H-2');  
5,06 (dd, 1H, H-3'); 5,56 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,90 (d, 1H, H-1'); 7,88 (s, 1H, H-8);  
8,23 (s, 1H, H-2)

#### <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 11,631-12,267 (CH<sub>Silylschutzgruppe</sub>); 15,927-16,437 (CH<sub>3</sub>, Silylschutzgruppe);  
60,916 (C-5'); 69,968 (C-3'); 74,103 (C-2'); 81,215 (C-4'); 88,687 (C-1');  
138,619 (C-8); 152,052 (C-2); 119,443 (C-5); 148,270 (C-6); 154,398 (C-4)

#### Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 509,7 g/mol; C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

m/z [Da] = 510,5 (M+H)<sup>+</sup>

### 2.2.4.2 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxy-thiocarbonyladenosin 24

200 mg (0,4 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]adenosin 23 und 400 mg (3,27 mmol) Dimethylaminopyridin wurden in 5 ml Acetonitril gelöst, mit 0,1 ml (0,74 mmol) O-Phenylchlorothioformiat versetzt und 120 Stunden gerührt. Anschließend wurden 100 ml Dichlormethan zugefügt und die Lösung wurde einmal mit kalter Salzsäure (1 mol/l), einmal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 85:15  $R_f$  : 0,66

Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 65 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 96:4

Ausbeute: 210 mg (0,33 mmol); 81,3 % d. Th. (Lit: 91 % <sup>[113]</sup>)

#### <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 1,0 (m, 28 H, CH und CH<sub>3</sub> aus der Silylschutzgruppe); 3,99 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );

4,05 (dt, 1H, H-4'); 4,11 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 5,30 (dd, 1H, H-3' );

5,59 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6,09 (d, 1H, H-1' ); 6,31 (d, 1H, H-2' );

7,06 (dt, 2H, CH<sub>arom.</sub>, ortho, Phenyl); 7,24 (tt, 1H, CH<sub>arom.</sub>, para, Phenyl);

7,36 (tt, 2H, CH<sub>arom.</sub>, meta, Phenyl); 7,91 (s, 1H, H-8); 8,24 (s, 1H, H-2)

<sup>2</sup>J<sub>5a',5b'</sub> = 12,81 Hz; <sup>3</sup>J<sub>5a',4'</sub> = 2,64 Hz; <sup>3</sup>J<sub>5b',4'</sub> = 2,9 Hz; <sup>3</sup>J<sub>4',3'</sub> = 8,87 Hz;

<sup>3</sup>J<sub>3',2'</sub> = 5,3 Hz

#### <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 11,836-12,266 (CH<sub>Silylschutzgruppe</sub>); 15,965-16,419 (CH<sub>3</sub>, Silylschutzgruppe);

59,477 (C-5' ); 68,481 (C-3' ); 81,078 (C-4' ); 83,084 (C-2' ); 86,283 (C-1' );

120,00 (C-5); 120,717 (CH<sub>arom.</sub>, ortho, Phenyl); 125,721 (CH<sub>arom.</sub>, para, Phenyl);

128,573 (CH<sub>arom.</sub>, meta, Phenyl); 138,585 (C-8); 148,000 (C-6); 152,211 (C<sub>arom.</sub>, Phenyl);

152,375 (C-2); 154,426 (C-4); 193,000 (C=S)

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

$M = 645,9 \text{ g/mol}$ ;  $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{O}_6\text{N}_5\text{Si}_2\text{S}$

$m/z [\text{Da}] = 646,3 (\text{M}+\text{H})^+$

**2.2.4.3 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosin 25**

In 7 ml Toluol wurden 150 mg (0,23 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyladenosin 24 gelöst und mit 12 mg (0,07 mmol) 2,2'-Azobis(2-methyl)propionitril ( $\alpha,\alpha'$ -Azoisobutyronitril; AIBN) und 0,4 ml (1,51 mmol) Tributylzinnhydrid versetzt. Nachdem die Lösung 15 Minuten gerührt worden war, wurde sie vier Stunden bei 80 °C gekocht und anschließend das Lösungsmittel entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85:15  $R_f : 0,57$

Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an 50 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95:5

Ausbeute: 106 mg (0,22 mmol); 92,5 % d. Th. (Lit: 75% <sup>[113]</sup>)

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  [ppm] = 1,0 ( $\text{CH}_3$  und CH aus der Silylschutzgruppe); 2,58 (ddd, 1H, H-2<sub>a</sub>' );

2,65 (ddd, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,83 (m, 1H, H-4' ); 3,97 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );

4,00 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 4,89 (dd, 1H, H-3' ); 5,63 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ );

6,23 (dd, 1H, H-1' ); 7,19 ( $\text{CDCl}_3$ ); 7,97 (s, 1H, H-8); 8,25 (s, 1H, H-2)

$^2\text{J}_{5\text{a}',5\text{b}'} = 12,52 \text{ Hz}$ ;  $^2\text{J}_{2\text{a}',2\text{b}'} = 13,29 \text{ Hz}$ ;  $^3\text{J}_{5\text{a}',4'} = 3,4 \text{ Hz}$ ;  $^3\text{J}_{3',2'} = 7,41 \text{ Hz}$ ;

$^3\text{J}_{2\text{a}',1'} = 2,58 \text{ Hz}$ ;  $^3\text{J}_{2\text{b}',1'} = 7,31 \text{ Hz}$

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  [ppm] = 11,519 - 12,368 ( $\text{CH}_{\text{Silylschutzgruppe}}$ ); 15,888 - 16,494 ( $\text{CH}_3$ , Silylschutzgruppe);

39,038 (C-2' ); 60,776 (C-5' ); 66,076 (Dioxan); 68,827 (C-3' ); 82,188 (C-1' );

84,192 (C-4' ); 120,000 (C-5); 137,967 (C-8); 148,000 (C-6); 151,931 (C-2);

154,348 (C-4);

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

$M = 493,7 \text{ g/mol}$ ;  $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}_5\text{Si}_2$

$m/z [\text{Da}] = 494,2 (\text{M}+\text{H})^+$

#### 2.2.4.4 Vergleich der Reaktionsbedingungen zur Darstellung von 2'-Desoxyadenosin 26

##### *Methode A*

5 mg (0,01 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxy-adenosin 25 wurden in 2 ml THF gelöst und mit 5 ml einer 1 mol/l Tetrabutyl-ammoniumfluorid-Lösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 1,5 Stunden wurde der Ansatz aufgeteilt und auf zwei verschiedenen Wegen aufgearbeitet.

- a) Entfernung des Lösungsmittels
- b) Zugabe von festem Natriumcarbonat, Filtration der Lösung, Entfernung des Lösungsmittels

##### *Methode B*

5 mg (0,01 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxy-adenosin 25 wurden in 2 ml THF gelöst und mit 40 mg (0,68 mmol) Kaliumfluorid, 10 mg (0,04 mmol) 18-Krone-6 und 25  $\mu$ l (1,39  $\mu$ mol) Wasser versetzt. Nach 1,5 Stunden wurde der Feststoff abfiltriert, mit THF gewaschen und eingeeengt.

Die drei verschiedenen Proben wurden dünnschichtchromatographisch untersucht und mit gekauften 2'-Desoxyadenosin verglichen.

DC-Kontrolle: Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85:15

$R_f$  : 0,36

$M = 251,24 \text{ g/mol}$ ;  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_5$

## 2.2.5 Versuch, die Aminofunktion während der Desoxygenierung zu schützen

### 2.2.5.1 DC-Versuch zur Darstellung von N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyladenosin 27

Eine Spatelspitze 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyladenosin 24 wurde in 0,5 ml Pyridin gelöst, mit einer Spatelspitze Dimethylaminopyridin und ein paar Tropfen Benzoylchlorid unter Kühlung versetzt. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung des Versuches zeigte keine Bildung des zu erwartenden unpolaren Spots an. Daher wurde der Versuch abgebrochen.

### 2.2.5.2 DC-Versuch zur Darstellung von N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-[1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosin 28

Ein wenig 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxyadenosin 25 wurde in 0,5 ml Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit einer Spatelspitze Dimethylaminopyridin und einer Spatelspitze Benzoesäureanhydrid versetzt. Da keine Reaktion eintrat, wurde die Reaktionslösung anschließend zwei Stunden unter Rückfluß gekocht. Aufgrund der Tatsache, daß auch auf diese Weise die Umsetzung nur teilweise eintrat, wurde unter Kühlung noch etwas Benzoylchlorid hinzugefügt. Es konnte aber keine Verbesserung der Ausbeute, sondern nur eine eintretende Zersetzung beobachtet werden.

## 2.2.6 Desoxygenierung des modifizierten Nukleosids

### 2.2.6.1 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 29

Zu einer Lösung von 70 mg (0,26 mmol) 7,9-Dideaza-7-oxoadenosin **11** in 4 ml Pyridin wurden 0,1 ml (0,32 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan hinzugefügt. Nach drei Stunden wurde die Reaktionslösung in Dichlormethan aufgenommen, dreimal mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 R<sub>f</sub>: 0,54

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 30 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 90:10

Ausbeute: 136 mg (0,22 mmol); 85 % d.Th.

#### <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 1,0 (m, 26 H, CH und CH<sub>3</sub> aus der Silylschutzgruppe); 3,25 (s, 1H, 2'-OH);  
 3,96 - 4,05 (m, 3H, H-5<sub>a</sub>', H-5<sub>b</sub>' und H-4'); 4,30 (dd, 1H, H-2');  
 4,65 (m, 1H, H-3'); 5,04 (dd, 1H, H-1'); 5,15 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,74 (d, 1H, H-6);  
 8,38 (s, 1H, H-2)  
<sup>3</sup>J<sub>3',2'</sub> = 5,62 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2',1'</sub> = 3,08 Hz; <sup>4</sup>J<sub>1',6</sub> = 0,89 Hz

#### <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 11,631 -12,172 (CH<sub>Silylschutzgruppe</sub>); 15,975 - 16,475 (CH<sub>3</sub>, Silylschutzgruppe);  
 61,343 (C-5'); 70,981 (C-3'); 74,107 (C-2'); 76,862 (C-1'); 81,060 (C-4');  
 119,913 (C-7); 133,660 (C-4a); 145,699 (C-6); 147,420 (C-7a); 148,546 (C-4);  
 152,525 (C-2)

#### Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 509,7 g/mol; C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>

m/z [Da] = 510 (M+H)<sup>+</sup>

**2.2.6.2 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-  
O-phenoxythiocarbonyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 30**

540 mg (4,42 mmol) Dimethylaminopyridin, welche kurz an der Ölpumpe getrocknet worden waren, und 0,2 ml (1,48 mmol) O-Phenylchlorothioformiat wurden zu 269 mg (0,53 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 29, die in 10 ml Acetonitril gelöst worden waren, gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden wurde die Lösung in 50 ml Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit kalter 1 mol/l HCl (je 50 ml), einmal mit Wasser (50 ml) und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (je 50 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt.

DC-Kontrolle: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 R<sub>f</sub> : 0.67

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 70 g Kieselgel 60 gereinigt. Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3

Ausbeute: 229 mg (0,35 mmol); 67,2 % d.Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 1,0 (m, 28H, CH und CH<sub>3</sub> aus der Silylschutzgruppe);

3,94 - 4,00 (m, 2H, H-5<sub>a</sub>' und H-4'); 4,08 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>'); 5,09 (dd, 1H, H-3');

5,16 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,28 (d, 1H, H-1'); 6,14 (dd, 1H, H-2');

7,07 (m, 2H, H<sub>arom., ortho, Phenyl</sub>); 7,22 (m, 1H, H<sub>arom., para, Phenyl</sub>);

7,34 (m, 2H, H<sub>arom., meta, Phenyl</sub>); 7,79 (s, 1H, H-6); 8,35 (s, 1H, H-2)

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 11,809 - 12,306 (CH<sub>Silylschutzgruppe</sub>); 16,041 - 16,461 (CH<sub>3</sub>, Silylschutzgruppe);

59,927 (C-5'); 69,755 (C-3'); 74,334 (C-1'); 80,397 (C-4'); 84,519 (C-2');

119,091 (C-7); 120,861 (CH<sub>arom., ortho, Phenyl</sub>); 125,502 (CH<sub>arom., para, Phenyl</sub>);

128,458 (CH<sub>arom., meta, Phenyl</sub>); 133,731 (C-4a); 146,264 (C-6); 147,390 (C-7a);

152,407 (C-2); 152,651 (C-4)

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 645,9 g/mol; C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>S

m/z [Da] = 646,1 (M+H)<sup>+</sup>

**2.2.6.3 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-  
2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 31**

230 mg (0,36 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-O-phenoxythiocarbonyl-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 30 wurden in 20 ml Toluol gelöst, mit 50 mg (0,3 mmol) 2,2'-Azobis(2-methyl)propionitril ( $\alpha,\alpha'$ -Azoisobutyronitril; AIBN) und 0,7 ml (2,24 mmol) Tributylzinnhydrid versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung drei Stunden bei ca 90 °C unter Rückfluß gekocht und dann langsam abgekühlt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt an der Ölpumpe getrocknet.

DC-Kontrolle: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 85:15 R<sub>f</sub> : 0,5

Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an 90 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5

Ausbeute: 158 mg (0,32 mmol); 89 % d.Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 1,0 (m, 28 H, CH und CH<sub>3</sub> aus der Silylschutzgruppe); 2,32 (m, 1H, H-2<sub>a</sub>' );  
2,45 (m, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,79 - 3,88 (m, 2H, H-4' und H-5<sub>a</sub>' ); 4,02 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' );  
4,57 (m, 1H, H-3' ); 5,19 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,30 (dt, 1H, H-1' ); 7,70 (d, 1H, H-6);  
8,39 (s, 1H, H-2)

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 11,932 - 12,459 (CH<sub>Silylschutzgruppe</sub>); 15,958 - 16,551 (CH<sub>3</sub>, Silylschutzgruppe);  
39,120 (C-2' ); 62,050 (C-5' ); 69,859 (C-1' ); 71,429 (C-3' ); 84,700 (C-4' );  
122,420 (C-7); 133,000 (C-4a); 144,947 (C-6); 147,401 (C-7a); 147,829 (C-4);  
152,440 (C-2)

Maasspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 493,7 g/mol; C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>

m/z [Da] = 494,1 (M+H)<sup>+</sup>

**2.2.6.4 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 32**

Zu einer Lösung aus 158 mg (0,32 mmol) 3',5'-O-[1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxan-1,3-diyl]-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 31 in 5 ml THF wurden 58 mg (0,22 mmol) 18-Krone-6, 233 mg (4,01 mmol) Kaliumfluorid und 129  $\mu$ l (7  $\mu$ mol) Wasser hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde fünf Stunden gerührt, zur Abtrennung des Feststoffes filtriert und anschließend eingeeengt.

DC-Kontrolle: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85 :15

R<sub>f</sub> : 0,25

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch eine Säulenchromatographie an 25 g Kieselgel 60.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 90:10

Ausbeute: 60 mg (0,27 mmol); 85,5 % d.Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, D<sub>2</sub>O)

$\delta$  [ppm] = 1,82 (ddd, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 2,07 (ddd, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,25 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
3,32 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 3,63 (m, 1H, H-4' ); 4,07 (d, 1H, H-3' ); 5,01 (q, 1H, H-1' );  
7,22 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,97 und 7,98 (2s, 2H, H-2 und H-6)  
<sup>2</sup>J<sub>5a',5b'</sub> = 11,98 Hz; <sup>2</sup>J<sub>2a',2b'</sub> = 12,59 Hz; <sup>3</sup>J<sub>3',2'</sub> = 5,15 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2a',1'</sub> = 5,56 Hz;  
<sup>3</sup>J<sub>2b',1'</sub> = 10,69 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, D<sub>2</sub>O)

$\delta$  [ppm] = 41,544 (C-2' ); 63,158 (C-5' ); 71,850 (C-1' ); 73,306 (C-3' ); 88,483 (C-4' );  
122,200 (C-7); 134,404 (C-4a); 146,596 (C-6); 147,890 (C-7a); 150,056 (C-4);  
153,282 (C-2)

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 251,24 g/mol; C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] = 252 (M+H)<sup>+</sup>

## **2.3 Schutzgruppeneinführung in Hinblick auf die Triphosphatsynthese**

### **2.3.1 Versuche mit 2'-Desoxyadenosin 26**

#### **2.3.1.1 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin 33**

460 mg (1,83 mmol) 2'-Desoxyadenosin 26 wurden zur Trocknung dreimal mit Pyridin an der Ölpumpe koevaporiert, anschließend in 10 ml Pyridin suspendiert und mit 1,4 g (4,13 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid, welche vorher kurz an der Ölpumpe getrocknet worden waren, und mit 10 mg (81,85 mmol) 4-Dimethylaminopyridin, welche auch an der Ölpumpe kurz getrocknet worden waren, versetzt. Zu der orangefarbenen Lösung wurde noch 1 ml (7,2 mmol) Triethylamin hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von 19 Stunden wurde der Ansatz direkt weiter umgesetzt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15     R<sub>f</sub>: 0,49

#### **2.3.1.2 N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin 34**

Zu der Reaktionslösung der 4,4'-Dimethoxytrityl-desoxyadenosin-Synthese 33 wurden 0,6 ml (4,75 mmol) frisch destilliertes Trimethylchlorsilan gegeben und eine Stunde gerührt (R<sub>f</sub>: 0,53 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15). Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml (8,61 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid. Die Lösung wurde zwei Stunden gerührt (R<sub>f</sub>: 0,75 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Hilfe eines Eisbades abgekühlt, mit 2 ml Wasser und 5 Minuten später mit 4 ml einer 28 %igen Ammoniaklösung versetzt, eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15     R<sub>f</sub>: 0,52

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 100 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3 + 0,5 % Pyridin

Ausbeute: 809 mg (1,23 mmol); 67,2 % d. Th. über vier Stufen bezogen auf 2'-Desoxyadenosin (Lit.: 88 % <sup>[126]</sup>)

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$

$\delta$  [ppm] = 2,50 (m, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 2,81 (m, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,34 (d, 2H, H-5<sub>a</sub>' , H-5<sub>b</sub>' );  
 3,70 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4,10 (q, 1H, H-4' ); 4,64 (m, 1H, H-3' ); 6,42 (t, 1H, H-1' );  
 6,72 (dd, 4H, H<sub>arom.</sub>, neben OCH<sub>3</sub>); 7,19 (m, 4H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Trityl);  
 7,31 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, Trityl); 7,38 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, Trityl); 7,45 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Trityl);  
 7,45 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, Benzoyl); 7,53 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Benzoyl);  
 7,95 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Benzoyl); 8,09 (s, 1H, H-8); 8,65 (s, 1H, H-2);  
 9,03 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl}_3\text{)}$

$\delta$  [ppm] = 39,244 (C-2' ); 54,212 (OCH<sub>3</sub>); 62,676 (C-5' ); 71,465 (C-3' ); 83,666 (C-1' );  
 85,216 (C-4' ); 85,615 (CPh<sub>3</sub>); 112,135 (CH<sub>arom.</sub>, neben OCH<sub>3</sub>, Trityl);  
 120-157 (CH<sub>arom.</sub> und C<sub>arom.</sub>); 140,495 (C-8); 151,537 (C-2); 168,360 (C=O)

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

M = 657 g/mol; C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub>

m/z [Da] = 658,8 (M+H)<sup>+</sup>

**2.3.1.3 Methoxyessigsäureanhydrid 35**

6 g (5 ml, 66,6 mmol) Methoxyessigsäure wurden in 14 ml Ethylacetat gelöst, mit 7,1 g (34,4 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und eine Stunde gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, das Filtrat unter Normaldruck destilliert, um das Lösungsmittel zu entfernen. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt im Vakuum destilliert.

Sdp. 78 °C bei 1,2 \* 10<sup>-1</sup> Bar

IR-Spektrum

$\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 1837,82 (C=O-Valenzschwingung bei Anhydriden)

1766,47 (C=O-Valenzschwingung bei Anhydriden)

2834,84 (C-H-Valenzschwingung)

1162,72 (C-O-Valenzschwingung)

**2.3.1.4 N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxyadenosin 36**

Zu einer Lösung von 250 mg (0,38 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin 34 in 2,5 ml Pyridin wurden 0,1 ml (0,56 mmol) Methoxyessigsäureanhydrid 35 gegeben und eine Stunde gerührt ( $R_f$ : 0,77 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15). Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Sirup in 2,5 ml 80 %iger Essigsäure aufgenommen und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Nach der vollständigen Abspaltung der Dimethoxytritylschutzgruppe wurde die Lösung eingengt, der Rückstand in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit einer kalten Natriumcarbonat (5 %ige Lösung)/ Eis-Mischung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und zur Entfernung des Pyridins mit Toluol koevaporiert.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15  $R_f$ : 0,56

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 25 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 95:5

Ausbeute: 91 mg (0,21 mmol); 56 % d.Th. ( Lit.: 81 % <sup>[97]</sup> )

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 2,52 (dd, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 3,25 (ddd, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,50 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,71 (Dioxan);  
 3,92-4,03 (m, 2H, H-5<sub>a</sub>' , H-5<sub>b</sub>' ); 4,11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,32 (s, 1H, H-4' );  
 5,69 (d, 1H, H-3' ); 5,87 (d, 1H, 5'-OH); 6,36 (dd, 1H, H-1' );  
 7,53 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, Benzoyl); 7,63 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Benzoyl);  
 8,03 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Benzoyl); 8,11 (s, 1H, H-8); 8,80 (s, 1H, H-2);  
 9,03 (s, 1H, NH);  
 $^2J_{2a',2b'}$  = 14,11 Hz;  $^3J_{3',2'}$  = 5,56 Hz;  $^3J_{2',1'}$  = 5,41 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 37,800 (C-2' ); 59, 572 (CH<sub>3</sub>); 63,153 (C-5' ); 67,103 (Dioxan); 69,835 (CH<sub>2</sub>);  
 77,280 (C-3' ); 87,412-87,604 (C-4' , C-1' ); 124,716 (C-5); 125-135 (5 CH<sub>arom.</sub>);  
 133,017 (C<sub>q</sub>, Benzoyl); 142,414 (C-8); 150,383 (C-6); 150,757 (C-4);  
 152,254 (C-2); 164,428 (C=O); 169,686 (COO)

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement) $M = 427,4 \text{ g/mol}; \text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_5$  $m/z [\text{Da}] = 428,1 (\text{M}+\text{H})^+$ **2.3.2 Versuche an 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin****2.3.2.1 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 37**

52 mg (0,24 mmol) 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 32 wurden zweimal mit Pyridin an der Ölpumpe getrocknet, in 2 ml Pyridin suspendiert und unter Rühren mit 8 mg (0,06 mmol) Dimethylaminopyridin und 150 mg (0,44 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid versetzt. Zu der Lösung wurden noch 0,13 ml (0,09 g; 0,94 mmol) Triethylamin hinzugefügt.

Nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden wurde das Reaktionsgemisch direkt zur weiteren Umsetzung eingesetzt.

DC-Kontrolle: Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85:15  $R_f$ : 0,47

**2.3.2.2 N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxo-adenosin 38**

Zu der Reaktionslösung der Dimethoxytritylierung 37 wurden 0,15 ml (1,18 mmol) Trimethylchlorsilan unter Argon gegeben. Nach 40 Minuten wurden, da die Umsetzung abgeschlossen ( $R_f$ : 0,73 in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85:15) war, 0,14 ml (1,22 mmol) Benzoylchlorid langsam unter Rühren hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden ( $R_f$ : 0,83 in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85/15) wurde die Lösung mittels eines Eisbades abgekühlt, mit 0,25 ml Wasser und 5 Minuten später mit 0,5 ml einer 28 %igen Ammoniaklösung versetzt und anschließend eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Dann wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und eingengt.

DC-Kontrolle: Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$  85:15  $R_f$ : 0,57

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 50 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$  97:3

Ausbeute: 16 mg (0,024 mmol); 10,3 % d.Th. über zwei Stufen bezogen auf 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 2,27 (ddd, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 2,43 (ddd, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,19 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
 3,27 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 3,70 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4,06 (ddd, 1H, H-4' );  
 4,46 (m, 1H, H-3' ); 4,98 (t, 1H, 3'-OH); 5,43 (dd, 1H, H-1' );  
 6,74 (d, 4H, H<sub>arom.</sub>, neben OCH<sub>3</sub> in DMT); 7,14 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, DMT);  
 7,19 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, DMT); 7,25 (m, 4H, H<sub>arom.</sub>, DMT);  
 7,37 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, DMT); 7,47 (t, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, Benzoyl);  
 7,56 (t, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Benzoyl); 7,90 (s, 1H, H-6); 7,96 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Benzoyl);  
 8,67 (s, 1H, H-2); 8,90 (s, 1H, NH)  
<sup>2</sup>J<sub>5<sub>a</sub>', 5<sub>b</sub>'</sub> = 9,79 Hz; <sup>2</sup>J<sub>2<sub>a</sub>', 2<sub>b</sub>'</sub> = 13,04 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2<sub>a</sub>', 1'</sub> = 9,44 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2<sub>b</sub>', 1'</sub> = 6,01 Hz

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

M = 657,4 g/mol; C<sub>39</sub>H<sub>35</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] = 658,3 (M+H)<sup>+</sup>, 303 (DMT<sup>+</sup>)

**2.3.2.3 N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 39**

Eine Lösung von 16 mg (0,024 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4, 4' dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **38** in 1 ml Pyridin wurde 0,01 ml (0,06 mmol) Methoxyessigsäureanhydrid **35** gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Entfernung des Pyridins wurde der Rückstand in 1,5 ml 80 %iger Essigsäure gelöst und vier Stunden gerührt.

Anschließend wurde die Lösung eingengt, der Sirup in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit einer Natriumcarbonat/ Eis-Mixtur gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde destillatv entfernt.

Das Produkt konnte nicht rein isoliert werden. Per Dünnschichtchromatographie wurde aber eine Produktbildung nachgewiesen.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 R<sub>f</sub>: 0,66

Massenspektrum (Fast-Atom-Bombardement)

M = 427,4 g/mol; C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] = 429,2 (M+H)<sup>+</sup>

### **2.3.3     **Protektion der exozyklischen Aminofunktion des 2'-Desoxyadenosins 26****

#### **2.3.3.1     **3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Tetrabenzoyl-2'-desoxyadenosin 40****

100 mg (0,4 mmol) 2'-Desoxyadenosin 26 wurden einmal mit Pyridin an der Ölpumpe getrocknet und anschließend in 4 ml Pyridin suspendiert. Die Suspension wurde mittels eines Eisbades abgekühlt, langsam mit 0,2 ml (1,72 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid unter Rühren versetzt und eine halbe Stunde bei 0 °C gerührt. Danach wurde noch vier Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt.

Nachdem die Umsetzung abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gegossen und viermal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit Wasser gewaschen, eingengt und das Rohprodukt direkt ohne weitere Aufreinigung zur Debenzoylierung eingesetzt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15   R<sub>f</sub>: 0,9

#### **2.3.3.2     **N<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-desoxyadenosin 41****

Das Rohprodukt des 3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Tetrabenzoyl-2'-desoxyadenosins 40 wurde in 10 ml Pyridin/Ethanol (3:1) gelöst und im Eisbad mit gekühlter 2 mol/l Natronlauge/Ethanol (1:1) unter pH-Wertkontrolle bis zu einem pH-Wert von über 12 versetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden war die Umsetzung vollständig abgeschlossen und die Lösung wurde durch Zugabe von Dowex-Ionenaustauscher 50 WX8 (Pyridiniumform) neutralisiert.

Der Ionenaustauscher wurde durch Filtration entfernt und mit Wasser gründlich gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether gewaschen, eingengt und der Rückstand in wenig Ethanol aufgenommen. Über Nacht bildete sich ein weißer Niederschlag, welcher abfiltriert und an der Ölpumpe getrocknet wurde.

DC-Kontrolle: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15

R<sub>f</sub> : 0,42

Ausbeute: 110 mg (0,310 mmol); 77,8 % d. Th. über zwei Stufen bezogen auf 2'-Desoxyadenosin (Lit.: 51 % <sup>[128]</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

δ [ppm] = 2,30 (ddd, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 2,73 (m, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,48 (m, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
 3,57 (m, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 3,84 (q, 1H, H-4' ); 4,39 (d, 1H, H-3' );  
 4,97 (t, 1H, 5'-OH); 5,32 (d, 1H, 3'-OH); 6,44 (t, 1H, H-1' );  
 7,50 (dt, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, Benzoyl); 7,58 (dt, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Benzoyl);  
 7,98 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Benzoyl); 8,62 (s, 1H, H-8); 8,69 (s, 1H, H-2)  
<sup>2</sup>J<sub>2a',2b'</sub> = 13,29 Hz

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

δ [ppm] = 39,618 (C-2' ); 61,961 (C-5' ); 71,044 (C-3' ); 84,090 (C-1' ); 88,338 (C-4' );  
 126,226 (C-5); 128,836 (CH<sub>Benzoyl</sub>); 132,817 (CH<sub>Benzoyl</sub>); 133,729 (C<sub>q</sub>, Benzoyl);  
 143,420 (C-8); 150,682 (C-6); 151,862 (C-2); 152,257 (C-4); 165,900 (C=O)

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

M = 355 g/mol; C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N<sub>5</sub>

m/z [Da] = 356,3 (M+H)<sup>+</sup>

### 2.3.4 Protektion der exozyklischen Aminofunktion an 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin

#### 2.3.4.1 3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Tetrabenzoyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 42

46 mg (0,21 mmol) 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 32 wurde mit Pyridin an der Ölpumpe getrocknet und nachfolgend in 5 ml Pyridin gelöst. Die Mischung wurde mittels eines Eisbades gekühlt, langsam mit 0,15 ml (0,18 g; 1,29 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid unter Rühren versetzt, eine halbe Stunde bei 0 °C und dann viereinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Eis gegossen. Das wasserunlösliche Produkt wurde durch viermalige Extraktion in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser gewaschen und eingengt. Das Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiter umgesetzt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15                      R<sub>f</sub> : 0,87

#### 2.3.4.2 N<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 43

Das Rohprodukt des 3',5',N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-Tetrabenzoyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosins 42 wurde in 10 ml Pyridin/Ethanol (3:1) gelöst und im Eisbad mit gekühlter 2 mol/l Natronlauge/Ethanol (1:1) unter pH-Wertkontrolle ( bis der pH-Wert über 12 lag) versetzt.

Nach vier Stunden wurde die Lösung durch Zugabe von Dowex-Ionenaustauscher 50 WX 8 (Pyridiniumform) neutralisiert und zur Entfernung des Ionenaustauschers filtriert. Der Ionenaustauscher wurde gründlich mit Wasser ausgespült und die wässrige Phase wurde etwas reduziert, mit Diethylether gewaschen und eingengt. Der Rückstand wurde in Ethanol aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Da kaum Kristalle zu sehen waren, wurde die gesamte Lösung erneut eingengt und an der Ölpumpe getrocknet.

Das noch Pyridin enthaltende Rohprodukt wurde ohne säulenchromatographische Reinigung weiter umgesetzt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15                      R<sub>f</sub> : 0,42

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)

δ [ppm] = 1,93 (ddd, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 2,06 (ddd, 1H, H-2<sub>b</sub>' );  
 2,25-3,30 (H-5' unter einem Wasserberg); 3,63 (m, 1H, H-4' );  
 4,07 (m, 1H, H-3' ); 5,08 (dd, 1H, H-1' ); 7,33 (dt, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, Benzoyl);  
 7,43 (dt, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Benzoyl); 7,84 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Benzoyl); 8,20 (s, 1H, H-6);  
 8,62 (s, 1H, H-2)  
<sup>2</sup>J<sub>2a',2b'</sub> = 12,62 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2a',1'</sub> = 5,66 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2b',1'</sub> = 10,24 Hz

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

M = 355 g/mol; C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] = 356,3 (M+H)<sup>+</sup>

### 2.3.5 **Protektion des aminogeschützten modifizierten 2'-Desoxynukleosids in Hinblick auf die Triphosphatsynthese**

#### 2.3.5.1 **N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy- 7,9-dideaza-7-oxoadenosin 38**

Das Rohprodukt des N<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosins 43 wurde mit Pyridin, Dioxan und Acetonitril an der Ölpumpe lyophilisiert, in 5 ml Pyridin gelöst und mit 20 mg (0,16 mmol) frisch getrocknetem Dimethylaminopyridin versetzt. Zu dieser Lösung wurden portionsweise 200 mg (0,59 mmol) frisch an der Ölpumpe getrocknetes 4,4'-Dimethoxytritylchlorid gegeben bis nach 2 Tagen eine nahezu vollständige Umsetzung zu beobachten war.

Das Reaktionsgemisch wurde in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit Eiswasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 R<sub>f</sub> : 0,66

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an 56 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5 + 0,5 % Pyridin

Ausbeute: 55 mg (0,08 mmol); 39,9 % d. Th. über 3 Stufen bezogen auf 46 mg (0,21 mmol)  
 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 32

$^1\text{H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$ 

$\delta$  [ppm] = 2,27 (ddd, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 2,43 (ddd, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,19 (dd, 1H, H-5<sub>a</sub>' );  
 3,27 (dd, 1H, H-5<sub>b</sub>' ); 3,70 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4,06 (ddd, 1H, H-4' );  
 4,46 (m, 1H, H-3' ); 4,98 (t, 1H, 3'-OH); 5,43 (dd, 1H, H-1' );  
 6,74 (d, 4H, H<sub>arom.</sub>, neben OCH<sub>3</sub> in DMT); 7,14 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, DMT);  
 7,19 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, DMT); 7,25 (m, 4H, H<sub>arom.</sub>, DMT);  
 7,37 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, DMT); 7,47 (t, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, Benzoyl);  
 7,56 (t, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Benzoyl); 7,90 (s, 1H, H-6); 7,96 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Benzoyl);  
 8,67 (s, 1H, H-2); 8,90 (s, 1H, NH)  
 $^2J_{5a', 5b'} = 9,79$  Hz;  $^2J_{2a', 2b'} = 13,04$  Hz;  $^3J_{2a', 1'} = 9,44$  Hz;  $^3J_{2b', 1'} = 6,01$  Hz

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

M = 657,7 g/mol; C<sub>39</sub>H<sub>35</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] = 658,3 (M+H)<sup>+</sup>

**2.3.5.2 N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 39**

Zu einer Lösung von 50 mg (0,08 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin **38** in 3 ml Pyridin wurden 0,04 ml (0,22 mmol) Methoxyessigsäureanhydrid **35** hinzugefügt (R<sub>f</sub> : 0,71 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15). Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand wurde zur Abspaltung der Dimethoxytritylschutzgruppe in 0,8 ml 80 %iger Essigsäure aufgenommen, vier Stunden bei 35 °C gerührt und dann die Essigsäure destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in 20 ml Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit kalter Natriumcarbonat/Eis-Lösung und einmal mit Eiswasser gewaschen. Nach der Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat wurde diese eingengt.

DC-Kontrolle: Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 R<sub>f</sub> : 0,64

Das Rohprodukt säulenchromatographisch an 20 g Kieselgel 60 gereinigt.

Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97:3

Ausbeute: 22 mg (0,05 mmol); 67,7 % d.Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 2,24 (dd, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 2,76 (ddd, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 3,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>);  
 3,80-3,90 (m, 2H, H-5<sub>a</sub>' , H-5<sub>b</sub>' ); 4,03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,20 (s, 1H, H-4' );  
 5,34 (dd, 1H, H-1' ); 5,57 (d, 1H, H-3' ); 6,09 (d, 1H, 5'-OH);  
 7,48 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>, meta, Benzoyl); 7,58 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>, para, Benzoyl); 7,94 (s, 1H, H-6);  
 7,96 (d, 2H, H<sub>arom.</sub>, ortho, Benzoyl); 8,66 (s, 1H, NH); 8,70 (s, 1H, H-2)  
<sup>2</sup>J<sub>2a',2b'</sub> = 13,77 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2a',1'</sub> = 5,21 Hz; <sup>3</sup>J<sub>2b',1'</sub> = 11,47 Hz

Massenspektrum (Fast-Atom Bombardement)

M = 427,4 g/mol; C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

m/z [Da] = 428,1 (M+H)<sup>+</sup>

## 2.4 Triphosphatsynthese

### **2.4.1 Bis(tri-n-butylammonium)pyrophosphat 44**

2,23 g (5 mmol) Tetranatriumdiphosphatdecahydrat wurden in ca. 40 ml Wasser gelöst und über eine Ionenaustauschersäule, welche mit Dowex 50 WX 8 (H<sup>+</sup>-Form) gefüllt war, gegeben. Das Eluat wurde direkt in eine mit Eiswasser gekühlte gerührte Lösung aus 2,4 ml (10 mmol) Tri-n-butylamin in 20 ml Ethanol getropft. Die Ionenaustauschersäule wurde mit ca. 60 ml Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats auf pH = 5 anstieg. Anschließend wurde die Wasser/ Ethanol - Lösung an der Ölpumpe getrocknet, zweimal in Ethanol und einmal in DMF aufgenommen und erneut eingengt. Nach beendeter Trocknung wurde der Rückstand mit 8 ml DMF verdünnt, mit Molsieb versetzt und die Lösung wurde bei - 20 °C unter Argon gelagert.

## 2.4.2 Triphosphatsynthese mit 2'-Desoxyadenosin

### 2.4.2.1 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat 47

#### *Methode A*

Zur Vorbereitung wurde das geschützte 2'-Desoxynukleosid **36** dreimal in je 1 ml Pyridin gelöst, lyophilisiert und anschließend über Phosphorpentaoxid an der Ölpumpe getrocknet.

43 mg (0,1 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxyadenosin **36** wurden in 100 µl Pyridin und 300 µl Dioxan gelöst und mit 110 µl (110 µmol) einer frisch angesetzten Lösung aus 115 mg (0,57 mmol) 2-Chlor-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on in 0,55 ml Dioxan versetzt. Nach 10 Minuten wurde eine gut gerührte Lösung von 300 µl des 0,5 mol/l Bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphatreagenzes **44** in DMF und 100 µl Tri-*n*-butylamin schnell dazugegeben. Nach weiteren 10 Minuten wurden 2 ml einer Lösung von Jod in Pyridin/Wasser hinzugefügt. (1 g Jod wurde in 100 ml einer Mischung aus Pyridin/Wasser 98:2 gelöst) Der Überschuß an Jod wurde durch Zugabe einiger Tropfen einer 5 %igen wässrigen Lösung von Natriumhydrogensulfit zerstört und die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 ml konzentriertem Ammoniak. Die Lösung wurde eine Stunden bei Raumtemperatur gerührt, eingengt und an der Ölpumpe getrocknet.

Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung in einem Laufmittel aus Isopropanol/Wasser/Ammoniak (3:1:1) zeigte drei Produkte an.

Das Rohprodukt wurde an einer DEAE-Sephacel-Säule mit TEAB-Puffer in einem Gradienten von 0,025 mol/l - 0,6 mol/l gereinigt.

Da die Entfernung der Schutzgruppe durch das Rühren mit Ammoniak bei Raumtemperatur nicht vollständig gelang, wurde das gereinigte Triphosphat 5 Stunden bei 60 °C mit 20 ml Ammoniak gerührt, anschließend eingengt und an der Ölpumpe mit Dioxan lyophilisiert.

Das erhaltene Produkt wurde dünnschichtchromatographisch mit 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat **47** verglichen.

Ausbeute: 26 mg (0,03mmol); 30 % d. Th.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, D<sub>2</sub>O)

$\delta$  [ppm] = 2,71 (ddd, 1H, H-2<sub>a</sub>' ); 2,90 (m, 1H, H-2<sub>b</sub>' ); 4,35 (m, 2H, H-5<sub>a</sub>' und H-5<sub>b</sub>' );  
4,42 (m, 1H, H-4' ); 4,96 (m, 1H, H-3' unter Wasserberg); 6,61 (t, 1H, H-1' );  
8,49 (s, 1H, H-2); 8,69 (s, 1H, H-8)

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100,62 MHz, D<sub>2</sub>O)

$\delta$  [ppm] = 39,790 (C-2' ); 65,725 (C-5' ); 71,228 (C-3' ); 84,838 (C-1' ); 86,403 (C-4' );  
142,564 (C-8); 146,033 (C-2)

<sup>31</sup>P-NMR-Spektrum (200Mhz, D<sub>2</sub>O)

$\delta$  [ppm] = - 9,6 und - 9,9 (2P, P<sub>α</sub> und P<sub>γ</sub>); - 21,7 (1P, P<sub>β</sub>)

*Methode B*

55 mg (0,2 mmol) 2'-Desoxyadenosin **26** wurden in 1 ml Pyridin gelöst und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Dann wurde das Nucleosid eine Stunde im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Das so vorbereitete Nucleosid wurde in 0,8 ml (0,86 g; 4,7 mmol) Triethylphosphat gelöst und bei -20 °C mit 0,03 ml (0,05 g; 0,33 mmol) Phosphorylchlorid versetzt. Nach zwei Stunden wurde eine Mischung aus 2 ml einer 0,5 molaren Bis(tri-n-butylammonium)-pyrophosphat-Lösung **44** in DMF und 0,8 ml Tributylamin unter starkem Rühren hinzugefügt. Eine Minute später wurden ca. 4 ml einer 1mol/l TEAB-Lösung (pH=8) hinzugefügt. Abschließend wurde das Lösungsmittel evaporiert.

Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich mit 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat **47** in einem Laufmittel aus Isopropanol/Wasser/Ammoniak (3:1:1) zeigte, daß sehr viele Nebenprodukte entstanden waren.

Trotzdem erfolgte die Reinigung an DEAE-Sephacel in einem TEAB-Puffer mit einem Gradienten von 0,025 mol/l - 0,6 mol/l. Auf diese Weise konnte aber kein 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat isoliert werden.

### 2.4.3 Triphosphatsynthese mit 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin

#### 2.4.3.1 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin -5'-O-triphosphat 50

22 mg (0,05 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-methoxyacetyl-2'-desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin 39 wurden dreimal mit Pyridin lyophilisiert und anschließend über Phosphorpentaoxid bei Raumtemperatur an der Ölpumpe getrocknet.

Das sorgfältig getrocknete, geschützte 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin wurde in 60 µl Pyridin und 170 µl Dioxan gelöst und unter Rühren im Argongegenstrom durch ein Septum mit 60 µl (60 µmol) einer Lösung aus 65 mg (0,321 mmol) 2-Chlor-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on in 0,31 ml Dioxan versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend erfolgte die schnelle Zugabe einer gut gerührten Lösung aus 170 µl des 0,5 mol/l Bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphatreagenzes 44 in DMF und 60 µl Tri-*n*-butylamin.

Nach 10 Minuten wurde 1 ml einer 1 %igen Jodlösung in Pyridin/Wasser (98:2) hinzugefügt. Das Gemisch wurde weitere 15 Minuten gerührt. Der Jodüberschuß wurde dann durch tropfenweise Zugabe einer 5 %igen Natriumsulfitlösung zerstört und das Reaktionsgemisch zur Trockne eingengt. Anschließend wurde der Rückstand in 5 ml Wasser aufgenommen, 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, wieder etwas eingengt, mit 10 ml konz. Ammoniak versetzt und 5 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach der Entfernung des Ammoniaks wurde das Rohprodukt an der Ölpumpe getrocknet.

Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung in einem Laufmittelgemisch aus Isopropanol/Wasser/Ammoniak (3:1:1) zeigte drei Hauptprodukte an.

Das Rohprodukt wurde an DEAE-Sephacel in einem TEAB-Puffer mit einem Gradienten von 0,025 mol/l - 0,6 mol/l gereinigt. Die Fraktionen wurden unverdünnt mittels UV-Messung analysiert und die so erhaltene Triphosphatlösung 50 wurde eingengt, an der Ölpumpe getrocknet und dünnschichtchromatographisch mit 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat in einem Laufmittelgemisch aus Isopropanol/Wasser/Ammoniak (3:1:1) verglichen.

Ausbeute: 20 mg (0,023 mmol); 44,7 % d.Th.

#### <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ [ppm] = 2,27 (m, 2H, H-2<sub>a</sub>' und H-2<sub>b</sub>'); 3,95 (s, 2H, H-5<sub>a</sub>' und H-5<sub>b</sub>'); 4,10 (s, 1H, H-4');  
4,49 (s, 1H, H-3'); 5,32 (t, 1H, H-1'); 8,02 (s, 1H, H-6); 8,15 (s, 1H, H-2)

$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (100,6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

$\delta$  [ppm] = 40,261 (C-2'); 66,309 (C-5'); 72,010 (C-1'); 72,983 (C-3'); 85,781 (C-4');  
148,282 (C-6); 153,133 (C-2)

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

$\delta$  [ppm] = - 8,5 und - 9,9 (2P,  $\text{P}_\alpha$  und  $\text{P}_\gamma$ ); - 21,7 (1P,  $\text{P}_\beta$ )

## 3 Biochemie

### 3.1 Enzyme und Puffer

#### 3.1.1 DNA-Polymerasen

*Pwo* DNA-Polymerase, Roche, 5 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1 mM EDTA, 0,5 % Nonidet P40, 0,5 % Tween 20, 50 % Glycerin

10 x *Pwo*-Reaktionspuffer: 100 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 250 mM KCl, 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM  $\text{MgSO}_4$

*Vent* (exo-)DNA-Polymerase, New England Biolabs, 2 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 1 mM DTT, 0,1 % Triton X-100, 50 % Glycerin

10 x *Vent* (exo-)Reaktionspuffer: 100 mM KCl, 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 200 mM Tris-HCl (pH = 8,8); 20 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 % Triton X-100,

*Deep Vent* (exo-)DNA-Polymerase, New England Biolabs, 2 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 1 mM DTT, 0,1 % Triton X-100, 50 % Glycerin

10 x *Vent* (exo-)Reaktionspuffer: 100 mM KCl, 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 200 mM Tris-HCl (pH = 8,8); 20 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 % Triton X-100,

*Taq* DNA-Polymerase, Roche, 5 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH = 8), 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % Glycerin, 1,0 % Triton X-100

10 x *Taq*-Reaktionspuffer: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH = 9,0), 1,0 % Triton X-100, 15 mM  $\text{MgCl}_2$

## VII. Experimenteller Teil - Biochemie und Massenspektrometrie

---

*Tfl* DNA-Polymerase, Promega, 5 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 % Nonidet-P40, 0,5 % Tween 20, 50 % Glycerin

10 x *Tfl*-Reaktionspuffer: 200 mM Tris-Acetat (pH = 9,0), 100 mM Ammoniumsulfat, 750 mM Kaliumacetat, 0,5 % Tween 20

*Tth*-DNA-Polymerase, Promega, 5 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 300 mM KCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 mg/ml BSA, 50 % Glycerin

10 x *Tth*-Reaktionspuffer: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH = 9,0), 1 % Triton X-100

*Pfu*(exo-) DNA-Polymerase, Stratagene, 2,5 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH = 8,2), 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 0,1 % NP-40, 0,1 % Tween 20, 50 % Glycerin

10 x *Pfu*(exo-)Reaktionspuffer: 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mM Tris-HCl (pH = 8,75), 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 % Triton X-100, 1mg/ml BSA

*ThermoSequenase* DNA-Polymerase, amersham pharmacia biotech, 32 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH = 8,5), 50 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Tween 20, 0,5 % Nonidet P-40, 1 mM DTT, 100 mM KCl

10 x *ThermoSequenase*-Reaktionspuffer: 260 mM Tris-HCl (pH = 9,5), 65 mM MgCl<sub>2</sub>

*ThermoSequenase*-Verdünnungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 1 mM 2-Mercaptoethanol, 0,5 % Tween 20, 0,5 % Nonidet P40

*DyNAzyme II* DNA-Polymerase, Finnzymes, 2 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 100 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 200  $\mu$ g/ml BSA, 50 % Glycerin

10 x *DyNAzyme II*-Reaktionspuffer: 100 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 15 mM MgCl, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100

*UTma* DNA-Polymerase, Perkin Elmer, 6 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 % Tween 20, 50 % Glycerin

10 x *UTma*-Reaktionspuffer: 100 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 100 mM KCl 0,02 % Tween 20

### 3.1.2 Restriktionsendonukleasen

*Alu* I Restriktionsendonuklease, Roche, 10 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 10 mM Tris-HCl, (pH = 7,5), 50 mM KCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, 50 % Glycerin

*Alu* I 10 x Inkubationspuffer: 33 mM Tris-Acetat (pH = 7,9), 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,5 mM DTT

*Bam*H I Restriktionsendonuklease, MBI Fermentas, 10 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 100 mM KCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, 50 % Glycerin

*Bam*H I 10 x Inkubationspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,02 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA

*Eco*R I Restriktionsendonuklease, Roche, 10 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH = 7), 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5 mM Dithioerythrit, 0,2 % Triton X-100, 50 % Glycerin

*Eco*R I 10 x Inkubationspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithioerythrit

*Hind* III Restriktionsendonuklease, Roche, 10 U/ $\mu$ l

Lagerungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 250 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithioerythrit, 50 % Glycerin

*Hind* III 10 x Inkubationspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-Mercaptoethanol

*Sma* I Restriktionsendonuklease, Roche, 10 U/μl

Lagerungspuffer: 10 mM Kaliumphosphat (pH = 7,0), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Dithiothreitol, 0,02 % Polydodecanol, 50 % Glycerin

*Sma* I 10 x Inkubationspuffer: 33 mM Tris-acetat (pH = 7,9), 66 mM Kaliumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 0,5 mM Dithiothreitol

*Xba* I Restriktionsendonuklease, MBI Fermentas, 10 U/μl

Lagerungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM KCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, 50 % Glycerin

*Xba* I 10 x Inkubationspuffer: 33 mM Tris-Acetat (pH = 7,9), 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,1 mg/ml BSA

## **3.2 Allgemeine Methoden**

### **3.2.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Alle PCR-Ansätze wurden mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft.

#### **3.2.1.1 native Polyacrylamidgele**

Puffer und Materialien:

AA: 38 %ige wässrige Acrylamid-Stammlösung mit 2 % N',N'-Methylenbisacrylamid als Quervernetzer oder 30 %ige wässrige Acrylamid-Stammlösung mit 1,2 % N,N'-Methylenbisacrylamid zur Quervernetzung

APS: 10 %ige wässrige Ammoniumperoxosulfat-Lösung als Polymerisationsinitiator

TEMED: N,N,N',N'-Tetraethylendiamin als Polymerisationsbeschleuniger

10 x TBE-Puffer: 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Formamid-Ladepuffer: 98 % Formamid, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol ff (XC) in 10 mM EDTA (Lagerung bei -20 °C)

Marker: Für die Polyacrylamidgele zur Überprüfung der PCR-Ansätze wurde in den meisten Fällen pBR322 DNA, welche mit *Alu* I geschnitten wurde, verwendet. Der Marker enthielt 17

doppelsträngige DNA-Fragmente von 908, 659, 656, 521, 403, 281, 257, 226, 100, 90, 63, 57, 49, 46, 19, 15 und 11 Basenpaaren.

Bei den Polyacrylamidgelen zur Überprüfung der Restriktionsspaltungen wurde ein 50-Basenpaar-Marker eingesetzt. Dieser enthielt 16 DNA-Fragmente mit einer Länge von 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (3 x intensiver), 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 bis 800 Basenpaaren und zusätzlich ein 2652 Basenpaare langes Fragment.

Zur Überprüfung längerer DNA-Fragmente wurde mit einem 100-bp-Marker gearbeitet. Dieser enthielt 15 DNA-Fragmente mit einer Länge von 100, 200, 300, 400, 500, 600 (3 x intensiver), 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 und 1500 Basenpaaren und zusätzlich ein Fragment mit 2072 Basenpaaren.

Gellösung für ein natives ca. 10 %iges Polyacrylamidgel:

- 3 ml Reinstwasser
- 0,5 ml 10 x Elektrophoresepuffer TBE
- 1,5 ml Acrylamid (38 %ig oder 30 %ig)
- 50 µl 10 %ige APS-Lösung
- 5 µl TEMED

Die Polyacrylamidgele wurden eine Stunde in einer vertikalen Mini-PAGE-Kammer der Firma Keutz bei Raumtemperatur polymerisiert, anschließend in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Beide Kammern wurden mit 1 x TBE-Puffer beschickt. Vor Auftragung der Proben wurde ein 10-minütiger Vorlauf bei 80 V durchgeführt.

10 % eines PCR-Ansatzes (5µl) wurden mit 1 µl des 5 x Ladepuffers vermischt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als interner Längenstandard diente der Marker pBR 322 DNA (siehe oben).

Die Gelelektrophorese erfolgte ca. 1 Stunde bei 80 V. Zur Detektion der DNA-Banden wurde das Gel nach beendeter Elektrophorese für ca. 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (3 Tropfen einer 10 %igen Ethidiumbromid-Lösung auf 1 Liter TBE-Puffer) angefärbt und dann unter UV-Licht photographiert.

### 3.2.1.2 denaturierende Polyacrylamidgele

#### Puffer und Materialien:

AA: 40 %ige wässrige Stammlösung mit 29 % Acrylamid und 1 % N', N'-Methylenbisacrylamid als Quervernetzer

APS: 10 %ige wässrige Ammoniumperoxosulfat-Lösung als Polymerisationsinitiator

TEMED: N,N,N',N'-Tetraethylendiamin als Polymerisationsbeschleuniger

10 x TBE-Puffer: 890 mM Tris, 890 mM Borsäure und 20 mM EDTA

Urea: 40 %ige (6,6 M) wässrige Harnstofflösung

Formamid-Ladepuffer: 99 % Formamid, 0,1 % Bromphenolblau, in 5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
(Lagerung bei -20 °C)

Marker: Es wurde der oben beschriebene 50-Basenpaar-Marker verwendet (0,5 µl)

Es wurden 12 %ige oder 17,5 %ige denaturierende Polyacrylamidgele gegossen.

Gellösung für ein 12 % iges denaturierendes Gel:

2,35 ml Reinstwasser

1,5 ml 5 x TBE-Puffer

1,33 ml Urea (6,6 M)

2,25 ml Acrylamid

3,75 µl TEMED

50 µl 10 %iges APS

Mischung für ein 17,5 %igen denaturierenden Polyacrylamidgele:

1,4 ml Reinstwasser

1,5 ml 5 x TBE-Puffer

1,3 ml Urea

3,3 ml Acrylamid

3,75 ml TEMED

50 µl 10 %iges APS

Die denaturierenden Gele wurden - wie oben für die nativen Gele beschrieben - gegossen. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Taschen des Geles, an dem zum Vorlaufen ca. 10

Minuten eine Spannung von 130 V angelegt worden war, mit TBE-Puffer gespült, um den Harnstoff herauszuwaschen.

Zur Denaturierung wurden die zu untersuchenden Proben mit 5 µl Formamid-Puffer 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, auf Eis gestellt und dann schnell aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 130 V in 0,5 x TBE-Puffer durchgeführt. Die Detektion der einzelsträngigen DNA-Banden erfolgte durch Silberfärbung.

### 3.2.1.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Drei verschiedene Färbeverfahren wurden ausgetestet:

#### *Methode A*

Das Gel wurde in einer Fixierlösung entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Gel dreimal für 10 Minuten mit Ethanol und dann dreimal 20 Sekunden mit Wasser gewaschen. Zur Färbung wurde das Gel 20 Minuten in einer 0,1 %igen Silbernitratlösung inkubiert und danach dreimal für 2 Sekunden mit Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte dann in 200 ml Entwicklerlösung, bis die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten. Zum Stoppen des Entwicklungsvorganges wurde das Gel 5 Minuten in 0,75 %iger Natriumcarbonatlösung inkubiert, anschließend gewässert, dokumentiert und in Folie eingeschweißt.

Fixierlösung: 50 % Methanol, 12 % Eisessig und 0,52 ml Formaldehyd pro Liter Reinstwasser

Entwicklerlösung: 3 g Natriumhydroxid in 200 ml Reinstwasser lösen, 20 mg Natriumborhydrid und 0,8 ml Formaldehyd hinzufügen

#### *Methode B*

Das Gel wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht in einer Lösung aus 15 % Ethanol und 0,5 % Essigsäure in Wasser fixiert. Die weitere Behandlung erfolgte analog zu Methode A.

### *Methode C*

Das Gel wurde 30 Minuten mit Fixierlösung A behandelt, kurz mit Wasser gewaschen, nocheinmal 20 Minuten mit Fixierlösung B behandelt und erneut mit Wasser gewaschen. Dann wurde das Gel 20 Minuten in einer 2,5 mM APS-Lösung inkubiert, mit Wasser gewaschen und eine Stunde zum Färben in eine 0,1 %ige Silbernitratlösung gelegt. Nach dem Waschen wurde die Entwicklung in 100 ml Entwicklerlösung durchgeführt. Die Entwicklung wurde durch Inkubation des Geles in einer 1 %igen Essigsäure gestoppt. Anschließend wurde das Gel kurz gewässert, dokumentiert und eingeschweißt.

Fixierlösung A: 12 % Trichloressigsäure und 50 % Methanol in Reinstwasser

Fixierlösung B: 10 % Methanol und 5 % Eisessig in Reinstwasser

Entwicklerlösung: 2 g Natriumcarbonat und 50 µl Formaldehyd auf 100 ml Wasser

### **3.2.2 Agarosegele**

PCR-Produkte mit über 300 Basenpaaren wurden mit 1,5 %igen Agarosegelen analysiert. Für ein solches Gel wurden 1,5 g Agarose in der Mikrowelle in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer gelöst und mit 1 µl einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) versetzt. Zum Auftragen der Proben wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl Farbstofflösung vermischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Marker wurden 5 µl eines 100-Basenpaar-Markers verwendet, welcher 15 DNA-Fragmente mit einer Länge von 100, 200, 300, 400, 500, 600 (3 x intensiver), 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 und 1500 Basenpaaren und zusätzlich ein Fragment mit 2072 Basenpaaren enthielt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 130 V in 0,5 x TBE-Puffer.

Farbstofflösung: 2,5 g Saccharose, 2,5 ml 10 x TBE-Puffer, 100 µl 0,5 M EDTA-Lösung und eine Spatelspitze Bromphenolblau wurden mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt.

### **3.2.3    Aufreinigung von PCR-Ansätze mit dem QIAquick           PCR-Purification Kit**

Zwei PCR-Ansätze (je 50 µl) wurden vereinigt, mit 500 µl PB-Puffer versetzt und kurz vermischt. Die Lösung wurde auf die QIAquick-Säule, die in einem 2 ml Reaktionsgefäß steckte, gegeben und das Ganze wurde 45 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule wurde wieder in das 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zum Waschen der Säule wurden 0,75 ml PE-Puffer aufgetragen und das Ganze wurde für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluß wurde erneut verworfen und die Säule wurde wieder in das gleiche Reaktionsgefäß gegeben und erneut für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. Es wurden 50 µl Wasser auf die Membran der Säule pipettiert. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde dann eine Minute zentrifugiert und das Eluat enthielt das gereinigte PCR-Produkt.

### **3.2.4    Restriktionsspaltung**

Für die Restriktionsspaltung wurden, wenn nicht anders angegeben, nachfolgende Reagenzien in ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

- 25 µl PCR-Produkt nach der QIAquick-Aufreinigung
- 3 µl 10 x Inkubationspuffer (entsprechend dem verwendeten Enzym)
- 2 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl)

Die Lösung wurde nach kurzem Durchmischen 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.



Collector) gestellt wurde. Dadurch wurden die magnetischen Partikel zurückgehalten. Anschließend wurden die Beads zweimal mit je 10 µl 1 x B/W-Puffer gewaschen, wobei die Reaktionsgefäße zum Abnehmen des Überstandes wieder in den MPC gestellt und kurz inkubiert wurden. Nach dem Waschen wurden die Streptavidin Dynabeads in je 10 µl 5 x B/W-Puffer resuspendiert.

### **Immobilisierung der biotinylierten DNA an die Streptavidin Dynabeads**

Die vorbereiteten Beads wurden zu den PCR-Ansätzen (50 µl) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand durch magnetische Separierung entfernt.

### **Denaturierung des Doppelstranges für die PROBE-Reaktion**

Die beladenen Beads wurden in je 50 µl 100 mM NaOH suspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde wieder durch magnetische Separierung entfernt und die Beads wurden zweimal mit je 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0) gewaschen.

### **Reaktionsmix für eine PROBE-Reaktion**

9,5 µl Wasser

1,5 µl 10 x *ThermoSequenase*-Reaktionspuffer

1,5 µl ddNTP/ dNTP-Mix (je 50 µM Endkonzentration)

2,0 µl PROBE-Primer (10 pmol/µl)

0,5 µl *ThermoSequenase* (0,422 µl Verdünnungspuffer + 0,078 µl  
Enzym = 2,5 U)

---

15 µl Reaktionsansatz

Der Reaktionsmix wurde zu den Beads gegeben und das Temperaturprogramm für die PROBE durchgeführt:

anschließend 10 Zyklen	80 °C 1 min.
	40 °C 10 sec.
	72 °C 5 sec.
abschließend	72 °C 3 min.

### **Denaturierung des Doppelstranges nach der PROBE-Reaktion**

Nach Durchführung der PROBE-Reaktion wurde der Überstand durch magnetische Separierung entfernt und die Beads wurden zweimal mit je 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0) gewaschen. Anschließend wurden die Dynabeads in je 5 µl 50 mM Ammoniak suspendiert und 4 Minuten bei 60 °C inkubiert. Der Überstand wurde durch magnetische Separierung abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde 20 Minuten mit offenem Deckel bei Raumtemperatur geschüttelt, um den Ammoniak abzdampfen.

### **Probenvorbereitung für die MALDI-Vermessung**

Pro PROBE-Reaktion wurden 500 nl 3-HPA-Matrix auf einen Probenteller aufgetragen. Nachdem die Matrix auskristallisiert war, wurden 500 nl der zu untersuchenden Lösung aufgegeben. Dann wurde erneut gewartet, bis alles auskristallisiert war.

### **3.3 Biochemische Experimente**

#### **3.3.1 PROBE-Reaktion**

##### **3.3.1.1 PROBE-Reaktion mit einer unaufgereinigten Rohlösung der Triphosphate**

Es wurde das nachfolgend beschriebene Primer/Template-System verwendet: Ein genomisches DNA-Fragment diente als Template. Mit Hilfe der PCR unter Verwendung der Primer 2590 bioF und 2590 R wurde ein 323 bp PCR-Produkt mit einer T/C-Mutation an Position 194 amplifiziert.

Template für die PCR:

...3'-GAGTACTTACGTTGGCTCC/TTA-5'...

Primer für die PCR:

2590 bioF: 5'-bioCAT GAA CCT TCT TAG CGC CCT

2590 R: 5'-GAG ATG TTT TGG TGT TTA GGG

Primer für die PROBE-Reaktion:

2590 P: 5'-CAT GAA TGC AAC CGA G (16mer), 4914 Da

Bei dieser PROBE-Reaktion wurde selbstsynthetisiertes, unaufgereinigtes dATP und dA\*TP eingesetzt. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, um das in der Triphosphat-Lösung enthaltene Sulfid zu binden.

1. Die unaufgereinigten Desoxynukleosidtriphosphat-Lösungen wurden mit BSA vorinkubiert

9 µl Desoxynukleosidtriphosphat-Lösung

1 µl BSA-Lösung (1 mg/ml)

1 Minute bei 50 °C inkubieren und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahren

2. Die PROBE-Reaktion wurde in Anwesenheit von BSA durchgeführt.

Folgende Desoxynukleosidtriphosphat-Mixe wurden eingesetzt:

Positivkontrolle: je 500  $\mu\text{M}$  dATP, dGTP, dCTP

500  $\mu\text{M}$  ddTTP

dATP: je 500  $\mu\text{M}$  dGTP, dCTP

500  $\mu\text{M}$  ddTTP

10  $\mu\text{l}$  dATP-Rohlösung in 100  $\mu\text{l}$  Desoxynukleosidtriphosphat-Mix  
(ein Mix mit vorinkubiertem dATP, ein Mix mit dATP ohne Vorinkubation)

dA\*TP: je 500  $\mu\text{M}$  dGTP, dCTP

500  $\mu\text{M}$  ddTTP

10  $\mu\text{l}$  dA\*TP-Rohlösung in 100  $\mu\text{l}$  Desoxynukleosidtriphosphat-Mix  
(ein Mix mit vorinkubiertem dA\*TP, ein Mix mit dA\*TP ohne Vorinkubation)

Bei der PROBE-Reaktion in Anwesenheit von BSA wurden nur 8  $\mu\text{l}$  Wasser und 1,5  $\mu\text{l}$  einer BSA-Lösung (1 mg/ml) eingesetzt.

mögliche Produkte:

Primer + dA	5227 Da (gleiche Masse für dA*TP, 5226 Da bei $c^7$ dATP)
Primer + dG	5243 Da (gleiche Masse für dA*TP, 5242 Da bei $c^7$ dATP)
Primer + dAdA	5540 Da (gleiche Masse für dA*TP, 5538 Da bei $c^7$ dATP)
Primer + dGdA	5556 Da (gleiche Masse für dA*TP, 5555 Da bei $c^7$ dATP)
Primer + dAdAddT	5828 Da (gleiche Masse für dA*TP, 5826 Da bei $c^7$ dATP)
Primer + dGdAddT	5844 Da (gleiche Masse für dA*TP, 5843 Da bei $c^7$ dATP)

### 3.3.1.2 PROBE-Reaktion mit gereinigten Triphosphaten

Bei dieser PROBE-Reaktion wurden nachfolgende Desoxynukleosidtriphosphat-Mixe verwendet:

1. Positivkontrolle: je 500  $\mu\text{M}$  dATP, dGTP, dCTP  
500  $\mu\text{M}$  ddTTP

2. Vergleich mit  $c^7\text{dATP}$ : je 500  $\mu\text{M}$  dGTP, dCTP,  $c^7\text{dATP}$   
500  $\mu\text{M}$  ddTTP

3.  $\text{dA}^*\text{TP}$ : je 500  $\mu\text{M}$  dGTP, dCTP  
500  $\mu\text{M}$  ddTTP  
10  $\mu\text{l}$   $\text{dA}^*\text{TP}$ -Lösung (ca. 10 mM) in 100  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix

mögliche Produkte:

Primer + dA	5227 Da (gleiche Masse für $\text{dA}^*\text{TP}$ , 5226 Da bei $c^7\text{dATP}$ )
Primer + dG	5243 Da (gleiche Masse für $\text{dA}^*\text{TP}$ , 5242 Da bei $c^7\text{dATP}$ )
Primer + dAdA	5540 Da (gleiche Masse für $\text{dA}^*\text{TP}$ , 5538 Da bei $c^7\text{dATP}$ )
Primer + dGdA	5556 Da (gleiche Masse für $\text{dA}^*\text{TP}$ , 5555 Da bei $c^7\text{dATP}$ )
Primer + dAdAddT	5828 Da (gleiche Masse für $\text{dA}^*\text{TP}$ , 5826 Da bei $c^7\text{dATP}$ )
Primer + dGdAddT	5844 Da (gleiche Masse für $\text{dA}^*\text{TP}$ , 5843 Da bei $c^7\text{dATP}$ )

### 3.3.1.3 PROBE-Reaktion mit gereinigter Triphosphatlösung an vier verschiedenen Primer/Template-Systemen

Die nachfolgend aufgeführten Primer/Template-Systeme wurden verwendet:

1. Ein DNA-Fragment des Methylentetrahydrofolatreduktasegens, bei welchem an Position 222 und 668 eine Mutation vorlag, diente als Template für die PCR. Als Primer für die PCR wurden bio-US-2-THF-F1 und US-1-THF-R3 verwendet. Primer für die PROBE-Reaktion war MTHR und es wurde eine ddCTP-Stop-Lösung eingesetzt.

Primer für die PCR:

US2-THF-F1:

5'-CGA ATT CGA GCT CGG TAC CCA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GAG

US1-THF-R3:

5'-GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG AGG AGA TCT GGG AAG AAC TC

Primer für die PROBE:

MTHR: 5'-GCT GCGTGA TGA TGA AAT CG (20mer); 6181 Da

2. Ein DNA-Fragment der Lipoprotein Lipase, welches an Position 291 eine Mutation enthält, diente als Template für die PCR. Als Primer für die PCR wurden US-1-LPL-F2 und bio-US-2-LPL-R2 verwendet. Primer für die PROBE-Reaktion war LPL und es wurde eine ddTTP-Stop-Lösung eingesetzt.

Primer für die PCR:

US1-LPL-F2:

5'-GCC AGG GTT TTC CCA ATC ACG CGC TCC ATT CAT CTC TTC

US2-LPL-R2:

5'-bioCGA ATT CGA GCT CGG TAC CCG GGC ATC TGA GAA CGA GTC

Primer für die PROBE:

LPL: 5'-AAC AAT CTG GGC TAT GAG ATC A (22mer); 6767,4 Da

3. Ein DNA-Fragment des Protrombingens dient als Template für die PCR. Aus diesem wurde ein 345 bp langes PCR-Produkt amplifiziert. Als Primer für die PCR wurden US-1-Pro-F und bio-US-2-Pro-R verwendet. Primer für die PROBE-Reaktion war Prothrom/2 und es wurde eine ddCTP-Stop-Lösung eingesetzt.

Primer für die PCR:

US1-Pro-F:

5'-GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACT CTA GAA ACA GTT GCC TGG C

US2-Pro-R:

5'-BioCGA ATT CGA GCT CGG TAC CCA TAG CAC TGG GAG CAT TGA AGC

Primer für die PROBE:

Prothrom/2: 5'-TTC CCA ATA AAA GTG ACT CTC AGC (24mer); 7280,8 Da

4. Ein DNA-Fragment des Faktor V Gens, bei welchem eine Mutation an Position 506 vorlag, diente als Template für die PCR. Als Primer für die PCR wurden US-1-APC-F und bio-US-2-APC-R verwendet. Primer für die PROBE-Reaktion war APC-506 und es wurde eine ddTTP-Stop-Lösung eingesetzt.

Primer für die PCR:

US1-APC-F:

5'-GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACC AGA GCA GTT CAA CCA GG

US2-APC-R:

5'-bioCGA ATT CGA GCT CGG TAC CCC TGA AAG GTT ACT TCA AGG AC

Primer für die PROBE:

APC-506: 5'-TAA GAG CAG ATC CCT GGA CAG GC (23mer); 7082,6 Da

Bei diesen PROBE-Reaktionen wurden nachfolgende dNTP-Mixe verwendet:

- Bei Verwendung einer ddTTP-Stop-Lösung
  1. Positivkontrolle: je 500  $\mu$ M dATP, dGTP, dCTP  
500  $\mu$ M ddTTP
  2. Vergleich mit  $c^7$ dATP: je 500  $\mu$ M dGTP, dCTP,  $c^7$ dATP  
500  $\mu$ M ddTTP
  3. dA\*TP: je 500  $\mu$ M dGTP, dCTP  
500  $\mu$ M ddTTP  
10  $\mu$ l dA\*TP-Lösung (ca. 10 mM) in 100  $\mu$ l dNTP-Mix
- Bei Verwendung einer ddCTP-Stop-Lösung
  1. Positivkontrolle: je 500  $\mu$ M dATP, dGTP, dTTP  
500  $\mu$ M ddCTP
  2. Vergleich mit  $c^7$ dATP: je 500  $\mu$ M dGTP, dTTP,  $c^7$ dATP  
500  $\mu$ M ddCTP
  3. dA\*TP: je 500  $\mu$ M dGTP, dTTP  
500  $\mu$ M ddCTP  
10  $\mu$ l dA\*TP-Lösung (ca. 10 mM) in 100  $\mu$ l dNTP-Mix

mögliche Produkte:

1. Methylentetrahydrofolatreduktase / ddC-Stop

Primer	6181 Da
Primer + dG	6510 Da (6510 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 6509 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dA	6494 Da (6494 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 6493 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dGddC	6799 Da (6799 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 6798 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dAddC	6783 Da (6783 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 6782 Da mit c <sup>7</sup> dATP)

2. Lipoprotein Lipase / ddT-Stop

Primer	6767 Da
Primer + dG	7096 Da (7096 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 7095 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dA	7080 Da (7080 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 7079 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dGddT	7400 Da (7400 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 7399 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dAddT	7384 Da (7384 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 7383 Da mit c <sup>7</sup> dATP)

3. Prothrombin / ddC-Stop

Primer	7280,8 Da
Primer + dG	7609 Da (7609 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 7608 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dA	7593 Da (7593 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 7592 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dGdAdGddC	8540 Da (8540 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 8539 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dAdAdGddC	8524 Da (8524 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 8524 Da mit c <sup>7</sup> dATP)

4. Faktor V Gen / ddT-Stop

Primer	7082,6 Da
Primer + dA	7395 Da (7395 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 7394 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dG	7411 Da (7411 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 7410 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dGdAdGdGdAdAddT	9312 Da (9312 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 9309 Da mit c <sup>7</sup> dATP)
Primer + dAdAdGdGdAdAddT	9296 Da (9296 Da mit dA <sup>*</sup> TP, 9292 Da mit c <sup>7</sup> dATP)

### 3.3.2 PCR

#### 3.3.2.1 PCR zur Überprüfung der Triphosphatsynthese

Um festzustellen, ob die Triphosphatsynthese erfolgreich verlief, wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurde folgendes Primer-Template-System verwendet:

Template für die PCR:

CFTR T87: 5'-TCTTCTAGTTCGCATGCTTTGATGACGCTTCTGTATCTATCATCA-  
-TAGGAAACACCAAAGATGATATTTTCTTTAATGGTGCCA-3'

Primer für die PCR:

bioF48: 5'-bioCTGGCACCATTAAAGAAAA-3' (19mer), 6218,8 Da

R48: 5'-ATTCATCATAGGAAACACC-3' (19mer), 5764,8 Da

In ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien pipettiert:

- x µl Wasser
- 5 µl 10 x (exo-)*Pfu*-Reaktionspuffer
- 1 µl dGTP (10 mmol/µl)
- 1 µl dCTP (10 mmol/µl)
- 1 µl dTTP (10 mmol/µl)
- 1 µl selbsthergestelltes dATP / 1 µl gekauftes dATP für die  
Positivkontrolle / 2µl selbstsynthetisiertes dA<sup>\*</sup>TP (10 mmol/µl)
- 1 µl Primer bio-F 48 (20 pmol/µl)
- 2 µl Primer R 48 (20 pmol/µl)
- 1 µl Template CFTR T87 (52 fmol/µl)
- 1 µl (exo-)*Pfu* (2,5 U/µl)

---

50 µl Reaktionsansatz

Für die Blindprobe wurde kein Template sondern 1 µl Wasser zusätzlich verwendet.

Temperaturprogramm des Thermocyclers:	95 °C 3 min.
anschließend 30 Zyklen	95 °C 1 min.
	50 °C 1 min.
	72 °C 1 min.

Das Polyacrylamidgel zur standardmäßigen Überprüfung der PCR wurde mit 38 %igem Acrylamid angesetzt.

### **3.3.2.2 Darstellung eines modifizierten 48mers mit CFTR T87 unter Austestung verschiedener DNA-Polymerasen**

Das oben zur Reaktionsüberprüfung beschriebene PCR-System wurde unter Verwendung verschiedener DNA-Polymerasen benutzt.

In ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden pro PCR-Ansatz folgende Reagenzien pipettiert:

- x µl Reinstwasser
- 5 µl PCR-Reaktionspuffer (es wurde jeweils der zum Enzym  
mitgelieferte Puffer verwendet)
- 2 µl dA\*TP oder 2 µl c<sup>7</sup>dATP oder 1µl dATP (jeweils 10 mmol/µl)
- 1 µl dCTP (10 mmol/µl)
- 1 µl dGTP (10 mmol/µl)
- 1 µl dTTP (10 mmol/µl)
- 1 µl Primer bio-F48 (20 pmol/µl)
- 2 µl Primer R-48 (20 pmol/µl)
- 1 µl Template CFTR T87 (52fmol/µl)
- y µl DNA-Polymerase

---

50 µl Reaktionsansatz

Die folgenden DNA-Polymerasen wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das modifizierte 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat einzubauen:

- *Taq* (0,5µl = 2,5 U und 1µl = 5 U) im 10 x *Taq*-Reaktionspuffer
- *Taq* (0,5µl = 2,5 U und 1µl = 5 U) im 10 x *AmpliTaq*-Reaktionspuffer
- (exo-)*Pfu* (1µl = 2,5 U und 2 µl = 5U) im 10 x (exo-)*Pfu*-Reaktionspuffer
- (exo-)*Vent* (1 µl = 2U und 2 µl = 4U) im 10 x *ThermoPol*-Reaktionspuffer
- (exo-)*Deep Vent* (1 µl = 2U) im 10 x *ThermoPol*-Reaktionspuffer
- *ThermoSequenase* (0,078 µl Enzym + 0,422 µl Verdünnungspuffer = 2,5 U) im 10 x *ThermoSequenase*-Reaktionspuffer
- *Pwo* (0,5 µl = 2,5 U) im 10 x *Pwo*-Reaktionspuffer
- *Tth* (0,5 µl = 2,5 U) im 10 x *Tth*-Reaktionspuffer unter Zugabe von 5 - 20 µl einer Magnesiumchlorid-Lösung (25 mmol/L)
- *Tfl* (0,5 µl = 2,5 U) im 10 x *Tfl*-Reaktionspuffer unter Zugabe von 3 -20 µl einer Magnesiumsulfat-Lösung (25 mmol/L)
- *UITma* (0,5 µl = 3 U) im 10 x *UITma*-Reaktionspuffer unter Zugabe von 5 µl einer Magnesiumchlorid-Lösung (25 mmol/L)
- *DyNAzyme* (1 µl = 2 U) im 10 x *DyNAzyme*-Reaktionspuffer

Temperaturprogramm des Thermocyclers:	95 °C 3 min.
anschließend 30 Zyklen	95 °C 1 min.
	50 °C 1 min.
	72 °C 1 min.

Polyacrylamidgele zur standardmäßigen Überprüfung der PCR-Ansätze wurden mit 38 %igem Acrylamid durchgeführt.

### 3.3.2.3 Darstellung eines modifizierten 121mers mit pOM9 unter Austestung von vier DNA-Polymerasen

Für die PCR wurde das nachfolgend beschriebene Primer-Template-System verwendet:

Template für die PCR: pOM9

Primer für die PCR:

USP: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT (17mer), 5228,4 Da

RP: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC (17mer), 5241,43 Da

In ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien pipettiert:

x µl Reinstwasser

5 µl PCR-Reaktionspuffer (es wurde jeweils der zum Enzym  
mitgelieferte Puffer verwendet)

2 µl dA\*TP oder 2 µl c<sup>7</sup>dATP oder 1 µl dATP (jeweils 10 mmol/µl)

1 µl dCTP (10 mmol/µl)

1 µl dGTP (10 mmol/µl)

1 µl dTTP (10 mmol/µl)

1 µl Primer USP (20 pmol/µl)

1 µl Primer RP (20 pmol/µl)

1 µl Template pOM9 ( ca.5fmol/µl)

y µl DNA-Polymerase

---

50µl Reaktionsansatz

Es wurden die nachfolgenden DNA-Polymerasen getestet:

- (exo-)Vent (2 µl = 4 U) im 10 x ThermoPol-Reaktionspuffer
- (exo-)DeepVent (1µl = 2U) im ThermoPol-Reaktionspuffer
- Pwo (0,5 µl = 2,5 U) im 10 x Pwo-Reaktionspuffer
- ThermoSequenase (0,078 µl Enzym + 0,422 µl Verdünnungspuffer = 2,5 U) im ThermoSequenase-Reaktionspuffer

Temperaturprogramm des Thermocyclers:	95 °C 3 min.
anschließend 30 Zyklen	95 °C 1 min.
	50 °C 1 min.
	72 °C 1 min.

Polyacrylamidgele zur standardmäßigen Überprüfung der PRC-Ansätze wurden mit 30 %igem Acrylamid hergestellt.

### 3.3.2.4 Darstellung eines modifizierten 122mers mit M13mp18RFI unter Austestung verschiedener DNA-Polymerasen

Es wurde mit dem im folgenden beschriebenen Primer-Template-System gearbeitet:

Template für die PCR: M13mp18

Primer für die PCR:

USP: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT (17mer), 5228,47 Da

RP-122: AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA G (22mer), 6736,4 Da

In ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien pipettiert:

- x µl Reinstwasser
- 5 µl PCR-Reaktionspuffer (es wurde jeweils der zum Enzym mitgelieferte Puffer verwendet)
- 2 µl dA\*TP oder 2 µl c<sup>7</sup>dATP oder 1 µl dATP (jeweils 10 mmol/µl)
- 1 µl dCTP (10 mmol/µl)
- 1 µl dGTP (10 mmol/µl)
- 1 µl dTTP (10 mmol/µl)
- 1 µl Primer USP (20 pmol/µl)
- 1 µl Primer RP-122 (20 pmol/µl)
- 1 µl Template M13mp18RFI ( 100 nmol/µl)
- y µl DNA-Polymerase

---

50 µl Reaktionsansatz

Die nachfolgenden DNA-Polymerasen wurden getestet:

- (exo-)*Vent* (2  $\mu$ l = 4 U) im 10 x ThermoPol-Reaktionspuffer
- (exo-)*DeepVent* (1  $\mu$ l = 2U) im ThermoPol-Reaktionspuffer
- *Pwo* (0,5  $\mu$ l = 2,5 U) im 10 x *Pwo*-Reaktionspuffer
- *ThermoSequenase* (0,078  $\mu$ l Enzym + 0,422  $\mu$ l Verdünnungspuffer = 2,5 U) im *ThermoSequenase*-Reaktionspuffer

Temperaturprogramm des Thermocyclers:	95 °C 3 min.
anschließend 30 Zyklen	95 °C 1 min
	50 °C 1 min.
	72 °C 1 min.

Die Polyacrylamidgele zur Überprüfung der PCR-Ansätze wurden mit 30 %igem Acrylamid hergestellt.

### **3.3.2.5 Darstellung von modifiziertem 391mer mit p9UTR unter Austestung verschiedener DNA-Polymerasen**

Die PCR wurde unter Verwendung des folgenden Primer-Template-Systems durchgeführt.

Template für die PCR: p9UTR

Primer für die PCR:

USP: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT (17mer), 5228,4 Da

RP: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC (17mer), 5241,43 Da

In ein 500  $\mu$ l Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien pipettiert:

x  $\mu$ l Reinstwasser  
5  $\mu$ l PCR-Reaktionspuffer (es wurde jeweils der zum Enzym  
mitgelieferte Puffer verwendet)  
2  $\mu$ l dA<sup>\*</sup>TP oder 2  $\mu$ l c<sup>7</sup>dATP oder 1  $\mu$ l dATP (jeweils 10 mmol/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l dCTP (10 mmol/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l dGTP (10 mmol/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l dTTP (10 mmol/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l Primer USP (20 pmol/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l Primer RP (20 pmol/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l Template p9UTR ( ca.5 fmol/ $\mu$ l)  
y  $\mu$ l DNA-Polymerase

---

50  $\mu$ l Reaktionsansatz

Die nachfolgenden DNA-Polymerasen wurden getestet:

- (exo-)*Vent* (2  $\mu$ l = 4 U) im 10 x ThermoPol-Reaktionspuffer
- (exo-)*DeepVent* (1  $\mu$ l = 2U) im 10 x ThermoPol-Reaktionspuffer
- *Pwo* (0,5  $\mu$ l = 2,5 U) im 10 x *Pwo*-Reaktionspuffer
- *ThermoSequenase* (0,078  $\mu$ l Enzym + 0,422  $\mu$ l Verdünnungspuffer = 2,5 U) im *ThermoSequenase*-Reaktionspuffer

Temperaturprogramm des Thermocyclers:	95 °C 3 min.
anschließend 30 Zyklen	95 °C 1 min.
	50 °C 1 min.
	72 °C 1 min.

Die Polyacrylamidgele zur Überprüfung der PCR-Ansätze wurden mit 30 %igem Acrylamid hergestellt. Außerdem erfolgte die Analyse der PCR-Ansätze mittels eines 1,5 %igen Agarosegels.

### 3.3.2.6 **Darstellung eines modifizierten 729mers mit pG3 unter Austestung verschiedener DNA-Polymerasen**

Nachfolgend wird das für die PCR verwendete Primer-Template-System beschrieben:

Template für die PCR: pG3

Primer für die PCR:

USP: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT (17mer), 5228,4 Da

RP: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC (17mer), 5241,4 Da

In ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien pipettiert:

x µl Reinstwasser  
5 µl PCR-Reaktionspuffer (es wurde jeweils der zum Enzym  
mitgelieferte Puffer verwendet)  
2 µl dA\*TP oder 2 µl c<sup>7</sup>dATP oder 1 µl dATP (jeweils 10 mmol/µl)  
1 µl dCTP (10 mmol/µl)  
1 µl dGTP (10 mmol/µl)  
1 µl dTTP (10 mmol/µl)  
1 µl Primer USP (20 pmol/µl)  
1 µl Primer RP (20 pmol/µl)  
1 µl Template pG3 ( ca.5 fmol/µl)  
y µl DNA-Polymerase

---

50 µl Reaktionsansatz

Die nachfolgenden DNA-Polymerasen wurden getestet:

- (exo-)Vent (2 µl = 4 U) im 10 x ThermoPol-Reaktionspuffer
- (exo-)DeepVent (1µl = 2U) im 10 x ThermoPol-Reaktionspuffer
- Pwo (0,5 µl = 2,5 U) im 10 x Pwo-Reaktionspuffer
- ThermoSequenase (0,078 µl Enzym + 0,422 µl Verdünnungspuffer = 2,5 U) im ThermoSequenase-Reaktionspuffer

Temperaturprogramm des Thermocyclers:	95 °C 3 min.
anschließend 30 Zyklen	95 °C 1 min.
	50 °C 1 min.
	72 °C 1 min.

Die Polyacrylamidgele zur Überprüfung der PCR-Ansätze wurden mit 30 %igem Acrylamid hergestellt. Zusätzlich erfolgte die Analyse der PCR-Ansätze mittels 1,5 %ige Agarosegele.

### 3.3.3 Restriktionsspaltung

#### 3.3.3.1 Restriktionsspaltung an aufgereinigter, doppelsträngig modifizierter DNA

Für eine Restriktionsspaltung war es nötig, die PCR-Ansätze zunächst aufzureinigen. Dies geschah mit dem QIAquick PCR-Purification Kit der Firma Quiagen. Nach der Aufreinigung wurde der Erfolg der Prozedur mit einer Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft.

Die PCR-Ansätze des 121 und des 122mers (unmodifiziertes,  $c^7$ dATPmodifiziertes und mit dA\*TP modifiziertes Oligonukleotid) wurden einer enzymatischen Spaltung unterzogen.

Die nachfolgenden Restriktionsendonukleasen wurden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, das unmodifizierte, das mit  $c^7$ dATP modifizierte und das mit dA\*TP modifizierte Oligonukleotid zu spalten:

- *Alu* I
- *Bam*H I
- *Eco*R I
- *Hind* III
- *Sma* I
- *Xba* I

Ein Zehntel jedes Spaltungsansatzes wurde mittels eines 10 %igen Polyacrylamidgels überprüft.

Mögliche Spaltungsfragmente des 122mers:

- Restriktionsspaltung mit *Alu* I : 23 / 25 / 29 / 45
- Restriktionsspaltung mit *Sma* I : 64 / 58
- Restriktionsspaltung mit *Bam*H I : 67 / 71 / 51 / 55
- Restriktionsspaltung mit : *Eco*R I : 46 / 50 / 72 / 76
- Restriktionsspaltung mit *Xba* I : 73 / 77 / 45 / 49
- Restriktionsspaltung mit *Hind* III : 97 / 101 / 25 / 21

Mögliche Spaltungsfragmente des 121mers:

- Restriktionsspaltung mit *Alu* I : 10 / 47 / 32 / 32
- Restriktionsspaltung mit *Sma* I : 96 / 25
- Restriktionsspaltung mit *Bam*H I : 48 / 52 / 73 / 69
- Restriktionsspaltung mit *Eco*R I : 99 / 103 / 22 / 18
- Restriktionsspaltung mit *Xba* I : 63 / 67 / 58 / 54
- Restriktionsspaltung mit *Hind* III : 55 / 59 / 66 / 62

### 3.3.3.2 Spaltungsversuch mit unaufgereinigter, doppelsträngig modifizierter DNA (pOM9)

Primer-Template-System für die PCR:

Template für die PCR: pOM9

Primer für die PCR:

USP: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT (17mer), 5228,47 Da

RP: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC (17mer), 5241,43 Da

In ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien pipettiert:

x µl Reinstwasser  
5 µl PCR-Reaktionspuffer (es wurde jeweils der zum Enzym mitgelieferte Puffer verwendet)  
2 µl dA<sup>\*</sup>TP oder 2 µl c<sup>7</sup>dATP oder 1 µl dATP (jeweils 10 mmol/µl)  
1 µl dCTP (10 mmol/µl)  
1 µl dGTP (10 mmol/µl)  
1 µl dTTP (10 mmol/µl)  
1 µl Primer USP (20 pmol/µl)  
1 µl Primer RP (20 pmol/µl)  
1 µl Template pOM9 ( ca.5fmol/µl)  
1 µl *DeepVent* (2 U/µl)

---

50 µl Reaktionsansatz

Temperaturprogramm des Thermocyclers:	95 °C 3 min.
anschließend 30 Zyklen	95 °C 1 min.
	50 °C 1 min.
	72 °C 1 min.

Für jeden Spaltungsansatz wurden 0,5 µl des unaufgereinigten PCR-Produktes mit 9,5 µl Wasser, 1,2 µl Inkubationspuffer des jeweiligen Enzyms und 0,5 µl Enzym versetzt und 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Folgende Restriktionsendonukleasen (je 10 U/ $\mu$ l) wurden getestet:

- *Alu* I
- *Bam*H I
- *Hind* III
- *Eco*R I

### 3.3.3.3 Restriktionsexperimente mit einzelsträngig modifizierter, doppelsträngiger DNA

Es wurde untersucht, ob doppelsträngige DNA, bei welcher nur ein Strang modifiziert war, von Restriktionsendonukleasen gespalten wird.

Primer-Template-System zur Darstellung eines modifizierten 121mers mit pOM9.

Template für die PCR: pOM9

Primer für die PCR:

bio-USP: 5'-bioGTA AAA CGA CGG CCA GT (17mer), 5720,98 Da

RP: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC (17mer), 5241,43 Da

In ein 500  $\mu$ l Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien pipettiert:

x  $\mu$ l Reinstwasser

5  $\mu$ l PCR-Reaktionspuffer (es wurde jeweils der zum Enzym mitgelieferte Puffer verwendet)

2  $\mu$ l dA<sup>\*</sup>TP oder 2  $\mu$ l c<sup>7</sup>dATP oder 1  $\mu$ l dATP (jeweils 10 mmol/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l dCTP (10 mmol/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l dGTP (10 mmol/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l dTTP (10 mmol/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l Primer bio-USP (20 pmol/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l Primer RP (20 pmol/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l Template pOM9 ( ca.5fmol/ $\mu$ l)

y  $\mu$ l DNA-Polymerase

---

50  $\mu$ l Reaktionsansatz

Die folgenden DNA-Polymerasen wurden verwendet:

- (exo-)*DeepVent* (1  $\mu$ l = 2U) im 10 x ThermoPol-Reaktionspuffer
- *Pwo* (0,5  $\mu$ l = 2,5 U) im 10 x *Pwo*-Reaktionspuffer

Temperaturprogramm des Thermocyclers:            95 °C 3 min.  
anschließend 30 Zyklen                            95 °C 1 min.  
   50 °C 1 min.  
   72 °C 1 min.

PCR-Produkt:

***AluI***

RP

SilCut

CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAATTGGCTGCAGGTCGAC  
GTCCTTTGTCGATACTGGTACTAATGCGGTAAACCGACGTCCAGCTG

***Alu I***

***BamH I***

***Hind III***

***Alu I***

**GGATCCCAAGCTTCTTCTAGAGGTACCGCATGCGATATCGAGCTCTCCCGG**  
**CCTAGGGTTCGAAGAAGATCTCCATGGCGTACGCTATAGCTCGAGAGGGCC**

***EcoR I***

**GAATTC**ACTGGCCGTCG TTT TAC (120mer, 93 mer mit SilCut)

CTTAAGTGACCGGCAGCAAATG

bio-USP

Das PCR-Produkt wurde an vorbereitete Dynabeads (10  $\mu$ l pro PCR-Ansatz) gebunden und der Doppelstrang wurde durch 5-minütige Inkubation mit 50  $\mu$ l 100 mM Natronlauge denaturiert. Der an den Beads verbleibende biotinylierte Einzelstrang diente als Template für die nachfolgende Primer Extension.

Primer für die Primer Extension:

SilCut: 5'-CAA TTG GCT GCA GGT CGA C (19mer), 5828,8 Da

Reaktionsmix für die Primer Extension:

10,625 ml Wasser

1,5  $\mu$ l 10 x *ThermoSequenase*-Reaktionspuffer

0,375  $\mu$ l dNTP-Mix je 2 mM

2  $\mu$ l Primer (10 pmol/ $\mu$ l)

0,5  $\mu$ l *ThermoSequenase* (0,422  $\mu$ l Verdünnungspuffer + 0,078  $\mu$ l  
Enzym = 2,5 U)

---

15  $\mu$ l Reaktionsansatz

Der Reaktionsmix wurde zu den Beads gegeben und folgendes Temperaturprogramm durchgeführt:

	80 °C 1 min.
anschließend 10 Zyklen	40 °C 10 sec.
	72 °C 5 sec.
abschließend	72 °C 3 min.

Nach der Verlängerung wurde der Überstand entfernt, die Beads wurden einmal mit 50  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0) und anschließend in 50  $\mu$ l Tris-HCl aufgenommen. Zur Überprüfung der Reaktion wurden 10  $\mu$ l abgenommen und an einem 12 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Nach einmaliger Primerverlängerung wurde eine Restriktionsspaltung durchgeführt. Um sicherzustellen, daß am Ende nur noch das gewünschte Produkt vorlag, wurde der erhaltene Doppelstrang noch zweimal denaturiert (5 Minuten mit 5  $\mu$ l 50 mM Ammoniak bei 60 °C inkubieren) und erneut der Primerverlängerung zugeführt. Die Reaktion wurde jeweils mittels eines denaturierenden Polyacrylamidgels überprüft. Nach dreimaliger Primerverlängerung wurde ebenfalls eine Restriktionsspaltung durchgeführt.

Für jede Restriktionsspaltung wurden 5  $\mu$ l der in Tris-HCl suspensierten Beads abgenommen, zweimal mit je 10  $\mu$ l Wasser gewaschen, in 10  $\mu$ l Wasser aufgenommen, mit 1,2  $\mu$ l

Inkubationspuffer des jeweiligen Enzyms sowie 0,5 µl Enzym versetzt und drei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Es wurden folgende Enzyme (je 10 U/µl) getestet:

- *Alu* I
- *Bam*H I
- *Hind* III
- *Eco*R I

Nach der Restriktionsspaltung wurde der Überstand separiert. Die Beads wurde mit 5 µl 50 mM Ammoniak versetzt und 5 Minuten bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Beads wurden mit 10 µl 2 M Ammoniak 6 Minuten bei 80 °C gekocht. Der Überstand wurde erneut separiert. Die Überstände wurden 30 Minuten bei geöffnetem Deckel des Eppendorf-Reaktionsgefäßes bei Raumtemperatur geschüttelt.

Anschließend wurden die Spaltungen mittels eines 17,5 %igen denaturierenden Polyacrylamidgels überprüft.

mögliche Spaltungsfragmente:

- Restriktionsspaltung mit *Alu*I: 57<sub>m</sub> / 29 / 32<sub>m</sub> / 32 / 32 / 32<sub>m, bio</sub>
- Restriktionsspaltung mit *Bam*H I: 20 / 52<sub>m</sub> / 73 / 69<sub>m, bio</sub>
- Restriktionsspaltung mit *Hind* III: 27 / 59<sub>m</sub> / 66 / 62<sub>m, bio</sub>
- Restriktionsspaltung mit *Eco*R I: 71 / 103<sub>m</sub> / 22 / 18<sub>m, bio</sub>

m = Fragment enthält modifiziertes dA\* TP

bio = Fragment ist biotinyliert

### 3.3.4 Stabilitätsprüfung des modifizierten 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphates

#### 3.3.4.1 MALDI-Vermessung der Triphosphate

Das modifizierte Triphosphat wurde mit dem natürlichen 2'-Desoxyadenosin-5'-O-triphosphat und dem 2'-Desoxy-7-deazaadenosin-5'-O-triphosphat bei MALDI-TOF-Messungen unter Verwendung von 3-HPA oder DHB als Matrix verglichen.

#### 3.3.4.2 MALDI-Vermessung einer PROBE-Reaktion

Template: 5'-bioCTA GAA GAA GCT TGT ATT GGA GGG AGA AGA GAG CCG TC

Primer: 5'-CTC TCT TCT CCC TCC (15mer); 4366 Da

Reaktionsmix für die PROBE:

8,5 µl Wasser

1,5 µl 10 x *ThermoSequenase*-Reaktionspuffer

2,0 µl Primer ( 10 pmol/µl)

1,0 µl Template ( 10 pmol/µl)

1,5 µl ddNTP/dNTP-Mix ( je 50 mM Endkonzentration)

0,5 µl *ThermoSequenase* (0,422 ml Verdünnungspuffer + 0,078 µl  
Enzym = 2,5 U)

---

15 µl Reaktionsansatz

Temperaturprogramm für die PROBE:	80 °C 1min.
anschließend 10 Zyklen	40 °C 10 sec.
	72 °C 5 sec.
abschließend	72 °C 3 min.

Zu den PROBE-Ansätzen wurden die vorbereiteten Dynabeads gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Doppelstrang mittels Ammoniak denaturiert, der nicht biotinylierte Einzelstrang separiert und mit MALDI-TOF vermessen.

Bei dieser PROBE-Reaktion wurden nachfolgende dNTP-Mixe verwendet:

- Bei Verwendung einer ddTTP-Stop-Lösung:
  1. Positivkontrolle: je 500  $\mu\text{M}$  dATP, dGTP, dCTP  
500  $\mu\text{M}$  ddTTP
  2. Vergleich mit  $c^7$ dATP: je 500  $\mu\text{M}$  dATP, dGTP, dCTP  
500  $\mu\text{M}$  ddTTP
  3.  $dA^*$ TP: je 500  $\mu\text{M}$  dGTP, dCTP  
500  $\mu\text{M}$  ddTTP  
10  $\mu\text{l}$   $dA^*$ TP-Lösung (ca. 10 mM) in 100  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix
  
- Bei Verwendung einer ddCTP-Stop-Lösung
  1. Positivkontrolle: je 500  $\mu\text{M}$  dATP, dGTP, dTTP  
500  $\mu\text{M}$  ddCTP
  2. Vergleich mit  $c^7$ dATP: je 500  $\mu\text{M}$  dATP, dGTP, dTTP  
500  $\mu\text{M}$  ddCTP
  3.  $dA^*$ TP : je 500  $\mu\text{M}$  dGTP, dTTP  
500  $\mu\text{M}$  ddCTP  
10  $\mu\text{l}$   $dA^*$ TP-Lösung (ca. 10 mM) in 100  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix
  
- Bei Verwendung einer ddGTP-Stop-Lösung
  1. Positivkontrolle: je 500  $\mu\text{M}$  dATP, dTTP, dCTP  
500 $\mu\text{M}$  ddGTP
  2. Vergleich mit  $c^7$ dATP: je 500  $\mu\text{M}$  dATP, dTTP, dCTP  
500  $\mu\text{M}$  ddGTP
  3.  $dA^*$ TP: je 500  $\mu\text{M}$  dTTP, dCTP  
500  $\mu\text{M}$  ddCTP  
10  $\mu\text{l}$   $dA^*$ TP-Lösung (ca. 10 mM) in 100  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix

mögliche Produkte:

Bei Verwendung des ddTTP-Stops:

Primer + AAddT

- |                            |         |
|----------------------------|---------|
| 1. mit dATP                | 5280 Da |
| 2. mit dA <sup>*</sup> TP  | 5280 Da |
| 3. mit c <sup>7</sup> dATP | 5278 Da |

Bei Verwendung des ddCTP-Stops:

Primer + AATAddC

- |                            |         |
|----------------------------|---------|
| 1. mit dATP                | 5882 Da |
| 2. mit dA <sup>*</sup> TP  | 5882 Da |
| 3. mit c <sup>7</sup> dATP | 5879 Da |

Bei Verwendung des ddGTP-Stops:

Primer + AATACAAAddG

- |                            |         |
|----------------------------|---------|
| 1. mit dATP                | 6837 Da |
| 2. mit dA <sup>*</sup> TP  | 6837 Da |
| 3. mit c <sup>7</sup> dATP | 6832 Da |

### 3.3.4.3 MALDI-Vermessung einer PROBE-Reaktion

Template: 5'-bioTCG TGC TTG ATT TTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA ATC GTC

Primer: 5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT (20mer); 6022 Da

Reaktionsmix für die PROBE:

9,25 µl Wasser

1,5 µl 10 x *ThermoSequenase*-Reaktionspuffer

2,0 ml Primer (10 pmol/µl)

1,0 µl Template (10 pmol/µl)

0,75 ml dATP / c<sup>7</sup>dATP / dA\*TP (1mM = 50 µM Endkonzentration)

0,5 µl *ThermoSequenase* (0,422 µl Verdünnungspuffer + 0,078 ml  
Enzym = 2,5 U )

---

15 µl Reaktionsansatz

Temperaturprogramm für die PROBE:

- |                        |               |
|------------------------|---------------|
| 1)                     | 80 °C 1 min.  |
| anschließend 10 Zyklen | 40 °C 10 sec. |
|                        | 72 °C 5 sec.  |
| abschließend           | 72 °C 3 min.  |
| 2)                     | 80 °C 1 min.  |
| anschließend 10 Zyklen | 45 °C 10 sec. |
|                        | 72 °C 5 sec.  |
| abschließend           | 72 °C 3 min.  |
| 3)                     | 80 °C 1 min.  |
| anschließend 5 Zyklen  | 40 °C 10 sec. |
|                        | 72 °C 5 sec.  |
| abschließend           | 72 °C 3 min.  |

## VII. Experimenteller Teil - Biochemie und Massenspektrometrie

---

- 4) 80 °C 1 min.  
anschließend 5 Zyklen 45 °C 10 sec.  
72 °C 5 sec.  
abschließend 72 °C 3min.
- 5) 80 °C 1 min.  
anschließend 10 Zyklen 50 °C 10 sec.  
72 °C 5 sec.  
abschließend 72 °C 3 min.
- 6) 80 °C 1 min.  
anschließend 10 Zyklen 55 °C 10 sec.  
72 °C 5 sec.  
abschließend 72 °C 3 min.

Die PROBE-Ansätze wurden an die vorbereiteten Dynabeads gebunden. Anschließend wurde der Doppelstrang denaturiert, der nichtbiotinylierte Einzelstrang separiert und mittels MALDI-TOF vermessen.

mögliche Produkte:

Primer	6022 Da
Primer + dAdAdAdA	7274,8 Da (7270,8 Da mit $c^7$ dATP)
Primer + dAdAdAdAdA	7588 Da (7583 Da mit $c^7$ dATP)

### 3.3.5 Amplifikation von Mikrosatelliten

Es wurde zwei verschiedene Primer-Template-Systeme verwendet:

1)

Template für die PCR (1-3):

..5'-GACTTTACTTTTGTCTACACACACACACACACACACACACT..

Primer für die PCR:

bio-R 1-3: 5'-bioCCCAGACTGTGTGCAGAGTGTG

F 1-3: 5'-GCGATGCTGCCGTTCAA

Primer für die PROBE:

P 1-3: CTTTACTTTTGTCTACACA (19mer); 5700,3 Da

2)

Template für die PCR (1-31):

..5'-TTCTTATCCCTCATNACACACACACACACACACACACA  
CACACACACACACTCTTT...

Primer für die PCR:

bio-R 1-31: 5'-bioAAGAAGTCACTGAGAACCTGGG

F 1-31: 5'-TCCTGACCTTGCGATG

Primer für die PROBE:

P 1-31: 5'-TCTTATCCCTCATTACACA (19mer); 6557 Da

Reaktionsmix für die PCR:

29,8 µl Wasser  
5,0 µl dNTP-Mix (je 2mM)  
5,0 µl 10 x PCR-Puffer für *HotStartTaq*  
1,0 µl bio-R-Primer (10 pmol/µl)  
2,5 µl F-Primer (10 pmol/µl)  
0,2 µl *HotStartTaq* (5U/µl)  
8,0 µl Template (25 ng/µl)

---

50 µl Reaktionsvolumen

## VII. Experimenteller Teil - Biochemie und Massenspektrometrie

---

Temperaturprogramm des Thermocyclers:	94 °C	10 min.
anschließend 39 Zyklen	94 °C	30 sec.
	62 - 54 °C	20 sec.
	72 °C	30 sec.
abschließend	72 °C	2,5 min.

Zur Qualitätskontrolle wurden 10 % jedes Ansatzes auf einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert.

Zu jedem Reaktionsansatz wurden 15 µl vorbereitete Beads gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Denaturierung des Doppelstranges erfolgte mit 5 µl 100 mM Natronlauge und der erhaltene gebundene Einzelstrang diente als Template für PROBE-Reaktion.

Reaktionsmix für die PROBE:

9,5 µl Wasser
1,5 µl 10 x <i>ThermoSequenase</i> -Reaktionspuffer
1,5 µl ddTTP/dNTP-Mix (50 µM/50 µM)
2,0 µl PROBE-Primer (20 pmol)
0,5 µl <i>ThermoSequenase</i> (0,078 µl Enzym + 0,422 µl Verdünnungspuffer)

---

15 µl Reaktionsvolumen

Der Reaktionsmix wurde zu den Beads gegeben und nachfolgendes Temperaturprogramm des Thermocyclers durchgeführt:

Ramping (0,1 °C/sec.) 1 Zyklus	80 °C	1 min.
	50 °C	3 min.
	72 °C	3 min.
abschließend	72 °C	2 min.

Der nach der PROBE-Reaktion erhaltene Doppelstrang wurde denaturiert (5µl konz. Ammoniak, 5 Minuten bei 40 °C inkubiert), der nicht biotinylierte Einzelstrang wurde separiert und mit MALDI-TOF vermessen.

## VII. Experimenteller Teil - Biochemie und Massenspektrometrie

---

mögliche Produkte:

Primer 1-3: 5700,3 Da

Primer + CACACACACACACACACACACACACACddT 14108,9 Da

Primer 1-31: 5657 Da

Primer + CACACACACACACACACACACACACACACACACACddT 16475,2 Da

---

## VIII Literaturverzeichnis

- [1] C.R. Cantor  
Orchestrating the Human Genom Project  
*Science* **248** (1990) 49-51
- [2] E.S. Lander  
The New Genomics: Global Views of Biology  
*Science* **274** (1996) 536-539
- [3] S.E. Koonin  
An Independent Perspective on the Human Genom Project  
*Science* **279** (1998) 36-37
- [4] V.A. McKusick  
HUGO News. The Human Genome Organisation: History, Purpose and Member Ship  
*Genomics* **5** (1989) 385-387
- [5] C. Heller  
Instrumentierung in der Genomforschung  
*Nachr. Chem. Tech. Lab.* **47** (1999) 396-400
- [6] A. Maelicke  
Genomics und Postgenomics  
*Nachr. Chem.* **48** (2000) 793-795
- [7] G.D. Schuler et al.  
A Gene Map of the Human Genome  
*Science* **274** (1996) 540-546
- [8] A.M. Maxam, W. Gilbert  
A New Methode for Sequencing DNA  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977) 560-564
- [9] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson  
DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977) 5463-5467.
- [10] R. Frank, H. Köster  
DNA Chain Length Markers and the Influence of Base Composition on Electrophoretic Mobility of Oligodeoxyribonucleotides in Polyacrylamide-Gels  
*Nucleic Acid Res.* **6** (1979) 2069-2087.
- [11] M. Chee, R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X.C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D.J. Lockhard, M.S. Morris, S.P.A.  
Fodor Accessing Genetic Information with High Density DNA Arrays  
*Science* **274** (1996) 610-614.
- [12] M. Schena, D. Shalon, W. Davis, P.O. Brown  
Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray  
*Science* **270** (1995) 467-470.

- [13] C.M. Henry  
DNA Microassays in Toxicology  
*Anal. Chem.* **71** (1999) 462A-464A.
- [14] D.P. Little, A. Braun, M.J. O'Donnell, H. Köster  
Mass Spectrometry from Miniaturized Arrays for Full Comparative DNA Analysis  
*Nature Med.* **3** (1997) 1413-1416.
- [15] A. Goffeau  
Molecular Fish on Chips  
*Nature* **385** (1997) 202-203.
- [16] R. Drmanac, S. Drmanac, Z. Strezoska, T. Paunesku, I. Labat, M. Zeremski, J. Snoddy, W.K. Funkhouser, B. Koop, L. Hood, R. Crkvenjakov  
DNA Sequence Determination by Hybridization: A Strategy for Efficient Large-Scale Sequencing  
*Science* **260** (1993) 1649-1652.
- [17] Z. Strezoska, T. Paunesku, D. Radosavljevic, I. Labat, R. Drmanac, R. Crkvenjakov  
DNA Sequencing by Hybridization: 100 Bases Read by a Non-Gel-Based Method  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991) 10089-10093.
- [18] N.E. Broude, T. Sano, C.L. Smith, C.R. Cantor  
Enhanced DNA Sequencing by Hybridization  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 3072-3076.
- [19] F.S. Collins, A. Patrinos, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland, L. Walter  
New Goals for the U.S. Human Genom Project 1998-2003  
*Science* **282** (1998) 682-689.
- [20] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh  
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage (1991) 241.
- [21] H. Pang, D.L. Smith, P.F. Crain, K. Yamaizumi, S. Nishimura, J. McClosley  
Identification of Nucleosides in Hydrolysates of Transfer RNA by High-Resolution Mass Spectrometry  
*Eur. J. Biochem.* **127** (1982) 459-471.
- [22] A. Wolter, C. Möhringer, H. Köster, W.A. König  
Negative Ion FAB Mass Spectrometric Analysis of Non-Charged Key Intermediates in Oligonucleotide Synthesis. Rapid Identification of Partially Protected Dinucleoside Monophosphates  
*Biomed. & Environmental Mass Spec.* **14** (1987) 111-116.
- [23] M.A. Posthumus, P.G. Kistemaker, H.L.C. Meuzelaar, M.C. Ten Noever de Brauw  
Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules  
*Anal. Chem.* **50** (1978) 985-991.
- [24] M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp  
Principles and a Application of Matrix-Assisted UV-Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry  
*Anal. Chim. Acta* **241** (1990) 175-185.

- 
- [25] M. Karas, F. Hillenkamp  
Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10.000 Daltons  
*Anal. Chem.* **60** (1988) 2299-2301.
- [26] R.W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams  
Mass Determination of Human Immunoglobulin IgM Using Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry  
*Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8** (1994) 627-631.
- [27] R.J. Cotter  
Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Biological Molecules  
*Anal. Chem.* **64** (1992) 1027A-1039A.
- [28] J. Bai, Y.-H. Liu, T. C. Cain, D.M. Lubman  
Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Using an Active Perfluorosulfonated Ionomer Film Substrate  
*Anal. Chem.* **66** (1994) 3423-3430.
- [29] D.C. Schriemer, L. Li  
Detection of High Molecular Weight Narrow Polydisperse Polymers up to 1,5 Million Daltons by MALDI Mass Spectrometry  
*Anal. Chem.* **68** (1998) 2721-2725.
- [30] F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B.T. Chait  
Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers  
*Anal. Chem.* **63** (1991) 1193A-1203A.
- [31] M. Karas, U. Giessmann  
Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Massenspektrometrie  
*Labor 2000* (1992) 71-83.
- [32] I.V. Chernushevich, W. Ens, K.G. Standing  
Orthogonal-Injection TOF-MS for Analyzing Biomolecules  
*Anal. Chem.* **71** (1999) 452A-461A.
- [33] R.J. Cotter  
The New Time-of-Flight Mass Spectrometry  
*Anal. Chem.* **71** (1999) 445A-451A.
- [34] M.T. Roskey, P. Juhasz, I.P. Smirnov, E.J. Takach, S.A. Martin, L.A. Haff  
DNA Sequencing by Delayed Extraction-Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 4724-4729.
- [35] J.M. Koomen, W.K. Russell, J.M. Hettick, D.H. Russell  
Improvement of Resolution, Mass Accuracy, and Reproducibility in Reflected Mode DE-MALDI-TOF Analysis of DNA Using Fast Evaporation-Overlayer Sample Preparations  
*Anal. Chem.* **72** (2000) 3860-3866.
- [36] S.L. Cohen, B.T. Chait  
Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins  
*Anal. Chem.* **68** (1996) 31-37.

- [37] K.J. Wu, A. Steding, C.H. Becker  
Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry of Oligonucleotides Using 3-Hydroxypicolinic Acid as an Ultra Violet-Sensitive Matrix  
*Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7** (1993) 142-146.
- [38] K. Tang, N.I. Taranenko, S.L. Allman, L.Y. Chang, C.H. Chen  
Detection of 500-Nucleotide DNA by Laser Desorption Mass Spectrometry  
*Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8** (1994) 727-730.
- [39] D.P. Little, T.J. Cornish, M.J. O'Donnell, A. Braun, R. J. Cotter, H. Köster MALDI on a Chip: Analysis of Arrays of Low-Femtomole to Subfemtomole Quantities of Synthetic Oligonucleotides and DNA Diagnostic Products Dispensed by a Piezoelectric Pipet  
*Anal. Chem.* **69** (1997) 4540-4546.
- [40] M.J. O'Donnell, K. Tang, H. Köster, C.L. Smith, C.R. Cantor  
High-Density, Covalent Attachment of DNA to Silicon for Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry  
*Anal. Chem.* **69** (1997) 2438-2443.
- [41] D.A. Van Ausdall, W.S. Marshall  
Automated High-Throughput Mass Spectrometry Analysis of Synthetic Oligonucleotides  
*Anal. Biochem.* **256** (1998) 220-228.
- [42] U.Piles, W. Zürcher, M. Schär, H.E. Moser  
Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Powerful Tool for the Mass and Sequence Analysis of Natural and Modified Oligonucleotides  
*Nucleic Acid Res.* **21** (1993) 3191-3196.
- [43] H. Köster, K. Tang, D.-J. Fu, A. Braun, D. van den Boom, C.L.Smith, R.J. Cotter, C.R. Cantor  
A Strategy for Rapid and Efficient DNA Sequencing by Mass Spectrometry  
*Nature Biotech.* **14** (1996) 1123-1128.
- [44] D. van den Boom, C. Jurinke, D.-J. Fu, H. Köster  
Sequence Analysis of Nucleic Acids by Mass Spectrometry In Nonradioactive Analysis of Biomolecules  
C. Kessler, Springer Lab Manual, Heidelberg, Springer Verlag, 1998.
- [45] N.R. Isola, S.L. Allman, U.U. Golovlov, C.-H. Chen  
Chemical Cleavage Sequencing of DNA Using Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry  
*Anal. Chem.* **71** (1999) 2266-2269.
- [46] U. Puapaiboorn, J. Jai-nhuknan, J.A. Cowan  
Rapid and Direct Sequencing of Double-Stranded DNA Using Exonuclease III and MALDI-TOF MS  
*Anal. Chem.* **72** (2000) 3338-3341.
- [47] C. Jurinke, D. van den Boom, A. Jacobs, K. Tang, R. Wörl, H. Köster  
Analysis of Ligase Chain Reaction Products via Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry  
*Anal. Biochem.* **237** (1996) 174-181.

- [48] M.J. Doktycz, G.B. Hurst, S. Habibi-Goudarzi, S.A. McLuckey, K. Tang, C.H. Chen, M. Uziel, K.B. Jacobson, R.P. Woychik, M.V. Buchanan  
Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified DNA Products by Mass Spectrometry Using Matrix-Assisted Laser Desorption and Electrospray: Current Status  
*Anal. Biochem.* **230** (1995) 205-214.
- [49] C.W. Siegert, A. Jacobs, H. Köster  
Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Detection of Polymerase Chain Reaction Products Containing 7-Deazapurine Moieties  
*Anal. Biochem.* **243** (1996) 55-65.
- [50] P.L. Ross, K. Lee, P. Belgrader  
Discrimination of Single-Nucleotide Polymorphisms in Human DNA Using Peptide Nucleic Acids Probes Detected by MALDI-TOF Mass Spectrometry  
*Anal. Chem.* **69** (1997) 4197-4202.
- [51] C. Jurinke, B. Zöllner, H.-H. Feucht, A. Jacobs, J. Kirchhübel, A. Lüchow, D. van den Boom, R. Laufs, H. Köster  
Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum Samples via Nested PCR and MALDI-TOF Mass Spectrometry  
*Genetic Analysis* **13** (1996) 67-71.
- [52] E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P.F. Crain  
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry of Nucleic Acids with Wavelengths in the Ultraviolet and Infrared  
*Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6** (1992) 771-776.
- [53] J.A. Zoltewicz, D.F. Clark, T.W. Sharpless, G. Grahe  
Kinetics and Mechanism of the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Some Purine Nucleosides  
*J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 1741-1750.
- [54] J.L. York  
Effect of the Structure of the Glycon on the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Adenine Nucleosides  
*J. Org. Chem.* **46** (1981) 2171-2173.
- [55] F. Seela, H. Steker  
Synthesis and Hydrolytic Stability of 4-Substituted Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine 2'-Desoxyribofuranosides  
*J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1985) 2573-2576.
- [56] J. Gross, A. Leisner, F. Hillenkamp, S. Hahner, M. Karas, J. Schäfer, F. Lützenkirchen, E. Nordhoff  
Investigation of the Metastable Decay of DNA under Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Conditions with Post-Source-Decay Analysis and Hydrogen/Deuterium Exchange  
*J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9** (1998) 866-878.
- [57] L. Zhu, G.R. Parr, M.C. Fitzgerald, C.M. Nelson, L.M. Smith  
Oligodesoxynucleotide Fragmentation in MALDI/TOF Mass Spectrometry Using 355nm Radiation  
*J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 6048-6056.

- [58] E. Nordhoff, R. Cramer, M. Karas, F. Hillenkamp, K. Kristiansen, P. Roepstorff Ion Stability of Nucleic Acids in Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry *Nucleic Acid Res.* **21** (1993) 3347-3357.
- [59] G. Habermehl, P. Hammann  
Naturstoffchemie Springer Verlag, Berlin, 1. Auflage (1992) S.388.
- [60] W. Tang, L. Zhu, L.M. Smith  
Controlling DNA Fragmentation in MALDI-MS by Chemical Modification  
*Anal. Chem.* **69** (1997) 302-312.
- [61] T. Ono, M. Scalf, L.M. Smith  
2'-Fluoro Modified Nucleic Acids: Polymerase-Directed Synthesis, Properties and Stability to Analysis by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry  
*Nucleic Acid Res.* **25** (1997) 4581-4588.
- [62] F. Kirpekar, E. Nordhoff, K. Kristiansen, P. Roepstorff, S. Hahner, F. Hillenkamp 7-Deaza Purine Bases Offer a Higher Ion Stability in the Analysis of DNA by Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionisation Mass Spectrometry  
*Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9** ((1995) 525-531.
- [63] F. Seela, A. Roling  
7-Deazapurine Containing DNA: Efficiency of  $c^7$ dGTP,  $c^7$ dATP and  $c^7$ dITP Incorporation during PCR-Amplifikation and Protection from Endodeoxyribonuclease Hydrolysis  
*Nucleic Acid Res.* **20** (1992) 55-61.
- [64] J.A. McClarin, C.A. Frederick, B.-C. Wang, P. Greene, H.W. Boyer, J. Grable, J.M. Rosenberg  
Structure of the DNA-*EcoR* I Endonuclease Recognition Complex at 3Å Resolution  
*Science* **234** (1986) 1526-1541.
- [65] J.M. Rosenberg, J.A. McClarin, C.A. Frederick, B.-C. Wang, J. Grable, H.W. Boyer, P. Greene  
Structure and Recognition mechanism of *EcoR* I Endonuclease  
*Trends Biochem. Sci.* **12** (1987) 395-398.
- [66] D. Ganten, K. Ruckpaul  
Genetisches Wissen für Gesundheit und Krankheit  
*Nachrichten aus der Chemie* **48** (2000) 894-902.
- [67] K. Okubo, K. Matsubara  
Complementary DNA Sequence (EST) Collection and the Expression information of the Human Genome  
*FEBS Letters* **403** (1997) 225-229.
- [68] M.D. Adams, J.M. Kelly, J.D. Gocayne, M. Dubnick, M.H. Polymeropoulos, H. Xiao, C.R. Merril, A. Wu, B. Olde, R.F. Moreno, A.R. Kerlavage, W.R. McCombie, L.C. Venter  
Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project  
*Science* **252** (1991) 1651-1656.

- [69] C. Jurinke, B. Zöllner, H.-H. Feucht, D. van den Boom, A. Jacobs, S. Polywka, R. Laufs, H. Köster  
Application of Nested PCR and Mass Spectrometry for DNA-Based Virus Detection: HBV-DNA Detection in the Majority of Isolated Anti-HBc Positive Sera  
*Genetic Analysis* **14** (1998) 97-102.
- [70] Wu, T.A. Shaler, C.H. Becker  
Time-Of-Flight Mass Spectrometry of Underivatized Single-Stranded DNA Oligomers by Matrix-Assisted Laser Desorption  
*Anal. Chem.* **66** (1994) 1637-1645.
- [71] V.D. Antel, C.A. Caperelli  
Synthesis of Chiral Carbocyclic Ribonucleotides  
*Nucleosides & Nucleotides* **18** (1999) 1911-1928.
- [72] E.S. Gibson, K. Lesiak, K.A. Watanabe, L.J. Gudas, K.W. Pankiewicz  
Synthesis of a Novel C-Nucleoside  
*Nucleosides & Nucleotides* **18** (1999) 363-376.
- [73] C. Liang, T. Ma, J.S. Cooperwood, J. Du, C.K. Chu  
Synthesis of L-Ribofuranosyl C-Nucleosides  
*Carbohydrate Res.* **303** (1997) 33-38.
- [74] M.J. Lim, R.S. Klein  
Synthesis of a 9-Deazaadenosine. A New Cytotoxic C-Nucleoside Isostere of Adenosine  
*Tetrahedron Lett.* **22** (1981) 25-28.
- [75] S.Y.-K. Tam, R.S. Klein, I. Wempfen, J.J. Fox  
Nucleosides.112. Synthesis of Some New Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines and Their C-Nucleosides  
*J. Org. Chem.* **44** (1979) 4547-4553.
- [76] S.Y.-K. Tam, J.S. Hwang, F.G. De Las Heras, R.S. Klein, J.J. Fox  
Nucleosides CV. Synthesis of the 8-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine Isosteres of Adenosine and Inosine  
*J. Heterocyc. Chem.* **13** (1976) 1305-1308.
- [77] T.P. Zimmerman, R.D. Deeprose, G. Wolberg, C.R. Stopford, G.S. Duncan, W.H. Miller, R.L. Miller, M.-I. Lim, W.-Y. Ren  
*Biochem. Pharmacol.* **32** (1983) 1211.
- [78] B.K. Bhattacharya, M.-I. Lim, B.A. Otter, R.S. Klein  
Synthesis of Furo[3,2-d]pyrimidine Nucleosides. A Novel C-Nucleoside Isostere of Adenosine  
*Tetrahedron Lett.* **27** (1987) 815-818.
- [79] D.Y. He, Z.J. Li, Z.J. Li, Y.Q. Liu, D.X. Qiu, M.S. Cai  
Studies on Carbohydrates X. A New Method for the Preparation of Isopropylidene Saccharides  
*Synthetic Commun.* **22** (1992) 2653-2658.

- [80] N.A. Huges, R.R. Speakman  
New Isopropylidene Derivates of D-Ribose; 1,2:3,4-Di-O-isopropylidene-D-ribofuranose and 1,2-O-Isopropylidene-D-ribofuranose  
*Carbohydrates Res.* **1** (1965) 71-75.
- [81] M. Nakata, M. Arai, K. Tomooka  
Total Synthesis of Erythronolide A  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **62** (1989) 2618-2635.
- [82] R.S. Klein, H. Ohuri, J.J. Fox  
Synthesis of 2,3-O-Isopropylidene-5-O-trityl-β-D-ribofuranosyl Chloride  
*J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides* **1** (1974) 265-269.
- [83] G.P. Schiemenz, H. Engelhard  
Die Synthese von Cyanomethyltriphenylphosphoran und seine Umsetzung mit aromatischen Aldehyden  
*Chem. Ber.* **94** (1961) 578-585.
- [84] S. Trippett, D.M. Walker  
The Reaction of Wittig Reagenz with Phenyl Isocyanate  
*J. Chem. Soc.* (1959) 3874-3876.
- [85] S. Atrott  
Synthese eines geschützten 7,9-Dideaza-7-oxoadenosins  
*Diplomarbeit* Universität Hamburg (1997)
- [86] G.H. Jones, J.G. Moffatt, M.L. Maddox, A.T. Christensen, S.K. Byran  
C-Glycosyl Nucleosides. V. Some Unexpected Observations on the Relative Stabilities of Compounds Containing Fused Five-Membered Rings with Epimerizable Substituents  
*J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 4602-4603.
- [87] H. Ohuri, S. Emoto  
A Rationalisation on the Relative Thermodynamic Stabilities of Fused Five-Membered Tetrahydrofurans with Epimerizable Substituents. An Anomeric Effect in Furanoses  
*J. Org. Chem.* **42** (1977) 1951-1957.
- [88] S. DeBernardo, M. Weigele  
Synthesis of Oxazinomycin  
*J. Org. Chem.* **42** (1977) 109-112.
- [89] H. Brederick, G. Simchen, S. Rebsdatt, W. Kantlehner, P. Horn, R. Wahl, H. Hofmann, P. Grieshaber  
Darstellung und Eigenschaften der Amidacetale und Aminalester  
*Chem. Ber.* **101** (1968) 41-50.
- [90] C.L. Liotta, H.P. Harris  
The Chemistry of „Naked“ Anions. I. Reactions of the 18-Crown-6 Complex of Potassium Fluoride with Organic Substrates in Aprotic Organic Solvents  
*J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 2250-2252.

- [91] B.K. Chun, C.K. Chu  
Asymmetric Synthesis of Carbocyclic C-Nucleoside 9-Deazaaristeromycin  
*Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 3309-3312.
- [92] M.-I. Lim, W.-Y. Ren, B.A. Otter, R.S. Klein  
Synthesis of 9-Deazaguanosine and Other New Pyrrolo[3,2-d]pyrimidine C-Nucleosides  
*J. Org. Chem.* **48** (1983) 780-788.
- [93] M.-I. Lim, R.S. Klein, J.J. Fox  
Synthesis of the Pyrrolo[3,2-d]pyrimidine C-Nucleoside Isostere of Inosine  
*Tetrahedron Lett.* **21** (1980) 1013-1016.
- [94] H. Jeong, M.S. Kim, N.K. Park, B.T. Kim  
Reactions of 1-Substituted 2,2-Difluorostyrene with Dianions of  $\beta$ -Enamino Ketones  
*Bull. Korean Chem. Soc.* **18** (1997) 135-136.
- [95] Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis  
Verlag John Wiley & Sons  
Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore 1995
- [96] J.F. Milligan, S.H. Krawczyk, S. Wadwani, M.D. Matteucci  
An Anti-Parallel Triple Helix Motif with Oligodeoxynucleotides Containing 2'-Deoxyguanosine and 7-Deaza-2'-deoxyxanthosine  
*Nucleic Acid Res.* **21** (1993) 327-333.
- [97] H.V.L. Potter, F. Eckstein  
Stereospecifically  $^{18}\text{O}$ -Labelled Deoxynucleoside Phosphate Block for Incorporation into an Oligonucleotide  
*Nucleic Acid Res.* **20** (1983) 7087-7103.
- [98] K. Dax, W. Wolflehner, H. Wiedmann  
Eine einfache Entritylierungsmethode  
*Carbohydrate Res.* **65** (1978) 132-138.
- [99] D.M. Brown, D.B. Parihar, C.B. Reese, Sir A. Todd  
Deoxynucleosides and Related Compounds Part VII  
*J. Chem. Soc.* (1958) 3035-3038.
- [100] M.J. Robin, R. Mengel, R.A. Jones, Y. Fouron  
Nucleic Related Compounds. 22 Transformation of Ribobnucleoside 2',3'-O-ortho-Esters into Halo, Deoxy and Epoxy Sugar Nucleosides Using Acyl Halides. Mechanism and Structure of Products  
*J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 8204-8213.
- [101] M.J. Robins, J.R. McCarthy Jr., R.A. Jones, R. Mengel  
Nucleic Acid Related Compounds.5. Transformation of Formycin and Tubercidin into 2'- and 3'-Deoxynucleosides  
*Can. J. Chem.* **51** (1973) 1313-1321.
- [102] M.J. Robins, P. Sporns, W.H. Muhs  
Nucleic Acids Related Compounds. 29.  
*Can. J. Chem.* **57** (1979) 274-282.

- [103] M.J. Robins, P. Sporns unpublished results
- [104] M. Smith, G.I. Drummond, H.G. Khorana  
Cyclic Phosphates IV. Ribonucleoside-3',5'-Cyclic Phosphates  
*J. Am. Chem. Soc.* **83** (1961) 698-706.
- [105] Y. Ishido, N. Sakairi, K. Okazaki, N. Nakazaki  
Partial Protection of Carbohydrate Derivates Part 4. Regioselective 2'-O-Deacylation of Fully Acylated Purine and Pyrimidine Ribonucleosides with Hydroxylaminium Acetate  
*J. Chem. Soc. PT* (1980) 563-573.
- [106] W.T. Markiewicz  
Tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3'- and 5'-Hydroxyl Functions of Nucleosides  
*J. Chem. Res.* (1979) 24-25.
- [107] E.J. Corey, A. Venkateswarlu  
Protection of Hydroxyl Groups as tert.-Buthyldimethylsilyl Derivates  
*J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 6190-6191.
- [108] J.N. Kremsky, N.D. Sinha  
Facile Protection of Silyl Nucleosides with Potassium Fluorid / 18-Crown-6  
*Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **4** (1994) 2171-2174.
- [109] D.H.R. Barton, S.W. McCombie  
A New Method for the Deoxygenation of Secondary Alcohols  
*J. Chem. Soc. PT I* (1975) 1574-1585.
- [110] E.M. Acton, R.N. Goerner, H.S. Uh, K.J. Ryan, W.D. Henry, C.E. Cass, G.A. LePage  
Improved Antitumor Effects in 3'-Branched Homologues of 2'-Deoxythio-guanosine. Synthesis and Evaluation of Thioguanine Nucleosides of 2,3-Dideoxy-3-(hydroxymethyl)-D-erythro-penta-furanose  
*J. Med. Chem.* **22** (1979) 518-525.
- [111] D.H. Barton, R. Subramanian  
Reactions of Relevance to the Chemistry of Aminoglycoside Antibiotics. Part 7. Conversion of Thiocarbonates into Deoxysugars  
*J. Am. Soc. PT I* (1977) 1718-1723.
- [112] J.R. Rasmussen, C.J. Slinger, R. J. Kordish, D.D. Newman-Evans  
Synthesis of Deoxy Sugars. Deoxygenation by Treatment with N,N-Thiocarbonyl-diimidazole / Tri-n-butylstannane  
*J. Org. Chem.* **46** (1981) 4843-4846.
- [113] M.J. Robins, J.S. Wilson, F. Hansske  
Nucleic Acid Related Compounds.42. A General Procedure for the Efficient Deoxygenation of Secondary Alcohols. Regiospecific and Stereoselective Conversion of Ribonucleosides to 2'-Deoxynucleosides  
*J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 4059-4965.
- [114] P.K. Sharma, V. Nair  
Synthesis of 3'-Trifluoromethyl Nucleosides as Potential Antiviral Agents  
*Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **19** (2000) 757-774.

- [115] A.E.A. Hassan, A.T. Shortnacy-Fowler, J.A. Montgomery, J.A. Secrist III  
A Convenient Synthesis of 2'-Deoxy-2-Fluoroadenosine. A Potential Prodrug for Suicide Gene Therapy  
*Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **19** (2000) 559-565.
- [116] G.C. Negin, J. Dauvergne, A. Burger, J.-F. Biemann  
Synthesis of a C-8 Modified Adenosine Analogue as a Potential Mechanistic Probe for Ribonucleotide Reductases  
*Nucleosides & Nucleotides* **18** (1999) 611-612.
- [117] E. Nandanar, S.-Y. Jang, S. Moro, H.O. Kim, M.A. Siddiqui, P. Russ, U.E. Marquez, R. Busson, P. Herdewijn, T.K. Harden, J.I. Boyer, K.A. Jakobsen  
Synthesis, Biological Activity and Molecular Modeling of Ribose-Modified Deoxyadenosine Bisphosphate Analogues as P2Y Receptor Ligands  
*J. Med. Chem.* **43** (2000) 829-842.
- [118] T.S. Rao, A.F. Lewis, T. Schmalz Hill, G.R. Revankar  
Incorporation of 2'-Deoxy-9-deazaguanosin and 2'-Deoxy-7-deaza-6-thioguanosine into G-Rich Oligodeoxyribonucleotides  
*Nucleosides & Nucleotides* **1** (1995) 1-12.
- [119] M.J. Robins, J.S. Wilson  
Smooth and Efficient Deoxygenation of Secondary Alcohols. A General Procedure for the Conversion of Ribonucleosides to 2'-Deoxynucleosides  
*J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 932-933.
- [120] J. Singh, D.S. Wise, L.B. Townsend  
Reduction of 2'-O-[(Imidazol-1-yl)thiocarbonyl]-3',5'-O-(tetraisopropyl-disiloxanyl)pseudouridine  
L.B. Townsend, R.S. Tipson *Nucleic Acid Chemistry Part 4*  
J. Wiley & Sons, Inc. New York 1991, 96-99.
- [121] T.S. Rao, A.F. Lewis, R.H. Durland, G.R. Revankar  
A Total Synthesis of 2'-Deoxy-9-deazaguanosine and its Incorporation into Triple Helix Forming Oligodeoxyribonucleotides with Antiparallel Motif  
*Tetrahedron Lett.* **34** (1993) 6709-6712.
- [122] K.L. Agarwal, A. Yamazaki, P.J. Cashion, H.G. Khorana  
*Angew. Chem.* **84** (1972) 489.
- [123] V. Kohli, H. Blöcker, H. Köster  
*Tetrahedron Lett.* **21** (1980) 2683-2686.
- [124] H. Köster, K. Kulikowski, T. Liese, W. Heikens, V. Kohli  
N-Acyl Protection Groups for Deoxynucleosides  
*Tetrahedron* **37** (1981) 363-369.
- [125] N.D. Sinha, P. Davis, N. Usman, J. Perez, R. Hodge, J. Kremsky, R. Casale  
Labile Exocyclic Amine Protection of Nucleosides in DNA, RNA and Oligonucleotide Analog Synthesis Facilitating N-Deacylation, Minimizing Depurination and Chain Degradation  
*Biochimie* **75** (1993) 13-23.

- [126] G.S. Ti, B.L. Gaffney, R.A. Jones  
Transient Protection: Efficient One-Flask Synthesis of Protected Deoxynucleosides  
*J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 1316-1319.
- [127] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H.G Khorana  
Studies on Polynucleotides XXIV The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides  
*J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 3821-3827.
- [128] S.A. Narang, R. Brousseau, H.M. Hsiung, J.J. Michniewicz  
Chemical Synthesis of Deoxyoligonucleotides by the Modified Triester Method  
*Methods Enzym.* **65** (1980) 613-614.
- [129] M.J. Robins, J.S. Wilson  
Regiospecific and Stereoselective 2'-Deoxygenation of a Ribonucleoside  
L.B. Townsend, R.S. Tipson *Nucleic Acid Chemistry Part 4*  
J. Wiley & Sons, Inc. New York 1991, 194-200.
- [130] J.G. Moffatt  
A General Synthesis of Nucleoside-5'-Triphosphates  
*Can. J. Chem.* **42** (1964) 599-604.
- [131] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi  
A Novel Method for Phosphorylation of Nucleosides to 5'-Nucleotides  
*Tetrahedron Lett.* **50** (1967) 5065-5068.
- [132] D.E. Hoard, D.G. Ott  
Conversion of Mono- and Oligodeoxyribonucleotides to 5'-Triphosphates  
*J. Am. Chem. Soc.* **87** (1965) 1785-1788.
- [133] G. Tusa, J.K. Reed  
The Synthesis of Cyclonucleotides with Fixed Glycosidic Bond Linkages as Putative Antagonists for P2-Purinergic Receptors  
*Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **19** (2000) 805-813.
- [134] M. Bretner, D. Beckett, R.K. Sood, D.M. Baldisseri, R.S. Hosmane  
Substrate / Inhibition Studies of Bacteriophage T7 RNA Polymerase with the 5'-Triphosphate Derivative of a Ring-Expanded (Fat) Nucleoside Possessing Potent Antiviral and Anticancer Activities  
*Bioorg. & Med. Chem.* **7** (1999) 2931-2936.
- [135] W.E. Ladner, G.M. Whitesides  
Enzymatic Synthesis of dATP Using DNA as Starting Material  
*J. Org. Chem.* **50** (1985) 1076-1079.
- [136] T. Brosette, A. Valleix, L. Goujon, C. Creminon, J. Grassi, C. Mioskowski, L. Lebeau  
Synthesis of Non-Hydrolysable AZT-Triphosphate Analogue Designed for the Protection of Anti-AZT-TP Antibodies  
*Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 3391-3394.
- [137] J. Ludwig, F. Eckstein  
Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1-Thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates Using 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one  
*J. Org. Chem.* **54** (1989) 631-635.

- [138] J.E. Marugg, M. Tromp, E. Kuyl-Yeheskiely, G.A. van der Marel, J.H. van Boom  
A Convenient and General Approach to the Synthesis of Properly Protected d-Nucleoside-3'-Hydrogen Phosphonates via Phosphite Intermediates  
*Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 2661-2664.
- [139] J. Ludwig, F. Eckstein  
Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1,3-Dithiotriphosphates and 5'-O-(1,1-Dithiotriphosphates)  
*J. Org. Chem.* **56** (1991) 1777-1783.
- [140] K. He, K.W. Porter, A. Hasan, J.D. Briley, B. Ramsay Shaw  
Synthesis of 5-Substituted 2'-Deoxycytidine 5'-( $\alpha$ -P-borano)triphosphates, their Incorporation into DNA and Effects on Exonucleases  
*Nucleic Acid Res.* **27** (1999) 1788-1794.
- [141] S. Lutz, P. Burgstaller, S.A Benner  
An In Vitro Screening Technique for DNA Polymerases that Can Incorporate Modified Nucleotides. Pseudothymidine as a Substrate for Thermostable Polymerases  
*Nucleic Acid Res.* **27** (1999) 2792-2798.
- [142] E. Trevisiol, E. Defrancq, J. Lhomme, A. Laayoun, P. Cros  
Synthesis of Nucleoside Triphosphates that Contain an Aminooxy Function for „Post-Amplification“ Labelling  
*Eur. J. Org. Chem.* (2000) 211-217.
- [143] J. Matulic-Adamic, A.T. Daniher, A. Karpeisky, P. Haeberli, D. Sweedler, L. Beigelman  
Functionalized Nucleoside 5'-Triphosphates for In Vitro Selection of New Catalytic Ribonucleic Acids  
*Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **10** (2000) 1299-1302.
- [144] A. Braun, D.P. Littel, D. Reuter, B. Müller-Mysok, H. Köster  
Improved Analysis of Microsatellites Using Mass Spectrometry  
*Genomics* **46** (1997) 18-23.
- [145] H. Köster, D. van den Boom, A. Braun, A. Jacobs, C. Jurinke, D.P. Littel, K. Tang  
DNA Analysis by Mass Spectrometry: Applications in DNA Sequencing and DNA Diagnostics  
*Nucleosides & Nucleotides* **16** (1997) 563-571.
- [146] A. Braun, D.P. Little, H. Köster  
Detecting CFTR Gene Mutations Using Primer Oligo Base Extension and Mass Spectrometry  
*Cin. Chem.* **43** (1997) 1151-1158.
- [147] D.P. Little, A. Braun, B. Darnhofer-Demar, H. Köster  
Identification of Apolipoprotein E Polymorphisms Using Temperature Cycled Primer Oligo Base Extension and Mass Spectrometry  
*Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **35** (1997) 545-548.
- [148] D.P. Little, A. Braun, B. Darnhofer-Demar, A. Frilling, Y. Li, R.T. Jr. McIver, H. Köster  
Detection of RET Proto-Oncogene Codon 635 Mutations Using Mass Spectrometry  
*J. Mol. Med.* **75** (1997) 745-750.

- 
- [149] S. Müller, D. van den Boom, D. Zirkel, H. Köster, F. Berthold, M. Schwab, M. Westphal, W. Zunkeller  
Retention of Imprinting of the Human Apoptosis-Related Gene TSSC3 in Human Brain Tumors  
*Human Mol. Genetics* **9** (2000) 757-763.
- [150] F. Sanger  
Sequences, Sequences and Sequences  
*Annu. Rev. Biochem.* **57** (1988) 1-28.
- [151] A.J. Smith  
DNA Sequence Analysis by Primed Synthesis  
*Methods Enzymol.* **65** (1980) 560-580.
- [152] S. Tabor, C.C. Richardson  
A Single Residue in DNA Polymerases of Escherichia Coli DNA Polymerase I Family is Critical for Distinguishing Between Deoxy and Dideoxyribonucleotides  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995) 6339-6343.
- [153] T. Hultman, S. Stahl, E. Hornes, M. Uhlen  
*Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 4937-4946.
- [154] J.J. Tsai-Wu, H.-T. Su, W.-H. Tang, C.-H. H. Wu  
Preparation of Heteroduplex DNA Containing a Mismatch Base Pair with Magnetic Beads  
*Anal. Biochem.* **275** (1999) 127-129.
- [155] X. Tong, L. Smith  
Solid-Phase Methods for the Purification of DNA Sequencing Reactions  
*Anal. Chem.* **64** (1992) 2672-2677.
- [156] K. Tang, D. Fu, S. Kötter, R.J. Cotter, C. R. Cantor, H. Köster  
Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation Mass Spectrometry of Immobilized Duplex DNA Probes  
*Nucleic Acids Res.* **23** (1995) 3126-3131.
- [157] T.A. Shaler, J. N. Wickham, K.A. Sannes, K.J. Wu, C.H. Becker  
Effect on Impurities on the Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation Mass Spectra of Single-Stranded Oligonucleotides  
*Anal. Chem.* **68** (1996) 576-579.
- [158] Cocuzza et al. United States Patent 1996 Ser. No. 05/484,701
- [159] C. Jurinke, D. van den Boom, H. Köster  
A Method for Dissociating Biotin Complexes  
US Patent Application 1996 Ser. No. 08/649,876
- [160] C. Jurinke, D. van den Boom, V. Collazo, A. Lüchow, A. Jacobs, H. Köster  
Recovery of Nucleic Acids from Immobilized Biotin-Streptavidin-Complexes Using Ammonium Hydroxid and Applications in MALDI-TOF-MS  
*Anal. Cham.* **69** (1997) 904-910.

- 
- [161] E. Nordhoff, R. Cramer, M. Karas, F. Hillenkamp, F. Kirekepar, K. Kristiansen, P. Roepstorff  
Ion Stability of Nucleic Acids in Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionisation Mass Spectrometry  
*Nucleic Acids Res.* **21** (1993) 3347-3357.
- [162] K.B. Mullis  
Eine Nachtfahrt und die Polymerasekettenreaktion  
*Spektrum der Wiss.* **6** (1990) 60-67.
- [163] R.K. Saiki, S. Scharf, F. Taloon, K.B. Mullis, G.T. Horn, H. Erlich, N. Arnheim  
Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia  
*Science* **230** (1985) 1350-1354.
- [164] C. Newton, A. Graham  
PCR 1994 Spectrum Verlag Heidelberg
- [165] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich  
Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA-Polymerase  
*Science* **239** (1988) 487-491.
- [166] Seminar molekulare Lebensmittelanalytik 1999, Hamburg, Fa. Perseptiv Biosystems
- [167] U.B. Gyllenstein, H.A. Erlich  
Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988) 7652-7656.
- [168] C. Jurinke, D. van den Boom, H. Köster  
Asymmetric PCR Improves Streptavidin-Biotin Based Purification of PCR Products Prior to MALDI-TOF Mass Spectrometric Analysis  
*Rapid Commun. Mass Spec.* **12** (1998) 50-52.
- [169] C. Siegert  
Dissertation, Universität Hamburg 1999
- [170] M.J. Lutz, J. Horlacher, S.A. Benner  
Recognition of a Non-Standard Base Pair by Thermostable DNA-Polymerase  
*Bioorg. & Med. Chem. Let.* **8** (1998) 1149-1152.
- [171] J. Horlacher, M. Hottiger, V.N. Podust, U. Hübscher, S.A. Benner  
Recognition by Viral and Cellular DNA-Polymerases of Nucleosides Bearing Bases With Non-Standard Hydrogen Bonding Patterns  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995) 9329-9333.
- [172] M.J. Lutz, H.A. Held, M. Hottiger, U. Hübscher, S.A. Benner  
Differential Discrimination of DNA Polymerases for Variants of the Non-Standard Nucleobase Pair Between Xanthosine and 2,4-Diaminopyridine, Two Compounds of an Expanded Genetic Alphabet  
*Nucleic Acids Res.* **24** (1996) 1308-1313.

- [173] F. Marciacq, S. Sauvaigo, J.-P. Issartel, J.-F. Mourett, D. Molko  
Synthesis and Enzymatic Incorporation of Morpholino Thymidine-5-Triphosphate in DNA Fragments  
*Tetrahedron Let.* **40** (1999) 4673-4676.
- [174] F. Hill, D. Loakes, C.L. Smith, D.M. Williams, D.M. Brown  
Synthesis and Polymerase Incorporation Properties of a Tricyclic Pyrrolopyrimidine Related to  
N<sup>6</sup>-Hydroxy-2'-desoxyadenosine  
*Nucleosides & Nucleotides* **18** (1999) 573-574.
- [175] F. Hill, I.R. Felix, M.G. McDougall, S. Kumar, D. Loakes, D.M. Brown  
Random Mutagenesis Using 2-Amino-9-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)purine-5'-triphosphate and  
Polymerase Chain Reaction  
*Nucleosides & Nucleotides* **18** (1999) 2677-2684.
- [176] D.M. Perrin, T. Garestier, C. Helene  
Expanding the Catalytic Repertoire of Nucleic Acid Catalysts: Simultaneous Incorporation of Two  
Modified Deoxyribonucleoside Triphosphates Bearing Ammonium and Imidazolyl Functionalities  
*Nucleosides & Nucleotides* **18** (1999) 377-391.
- [177] V. Collazo  
Dissertation in Vorbereitung
- [178] C. Matthies  
Dissertation in Vorbereitung
- [179] F. Seela, A. Kehne  
Palindromic Octa- and Dodecanucleotides Containing 2'-Deoxytubercidin: Synthesis, Hairpin  
Formation and Recognition by the Endodeoxyribonuclease Eco RI  
*Biochemistry* **26** (1987) 2232-2238.
- [180] L.W. McLaughlin, F. Benseler, E. Graeser, N. Piel S. Scholtissek  
Effects of Functional Group Changes in the Eco RI Recognition Site on the Cleavage Reaction  
Catalyzed by the Endonuclease  
*Biochemistry* **26** (1987) 7238-7245.
- [181] C.A. Brennan, M.D. van Cleve, R. I. Gumport  
The Effects of Base Analogue Substitutions on the Cleavage by the Eco RI Recognition Sequences  
*J.Bio.Chem.* **261** (1986) 7270-7278.
- [182] A. Flies, H. Wolfes, F. Seela, A. Pingoud  
*Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 11781-11793.
- [183] P.C. Newman, V.U. Nwosu, D.M. Williams, R. Cosstick, F. Seela, B.A. Connolly  
Incorporation of a Complete Set of Desoxyadenosine and Thymidine Analogues Suitable for Study of  
Protein Nucleic Acid Interaction into Oligonucleotides. Application to the Eco RIV Restriction  
Endonucleases and Modification Methylase  
*Biochemistry* **29** (1990) 9891-9901.
- [184] S.K. Grime, R.L. Martina, B.L. Holaway  
Inhibition of Restriction Enzyme Cleavage of DNA Modified with 7-Deaza-dGTP  
*Nucleic Acids Res.* **19** (1991) 2791.

- 
- [185] M.J. Guo, S. Hildebrand, C.J. Leuman, L.W. McLaughlin, M.J. Waring  
Inhibition of DNA-Polymerase Reaction by Pyrimidine Nucleotide Analogues Lacking the  
2-Ketogroup  
*Nucleic Acid Res.* **26** (1998) 1863-1869.
- [186] C. Siegert  
Diplomarbeit, Universität Hamburg, 1995
- [187] E.C. Taylor, B. Hu  
A Fischer-Indol Approach to Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines  
*Heterocycles* **43** (1996) 323-338.
- [188] M.-I. Lim, W.-Y. Ren, B.A. Otter, R.S. Klein  
Synthesis of 9-Deazaguanosine and Other New Pyrrolo[3,2-d]pyrimidine C-Nucleosides  
*J. Org. Chem.* **48** (1983) 780-788.
- [189] N.S. Girgis, M.A. Michael, D.F. Smee, H.A. Alaghamandan, R.K. Robins, H.B.  
Cottam  
Direct C-Glycosylation of Guanine Analogues: The Synthesis and Antiviral Activity of Certain 7- and  
9-Deazaguanosine C-Nucleosides  
*J. Med. Chem.* **33** (1990) 2750-2755.
- [190] J. Ludwig  
A New Route to Nucleoside-5'-triphosphates  
*Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* **16** (1981) 131-133.
- [191] M.J. Lutz, D.W. Will, G. Breipohl, S.A. Benner, E. Uhlmann  
Synthesis of a Monocharged Peptid Nucleic Acid (PNA) Analog and Its Recognition as Substrat by  
DNA Polymerases  
*Nucleosides & Nucleotides* **18** (1999) 393-401.
- [192] R.S. Cha, W.G. Tilly  
*PCR Methods Applic.* **3** (1993) 18-29.
- [193] P. Mattila, J. Ronka, T. Tenkanen, K. Pikanen  
*Nucleic Acids Res.* **19** (1991) 4967-4973.
- [194] Information des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech)
- [195] H. Li, K. Porter, F. Huang, B.R. Shaw  
Boron-Containing Oligodesoxyribonucleotide 14mer Duplex: Enzymatic Synthesis and Melting  
Studies  
*Nucleic Acids Res.* **23** (1995) 4495-4501.
- [196] F. Eckstein, B.A. Connolly, B.V.L. Potter  
Cleavage of Phosphorothioate-Containing Oligonucleotides and DNA by Restriction Endonucleases  
Chemical Synthesis in Molecular Biology  
VCH Verlag Weinheim New York **8** (1987).

- 
- [197] L. Mao, M.P. Schoenberg, M. Scicchitano, Y.S. Erozan, A. Merlo, D. Schwab, D. Sidransky  
Molecular Detecting of Primary Bladder Cancer by Microsatellite Analysis  
*Science* **271** (1996) 659-662.
- [198] C. Dig, S. Faure, C. Fizames, D. Samson, N. Drouot, A. Vignal, P. Millasseau, S. Marc, J. Hazan, E. Seboun, M. Lathrop, G. Gyapay, J. Morissette, J. Weissenbach A  
Comprehensive Genetic Map of the Human Genom Based on 5,264 Microsatellites  
*Nature* **380** (1996) 152-154.
- [199] A. Jakob  
*Dissertation* 1999 Uni Hamburg
- [200] U.T. Bornscheuer  
Gerichtete Evolution von Enzymen  
*Angew. Chem.* **110** (1998) 3285-3288.
- [201] P.Önnerfjord, J. Nilsson, L. Wallmann, T. Laurell, G. Marko-Varga  
Picoliter Sample Preparation in MALDI-TOF-MS Using a Micromachined Silicon Flow-Through Dispenser  
*Anal. Chem.* **69** (1997) 4540-4546.
- [202] M. U. Kopp, A.J. de Mello, A. Manz  
Chemical Amplification: Continous-Flow PCR on a Chip  
*Science* **280** (1998) 1046-1048.
- [203] H. Zorbas  
Minatur-Durchfluß-PCR: Ein Durchbruch?  
*Angew. Chem.* **111** (1999) 1121-1124.
- [204] K.C. Hung, H. Ding, B. Guo  
Use of Poly(tetrafluorethylene)s as a Sample Support for the MALDI-TOF Analysis of DNA  
*Anal. Chem.* **71** (1999) 518-521.
- [205] K.C. Hung, H. Rashidzadeh, Y. Wang, B. Guo  
Use of Paraffin Wax Film in MALDI-TOF Analysis of DNA  
*Anal. Chem.* **70** (1998) 3088-3093.
- [206] H. Köster  
DNA Sequencing by Mass Spectrometry via Exonuclease Degradation  
*US Patent* Ser. No. 5,872,003 issued 1999 to Sequenom Inc.
- [207] E. Zubritsky  
SNP Mining  
*Anal. Chem.* **111** (1999) 683A.
- [208] T.J. Griffin, J.G. Hall, J.R. Prudent, L.M. Smith  
Direct Genetic Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation Mass Spectrometry  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** (1999) 6301-6306.

- [209] D. Foernzler  
SNPs: kleine genetische Varianten - große medizinische Wirkung  
*Nachr. aus der Chemie* **48** (2000) 1342-1347.
- [210] D. van den Boom, C. Jurinke, S. Higgins, T. Becker, H. Köster  
Mass Spectrometric DNA Diagnostics  
*Nucleosides & Nucleotides* **17** (1998) 2157-2164.
- [211] A. Kerk  
DNA-Chips: Diagnostik vom Fließband  
*Nachr. Chem, Tech. Lab.* **47** (1999) 777-779.
- [212] K. Ullrich, A. Hinnen, H. Saluz  
Bedeutung der Biochips für den Weltmarkt  
*Nachr. Chem. Tech. Lab.* **47** (1999) 780-781.

## IX. Anhang

Stoffbezeichnung	Gef.- Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F	11	9-17-23.2-33
Acetonitril	F,T	11-23/24/25	16-27-45
Ammoniaklösung 32 %	C,N	34-50	26-36/37/39-45-61
Azobis(2-methyl)propionitril	E,Xn	2-11-20/22	39-41-47
Benzoylchlorid	C	34	26-45
Bis(dimethylamino)tert.-butoxymethan		10-36/37/38	16-27-44
Bortrifluorid-Methanol-Lösung 20 %	F,T	11-23/25-34	16-26-36/37/39-45
Chloracetonitril	T	10-23/24/25	45
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Diazabicyclononen	C	34	26-36-/37/39-45
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan	C	34	26-36/37/39-45
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	T	22-24-41-43	24-26-37/39-45
N,N'-Dimethoxypropan	F	11	
Dimethoxytritylchlorid			22-24/25
Dimethylaminopyridin	T	25-36/38	45
N,N'-Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Ethylacetat	F	11	16-23.2-29-33
Formamidinacetat	Xi	36/37/38	
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Isobuttersäureanhydrid	C	21/22	
Kaliumfluorid	T	23/24/25	26-45
Lithiumdiisopropylamid-Lösung	C,F	11-14-34	9-16-23.2-26-36/37/38-45
Methanol	T,F	11-23/25	7-16-24-45
Methoxyessigsäure	T	60-61-E22-34	53-26-36/37/39-45
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natronlauge	C	35	26-37/39-45
p-Toluolsulfonsäure	Xi	36/37/38	26-37
Petrolether	F,Xn	11-52/53-65	9-16-23.2-24-33-62
Phosphorylchlorid	C	34-37	7/8-26-45
Pyridin	Xn,F	11-20/21/22	26-28.1
Salzsäure 32 %	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure 96 %	C	35	26-30-45
Tetrahydrofuran	Xi,F	11-19-36/37	16-29-33
Tetramethylsilan	F+	12	9-16-29-43.3
Toluol	Xn,F	11-20-	16-25-29-33
Tributylzinnhydrid	T	21-25-36/38-48/23/25	35-36/37/39-45
Triethylamin	F,C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Triethylphosphat	Xn	22	25
Trifluoressigsäure	C	20-35	9-26-27-28.1-45
Trimethylchlorsilan	F,C	11-14-35-37	16-26-36/37/39-45
Tritylchlorid	Xi	38	

Organische halogenfreie bzw. halogenhaltige Lösungsmittel wurden ebenso wie Feststoffe in gesonderte Sammelbehälter gegeben. Saure bzw. alkalische Lösungen wurden neutralisiert und entsprechend der Lösungsmittelart entsorgt.

# Lebenslauf

## ***Persönliche Daten***

*Name* Silke Atrott  
*geboren am* 09. Mai 1971 in Hamburg  
*Familienstand* ledig

## ***Schulbildung***

08/1977 - 07/1981 Grundschule Sinstorf, Hamburg  
08/1981 - 06/1990 Gymnasium Sinstorf, Hamburg  
06/1990 Abitur

## ***Berufsausbildung***

08/1987 - 01/1991 Ausbildung am Gymnasium Altona und an der staatlichen Gewerbeschule für Chemie, Pharmazie und Agrarwissenschaft, Hamburg  
Abschluß : Chemisch-technische Assistentin

## ***Hochschulstudium***

04/1991 Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Hamburg  
09/1993 Diplomvorprüfung  
05/1996 Diplomhauptprüfung, Wahlpflichtfach Biochemie  
07/1996 - 04/1997 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Köster  
05/1997 Beginn der vorliegenden Dissertation

## ***Promotionsstellen***

10/1997 - 12/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Organische Chemie  
01/2000 - 03/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des BMBF-Projektes „Entwicklungen zum Einsatz der MALDI-TOF MS in der genomischen Analyse und Diagnostik“

## *Danksagung*

Den Mitgliedern des Arbeitskreises und den Mitarbeitern der Firma Sequenom danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich besonders bei Frau Dr. N. Rogmann und Herrn Dipl. Chem. D. Otzen für die vielen aufmunternden Gespräche und anregenden Ideen.

Mein Dank gilt meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung und ihre große Anteilnahme während meiner gesamten Ausbildung.

Ebenso danke ich meinem Freund Hendrik ganz herzlich für seine Hilfe bei allen großen und kleinen Problemen während der ganzen Zeit.

Hiermit erkläre ich, Silke Atrott, diese Arbeit selbständig angefertigt und keine weiteren als die genannten Hilfsmittel verwendet zu haben. Andere Promotionsversuche als die hier vorliegende Arbeit mit dem Titel „ 2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin : Ein optimierter Baustein für die MALDI-TOF Massenspektrometrie und biochemische DNA-Analytik “ habe ich bisher nicht unternommen.

Hamburg, Februar 2001

Silke Atrott