

**Synthese von C8-Arylamin-
modifizierten
2'-Desoxyguanosin-
Phosphoramiditen und deren Einbau
in Oligonucleotide**

Dissertation


zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von

Sarah Krüger

vorgelegt dem Department Chemie
der Universität Hamburg

Oktober 2011



**Synthese von C8-Arylamin-
modifizierten
2'-Desoxyguanosin-
Phosphoramiditen und deren Einbau
in Oligonucleotide**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von

Sarah Krüger

vorgelegt dem Department Chemie
der Universität Hamburg

Oktober 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Meier in der Zeit von April 2008 bis Oktober 2011 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Francke

Datum der Disputation: 09.12.2011

*Meinem Partner Jens-Christian Bruns und
meiner Mutter Maura Pallaoro Krüger*

*Ein Ort ist immer so gut,
wie die Menschen die du dort kennst.*

Ich danke Euch!

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg in der Zeit von April 2008 bis Oktober 2011 angefertigt.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Meier für die interessante Themenstellung im Bereich des von mir bevorzugt gewünschten Themengebietes. Ferner danke ich ihm für die Freiheiten bei der Bearbeitung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die gute Betreuung während der Arbeit und hilfreichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Francke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Herrn Prof. Dr. M. Fischer und Herrn Dr. T. Hackl für die Teilnahme am Dissertationskolloquium.

Weiterhin möchte ich allen ehemaligen und aktiven Mitgliedern des Arbeitskreises danken.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dipl.-Chem. Annika Mergner und Frau Dr. Dipl.-Chem. Tanja Zismann für ihre liebevolle Unterstützung, sowohl innerhalb als auch außerhalb des Instituts. Ich werde stets mit euch in Freundschaft verbunden sein.

Meinem „Vorgänger“ Dr. Dipl.-Chem. Nicolas Böge, danke ich für seine stete thematische Hilfsbereitschaft, guten Ideen und Ratschläge.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Dipl.-Chem. Zita Szombati für den geteilten Oligonucleotid-„kampf“ und die gemeinsame Zeit während der Promotion.

Ein besonderer Dank gilt den zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten, welche im Rahmen ihres Studiums experimentelle Arbeiten in den jeweiligen Praktika für mich durchgeführt haben.

Herrn Dr. V. Sinnwell, Herrn Dr. T. Hackl, Herrn Dr. E.T.K. Haupt und ihren Mitarbeitern möchte ich für die Messung zahlreicher NMR-Spektren danken.

Herrn Dr. S. Francke, Frau D. Gellert, Frau C. Christ und Frau G. Graack möchte ich für die Messung zahlreicher FAB-, ESI-, EI- und HPLC-MS-Massenspektren danken.

Besonders dankbar bin ich meinen Kooperationspartnern am DESY (Hamburg). Allen voran Herrn Dipl.-Chem. Dominik Oberthür für die Unterstützung bei der Kristallisation der Oligonucleotide.

Ebenso wie der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. U. Hahn und JProf. A. Rentmeister. Hervorzuheben hier insbesondere Frau Dipl.-Biochem. Anna Rath für die phantastische Einarbeitung in die Grundlagen der präparativen Biochemie. Frau Dipl.-Biochem. Kristina Szameit für die „Welt der Sequenzier-Gele“. Frau Dipl.-Biochem. Kirstin Gerstle für die Hilfe beim Durchbruch des „dNTP-Problems“, sowie Frau Margot Binnewies für ihr stets hilfsbereites und unterstützendes Wesen.

Frau Dipl.-Chem. Annika Mergner, Frau Dipl.-Chem. Katrin Seelhorst, Frau Dr. Dipl.-Chem. Tanja Zismann, Herrn Dr. Dipl.-Chem. Nicolas Böge und Herrn Dr. Dipl.-Chem. Edwain Hander Rios Morales danke ich für die intensive und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Meiner „kleinen Schwester“ Frau Dipl.-Chem. Annika Mergner möchte ich dafür danken, dass sie immer für mich da ist. Sissi du bist die Beste.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, insbesondere meinem Partner Jens-Christian Bruns und meiner Mutter Maura Pallaoro Krüger, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Euch widme ich diese Arbeit!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Symbole	III
Theoretischer Teil	
1. Einleitung	1
2. Kenntnisstand	5
2.1 Metabolismus aromatischer Amine	5
2.2 Reaktion ultimaler Carcinogene mit der DNA.....	7
2.3 Mechanismus der Adduktbildung <i>in vivo</i>	9
2.4 Nachweis der Carcinogenität	10
2.5 Chemische Synthese der C8-Addukte am 2'-Desoxyguanosin	11
2.6 Synthese von Oligonucleotiden.....	19
2.7 Synthese und Eigenschaften Arylamin-modifizierter Oligonucleotide	22
2.8 Struktur C8-[(N-Acetyl)-]arylamin-modifizierter Oligonucleotide	23
2.9 Antisense-Oligonucleotide	25
3. Aufgabenstellung	35
4. Resultate und Diskussion	37
4.1 Synthese der C8-(N-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin- Phosphoramidite zur Oligonucleotidsynthese	37
4.2 Synthese des N ² -Formamidin-8-(N-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguansins über eine metallkatalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung	110 69
4.3 Synthese der C8-NH-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin- Phosphoramidite zur Oligonucleotidsynthese	77
4.4 Synthese der C8-NH- und C8-(N-Acetyl)-arylamin-modifizierten Oligonucleotide	83
4.5 Bestimmung der Schmelztemperaturen (T _m -Werte).....	92
4.6 Messung des circularen Dichroismus (CD)	102
4.7 Enzymabbau mittels des Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	109

4.8 Primer-Verlängerungs-Studien.....	116
4.9 Röntgenstrukturanalyse der DNA.....	128
5.0 Pro-Oligonucleotide.....	128
5.1 Synthese des <i>iso</i> Butyryloxybenzyl-maskierten Phosphoramidits 61	141
5.2 Synthese des modifizierten Oligonucleotids.....	155
6. Zusammenfassung	162
7. Summary	168
8. Ausblick.....	170
<i>Experimenteller Teil</i>	
9. Allgemeines	172
9.1 Lösungsmittel.....	172
9.2 Reagenzien und Enzyme.....	174
9.3 Puffer, Lösungen und Medien.....	176
9.4 Chromatographie und Geräte.....	178
9.5 Synthese von Oligonucleotiden.....	184
9.6 Analytik der Oligonucleotide.....	185
9.7 Methoden.....	187
10. Synthesen	192
10.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	192
10.2 Synthese der C8-[(<i>N</i> -Acetyl)-]arylamino-Addukte.....	195
10.3 Oligonucleotide.....	263
10.4 Synthesen der Pro-Nucleotide.....	271
11. Gefahrstoffverzeichnis	278
12. Literatur.....	281
13. Anhang	296
14. Persönliches	305

Abkürzungen und Symbole

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut, trocken
Ac	Acetyl
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Äquiv.	Äquivalente
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
bp	Basenpaare
Bz	Benzoyl
CD	<i>circular dichroism</i> (zirkularer Dichroismus)
CDCl ₃	Chloroform (deutertiert)
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
CPE	Cyanophenylethyl
CPG	<i>controlled pore glass</i>
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
2'-dA	2'-Desoxyadenosin
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
2'-dC	2'-Desoxycytosin
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
2'-dG	2'-Desoxyguanosin

dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
1,2-DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriert)
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
2'-dT	2'-Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
ε	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenionisation
ESI	Elektronensprayionisation
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Form	Formamidin
gef.	gefunden
GSH	Glutathion
h	Stunde
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> Butyryl
IHGSC	<i>International Human Genome Sequencing Consortium</i>
<i>i</i> PrPac	<i>iso</i> Propyl-Phenoxyacetyl
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]-quinolin

IR	Infrarot
J	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
lcaa	<i>long chain amino alkyl</i>
m	Multipllett
M	Molar
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight</i>
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeOH	Methanol
Me-SATE	Methyl-S-acetylthioethyl
MHz	Megahertz
min	Minute
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
<i>m</i> RNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
NAT	<i>N</i> -Acetyltransferase
NaOAc	Natriumacetat
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernmagnetische Resonanz)
NOE	<i>nuclear overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser and exchange spectroscopy</i>
nt	Nucleotide
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pd ₂ (dba) ₃	Tris(dibenzylidenaceton)-dipalladium(0)
PE	Petrolether
Ph-SATE	Phenyl-S-acetylthioethyl
PNK	T4-Polynucleotidkinase
POM	Pivaloyloxymethyl
ppm	<i>parts per million</i>
<i>rac</i> -BINAP	racemisches 2,2'- <i>Bis</i> (diphenylphosphino)-1,1'-binaphtyl
R _f	Retentionsfaktor

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
RP	<i>reversed Phase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Rt	Raumtemperatur
s	Singulett
S.	Seite
Sdp.	Siedepunkt
sept	Septett
SG	Schutzgruppe
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> Butyldimethylsilyl
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - Tetramethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
T _m	<i>midpoint of transition temperature</i> (Schmelzpunkt eines DNA-Duplexes)
TOF	<i>time of Flight</i>
T4-PNK	T4-Polynucleotidkinase
t _r	Retentionszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
WHO	<i>World Health Organisation</i>
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)
z.B.	zum Beispiel

Theoretischer Teil

1. Einleitung

Krebs ist eine Krankheit des Erbguts (Genoms), also bestimmter Gene des menschlichen Organismus, die meist im Laufe des Lebens erworben wird. Es gibt hunderte verschiedener Arten der Krebserkrankungen. Diese gehen jeweils aus einer normalen Zelle hervor, die sich aufgrund genetischer Veränderungen in eine unkontrolliert wachsende Tumorzelle umgewandelt hat.^[1]

In allen gesunden Körperzellen kommen sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressorgene vor und regulieren dort Zellwachstum (Proliferation) und Zellreifung (Differenzierung). Während Onkogene prinzipiell das Zellwachstum fördern, wird es hingegen von Tumorsuppressorgenen unterdrückt. Verliert dieses genetische Kontrollsystem sein Gleichgewicht, gerät die Zelle aus ihrem Wachstumstakt und über ein unkontrolliertes Wachstum entsteht ein Tumor.^[2]

Metastasierung

Eine Differenzierung erfolgt zwischen malignen (bösartigen) Tumoren - eine bösartige Gewebeneubildung, auch Neoplasie genannt - und benignen (gutartigen) Tumoren. Während gutartige Tumore langsam und eingekapselt wachsen und sich daher gut operativ entfernen lassen (z.B. Nasenpolypen), wachsen maligne Tumoren in andere Organe und Blutgefäße (infiltratives Wachstum) und zerstören diese (destruierendes Wachstum). Zellen können sich aus dem Zellverband des Primärtumors lösen und sich über das Lymphsystem und den Blutstrom verbreiten. Binden sie schließlich an Endothelzellen, so kann die Zelle von dort in das umliegende Gewebe eindringen und einen Tochtertumor (Metastase) bilden (Abb. 1, S. 2).^[3]

Erst durch die Fähigkeit der Metastasierung erlangt der Krebs sein tödliches Potential.

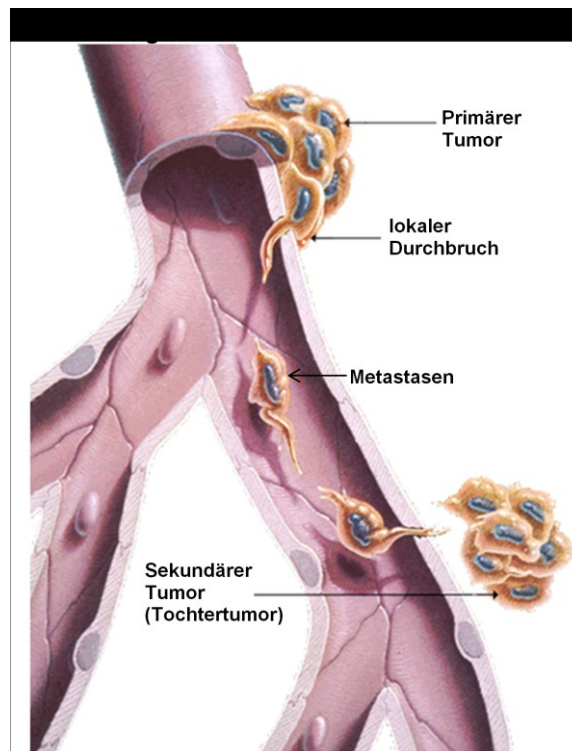


Abb. 1: Metastasierung^[4]

Weltweit lag die Zahl der durch Krebs verursachten Todesfälle im Jahr 2008 bei 7.6 Millionen Opfern. Somit ist Krebs heute nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit. Nach Schätzungen der WHO (*World Health Organisation*) wird die Zahl der durch Krebs ausgelösten Todesfälle für das Jahr 2030 auf elf Millionen Opfer pro Jahr ansteigen.^[5]

Ursachen genetischer Veränderung

Meist ist nicht eine einzelne Ursache für eine Krebserkrankung verantwortlich, sondern eine ganze Reihe verschiedenster Auslöser. Neben den endogenen (inneren) Faktoren, welche dem Organismus selbst entstammen, spielen die exogenen (äußeren) Faktoren, auf welche etwa 80% der Krebsfälle zurückzuführen sind, eine wichtige Rolle.^[6]

Zu diesen äußeren Risikofaktoren, welche die Entstehung von malignen Tumoren begünstigen, gehören chemische Substanzen, Viren und ionisierende Strahlung. Wie diese verschiedenen Carcinogengruppen im Einzelnen auf die Zelle einwirken, ist erst zum Teil bekannt, wobei im Ergebnis genetische Veränderungen (Mutationen) der Onkogene, Tumorsuppressorgene, Reparaturgene sowie Apoptosegene von Bedeutung sind.^[2,7]

Nach heutiger Kenntnis kommt den chemischen Substanzen dabei, mit etwa 60%, die weitaus bedeutendste Funktion zu.

Chemische Carcinogene kommen vermehrt in der Gruppe der aromatischen Kohlenwasserstoffe, der Amine, der Nitro- und Azoverbindungen vor. Bei den Aliphaten sind es hauptsächlich die Hydrazine, Azo- und Alkoxyverbindungen sowie die *N*-Nitrosoverbindungen und sämtliche Alkylierungsmittel.^[8]

Eine Auffälligkeit zeigt sich bei den Arylaminen und ihren *N*-acetylierten-Derivaten in Bezug auf ihre biologischen und physicochemischen Eigenschaften. Letztere sind vermeintlich stärkere Blocker von Replikation und Transkription und daraus folgend haben sie möglicherweise einen schwerwiegenderen Einfluss auf die Struktur der DNA.^[9-11]

Erste Aufzeichnungen über einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einer vorausgegangenen Verwendung von Chemikalien stammen von *Hill* 1761.^[7] Er verband das vermehrte Auftreten von Nasenschleimhautkrebs mit häufigem Konsum von Schnupftabak. Die erste beruflich induzierte Krebserkrankung wurde 1775 von *Pott* nachgewiesen.^[12] Dabei handelte es sich um eine Häufung von Skrotalkrebs, der so genannten „Rußwarze“, welche hauptsächlich bei Männern auftrat, die als Schornsteinfeger gearbeitet haben. Im Jahre 1895 berichtete *Rehn* über eine Zunahme von Harnblasencarcinomen bei Arbeitern einer Produktionsstätte für Magenta (Fuchsin).^[13,14] *Rehn* machte ein aromatisches Amin, das Anilin **1** (Abb. 2, S. 4), welches ein Ausgangsstoff der Synthese darstellte, dafür verantwortlich und prägte den Namen „Anilin-Krebs“. Dies erwies sich Jahre später als unzutreffend, da nachgewiesen werden konnte, dass Nebenprodukte, wie z.B. das 4-Aminobiphenyl **6** (Abb. 2, S. 4), die Auslöser für die Erkrankung waren. *Rehn* erkannte erstmals die Bedeutung der langen Expositions- und Latenzzeit. Im Anschluss veröffentlichten *Leichtenstern* (1898) und *Nassauer* (1920) ihre Ergebnisse zum Auftreten von Blasenkarzinomen bei Chemiearbeitern, hervorgerufen durch aromatische Amine.^[15,16]

Der erste experimentelle Beweis, dass aromatische Amine Blasenkrebs verursachen können, wurde 1938 von *Hueper et al.* geliefert. Sie verfütterten 2-Naphthylamin an Hunde, welche daraufhin Urothelcarcinome der Harnblase entwickelten.^[17]

Während polycyclische, aromatische Amine wie z.B. 2-Aminofluoren **5** und 4-Aminobiphenyl **6** eine erwiesene, stark carcinogene Wirkung haben, werden monocyclische, aromatische Amine wie z.B. Anilin **1**, 4-Toluidin **2**, 4-Anisidin **3** oder 3,5-Dimethylanilin **4** im Bereich der Grenzcarcinogene eingeordnet. Bei diesen Substanzen ist eine hohe Dosierung, eine lange Exposition oder die Zugabe eines Comutagens notwendig, um eine carcinogene Wirkung zu erreichen (Abb. 2).^[18]

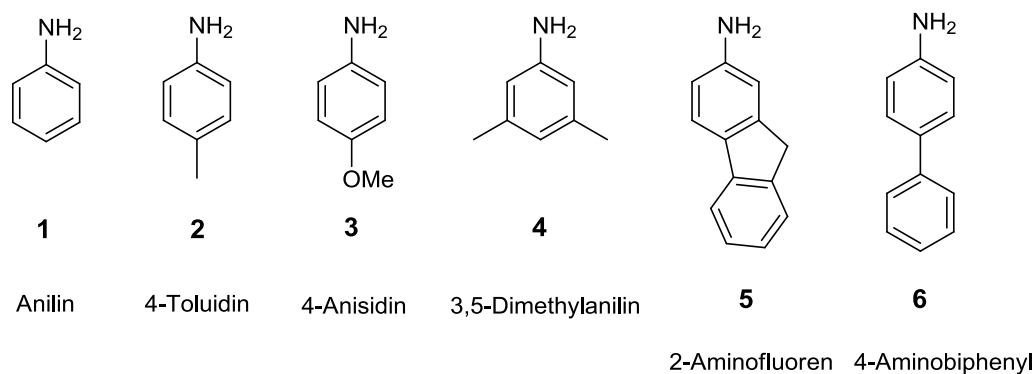


Abb. 2: Carcinogene, aromatische Amine

Trotz der Erkenntnis der Carcinogenität aromatischer Amine werden diese seit Beginn des 19. Jahrhundert sowohl zur Herstellung von Azo-Farbstoffen, Pharmaka, Pestiziden als auch in der Reifenproduktion verwendet. Anteilig sind sie im Tabakrauch zu finden und bis heute im Straßenteer enthalten. Darüber hinaus können sie als Abbauprodukte, z.B. durch Reduktion polycyclischer Nitroaromaten aus Dieselgasen entstehen.^[19,20]

2. Kenntnisstand

2.1 Metabolismus aromatischer Amine

Aromatische Amine sind, wie bereits erwähnt, indirekte Carcinogene und unterliegen im Organismus einer metabolischen Aktivierung. Trotz des unterschiedlichen carcinogenen Potentials aromatischer Amine unterscheidet sich der Ablauf der Carcinogenese nicht.

Gelangen aromatische Amine in den Körper, setzt ein Detoxifizierungsprozess ein, der zum Ziel hat, die körperfremden Stoffe in wasserlösliche Verbindungen zu überführen, um sie dann ausscheiden zu können. Dabei sind enzymatische Nebenreaktionen möglich, in denen die aromatischen Amine zu elektrophilen Aminierungsreagenzien (ultimale Carcinogene) umgewandelt werden (Abb. 3, S. 6).

Bei diesen Prozessen werden zwei Phasen unterschieden. Der erste Schritt des Metabolismus erfolgt durch enzymatische Oxidation am aromatischen Ring zu Phenol-Derivaten (**Phase I**), während es sich bei dem zweiten Schritt meist um eine Veresterung handelt (**Phase II**).^[21]

Phase I (Oxidation; Bildung proximaler Carcinogene)

Aus Arbeiten von *Cramer et al.* wurde bekannt, dass dem ersten Schritt, der Oxidation aromatischer Amine, eine Schlüsselrolle für deren Carcinogenität zukommt.^[21]

In **Phase I**, die in der Leber stattfindet, kann das aromatische Amin **7** relativ unspezifisch durch verschiedene Enzymsysteme am Stickstoff oxidiert werden. So kann es einerseits durch die cytosolische *N*-Acetyltransferase in das entsprechende Arylamid **8** überführt werden, andererseits aber auch, unabhängig von dieser Acetylierung, mittels Cytochrom P₄₅₀ vermittelter Oxygenasen zum Hydroxylamin **9** bzw. zur Hydroxamsäure **10** *N*-hydroxyliert werden. Ebenso kann das Hydroxylamin **9** auch durch die *N*-Acetyltransferase zur Hydroxamsäure **10** acetyliert und anschließend durch *N*-Glucuronierung in den stabilen Glucuronsäureester **11** umgewandelt werden, welcher dann über die Niere abtransportiert und ausgeschieden werden kann (Entgiftungsreaktion).

Erfolgt keine *N*-Glucuronierung, werden das Hydroxylamin **9** und die Hydroxamsäure **10** über den Blutweg in die Harnblase transportiert.

Teilweise kann das Hydroxylamin **9** im Blut durch Hämoglobin, unter Bildung von Methämoglobin, zum Nitrosoderivat **12** oxidiert werden und spontan mit Glutathion (GSH) oder den SH-Gruppen des Hämoglobins reagieren.^[22,23]

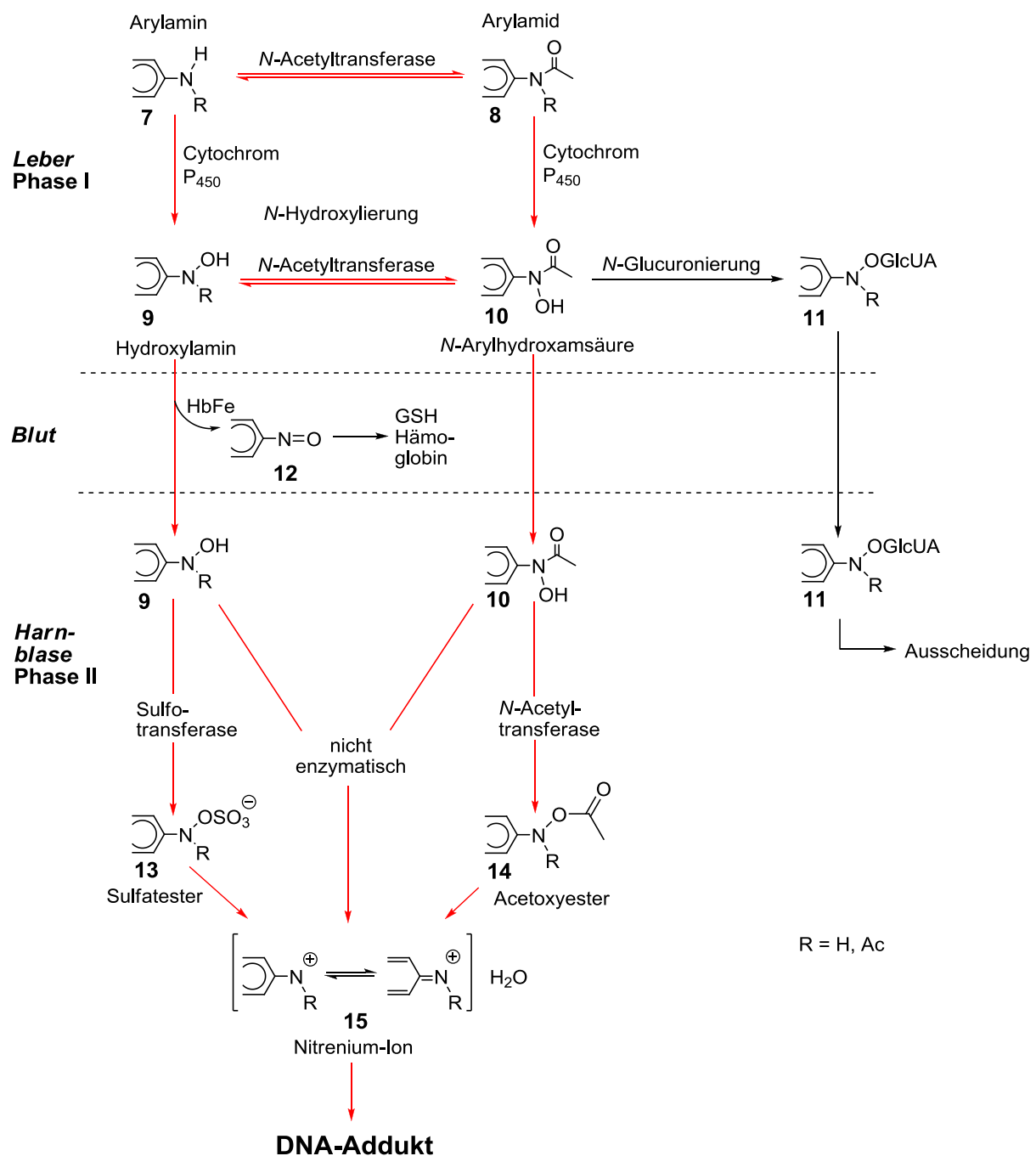


Abb. 3: Metabolismus aromatischer Amine in der Entstehung von Harnblasenkrebs (Giftungsreaktionen, Entgiftungsreaktionen)^[24]

Phase II (Veresterung; Bildung ultimaler Carcinogene)

An den ersten Aktivierungsschritt (**Phase I**, Leber), der zu den proximalen Carcinogenen, den *N*-hydroxylierten Verbindungen **9** und **10** führt, schließt sich ein weiterer Schritt zu den ultimalen Carcinogenen an (**Phase II**, Harnblase).

Hier findet meistens eine Veresterung statt, in dem das entsprechende Hydroxylamin **9** bzw. die Hydroxamsäure **10** wegen des geringen pH-Wertes protoniert wird und unter Wasserabspaltung das hochreaktive Nitreniumion **15** liefert. Neben diesem nicht-enzymatischen Aktivierungsschritt ist diese Reaktion auch enzymatisch durch die Sulfotransferase bzw. *N*-Acetyltransferase möglich, wobei jeweils die beiden ultimalen Carcinogene, der Sulfatester **13** bzw. das *N*-Acyloxyarylamino **14**, entstehen, welche dann unter Abspaltung der Sulfat- bzw. Acetatgruppe ebenfalls das Nitreniumion **15** liefern (Abb. 3, S. 6).

Das auf diesen Wegen erhaltene Nitreniumion **15** kann kovalent an die DNA oder andere Biomoleküle binden.^[24,25]

2.2 Reaktion ultimaler Carcinogene mit der DNA

Das in dem Metabolismus erhaltene hochreaktive elektrophile Nitreniumion **15** ist in der Lage, sich an die nucleophilen Stellen der DNA anzulagern und so genannte DNA-Addukte zu bilden.^[24,25]

Die Bezeichnung „DNA-Addukt“ impliziert hier fälschlicherweise eine Additionsreaktion zwischen Carcinogen und Nucleobase, wobei es sich chemisch gesehen um eine Substitutionsreaktion handelt. Da sich dieser Begriff in der naturwissenschaftlichen Terminologie durchgesetzt hat und auch in der Literatur Verwendung findet, soll er auch hier angewandt werden.

Zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren haben sich mit der Identifizierung dieser Addukte beschäftigt. Dabei zeigte sich, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Anzahl und auch die Menge der mit den DNA-Basen gebildeten Produkte je nach Carcinogen verschieden sein können.

Neben der Bildung von Addukten an der N^4 - und C5-Position des 2'-Desoxycytosins, an der C6-Position des 2'-Desoxythymidins und an der C8- sowie N^6 -Position des 2'-Desoxyadenosins wurde der Hauptteil der gebildeten Addukte am 2'-Desoxyguanosin gefunden, welche Thema dieser Arbeit sind (Abb. 4, S. 8).^[26,27]

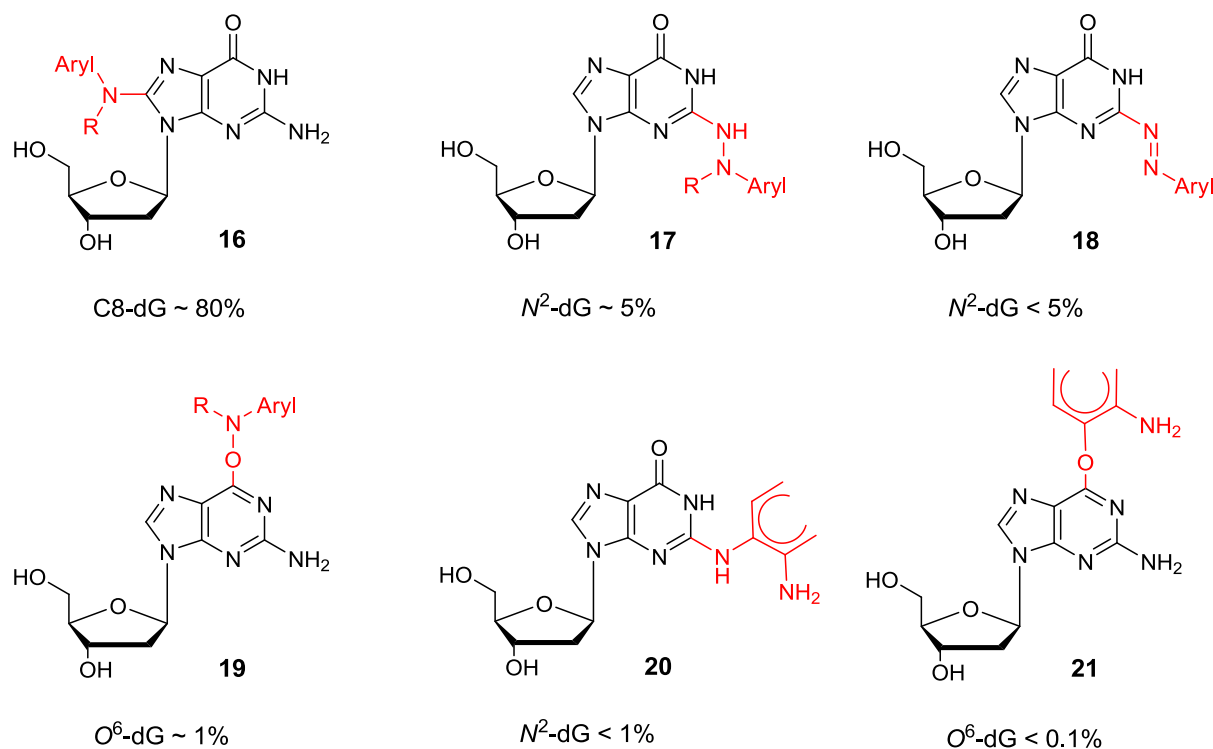


Abb. 4: Addukte des 2'-Desoxyguanosins (2'-dG) und deren relative Häufigkeiten

Durch die in Abbildung 4 gezeigten Addukte kann die Struktur der DNA soweit verändert werden, dass bei der Transkription Mutationen auftreten können und die im Zellteilungsprozess entstehenden neuen Zellen ein mutiertes Genom besitzen. Dies kann zum Absterben der Zelle (Apoptose) oder auch zur Entwicklung einer Tumorzelle führen.^[7] Allerdings führen diese DNA-Modifikationen nur dann zu Replikationsfehlern, wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen die Veränderung nicht rechtzeitig erkennen und beheben, sowie die Zelle nicht mehr in der Lage ist, ein Signal zu ihrer eigenen Zerstörung abzugeben.

In Tierversuchen konnte im Zusammenhang mit ³²P-Postlabeling-Experimenten (vgl. Kapitel 2.4, S. 10) gezeigt werden, dass unterschiedliche DNA-Addukte mit verschiedenen aromatischen Aminen unterschiedlich schnell repariert werden können.^[28]

Als Beispiel sind die in dieser Arbeit verwendeten, an der C8-Position acetylierten Derivate erwähnt, welche schneller repariert werden als die unacetylierten Derivate.^[10,11]

Der Grund hierfür liegt in den unterschiedlichen DNA-Konformationen, welche durch die verschiedenen Addukte entstehen. Welche Konformation vorliegt und somit maßgebliche Auswirkungen auf die Struktur hat, ist vom aromatischen System des Adduktes abhängig. Während sich einige Aromaten in die Helix der DNA einfügen und eine geringe konformative Änderung hervorrufen, begünstigen andere in unterschiedlichem Maße die Umwandlung von der *B*-Konformation in *A*- oder *Z*-Konformation (z.B. 2-Aminofluoren **5** oder 4-Aminobiphenyl **6** (Abb. 2, S. 4), sowie die entsprechenden *N*-Acetyl-Derivate, die eine stärkere konformative Änderung verursachen).

Anhand von Schmelzpunktexperimenten, Circular dichroismus- und NMR-Messungen konnte gezeigt werden, dass Addukte mit denaturierender Konformation schneller repariert werden als solche, die die Konformation nicht verändern.^[29] Wird die DNA nicht repariert, so kann es bei der Transkription zu Mutationen und folglich entweder zum Zelltod oder zur Entstehung einer Tumorzelle kommen.

2.3 Mechanismus der Adduktbildung *in vivo*

Der Mechanismus der am häufigsten auftretenden DNA-Addukt-Gruppe, den C8-dG-Addukten, ist bislang nicht vollständig geklärt. Allerdings gilt es als erwiesen, dass intermediär ein Arylnitreniumion **15** gebildet wird (Abb. 3, S. 6). Die Beobachtung, dass die Reaktion vorwiegend am Guanin stattfindet, kann mit Hilfe des Redoxpotentials erklärt werden, da dieses deutlich kleiner als das der DNA-Heterocyclen ist und somit die notwendige Elektronenabgabe erst möglich macht.

Aufgrund der Tatsache, dass die C8-Position nicht die nucleophilste Stelle der Base ist und mit Alkylierungsreagenzien (z.B. Methyljodid) eine bevorzugte Reaktion an der *N*⁷-Position nachgewiesen werden konnte, schlugen *Guengerich et al.* einen Mechanismus vor, der diesen Aspekt berücksichtigte.^[21,23,30,31]

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen drei Jahre später auch *Novak und Kennedy*.^[32] Die durch den elektrophilen Angriff des Arylnitreniumions **15** erzeugte positive Ladung ist über die *N*⁷-, C8- und *N*⁹-Positionen delocalisiert. Nach Deprotonierung an der C8-Position liegt dann ein Ylid vor, welches in einer der Stevens-Umlagerung ähnlichen Reaktion das *in vivo* beobachtete C8-Addukt **16** liefert, wobei seine Aromatizität beibehalten wird (Abb. 5, S. 10).

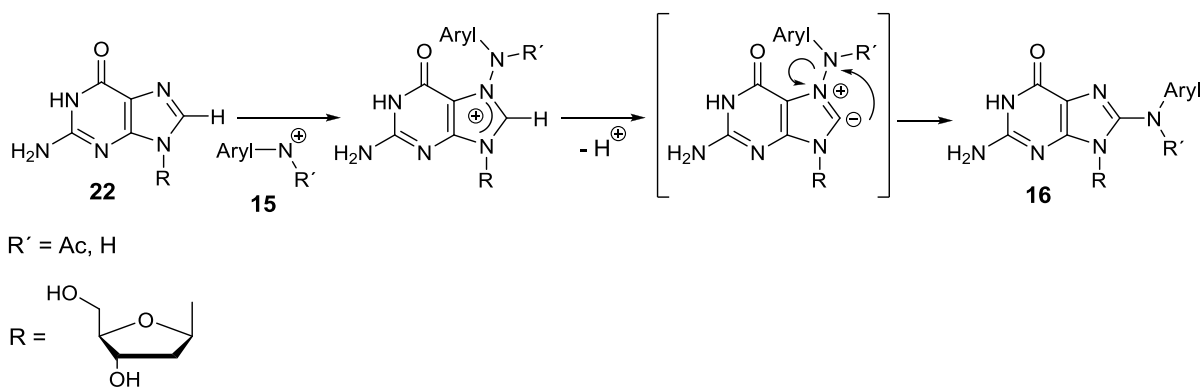


Abb. 5: Postulierter Mechanismus der C8-Adduktbildung

2.4 Nachweis der Carcinogenität

Der zuverlässigste Nachweis für eine carcinogene oder mutagene Substanz ist in Tierversuchen an Säugern zu klären. Da diese jedoch einerseits sehr umstritten und andererseits sehr teuer sind, werden bevorzugt auch andere Methoden verwendet.

³²P-Postlabeling

Das ³²P-Postlabeling ist eine hochempfindliche Methode zum Nachweis von DNA-Addukten, die 1981 erstmals von *Randerath* eingeführt wurde.^[33] Dieses Verfahren lässt sich in zwei Schritte einteilen. Zuerst wird die DNA mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und anschließend mittels einer Nuclease und einer Phosphodiesterase enzymatisch zu 3'-Nucleosidmonophosphaten hydrolysiert. Anschließend spaltet eine P1-Nuclease selektiv das 3'-Phosphat von den normalen Nucleotiden ab. Die durch Addukte modifizierten Nucleotide sind abbauresistent, so dass es zu einer Anreicherung kommt. Zur Markierung der Nucleotide wird mittels T4-Polynucleotidkinase das radioaktive [γ -³²P]-Adenosintriphosphat am C5' phosphoryliert. Durch mehrdimensionale Dünnschichtchromatographie können die Addukte von den unveränderten 3',5'-Nucleosiddiphosphaten abgetrennt und autoradiographisch untersucht werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die Addukte bekannt und strukturell charakterisiert sind, um eine eindeutige Zuordnung vornehmen zu können.^[34,35]

Ames Test

Der nach seinem Erfinder *Bruce Ames* benannte Ames-Test weist das mutagene Potenzial verschiedener Chemikalien nach.^[36,37] Als Testobjekte werden Mangelmutanten des Bakterienstammes *Salmonella typhimurium* verwendet. Diese besitzen eine Histidinauxotrophie; eine Mutation in den Genen für die Enzyme der Histidinbiosynthese. Im Gegensatz zum Wildtyp sind diese Bakterien nicht zur Synthese von Histidin befähigt und können deshalb in histidinfreiem Medium nicht wachsen. Einige dieser Bakterien, die so genannten Revertanten, können aufgrund einer Rückmutation ohne Histidin wachsen und bilden so Kolonien auf histidinfreiem Medium. Da die Frequenz der Rückmutation durch ein Mutagen erhöht wird, lässt sich die Mutagenität an den, im Test befindlichen Chemikalien anhand der Wachstumsrate auf histidinfreiem Medium im Vergleich zu der Spontanmutationsrate in Korrelation setzen.

Routinemäßig werden heutzutage fünf verschiedene Bakterienstämme eingesetzt. Da diese Stämme zum Teil verschiedene Arten von Mutationen, z.B. Leseraster- oder Basenpaarmutationen, besitzen, kann mit ihrer Hilfe nicht nur das mutagene Potential einer Substanz bestimmt werden, sondern auch eine Klassifizierung des Wirkmechanismus erfolgen. Da die meisten genotoxischen Stoffe nicht direkt, sondern erst nach Aktivierung zu reaktiven Metaboliten mit der DNA reagieren (z.B. die aromatischen Amine), wird diese im Säugetierorganismus stattfindende Metabolisierung im Ames-Test simuliert. Hierzu kann ein aus Säugetierleber gewonnenes Aktivierungssystem (S9-Mix) verwendet werden. Anhand eines positiven Ames-Test kann eine Einstufung des mutagenen Potentials einer Substanz ermittelt werden.^[38]

2.5 Chemische Synthese der C8-Addukte am 2'-Desoxyguanosin

2.5.1 Synthese der C8-Arylamin-Addukte

Bei der Synthese modifizierter C8-Addukte können generell drei Methoden angewendet werden. Zum Einen kann eine nucleophile Arylaminierung am 8-Brom-Derivat durchgeführt werden. Der zweite Weg beruht auf einer elektrophilen Arylaminierung und die dritte Möglichkeit erfolgt über eine Palladium-katalysierte C-N-Bindungsknüpfung.

Nucleophile Arylaminierung

Bereits 1967 gelang es *Kriek* und *Miller* mittels einer nucleophilen Arylaminierung des acetyl-geschützten Ribosederivates **23** das C8-2-Fluorenyl-Addukt **24** mit einer Ausbeute von 23% zu synthetisieren (Abb. 6).^[39]

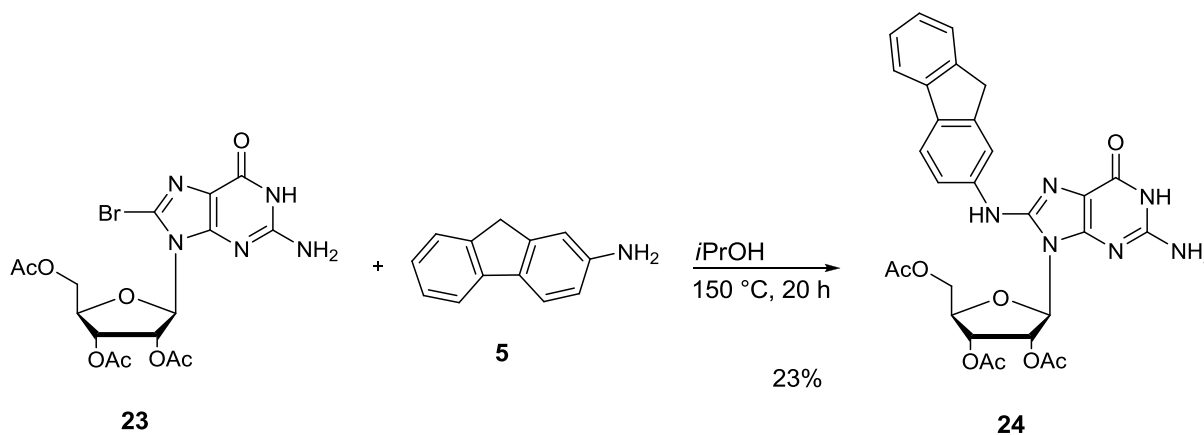


Abb. 6: Beispielreaktion zur nucleophilen Arylaminierung

Das Problem dieser Reaktion bestand in den harschen Reaktionsbedingungen. Umsetzungen von Arylaminen mit 2'-Desoxynucleosiden waren dadurch nicht möglich, da bei hohen Temperaturen häufig eine Depurinierung statt fand.

Elektrophile Arylaminierung

Erst 1989 veröffentlichten *Famulok* und *Boche* eine Methode, die auch zu den gewünschten C8-Arylamin-2'-desoxynucleosiden führte.^[40,41]

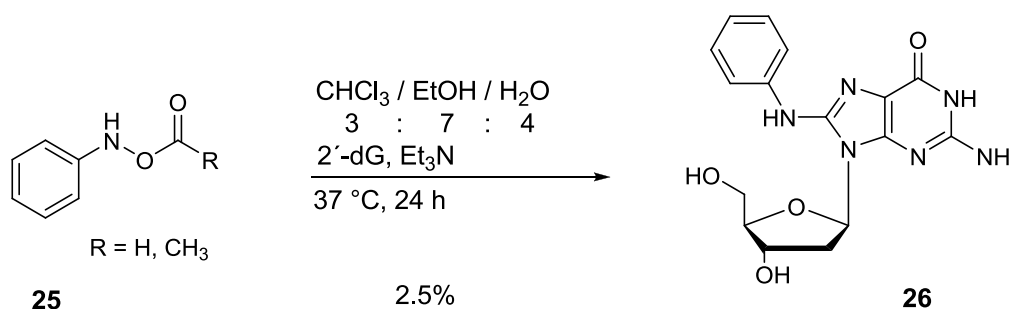


Abb. 7: Beispielreaktion zur elektrophilen Arylaminierung

Bei der elektrophilen Arylaminierung werden, analog dem *in vivo* Mechanismus, Hydroxylamine gebildet, welche dann in das elektrophile Nitreniumion umgewandelt werden können. Der Nachteil dieser Reaktion ist die sehr geringe Ausbeute von nur 2.5% (Abb. 7).

Palladium-katalysierte C-N-Bindungsknüpfung

Die Strategie der Palladium-katalysierten C-N-Bindungsknüpfung wurde erstmals von *Migita et al.* 1983 veröffentlicht. Sie zeigten eine $\text{PdCl}_2[\text{P}(o\text{-Tol})_3]_2$ katalysierte Kupplung eines Aminostannans mit verschiedenen Bromaromaten **27** zu den entsprechenden Arylaminen **28**.^[42] Diese Reaktion wurde anschließend von *Buchwald et al.* und *Hartwig et al.* weiterentwickelt und 1995 unter dem Namen Buchwald-Hartwig-Kupplung veröffentlicht (Abb. 8).^[42-44]

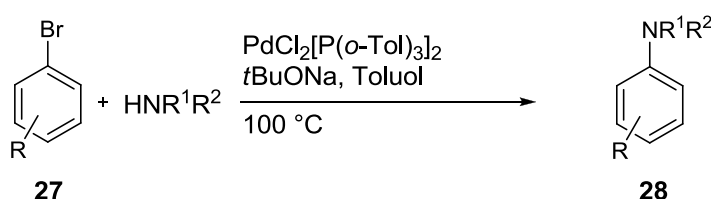


Abb. 8: Buchwald-Hartwig-Kupplung

Die ersten erfolgreichen Reaktionen mit Nucleosiden wurden von *Lakshman et al.* durchgeführt. Ihnen gelang ebenfalls die Synthese der N^6 -Arylamin-Addukte des 2'-Desoxyadenosins.^[45]

Eine Anwendung der Buchwald-Hartwig-Kupplung zur Darstellung C8-Arylamin-modifizierter 2'-Desoxyguanosin-Derivate und deren anschließende Überführung in die entsprechenden Phosphoramidite gelang *Rizzo et al.*^[46] Sie kuppelten ein bromiertes 2'-Desoxyguanosin-Derivat mit 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]-quinolin (IQ), ein Arylamin, welches auch in Nahrungsmitteln vorkommt (Abb. 9, S. 14).

Die Probleme der Synthese von *Rizzo* traten erst nach Darstellung des Phosphoramidites **30** auf. Dieses war in den standardmäßig verwendeten Lösungsmitteln für die Oligonucleotidsynthese nicht löslich. Die Folge war eine präparativ schwierige Oligonucleotidsynthese.

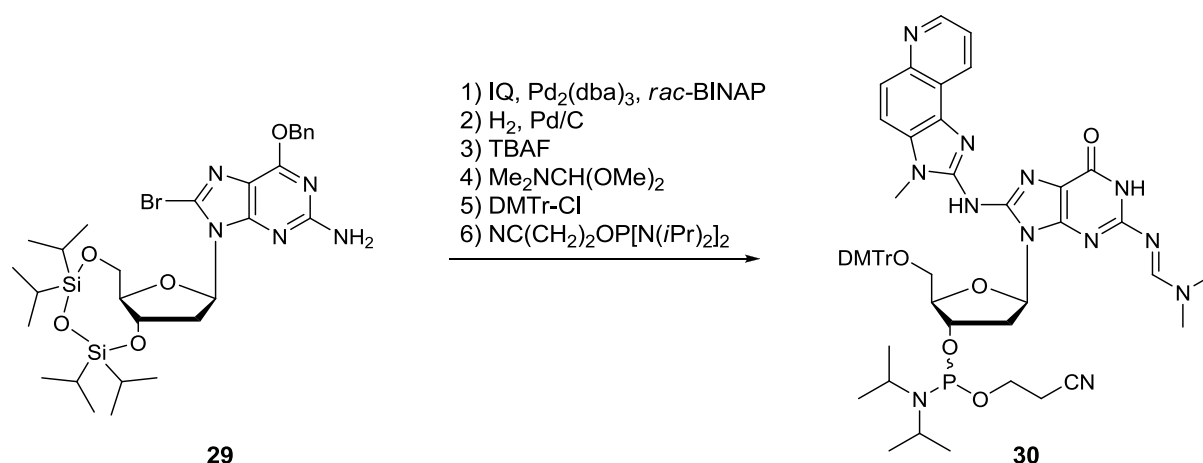


Abb. 9: Darstellung des Phosphoramidites **30** nach *Rizzo*^[46]

Zur gleichen Zeit gelang *Gräs* in ihrer Dissertation die Darstellung von C8-NH-Arylamin-modifizierten Phosphoramiditen von 2'-Desoxyguanosin **32** (Abb. 10).^[47-49]

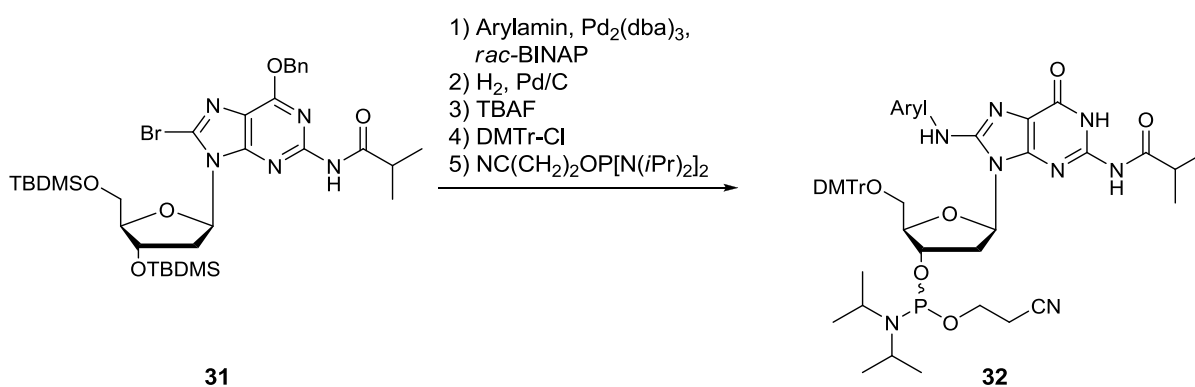


Abb. 10: Syntheseroute der C8-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite **32** nach *Gräs*^[47]

Für die exocyclische Aminofunktion verwendete *Gräs* die *Isobutyryl*-Schutzgruppe anstelle der von *Rizzo* verwendeten Formamidin-Schutzgruppe, welches sich in der folgenden Arbeit als nachteilig herausstellte, da diese Gruppe im Gegensatz zu der Formamidin-Schutzgruppe eine lange Abspaltungszeit (8 h, 55 °C), nach Einbau in ein Oligonucleotid, benötigte. Unabhängig davon konnte *Gräs* in ihrer Arbeit den Einbau der modifizierten Phosphoramidite in verschiedene Oligonucleotide zeigen.^[47]

Aufgrund der Nachteile der *Isobutyryl*-Schutzgruppe führte *Böge* 2008 erneut die Formamidin-Schutzgruppe an der exocyclischen Aminogruppe ein, so dass die Abspaltungszeit der Schutzgruppe des Roholigonucleotids von acht Stunden auf vier Stunden verkürzt und somit die Ausbeuten der modifizierten Oligonucleotide deutlich gesteigert werden konnten. Zusätzlich bemerkte *Böge* bei der Entschützung der 3'- und 5'-Hydroxygruppe eine Dearylierung unter Verwendung von Tetrabutylammoniumfluorid. Eine mildere Abspaltung der TBDMS-Gruppen wurde unter Verwendung von Triethylamin-Trihydrofluorid in Gegenwart von Triethylamin erreicht.^[50]

Einen weiteren Weg zur Darstellung von C8-NH-Arylamin modifizierten 2'-dG-Derivaten mittels Buchwald-Hartwig-Kupplung zeigte 2003 auch *Takamura-Enya*.^[51,52] Die Umsetzung erfolgte hier nach Überführung eines geschützten 2'-Desoxyguanosins **33** in das entsprechende C8-Aminoderivat **35** mit einem polycyclischen Arylbromid **36** (Abb. 11).

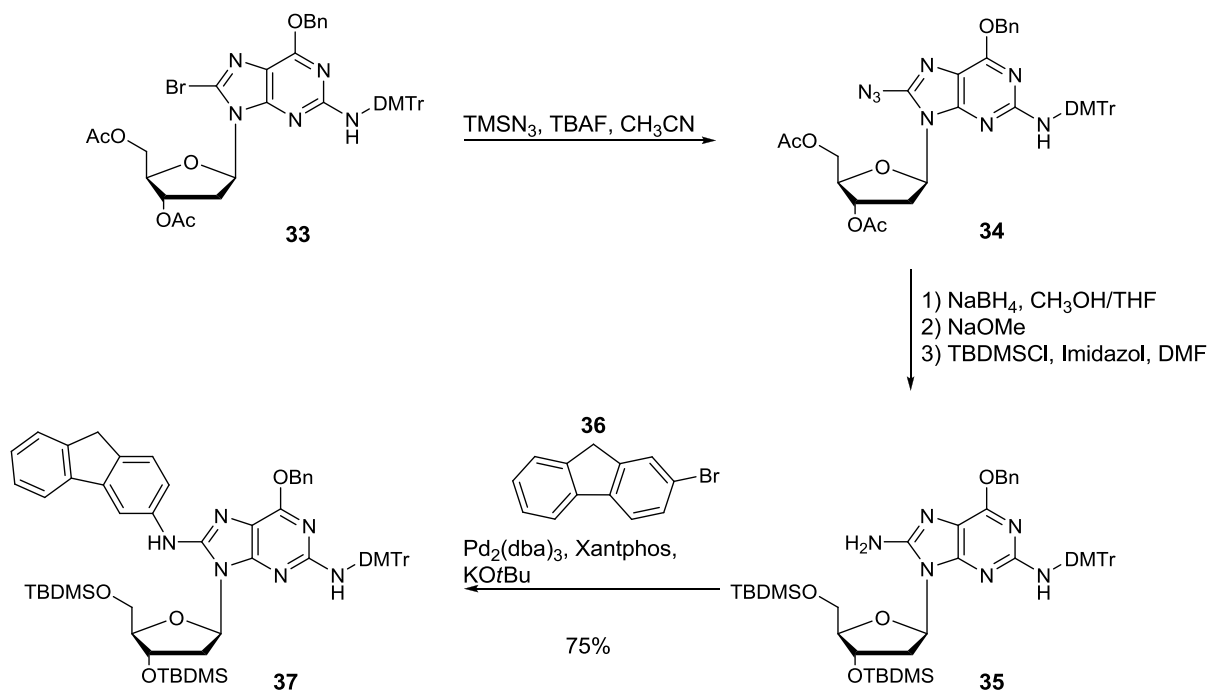


Abb. 11: Synthese eines C8-NH-Arylamin modifizierten 2'-dG-Derivaten mit einem polycyclischen Arylbromid **36** nach *Takamura-Enya*^[51,52]

Zwar gelang die Synthese auch mit polycyclischen Arylaminen, es konnte keine Verkürzung der Syntheseschritte und somit auch keine Ausbeutelerhöhung erreicht werden.

2.5.2 Synthese der C8-(N-Acetyl)-arylamino-Addukte

Wie bereits im ersten Kapitel (S. 3) beschrieben, sind nicht nur die C8-NH-Arylamino-Addukte von großer Bedeutung für die chemische Carcinogenese, sondern auch die N-acetylierten Derivate. Sie unterscheiden sich gravierend in ihren physico-chemischen und biologischen Eigenschaften.^[9-11]

Der Einfluss polycyclischer, aromatischer C8-NH-Addukte auf die Struktur der DNA wurde 1992 und 1994 von *Marques et al.* veröffentlicht und von *Böge* bestätigt.^[53-55]

Sie zeigten, dass die Anilin-, 2-Aminofluoren- und 4-Aminobiphenyl-modifizierte Addukte vorwiegend die *anti*-Konformation **38** der glycosidischen Bindung einnehmen (Abb. 12 links). Im Gegensatz dazu konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die N-acetylierten Derivate hauptsächlich in der *syn*-Konformation **39** vorliegen (Abb. 12 rechts).^[56]

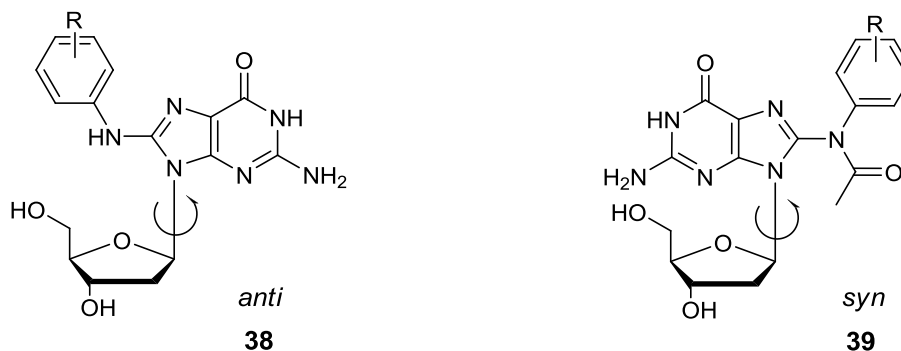


Abb. 12: *anti*- und *syn*-Konformation der verschiedenen Addukte **38** und **39**

Aus der Konformation der einzelnen Addukte resultiert, dass bei den NH-Addukten **38**, welche vorwiegend in der *anti*-Konformation vorliegen, die Modifikation in der großen Furche der DNA-Doppelhelix liegt und die Basenpaarung nicht stört. Dagegen ragt die Modifikation bei den N-acetylierten Addukten **39** in die Helix hinein, interkaliert mit den Nachbarbasen und schiebt den Heterocyclus in die große Furche der DNA.

Die erste erfolgreiche Synthese der N-acetylierten Addukte wurde 1993 von *Zhou* und *Romano* beschrieben.^[57,58] Mittels elektrophiler Arylaminiierung stellten sie das C8-(N-Acetyl)-2-fluorenyl-Addukt her. Allerdings verlief die Kupplung mit einer Ausbeute von 2.5%.

Erst 2002 veröffentlichten *Gillet* und *Schärer* eine weitaus effizientere Methode zur Darstellung der acetylierten Addukte (Abb. 13).^[59,60] Ausgehend vom 2'-Desoxyguanosin **40** wurde zunächst in vier Stufen das geschützte, bromierte Addukt **41** synthetisiert. Im Anschluss folgte die in Kapitel 2.5.1 (S. 13) beschriebene Buchwald-Hartwig-Kupplung zum C8-Arylamin-modifizierten Addukt **42**. Nach Acetylierung des Arylamins, Abspaltung und Einführung verschiedener Schutzgruppen, zur Vorbereitung für die Oligonucleotidsynthese, konnte das Phosphoramidit **43** über 12 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 6% erhalten werden. Hierbei wurden ausschließlich polycyclische, aromatische Amine verwendet. Eine Umsetzung mit den monocyclischen Derivaten erfolgte nicht.

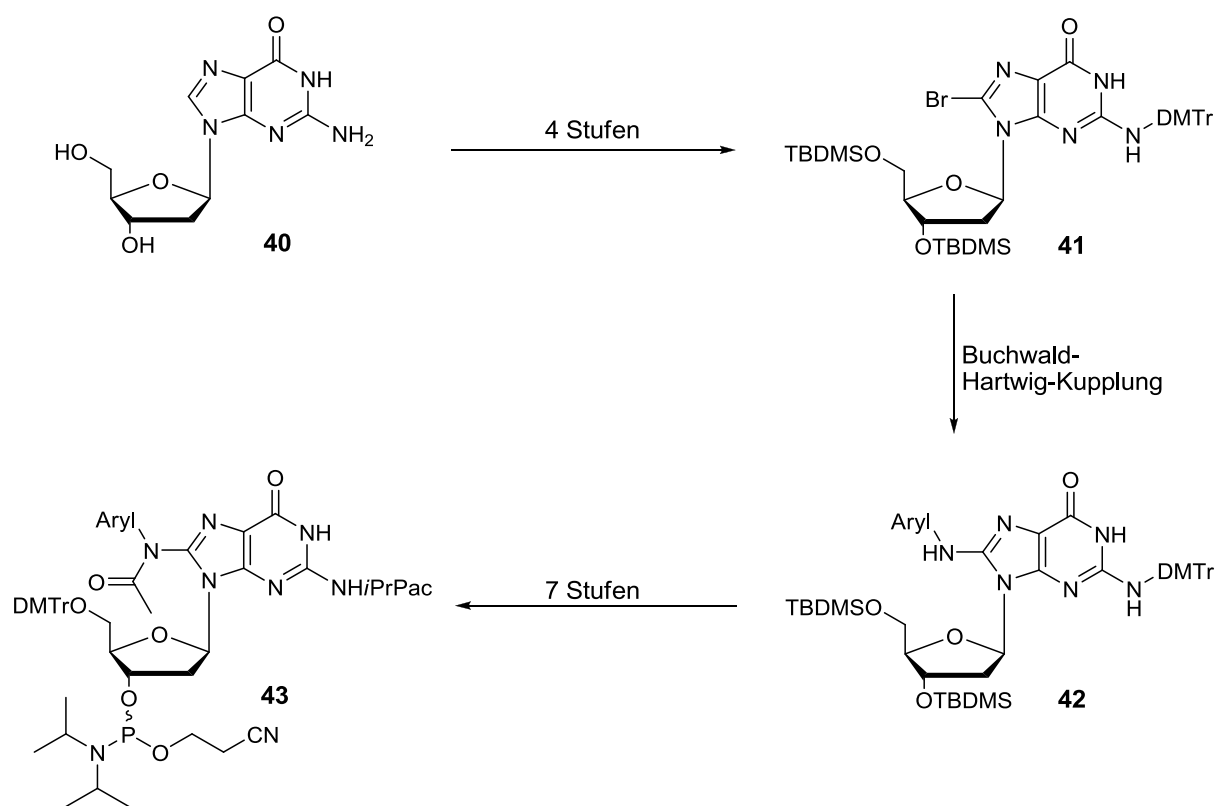


Abb. 13: Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2'-dG-Phosphoramidite **43** nach *Gillet* und *Schärer*^[60]

Ebenso verwendeten *Gillet* und *Schärer* für die exocyclische Aminogruppe die *i*PrPac-Schutzgruppe (*iso*Propyl-Phenoxyacetyl-). Diese Gruppe findet Anwendung bei der Festphasensynthese der Oligonucleotide unter „*ultra-mild*“-Bedingungen. Sie befürchteten, dass die basenlabile Acetylgruppe unter den Standard-Abspaltbedingungen (25% NH₃, 4 h, 55 °C) nicht stabil wäre. Durch die Verwendung der *i*PrPac-Schutzgruppe konnten mildere Abspaltbedingungen (*Diisopropylamin*, Raumtemperatur, 1 - 12 h) gewählt werden.

Die erste Synthese ohne eine Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung des verwendeten Arylamins und der damit verbundenen umfangreichen Schutzgruppenstrategie gelang *Böge et al.* 2007.^[61] Im Gegensatz zu der bisher angewandten metallkatalysierten Kupplung verwendete *Böge et al.* einen zuvor mit 1H-Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) aktivierten 2'-Desoxyguanosinbaustein **45**, welcher mit der entsprechenden Aryl-Hydroxamsäure **46** direkt umgesetzt wurde (Abb. 14).

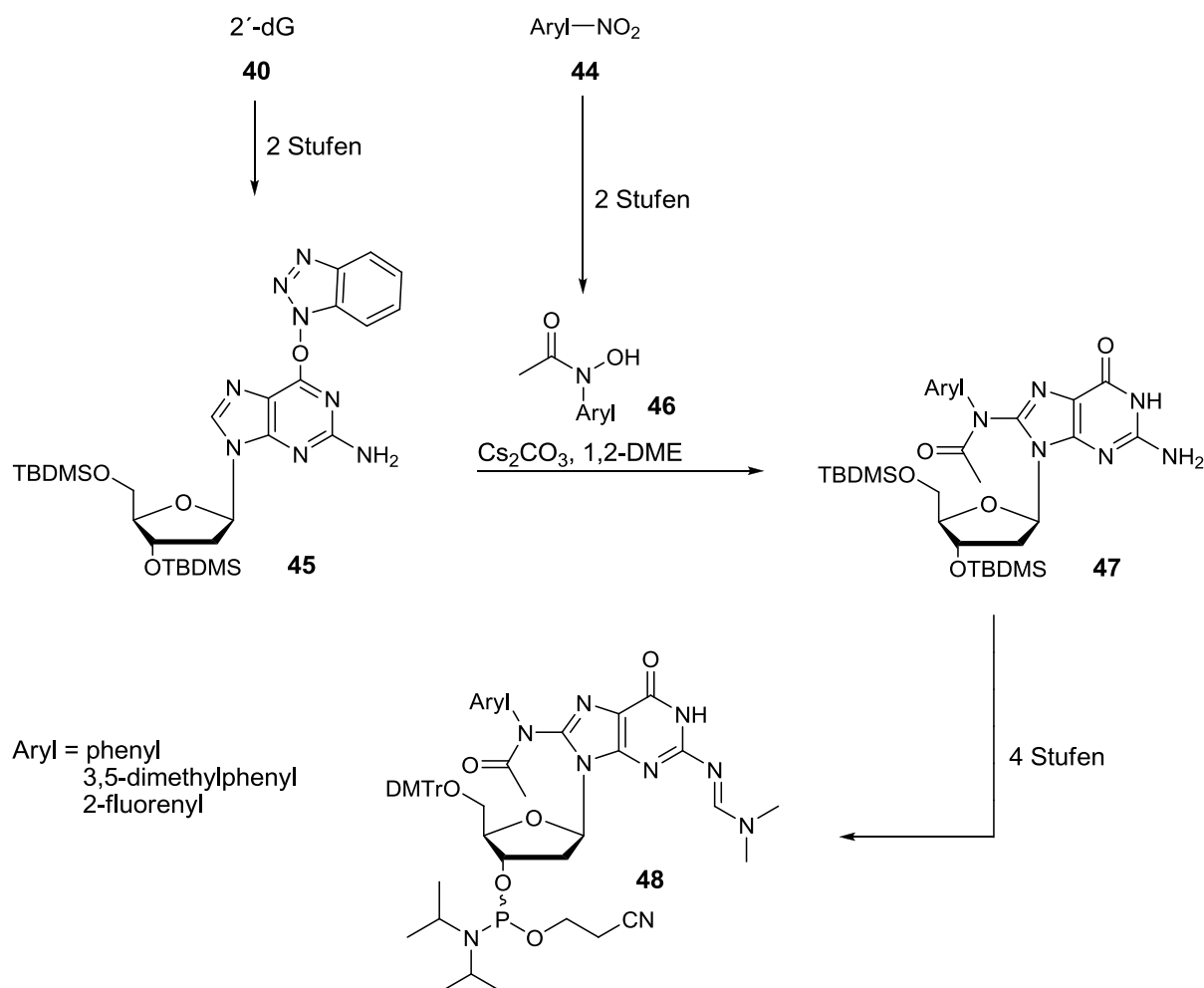


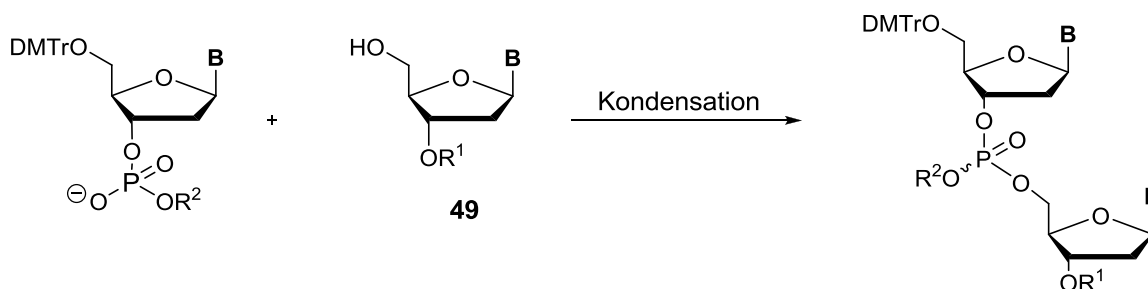
Abb. 14: Darstellung C8-(N-Acetyl)-arylamino-modifizierter 2'-dG-Phosphoramidite **48** nach *Böge et al.*^[61]

Die Synthese verlief in sieben Schritten mit Gesamtausbeuten zwischen 11% und 26%. Aufgrund der hier verwendeten Formamidin-Schutzgruppe konnten diese nach Einbau der modifizierten Phosphoramidite **48** in 12mer-Oligonucleotide, innerhalb von vier Stunden bei 45 °C abgespalten werden. Dabei wurde jedoch teilweise auch eine Abspaltung der Acetylgruppe beobachtet.

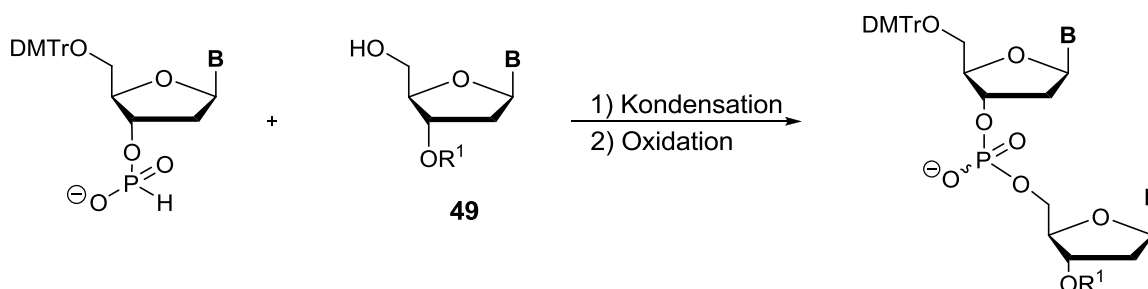
2.6 Synthese von Oligonucleotiden

Oligonucleotide sind Polymere, die durch Polykondensation von Nucleosidphosphaten entstehen. Im Gegensatz zu der auf 5'-Triphosphaten basierenden natürlichen DNA-Synthese verläuft die Oligonucleotidsynthese am DNA-Synthesizer aufgrund der höheren Reaktivität der 5'-Hydroxygruppe in 3' → 5'-Richtung.

Triestermethode



H-Phosphonatmethode



Phosphit- (X = Cl) bzw. Phosphoramiditmethode (X = N(iPr)₂)

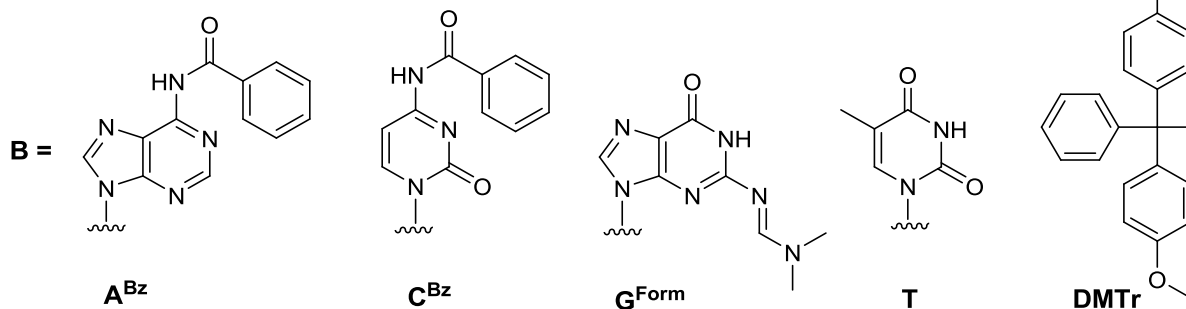
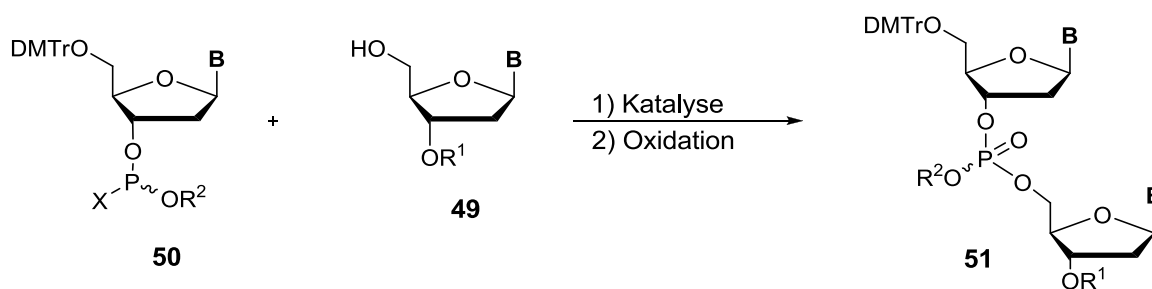


Abb. 15: Methoden zur Oligonucleotidsynthese

Die Methoden zur chemischen Synthese von Oligonucleotiden unterscheiden sich im Wesentlichen durch die Bildung der Phosphorsäureesterbindung. Unterschieden wird zwischen Triester-, H-Phosphonat-, Phosphit- bzw. Phosphoramiditmethode. Als Ausgangsverbindung der Synthesen fungiert jeweils das entsprechend geschützte Nucleosidderivat **49** (Abb. 15, S. 19).

Obwohl zahlreiche Schutzgruppen bekannt sind, haben sich aufgrund der Automatisierung der DNA-Synthese einige wenige Schutzgruppen durchgesetzt. Dies sind im Wesentlichen die von *Khorana* eingeführten Acyl-Gruppen für die exocyclischen Aminofunktionen an Adenin und Cytosin (diese wurden später durch Benzoyl (Bz) ersetzt), die Formamidin-Gruppe am Guanin sowie die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMTr) an der 5'-Hydroxyl-Gruppe der Desoxyribose.^[62]

Das Startnucleosid ist bei der automatisierten Festphasensynthese über die 3'-Hydroxyl-Gruppe und einem Linker bereits an einem CPG-Träger (*controlled pore glass*) gebunden. Der Linker zwischen dem festen Trägermaterial und dem Startnucleosid ist eine Dicarbonsäure (meist Bernsteinsäure), die wiederum an ein langkettiges Alkylamin (*long chain amino alkyl*) gebunden ist. Die wegen ihrer sehr guten Ausbeuten standardmäßig angewandte Methode ist die Phosphoramiditmethode. Hier wird ein geschütztes Phosphoramidit **50** in Gegenwart eines sauren Aktivators wie Dicyanoimidazol mit einem 5'-OH-freien Nucleosid **49** zu einem Phosphitriester umgesetzt. Die anschließende Oxidation des Phosphoratoms führt zum entsprechenden Phosphattriester **51**.

Durch die höhere Reaktivität der P(III)-Verbindungen im Gegensatz zu den P(V)-Verbindungen sind die Phosphoramidite attraktive Edukte, wobei zunächst ihre schlechte Zugänglichkeit und die Lagerfähigkeit der monomeren Bausteine ein Problem darstellte. Mit der Einführung der durch milde Säuren aktivierbaren Phosphoramidite durch *Köster*^[63] und deren Optimierung durch *Caruthers*^[64] gelang der Durchbruch, wobei heute die Diisopropylaminverbindungen im Zusammenhang mit der 2-Cyanoethyl-Schutzgruppe den besten Kompromiss darstellen.

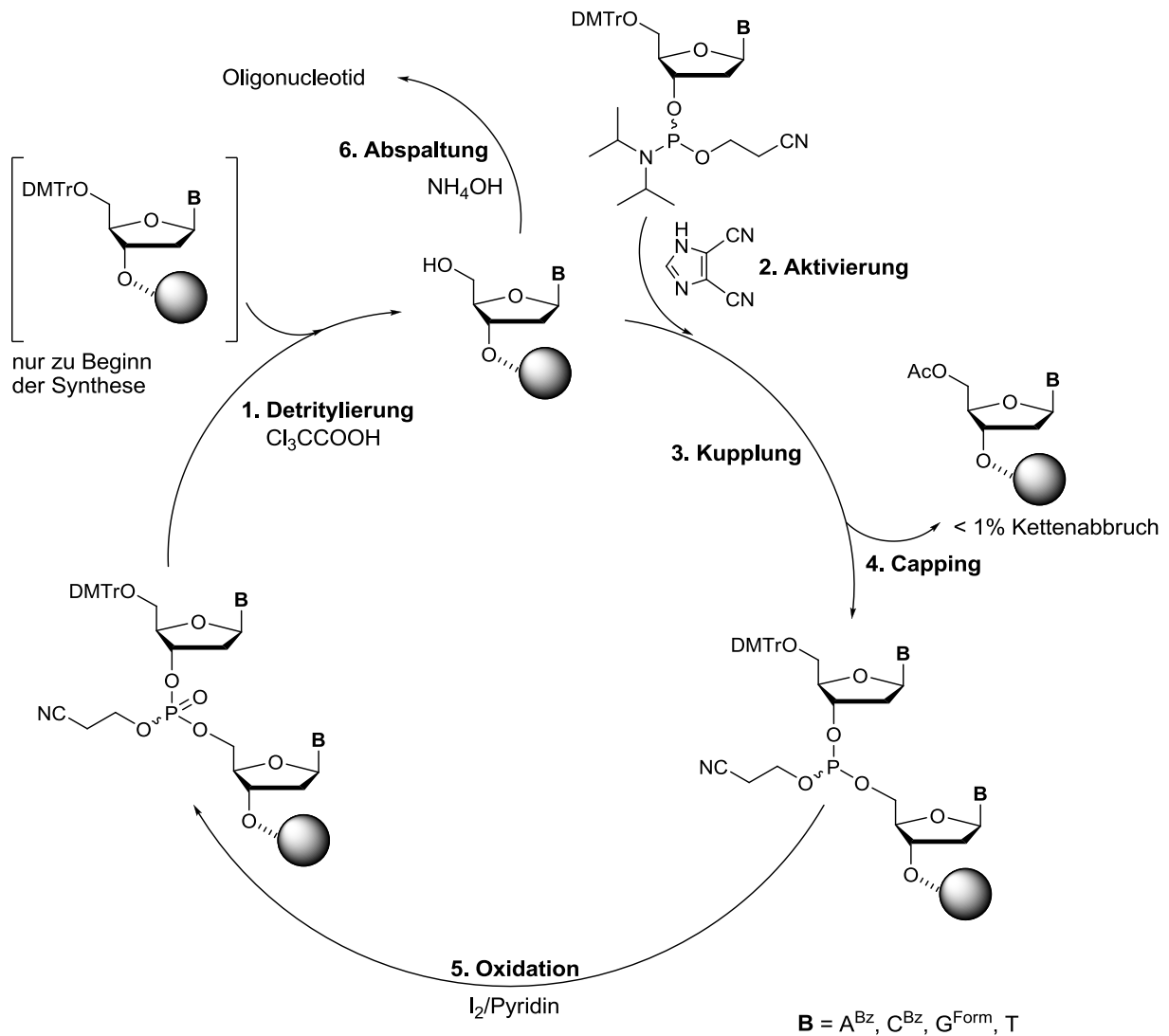


Abb. 16: Synthesecyclus der Phosphoramiditmethode

Der Synthesecyclus beginnt mit der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe durch Trichloressigsäure (Schritt 1). Darauf folgt die Aktivierung des Nucleosidphosphoramidits durch 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) (Schritt 2). Anschließend erfolgt die Addition des zuvor aktivierten Nucleosidphosphoramidits an die bereits freie 5'-OH-Gruppe des ersten Nucleosids an der festen Phase (Schritt 3). Man erhält zunächst ein 3'→5'-verknüpftes Dinucleosidphosphit mit Ausbeuten von über 99%. Zur Vermeidung von Fehlsequenzen werden daraufhin nicht umgesetzte 5'-Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid und *N*-Methylimidazol als 5'-Acetate blockiert (Schritt 4). Der anschließenden Oxidation des dreiwertigen Phosphits zum fünfwertigen Phosphat mit einer Iodlösung (Schritt 5) folgen erneut die saure

Abspaltung der nächsten DMTr-Gruppe und der Eintritt in den sich wiederholenden Syntheszyklus (Abb. 16, S. 21).

Nach Abschluss der Synthese wird unter Standardbedingungen das Oligonucleotid mit konzentrierter, wässriger Ammoniaklösung (25%) von der festen Phase abgespalten und die Schutzgruppen der Nucleobasen, sowie der Phosphatgruppen im gleichen Medium bei erhöhter Temperatur (45 °C) entfernt.

2.7 Synthese und Eigenschaften Arylamin-modifizierter Oligonucleotide

Die ersten synthetisierten C8-Arylamin-modifizierten Oligonucleotidbausteine und deren Einbau beschrieb *Rizzo*.^[46]

Problematisch dabei war die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe für die exocyclische Aminogruppe, da die entsprechenden Phosphoramidite nicht kommerziell erhältlich waren und somit aufwendig synthetisiert werden mussten.

Nach erfolgreicher Synthese verschiedener C8-Arylamin-modifizierter Phosphoramidite konnte *Gräsl* in ihrer Arbeit auch deren Einbau in verschiedene Oligonucleotide zeigen.^[47] Nach Reinigung mittels HPLC konnte sie Untersuchungen hinsichtlich der Eigenschaften dieser modifizierten Oligonucleotide durchführen. Sie beobachtete, dass die Modifikation eine destabilisierende Wirkung auf den Doppelstrang ausübt, da sich die Schmelztemperaturen (T_m -Wert) im Vergleich zum unmodifizierten Strang verringerten. Eine konformative Änderung bezüglich der Gesamtstruktur konnte jedoch nicht festgestellt werden.

In den ersten biochemischen Experimenten, Primer-Verlängerungs-Untersuchungen, konnte ein Unterschied bezüglich des 4-Aminobiphenyl-modifizierten Adduktes und den Grenzcarcinogenen festgestellt werden. Bei Versuchen mit der humanen Polymerase *Pol β* stellte *Gräsl* fest, dass das starke Carcinogen 4-Aminobiphenyl erhebliche Auswirkungen auf einen Fehleinbau gegenüber der auf das Addukt folgenden Nucleobase zeigte. Hierbei fand neben dem kanonischen Einbau eines dCTPs mit derselben Häufigkeit auch der nicht-kanonische Einbau eines dGTPs statt. Ebenso konnte sie eine Erhöhung der Selektivität der Polymerasen (*KF exo⁻*, *Pfu exo⁻*, *Pol β*) bei allen modifizierten Oligonucleotiden feststellen.

Gleichzeitig gelang auch *Rizzo* der Einbau des C8-IQ-2'-dG-modifizierten Phosphoramidits. Er untersuchte die Eigenschaften dieses modifizierten Oligonucleotides im Vergleich zu einem C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierten 12mer-Oligonucleotid und konnte ebenfalls zeigen, dass der Einfluss auf den T_m -Wert in Bezug auf den IQ-modifizierten Doppelstrang geringer ist. Allerdings konnte auch er keine Änderung in der Konformation des Doppelstranges feststellen.^[46]

Auch *Böge* konnte in seiner Arbeit beweisen, dass der Einbau mono- und polycyclischer C8-Arylamin-Modifikationen eine Verringerung des T_m -Wertes im Vergleich mit dem unmodifizierten Doppelstrang bewirkte.^[55] Er führte erstmals einen Restriktionsabbau mittels der Endonuclease *EcoRI* an modifizierten und unmodifizierten 12mer-Oligonucleotiden durch. *Böge* zeigte, dass bei einer Modifikation innerhalb der Schnittstelle des Enzyms kein Abbau stattfand und bei einer Modifikation außerhalb der Schnittstelle die Aktivität des Enzyms erniedrigt wurde. Hierbei war der Einfluss der polycyclischen Modifikation geringer als der eines monocyclischen Arylamin-Schadens. Weiterhin konnte *Böge* bei den Polymerase-Untersuchungen zeigen, dass starke Carcinogene überraschenderweise eine geringere Rate an Fehleinbauten besitzen als die monocyclischen DNA-Schäden. Da weitere Untersuchungen, insbesondere in Hinblick auf den Unterschied zwischen den acetylierten Addukten und den *NH*-Addukten nicht bekannt sind, ist es ein Ziel dieser Arbeit, zu weiteren Erkenntnissen auf diesem Gebiet zu gelangen.

2.8 Struktur C8-[(*N*-Acetyl)-]arylamin-modifizierter Oligonucleotide

Bisherige Untersuchungen in Bezug auf die Reparatur der durch aromatische Amine verursachten DNA-Schäden zeigen, dass die Struktur eine entscheidende Rolle spielt. Addukte, bei denen das aromatische Amin innerhalb der großen Furche der DNA-Helix liegt, sind gute Substrate, da sie die Basenpaarung nicht stören (*anti*-Konformation). Wohingegen Addukte, deren Arylamine in die Helix der DNA hineinragen, eher schlechte Substrate sind, da sie die Basenpaarung stören (*syn*-Konformation).^[65]

Erste Erkenntnisse wurden nach detaillierten Versuchen zur Reparatur von Benzo[*a*]pyren- und Benzo[*a*]phenanthren-Addukten erzielt. Hierbei wurde erkannt, dass bei der Reparatur verschiedene Parameter, wie z.B. der Einfluss auf die Basenpaarung sowie die Krümmung, Entwindung und Flexibilität der DNA eine Rolle zu spielen scheinen.^[66-68]

Experimentelle Untersuchungen zur Reparatur von Addukten, welche durch aromatische Amine gebildet werden, sind bislang nur für polycyclische Arylamine, wie 2-Aminofluoren **5** und 4-Aminobiphenyl **6**, sowie deren *N*-acetylierte Addukte, bekannt. Diese legen nahe, dass eine mögliche *syn*-Konformation der modifizierten Guanin-Base (Kapitel 2.5.2, S. 16) die Fähigkeit der DNA-Polymerase über das Addukt hinweg zu transkribieren verringern oder gar ganz verhindern könnte. Hinzu kommt, dass die Struktur des aromatischen Systems verantwortlich für die Stabilität der Addukte gegenüber Reparaturmechanismen ist. So scheint eine planare, aromatische Struktur wie z.B. bei 2-Aminofluoren **5**, beständiger in den untersuchten Zelllinien zu sein.^[69-71]

Strukturuntersuchungen, die genaue Aussagen über den räumlichen Einfluss der Modifikation geben würden, sind jedoch bisher nicht bekannt.

Broyde veröffentlichte 1998 computerunterstützte Rechnungen, die zeigten, dass für einen C8-Anilin-modifizierten DNA-Strang die B-DNA begünstigt ist und vorwiegend ein energetisches Minimum berechnet wurde, welches einer *anti*-Konformation entspricht. Im Gegensatz dazu fand sie heraus, dass bei dem C8-2-Fluorenyl modifizierten DNA-Strang nicht nur die *anti*-Konformation begünstigt ist, sondern zusätzlich auch andere Konformationen aufgrund ihres energetischen Minimums berechnet wurden, wie z.B. die *syn*-Konformation.^[72] Einen Beweis für die Existenz dieser *syn*-Konformation lieferte *Beland et al.* 1994.^[73] Mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen konnten sie zwei Konformationen nachweisen. In der einen Konformation interkaliert der 2-Aminofluorenyl-Rest in die Furche der DNA (*anti*-Konformation des Nucleosids) und in der anderen in den DNA-Duplex hinein (*syn*-Konformation des Nucleosids).

Carell publizierte 2008 erste Kristallstrukturen modifizierter DNA allerdings in einem Enzym/DNA-Komplex.^[74]

Weitere Strukturaufklärungen mit poly- aber auch monocyclischen Arylamin-Addukten sind bisher nicht bekannt. Da dadurch möglicherweise eine Differenzierung zwischen mono- und polycyclischen Addukten im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Struktur der DNA und somit möglicherweise auf das carcinogene Potenzial erfolgen könnte, ist dieses ein Bereich, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht wird.

2.9 Antisense-Oligonucleotide

Neben dem Interesse an der Ursachenforschung der Krebserkrankungen gilt ein weiteres Hauptaugenmerk den Behandlungsmethoden.

Bei frühzeitiger Erkennung des Tumors kann das Krebsgewebe operativ oder mittels Strahlentherapie entfernt werden. Weitere Möglichkeiten sind die Chemotherapie, bei der zellgiftige Medikamente (Zytostatika) verabreicht werden und somit starke Nebenwirkungen auftreten. Alternativ kann auch eine Hormonbehandlung durchgeführt werden, welche jedoch nicht bei allen Krebsarten eingesetzt werden kann.^[5]

Aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen bzw. eingeschränktem Nutzen der zur Verfügung stehenden Therapien wächst die Anforderung, nebenwirkungsärmere und effektivere Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln.

Einer der interessantesten und vielversprechendsten Ansätze liegt in der Inhibierung onkogener Proteine, welche in der Lage sind Mutationen und somit unkontrolliertes Zellwachstum auszulösen. Gelingt es, die Bildung solch spezifischer Proteine zu unterbinden, so wird auch die Genexpression verhindert und die Ausbreitung inhibiert. Ausgangspunkt für eine solche Inhibierung liegt in der Proteinbiosynthese (Abb. 17).

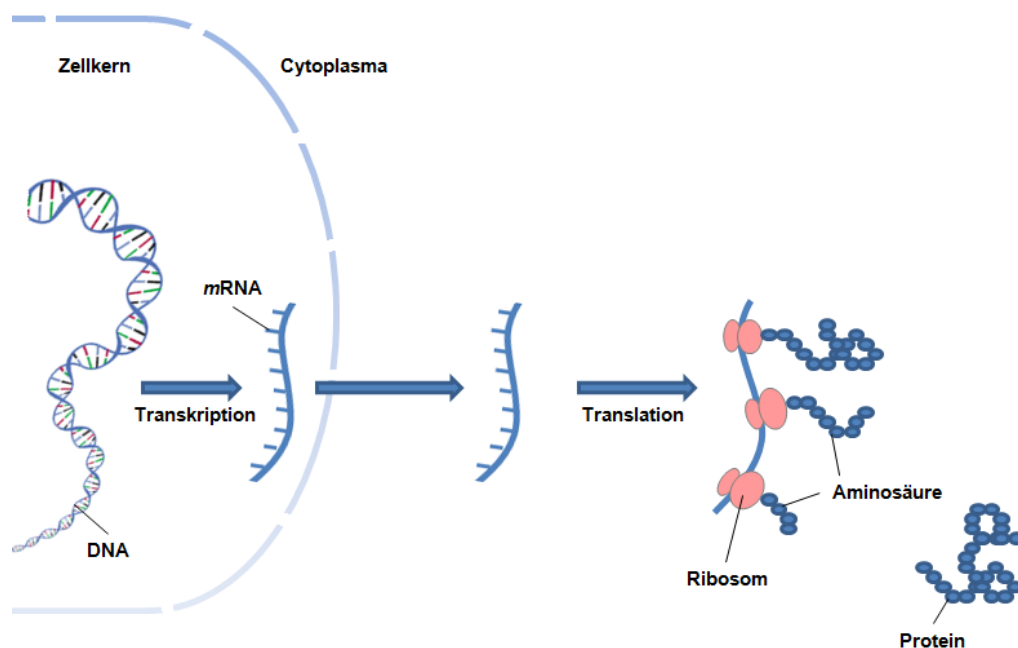


Abb. 17: Proteinbiosynthese

Der erste Schritt der Proteinbiosynthese, die Transkription, findet im Zellkern (Nucleus) statt, wobei der komplementäre Strang eines codierenden Gens auf der DNA als Matrize für die Bildung einer *mRNA* genutzt wird. Diese verlässt den Zellkern durch die Kernporen und bindet an den im Cytoplasma zahlreich vorhandenen Ribosomen. Dort dient sie als Vorlage für die Proteinbiosynthese. Dabei wird die *mRNA* schrittweise abgelesen und in eine Folge von Aminosäuren, den Grundbausteinen der Proteine, umgesetzt. Dieser Prozess wird als Translation bezeichnet.^[75]

Da die *mRNA* immer ein Zwischenprodukt in der Proteinbiosynthese darstellt, ist sie ein guter Ansatz zur spezifischen Abschaltung von Genen.

Wäre also bekannt, welche kodierende Sequenz die DNA hat und wo sie exprimiert wird, könnte eine komplementäre DNA/RNA-Sequenz entwickelt werden, die sich an die *mRNA* anlagert und die anschließende Translation in Proteine verhindert.

Das erste vollständig sequenzierte Bakteriengenom stammte von dem Krankheitserreger *Haemophilus influenzae Rd* und wurde 1995 von *Merrick et al.* veröffentlicht.^[76] Im Februar 2001 publizierten *Venter et al.* und das IHGSC (*International Human Genome Sequencing Consortium*) den ersten Entwurf der vollständigen Sequenzierung des ersten menschlichen Genoms.^[77,78]

Seither sind zahlreiche DNA-Abschnitte sequenziert worden, so dass der Analyse der carcinogenen oder auch viralen DNA keine Grenzen mehr gesetzt sind.

Somit besteht die Möglichkeit komplementäre DNA-Oligonucleotide (so genannte Antisense-Oligonucleotide) zum Eingriff in die Proteinbiosynthese zu synthetisieren. Antisense-Oligonucleotide sind synthetisch hergestellte DNA-Fragmente (Länge: 12 - 21 Nucleotide), die aufgrund ihrer Basenfolge spezifisch an eine *mRNA* binden können, welche ein Protein codiert. Bei der Bindung des Antisense-Oligonucleotids an die *mRNA* wird somit die Elongation des entsprechenden Proteins und damit die Translation unterbunden (Abb. 18, S. 27).^[79]

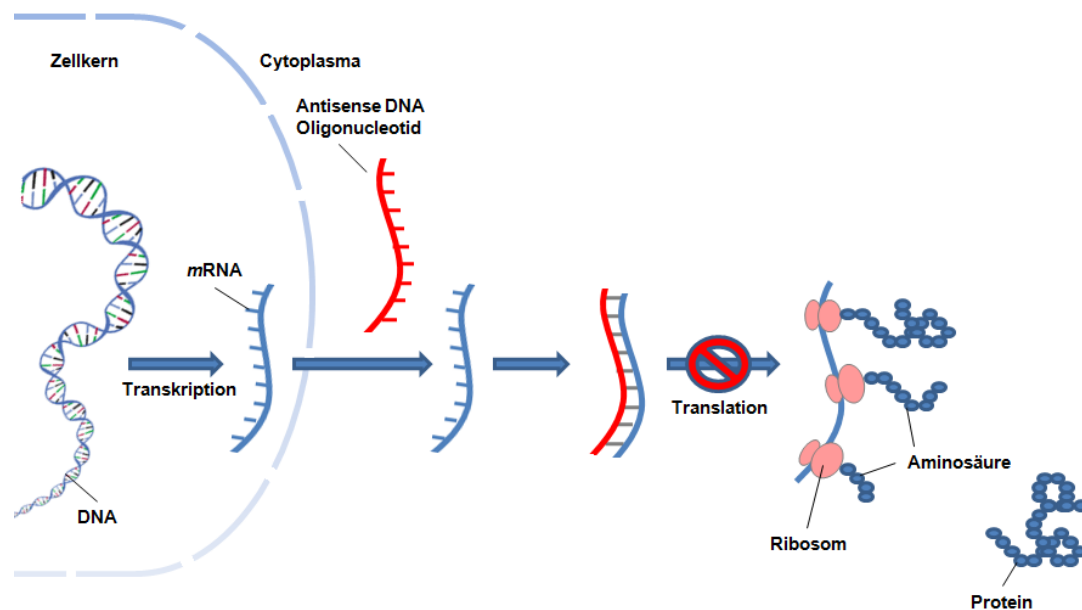


Abb. 18: Antisense-Prinzip: Inhibierung der Translation der Proteinbiosynthese

Aufgrund der Vielseitigkeit dieses Prinzips können neuartige Therapien entwickelt werden, die gezielter als bisher in die Proteinbiosynthese eingreifen.

2.9.1 Konzept

Als Beispiel eines gezielten Eingriffs in die Proteinbiosynthese zur Inhibierung der Genexpression sei hier die Anwendung des Antisense-Konzeptes genannt.

Die Attraktivität des Antisense-Prinzips als neue therapeutische Strategie resultiert aus der universellen Anwendbarkeit, der inhärent hohen Spezifität und der Möglichkeit zum rationalen Arzneimittel-Design, die allesamt auf der natürlichen Basenpaarung beruhen.^[79]

Bisher sind drei mögliche Wirkmechanismen bekannt:

Der erste Mechanismus basiert auf der Bindung des Antisense-Oligonucleotids an die mRNA, so dass eine Elongation des Proteins unterbunden wird, da durch die sterische Hinderung die weitere Translation durch das Ribosom nicht fortgeführt werden kann (Abb. 19, S. 28).^[79]

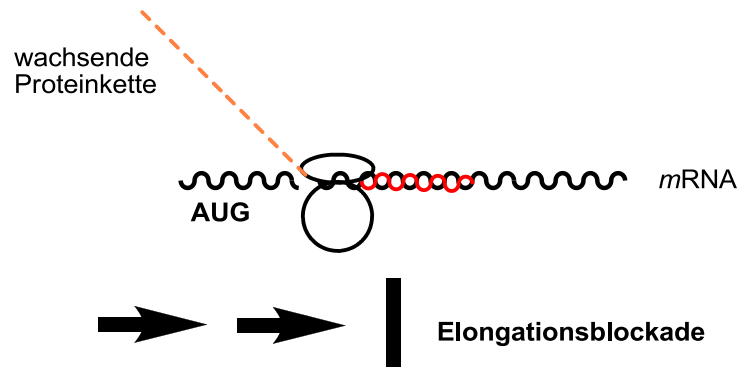


Abb. 19: Erster Wirkmechanismus von Antisense-Oligonucleotiden

Eine weitere Möglichkeit ist die Bindung des Antisense-Oligonucleotids an den Translationsstartpunkt, das sogenannte AUG-Codon. Bindet das Oligonucleotid an dieser Stelle, kann es gar nicht erst zur Anlagerung des Ribosoms und der Initiationsfaktoren kommen, so dass eine Translation unterbunden wird (Abb. 20).^[79]

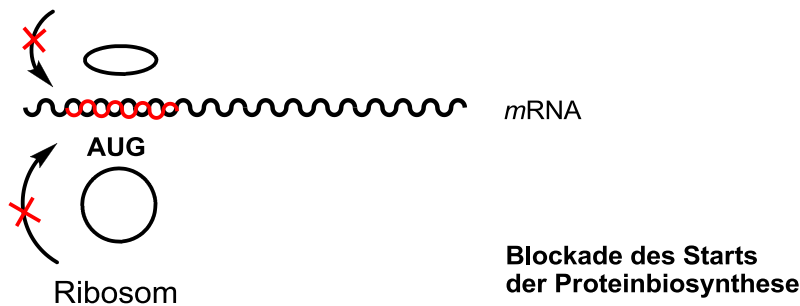


Abb. 20: Zweiter Wirkmechanismus von Antisense-Oligonucleotiden

Ein dritter Wirkmechanismus beruht auf der Aktivität der zellulären Ribonuclease H (RNase H). Dieses Enzym kommt in allen menschlichen Zellen vor. Es bindet an das DNA/RNA-Hybrid und schneidet selektiv die zum Oligonucleotid komplementäre mRNA durch Hydrolyse einer oder mehrerer Phosphatdiesterbindungen. Dadurch wird die Bindungsfestigkeit des Antisense-Oligonucleotids an die mRNA stark reduziert, so dass das Oligonucleotid dissoziiert und für die erneute Bindung an ein weiteres RNA-Molekül zur Verfügung steht. Somit wird auch hier die Translation unterbrochen (Abb. 21, S. 29).^[79]



Abb. 21: Dritter Wirkmechanismus von Antisense-Oligonucleotiden

Um als Antisense-Oligonucleotid wirksam sein zu können, muss das synthetische DNA-Fragment folgende Anforderungen erfüllen.

Zum Einen muss das Molekül eine erhöhte Lipophilie aufweisen, um Zellmembran und die Blut-Hirn-Schranke passieren und ins Innere der Zelle gelangen können. Weiterhin sollte das Nucleotid eine ausreichende Stabilität im extrazellulären Medium aufweisen, wie beispielsweise die Nucleaseaktivität, die zur Spaltung von DNA bzw. RNA führt. Die Duplex-Bildung mit dem Sense-Strang muss ausreichend stabil sein (Hybridisierung), ebenso wie die Selektivität der Hybridisierung mit der Zielsequenz. Um im Rahmen einer Therapie eine Anwendung zu finden, muss auch die Toxizität der Abbauprodukte bedacht werden.^[79]

Aufgrund der hohen Polarität von RNA- und DNA-Oligonucleotiden ergibt sich ein Hauptproblem bei der Anwendung von Antisense-Oligonucleotiden als Therapeutika, da eine passive Aufnahme von DNA- bzw. RNA-Oligonucleotiden durch die hydrophobe Zellmembran verhindert wird.

Um Oligonucleotide als Antisense-Therapeutika einsetzen zu können, werden diese chemisch modifiziert. Diese Modifikationen können an der Ribose, an der Base oder an der Phosphatdiesterbrücke lokalisiert sein.^[79]

Mittlerweile sind einige Rückgrat-modifizierte Oligonucleotide bekannt, wie z.B. Methylphosphonate, Phosphorthioate oder Phosphattriester.^[80] Sie besitzen keine Phosphatdiesterbrücken und sind somit viel stabiler gegenüber enzymatischem Abbau. Ebenso ist eine erhöhte Zellaufnahme durch rezeptorvermittelte Endocytose zu beobachten. Die durch die Modifikation erworbene Nucleaseaktivität ist jedoch so hoch, dass bei dauerhafter Verabreichung von Antisense-Oligonucleotiden eine Akkumulation innerhalb der Zelle auftreten kann. Eine Möglichkeit wäre der Einsatz eines Antisense-Oligonucleotids, dessen Halbwertszeit gerade ausreicht, um zum Zielort zu gelangen und dort seine Wirkung zu entfalten.

Diese Art von Antisense-Oligonucleotiden werden Pro-Oligonucleotide genannt.

Ein Pro-Oligonucleotid trägt eine temporäre Schutzgruppe, welche die negative Ladung des Phosphatrückgrats maskiert und durch enzymatische oder chemische Hydrolyse innerhalb der Zelle entfernt werden kann. Im Idealfall wird so ein unmodifiziertes Oligonucleotid freigesetzt, welches dann an die komplementäre mRNA binden kann. Die Modifikation sorgt weiterhin dafür, dass das Pro-Oligonucleotid selbst nicht durch Nucleasen abgebaut wird und es ins Cytoplasma gelangen kann.

2.9.2 Pro-Oligonucleotide

Die zwei bisher wichtigsten Pro-Oligonucleotid-Ansätze stammen von *Imbach et al.* und *Iyer et al.* Sie basieren auf Phosphorthioat-modifizierten Oligonucleotiden. Durch das Anbringen einer Maske an das Schwefelatom des Phosphatrückgrats konnten sie die Transporteigenschaften verbessern und die Nebenwirkungen des Antisense-stranges verringern.

Imbach et al. arbeiteten an verschiedenen lipophilen Estergruppen, welche zunächst postsynthetisch an das Phosphatrückgrat des Nucleinsäurestranges geknüpft wurden. Als Masken dienten z.B. das **Pivaloyloxymethyl-** (POM), **Methyl-S-acetylthioethyl-** (Me-SATE) oder auch **Phenyl-S-acetylthioethyl-** (Ph-SATE) (Abb. 22).^[81-88]

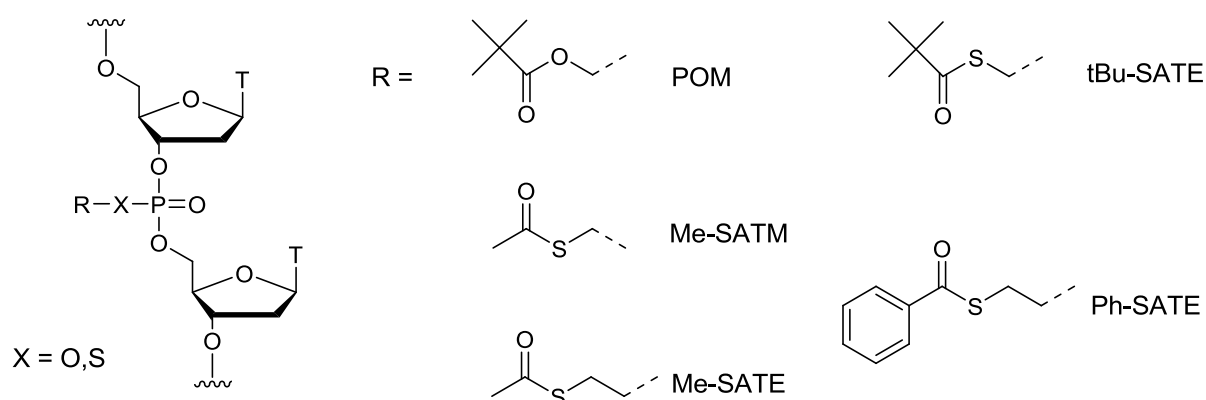


Abb. 22: Pro-Oligonucleotide von *Imbach et al.*^[88]

Der Ansatz von *Imbach* basiert auf einem Prodrug-System, der ursprünglich für die Freisetzung von anti-HIV-aktiven 5'-Phosphatnucleotiden konzipiert wurde. Die endständige Carbonsäureestergruppe der neutralen Phosphorthioattriester soll nach der Zellaufnahme enzymatisch durch Carboxyesterasen gespalten werden.

Diesem enzymatischen Initiationsschritt folgt ein chemischer Hydrolyseschritt, wodurch man zum unmaskierten Phosphorthioat gelangt. Als Spaltprodukte entstehen CO und CS bzw. Thiiran.

Dieses Konzept wurde in zahlreichen Arbeiten auch auf Phosphattriester Oligonucleotide übertragen. Erste Tests zur Zellaufnahme konnten mit 5'-fluoreszenzmarkierten Thymidindodecanucleotiden durchgeführt werden.^[89]

Mittels Hydrolysestudien konnte gezeigt werden, dass die POM- und die Me-SATM-Gruppe nicht ausreichend stabil sind, so dass der Schwerpunkt auf die SATE-Derivate gelegt wurde. Der entscheidende Nachteil dieser Schutzgruppe besteht darin, dass es sich bei dem freigesetzten Episulfid um ein toxisches Molekül handelt.

Aufgrund der Toxizität der innerhalb der Zelle abgespaltenen Masken von *Imbach*, entwickelten *Iyer et al.* alternative Masken, wie die Acyloxyderivate, deren Spaltprodukte weniger toxisch sind.^[90,91]

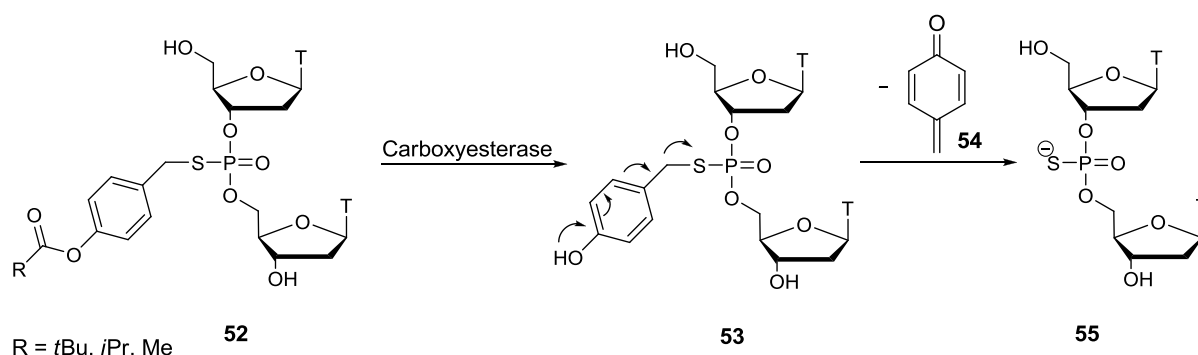


Abb. 23: Spaltungsmechanismus der Pro-Oligonucleotide von *Iyer et al.*^[91]

Die Freisetzung des Oligonucleotids erfolgt über die enzymatische Spaltung der Acylgruppe durch eine Carboxyesterase. Dadurch findet eine Umpolung des zur Benzylgruppe *para*-ständigen Restes vom Elektronenacceptor zu einem Elektronendonator statt. Diese Umpolung schwächt die Benzylesterbindung und führt zu einem spontanen Zerfall des Intermediats **53** in den Diester **55** und ein mesomerie-stabilisiertes 4-Chinonmethid **54** (Abb. 23).

Wie bei *Imbach* bereits erwähnt, erfolgt die Synthese der Acyloxyalkyl- und der Acyloxyaryl-Phosphorthioattriester-Oligonucleotide bei *Iyer* ebenfalls postsynthetisch,

indem ein Phosphorthioat in Tris-Puffer (250 mM, pH 7.0) mit dem entsprechenden Iodalkylacylaten bzw. Iodarylacylaten bei 37 °C für 3-4 Stunden umgesetzt wird.^[92]

Ein großer Nachteil der postsynthetischen Kupplung der Modifikation sind die oftmals geringen Kupplungsausbeuten, welche die Reinigung der funktionalisierten Oligonucleotide noch zusätzlich erschweren. Eine alternative Möglichkeit wäre die Modifizierung des Phosphatrückgrats vor der Oligonucleotidsynthese.

Das Problem bei der präsynthetischen Modifizierung ist, dass das modifizierte Phosphoramidit so stabil sein muss, dass es die Bedingungen der DNA-Synthese und der Entschützung übersteht. Eine andere Möglichkeit wäre die Suche nach einem alternativen Linker/Träger, welcher unter milderen Bedingungen abspaltbar ist. Erstmals konnten *Imbach et al.* 1998 eine Modifikation in Form eines Phosphotriesters präsynthetisch in ein Oligonucleotid einbauen. Hierbei war jedoch ein neu entwickelter, photolabiler Träger nötig, der mittels Photolyse innerhalb von 15 Minuten abspaltbar ist. Die β -Cyanoethylgruppen wurden zuvor mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in Tetrahydrofuran innerhalb von 20-120 Minuten gespalten.^[93]

2.9.3 Träger und Linker der Festphasensynthese

Voraussetzung für die Festphasensynthese ist ein Trägermaterial, welches durch Unlöslichkeit und Resistenz gegenüber den verwendeten Chemikalien auszeichnet. Zusätzlich sollen funktionelle Gruppen am polymeren Träger die kovalente Verknüpfung des zu synthetisierenden Produkts ermöglichen und die Struktur des Polymers die chemische Reaktion nicht beeinträchtigen.

Hauptsächlich durchgesetzt haben sich speziell definierte Glasperlen, so genanntes „controlled pore glass“ (CPG). Die Verbindung zwischen festem Träger und dem Startnucleosid wird durch einen Spacer erreicht. Dieser Spacer kann eine Aminopropylgruppe (AP-CPG) oder eine *long-chain-amino-alkyl-gruppe* (lcaa-CPG) sein (Abb. 24, S. 33).

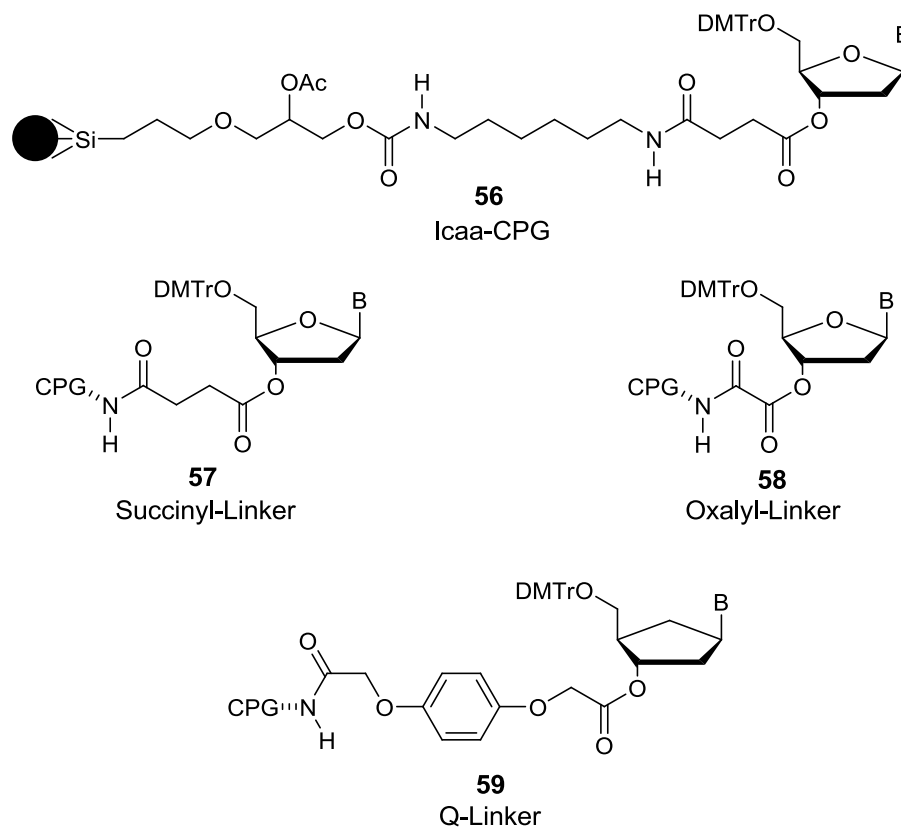


Abb. 24: Literaturbekannte Linker für die Oligonucleotidsynthese

Die Verknüpfung der Oberfläche (des Spacers) mit dem Startnucleosid wird allgemein als Linker bezeichnet. Bei dieser Verknüpfung kommt in der Regel eine Dicarbonsäure zum Einsatz, wobei am häufigsten ein Derivat der Bernsteinsäure, der so genannte Succinyl-Linker **57**, verwendet wird. Dieser Linker ist während der Oligonucleotidsynthese stabil und kann durch konzentrierte Ammoniaklösung (25% in Wasser) innerhalb einer Stunde gespalten werden. Für die Standard-DNA-Synthese hat sich dieser Succinyl-Linker **57** seit Jahren bewährt. Für basenlabile Modifikationen ist ein Linker, welcher unter milderen Bedingungen abgespalten werden kann jedoch von Vorteil. Als Alternativen sind der Oxalyl- **58** oder auch der Q-Linker **59** zu erwähnen. Der von *Letsinger* beschriebene Oxalyl-Linker **58** zeichnet sich durch sehr kurze Halbwertszeiten aus.^[94] So lässt sich dieser mit konzentrierter Ammoniaklösung schon nach fünf Minuten abspalten. Nur einige Jahre später entwickelten *Pon* und *Yu* den Q-Linker **59**.^[95] Dieser aus der Klasse der Hydrochinone stammende Linker lässt sich mit wässriger Ammoniaklösung bereits innerhalb von zwei Minuten vom Oligonucleotid abspalten. Zudem sind mildere Abspaltreagenzien wie z.B. Ammoniak in Methanol oder auch Kaliumcarbonat in Methanol bekannt.

2.9.4 Antisense-Oligonucleotide in der klinischen Phase

Zurzeit befindet sich eine große Zahl an Antisense-Oligonucleotiden gegen verschiedene Krankheiten in der klinischen Prüfung am Menschen. Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich dabei um *all*-Phosphorthioate.

Das erste, seit August 1998 als Antisense-Therapeutikum auf dem amerikanischen Markt zugelassene Oligonucleotid ist Formivirsin (VitraveneTM) von der Firma ISIS in Kooperation mit Novartis. Dies ist ein 21mer *all*-Phosphorthioat-Oligonucleotid, das die Vermehrung des humanen Cytomegalievirus (CMV) inhibiert. Weitere, von der Firma ISIS in den einzelnen klinischen Phasen erprobten Oligonucleotide richten sich z.B. gegen solide Tumoren, Hepatitis C und entzündliche Erkrankungen.

GEM 92, ein gegen HIV wirksames Antisense-Oligonucleotid, wurde zur Behandlung von AIDS entwickelt. Es handelt sich um ein chimäres Oligonucleotid aus Phosphothioat und 2'-O-Methyl-RNA, das derzeit in einer klinischen Studie durch intravenöse Infusion und auch orale Verfügbarkeit an AIDS-Patienten erprobt wird.^[79]

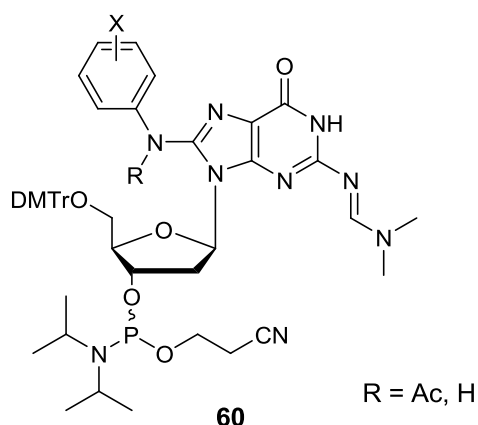
Aufgrund der komplizierten Entwicklung und Synthese eines erfolgreichen Prodrug-Konzeptes, welches auf der Stufe der Oligonucleotide mit zahlreichen Problemen einhergeht, besteht auf dem Gebiet der Prodrug-Oligonucleotide ein hohes Entwicklungspotential.

Da weitere Untersuchungen, insbesondere an präsynthetischen, Rückgrat-modifizierten Phosphotriester-Oligonucleotiden nicht bekannt sind, ist dies ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

3. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der strukturelle und biochemische Unterschied zwischen starken Carcinogenen und Grenzcancerogenen auf molekularer Ebene mit Hilfe C8-modifizierter 2'-Desoxyguanosin-Phosphoramidite **60** untersucht werden.

Dazu mussten zunächst die Oligonucleotidbausteine der C8-NH- und C8-(N-Acetyl)-arylamino-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-phosphoramidite **60** dargestellt und sequenzspezifisch in verschiedene Oligonucleotide eingebaut werden (Abb. 25).



NarI: 5' - CTC G*GC G*CC ATC - 3'

EcoRI: 5' - G*TA G*AA TTC TAC - 3'

20mer: 5' - ACA TG*A GCA TCT ACG ACG CG - 3'

Abb. 25: Modifizierte Phosphoramidite **60** und die verwendeten Oligonucleotidsequenzen

Bei den zu untersuchenden Oligonucleotidsequenzen handelte es sich um die *NarI*-Sequenz (5'-CTC GGC GCC ATC), die palindrome *EcoRI*-Sequenz (5'-GTA GAA TTC TAC) für Enzym-Abbau-Untersuchungen sowie ein 20mer-Oligonucleotid (5'-ACA TGA GCA TCT ACG ACG CG) für Primer-Verlängerungs-Studien. Alle Oligonucleotide sollten bezüglich ihrer thermischen Stabilität (T_m -Wert) und der Konformation des Doppelstranges (CD) charakterisiert werden, um Auskünfte über mögliche physikalische und strukturelle Veränderungen der modifizierten DNA-Fragmente zu geben.

Für das palindrome Oligonucleotid sollte ein Restriktionsabbau mit der Endonuclease *EcoRI* durchgeführt werden, um den Einfluss der eingebauten Modifikationen auf das Enzym bestimmen zu können.

Desweiteren sollten Primer-Verlängerungs-Untersuchungen durchgeführt werden, um den Einfluss der verschiedenen *N*-acetylierten und unacetylierten Arylamin-Modifikationen bei der Replikation untersuchen und möglicherweise Unterschiede bezüglich der Einstufung des mutagenen Potentials der Arylamine belegen zu können.

Um Aussagen über den Einfluss der Modifikation auf die Struktur des DNA-Doppelstranges treffen zu können, sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. C. Betzel, Universität Hamburg, Kristallisationsversuche der modifizierten Oligonucleotide durchgeführt werden.

In einem zweiten Teil ist es Ziel dieser Arbeit, eine geeignete Syntheseroute zur Darstellung des *iso*Butyryloxybenzyl-modifizierten 2'-Desoxythymidinphosphoramidits **61** und dessen Einbau in ein Oligonucleotid zu entwickeln (Abb. 26). Die *iso*Butyryloxybenzyl-Gruppe dient als temporäre Schutzgruppe, welche die negative Ladung des Phosphatrückgrats maskiert und durch enzymatische oder chemische Hydrolyse innerhalb der Zelle entfernt werden kann. Im Idealfall wird so ein unmodifiziertes Oligonucleotid freigesetzt, welches dann an die komplementäre mRNA, zur Inhibierung der Genexpression, binden kann. Die Modifikation sorgt weiterhin dafür, dass das Pro-Oligonucleotid selbst nicht durch Nucleasen abgebaut wird.

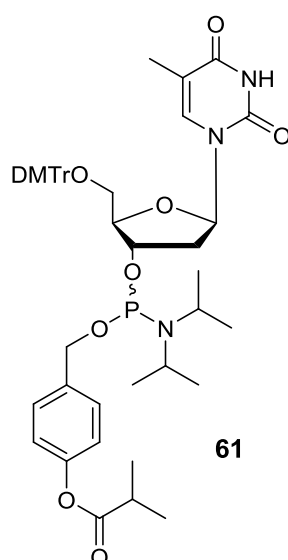


Abb. 26: *iso*Butyryloxybenzyl-modifiziertes Phosphoramidit **61**

4. Resultate und Diskussion

Um die Auswirkungen der C8-NH-arylamin- und C8-(N-Acetyl)-arylamin-Modifikationen auf molekularer Ebene untersuchen zu können, wurden zunächst die C8-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Phosphoramidite **60** synthetisiert.

4.1 Synthese der C8-(N-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Phosphoramidite zur Oligonucleotidsynthese

Die Synthese der C8-(N-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Derivate **48** sollte über eine von Böge *et al.* entwickelte Synthese der entsprechenden Modifikationen in der C8-Position von geschütztem 2'-Desoxyguanosin **45** erfolgen, welche im Anschluss in die Phosphoramidite überführt werden.^[61] Im Gegensatz zu bisher verwendeten Synthesen, bei denen eine komplexe Schutzgruppenstrategie sowie eine metallkatalysierte Kreuzkupplungsreaktion nötig waren, bietet dieser Syntheseweg eine effektive und kurze Route zu den gewünschten Oligonucleotidbausteinen. Der entscheidende Schritt bei der Synthese ist dabei die Einführung der Modifikation in C8-Position des Guanins unter Erhalt der Acetylgruppe.

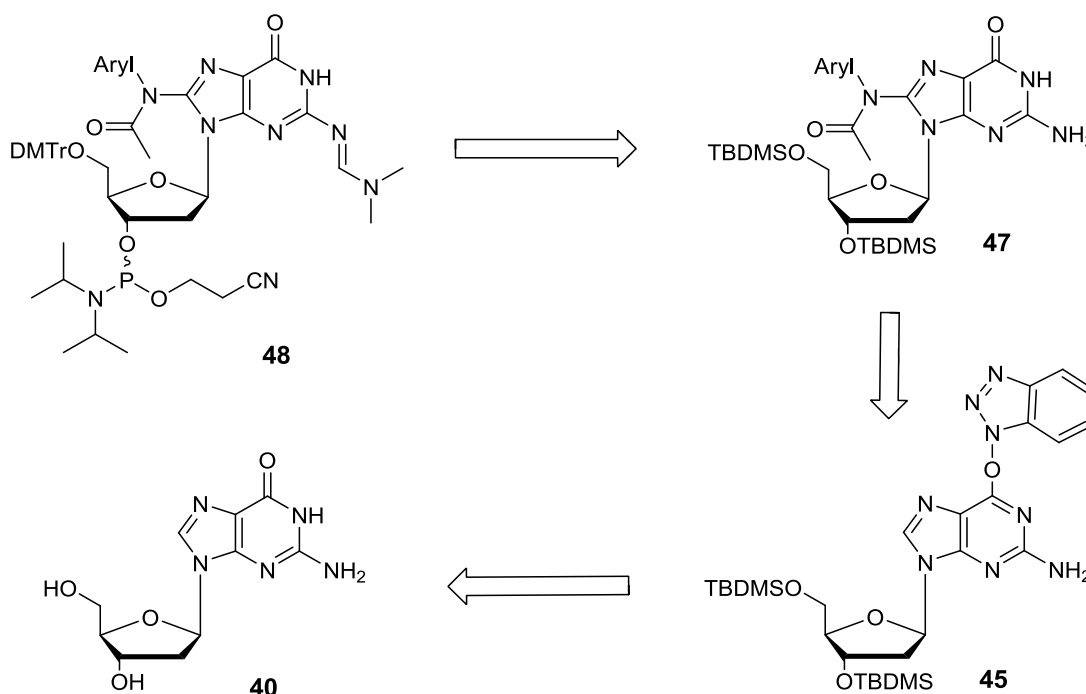


Abb. 27: Retrosynthese zur Darstellung von C8-(N-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin Phosphoramiditen **48** nach Böge^[61]

Ausgehend vom 2'-Desoxyguanosin **40** sollte in zwei Stufen das 3',5'-Bis(TBDMS)- und O⁶-Benzotriazol-geschützte 2'-dG **45** dargestellt werden. Im Anschluss wurden die in zwei Stufen aus dem jeweiligen Nitroaromaten erhaltenen Hydroxamsäure in C8-Position synthetisiert. Zur Darstellung des Zielmoleküls **48** wurden nach erfolgreicher Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Derivate **47** die TBDMS-Schutzgruppen abgespalten, die exocyclische Aminogruppe sowie die 5'-Hydroxygruppe geschützt und abschließend das Phosphoramidit in 3'-Position gebildet (Abb. 27, S. 37).

Zunächst wurden die beiden Edukte, die Hydroxamsäuren und das geschützte 2'-Desoxyguanosin **45** wie im Anschluss beschrieben, für die Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Derivate **47** hergestellt.

4.1.1 Synthese der Hydroxamsäure

Ausgehend von den Nitroaryl-Derivaten sollten zunächst die Hydroxylamine und anschließend durch Acetylierung die Hydroxamsäuren synthetisiert werden.

Aufgrund der hohen Kosten wurde 4-Nitrobiphenyl **63** zuvor aus 4-Aminobiphenyl **62** analog zu *Webster* dargestellt (Abb. 28).^[96]

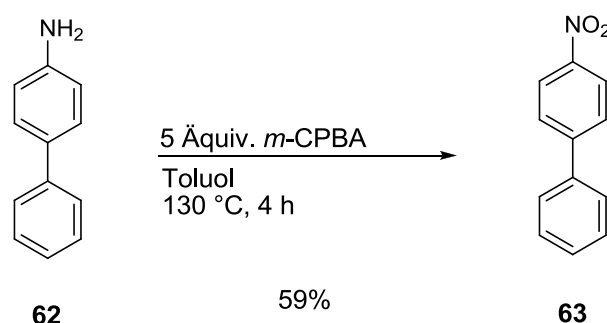
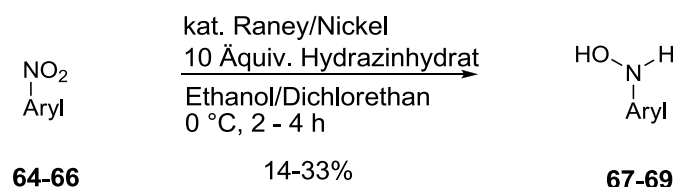


Abb. 28: Oxidation von 4-Aminobiphenyl **62** zu 4-Nitrobiphenyl **63**

Die Oxidation des 4-Aminobiphenyls **62** erfolgte mit *meta*-Chlorperbenzoes\u00e4ure (*m*-CPBA) bei einer Temperatur von 130 °C und lieferte nach vierst\u00fcndigem R\u00fchren und s\u00e4ulenchromatographischer Reinigung 4-Nitrobiphenyl **63** in einer Ausbeute von 59%.

Im Anschluss folgte die Reduktion der Nitroverbindungen **64-66** zu den Hydroxylaminen nach *Ayyangar* (Abb. 29, S. 39).^[97]


Abb. 29: Reduktion der Nitroaryl-Derivate **64-66**

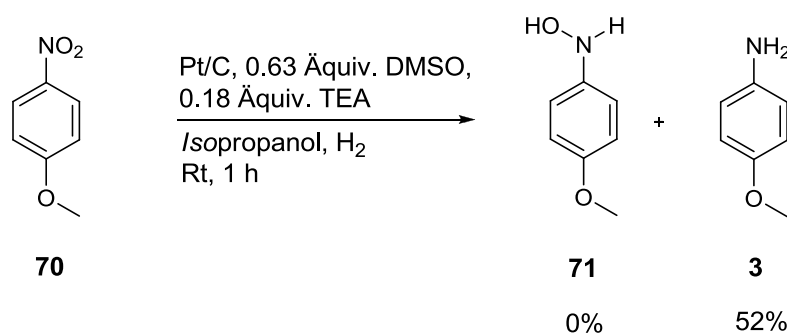
Zunächst wurden die entsprechenden Edukte **64-66** in Ethanol/Dichlorethan (1:1 v/v) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Parallel dazu wurde das über Wasser gelagerte Raney/Nickel mittels einer Vakuumpumpe getrocknet. Unter Eiskühlung wurde die Nitroaryl-Lösung zu dem getrockneten Raney/Nickel gegeben und mit Hydrazinhydrat (80%) versetzt. Nach erfolgter Umsetzung wurde der Katalysator abgetrennt und das Rohprodukt aus Toluol kristallisiert. Anhand NMR-spektroskopischer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass als Nebenprodukte die jeweiligen Amine gebildet wurden. Dies erklärt auch die geringen Ausbeuten der in Tabelle 1 aufgeführten Hydroxylamin-Derivate **67-69**.

Tab. 1: Ausbeuten der Hydroxylamin-Derivate **64-66**

Produkt	Aryl	Ausbeute
67	Phenyl	21%
68	3,5-Dimethylphenyl	33%
69	4-Biphenyl	14%

Aufgrund der niedrigen Ausbeuten wurden alternative Reduktionsbedingungen zur Darstellung der Hydroxylamine gesucht.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion von Nitroverbindungen publizierte *Takenaka* (Abb. 30).^[98]


Abb. 30: Versuch zur Darstellung von *N*-(4-Methoxyphenyl)hydroxylamin **71**

Hierbei wurde 4-Nitroanisol **70** in *Isopropanol* gelöst und mit Platin auf Aktivkohle, DMSO sowie Triethylamin versetzt. Nach einstündigem Rühren unter Wasserstoffatmosphäre konnte dünn-schichtchromatographisch keine Reduktion zum Hydroxylamin **71** festgestellt werden. Einzig das Edukt **70** sowie das Amin **3** wurden detektiert.

Eine weitere Synthesemöglichkeit verlief analog zu *Ren* (Abb. 31).^[99]

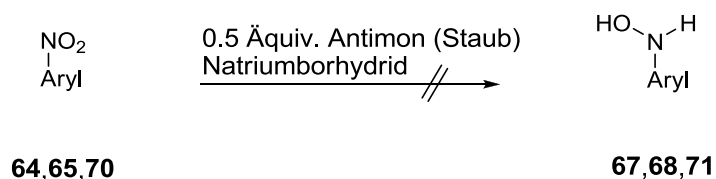


Abb. 31: Versuch zur Darstellung der Hydroxylamin-Derivate **67,68,71**

Die Reduktion mit 0.5 Äquivalenten Antimonstaub und 3 Äquivalenten Natriumborhydrid in Methanol lieferte mit 4-Nitroanisol **70** nach einer halben Stunde Rühren bei Raumtemperatur nur das Amin (Tab. 2).

Tab. 2: Reaktionsoptimierung der Reduktion zu den Hydroxylaminen

Aryl	NaBH ₄ (Äquiv.)	T [°C]	t [h]	Lösungsmittel	Ergebnis
4-Methoxyphenyl	3	Rt	0.5	Methanol	<i>p</i> -Anisidin
4-Methoxyphenyl	3	Rt	16	Ethanol	keine Reaktion
4-Methoxyphenyl	1.5	0	1	Methanol	nur Edukt 70 + <i>p</i> -Anisidin
Phenyl	1.5	Rt	1	Methanol	Anilin
Phenyl	1.5	0	3	Methanol	nur Edukt 64 + Anilin
3,5-Dimethylphenyl	1.5	Rt	2	Methanol	3,5-Dimethylanilin
3,5-Dimethylphenyl	1.5	0	5	Methanol	nur Edukt 65 + 3,5-Dimethylanilin

Aufgrund der vollständigen Reduktion des 4-Nitroanisols **70** zum *p*-Anisidin wurden die Reaktionsbedingungen variiert. Zunächst wurde anstelle von Methanol Ethanol verwendet. Hierbei war nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden dünn-schichtchromatographisch keine Umsetzung zum gewünschten Produkt **71** zu beobachten und die Reaktion wurde abgebrochen. Daher wurde erneut Methanol als Lösungsmittel verwendet. Hierbei wurde die Menge an Natriumborhydrid von drei Äquivalenten auf 1.5 Äquivalente reduziert. Es wurden sowohl das Phenyl- **64**, das 4-Methoxyphenyl- **70** als auch das 3,5-Dimethylphenyl-Derivat **65** verwendet, um auszuschließen, dass die Substituenten den Reaktionsverlauf negativ beeinflussen.

Da sich die Reaktionslösung während der Zugabe des Natriumborhydrids stark erwärmt hatte, wurde die Reaktion je Ansatz sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 0 °C durchgeführt. Alle Reaktionen wurden in einem Zeitraum von einer bis fünf Stunden in Methanol durchgeführt. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Reaktionen bei Raumtemperatur nur zu den jeweiligen Aminen führten, wo hingegen die Reaktionen bei 0 °C anhand dünnschichtchromatographischer Kontrolle ein Gemisch aus Edukt und Amin zeigten. Eine Detektion des Hydroxylamins war in allen Fällen nicht möglich. Somit lieferte auch dieser Weg keine geeignete Synthese zur Darstellung der Hydroxylamine (Tab. 2, S. 40).

Eine weitere Methode war die Reduktion mittels Zink und Ammoniumformiat nach *Shi* (Abb. 32).^[100]

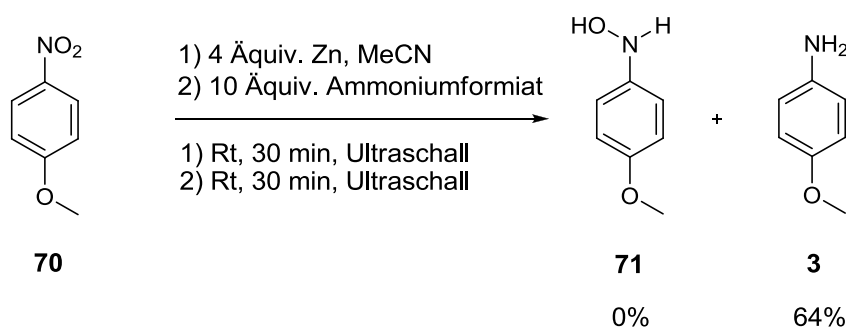


Abb. 32: Reduktion des 4-Nitroanisols **70** nach *Shi*^[100]

Bei dieser Reaktion wurde 4-Nitroanisol **70** in Acetonitril gelöst, mit Zink versetzt und 30 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde Ammoniumformiat zugegeben und weitere 30 Minuten mit Ultraschall behandelt. Auch mittels dieser Reaktion waren nur das 4-Anisidin **3** (64%) und keine Bildung von *N*-(4-Methoxyphenyl)hydroxylamin **71** dünnschichtchromatographisch detektiert.

Aufgrund der erfolglosen Versuche, eine alternative Route zur Reduktion mittels Raney/Nickel zu finden, wurden alle weiteren Reduktionen der Nitroaryl-Derivate **64-66,70** und **72-75** zu den entsprechenden Hydroxylarylamin-Addukten **67-69,71** und **76-79** mittels der Reaktion nach *Ayyangar* durchgeführt.^[97] Um die Bildung des Amins zu unterdrücken, sollten diese zunächst optimiert werden. Hierzu wurden sowohl die Äquivalente an Hydrazinhydrat variiert als auch die Temperatur kontrolliert.

Die Reduktion nach *Ayyangar* (Abb. 29, S.39) wurde mit zehn Äquivalenten Hydrazinhydrat (80%) durchgeführt und je nach verwendetem Nitroaryl für zwei bis vier Stunden bei einer Temperatur unter 10 °C gerührt.^[97] Aufgrund der geringen Ausbeuten und dem damit verbundenen hohen Anteil an Nebenprodukt (Amin), sollte die optimale Anzahl an Äquivalenten an Hydrazinhydrat am Beispiel des 4-Nitroanisols **70** ermittelt werden.

Unter Verwendung von 12, 8 bzw. 6.5 Äquivalenten Hydrazinhydrat (80%) wurden die Reaktionen für 30 bzw. 60 Minuten gerührt (Tab. 3).

Tab. 3: Reaktionsoptimierung der Reduktion von 4-Nitroanisol **70**

Äquiv. Hydrazinhydrat	Zeit [min]	Ausbeute [%]
12	30	93
8	30	87
8	60	91
6.5	30	94
6.5	60	74

Nach Aufarbeitung konnte für die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen festgestellt werden, dass diese bei kürzerer Reaktionszeit höher waren als bei längerer Reaktionszeit. Ein deutlicher Einfluss der Anzahl an Äquivalente an Hydrazinhydrat konnte nicht ermittelt werden, so dass für die folgenden Reduktionen 6.5 Äquivalente Hydrazinhydrat und eine Reaktionszeit von 30 Minuten verwendet wurde (Abb. 33).

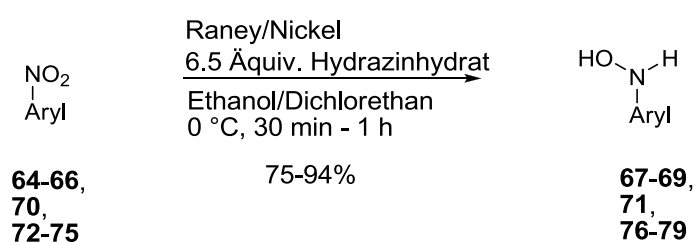


Abb. 33: Reduktion der Nitroaryl-Derivate **64-66,70** und **72-75**

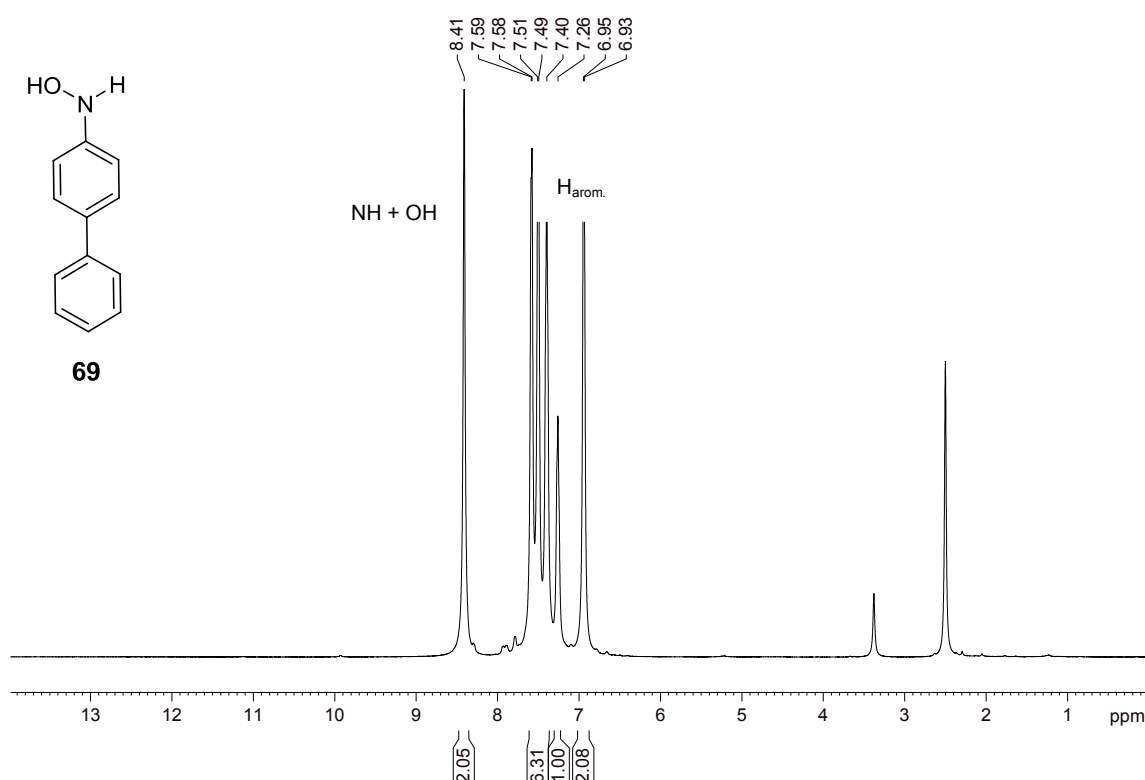
In Tabelle 4 (S. 43) sind alle nach dieser Methode hergestellten Hydroxylamine und den entsprechenden Ausbeuten dargestellt.

Tab. 4: Ausbeuten der Hydroxylamin-Derivate **67-69,71,76-79**

Produkt	Aryl	Ausbeute
67	Phenyl	83%
76	4-Methylphenyl	75%
71	4-Methoxyphenyl	94%
77	4-Hydroxyphenyl	-
78	4-Cyanophenyl	n.b.
68	3,5-Dimethylphenyl	89%
79	2-Fluorenyl	80%
69	4-Biphenyl	88%

n.b. = nicht bestimmbar, da Verunreinigungen enthalten

Durch zahlreiche Untersuchungen konnte eine Abhängigkeit zwischen dem Temperaturanstieg während der Hydrazinhydratzugabe und der Entstehung der Amine beobachtet werden. Unter strenger Einhaltung einer Temperatur von 0 °C und kurzen Reaktionszeiten von maximal einer Stunde konnten somit die Ausbeuten auf 75-94% erhöht werden. In der folgenden Abbildung ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 4-Biphenyl-modifizierten Adduktes **69** dargestellt (Abb. 34).


Abb. 34: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des *N*-(4-Biphenyl)hydroxylamins **69** in DMSO-d_6

Die hohe Reinheit der durch Kristallisation erhaltenen Addukte ist am Beispiel des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des 4-Biphenyl-modifizierten Adduktes **69** in Abbildung 34 (S. 43) exemplarisch dargestellt.

Das 4-Cyanophenyl-modifizierte Hydroxylamin **78** konnte durch Kristallisation nicht isoliert werden. Eine säulenchromatographische Reinigung ist aufgrund der Instabilität der Hydroxylamine nicht möglich, so dass dieses Rohprodukt **78** direkt zur Hydroxamsäure umgesetzt wurde.

Ein weiteres Problem war die Darstellung des 4-Hydroxyphenyl-Derivates **77**. Hier ergab die Reduktion nicht das gewünschte Produkt.

Aufgrund des großen Interesses an dieser Verbindung durch die Analogie zum bekannten Paracetamol sollte der Reduktion die Einführung einer Schutzgruppe an die Hydroxygruppe vorausgehen.

Hierzu wurde die von *Rahmathullah* verwendete Methylcarbonatgruppe eingeführt (Abb. 35).^[101] Diese ist säurestabil und wird erst durch Basen in Kombination mit erhöhter Temperatur abgespalten. Somit sollte diese Gruppe bis nach der Oligonucleotidsynthese an der Hydroxygruppe verbleiben.

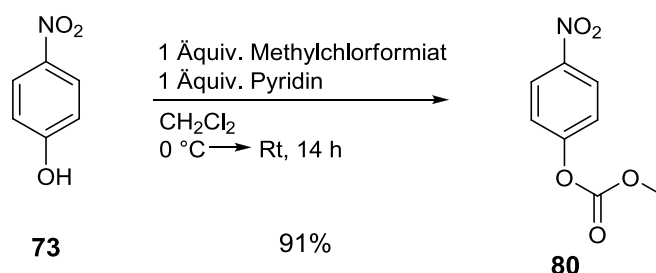


Abb. 35: Schützung der Hydroxygruppe nach *Rahmathullah*^[101]

Zur Darstellung wurde 4-Nitrophenol **73** in Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung mit Methylchlorformiat und Pyridin versetzt. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und 14 Stunden gerührt. Die anschließende Extraktion und säulenchromatographische Reinigung lieferte das geschützte Produkt **80** in 91% Ausbeute.

Anhand des geschützten Nitrophenol-Derivates **80** sollte zunächst die Stabilität der Schutzgruppe unter den verwendeten Reaktionsbedingungen bis zum Phosphoramidit untersucht werden (Tab. 5. S. 45).

Tab. 5: Stabilitätsuntersuchungen der Methylcarbonatgruppe anhand der folgenden Reaktionsbedingungen

Bedingungen	Zeit [h]	Zersetzung (DC)
Raney/Nickel, Hydrazinhydrat, Dichlorethan/Ethanol	2	keine
Acetylchlorid, NaHCO ₃ -Lösung, Diethylether	2	keine
Cs ₂ CO ₃ , 1,2-DME	20	keine
Et ₃ N/ Et ₃ N*3HF, Dichlormethan/Tetrahydrofuran	20	gering
N,N'-Dimethylformamid-diethylacetal, Pyridin	20	gering
DMTr-Chlorid, Pyridin	20	gering
Dicyanoimidazol, Phosphitylierer, Dichlormethan, Acetonitril	20	keine

Die in Tabelle 5 gezeigten Stabilitätstests basieren auf dünnschichtchromatographischer Reaktionsverfolgung. Dabei konnte unter den verwendeten Reaktionsbedingungen der einzelnen Synthesen entweder keine Veränderung oder lediglich eine geringe Zersetzung beobachtet werden, die sich in der Bildung eines zweiten Spots auf der Silicafolie zeigte. Die Abspaltung der Methylcarbonatgruppe erfolgte durch Ammoniak innerhalb von vier Stunden bei 45 °C. Hierbei konnte die vollständige Entschützung beobachtet werden. Durch die ermittelte Stabilität gegenüber den folgenden Reaktionsbedingungen und der Labilität unter den Standard-Spaltungsbedingungen für die Oligonucleotidsynthese sollte die Umsetzung zum Hydroxylamin durchgeführt werden. Unter den zuvor ermittelten optimalen Bedingungen wurde das geschützte Derivat **80** mittels Raney/Nickel und Hydrazinhydrat (80%) reduziert (Abb. 36).

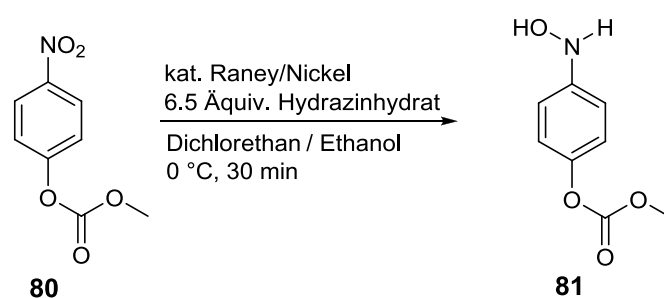


Abb. 36: Reduktion des geschützten Nitrophenol-Derivates **80**

Die Reaktion wurde nach 30 Minuten abgebrochen, da dünnschichtchromatographisch neben dem Hydroxylamin **81** ebenfalls das Amin detektiert werden konnte.

Nach erfolglosem Versuch der Kristallisation des Produktes **81** wurde auch hier die direkte Umsetzung zur entsprechenden Hydroxamsäure vorgenommen.

Parallel zu der Methylcarbonatgruppe wurde auch eine weitere, die *tert*Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe (TBDMS), analog zu *Hopkins* eingeführt (Abb. 37).^[102]

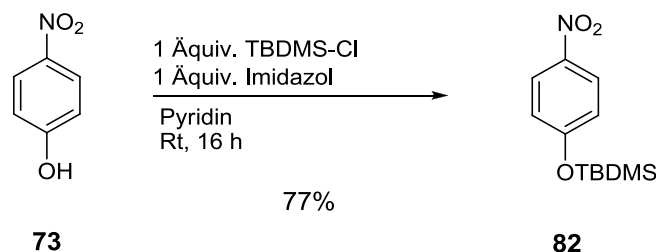


Abb. 37: TBDMS-Schätzung der Hydroxygruppe nach *Hopkins*^[102]

Hierzu wurde 4-Nitrophenol **73** in Pyridin gelöst und mit TBDMS-Chlorid sowie Imidazol versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden bei Raumtemperatur und säulenchromatographischer Reinigung konnte das geschützte Addukt **82** in einer Ausbeute von 77% erhalten werden.

Anschließend sollte anhand dieser TBDMS-geschützten Verbindung **82** die Reduktion zum Hydroxylamin erfolgen (Abb. 38).

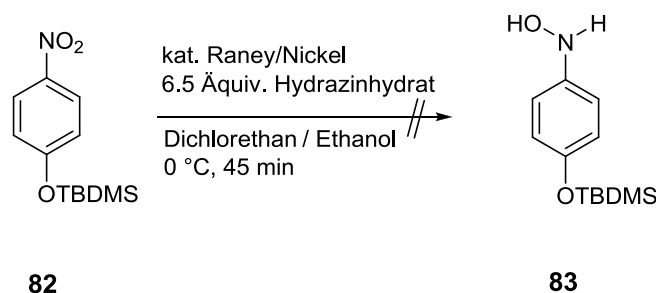


Abb. 38: Reduktion des TBDMS-geschützten 4-Nitrophenols **82**

Nach einer Reaktionszeit von 45 Minuten konnte dünn-schichtchromatographisch nur die Umsetzung zum Amin sowie eines weiteren Nebenproduktes, welches sich als 4-Aminophenol herausstellte, und kein Hydroxylamin **83** detektiert werden. Somit ist die TBDMS-Schutzgruppe für die Reduktion der Nitroaryl-Verbindung **82** mittels Raney/Nickel ungeeignet.

Anhand der zuvor dargestellten Hydroxylamine sollte sich nun die Umsetzung zu den Hydroxamsäuren anschließen. Die Oxidation verlief analog zu *Nelson* (Abb. 39).^[103]

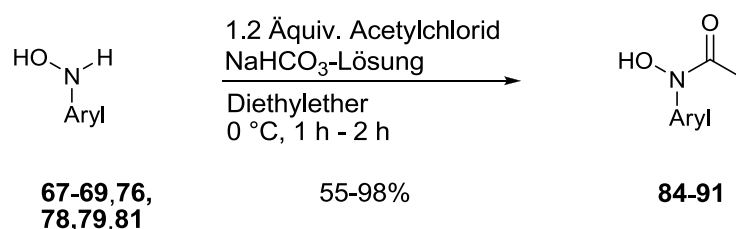


Abb. 39: Acetylierung der Hydroxylamine **67-69,76-79,81**

Die Hydroxylamine **67-69,76-79,81** wurden in Diethylether gelöst, auf 0 °C gekühlt, mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Acetylchlorid versetzt und für ein bis zwei Stunden, je nach verwendetem Hydroxylamin, gerührt. Nach Extraktion konnten die Hydroxamsäuren **84-91** in Ausbeuten von 55% bis 98% erhalten werden (Tab. 6).

Tab. 6: Ausbeuten der Acetylierung

Produkt	Aryl	Ausbeute
84	Phenyl	84%
85	4-Methylphenyl	98%
86	4-Methoxyphenyl	55%
87	4-Hydroxyphenyl	-
88	4-Cyanophenyl	n.b.
89	3,5-Dimethylphenyl	93%
90	2-Fluorenyl	78%
91	4-Biphenyl	98%

n.b. = nicht bestimmbar, da Verunreinigungen enthalten

In Abbildung 40 (S. 48) ist exemplarisch das ¹H-NMR-Spektrum der reinen 4-Biphenyl-modifizierten Hydroxamsäure **91** dargestellt.

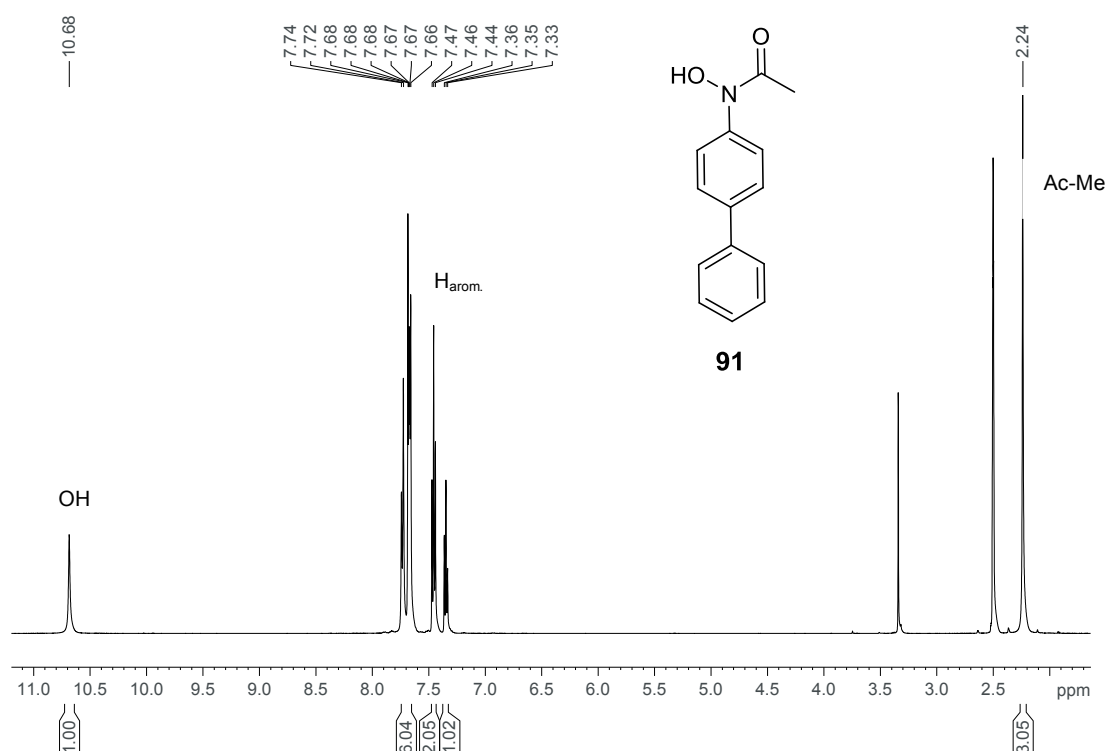


Abb. 40: ^1H -NMR-Spektrum der *N*-Acetyl-*N*-(4-biphenyl)hydroxamsäure **91** in $\text{DMSO-}d_6$

Einzig die Synthesen der *N*-Acetyl-*N*-(4-cyanophenyl)-hydroxamsäure **88** und der *N*-Acetyl-*N*-(4-methoxycarbonyloxyphenyl)-hydroxamsäure **87** konnten mittels der Reaktion nach *Nelson*^[103] nicht rein erhalten werden. Bei dem 4-Cyanophenyl-modifizierten Hydroxylamin **78** ist dies wahrscheinlich auf die verunreinigte Vorstufe zurückzuführen, so dass anhand der Extraktion nicht alle Nebenprodukte abgetrennt werden konnten. Da anhand NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Untersuchungen die Verbindung nachgewiesen wurde, sollte dieses Rohprodukt **88** direkt in der nächsten Stufe, der Synthese mit dem Nucleosid, umgesetzt werden. Aufgrund der stark basischen und sauren Bedingungen während der Extraktion wurde vor der Aufarbeitung des geschützten 4-Hydroxyphenyl-modifizierten Derivates **87** eine NMR-spektroskopische Analyse vorgenommen, um die mögliche Entstehung des Produktes nachzuweisen. Dieses konnte allerdings weder im NMR noch in der Massenanalyse ermittelt werden.

Ein weiterer Versuch zur Acetylierung erfolgte mit Essigsäureanhydrid und 4-DMAP (4-Dimethylaminopyridin) analog zu *Vorbrüggen* (Abb. 41).^[104]

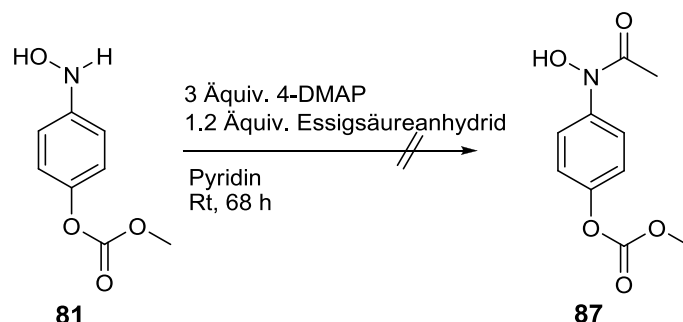


Abb. 41: Versuch der Acetylierung des geschützten Phenol-Derivates **81**

Das geschützte Phenol-Derivat **81** wurde in Pyridin gelöst und mit Essigsäureanhydrid und 4-DMAP versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 68 Stunden konnte dünn-schichtchromatographisch nur der Zerfall in Methyl-4-nitrophenylcarbonat **80** beobachtet werden.

Somit konnte das 4-Nitrophenol-Derivat **81** nicht in die entsprechende Hydroxamsäure umgewandelt und folglich auch nicht in C8-Position am 2'-Desoxyguanosin eingeführt werden.

4.1.2 Synthese des geschützten 2'-Desoxyguanosinbausteins **45**

Zur Darstellung des O^6 -Benzotriazol-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosins **45**, wurden zunächst die 3'- und 5'-Hydroxyfunktionen blockiert, um später unerwünschte Reaktionen an diesen Stellen zu verhindern. Hierzu wurde die Synthese analog zu *Hopkins* durchgeführt (Abb. 42).^[102]

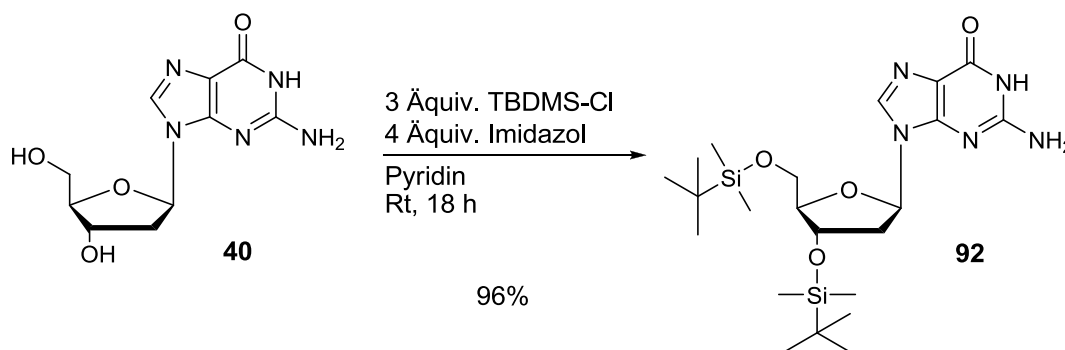


Abb. 42: Schützung der 3',5'-Hydroxyfunktion als Silylether analog zu *Hopkins*^[102]

In einem ersten Schritt wurde 2'-Desoxyguanosin **40** in Pyridin gelöst und anschließend mit TBDMS-Chlorid und Imidazol versetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das gewünschte Produkt **92** in einer sehr guten Ausbeute von 96% erhalten werden.

Als nächstes sollte die von *Lakshman* zur Synthese C6-modifizierter Inosin-Derivate etablierte Benzotriazol-Funktion eingeführt werden (Abb. 43),^[105] da auf diese Weise nach der Addition von Benzotriazol an die O⁶-Position des Inosins, nucleophile Substitutionsreaktionen mit Alkoholen, Aminen, Phenolen und Thiolen gelungen waren.

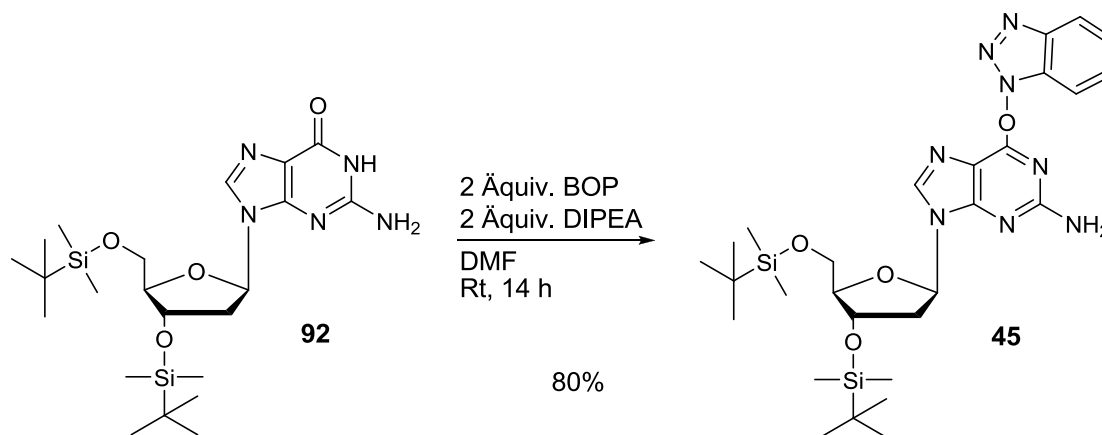


Abb. 43: Benzotriazol-Schätzung von 3',5'-Bis(TBDMS)-2'-dG **92**

Für diese Reaktion wurde das geschützte Nucleosid **92** in Dimethylformamid (DMF) gelöst und anschließend mit Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) und Diisopropylethylamin (DIPEA; Hünings Base) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 14 Stunden und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt in einer Ausbeute von 80% isoliert werden, im Gegensatz zu den in vorangegangenen Arbeiten 65%.^[55] Dies ist zum Einen auf die optimierte Äquivalentemenge des BOP zurückzuführen, hierbei wurden die besten Ergebnisse mit zwei Äquivalenten erhalten, im Gegensatz zu einem Äquivalent. Zum Anderen konnte mittels dünnschichtchromatographischer Reaktionsverfolgung festgestellt werden, dass die Reaktion nach 12 bis 16 Stunden quantitativ erfolgt ist. Eine längere Reaktionszeit wie in den Arbeiten zuvor, bewirkte einzig die Zersetzung des Produktes zu 2'-Desoxyguanosin **40**. Zuletzt wurde die Aufarbeitung optimiert. Anstelle der wässrigen Aufarbeitung mit anschließender säulenchromatographischer

Reinigung wurde das Rohprodukt direkt chromatographisch gereinigt. Somit wurde eine Ausbeutesteigerung von 15%, auf insgesamt 80% erzielt.

Mit diesen beiden Ausgangsverbindungen, dem O^6 -Benzotriazol-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **45** und den Hydroxamsäuren **84-91**, konnte anschließend die Synthese der in C8-Position modifizierten 2'-dG-Derivate durchgeführt werden.

4.1.3 Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin-Addukte

Das ursprüngliche Ziel von Böge war, eine basenkatalysierte Substitution mit dem Benzotriazol-geschützten 2'-dG-Derivat **45** durchzuführen. Basierend auf den von Lakshman^[105] publizierten Ergebnissen sollte die *N*-Acetyl-*N*-phenylhydroxamsäure **84** mittels Base deprotoniert werden und selektiv unter Abspaltung von Hydroxybenzotriazol an der C6-Position angreifen. Unerwartet wurde anhand von NMR-spektroskopischen Analysen die Modifikation nicht an der O^6 -Position **93**, sondern an der C8-Position **94** lokalisiert (Abb. 44).^[55]

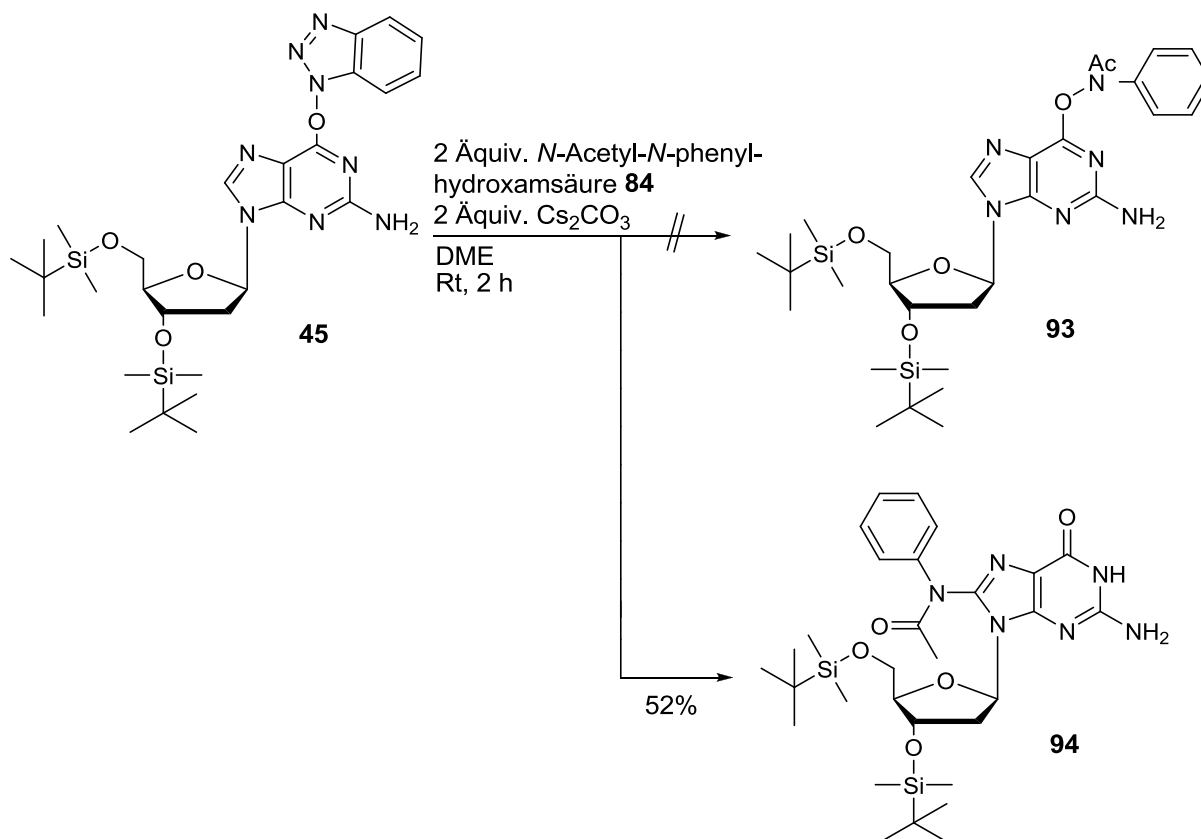


Abb. 44: Kupplung der *N*-Acetyl-*N*-phenylhydroxamsäure **84**

Die Umsetzung zum Produkt **94** gelang dabei in 1,2-Dimethoxyethan unter Zugabe von Cäsiumcarbonat und der Hydroxamsäure **84** nach zwei Stunden mit einer Ausbeute von 52% in C8-Position des geschützten Nucleosids.

Mit dieser Methode sind offensichtlich die O^6 -Addukte nicht zugänglich, jedoch gelang es eine neue Methode zu entwickeln, schnell und effizient C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-Addukte darzustellen.^[61]

Anhand dieser neuen Reaktion konnte die einzige bislang veröffentlichte Syntheseroute solcher Addukte von *Gillet* und *Schärer*^[59] über zwölf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 6% umgangen werden. Hierbei sind keine komplexe Schutzgruppenstrategien sowie keine metallkatalysierte Kreuzkupplungsreaktionen nötig. Allerdings scheint eine Aktivierung der O^6 -Position mit Benzotriazol elementar.

In einer von *Böge* durchgeführten Testsynthese von 3',5'-Bis(TBDMS)-2'-dG **92** unter Zugabe der Hydroxamsäure **84**, BOP und DIPEA in Dimethylformamid konnte auch nach 96 Stunden keine Umsetzung detektiert werden.^[55] Auch eine Aktivierung der O^6 -Position mit Benzotriazol konnte nicht beobachtet werden.

Anhand der erzielten Ergebnisse wurde der in Abbildung 45 (S. 53) postulierte Mechanismus vorgeschlagen, der zu dem unerwarteten Produkt **94** führt.

Nach der Addition der Hydroxamsäure **84** an die Benzotriazol-Gruppe unter Ausbildung einer delokalisierten negativen Ladung könnte sich unter Abspaltung von Hydroxybenzotriazol neben 3',5'-Bis(TBDMS)-2'-dG **92** ein hochreaktives Nitreniumion bilden. Dieses ist dann in der Lage, analog zu dem *in vivo* gefundenen Mechanismus, in einer elektrophilen Arylaminoanierung an die N^7 -Position der Base des Nucleosids anzugreifen und anschließend unter Abspaltung eines Protons in einer der Stevens-Umlagerung ähnlichen Reaktion das C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-Addukt **94** zu bilden.

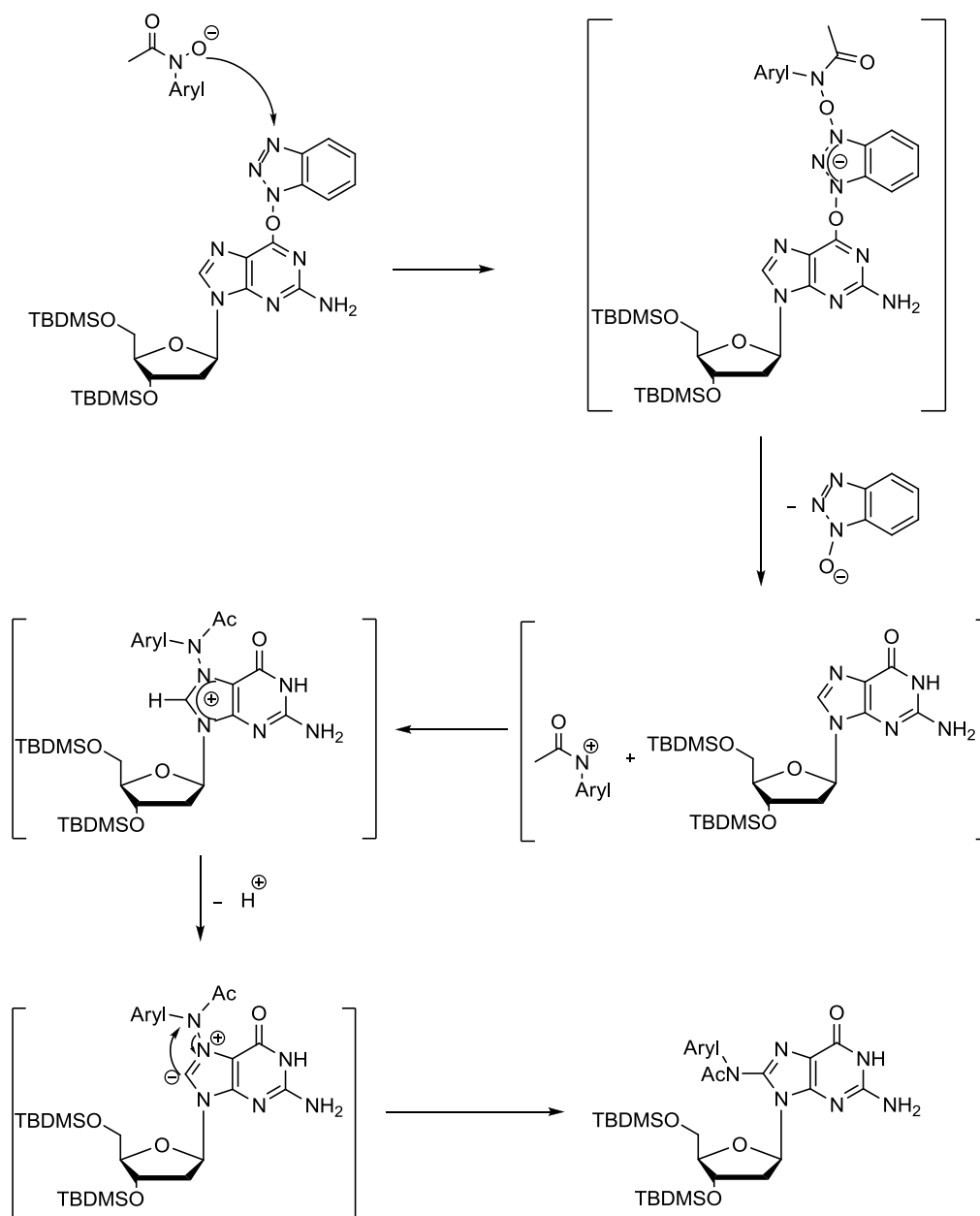


Abb. 45: Postulierter Mechanismus der C8-(N-Acetyl)-arylamin-Addukte **94**

Um den postulierten Mechanismus weiter zu belegen, wurde die Synthese ohne Base (Cäsiumcarbonat) durchgeführt (Abb. 46, S. 54).

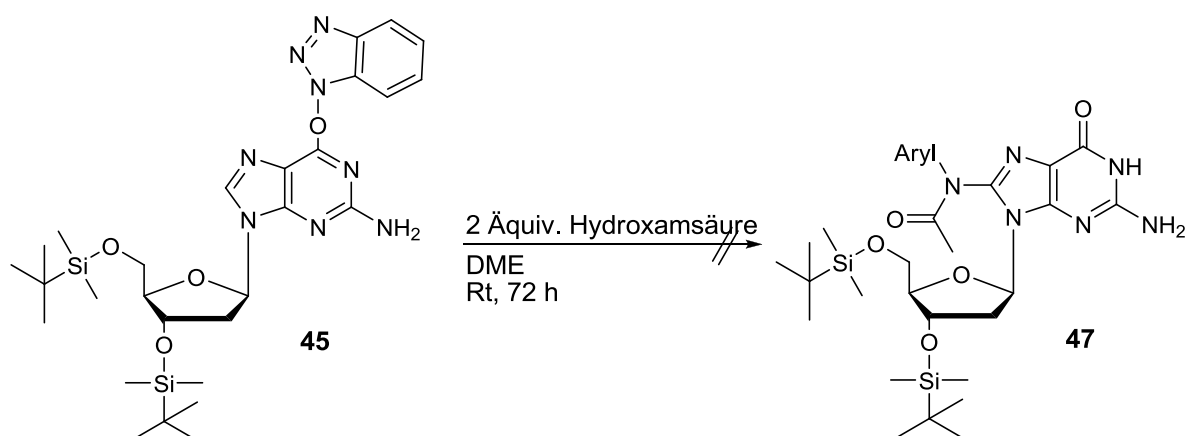


Abb. 46: Versuch zur Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-2'-dG-Derivates **47**

Hierbei konnte nach 72 Stunden keine Umsetzung des Eduktes **45** beobachtet werden. Somit scheint die Deprotonierung der Hydroxamsäure **84** durch Cäsiumcarbonat mit anschließender Addition der Hydroxamsäure **84** an die Benzotriazol-Gruppe zur Aktivierung ein Schlüsselschritt dieses Mechanismus zu sein.

Der postulierte Mechanismus ist eine außergewöhnliche Darstellungsmethode der C8-Addukte mittels elektrophiler Arylaminierung. Im Gegensatz zu den Arbeiten von *Famulok* und *Boche* (Kapitel 2.5.1, S. 12) ist somit eine neue effiziente Syntheseroute zu den C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-Addukten möglich.^[40,41]

Aufgrund des neuen, effektiven Syntheseweges und somit einfachen Zugangs zu den C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-Addukten sollte die Allgemeingültigkeit und Effizienz dieser Strategie anhand mono- und polycyclischer Arylamine bewiesen werden.

Die zuvor dargestellten Hydroxamsäuren **84-91** sollten nun anhand der genannten Kupplungsbedingungen in die C8-Position eingeführt werden (Abb. 47).

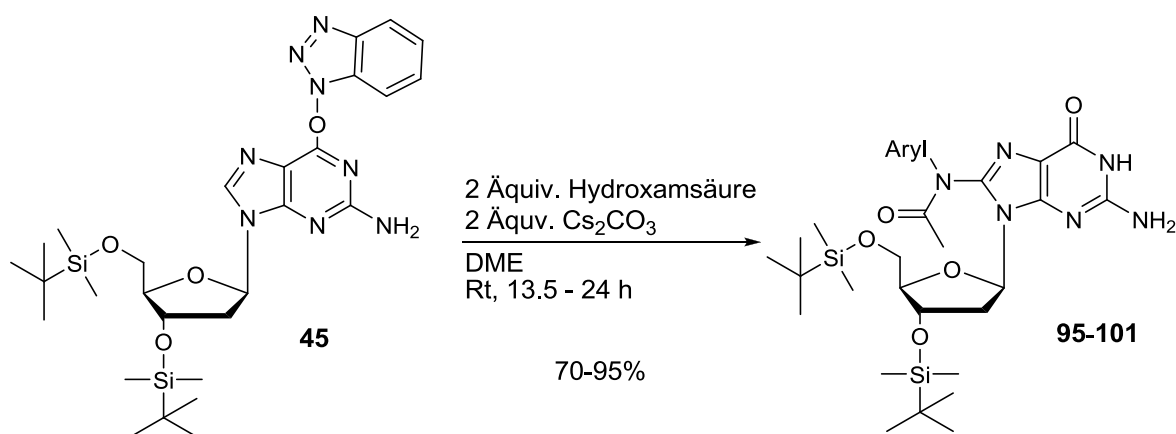


Abb. 47: Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-2'-dG-Derivate **95-101**

Das geschützte Nucleosid **45** wurde in 1,2-Dimethoxyethan gelöst, mit der jeweiligen Hydroxamsäure **84-91** sowie Cäsiumcarbonat versetzt und je nach Modifikation für 13.5-24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dünnschichtchromatographisch konnte die Bildung von 3',5'-Bis(TBDMS)-2'-dG **92** als Zwischenprodukt sowie nach sehr langen Reaktionszeiten von einer Woche auch das 2'-Desoxyguanosins **40** beobachtet werden. Die Bildung von 2'-Desoxyguanosin **40** weist darauf hin, dass bei zu langen Reaktionszeiten ein Zerfall eintritt. Das intermediär entstehende 3',5'-Bis(TBDMS)-2'-dG **92** stützt ebenfalls den postulierten Mechanismus. Die Produkte **95-101** konnten nach säulenchromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 70-95%, abhängig vom Arylamin, isoliert werden (Tab. 7).

Tab. 7: Ausbeuteübersicht der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-2'-dG-Derivate **95-101**

Produkt	Aryl	Ausbeute
95	Phenyl	70%
96	4-Methylphenyl	78%
97	4-Methoxyphenyl	72%
98	4-Cyanophenyl	-
99	3,5-Dimethylphenyl	91%
100	2-Fluorenyl	95%
101	4-Biphenyl	77%

Einzig die Synthese der verunreinigten 4-Cyanophenyl-modifizierten Hydroxamsäure **98** gelang nicht. Hierbei ist fraglich, ob die Kupplung aufgrund der verunreinigten Verbindung oder der *para*-ständigen Cyanogruppe missglückte.

4.1.4 Synthese der Oligonucleotidbausteine

Nach erfolgreicher Synthese der Hydroxamsäuren in C8-Position des geschützten Nucleosids **47** konnten die anschließenden vier Reaktionsschritte zur Synthese der gewünschten Phosphoramidite **48** erfolgen (Abb. 48).

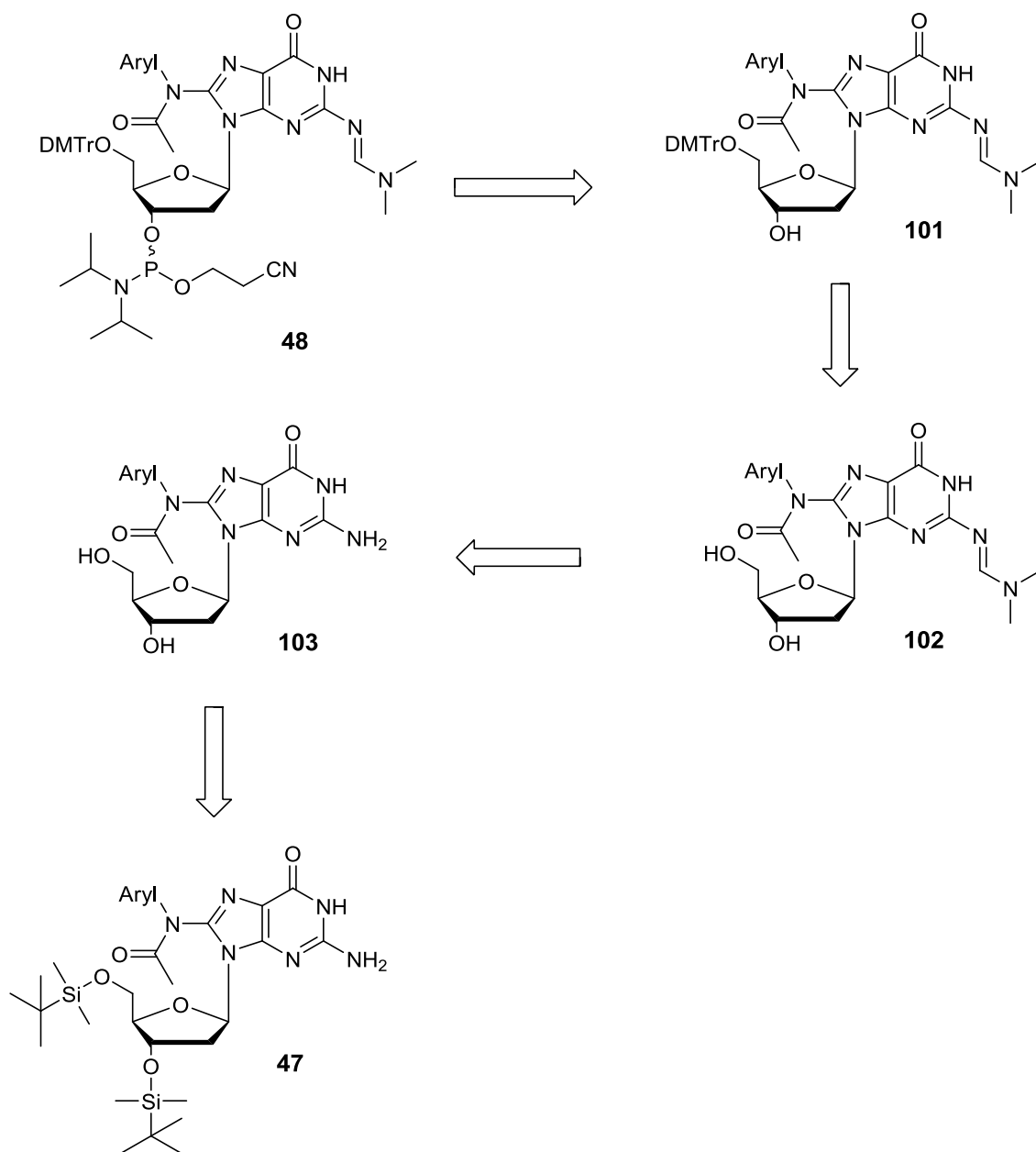


Abb. 48: Retrosynthese zur Darstellung von N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-arylamino modifizierten 2'-dG Phosphoramiditen **48**

Zunächst erfolgte die Entschützung der 3'- und 5'-Position. Relevant für diese Abspaltung ist die Anwesenheit von Fluorid im Spaltungsreagenz, da Silicium eine höhere Affinität zu Fluorid als zu Sauerstoff besitzt. Somit kann die Entschützung nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus ablaufen.

Böge präsentierte in vorangegangenen Arbeiten anhand der C8-NH-Addukte die TBDMS-Entschützung mittels Triethylamin-Trihydrofluorid in Tetrahydrofuran/Dichlormethan (1:1 v/v), da unter Verwendung von TBAF eine Dearylierung beobachtet wurde.^[50] Dieses Reagenz sollte auch bei den acetylierten Addukten ohne Verlust der Acetyl-Gruppe anwendbar sein.

Hierzu wurden die entsprechenden Addukte **94-96**, **98** und **99** in Tetrahydrofuran/Dichlormethan (1:1 v/v) gelöst, mit 10 Äquivalenten Triethylamin und 12.5 Äquivalenten Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt und für 15-20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 49).

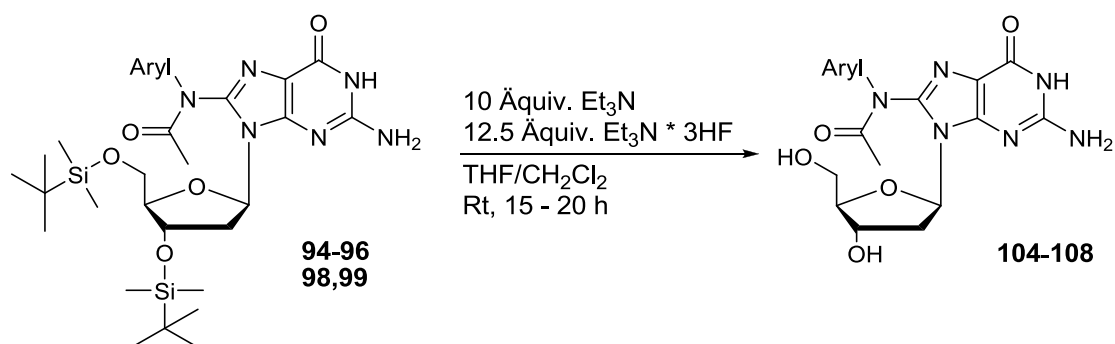


Abb. 49: Desilylierung der C8-(N-Acetyl)-arylamino-Addukte **94-96** sowie **98** und **99**

Die Produkte **104-108** konnten nur teilweise in reiner Form erhalten werden, da sich das Entfernen der Triethylammoniumsalze als großes Problem herausstellte (Tab. 8).

Tab. 8: Zusammenfassung der Ausbeuten der Desilylierung

Produkt	Aryl	Ausbeute
104	Phenyl	69%
105	4-Methylphenyl	n.b.
106	4-Methoxyphenyl	49%
107	3,5-Dimethylphenyl	n.b.
108	2-Fluorenyl	n.b.

n.b. = nicht bestimmbar, da Verunreinigungen enthalten

Nur bei dem Phenyl- **104** und 4-Methoxyphenyl-Derivat **106** konnten die Triethylammoniumsalze nach drei bis vier säulenchromatographischen Reinigungen entfernt werden. Bei den Addukten **105,107,108** wurde nach der vierten Reinigung auf weitere Schritte zur Entfernung der Salze verzichtet und diese direkt in der nächsten Stufe, der Blockierung der exocyclischen Aminogruppe, umgesetzt. Diese direkte Umsetzung führte allerdings zu weiteren Problemen, da die Reinigungen der Folgestufen sich als immer komplizierter herausstellten.

Ebenso wurde versucht, die Triethylammoniumsalze mittels Extraktion vor der säulenchromatographischen Reinigung abzutrennen. Dies erwies sich als eine ungeeignete Methode, da sich die Produkte **104-108** überwiegend in der wässrigen Phase lösten und somit nicht von den Salzen abgetrennt werden konnten.

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse der Desilylierung mittels Triethylamin-Trihydrofluorid wurden weitere Entschützungsverfahren durchgeführt. In Abwesenheit der Acetyl-Gruppe wurde bisher Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) als Reagenz verwendet. Diese Methode nach *Gillet* und *Schärer*^[59] ist jedoch ungeeignet, da die Basizität von TBAF möglicherweise zusätzlich zu der schon erwähnten Dearylierung eine Abspaltung der Acetyl-Gruppe bewirken würde.

Eine mildere Methode stellt die Entschützung mittels TBAF in Tetrahydrofuran unter Zusatz von Essigsäure dar.^[60]

Eine weitere Möglichkeit sollte in Anlehnung an die Arbeit von *Arnold* erfolgen.^[106] *Arnold* führte eine Desilylierung mit einem HF*Pyridin-Komplex (~70% HF) anhand eines carbocyclischen Analogons, eines Formamidopyrimidin-2'-desoxyadenosins, in Gegenwart der basenlabilen Formylgruppe durch. Zum Vergleich sollten beide Möglichkeiten zur Desilylierung durchgeführt werden.

Analog der Synthese nach *Arnold*^[106] wurde der HF-Komplex zusätzlich mit Pyridin gepuffert. Das C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierte Addukt **99** wurde in Tetrahydrofuran gelöst und mit einem Überschuss des HF*Pyridin-Komplexes sowie Pyridin versetzt (Abb. 50, S. 59).

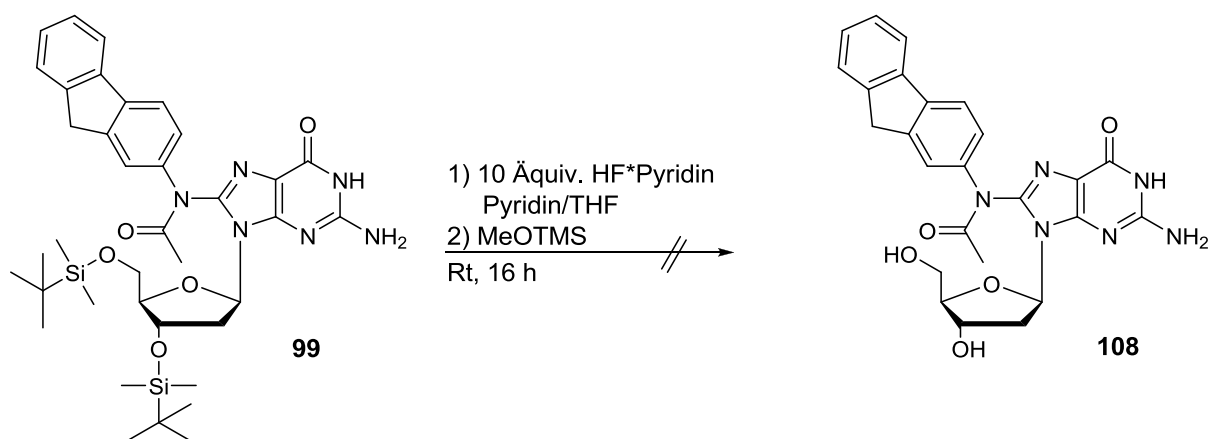


Abb. 50: Versuch zur Desilylierung des C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-Adduktes **99**

Dünnschichtchromatographisch konnte keine Umsetzung zum gewünschten Produkt **108** festgestellt werden. Vielmehr wurde eine Zersetzung zu 2'-Desoxyguanosin **40** nachgewiesen, so dass sich diese Methode zur Desilylierung der 3'- und 5'-Position der C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-modifizierten Addukte **94-100** als ungeeignet herausstellte.

Analog der Methode nach Gillet und Schärer^[60] wurden TBAF und Essigsäure als Spaltungreagenzien verwendet.

Hierzu wurden sechs Äquivalente TBAF und zwölf Äquivalente Essigsäure verwendet, und anschließend zu dem bereits in Tetrahydrofuran gelösten C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierten Addukt **99** gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden und einmaliger säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **108** in einer Ausbeute von 94% erhalten werden. Durch den Vorteil der leichten Reinigung dieser Verbindung und der sehr guten Ausbeute sollten anhand dieser Methode die weiteren modifizierten Addukte **94-100** dargestellt werden (Abb. 51).

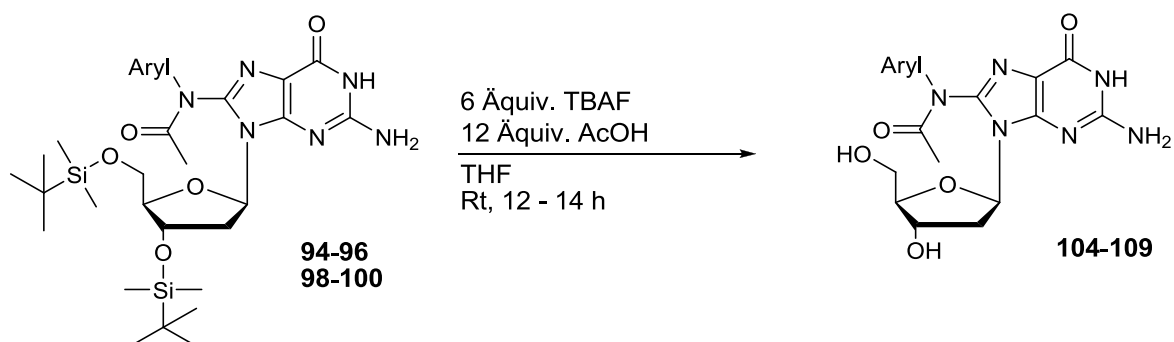


Abb. 51: Desilylierung der C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-Addukte **104-109**

Unter den genannten Bedingungen konnten alle modifizierten Addukte **104-109** entschützt und mit einer säulenchromatographischen Reinigung in Ausbeuten von 69-96% isoliert werden (Tab. 9).

Tab. 9: Zusammenfassung der Ausbeuten der Desilylierung

Produkt	Aryl	Ausbeute
104	Phenyl	89%
105	4-Methylphenyl	96%
106	4-Methoxyphenyl	89%
107	3,5-Dimethylphenyl	89%
108	2-Fluorenyl	94%
109	4-Biphenyl	69%

Um erste Informationen über die Molekül-Konformation bezüglich der *N*-glycosidischen Bindung zu erhalten, wurden mit den Produkten **104-109** Konformationsanalysen mittels NOESY-NMR-Spektroskopie durchgeführt (Abb. 52).

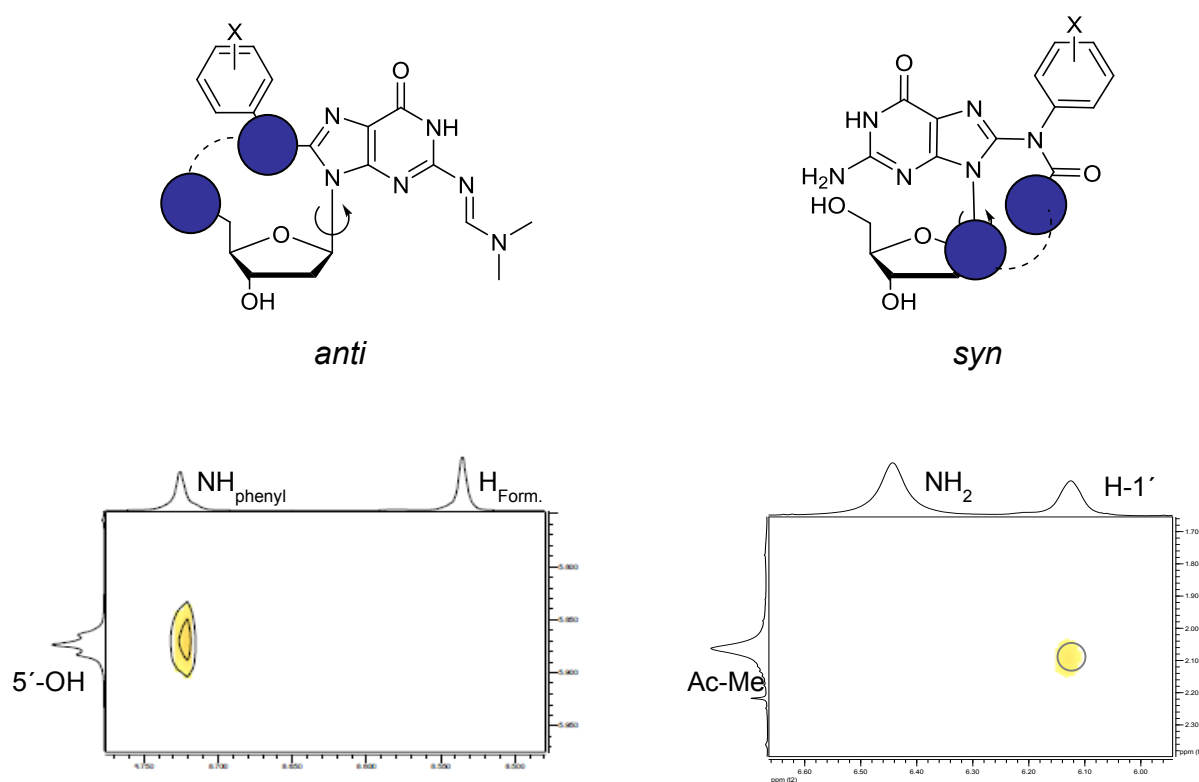


Abb. 52: relevante Kopplungen der NOESY-Spektren des C8-NH-Phenyl-Adduktes **135** und des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-Adduktes **104** in DMSO-*d*₆

Mit Hilfe der beobachteten NOE-Effekte ist es möglich, die Stellung der modifizierten Guanosin-Base zu bestimmen. Bei einer *anti*-Stellung wäre eine Kopplung zwischen der 5'-Hydroxygruppe und dem NH-Proton bzw. der Acetylgruppe des jeweiligen Arylamins sichtbar. Bei einer *syn*-Stellung würde diese Kopplung zwischen dem 1'-Proton und dem NH-Proton bzw. der Acetylgruppe des jeweiligen Arylamins auftreten. In Abbildung 52 (S. 60) sind exemplarisch die relevanten Kopplungen des C8-NH-Phenyl-Adduktes **135** sowie des C8-(N-Acetyl)-phenyl-Adduktes **104** abgebildet.

Auf der linken Seite der Abbildung 52 (S. 60) ist das NOESY-Spektrum des NH-Adduktes abgebildet. In dem Spektrum ist deutlich der NOE-Effekt zwischen dem NH-Proton der Modifikation und der 5'-Hydroxygruppe zu sehen. Dieser Effekt kann eindeutig einer vorwiegenden *anti*-Konformation zugewiesen werden. Zum gleichen Ergebnis kam auch *Böge* in seiner Arbeit.^[55]

Auf der rechten Seite der Abbildung 52 (S. 60) ist zum Vergleich das NOESY-Spektrum des N-Acetyl-Adduktes **104** abgebildet. Im Gegensatz zum NH-Addukt war im NOESY-Spektrum keine Kopplung der Acetylgruppe mit der 5'-Hydroxygruppe zu erkennen. Dafür eine Kopplung zwischen der Acetylgruppe der Modifikation mit dem 1'-Proton der Ribose. Somit nehmen die acetylierten Addukte eine *syn*-Konformation ein.

Zu gleichen Ergebnissen kam auch *Szombati* in ihrer Dissertation über die entsprechenden 2'-Desoxyadenosin-Addukte.^[107]

Die verschiedenen Auswirkungen der NH- und N-Acetyl-Addukte auf die Konformation bezüglich der N-glycosidischen Bindung geben erste Hinweise auf mögliche Strukturunterschiede auf molekularer Ebene. Somit kann die These von *Gillet* und *Schärer* bestätigt werden.^[59,60] Sie stellten fest, dass aufgrund einer Stabilisierung, nach Einführung der Acetylgruppe, die *syn*-Konformation der N-glycosidischen Bindung bevorzugt eingenommen wird. Aufgrund der vorhandenen Acetylgruppe kann sich das Molekül nicht mehr zwischen der NH- und der 5'-OH-Position über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren und stabilisiert sich bevorzugt über das NH₂ und der 5'-Hydroxygruppe.

Zur Klärung der Substituenteneffekte im Molekül wurden von den Addukten **104-109** UV-Spektren gemessen und mit dem Spektrum von 3',5'-Bis(TBDMS)-2'-Desoxyguanosin **92** verglichen (Abb. 53, S. 62).

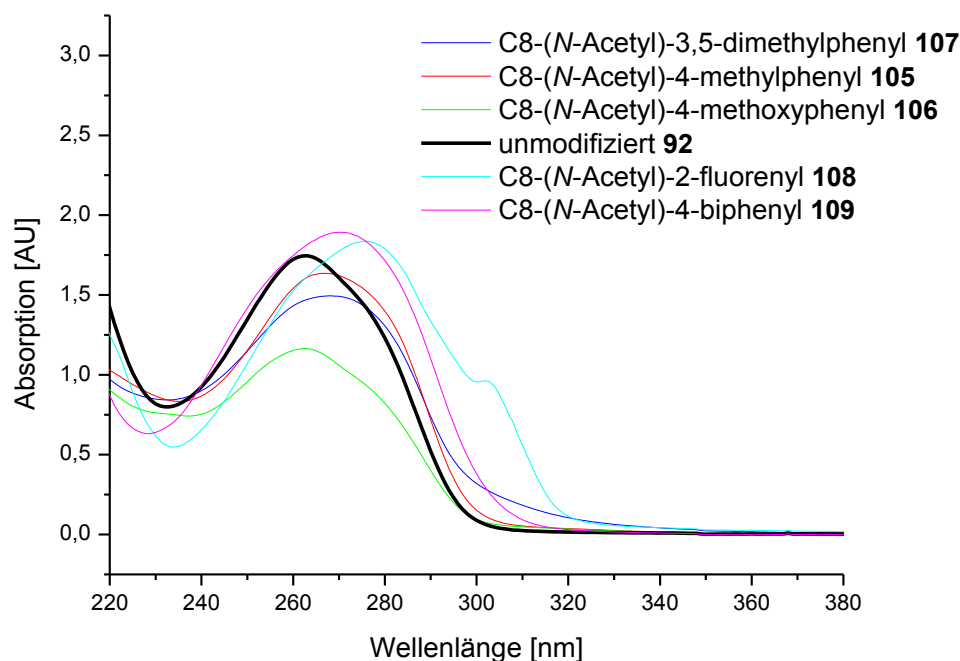


Abb. 53: UV-Spektren der entschützten C8-(N-Acetyl)-Addukte **105-109** im Vergleich zum 3',5'-O-Bis-(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **92**

Die modifizierten Verbindungen **104-109** zeigten im Vergleich zum 3',5'-O-Bis-(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **92** einen bathochromen Effekt (Verschiebung zu höherer Wellenlänge) aufgrund des nun vergrößerten π -Elektronensystems. Wie zu erwarten, weist das C8-(N-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierte Addukt **108** aufgrund des aromatischen Systems eine größere bathochrome Verschiebung im Gegensatz zu den monocyclischen Addukten auf. Bei dem C8-(N-Acetyl)-4-biphenyl-Addukt **109** ist diese Verschiebung weniger ausgeprägt, aber dennoch ersichtlich. Ein Unterschied bezüglich der verschiedenen Substituenten der monocyclischen Addukte **105-107** ist nicht zu erkennen.

Vorbereitend auf die automatisierte Oligonucleotidsynthese sollten nun die funktionellen Gruppen entsprechend geschützt werden.

Der folgende Syntheseschritt bestand in der selektiven Schützung der exocyclischen Aminofunktion der Addukte **104-109**. Aufgrund der in vorangegangenen Arbeiten gescheiterten Versuche, die Phenoxyacetylgruppe an diese Position einzuführen, wurde auf die Formamidin-Gruppe zurückgegriffen.^[46] Diese Schutzgruppe ist im Gegensatz zu der von *Gräsl* verwendeten *iso*Butyryl-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen (konz. Ammoniak) innerhalb von zwei Stunden bei 45 °C abspaltbar. Die selektive Schützung der exocyclischen Aminofunktion der Addukte **104-109**

konnte durch die Reaktion mit Dimethylformamiddiethylacetal in Pyridin bei Raumtemperatur innerhalb von 14-17 Stunden erreicht werden (Abb. 54).

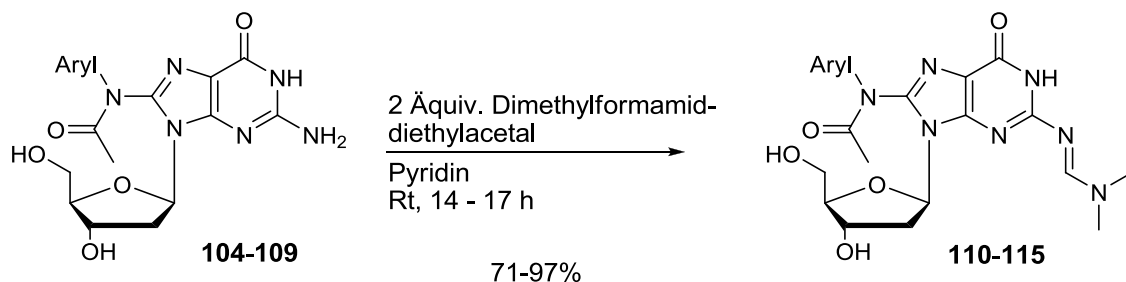


Abb. 54: Formamidin-Schätzung der exocyclischen Aminogruppe der C8-(N-Acetyl)-arylamino Addukte **104-109**

Die Formamidin-geschützten Addukte **110-115** konnten dabei nach säulen-chromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 71-97% isoliert werden (Tab. 10).

Tab. 10: Zusammenfassung der Formamidin-Schätzungen

Produkt	Aryl	Ausbeute
110	Phenyl	86%
111	4-Methylphenyl	97%
112	4-Methoxyphenyl	86%
113	3,5-Dimethylphenyl	83%
114	2-Fluorenyl	90%
115	4-Biphenyl	71%

Die nächste Stufe zur Darstellung der Phosphoramidite für die Oligonucleotid-synthese bestand in der Einführung der säurelabilen DMTr-Schutzgruppe an die 5'-Hydroxygruppe. Dazu musste zunächst 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **118** aus Bromanisol **116** über 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol **117** dargestellt werden (Abb. 55).^[107]

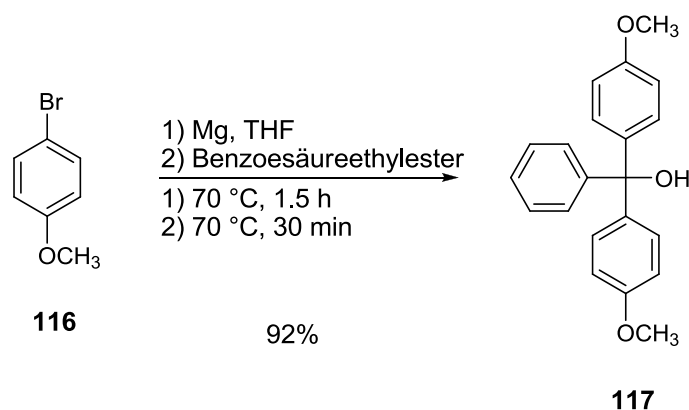


Abb. 55: Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol **117**

Hierzu wurden Magnesiumspäne in Tetrahydrofuran vorgelegt und unter Rühren mit Bromanisol **116** versetzt. Nach Beginn dieser Grignard-Reaktion wurde weiteres Bromanisol **116** zugegeben und für 30 Minuten bei 70 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Eis hydrolysiert und mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Nach azeotroper Destillation konnte das Produkt in einer Ausbeute von 92% isoliert werden.

Aufgrund der Empfindlichkeit des Produktes **117** wurde dieses direkt zum gewünschten Chlorid umgesetzt (Abb. 56).

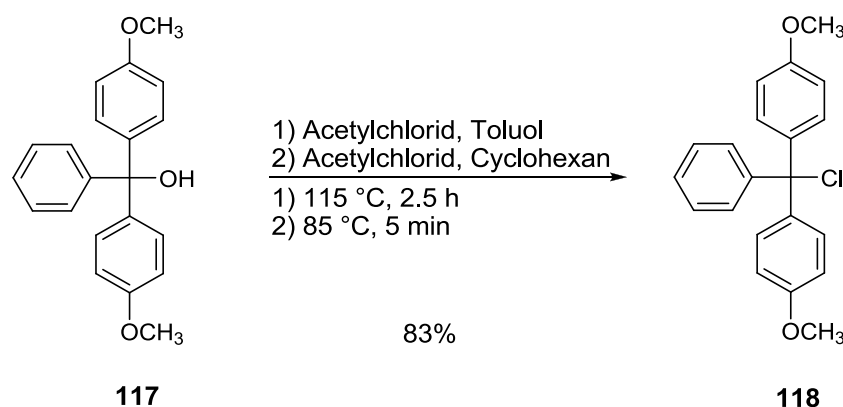


Abb. 56: Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **118**

Das zuvor hergestellte 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol **117** wurde mit Acetylchlorid versetzt und für 2.5 Stunden bei 85 °C erhitzt. Das 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **118** wurde durch Kristallisation aus der Reaktionslösung unter Licht- und Luftausschluss in einer Ausbeute von 83% erhalten.

Anhand dieser Verbindung **118** konnte die DMTr-Schätzung der 5'-Hydroxygruppe der *N*²-Formamidin-8-(*N*-Acetyl)-arylamino-modifizierten 2'-Desoxyguanosine **110-115** analog zu Böge durchgeführt werden. Um eine zweifache DMTr-Schätzung (3'- und 5'- OH) zu vermeiden, wurde in den durchgeführten Synthesen nur ein Äquivalent des DMTr-Chlorids eingesetzt (Abb. 57).

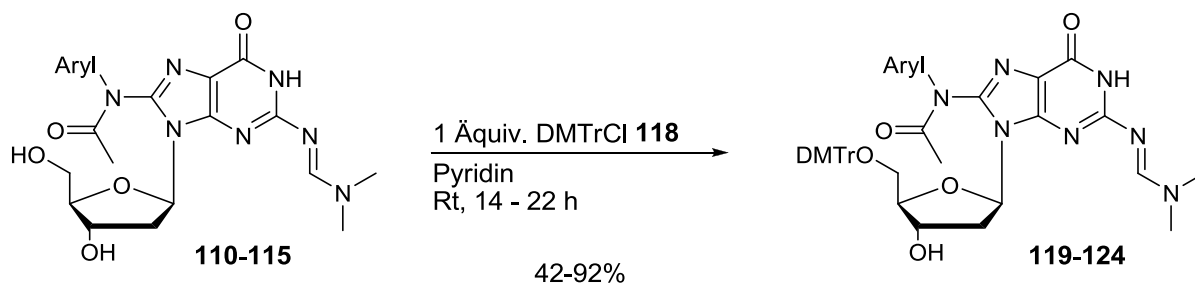


Abb. 57: Synthese der 5'-DMTr-geschützten Addukte **119-124**

Die Edukte **110-115** wurden zunächst in Pyridin gelöst, mit einem Äquivalent DMTr-Chlorid versetzt und für 14-22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung konnten die Produkte **119-124** in Ausbeuten zwischen 42% und 92% erhalten werden (Tab. 11).

Tab. 11: Ausbeuteübersicht der 4,4'-Dimethoxytrityl-geschützten Addukte **119-124**

Produkt	Aryl	Ausbeute
119	Phenyl	89%
120	4-Methylphenyl	90%
121	4-Methoxyphenyl	65%
122	3,5-Dimethylphenyl	92%
123	2-Fluorenyl	79%
124	4-Biphenyl	42%

Die zum Teil niedrigen Ausbeuten lassen sich auf die schwierige chromatographische Reinigung zurückführen. Hierbei bestand das Problem in dem leicht sauren Kieselgel in Dichlormethan, welches dazu führte, dass die DMTr-Gruppe teilweise wieder abgespalten wurde. Um diese Abspaltung zu umgehen, wurde das Kieselgel mit Dichlormethan versetzt und mit Triethylamin neutralisiert, bevor die Rohprodukte gereinigt wurden.

Nach erfolgreicher Blockierung der exocyclischen Aminogruppe und der 5'-Hydroxygruppe konnte nun die Umsetzung zum Phosphoramidit erfolgen. Dafür musste zunächst das Phosphitylierungsreagenz, Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-O-cyanoethyl)-phosphit **127**, dargestellt werden.

Dazu wurde frisch destilliertes Phosphortrichlorid **125** auf -78 °C gekühlt und mit frisch destilliertem 3-Hydroxypropionitril versetzt (Abb. 58).

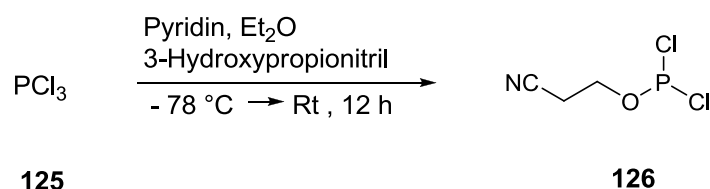


Abb. 58: Darstellung von 2-Cyanoethylphosphordichloridit **126**

Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und 12-stündigem Rühren wurde der Niederschlag unter Schutzgas filtriert und das Rohprodukt **126** aufgrund der starken Licht- und Luftempfindlichkeit direkt in der nächsten Stufe umgesetzt.

Das frisch synthetisierte 2-Cyanoethylphosphordichloridit **126** wurde auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und langsam mit *N,N'*-Diisopropylamin versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und anschließendem 12-stündigem Rühren wurde der Niederschlag wiederum unter Schutzgas filtriert (Abb. 59).

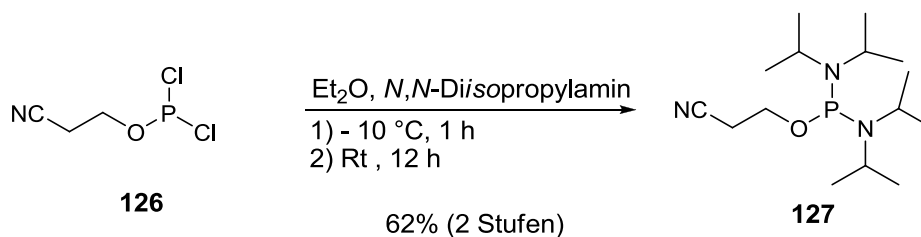


Abb. 59: Synthese von Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-O-cyanoethyl)-phosphit **127**

Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der ölige Rückstand mit Calciumhydrid versetzt und über eine Vigreuxkolonne destilliert. Das Produkt konnte hierbei in einer Ausbeute von 62% über zwei Stufen isoliert werden.

Das so erhaltene Phosphitylierungsreagenz **127** konnte nun zur Umsetzung mit den DMTr-geschützten Addukten **119-124** in die entsprechenden Phosphoramidite eingesetzt werden (Abb. 60).

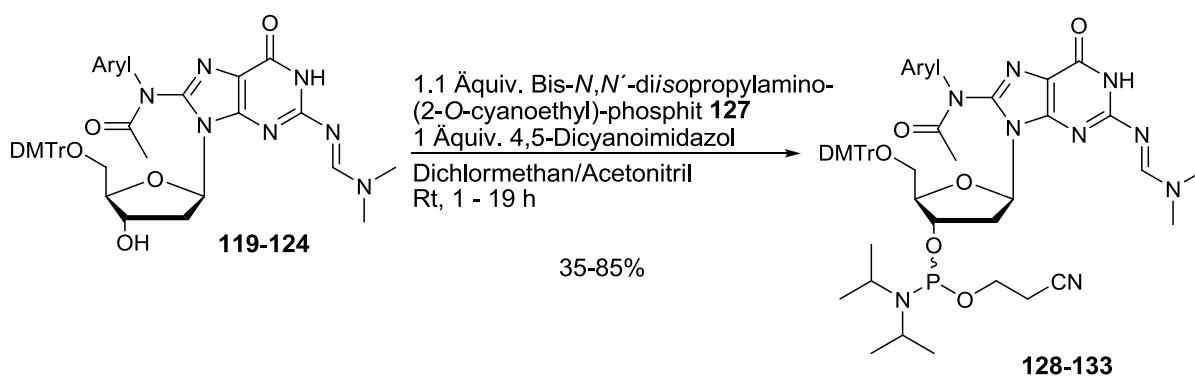


Abb. 60: Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Phosphoramidite **128-133**

Die DMTr-geschützten Addukte **119-124** wurden jeweils zweimal mit Acetonitril coevaporiert, in Dichlormethan/Acetonitril (1:1 v/v) gelöst und zunächst mit 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) und anschließend mit 1.1 Äquivalenten Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-O-cyanoethyl)-phosphit **127** versetzt. Im Gegensatz zu Arbeiten von Böge erfolgte keine wässrige Aufarbeitung, sondern eine direkte

chromatographische Reinigung über Aluminiumoxid (Alox, neutral, Akt.stufe III).^[55] Hierbei konnten die entsprechenden Phosphoramidite **128-133** von den ebenfalls entstehenden H-Phosphonaten in Ausbeuten zwischen 35-85% isoliert werden (Tab. 12).

Tab. 12: Zusammenfassung der Ausbeuten der Phosphoramiditsynthese

Produkt	Aryl	Ausbeute
128	Phenyl	85%
129	4-Methylphenyl	83%
130	4-Methoxyphenyl	35%
131	3,5-Dimethylphenyl	74%
132	2-Fluorenyl	66%
133	4-Biphenyl	46%

Eine Erklärung für die relativ geringen Ausbeuten der 4-Methoxyphenyl- und 4-Biphenyl-modifizierten Addukte **130** und **133** liegt nicht vor, da eine vollständige Umsetzung dünnschichtchromatographisch beobachtet wurde und die säulenchromatographische Reinigung ebenfalls ohne Probleme verlief. Interessant ist allerdings, dass bei der Reaktion zur DMTr-Schätzung der 5'-Hydroxygruppe ebenfalls bei diesen beiden Modifikationen eine geringere Ausbeute beobachtet als bei den anderen Modifikationen werden konnte (Tab. 11, S. 65).

Die Phosphoramidite wurden jeweils nach Gefriertrocknung aus Benzol als farblose Feststoffe erhalten.

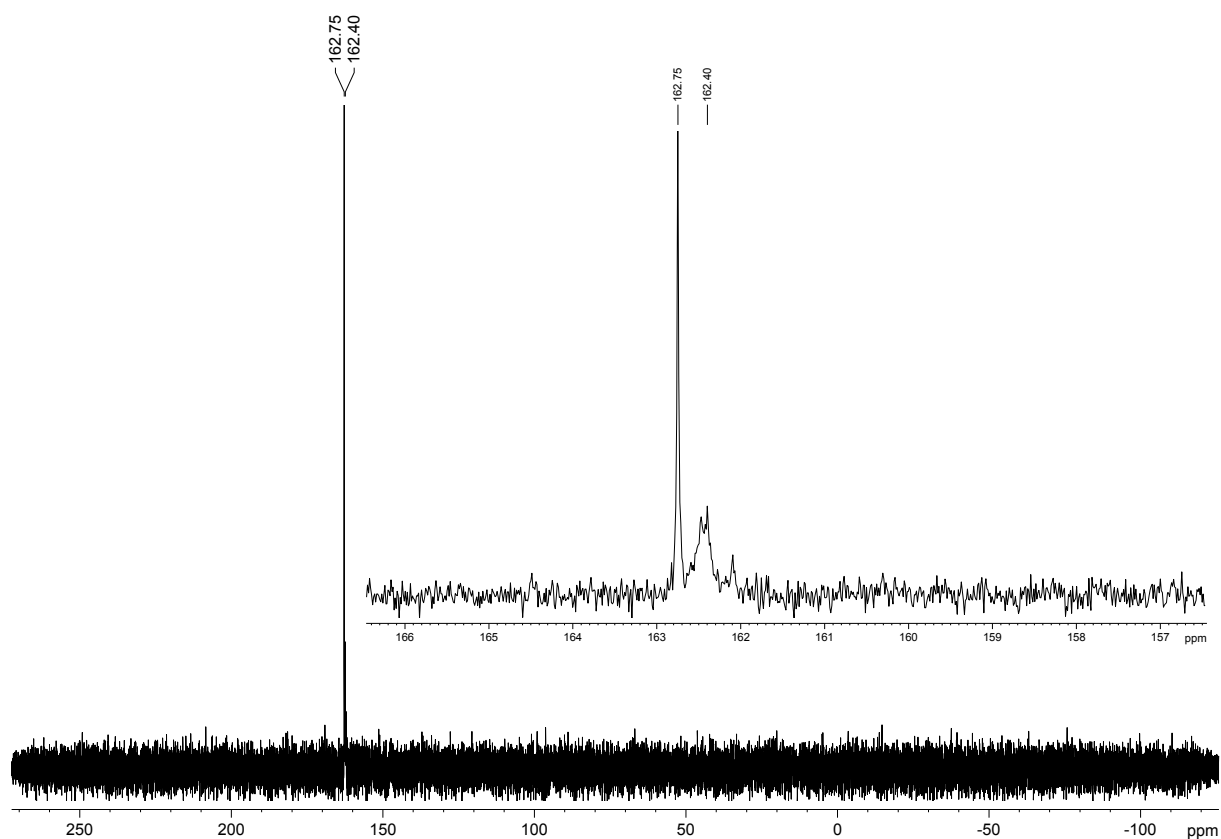


Abb. 61: exemplarisch abgebildetes ^{31}P -NMR-Spektrum des 4-Methylphenyl-modifizierten Phosphoramidits **129** in Benzol- d_6

Das ^{31}P -NMR-Spektrum des N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-dG **129** in Abbildung 61 zeigt die charakteristischen Signale der Phosphoramidite (Diastereomere) bei einer chemischen Verschiebung von 162.8 ppm und 162.4 ppm. Weder das Phosphitylierungsreagenz **127** (chemische Verschiebung 123.3 ppm) noch die entsprechenden H-Phosphonate (chemische Verschiebung - 5 - 20 ppm) sind zu erkennen. Die Phosphoramidite sind an der Luft sehr labil und zersetzen sich im Gefrierschrank (- 20 °C) unter Inertgas innerhalb eines Jahres nahezu vollständig. Dies ist anhand der immer deutlicher werdenden Verfärbung in einen zunächst gelben und anschließend braunen Feststoff zu beobachten. Aufgrund dieser Instabilität sollten die Phosphoramidite möglichst direkt im Anschluss an die Synthese zur Oligonucleotidsynthese verwendet werden.

4.2 Synthese des N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosins **110** über eine metallkatalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung

Die Darstellung des N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosins **110** sollte zusätzlich zu der in Kapitel 4.1 gezeigten Syntheseroute über die Standardsynthese für die C8-Arylamin-modifizierte Addukte mittels Buchwald-Hartwig-Kupplung erfolgen. Diese Synthese diente zum Einen zum Vergleich der Effizienz der beiden Syntheserouten, als auch der direkten Gegenüberstellung der beiden über verschiedene Syntheserouten erhaltenen Addukte. Im Folgenden ist retrosynthetisch die Darstellung des N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosins **110** über die metallkatalysierte Kreuzkupplung abgebildet.

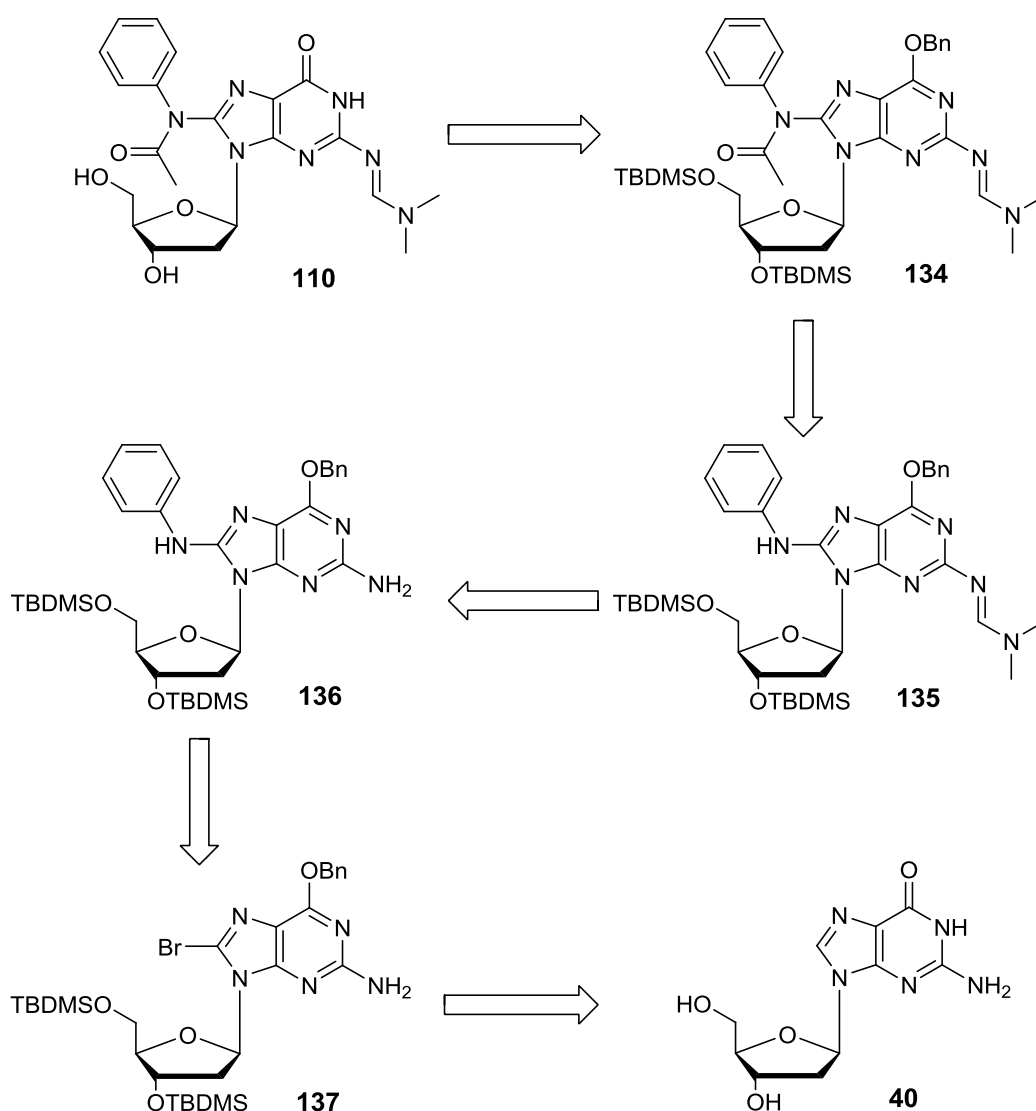


Abb. 62: Retrosynthese der Darstellung des N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosins **110**

Der entscheidende Schritt bei dieser Syntheseroute ist die Einführung der Modifikation in die C8-Position des Guanosins **137** (Abb. 62, S. 69). Diese C-N-Bindungsknüpfung sollte mittels der Buchwald-Hartwig-Kupplung erfolgen. Die für diese Kupplung notwendigen Schutzgruppen sollten dafür zunächst eingeführt werden. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Schützung der exocyclischen Aminogruppe bei der Kreuzkupplung nicht notwendig ist.^[50] Nach der C8-Modifizierung sollte die basenlabile Formamidin-Schutzgruppe an die exocyclischen Aminofunktion eingeführt und anschließend das C8-N-Atom acetyliert werden. Zum Vergleich der beiden über verschiedene Syntheserouten dargestellten Addukte mussten die Benzyl- sowie die TBDMS-Schutzgruppen abgespalten werden. Zur Anwendung der Buchwald-Hartwig-Kupplung war die Synthese des O⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosins **137** notwendig. Hierbei war besonders wichtig, dass die verwendeten Schutzgruppen nicht nur den Bedingungen der Kupplungsreaktion standhalten, sondern auch unter möglichst milden Bedingungen nach der Kupplung abzuspalten waren. Aufgrund dieser Voraussetzungen konnte in Arbeiten von *Gräsl* gezeigt werden, dass sich die TBDMS-Schutzgruppe am besten eignete.^[47] Das Amid des Guanosins sollte durch die Benzylgruppe geschützt werden, da diese mittels Hydrogenolyse mild abspaltbar ist.

Der erste Schritt verlief über eine Bromierung des 2'-Desoxyguanosins **40** an der C8-Position. Diese Reaktion wurde analog zu *Sura* durchgeführt (Abb. 63).^[108]

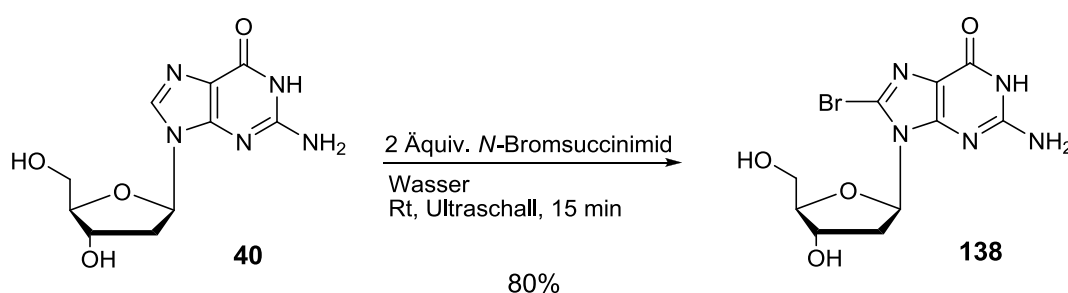


Abb. 63: Synthese von 8-Brom-2'-desoxyguanosin **138**

Bei dieser Reaktion wurde fein gepulvertes 2'-Desoxyguanosin **40** und *N*-Bromsuccinimid mit Wasser versetzt, kurz mit Ultraschall behandelt (15 s) und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration konnte das gewünschte Produkt **138** in einer Ausbeute von 80% erhalten werden. Limitierender Faktor dieser Reaktion ist die maximale Einsatzmenge von 500 mg, da in vorangegangenen

Arbeiten festgestellt wurde, dass es bei größeren Ansätzen zu einer Spaltung der glycosidischen Bindung kam.^[55]

Der nächste Syntheseschritt war die Einführung der TBDMS-Schutzgruppe in 3'- und 5'-Position. Diese wurde analog zu *Hopkins* durchgeführt (Abb. 64).^[102]

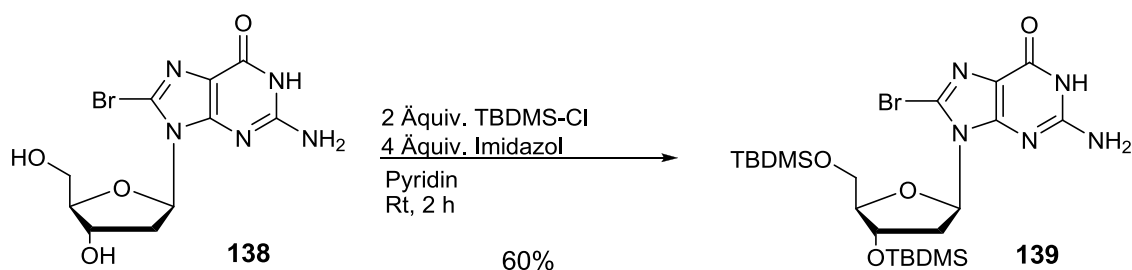


Abb. 64: Synthese von 8-Brom-3',5'-bis(TBDMS)-2'-desoxyguanosin **139**

Zunächst wurden TBDMS-Chlorid und Imidazol in Pyridin gelöst und anschließend mit 8-Brom-2'-dG **138** versetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **139** in einer Ausbeute von 60% isoliert werden.

Mittels einer Mitsunobu-Reaktion konnte der Benzylalkohol ebenfalls analog zu *Hopkins* in die O⁶-Position eingeführt werden (Abb. 65).

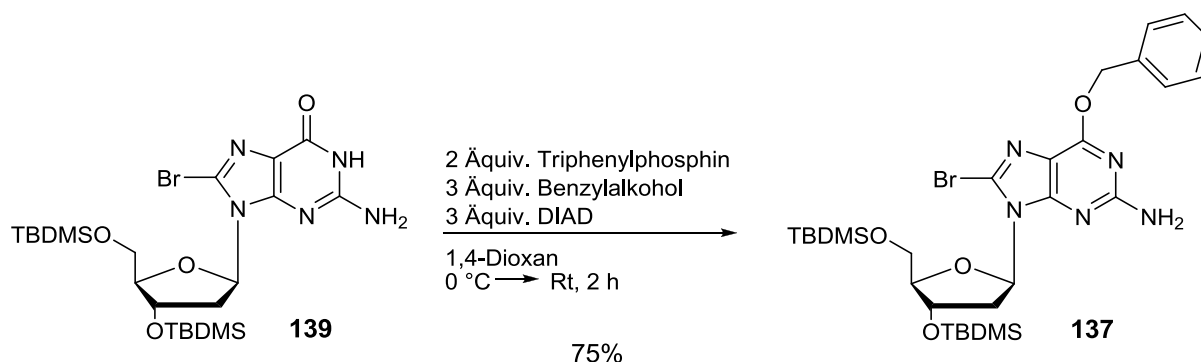


Abb. 65: Synthese von O⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(TBDMS)-2'-dG **137**

Bei dieser Reaktion wurde das 8-Brom-3',5'-bis(TBDMS)-2'-desoxyguanosin **139** in 1,4-Dioxan gelöst auf 0 °C gekühlt und mit Triphenylphosphin, Benzylalkohol und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) versetzt. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur konnte das Produkt **137** in einer Ausbeute von 75% isoliert werden. Mit dieser Ausgangsverbindung konnte anschließend die Pd-katalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung durchgeführt werden (Abb. 66, S. 72).

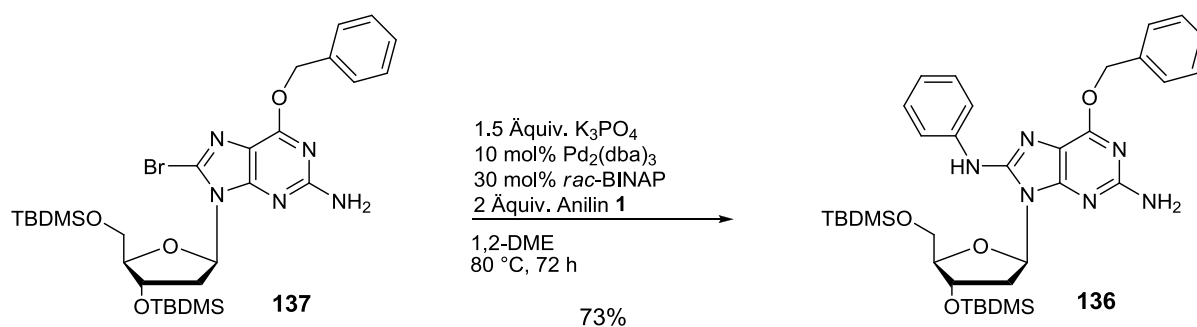


Abb. 66: Synthese von O^6 -Benzyl-8-*N*-(phenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **136**

Der Ligand *rac*-BINAP und der Katalysator $Pd_2(dba)_3$ wurden mit 1,2-DME versetzt und anschließend das O^6 -Benzyl-8-brom-3',5'-bis(TBDMS)-2'-dG **137** und Anilin hinzugegeben. Das Produkt **136** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 73% isoliert werden.

Der Mechanismus dieser Kupplungsreaktion ist noch nicht vollständig geklärt, wurde aber von *Buchwald* postuliert und kann auf die hier durchgeführte Reaktion übertragen werden (Abb. 67).^[44]

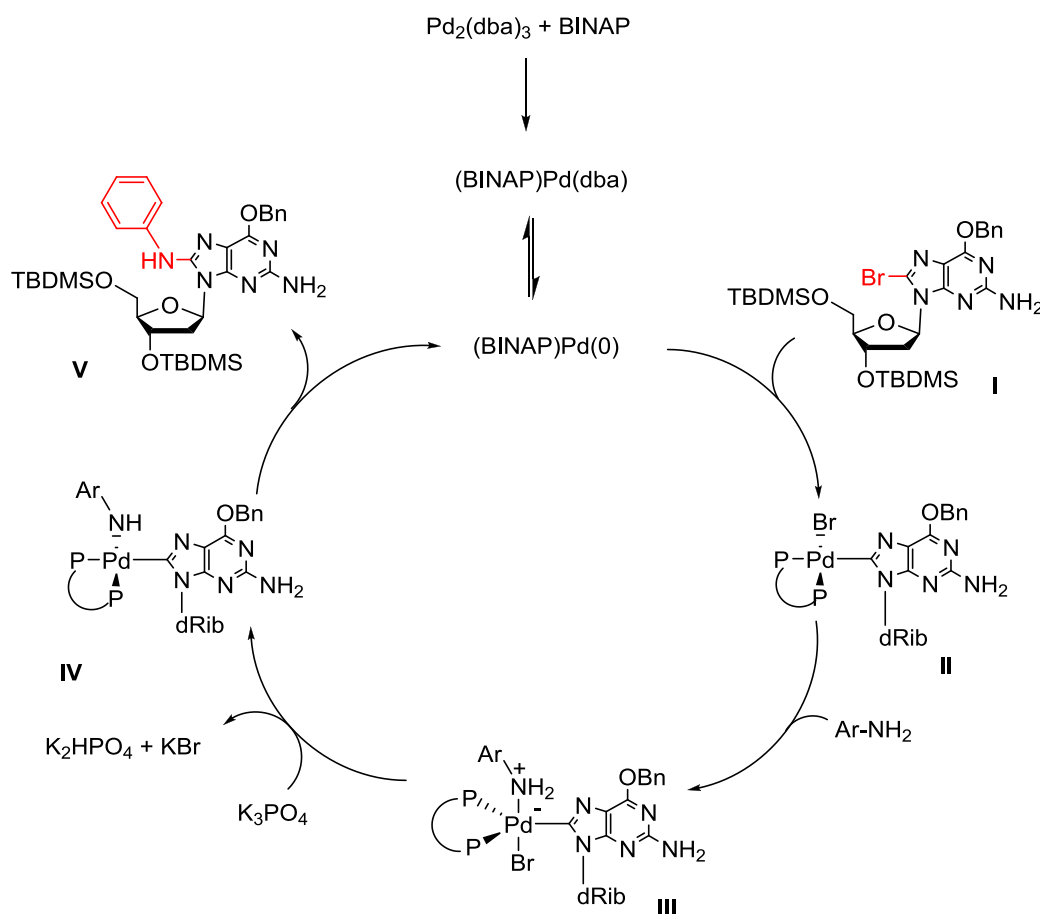


Abb. 67: Postulierter Mechanismus der Buchwald-Hartwig-Reaktion

Die Palladium-katalysierte Arylaminierung verläuft wahrscheinlich über die oxidative Addition des Arylbromids **I** an die Pd⁰-Spezies (BINAP)Pd⁰, die sich aus dem Katalysator Pd₂(dba)₃ (Tris(Dibenzylidenaceton)-dipalladium(0)) und dem Liganden *rac*-BINAP bildet. Das entstehende Pd²⁺-Intermediat **II** bildet durch die Koordination des verwendeten Arylamins die trigonal-bipyramidale Verbindung **III**. Durch Deprotonierung mit der zugesetzten Base entsteht die Verbindung **IV**, die durch reduktive Eliminierung neben dem gewünschten Arylaminaddukt **V** den Pd⁰-Katalysator zurückbildet.

Um nun, ausgehend von dem vollgeschützten, C8-Arylamin-modifizierten Addukt **136**, die Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-Adduktes **135** durchzuführen, musste die Formamidin-Schutzgruppe in die exocyclische Aminofunktion eingeführt werden, die Acetylierung an der C8-*N*-Position erfolgen und abschließend die O⁶- sowie die 3',5'-Hydroxy-Schutzgruppen abgespalten werden.

Die zunächst durchgeführte Formamidin-Schätzung der exocyclischen Aminofunktion wurde analog zu *Rizzo* dargestellt (Abb. 68).^[45]

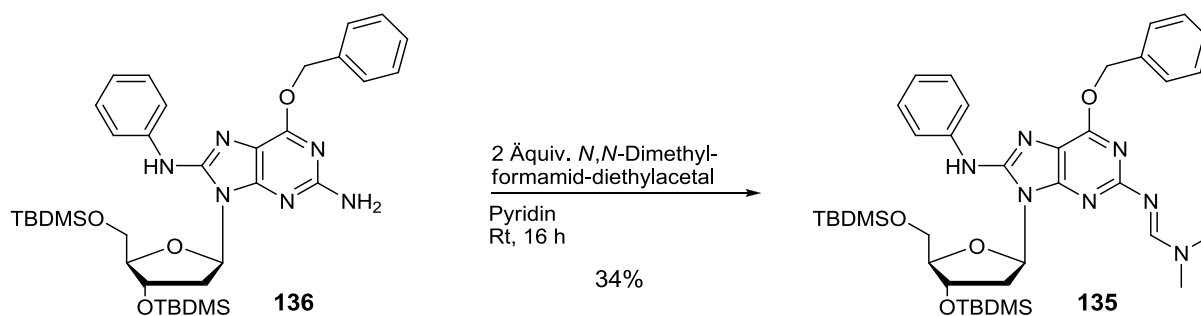


Abb. 68: Synthese von *N*²-Formamidin-O⁶-benzyl-8-*N*-(phenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **135**

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das gewünschte Produkt **135** in einer Ausbeute von 34% isoliert werden.

Nach der Vorschrift von *Vorbrüggen* wurde die folgende Acetylierung mittels 4-DMAP und Essigsäureanhydrid durchgeführt (Abb. 69, S. 74).^[104]

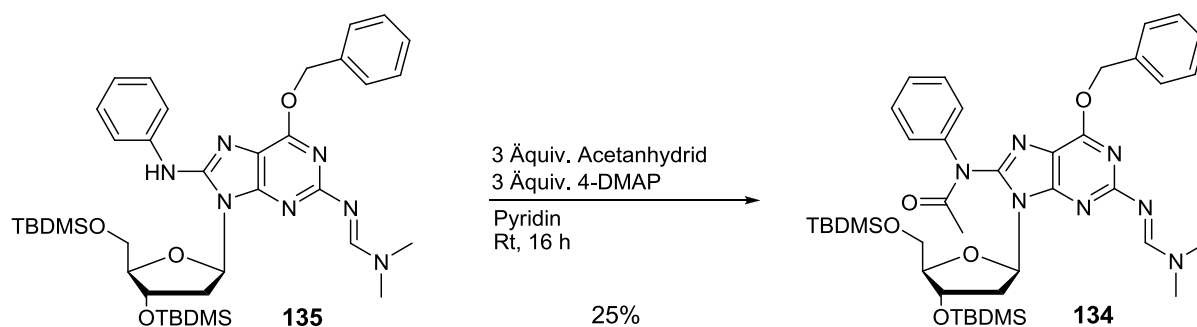


Abb. 69: Synthese von *N*²-Formamidin-*O*⁶-benzyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **134**

Die Reaktion wurde nach 16 Stunden beendet und nach viermaliger säulenchromatographischer Reinigung des Produktes **134** in einer Ausbeute von nur 25% isoliert. Die geringen Ausbeuten der Verbindungen **134** und **135** resultieren aus mehrfachen Reinigungsschritten um die Verbindungen rein zu isolieren.

Die darauffolgende Debenzylierung erfolgte durch die Reaktion des C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-Adduktes **134** mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoff-Atmosphäre (Abb. 70).

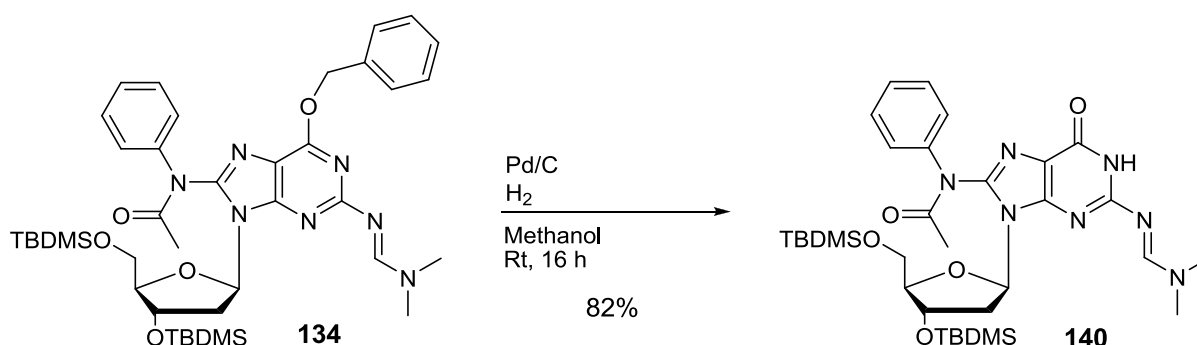


Abb. 70: Synthese von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **140**

Das Produkt **140** konnte dabei nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden in einer Ausbeute von 82% isoliert werden.

Abschließend wurden die 3',5'-TBDMS-Schutzgruppen entfernt (Abb. 71).^[50]

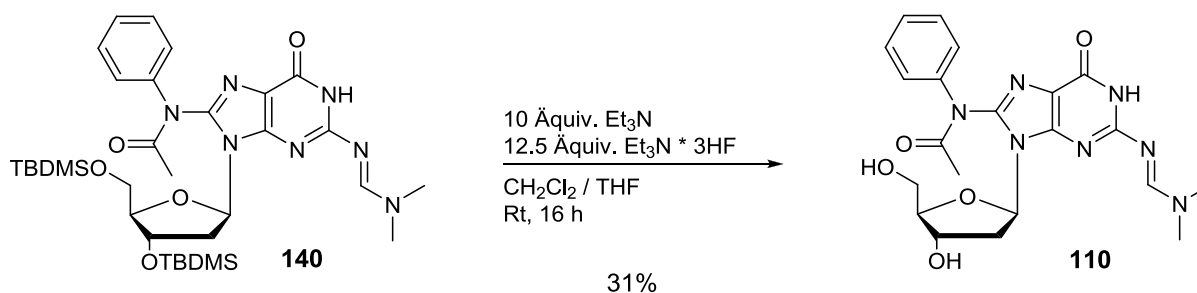


Abb. 71: Synthese von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosin **110**

Hierzu wurde das Addukt **140** in Tetrahydrofuran/Dichlormethan (1:1 v/v) mit Triethylamin-Trihydrofluorid sowie Triethylamin umgesetzt. Nach 16-stündigem Rühren bei Raumtemperatur konnte *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosin **110** in einer Ausbeute von 31% isoliert werden. Die geringe Ausbeute ist auf die schon in Kapitel 4.1 (S. 57) erwähnte problematische säulenchromatographische Reinigung zurückzuführen um die Triethylammoniumsalze vollständig abzutrennen.

Dieses Molekül konnte nun direkt mit dem gleichen Addukt **110**, welches über die Benzotriazol-aktivierte 2'-Desoxyguanosin-Route aus Kapitel 4.1 synthetisiert wurde, verglichen werden. In den folgenden beiden ¹H-NMR-Spektren ist der Vergleich dieser, über zwei unterschiedliche Routen, synthetisierten gleichen Addukte **110** abgebildet (Abb. 72 und Abb. 73, S. 76).

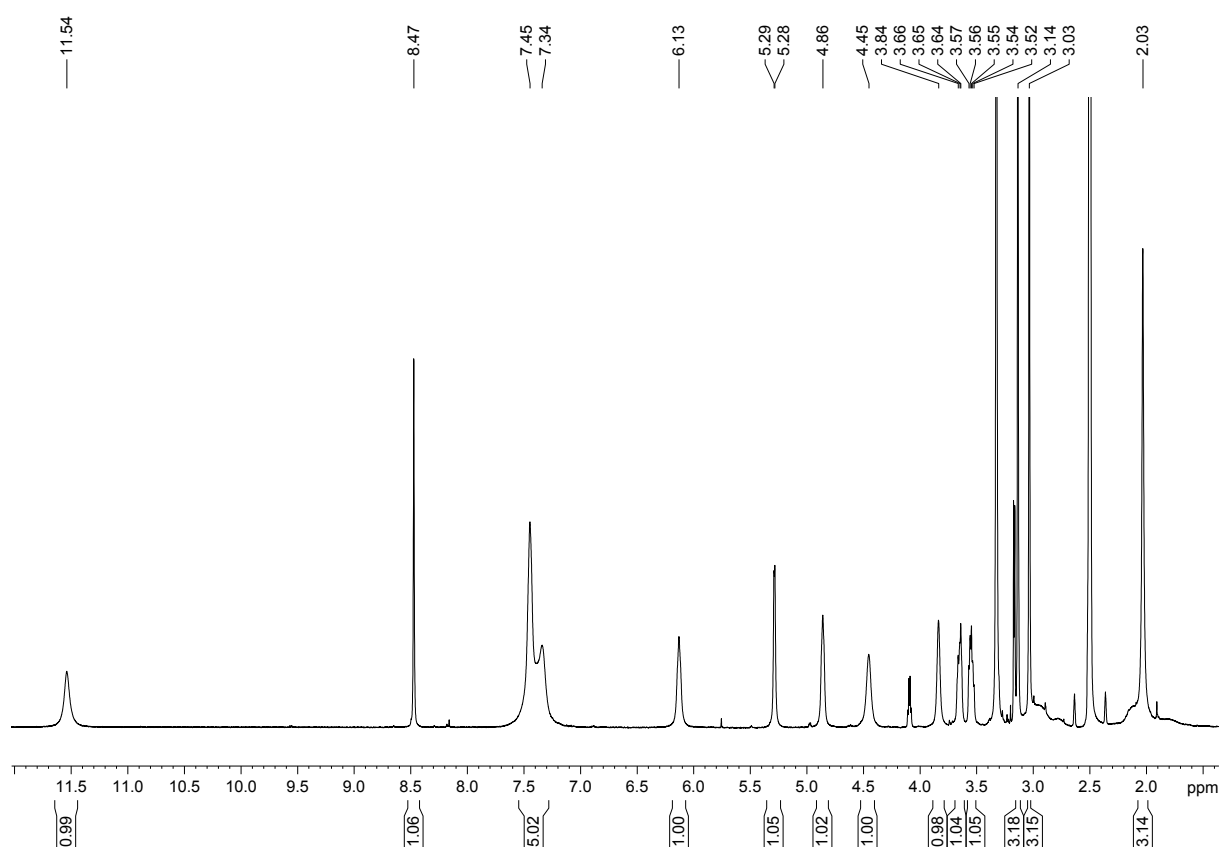


Abb. 72: ¹H-NMR-Spektrum von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosins **110** in DMSO-*d*₆ synthetisiert über die Benzotriazol-aktivierte 2'-Desoxyguanosin-Route

Abbildung 72 (S. 75) zeigt das reine Formamidin-geschützte, C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierte Addukt **110** welches über die Benzotriazol-Route aus Kapitel 4.1 dargestellt wurde. Dieses ^1H -NMR-Spektrum ist identisch mit dem Spektrum des über die Buchwald-Hartwig-Kupplung dargestellten Adduktes **110** (Abb. 73).

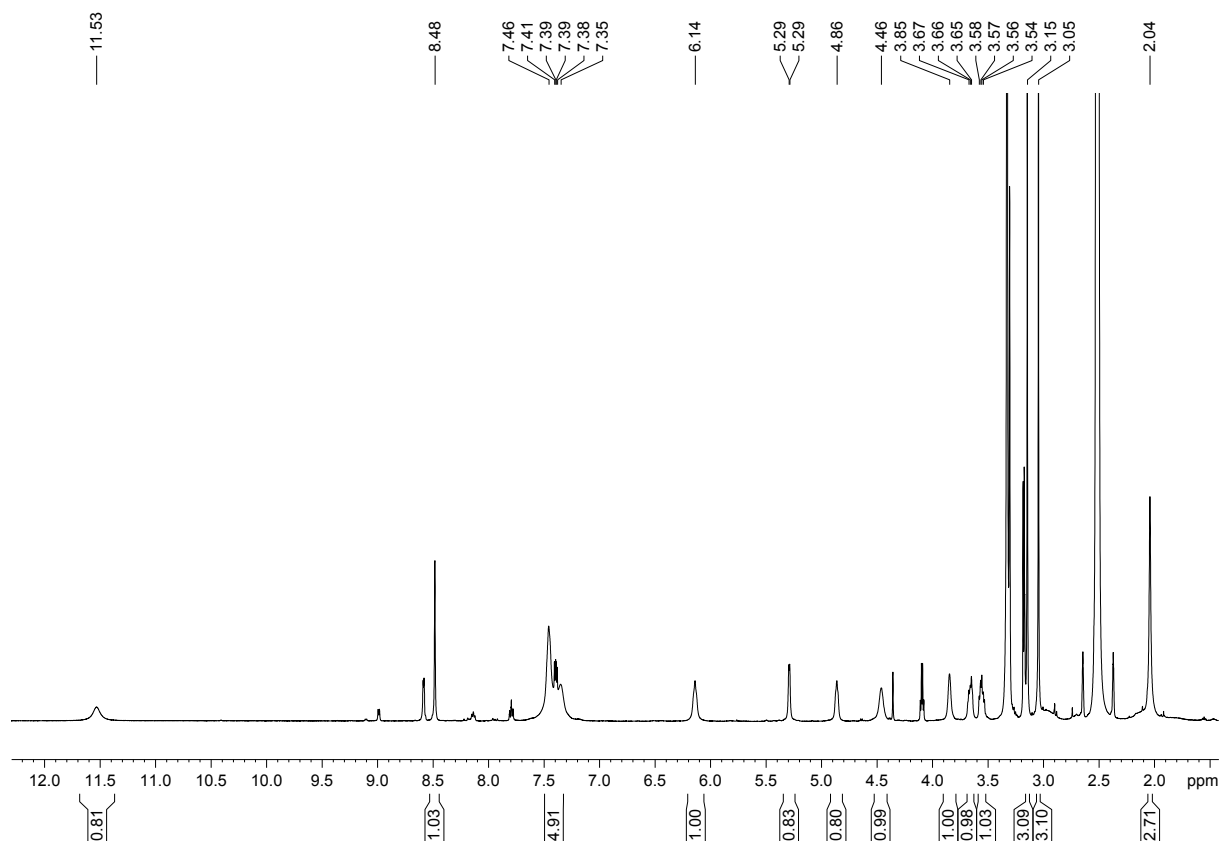


Abb. 73: ^1H -NMR-Spektrum von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosins **110** in $\text{DMSO-}d_6$ synthetisiert über die metallkatalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung

Zusätzlich konnte die Effektivität der Benzotriazol-Route deutlich hervorgehoben werden, da anhand dieser über nur fünf Stufen *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosin **110** in einer Ausbeute von 46% erhalten wurde. Im Gegensatz dazu werden über die Buchwald-Hartwig-Kupplung acht Syntheseschritte benötigt und eine Gesamtausbeute von nur 1% berechnet werden.

4.3 Synthese der C8-NH-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Phosphoramidite zur Oligonucleotidsynthese

Die Darstellung der C8-NH-Arylamin-modifizierten Oligonucleotidbausteine sollte analog der Syntheseroute von Böge ausgehend vom 2'-Desoxyguanosin **40** erfolgen.^[55]

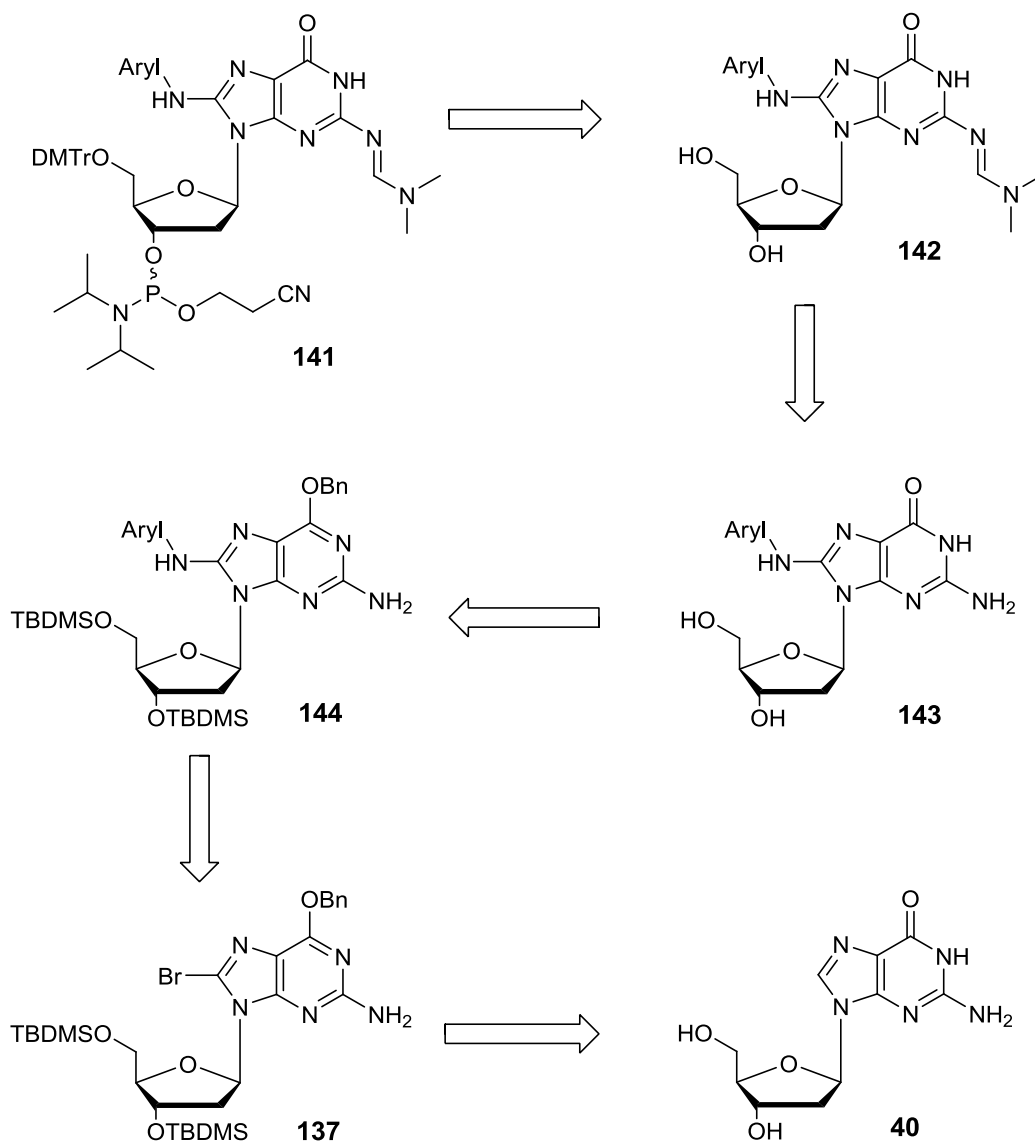


Abb. 74: Retrosynthese zur Darstellung der C8-NH-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite **141**

Wie schon in Kapitel 4.2 (S. 69) beschrieben, ist der entscheidende Schritt der gewählten Syntheseroute die Einführung der Modifikation in C8-Position des Guanosins **144** (Abb. 74).

Die C-N-Bindungsknüpfung sollte mittels einer Buchwald-Hartwig-Kupplung eingeführt werden. Nach der C8-Modifizierung sollten die Schutzgruppen abgespalten, die Einführung der basenlabilen Amino-Schutzgruppe (Formamidin) sowie die für die Oligonucleotid-Festphasensynthese notwendige 5'-OH-Schutzgruppe (DMTr) erfolgen und abschließend die Phosphoramiditfunktion generiert werden.

Zur Anwendung der Buchwald-Hartwig-Kupplung wurde das in Kapitel 4.2 über drei Stufen in einer Gesamtausbeute von 36% synthetisierte *O*⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **137** verwendet.

Mit dieser Verbindung wurde im Folgenden die Kupplung des Arylamins in C8-Position durchgeführt (Abb. 75).

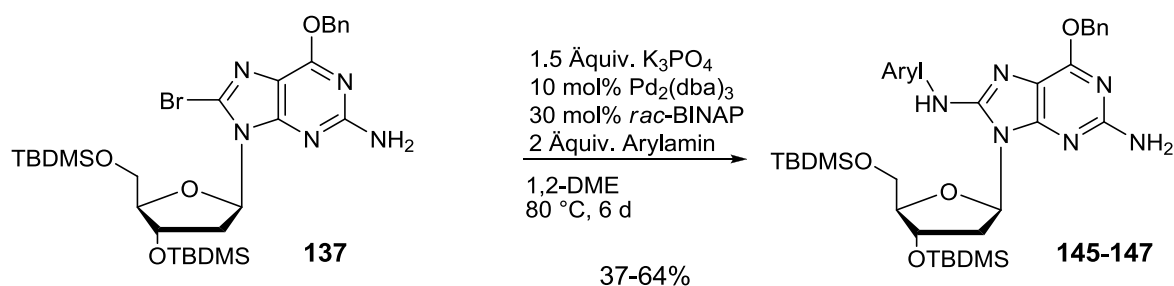


Abb. 75: Buchwald-Hartwig-Kupplung zu den C8-NH-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukten **145-147**

*O*⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(TBDMS)-2'-desoxyguanosin **137** wurde in 1,2-Dimethoxyethan gelöst und mit dem Palladium-Katalysator, *rac*-BINAP, Kaliumphosphat und dem entsprechenden Arylamin versetzt. Die Produkte **145-147** konnten nach der Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung in Ausbeuten zwischen 37% und 64% isoliert werden (Tab. 13).

Tab. 13: Zusammenfassung der Ausbeuten der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung

Produkt	Aryl	Ausbeute
145	4-Methylphenyl	37%
146	3,5-Dimethylphenyl	64%
147	2-Fluorenyl	47%

Der postulierte Mechanismus dieser Kupplungsreaktion ist in Abbildung 67 (S. 72) dargestellt.

Die relativ niedrigen Ausbeuten des 4-Methylphenyl- **145** und des 2-Fluorenyl-modifizierten Produktes **147** resultieren aus der benötigten zweifachen chromatographischen Reinigung dieser Addukte und den damit verbundenen Ausbeuteeinbußen.

Die zunächst durchgeführte Debenzylierung wurde durch Lösen des entsprechenden C8-Adduktes in Methanol und Zugabe von Palladium auf Aktivkohle bei anschließendem Rühren unter einer Wasserstoff-Atmosphäre erreicht (Abb. 76).

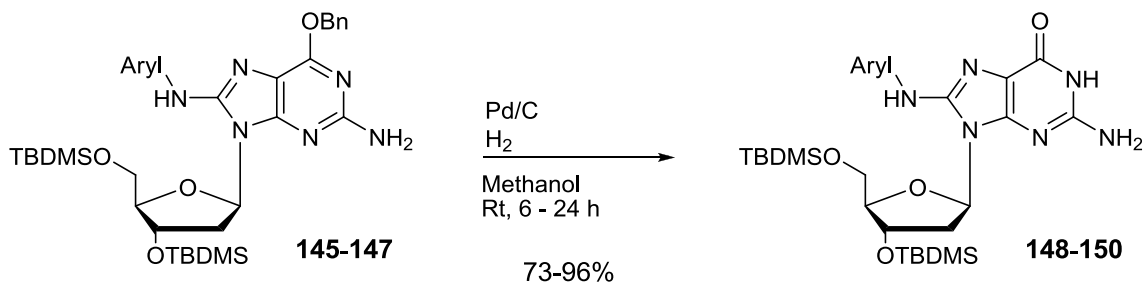


Abb. 76: Debenzylierung der C8-NH-Arylamin-Addukte **145-147**

Die entsprechenden Produkte **148-150** konnten dabei nach Reaktionszeiten von 6-24 Stunden in Ausbeuten von 73-96% durch mehrmaliges Zentrifugieren und Waschen des Katalysators mit Methanol in reiner Form isoliert werden (Tab. 14).

Tab. 14: Ausbeuteübersicht der Debenzylierung

Produkt	Aryl	Ausbeute
148	4-Methylphenyl	81%
149	3,5-Dimethylphenyl	96%
150	2-Fluorenyl	73%

Im nächsten Syntheseschritt wurden die Silylschutzgruppen abgespalten. Hierbei konnte aus vorangegangenen Arbeiten eine milde Abspaltung unter Verwendung von Triethylamin-Trihydrofluorid in Gegenwart von Triethylamin erreicht werden (Abb. 77, S. 80).^[55]

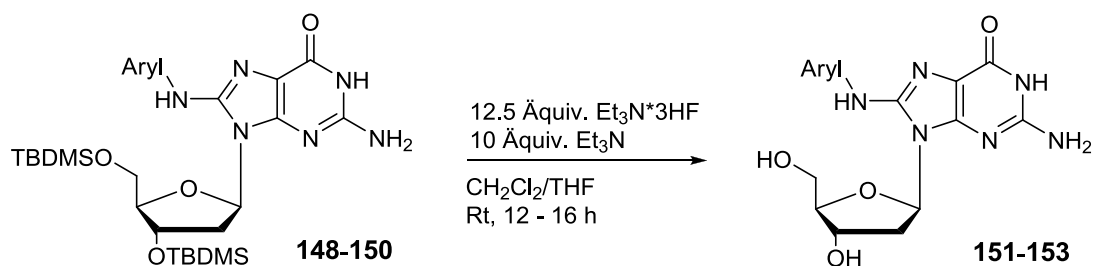


Abb. 77: Desilylierung der C8-NH-Addukte **148-150**

Hierzu wurden die entsprechenden Addukte in THF/Dichlormethan (1:1 v/v) gelöst, mit Triethylamin-Trihydrofluorid und Triethylamin versetzt und bei Raumtemperatur für 12-16 Stunden gerührt. Da in vorangegangenen Arbeiten eine Instabilität dieser Verbindungen durch hohe Ausbeuteeinbußen während der Reinigung nachgewiesen werden konnten, sollten diese direkt in die nächste Stufe, der Blockierung der exocyclischen Aminofunktion eingesetzt werden.^[55]

Die selektive NH₂-Blockierung der entschützten Addukte **151-153** konnte durch Reaktion mit Dimethylformamid-diethylacetal in Pyridin bei Raumtemperatur innerhalb von 18-30 Stunden erreicht werden (Abb. 78).

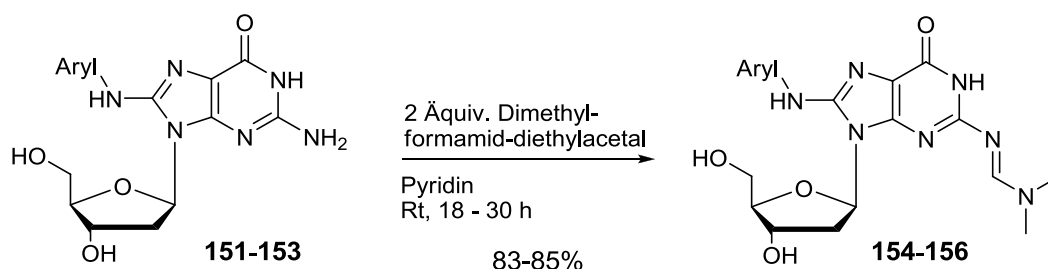


Abb. 78: Formamidin-Schätzung der C8-NH-Arylamin-Addukte **151-153**

Die geschützten Addukte **154-156** konnten dabei über zwei Stufen in Ausbeuten von 83-85% isoliert werden (Tab. 15).

Tab. 15: Formamidin-Schätzung der C8-Addukte **154-156**

Produkt	Aryl	Ausbeute
154	4-Methylphenyl	85%
155	3,5-Dimethylphenyl	83%
156	2-Fluorenyl	83%

Die nächste Stufe zur Darstellung der Phosphoramidite für die Oligonucleotidsynthese bestand in der Einführung der säurelabilen DMTr-Schutzgruppe an die 5'-Hydroxyfunktion (Abb. 79).

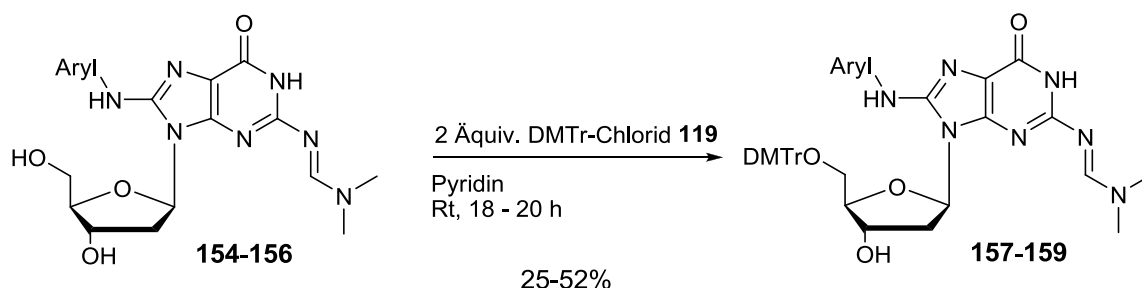


Abb. 79: DMTr-Schätzung der C8-Addukte **154-156**

Die N^2 -Formamidin-8-*N*-(arylamino)-2'-dG-Addukte **154-156** wurden mit zwei Äquivalenten DMTr-Chlorid **119** versetzt und bei Raumtemperatur für 18-20 Stunden gerührt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung konnten die entsprechenden Produkte **157-159** in Ausbeuten von 25-52% isoliert werden (Tab. 16).

Tab. 16: Ausbeuteübersicht der DMTr-Schätzungen

Produkt	Aryl	Ausbeute
157	4-Methylphenyl	27%
158	3,5-Dimethylphenyl	52%
159	2-Fluorenyl	25%

Die niedrigen Ausbeuten sind auf die schon in Kapitel 4.1 erwähnte, zum Teil doppelte DMTr-Schätzung der 3'- und 5'-Hydroxygruppe zurückzuführen. Dieses ungewünschte Nebenprodukt kann durch Reduktion der zugegebenen Äquivalente an DMTr-Chlorid von zwei auf ein Äquivalent eingeschränkt werden (vgl. Kapitel 4.1.4, S. 64).

An die Dimethoxytritylierung schloss sich die Überführung in das entsprechende Phosphoramidit an (Abb. 80, S. 82).

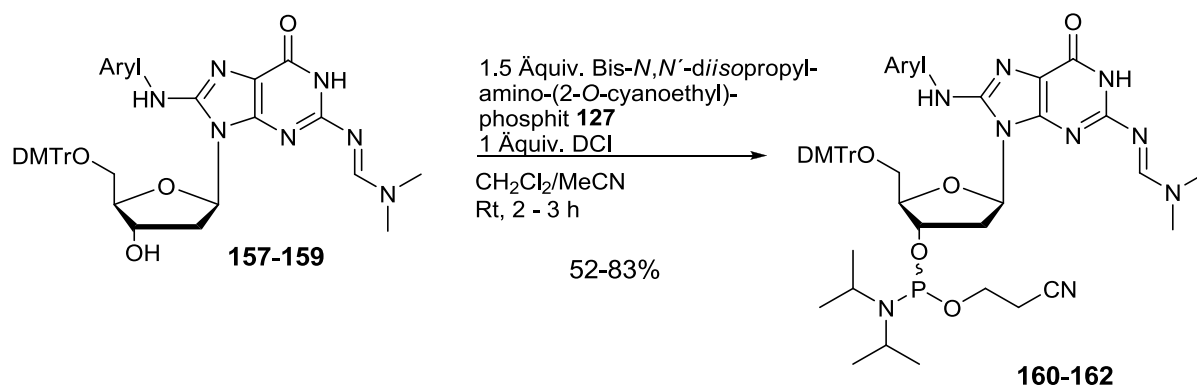


Abb. 80: Synthese der Arylamin-modifizierten Phosphoramidite **160-162**

Die DMTr-geschützten Addukte **157-159** wurden in Dichlormethan/Acetonitril (1:1 v/v) gelöst mit 4,5-Dicyanoimidazol und mit Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** versetzt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Alox, neutral, Akt.stufe III) wurden die entsprechenden Phosphoramidite **160-162** von den ebenfalls entstehenden H-Phosphonaten in Ausbeuten von 52-83% isoliert (Tab. 17).

Tab. 17: Ausbeuteübersicht der C8-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite **160-162**

Produkt	Aryl	Ausbeute
160	4-Methylphenyl	72%
161	3,5-Dimethylphenyl	52%
162	2-Fluorenyl	83%

Die Phosphoramidite wurde nach Gefriertrocknung aus Benzol als farblose Schäume erhalten und konnten im Folgenden gezielt in Oligonucleotide eingebaut werden.

4.4 Synthese der C8-NH- und C8-(N-Acetyl)-arylamino-modifizierten Oligonucleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten C8-NH- und C8-(N-Acetyl)-arylamino-modifizierten Phosphoramidite **128-133** und **160-162** sollten sequenzspezifisch in verschiedene Oligonucleotide eingebaut und ihr Einfluss auf deren Eigenschaften untersucht werden.

Zunächst sollte die bereits von *Rizzo* für das heterocyclische Amin IQ verwendete *NarI*-Sequenz synthetisiert werden.^[46] Dieses 12mer-Oligonucleotid ist ein Hotspot für Arylamino-modifizierte 2'-Desoxyguanosine und sollte, ausgehend vom 5'-Ende, an Position 4 und 7 modifiziert werden (5'-d(CTC **GGC GCC** ATC)-3'). Im Anschluss sollte der Einfluss der jeweiligen eingeführten Modifikation auf die Schmelztemperatur und die Konformation des Duplex-Stranges untersucht werden.

Als weitere Sequenz wurde ein palindromes (selbstkomplementäres) 12mer-Oligonucleotid gewählt, welches die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI* besitzt und im Folgenden als *EcoRI*-Sequenz bezeichnet wird (5'-d(**GTA GAA** TTC TAC)-3'). Hier sollte, ausgehend vom 5'-Ende die Position 1 und 4 modifiziert werden. Somit liegt die eine Modifikation innerhalb der *EcoRI*-Schnittstelle und die andere außerhalb. Anschließend können Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Modifikation auf den T_m -Wert, die Konformation, als auch den Restriktionsabbau durch das Enzym *EcoRI* durchgeführt werden.

Um den Einfluss der Modifikation auf längere Oligonucleotide zu untersuchen, wurden diese zusätzlich in ein 20mer-Oligonucleotid (5'-d(ACA **TGA** GCA TCT ACG ACG CG)-3') eingebaut. Neben den Untersuchungen bezüglich T_m -Wert und Konformationsanalyse sollten erstmals Primer-Verlängerungs-Untersuchungen in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

Die Synthese der modifizierten und unmodifizierten Oligonucleotide wurde mittels Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode mit einem DNA-Synthesizer durchgeführt. Zur Synthese der unmodifizierten Oligonucleotide wurden sowohl die Standardchemikalien als auch die Syntheseprotokolle des Geräteherstellers (s. Anhang, S. 296) verwendet. Als Trägermaterial diente kommerziell erhältlicher Succinyl-CPG-Träger. Die Kupplungsausbeuten lagen bei jedem Schritt über 95% (ermittelt durch einen Trityl-Assay).

Für den Einbau der modifizierten Phosphoramidite wurden diese zunächst in Acetonitril gelöst (0.1 M) und das Kupplungsprotokoll leicht verändert (s. Anhang, S. 298). Zusätzlich wurde ein dritter Kupplungsschritt eingefügt und die Kupplungszeit bei jedem dieser Schritte von 15 Sekunden auf 500 Sekunden verlängert. Dies konnte die Kupplungsausbeuten jedoch nicht über 70% erhöhen und die Methode liegt damit deutlich unter den Ausbeuten der Standardkupplungen. Alle Synthesen wurden im 1 μ M-Maßstab durchgeführt. Die letzte DMTr-Schutzgruppe wurde noch am Synthesizer entfernt. Anschließend wurden die Oligonucleotide manuell mit konzentriertem Ammoniak (25%) und β -Mercaptoethanol vom CPG-Träger abgespalten. Zur Entschützung der funktionellen Gruppen der einzelnen Basen wurde diese Lösung zunächst für vier Stunden bei 55 °C im Thermomixer inkubiert und abschließend im Vakuum konzentriert.^[109,110] Diese Methode wurde im Anschluss teilweise verändert. Wichtig hierbei war, dass die Oligonucleotide niemals bis zur Trockene eingeeengt wurden, da sonst eine teilweise Zersetzung beobachtet werden konnte. Die erhaltenen Rohprodukte wurden in Reinstwasser aufgenommen und mittels HPLC über eine RP-18-Säule mit einem TEAA-Puffer (Triethylammoniumacetat) und einem Acetonitril-Gradienten bei Raumtemperatur eluiert. Anhand der für Oligonucleotide spezifischen Absorption bei 260 nm konnten bei den entsprechenden Retentionszeiten einzelne Fraktionen aufgefangen und bei Bedarf ein weiteres Mal gereinigt werden. Die gereinigten Oligonucleotide wurden anschließend für die Messung der optischen Dichte in Reinstwasser gelöst. Von dieser Oligonucleotidlösung (1:100) wurde die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gemessen. Aus dem A_{260} -Wert ließ sich durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die optische Dichte der Gesamtlösung (OD_{260}) und daraus die Gesamtmenge des erhaltenen Oligonucleotids berechnen.

Abbildung 81 (S. 85) zeigt exemplarisch das Rohchromatogramm des C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten 20mer-Oligonucleotids **163** (5'-d(ACA TGA GCA TCT ACG ACG CG)-3'), welches unter Standardbedingungen (NH_3 , β -Mercaptoethanol, 4 h, 55 °C) abgespalten wurde.

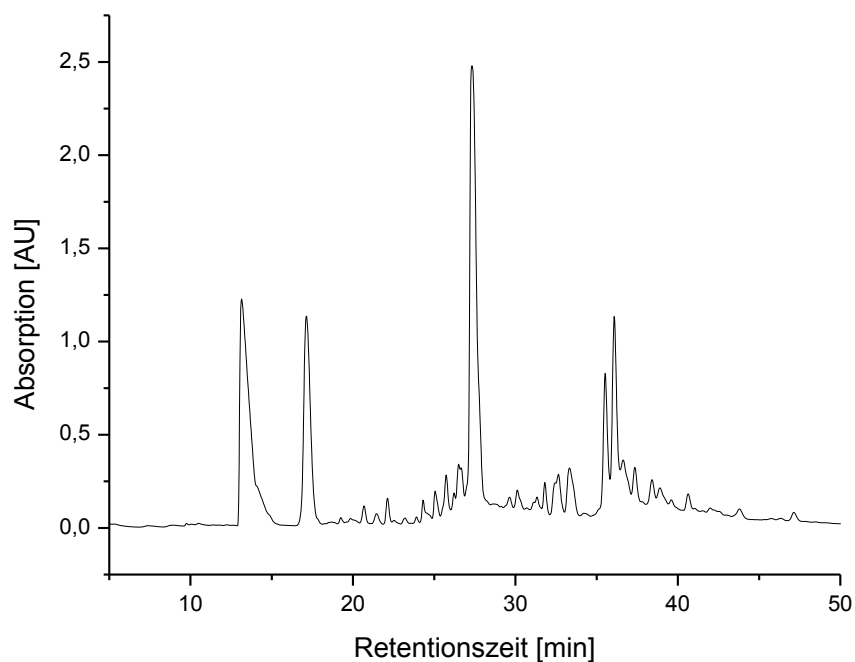


Abb. 81: Rohchromatogramm des C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids **163** Abspaltungsbedingung: NH_3 , β -Mercaptoethanol, 4 h, 55 °C

In dem Bereich zwischen 13 und 18 Minuten eluierten zunächst diverse Schutzgruppen und Verunreinigungen. Das große Signal bei etwa 28 Minuten konnte durch massenspektrometrische Analyse dem Abbruchstrang 5'-d(A GCA TCT ACG ACG CG)-3' zugeordnet werden. Die beiden weiteren Signale bei ungefähr 36 Minuten wurden ebenfalls massenspektrometrisch analysiert. Ihnen konnten zwei Produkte zugeordnet werden. Zum Einen das in Abbildung 82 (S. 86) dargestellte 4-Biphenyl-modifizierte Oligonucleotid **164** (5'-d(ACA TG^[4-biphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG)-3') mit einer Retentionszeit von 34.4 Minuten.

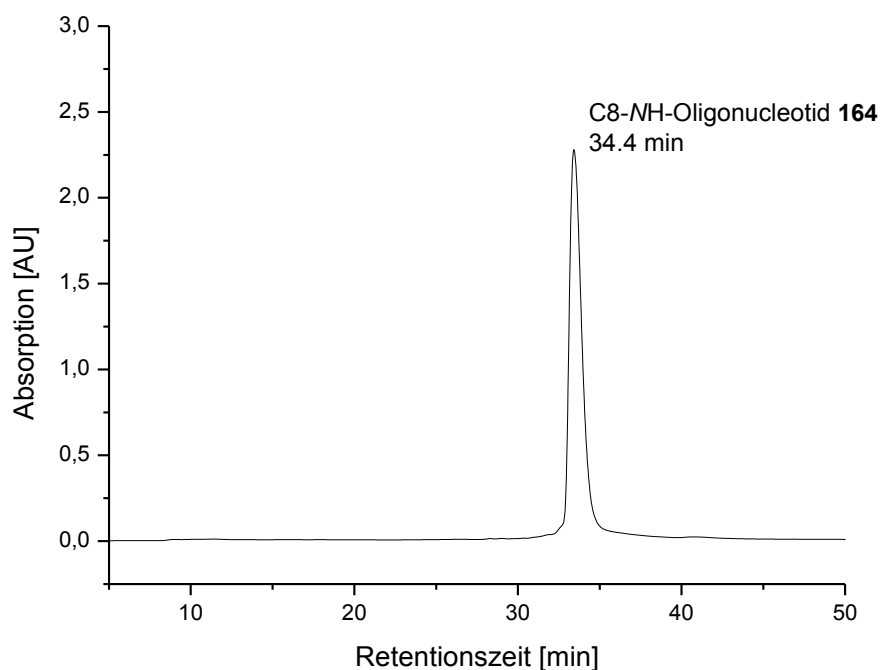


Abb. 82: Chromatogramm des isolierten, gereinigten C8-NH-4-Biphenyl-modifizierten Oligonucleotids **164** (5'-d(ACA TGA GCA TCT ACG ACG CG)-3')

Zum Anderen das in Abbildung 83 dargestellte acetylierte Addukt (5'-d(ACA TG^[Ac-4-biphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG)-3') **163** mit einer Retentionszeit von 33.4 Minuten.

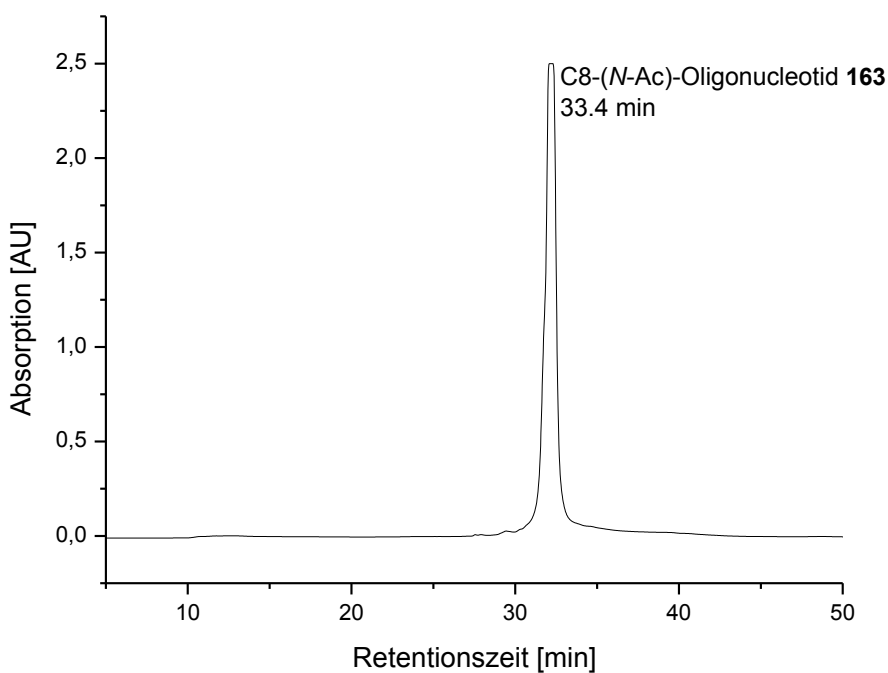


Abb. 83: Chromatogramm des isolierten, gereinigten C8-(N-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids **163** (5'-d(ACA TGA GCA TCT ACG ACG CG)-3')

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass durch die Entschützung mit Ammoniak über vier Stunden bei 55 °C ein beträchtlicher Teil der Acetylgruppe abgespalten wird. Vergleicht man das Rohchromatogramm (Abb. 81, S. 85) mit den beiden gereinigten Oligonucleotiden, so kann im Bereich von 35-38 Minuten das kleinere Signal dem acetylierten Oligonucleotid **163** zugeordnet werden und das größere Signal dem deacetylierten Oligonucleotid **164**. Die in den isolierten Verbindungen geringere Verschiebung der Retentionszeiten ist auf die höhere Beladung der Säule zurückzuführen.

Zur Identifizierung der einzelnen Oligonucleotide wurden ESI-MS Messungen mit einer Konzentration von jeweils 50 pmol/µL analysiert. Hierbei wurde anfangs eine Lösung aus 20% Isopropanol und 1% Triethylamin in Wasser verwendet. Aufgrund der basenlabilen Acetylgruppe wurde später anstelle dieser Lösung ein TEAA-Puffer verwendet. Hierdurch gelang eine erfolgreiche Vermessung und Charakterisierung aller synthetisierten Oligonucleotide. Abbildung 84 zeigt exemplarisch das ESI-Massenspektrum des C8-NH-4-Biphenyl-modifizierten 20mer-Oligonucleotids **164** (5'-d(ACA TG^[4-biphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG)-3').

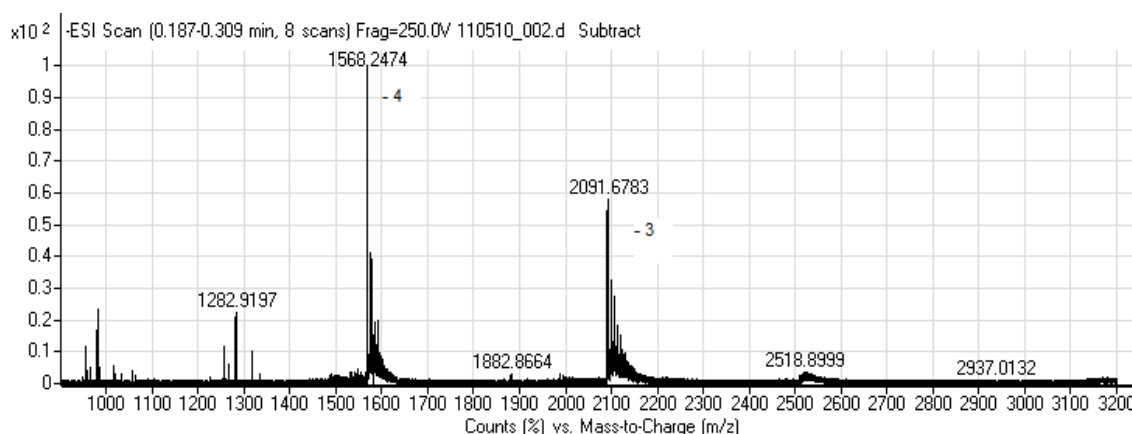


Abb. 84: ESI-Massenspektrum des modifizierten Oligonucleotides **164**

Oligonucleotide sind Polyanionen und liegen mehrfach geladen vor. Maximale Ladung des Dodecamers ist -11. Bei dem ESI-MS-Spektrum muss somit die m/z mit der dort vorliegenden Ladung multipliziert werden, um die Masse des Oligonucleotids zu erhalten.

Um eine Abspaltung der Acetylgruppe zu verhindern, wurden Temperatur und Zeit für die unterschiedlichen Oligonucleotide variiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

In Abbildung 85 ist das Rohchromatogramm des C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl-modifizierten Oligonucleotids **165** dargestellt. Hierbei wurde die Abspaltzeit auf drei Stunden reduziert. Nach der Isolierung und Charakterisierung konnte dem Signal bei 29.4 Minuten das acetylierte Derivat **165** zugewiesen werden und dem kleineren Signal bei 30.2 Minuten das *NH*-Oligonucleotid **166**. Durch die Reduzierung der Abspaltungszeit von vier auf drei Stunden konnte auch hier die Abspaltung der Acetylgruppe nicht vollständig unterbunden werden.

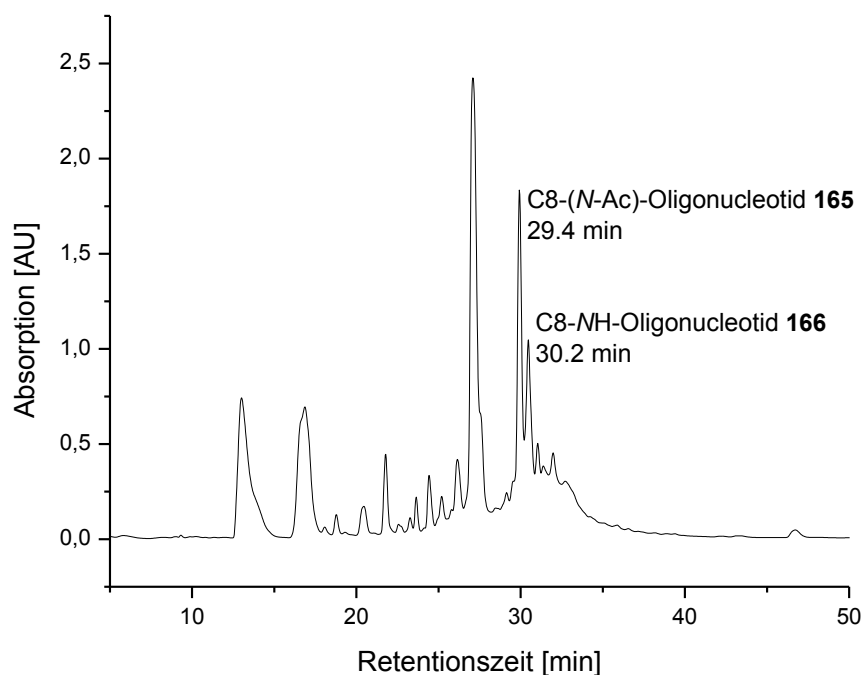


Abb. 85: Rohchromatogramm des C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl-modifizierten Oligonucleotids **165** Abspaltungsbedingung: NH_3 , β -Mercaptoethanol, 3 h, 55 °C

Im Folgenden wurde die Temperatur von 55 °C auf 45 °C erniedrigt und die Abspaltzeiten von einer bis vier Stunden gewählt.

In Abbildung 86 (S. 89) ist das Rohchromatogramm des C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-modifizierten Oligonucleotids **167** dargestellt. Hierbei wurde die Abspaltzeit auf eine Stunde verkürzt und die Temperatur auf 45 °C erniedrigt. Wie schon in vorangegangenen Arbeiten festgestellt wurde, weist ein solches Chromatogramm auf eine nicht vollständige Entschützung hin. Dies konnte anhand der sehr geringen Menge an isoliertem Oligonucleotid **167** bestätigt werden. Trotz gleichbleibender Ausbeuten bei der Synthese dieses Oligonucleotids konnten nur etwa 20% des gewünschten Produktes **167** isoliert werden. Somit ist eine Stunde bei 45 °C für die Abspaltung der Schutzgruppen ungeeignet.

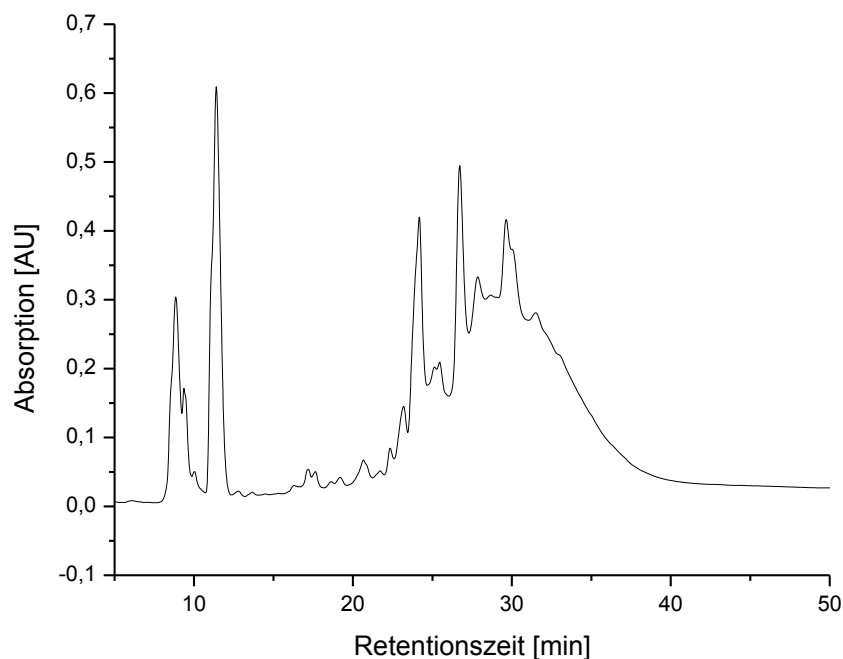


Abb. 86: Rohchromatogramm des C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-modifizierten Oligonucleotids **167** Abspaltungsbedingung: NH₃, β-Mercaptoethanol, 1 h, 45 °C

Daraufhin wurde die Abspaltzeit auf zwei Stunden verlängert. Das Rohchromatogramm des C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-modifizierten Oligonucleotids **167** (5'-d(GTA **GAA** TTC TAC)-3') ist in Abbildung 87 (S. 90) dargestellt. Das Signal bei etwa 25 Minuten konnte ebenfalls durch massenspektrometrische Analyse dem Abbruchstrang (5'-d(AA TTC TAC)-3') zugeordnet werden. Das darauffolgende größte Signal bei einer Retentionszeit von 27.7 Minuten konnte dem gewünschten acetylierten Oligonucleotid **167** zugeordnet werden. Die beiden nachfolgenden kleinen Signale wurden nicht isoliert, da die entsprechenden Substanzen keine charakteristische Absorption bei 260 nm aufwiesen.

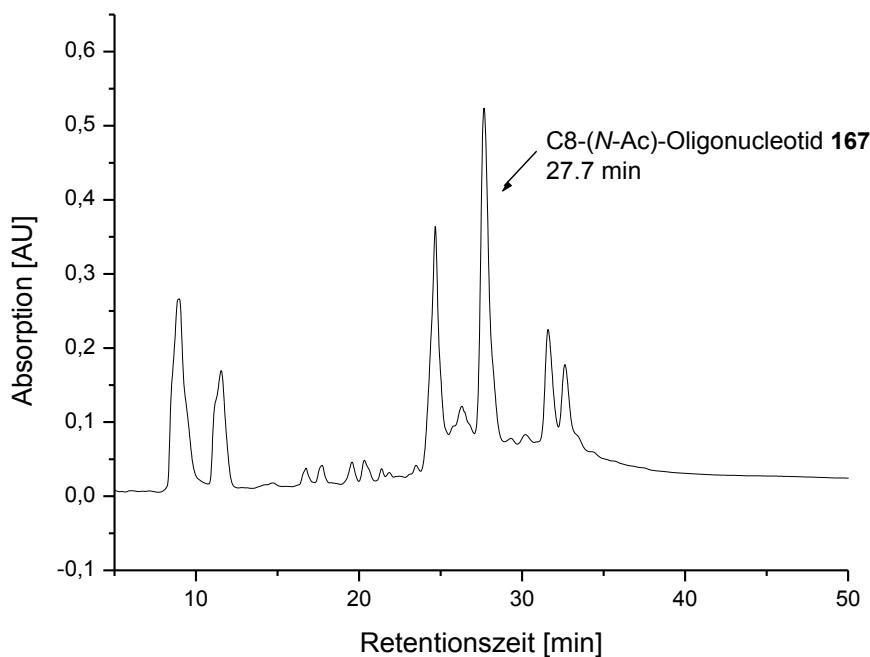


Abb. 87: Rohchromatogramm des C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-modifizierten Oligonucleotids **167** Abspaltungsbedingung: NH₃, β-Mercaptoethanol, 2 h, 45 °C

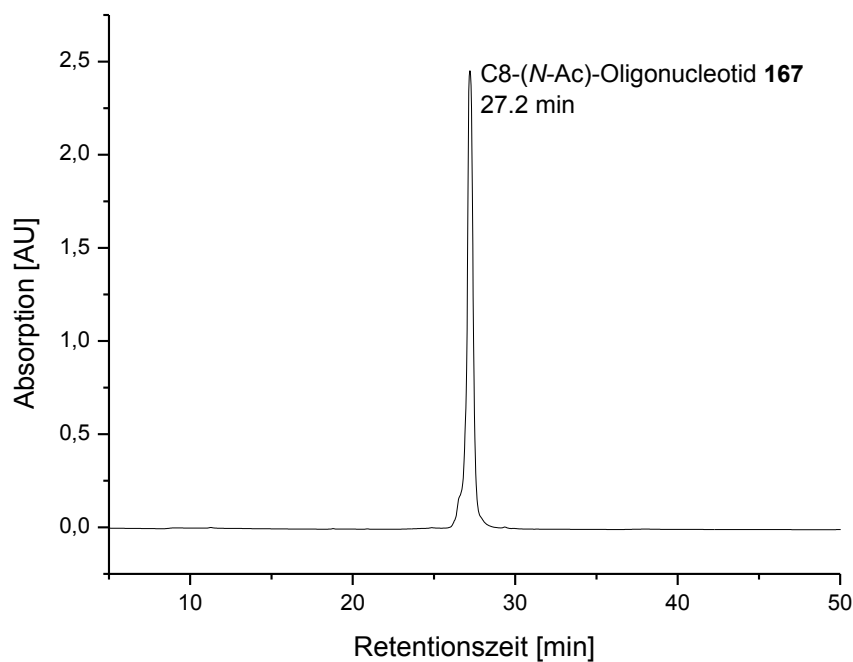


Abb. 88: Chromatogramm des isolierten, gereinigten C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-modifizierten Oligonucleotids **167** (5'-d(GTA **G**AA TTC TAC)-3')

Parallel zu den bisher genutzten Abspaltbedingungen wurden zudem Bedingungen von drei und vier Stunden bei 45 °C getestet. Zu Beobachten war aber wiederum eine geringe Abspaltung der Acetylgruppe.

Somit wurden alle weiteren Abspaltungen unter den optimierten Bedingungen von zwei Stunden bei 45 °C mittels Ammoniak und β -Mercaptoethanol durchgeführt, unabhängig davon, ob ein 12mer- oder das 20mer-Oligonucleotid vorlag. Es konnten alle Oligonucleotide ohne Abspaltung der Acetylgruppe dargestellt werden.

Um einen zuverlässigen Beweis für die relativ großen Verschiebungen der Retentionszeiten von einer bis zwei Minuten zwischen den *NH*- sowie *N*-Acetyl-Oligonucleotiden zu erhalten, wurden jeweils beide Phosphoramidite synthetisiert, in 20mer-Oligonucleotide eingebaut, gereinigt und anschließend coinjiziert (Abb. 89).

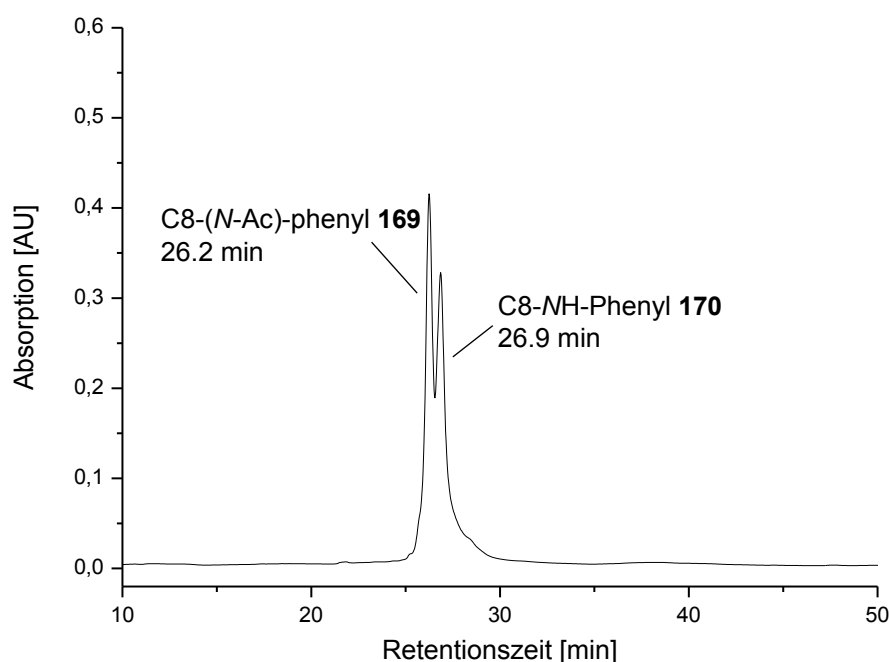


Abb. 89: Chromatogramm der Coinjektion des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl- sowie C8-*NH*-Phenyl-modifizierten Oligonucleotids **169** und **170** (5'-d(ACA TGA GCA TCT ACG ACG CG)-3')

In Abbildung 89 ist exemplarisch das Chromatogramm der Coinjektion des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl- **169** sowie C8-*NH*-Phenyl-modifizierten Oligonucleotids **170** abgebildet. Hier ist ein deutlicher Unterschied in der Retentionszeit der beiden Oligonucleotide zu erkennen. Das C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-Oligonucleotid **169** eluiert aufgrund der Acetylgruppe nach 26.2 Minuten und somit vor dem entsprechenden *NH*-Oligonucleotid **170** ($R_t = 26.9$ min). Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Polarität der Acetylgruppe ausreicht, um die Oligonucleotide in ihren Retentionszeiten deutlich voneinander zu verschieben.

Für die Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Acetylarylamin- und Arylamin-Modifikationen sollte zunächst die Messung der Schmelztemperatur (T_m -Wert) erfolgen, um Aussagen über die thermische Stabilität der modifizierten

Oligonucleotide im Vergleich zu den unmodifizierten machen zu können. Ebenfalls sollten hierüber Aussagen über den Einfluss der *N*-acetylierten und *N*-unacetylierten Derivate gemacht werden können.

4.5 Bestimmung der Schmelztemperaturen (T_m -Werte)

Als Schmelztemperatur (T_m) wird die Temperatur definiert, bei der 50% des DNA-Doppelstranges als Einzelstrang vorliegt. Bei Oligonucleotiden kann durch Messung der UV-Absorption, als Funktion der Temperatur, der thermisch induzierte Übergang von einer geordneten, helikalen Struktur in einen ungeordneten Zustand mit statistischer Verteilung der Konformation verfolgt werden. Der Wendepunkt dieser sigmoiden Schmelzkurve entspricht dem T_m -Wert (Abb. 90).^[111]

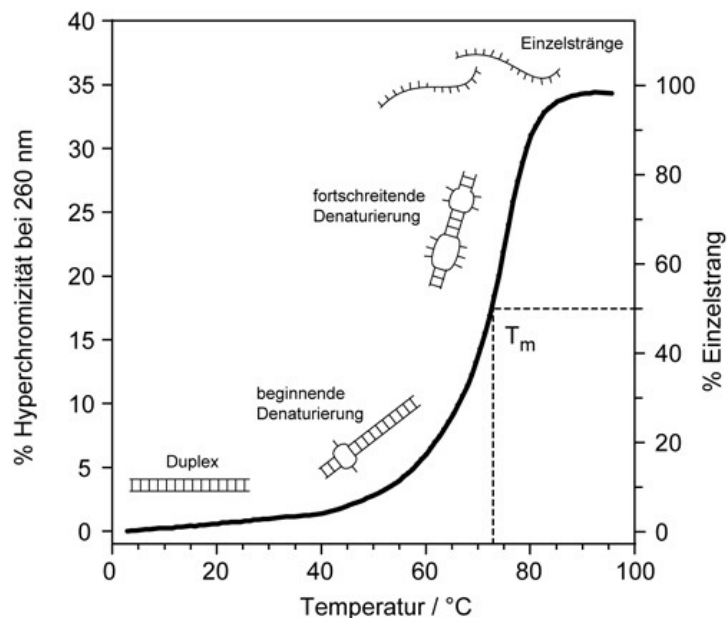


Abb. 90: Beispiel einer Schmelzkurve^[112]

Aufgrund der Basen, die in der helikalen Form in Stapeln senkrecht zur Helixachse angeordnet sind, hat doppelsträngige DNA einen geringeren molaren Absorptionskoeffizienten als aus der Summe der einzelnen molaren Absorptionskoeffizienten berechnet wird. Aufgrund dieses verringerten Wertes kommt es beim Schmelzen der DNA zu einer Zunahme der UV-Absorption (hyperchromer Effekt). Der Grad der Hyperchromizität ist ein Maß für die Basenpaarung und -stapelung der Sekundärstruktur.^[111]

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonucleotide wurden jeweils in einem 2 μ M-Maßstab in einem Phosphat-Puffer mit 140 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und einem pH-Wert von 6.8 vermessen. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 80 °C durchgeführt, wobei jeweils dreimal erhitzt und wieder abgekühlt wurde. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug hierbei 0.5 °C/min, wobei alle 0.5 °C ein Datenpunkt aufgenommen wurde. Zuvor wurde die Probenlösung zweimal schnell von 5 °C auf 80 °C erhitzt und wieder auf 5 °C abgekühlt. Hierbei lag die Kühl- bzw. Heizrate bei 10 °C/min. Hiermit wurde die DNA-Struktur zunächst in ihre Einzelstränge denaturiert, damit sie bei der folgenden Kühlung eine definierte Struktur ausbilden konnte. Die Absorption der entsprechenden Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm verfolgt. Das Ergebnis ist eine sigmoidale Kurve, von welcher das Maximum der 1. Ableitung zur Bestimmung des T_m -Wertes berechnet werden kann. Die während dieser Arbeit angewandte Methode ist die Van't Hoff'sche Kurvenanalyse. Sie lieferte mit einem Fehler von ± 0.5 °C die T_m -Werte der Oligonucleotid-Stränge. Zusätzlich lassen sich mittels dieser Methode thermodynamische Daten (ΔH und ΔS) der Oligonucleotid-Stränge bestimmen.

Für alle in dieser Arbeit synthetisierten Oligonucleotid-Stränge wurden die T_m -Werte ermittelt und mit dem unmodifizierten Strang verglichen.

In Tabelle 18 sind die berechneten Werte für die *Narl*-Oligonucleotide aufgelistet.

Narl-Sequenz (5' - d(CTC GGC GCC ATC) - 3')

Tab. 18: T_m -Werte und thermodynamische Daten der an Position 4 und 7 modifizierten und unmodifizierten *Narl*-Oligonucleotide **171-179**

Modifikation	T_m [°C]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol/K]
unmodifiziert 171	58.2	-79.1	-267.7
Position 4:			
C8-(<i>N</i> -Ac)-phenyl 172	41.9	-100.9	-291.1
C8-NH-Phenyl 173	50.3 ^[55]	-88.5 ^[55]	-303.0 ^[55]
C8-(<i>N</i> -Ac)-2-fluorenyl 174	51.5	-94.8	-262.9
C8-NH-2-Fluorenyl 175	49.8	-62.7	-168.5
Position 7:			
C8-(<i>N</i> -Ac)-phenyl 176	44.1	-80.2	-223.4
C8-NH-Phenyl 177	49.2	-140.8	-414.7
C8-(<i>N</i> -Ac)-2-fluorenyl 178	44.7	-105.1	-301.4
C8-NH-2-Fluorenyl 179	48.8	-72.8	-197.1

Der T_m -Wert des unmodifizierten *NarI*-Oligonucleotids **171** liegt bei 58.2 °C. Es ist ein deutlicher Einfluss der Modifikationen auf die thermische Stabilität zu erkennen. So liegen die T_m -Werte der C8-NH-Oligonucleotide **173** und **175** sowie der des C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-Oligonucleotids **174** um 6.7-8.4 °C unter dem des unmodifizierten Stranges **171**. Auffällig ist, dass das C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierte Oligonucleotid **172** die thermische Stabilität nochmals herabsetzt. Hier ist der T_m -Wert um 16.3 °C geringer im Vergleich zum Referenzstrang **171**. Diese Reduktion der Schmelztemperatur ist durch die mögliche *syn*-Konformation zu erklären (Kapitel 4.1). Hierbei ragt die *N*-acetylierte Base in die DNA-Doppelhelix hinein, interkaliert mit den Nachbarbasen und schiebt den Guanin-Heterocyclus in die große Furche der DNA. Bei den unacetylierten Addukten, welche vermutlich in der *anti*-Konformation vorliegen, liegt der modifizierte Teil in der großen Furche und stört die Basenpaarung nicht. Auffällig ist der geringe Einfluss des C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-Oligonucleotids **174**, da die Acetylgruppe, wie beim C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierten Strang **172** und auch in den folgenden Sequenzen zu beobachten, einen größere Wirkung auf die thermische Stabilität haben sollte. Diese scheint an der Position 4 keinen Einfluss zu haben. Der Grund für diesen geringeren Einfluss kann möglicherweise das polycyclische, aromatische System des C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-Oligonucleotids **174** sein, welches eine merkliche Krümmung des DNA-Duplex zur Folge hat und somit die thermische Stabilität wieder erhöht.

Um eine eventuelle Abhängigkeit des T_m -Wertes von der Lage der Modifikation innerhalb einer bestimmten Sequenz zu ermitteln, wurden neben der Position 4 ebenfalls analoge T_m -Wertmessungen mit den in Position 7 modifizierten Oligonucleotiden **176-179** durchgeführt.

Anhand der gemessenen T_m -Werte ist auch hier ein deutlicher Einfluss der Modifikationen auf die thermische Stabilität zu erkennen. Im Vergleich zum Referenzstrang **171** liegt der Einfluss der C8-NH-Oligonucleotide **177** und **179** mit etwa 9 °C im gleichen Bereich wie für die in Position 4 modifizierten C8-NH-Oligonucleotide **173** und **175**. Im Gegensatz dazu liegen die T_m -Werte beider C8-(*N*-Acetyl)-Oligomere **176** und **178** etwa 14 °C unter dem des Referenzstranges **171** und sind somit vergleichbar mit dem in Position 4 modifizierten C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotid **172**. Insgesamt lässt sich keine Abhängigkeit des T_m -Wertes durch die Position (4 oder 7) einer Arylamin-Modifikation feststellen.

Um weitere Informationen über den Einfluss der Arylamin-Modifikationen zu erhalten, wurden analoge Messungen für die palindrome *EcoRI*-Sequenz vorgenommen.

EcoRI-Sequenz (5' - d(GTA **GAA** TTC TAC) - 3')

Zunächst erfolgte der Einbau der Modifikationen innerhalb der Position 4 der *EcoRI*-Sequenz. Da es sich bei dieser Sequenz um eine selbstkomplementäre Sequenz handelt, erfolgte die Messung der Schmelztemperaturen ohne unmodifizierten Gegenstrang. Die Ergebnisse für die in Position 4 modifizierten Oligonucleotide **165-168** und **181-188** sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Tab. 19: T_m -Werte und thermodynamische Daten der in Position 4 modifizierten und unmodifizierten *EcoRI*-Oligonucleotide **165-168** und **180-188**

Modifikation	T_m [°C]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol/K]
unmodifiziert 180	42.1 ^[55]	-74.4 ^[55]	-269.5 ^[55]
C8-(<i>N</i> -Ac)-phenyl 181	11.9	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
C8-NH-Phenyl 182	29.5 ^[55]	-88.9 ^[55]	-323.1 ^[55]
C8-(<i>N</i> -Ac)-4-methylphenyl 167	13.4	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
C8-NH-4-Methylphenyl 168	23.2 ^[55]	-50.2 ^[55]	-142.0 ^[55]
C8-(<i>N</i> -Ac)-4-methoxyphenyl 165	11.0	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
C8-NH-4-Methoxyphenyl 166	25.5 ^[55]	-90.7 ^[55]	-276.1 ^[55]
C8-(<i>N</i> -Ac)-3,5-dimethylphenyl 183	8.2	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
C8-NH-3,5-Dimethylphenyl 184	24.0 ^[55]	-80.7 ^[55]	-243.4 ^[55]
C8-(<i>N</i> -Ac)-2-fluorenyl 185	11.4	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
C8-NH-2-Fluorenyl 186	23.3 ^[55]	-56.5 ^[55]	-164.0 ^[55]
C8-(<i>N</i> -Ac)-4-biphenyl 187	7.9	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
C8-NH-4-Biphenyl 188	23.9 ^[55]	-87.5 ^[55]	-267.5 ^[55]

n.b. = nicht bestimmbar

Um die Auswirkung der acetylierten Addukte zu verdeutlichen, wurde in Abbildung 91 (S. 96) ein Balkendiagramm der T_m -Werte dargestellt.

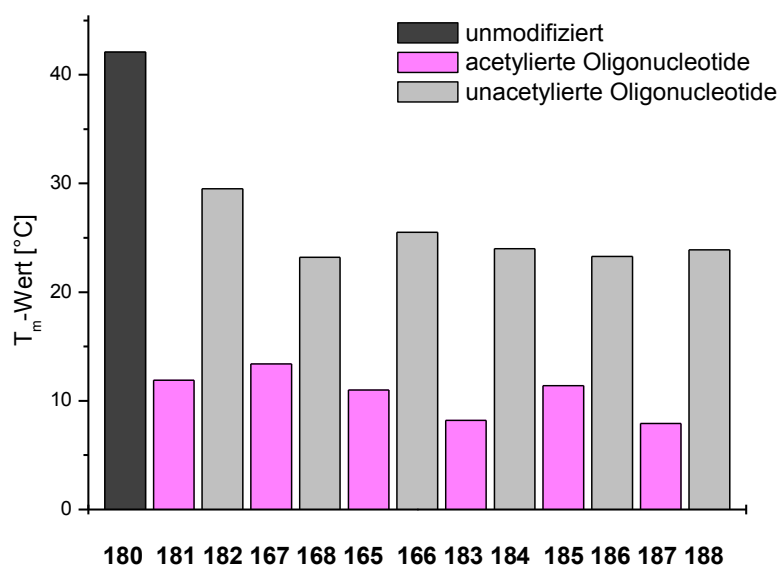


Abb. 91: T_m-Werte in Form eines Balkendiagrammes der in Position 4 modifizierten und unmodifizierten *EcoRI*-Oligonucleotide **165-168** und **180-188**

Wie erwartet, sind auch hier die T_m-Werte der modifizierten Oligonucleotide **165-168** und **181-188** niedriger als der des unmodifizierten Referenzstrangs **180**, der einen Wert von 42.1 °C aufweist. Dabei lässt sich an den C8-NH-Oligonucleotiden **166** (Anis), **168** (Tol), **182** (An), **184** (DMA), **186** (Af), **188** (ABP) generell erkennen, dass eine zweite Modifikation nahezu eine Verdopplung der thermischen Destabilisierung bewirkt. Interessanterweise ist bei den C8-(N-Acetyl)-Oligonucleotiden **165** (AcAnis), **167** (AcTol), **181** (AcAn), **183** (AcDMA), **185** (AcAf), **187** (AcABP) eine noch größere destabilisierende Wirkung zu erkennen. Aufgrund dieser großen Destabilisierung liegen die T_m-Werte in einem Bereich 7.9-13.4 °C, so dass es nicht möglich war, die Daten mittels computerunterstützter Berechnungen zu ermitteln. Exemplarisch ist eine solche Schmelzkurve am Beispiel des C8-(N-Acetyl)-4-methylphenyl-modifizierten Oligonucleotides **167** in Abbildung 92 (S. 97) dargestellt.

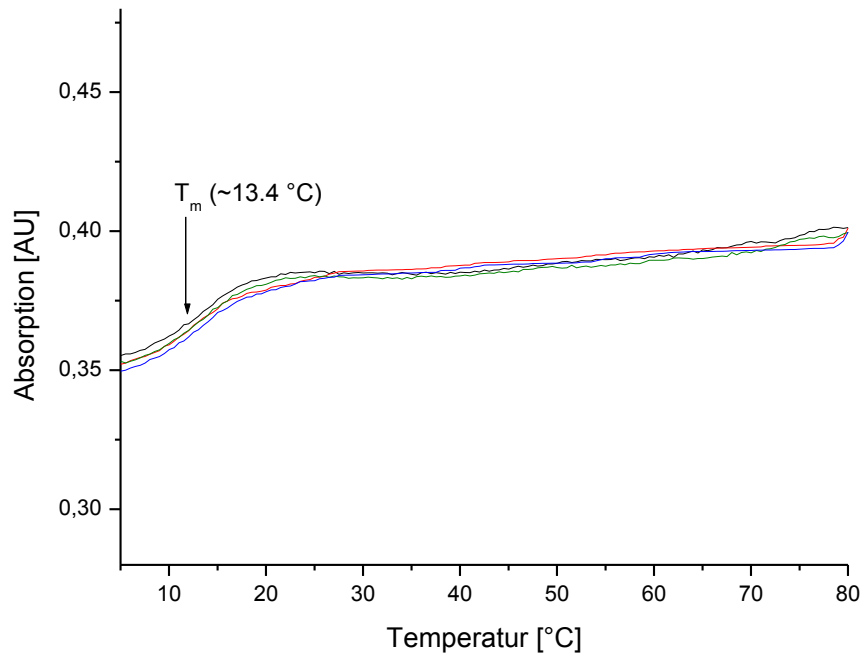


Abb. 92: Schmelzkurven des C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-modifizierten *EcoRI*-Oligonucleotids **167** (5' - d(GTA **GAA** TTC TAC) - 3')

Die Abbildung weist einen ungefähren T_m -Wert von 13.4 °C auf. Dieser Wert ist aufgrund der niedrigen Temperatur nicht zu berechnen. Aufgrund der manuellen Bestimmung der in Tabelle 19 (S. 95) aufgelisteten Werte liegt der Fehlerbereich hier bei ± 2 °C. Trotz des größeren Fehlers ist ein deutlicher Unterschied zu den Werten der in Tabelle 19 (S. 95) aufgelisteten C8-NH-Oligonucleotide zu erkennen. Die T_m -Werte der acetylierten Oligonucleotide sind um 29-34 °C geringer als der des Referenzstranges **180** und um 10-17.5 °C geringer als die entsprechenden C8-NH-Oligonucleotide. Die acetylierten Modifikationen, welche sich innerhalb der Schnittstelle des *EcoRI*-Enzyms befinden, üben somit eine deutliche destabilisierende Wirkung auf den Duplex-Strang aus, so dass dieser schon bei geringen Temperaturen denaturiert. In diesem Fall lässt sich kein Unterschied zwischen mono- und polycyclischen Modifikationen erkennen. In Abbildung 93 (S. 98) ist die Schmelzkurve des in Position 1 modifizierten C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierten Oligonucleotids **189** dargestellt. Anhand dieses Graphen zeigt sich der Unterschied eines durch computerunterstützte Rechnungen ermittelten T_m -Wertes im Gegensatz zu der zuvor abgebildeten unvollständigen Kurve, bei der der T_m -Wert manuell ermittelt wurde.

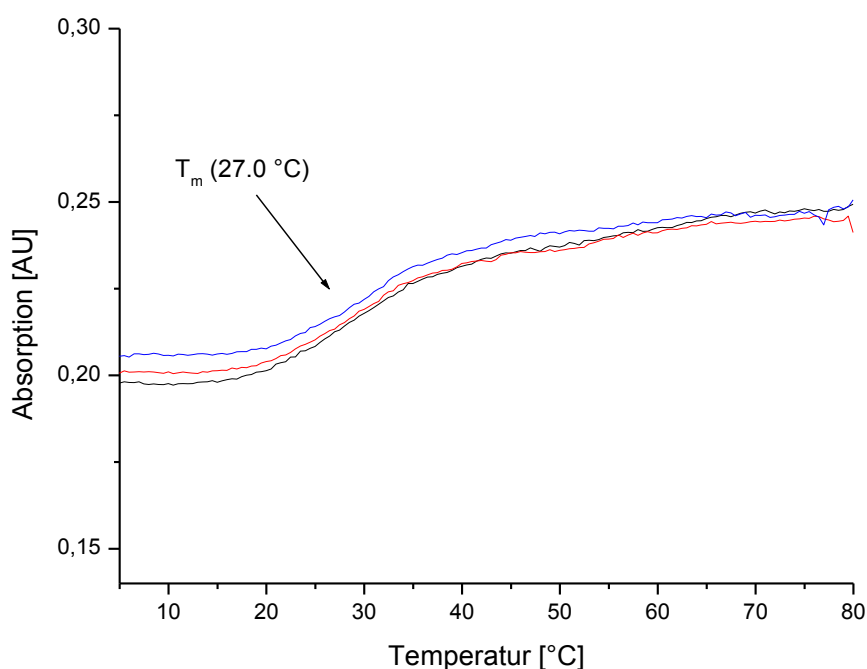


Abb. 93: Schmelzkurven des C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierten *EcoRI*-Oligonucleotids **189** (5'- d(GTA GAA TTC TAC) - 3')

Abbildung 93 zeigt die vollständigen Schmelzkurven, angefangen mit einer Geraden, welche den vollständig Duplex widerspiegelt, dem Anstieg ab etwa 20 °C, die beginnende Denaturierung des Duplex, und abschließend bei etwa 35 °C, das Abflachen der Kurve, was die vollständige Bildung der Einzelstränge darstellt. Für diese Schmelzkurve wurde ein T_m -Wert von 27 °C berechnet.

Befindet sich die Modifikation außerhalb der Erkennungssequenz, scheint der Einfluss der Modifikation somit geringer als innerhalb der Schnittstelle. Die Zusammenfassung der berechneten T_m -Werte ist in Tabelle 20 aufgelistet.

EcoRI Sequenz (5' - d(GTA GAA TTC TAC) - 3')

Tab. 20: T_m -Werte und thermodynamische Daten der in Position 1 modifizierten und unmodifizierten *EcoRI*-Oligonucleotide **180** und **189-194**

Modifikation	T_m [°C]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol/K]
unmodifiziert 180	42.1 ^[55]	-74.4 ^[55]	-269.5 ^[55]
C8-(<i>N</i> -Ac)-phenyl 190	23.8	-71.5	-214.7
C8-NH-Phenyl 191	34.5	-53.6	-202.6
C8-(<i>N</i> -Ac)-2-fluorenyl 189	27.0	-66.2	-194.2
C8-NH-2-Fluorenyl 192	32.5	-104.1	-314.3
C8-(<i>N</i> -Ac)-4-biphenyl 193	26.2	-91.3	-278.6
C8-NH-4-Biphenyl 194	30.9 ^[55]	-88.1 ^[55]	-263.1 ^[55]

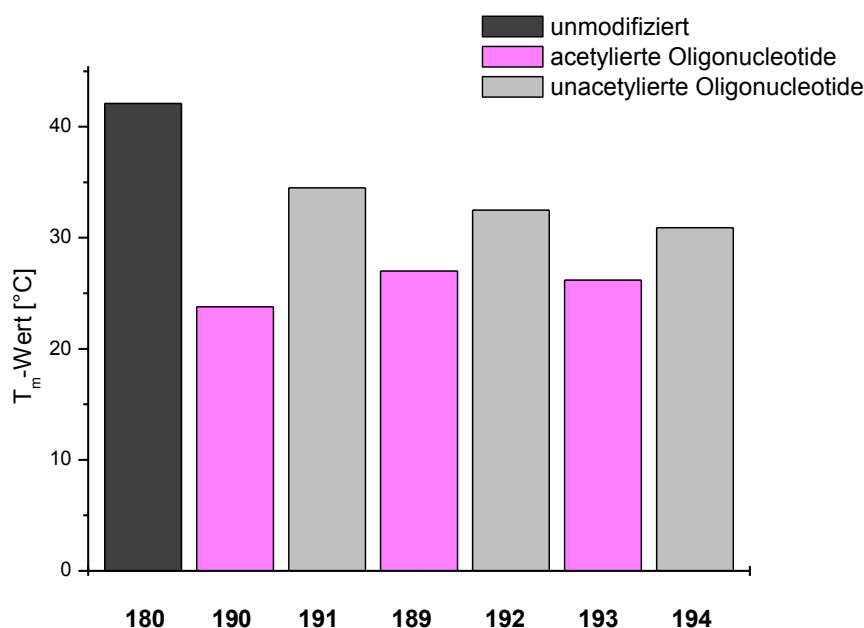


Abb. 94: T_m-Werte in Form eines Balkendiagrammes der in Position 1 modifizierten und unmodifizierten *EcoRI*-Oligonucleotide **180** und **189-194**

Auch bei diesen Messungen ist eine Reduktion der T_m-Werte zu erkennen. Diese ist jedoch im Vergleich zu den Modifikationen in Position 4 deutlich geringer. Bei den C8-NH-Oligonucleotiden **191** (An), **192** (Af), **194** (ABP) liegen die Werte zwischen 7.6 und 11.2 °C unter dem Referenzstrang **180**. Ein Unterschied in Bezug auf die thermische Stabilität ist hier für die polycyclischen Modifikationen zu erkennen. So konnte eine deutliche Destabilisierung des Stranges durch die C8-NH-2-Fluorenyl-Modifikation **192** auf einen T_m-Wert von 32.5 °C ermittelt werden und ein noch größerer Effekt durch die C8-NH-4-Biphenyl-Modifikation **194** auf einen T_m-Wert von 30.9 °C. Diese Beobachtung des Unterschiedes zwischen mono- und polycyclischen Modifikationen konnte zuvor bei keiner Sequenz beobachtet werden und ist auch auf die acetylierten Oligonucleotide nicht übertragbar. So liegen diese wiederum deutlich (15.1-18.3 °C) unter denen der C8-NH-Oligonucleotide **191** (An), **192** (Af), **194** (ABP). Jedoch bewirkt das monocyclische C8-(N-Acetyl)-phenyl-Oligonucleotid **190** die größte Destabilisierung und nicht eines der polycyclischen Modifikationen. Somit ist der Einfluss der acetylierten Oligonucleotide auf monocyclische bzw. polycyclische Arylamine entgegengesetzt zu den Ergebnissen der NH-Oligonucleotide.

Um diese Ergebnisse und den Einfluss der Modifikationen auf längere Oligonucleotidsequenzen untersuchen zu können, wurden diese zusätzlich in ein

nicht selbstkomplementäres 20mer-Oligonucleotid eingebaut. Die Ergebnisse der T_m -Wert-Messungen sind in Tabelle 21 aufgeführt.

20mer-Sequenz (5' -d(ACA TGA GCA TCT ACG ACG CG) - 3')

Tab. 21: T_m -Werte und thermodynamische Daten der in Position 5 modifizierten und unmodifizierten 20mer-Oligonucleotide **163,164,169,170,195-203**

Modifikation	T_m [°C]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol/K]
unmodifiziert 195	68.5	-152.8	-418.2
C8-(N-Ac)-phenyl 169	56.3	-58.1	-147.9
C8-NH-Phenyl 170	63.1	-89.2	-236.7
C8-(N-Ac)-4-methylphenyl 196	55.4	-39.4	-91.5
C8-NH-4-Methylphenyl 197	61.0	-40.4	-91.4
C8-(N-Ac)-4-methoxyphenyl 198	66.6	-139.0	-379.1
C8-NH-4-Methoxyphenyl 199	61.1	-148.9	-416.4
C8-(N-Ac)-3,5-dimethylphenyl 200	64.7	-194.0	-545.0
C8-NH-3,5-Dimethylphenyl 201	62.3	-76.1	-198.4
C8-(N-Ac)-2-fluorenyl 202	62.7	-102.0	-274.8
C8-NH-2-Fluorenyl 203	63.4	-127.5	-350.0
C8-(N-Ac)-4-biphenyl 163	63.5	-141.7	-391.7
C8-NH-4-Biphenyl 164	64.0	-122.2	-333.9

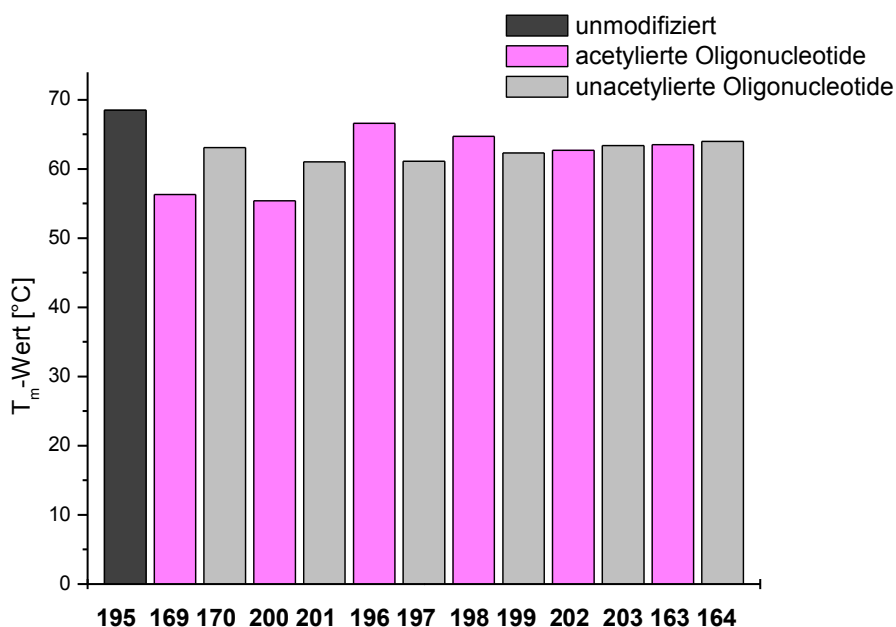


Abb. 95: T_m -Werte in Form eines Balkendiagrammes der in Position 5 modifizierten und unmodifizierten 20mer-Oligonucleotide **163,164,169,170,195-203**

Der T_m -Wert des unmodifizierten Stranges **195** liegt bei 68.5 °C. Wiederum liegen auch hier nahezu alle Werte der modifizierten Oligonucleotide um etwa 2-6 °C unter dem des Stranges **195**. Der Einfluss der Modifikation auf längere Sequenzen ist also erwartungsgemäß geringer. Auffällig hierbei sind das C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-Oligonucleotid **169** und das C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-modifizierte **196**. Ihre T_m -Werte von 56.3 °C und 55.4 °C liegen jeweils 6-7 °C unter den entsprechenden C8-NH-Oligonucleotiden **170** (An) und **197** (Tol) und 12-13 °C unter dem des unmodifizierten Stranges **195**. Diese deutliche Destabilisierung ist zwar nicht auf das andere monocyclische Oligonucleotid **198** (Anis) übertragbar, dennoch kann insgesamt ein größerer Einfluss der monocyclischen C8-(*N*-Acetyl)-Oligonucleotide **169** (AcAn), **196** (AcTol), **198** (AcAnis), **200** (AcDMA) auch in Bezug zu den anderen Oligonucleotidsequenzen nachgewiesen werden.

Die durchgeführten Messungen geben erste Hinweise darauf, dass der Einfluss auf die thermische Stabilität bei den C8-NH-Oligonucleotiden durch polycyclische Arylamin-Modifikationen höher ist als durch monocyclische Modifikationen. Dagegen ist bei den C8-(*N*-Acetyl)-Oligomeren insgesamt ein viel größerer Einfluss auf die thermische Stabilität des DNA-Duplex im Vergleich zu den C8-NH-Oligonucleotiden zu beobachten und zusätzlich noch eine höhere destabilisierende Wirkung durch monocyclische Arylamin-Modifikationen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der NH-Oligonucleotide haben die monocyclischen, acetylierten Oligonucleotide einen größeren destabilisierenden Einfluss auf den Duplex-Strang als die polycyclischen.

Um Aussagen über den Einfluss der Modifikation auf die Konformation des DNA-Duplexes machen zu können, wurden Untersuchungen mittels circularem Dichroismus durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden gezeigt.

4.6 Messung des circularen Dichroismus (CD)

Circularer Dichroismus basiert auf der unterschiedlichen Absorption von links und rechts circular-polarisiertem Licht durch eine optisch aktive Substanz. Hierbei wird nicht nur die spezifische Drehung gemessen, sondern auch die Intensitätsunterschiede des Lichtes. Zu diesem Effekt kommt es durch Wechselwirkung der helikalen Struktur des circular-polarisierten Lichtes mit den Gruppen um ein asymmetrisches Kohlenstoffatom. Ein Maximum im CD-Spektrum ist für das eine Enantiomer positiv, für das andere negativ. Anhand der CD-Spektroskopie ist somit die Bestimmung der absoluten Konfiguration möglich. In Oligonucleotiden sind die Nucleobasen als Chromophore konformativ fixiert, während in Einzelsträngen eine statistische Verteilung der Basenorientierung vorliegt. Dadurch entsteht eine chirale Doppelhelix.^[113]

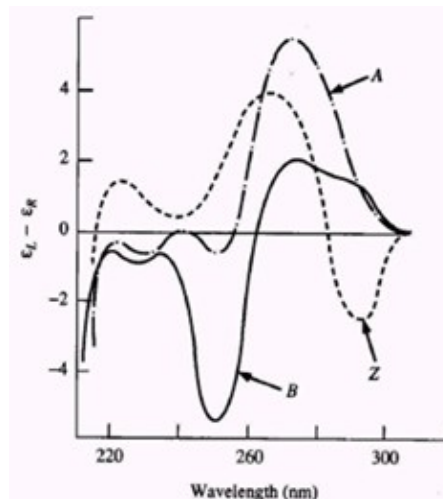


Abb. 96: CD-Spektren der verschiedenen DNA-Konformationen^[113]

Anhand der charakteristischen Lage der Maxima und Minima erfolgt die Bestimmung der bevorzugten DNA-Konformationen (Abb. 96). Dabei handelt es sich bei der B-DNA um die natürlich vorkommende DNA-Konformation, während die A-DNA-Konformation nur in stark salzhaltigen Lösungen und Sequenzen mit alternierenden Pyrimidin- und Purinbasen vorliegt.

Die durchgeführten CD-Messungen wurden in einem 10 mM Phosphat-Puffer mit 140 mM Natriumchlorid und 1 mM EDTA mit einem pH-Wert von 6.8 vermessen. Die Absorption wurde dabei in einem Bereich von 230 - 320 nm bei einer Temperatur von 10 °C gemessen. Mit Hilfe dieser Spektren kann analysiert werden, welche Konformation der DNA bei den modifizierten Oligonucleotiden im Vergleich zu dem unmodifizierten Duplex vorliegt.

Die gemessenen CD-Spektren der Oligonucleotide der in Position 4 modifizierten *NarI*-Sequenz sind in Abbildung 97 dargestellt. Exemplarisch sind hier nur je ein monocyclisches **172** und ein polycyclisches C8-(*N*-Acetyl)-Oligonucleotid **175** sowie die entsprechenden C8-NH-Oligonucleotide **173** und **175** im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **171** abgebildet.

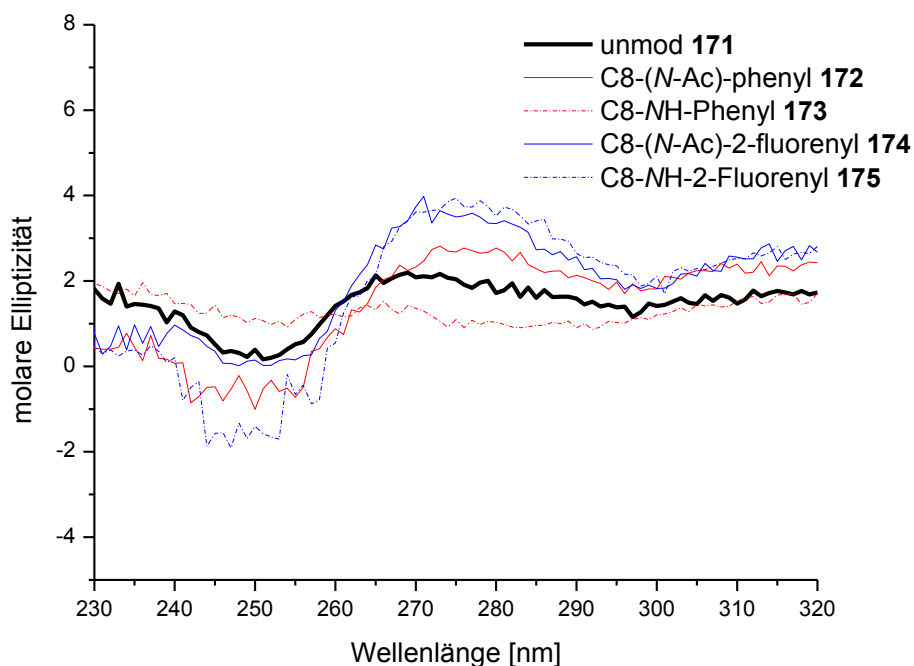


Abb. 97: CD-Spektren der unmodifizierten **171** und modifizierten *NarI*-Sequenzen **172-175**

Die CD-Spektren der unmodifizierten und modifizierten *NarI*-Oligonucleotide zeigen im Duplex die gleiche charakteristische Konformation. Anhand der Lage der Minima (250 nm) und Maxima (270 nm) kann diesen eindeutig die Konformation der B-DNA zugeordnet werden. Somit wird durch die Modifikation keine Konformationsänderung hervorgerufen. Dagegen lässt sich bei allen modifizierten Oligonucleotid-Kurven eine Verschiebung der lokalen Maxima und Minima erkennen. Diese Verschiebung zu höherer Wellenlänge (bathochromer Effekt) lässt sich durch die Vergrößerung des π -Elektronensystems und der damit verbundenen stärkeren Delokalisierung erklären. Eine Konformationsänderung aufgrund der vorhandenen Acetylgruppe lässt sich nicht erkennen. Ein Unterschied konnte dagegen in den Intensitäten der molaren Elliptizitäten der Banden beobachtet werden. Diese Intensität ist ein Maß für die Ordnung des Duplex-Systems. Je ungeordneter der DNA-Duplex, z.B. durch Modifikationen, desto flacher verläuft die Kurve. Für den unmodifizierten Duplex wurde die höchste Intensität erwartet. Dies ist anhand der in Abbildung 97 gezeigten

Spektren jedoch nicht zu erkennen. Einzig das C8-NH-Phenyl-Oligonucleotid **173** weist eine flachere Kurve und somit eine Störung des Systems auf. Die C8-(N-Acetyl)-Oligonucleotide **172** und **174** sowie das C8-NH-Oligonucleotid **175** besitzen dagegen sogar größere Intensitäten.

Analoge Beobachtungen konnten auch bei den CD-Spektren für die in Position 7 modifizierten Oligonucleotide der *NarI*-Sequenz gemacht werden (Abb. 98).

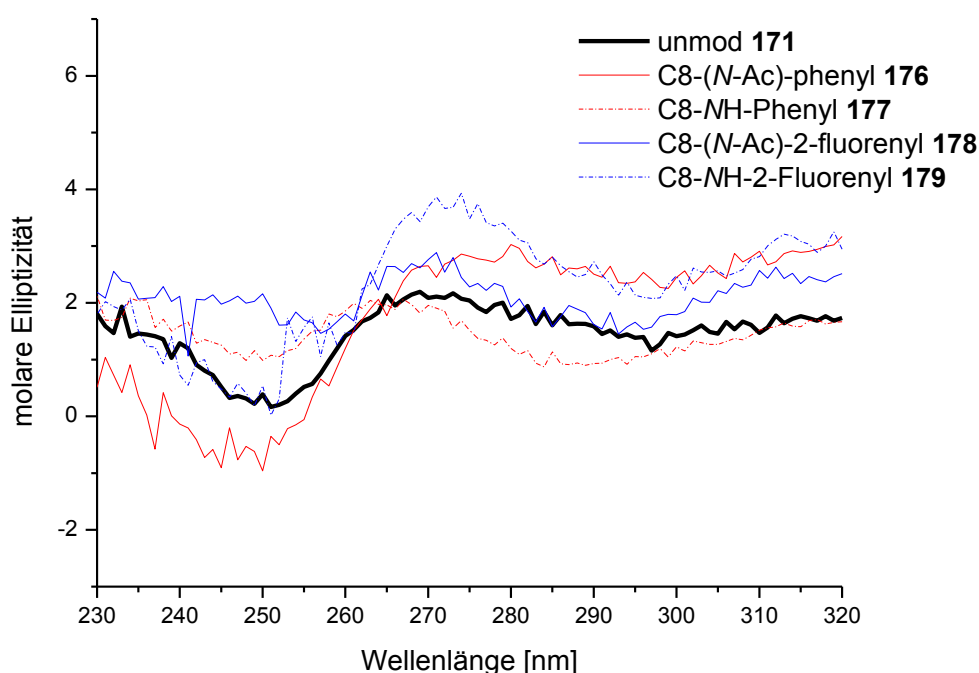


Abb. 98: CD-Spektren der unmodifizierten **171** und modifizierten *NarI*-Sequenzen **176-179**

Aufgrund der Lage der Minima und Maxima der in Abbildung 98 gezeigten CD-Spektren kann eindeutig die B-DNA-Konformation zugeordnet werden. Wie schon zuvor beobachtet, bewirken die Modifikationen auch hier eine bathochrome Verschiebung. Ebenso weist das C8-NH-Phenyl-modifizierte Oligonucleotid **178** wie schon bei dem in Position 4 modifizierten Strang eine flachere Kurve auf. Eine Konformationsänderung aufgrund der vorhandenen Acetylgruppe lässt sich auch in diesem Fall nicht erkennen.

Ebenso wurden die CD-Spektren der in Position 1 modifizierten und unmodifizierten *EcoRI*-Oligonucleotide gemessen. Für eine übersichtliche Darstellung wurden auch in diesem Fall jeweils ein mono- und ein polycyclisches C8-(N-Acetyl)-Oligonucleotid **190** und **189** sowie die entsprechenden C8-NH-Oligonucleotide **191** und **192** im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **180** abgebildet (Abb. 99, S. 105).

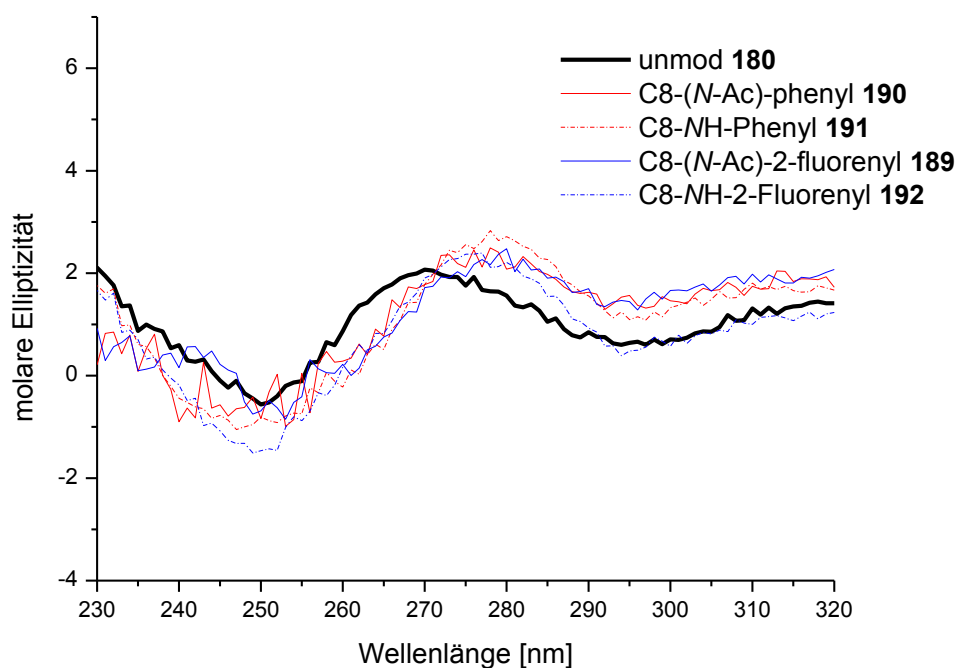


Abb. 99: CD-Spektren der unmodifizierten **180** und modifizierten *EcoRI*-Sequenzen **189-192**

Zunächst wurde die Modifikation außerhalb der Erkennungssequenz vermessen. Deutlich sind auch hier wiederum die vorhandene B-DNA-Konformation sowie der bathochrome Effekt der modifizierten Oligonucleotide. Wiederum lässt sich keine Auswirkung der Acetylgruppe auf die vorhandene Konformation erkennen. Auch die Intensitäten der vermessenen unmodifizierten sowie modifizierten Oligonucleotide sind nahezu gleich, so dass keine Veränderung der Ordnung des Systems beobachtet werden konnte.

Ebenso konnte keine konformative Änderung festgestellt werden, wenn sich die Modifikation außerhalb der Erkennungssequenz befindet. Abbildung 100 (S. 106) zeigt die CD-Spektren der unmodifizierten **180** und in Position 4 modifizierten *EcoRI*-Oligonucleotide.

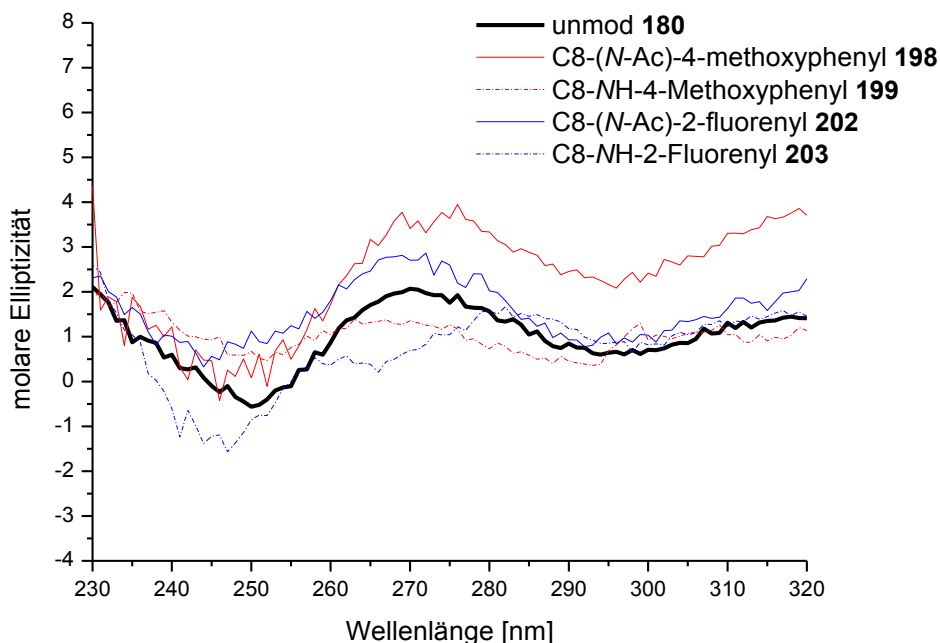


Abb. 100: CD-Spektren der unmodifizierten **180** und modifizierten *EcoRI*-Sequenzen **198, 199, 202, 203**

Auch bei den modifizierten *EcoRI*-Oligonucleotiden **198, 199, 202, 203** sind geringe Unterschiede in den Intensitäten zu erkennen, aber keine deutlichen Veränderungen in der Lage der Minima und Maxima. Aufgrund der zuvor ermittelten sehr geringen T_m -Werte für die acetylierten Oligonucleotide **198** und **202**, der innerhalb der Erkennungssequenz modifizierten *EcoRI*-Oligonucleotide, ist fraglich, ob die dargestellten CD-Kurven genaue Aussagen über die Konformation bzw. Intensitätsunterschiede der molaren Elliptizität geben.

Um einen möglichen Unterschied in der Position der Modifikation zu ermitteln, wurden in Abbildung 101 (S. 107) am Beispiel des in Position 1 und 4 C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierten *EcoRI*-Oligonucleotides **189** und **202** die jeweiligen CD-Spektren mit dem Referenzstrang **180** verglichen.

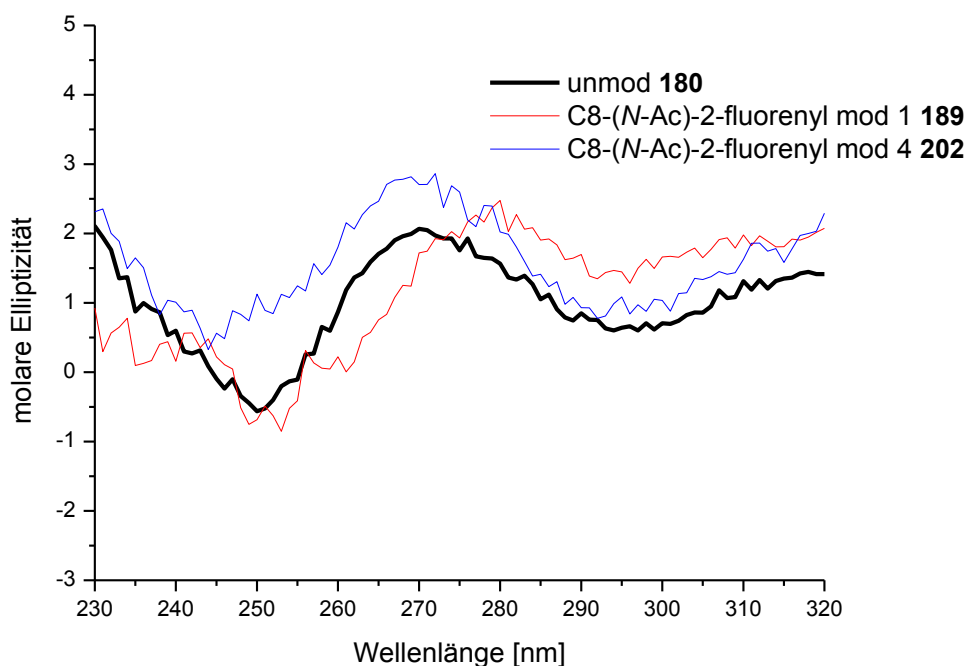


Abb. 101: CD-Spektren der unmodifizierten **180** und modifizierten *EcoRI*-Oligonucleotide **189** und **202**

Anhand dieser CD-Spektren kann dem in Position 1 modifizierten Oligonucleotid **189** ein deutlicher bathochromer Effekt aufgrund des vergrößerten π -Elektronensystems und der damit verbundenen stärkeren Delokalisierung zugewiesen werden. Dagegen tritt bei dem in Position 4 modifizierten Oligonucleotid **202** keine Verschiebung auf. Somit scheint die Modifikation innerhalb der Erkennungssequenz keine destabilisierende Wirkung auf den Duplex auszuüben. Dies ist eventuell auf eine bessere Basenstapelung innerhalb der Sequenz zurückzuführen.

Anschließend sollten diese konformativen Unterschiede ebenfalls für das synthetisierte 20mer-Oligonucleotid und die entsprechenden modifizierten Oligonucleotide durchgeführt werden. Für eine vereinfachte Übersicht sind in Abbildung 102 (S. 108) jeweils ein monocyclisches und ein polycyclisches C8-(*N*-Acetyl)- **169** und **202** sowie die entsprechenden *NH*-Oligonucleotide **170** und **203** dargestellt.

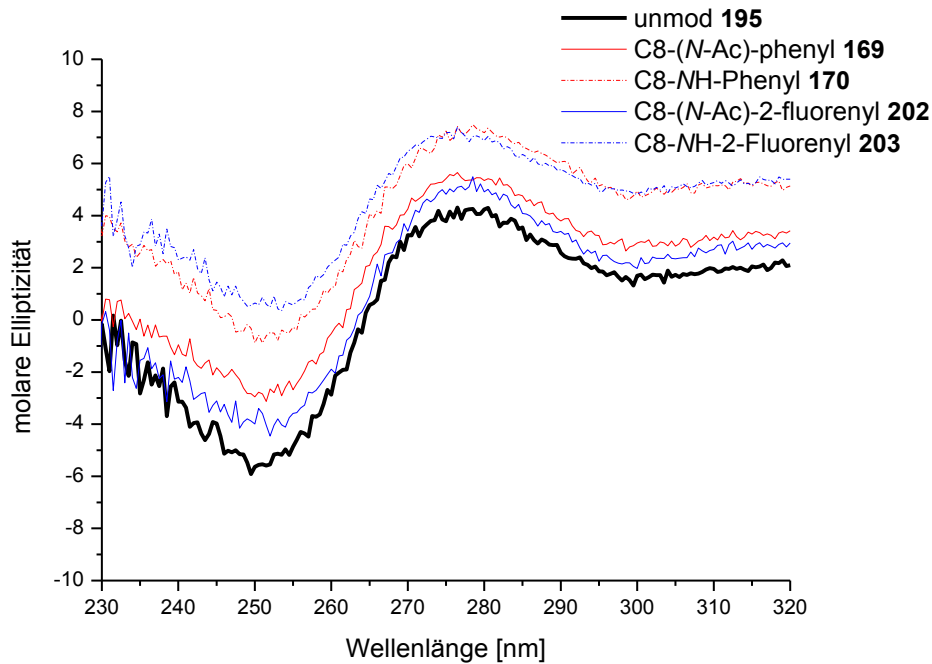


Abb. 102: CD-Spektren der unmodifizierten **195** und modifizierten 20mer-Sequenzen **169,170,202,203**

Diese CD-Spektren des Referenzstranges **195** und der modifizierten Oligonucleotide **169** (AcAn), **170** (An), **202** (AcAf), **203** (Af) zeigen ebenfalls das Vorliegen einer B-DNA-Konformation. Anhand der in Abbildung 102 dargestellten Graphen ist kein Unterschied in der Lage der Minima bzw. Maxima des unmodifizierten und der modifizierten Duplices zu erkennen.

Zusammenfassend kann aus den aufgenommenen CD-Spektren geschlossen werden, dass die hier angewandte CD-Spektroskopie keinen Hinweis auf eine strukturelle Veränderung der DNA durch Modifikation in C8-Position eines 2'-Desoxyguanosins liefert. Weiter kann kein konformativer Unterschied der *N*-acetylierten und unacetylierten C8-Modifikationen erkannt werden. Die Unterschiede in der Carcinogenität sind demnach auf lokale strukturelle Veränderungen oder auf die unterschiedliche Interaktion mit Enzymen zurückzuführen.

Um diese Vermutung zu stützen, sollten erste Informationen über die Interaktion mit Enzymen, am Beispiel des Restriktionsenzym *EcoRI* sowie verschiedener Polymerasen, anhand von Primer-Verlängerungs-Untersuchungen erhalten werden.

4.7 Enzymabbau mittels des Restriktionsenzym *EcoRI*

Um den Einfluss der Modifikation auf die Restriktion durch das *EcoRI*-Enzym (Restriktionsenzym) untersuchen zu können, wurde die von Seela *et al.* beschriebene Sequenz **180** verwendet.^[114] Bei der *EcoRI*-Sequenz handelt es sich um eine selbstkomplementäre (palindrome) Sequenz, welche die Erkennungssequenz (5'-d(GAA TTC)-3') für das *EcoRI*-Enzym beinhaltet. Mittels dieser Restriktion kann der Strang in die entsprechenden Tetra- (5'-d(GTA G)-3') bzw. Octamere (5'-d(AA TTC TAC)-3') abgebaut werden (Abb. 103).



Abb. 103: Restriktionsabbau des Oligonucleotids **180** mittels *EcoRI*

Um nun die Auswirkungen der verschiedenen Modifikationen untersuchen zu können, wurden diese an unterschiedlichen Positionen eingebaut. Zuerst direkt an der Schnittstelle (Position 4 von 5') und anschließend außerhalb der Schnittstelle (Position 1 von 5').

Die optimalen experimentellen Bedingungen für diesen Abbau wurden bereits von Böge erarbeitet.^[55] Diese entsprachen einer Temperatur von 23 °C und einem für die Restriktion geeigneten Puffersystem (DTT-Puffer). Für den Abbau wurden jeweils 0.4 OD des Oligonucleotids in 100 µL DTT-Puffer (pH 7.5) gelöst und für fünf Minuten auf 70 °C erhitzt. Diese Oligonucleotidlösung wurde innerhalb einer Stunde auf Raumtemperatur gekühlt und danach mit 270 Units *EcoRI*-Enzym bei 23 °C inkubiert. Sofort erfolgte die erste Probenentnahme als Nullwert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten, abhängig von der Halbwertszeit des Abbaus, erfolgten weitere Probenentnahmen und ihre chromatographische Analyse mittels HPLC. Abbildung 104 (S. 110) zeigt den Abbau des unmodifizierten Oligonucleotids **180**.

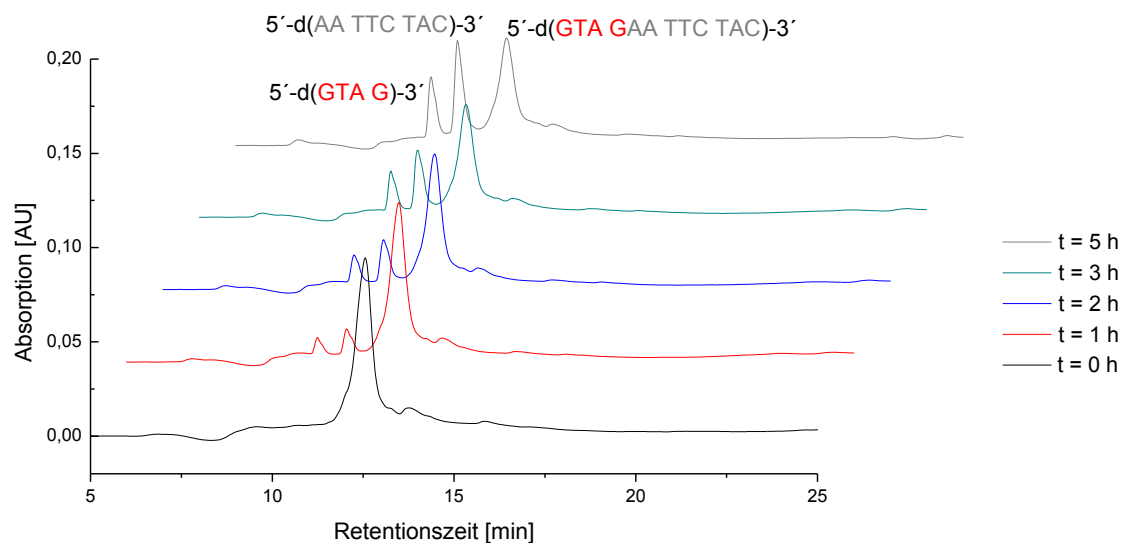


Abb. 104: Restriktionsabbau des unmodifizierten Oligonucleotids **180**

Die Abnahme des Signals des 12mer-Oligonucleotids und die Zunahme der neu gebildeten Signale des Tetramers und Octamers sind in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit dem Enzym deutlich zu erkennen. Mit der auf diesem Weg erhaltenen HPLC-Chromatogramme ist es möglich, die Halbwertszeiten für den Restriktionsabbau des Oligonucleotids **180** zu berechnen. Anhand der im Folgenden gezeigten Formel kann die Menge an abgebauten Oligonucleotid berechnet und anschließend die Halbwertszeit graphisch ermittelt werden (Abb. 105, S. 111).

$$\mu\text{M gespaltenes Oligonucleotid} = \frac{[\text{Fläche (GTAG)}][\epsilon_{260}(\text{GTAGAATTCTAC})][\mu\text{M}(\text{GTAGAATTCTAC})_{\text{orig.}}]}{[(\text{Gesamtfläche}) * [\epsilon_{260}[(\text{GTAG})]]]}$$

Anhand dieser Formel lässt sich die Variable x berechnen durch:

$$x = \frac{\mu\text{M Ausgangsmenge Oligonucleotid} - \mu\text{M gespaltenes Oligonucleotid}}{\mu\text{M Ausgangsmenge Oligonucleotid}}$$

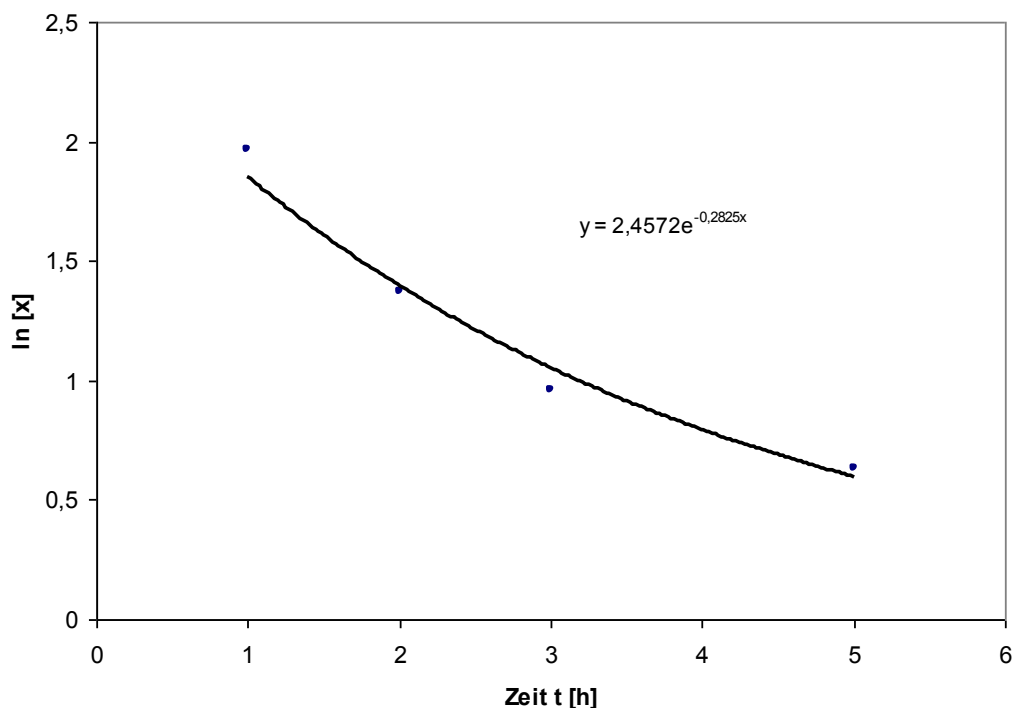


Abb. 105: Graph zur Berechnung der Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ des Oligonucleotids **180**

Nach Auftragen des natürlichen Logarithmus der berechneten Menge gegen die Zeit, konnte unter der Annahme einer Reaktion 1. Ordnung, die Halbwertszeit nach folgender Formel berechnet werden:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

k ergibt sich aus der Gleichung des Graphen (Steigung)

Somit konnte für das unmodifizierte Oligonucleotid **180** eine Halbwertszeit von 2.45 Stunden berechnet werden.

Anschließend sollten die Auswirkungen der Modifikation auf das Restriktionsenzym untersucht werden. Beginnend mit der Modifikation innerhalb der Erkennungssequenz (Position 4). In Abbildung 106 (S. 112) sind die Ergebnisse des Restriktionsverdau des monocyclischen C8-(N-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids **181** abgebildet.

Dieses direkt an der Schnittstelle modifizierte Oligonucleotid **181** wurde im Gegensatz zum unmodifizierten Oligonucleotid **180** nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden nicht vom Enzym gespalten. Analoge Versuche wurden auch mit den Oligonucleotiden **165** (AcAnis), **167** (AcTol), **183** (AcDMA) durchgeführt und es

konnte ebenfalls keine Restriktion des entsprechenden Oligonucleotids festgestellt werden.

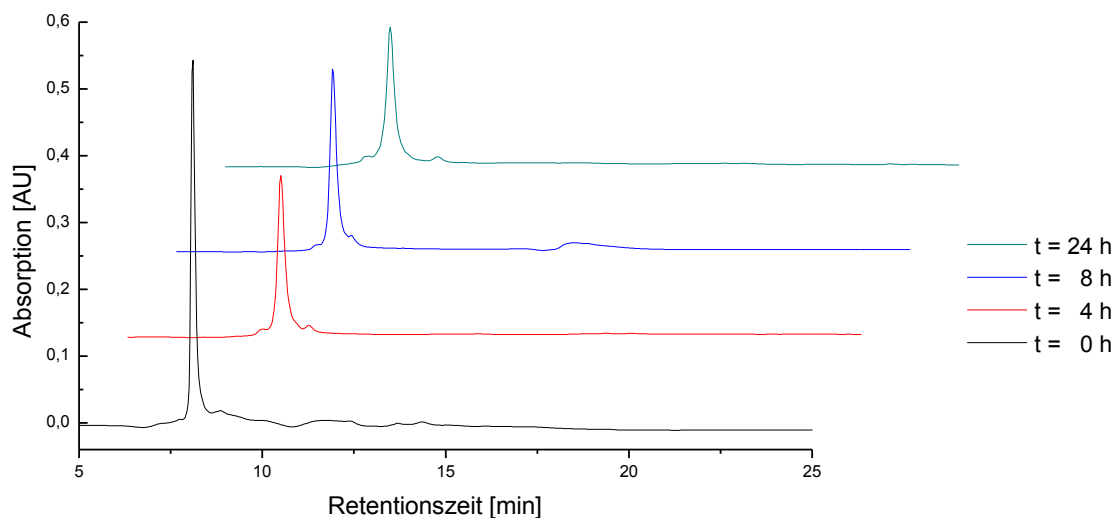


Abb. 106: *EcoRI*-Restriktion des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids **181**
 $5'-(\text{GTA G}^{[\text{Ac-phenyl}]}\text{AA TTC TTC})-3'$

Um allgemeine Aussagen über die Auswirkungen der Modifikationen innerhalb der Schnittstelle treffen zu können, wurden die polycyclisch modifizierten Oligonucleotide **185** (AcAf) und **187** (AcABP) ebenfalls mittels Restriktionsabbau untersucht. Exemplarisch sind in Abbildung 107 die Ergebnisse der Restriktion des polycyclischen C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids **187** dargestellt.

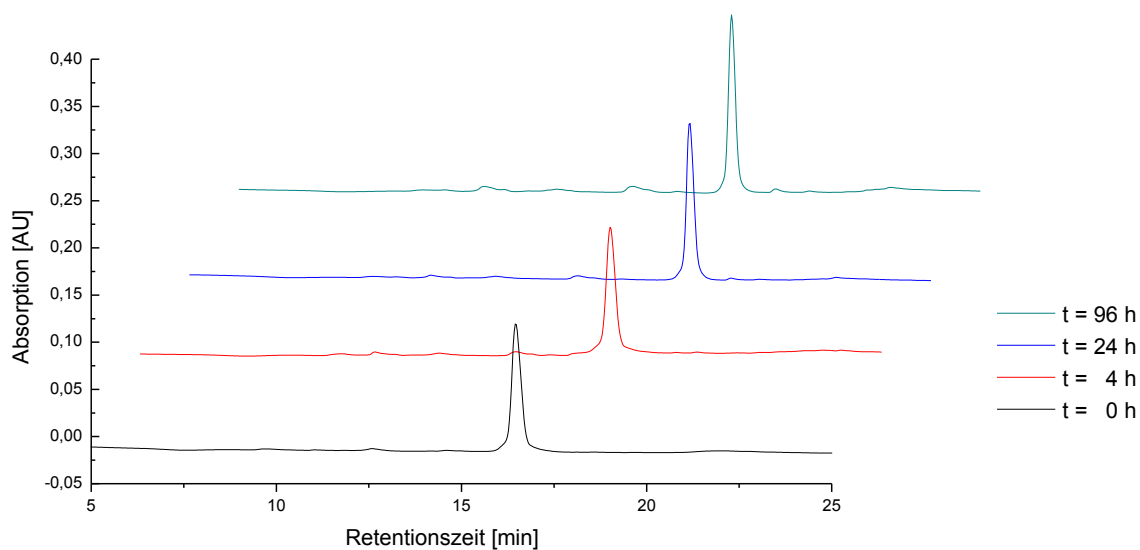


Abb. 107: *EcoRI*-Restriktion des C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids **187**
 $5'-(\text{GTA G}^{[\text{Ac-4-biphenyl}]}\text{AA TTC TTC})-3'$

Am Beispiel des polycyclisch modifizierten Oligonucleotids **187** konnte innerhalb von 96 Stunden kein Abbau beobachtet werden. Durch die Modifikation direkt an der Schnittstelle ist also das Restriktionsenzym nicht mehr in der Lage, an den Oligonucleotid-Doppelstrang zu binden und diesen enzymatisch zu spalten. Diese Ergebnisse sind unabhängig von der jeweiligen Modifikation. Die erhaltenen Ergebnisse sind identisch zu denen, die in Arbeiten von Böge anhand der unacetylierten Oligonucleotide ermittelt wurden.^[55] Somit hat die Acetylgruppe keinen zusätzlichen Einfluss auf das Enzym.

Neben der Modifikation der Guanosinbase an der Schnittstelle des *EcoRI*-Enzyms sollte untersucht werden, ob eine C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-Modifikation außerhalb der Schnittstelle Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat. Als Beispiel einer monocyclischen Modifikation ist in Abbildung 108 der Abbau des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierte Oligonucleotids **190** dargestellt.

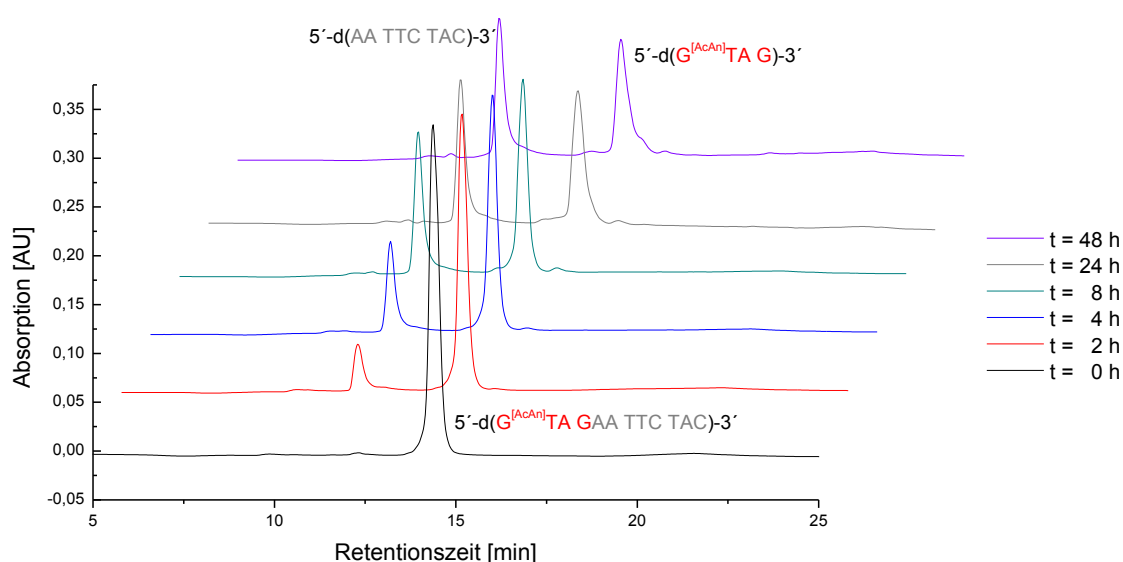


Abb. 108: *EcoRI*-Restriktion des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids **190**
 $5'-(\mathbf{G}^{\text{[Ac-phenyl]}}\text{TA GAA TTC TAC})-3'$

Im abgebildeten Chromatogramm ist der Abbau des Oligonucleotids **190** durch das Restriktionsenzym zu erkennen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden entsteht ein weiteres Signal mit einer Retentionszeit von 12,5 min, welches mittels massenspektrometrischer Analyse dem unmodifizierten Octamer ($5'-(\text{AA TTC TAC})-3'$) zugeordnet wurde. Dagegen konnte dem Signal nach 24 und 48 Stunden, welches die gleiche Retentionszeit von 14,7 min, wie das 12mer-Oligonucleotid aufweist, dem modifizierten Tetramer-Oligonucleotid ($5'-(\mathbf{G}^{\text{AcAn}}\text{TA G})-3'$) zugewiesen werden. Eine Berechnung der Halbwertszeit erfolgte somit nur anhand

der Zunahme des sich neu bildenden 8mer-Signals und beträgt wie das unmodifizierte Oligonucleotid 2.5 Stunden.

Wie zuvor bei den Modifikationen innerhalb der Schnittstelle sollten zusätzlich die Auswirkungen der polycyclisch-modifizierten Oligonucleotide untersucht werden. In Abbildung 109 ist exemplarisch das C8-(N-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierte Oligonucleotid **193** dargestellt.

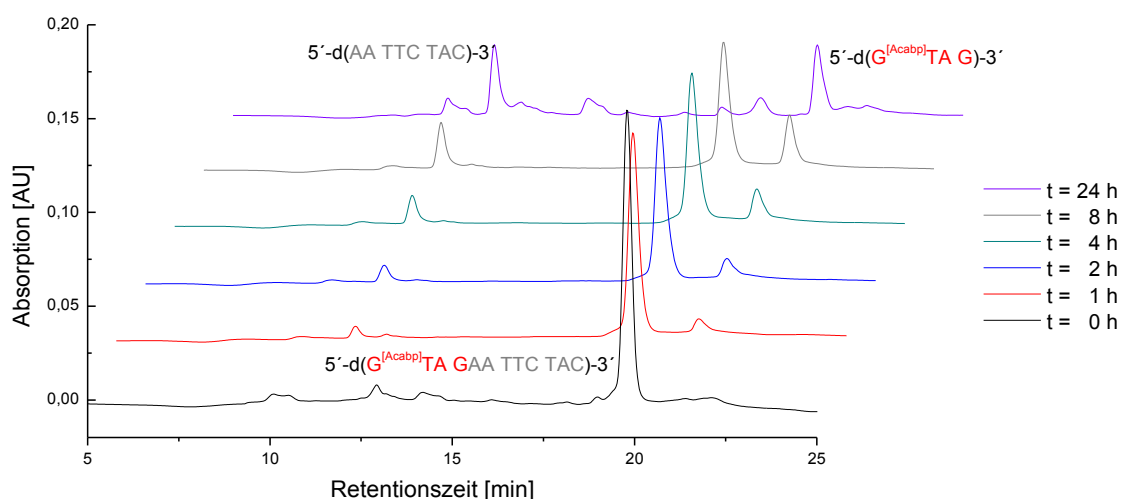


Abb. 109: *EcoRI*-Restriktion des C8-(N-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids **193**
 $5'-(G^{[Ac-4-biphenyl]}TA\ GAA\ TTC\ TTC)-3'$

In dem in Abbildung 109 dargestellten Chromatogramm ist nach bereits einer Stunde die Abnahme des 12mer-Oligonucleotidsignals **193** deutlich zu erkennen. Gleichzeitig ist die Zunahme der entstandenen 4mer- und 8mer-Oligonucleotide zu beobachten. Interessanterweise ist dieser Abbau nicht mit dem des unmodifizierten Oligonucleotids **180** (Abb. 104, S. 110) zu vergleichen. Anhand massenspektrometrischer Analysen konnten die Signale den entsprechenden Abbruchsträngen zugeordnet werden. Das 8mer-Oligonucleotid ($R_t = 9$ min) eluiert wie auch schon in Abbildung 108 (S. 113) vor dem 12mer-Oligonucleotidsignal ($R_t = 20$ min). Das modifizierte Tetramer weist eine höhere Retention von 22 Minuten auf, als das 12mer-Oligonucleotid. Aufgrund der verwendeten RP-HPLC-Trennung und der späten Elution des modifizierten 4mer-Oligonucleotids ist dieses mit der Modifikation und den vier negativen Ladungen unpolarer als die beiden anderen Oligonucleotide. Für das C8-(N-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierte Oligonucleotid **193** wurde eine Halbwertszeit von 5.6 Stunden berechnet.

Die erzielten Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss der Modifikationen auf die Enzymaktivität. Befindet sich die Modifikation innerhalb der Erkennungssequenz für

das Enzym, erfolgte keine enzymatische Spaltung der Oligonucleotide. Dagegen konnte anhand der Modifikationen außerhalb der Schnittstelle ein Abbau beobachtet werden. Der Einfluss der jeweiligen Modifikation auf das Enzym wurde anhand der Halbwertszeiten berechnet, die in nachfolgender Tabelle 22 zusammengefasst sind.

Tab. 22: Zusammenfassung der berechneten Halbwertszeiten der *EcoRI* Restriktion

Oligonucleotid	Modifikation	$\tau_{1/2}$ [h]
180	5'-d(GTA GAA TTC TAC)	2.5
190	5'-d(G ^{(C8-(N-Ac)-phenyl)} TA GAA TTC TAC)	2.5
191	5'-d(G ^(C8-NH-Phenyl) TA GAA TTC TAC)	6.5 ^[55]
189	5'-d(G ^{(C8-(N-Ac)-2-fluorenyl)} TA GAA TTC TAC)	4.4
193	5'-d(G ^{(C8-(N-Ac)-4-biphenyl)} TA GAA TTC TAC)	5.6
194	5'-d(G ^(C8-NH-4-Biphenyl) TA GAA TTC TAC)	3.4 ^[55]

Dabei sind deutliche Unterschiede in den Halbwertszeiten der C8-NH- und der C8-(N-Acetyl)-Oligonucleotide aufgetreten. Die Modifikation des C8-(N-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotides **190** weist die gleiche Halbwertszeit von 2.5 Stunden auf wie das Referenzoligonucleotid **180**. Dagegen zeigt die des entsprechenden NH-Oligonucleotids mehr als eine Verdopplung auf 6.5 Stunden. Genau umgekehrt ist dieses Verhältnis bei den polycyclisch modifizierten Sequenzen. Hier konnte für das acetylierte biphenyl Derivat **193** eine Halbwertszeit von 5.6 Stunden berechnet werden und für das entsprechende NH-Oligonucleotid 3.4 Stunden. Böge wies in seiner Arbeit anhand der gezeigten Halbwertszeiten der NH-Oligonucleotide **191** und **194** auf einen größeren Effekt einer grenzcarcinogen-modifizierten Guanosin-nucleobase, als den einer in C8-Position mit einem starken Carcinogen modifizierten Nucleobase hin. Dieses Postulat kann jedoch nicht auf die N-acetylierten Oligonucleotide übertragen werden. Hier ist der Einfluss von Grenzcarcinogen und starkem Carcinogen entgegengesetzt. Die berechnete Halbwertszeit des monocyclischen C8-(N-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids **190** von 2.5 Stunden ist identisch mit der Halbwertszeit für das unmodifizierte Oligonucleotid **180**. Somit besitzt diese Modifikation keinen Einfluss auf die Endonuclease. Der größte Einfluss konnte bei dem C8-(N-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotid **193** mit einer Halbwertszeit von 6.5 Stunden beobachtet werden. Das C8-(N-Acetyl)-

2-fluorenyl-modifizierte Oligonucleotid **189** nimmt mit einer Halbwertszeit von 4.4 Stunden eine Position zwischen den beiden anderen Oligonucleotide ein.

Dieses unerwartete Ergebnis lässt sich bislang nicht erklären, gibt jedoch einen ersten Hinweis darauf, dass die Acetylgruppe einen entgegengesetzten Einfluss auf die Enzymaktivität der Endonuclease *EcoRI* aufweist als die der NH-Addukte.

Um einen weiteren Einblick und eine mögliche Bestätigung dieses Unterschiedes zwischen *N*-acetylierten und *N*-unacetylierten Oligonucleotiden zu erhalten, sollten erstmals in unserer Arbeitsgruppe Primer-Verlängerungs-Untersuchungen durchgeführt werden. Die Ergebnisse sollen im Folgenden gezeigt werden.

4.8 Primer-Verlängerungs-Studien

Mittels Primer-Verlängerungs-Untersuchungen sollte der Einfluss von C8-NH- und C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-Modifikationen am 2'-Desoxyguanosin in Oligonucleotiden auf die Selektivität verschiedener DNA-Polymerasen untersucht werden.

Die Hauptfunktion der DNA-Polymerasen ist die Replikation der genomischen DNA.^[115] Dafür sind die eukaryotischen DNA-Polymerasen der Familien α , δ , ϵ und γ verantwortlich.^[116] Der Mechanismus der Replikation erfolgt semikonservativ, wobei der ursprüngliche DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge getrennt wird, an denen dann jeweils komplementäre Stränge neu gebildet werden.^[117,118] Bei diesen Prozessen entstehen beim Einbau der dNTPs Fehler, die korrigiert werden müssen.^[119] Für die Behebung solcher Einbaufehler sind z.B. die DNA-Polymerasen β und λ zuständig (Pol β und Pol λ).^[120,121] Weitere DNA-Polymerasen sind für das Korrekturlesen von DNA-Schäden zuständig (z.B. DNA-Polymerasen η , κ , ι und ξ).^[122,123] Alle bisher bekannten DNA-Polymerasen besitzen eine sehr ähnliche Struktur und einen vergleichbaren Reaktionsmechanismus.^[124,125] Bei diesem Prozess bindet zuerst die Polymerase den Primer/Templat-Komplex. Anschließend wird ein dNTP gebunden und dadurch eine Konformationsänderung des Enzyms („induced fit“, Schließen der Fingerdomäne) induziert, die zur Ausbildung einer Bindungstasche dient. Die korrekte Positionierung des eingetretenen dNTPs ist für die folgende Transferreaktion der Phosphorylgruppe notwendig.

Darauf folgt eine erneute Konformationsänderung, die das System wieder in die offene Konformation überführt und das durch die Bildung der Phosphodiesterbindung

entstehende Pyrophosphat wird freigesetzt. An diesem Punkt kann die DNA-Polymerase entweder dissoziieren oder zum nächsten Einbau translokieren.^[126]

Im Gegensatz zum Mechanismus und der Struktur weisen die Polymerasen sehr unterschiedliche Eigenschaften auf.^[116] Diejenigen, die in der Replikation der DNA involviert sind, besitzen eine sehr hohe Genauigkeit und Prozessivität (ca. ein Fehler pro 100000 synthetisierter Phosphorsäurediesterbindungen). Dagegen weisen Polymerasen, die z.B. in der Reparatur von DNA-Schäden oder in der somatische Hypermutation von Genen involviert sind, die für Immunglobuline kodieren, eine viel niedrigere Genauigkeit und Geschwindigkeit auf (ca. ein Fehler pro 10 - 1000 synthetisierter Phosphorsäurediesterbindungen).^[122,126,127]

Damit die Biokatalyse einer Reaktion erfolgen kann, müssen Enzyme das richtige Substrat erkennen und es zum Produkt umsetzen können. Meistens weisen Enzyme eine hochspezifische Substraterkennung auf. DNA-Polymerasen sind besondere Enzyme, da sie zwei Substrate, das Templat und das eintretende dNTP erkennen können. Außerdem müssen sie das richtige dNTP aus einem Pool von vier verschiedenen, aber doch ähnlichen Substraten, selektieren. Diese Auswahl erfolgt nach den bekannten „*Watson und Crick* Regeln“, wobei ein Thymin immer mit einem Adenin und ein Cytosin mit einem Guanin paart. Diese Selektivität ist kritisch für die Erhaltung der intakten genomischen Information. DNA-Polymerasen mit einer hohen Genauigkeit weichen dieser Regel nur einmal pro 100000 synthetisierte Phosphorsäurediesterbindungen ab.^[119,123] Eine so hohe Genauigkeit kann mithilfe der intrinsischen Korrekturlese-Funktion dieser Enzyme (3'-5'-Exonuclease-Aktivität oder „*proofreading*“) erreicht werden, die falsch eingebaute Nucleotide wieder entfernt.^[119] Einige DNA-Polymerasen, die hauptsächlich in der Reparatur der DNA involviert sind, weisen allerdings eine niedrige Genauigkeit auf. Die Gründe dieser Unterschiede sind bisher nicht genau erforscht, auch wenn postuliert wird, dass eine Variationen in der Spannung des aktiven Zentrum dafür verantwortlich sind.^[128,129]

DNA-Polymerasen lassen sich nach Sequenzhomologien und Strukturähnlichkeiten in sieben Familien einteilen, darunter Familie A (*Pol I*), Familie B (*Pol α*, *Pfu*) und Familie X (*Pol β*).

Die DNA-Polymerase I, aus *E. coli* (*Pol I*) besteht aus der DNA-Polymerase-Untereinheit sowie einer 3'-5'- und einer 5'-3'-Exonuclease. *Pol I* synthetisiert sehr genau mit einem Fehler pro $10^5 - 10^6$ Basenpaaren (bp). Wird die 5'-3'-Exonucleasefunktion ausgeschaltet, spricht man vom *Klenow-Fragment* (*KF exo⁺*), wobei dies nicht zum Überleben eines Bakterium ausreicht, da die entfernte Exonucleaseaktivität zum Entfernen der RNA-Primerstränge unbedingt nötig ist. Beim *KF exo⁺* steigt die Fehlerrate auf 18×10^{-6} bp. Ist zusätzlich noch die 3'-5'-Exonucleasefunktion entfernt, spricht man vom *KF exo⁻*, mit einer Fehlerrate von 10^{-4} bp. Die Exonucleasefunktion ist eine Korrekturlesefunktion (*proofreading*), d.h. sie ist in der Lage, den Einbau eines fehlgepaarten Nucleotids zu erkennen und dieses anschließend wieder aus der DNA zu entfernen. Ist die Exonucleasefunktion ausgeschaltet, steigt die Fehlerrate des Enzyms.

Die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) arbeitet ebenfalls mit einer sehr hohen Genauigkeit (Fehlerrate 2.6×10^{-6} bp). Da sie zusätzlich noch thermostabil ist, wird sie häufig für die PCR verwendet.^[130] Die *Pfu* DNA-Polymerase besitzt eine 3'-5'- Exonucleasefunktion, jedoch keine 5'-3'-Exonucleaseaktivität.

Zur Familie X gehören DNA-Polymerasen, die vorwiegend in der DNA-Reparatur involviert sind, wie beispielsweise die *Pol β*. Diese Polymerase kann durch Basen-Excisions-Reparatur entstandene „Löcher“ in der DNA wieder auffüllen. *In vitro* macht *Pol β* jedoch vergleichsweise viele Deletionen und Einbaufehler (ein Fehler pro 10^3 bp).^[131] Es wird weiter angenommen, dass *Pol β* in der Neurogenese eine entscheidende Rolle spielt und auch bei der Meiose beteiligt ist.^[132]

Die thermostabile DNA-Polymerase *FIREPol[®]* aus *E. coli* (Familie A) besitzt eine relativ hohe Fehlerrate von 2.5×10^{-5} bp aufgrund der fehlenden 3'-5'-Exonucleaseaktivität.

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonucleotide **163,164,169,170,195-203** sollten mit DNA-Polymerasen aus drei verschiedenen Familien *Pfu* (Familie B), *FIREPol[®]* (Familie A), *KF exo⁻* (Familie A), *Pol β* (Familie X) untersucht werden. Diese Polymerasen besitzen unterschiedliche Fehlerraten.

Auf diese Weise ist es möglich, die Auswirkungen der Modifikationen innerhalb der 20mer-Oligonucleotide auf die Einbaugenauigkeit der verschiedenen Polymerasen zu untersuchen.

Um den Einbau gegenüber der modifizierten Base untersuchen zu können, wurden so genannte „standing-start“-Reaktionen durchgeführt. Hierbei soll die gewählte DNA-Polymerase direkt an der zu untersuchenden Stelle binden und anschließend mit dem komplementären Nucleotideinbau beginnen. Dafür wurde ein zuvor radioaktiv markierter Primer verwendet, der eine Base vor dem 2'-Desoxyguanosinanalogen endete (Abb. 110).

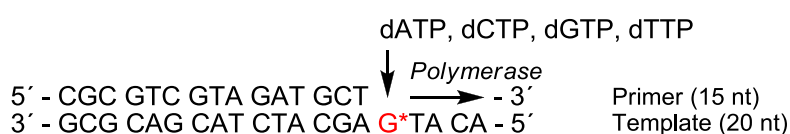


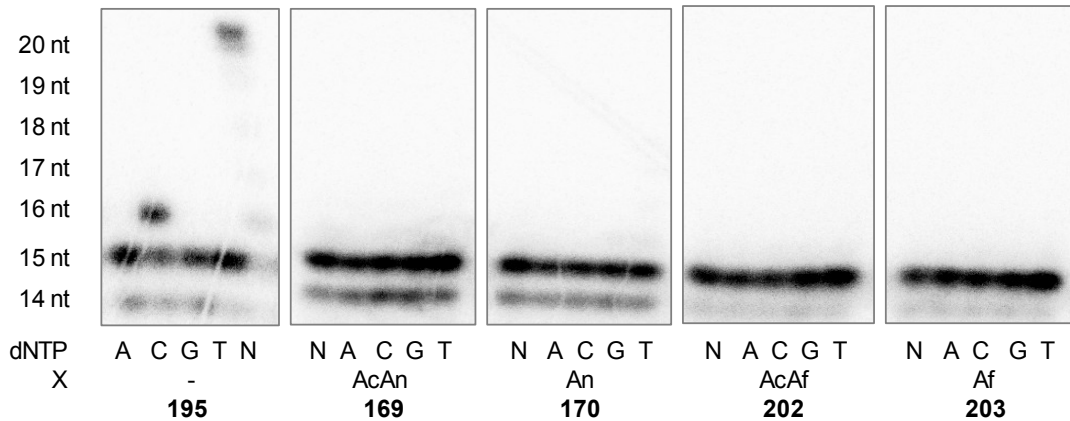
Abb. 110: „standing-start“-Reaktion anhand des radioaktiv markierten Primers durch verschiedene Polymerasen

Im Folgenden sind die Polymerase-Untersuchungen in Abhängigkeit der Einbaugenauigkeit aufgeführt. Beginnend mit der höchsten Genauigkeit (*Pfu*) bis hin zur niedrigsten (*KF exo*⁻).

***Pfu* Polymerase**

Zunächst wurde die *Pfu* DNA-Polymerase aus der Familie B der Polymerasen verwendet. Diese ist eine replikative, thermostabile Polymerase, die mit einer sehr hohen Genauigkeit arbeitet. Die „standing-start“-Reaktionen wurden mit allen modifizierten Addukten **163,164,169,170,195-203** durchgeführt, da die Ergebnisse identisch waren, sind hier exemplarisch nur das C8-(*N*-Acetyl)-phenyl- **169** (AcAn) und das C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierte Oligonucleotid **202** (AcAf) sowie die entsprechenden *NH*-Oligonucleotide **170** (An) und **203** (Af) im Vergleich zum unmodifizierten Referenzstrang **195** abgebildet (Abb. 111, S. 120).





X: Modifikation
dNTP: 2'-Desoxynucleosidtriphosphate
A: dATP **C:** dCTP **G:** dGTP **T:** dTTP **N:** dNTP
nt: Nucleotide; Länge des Primers

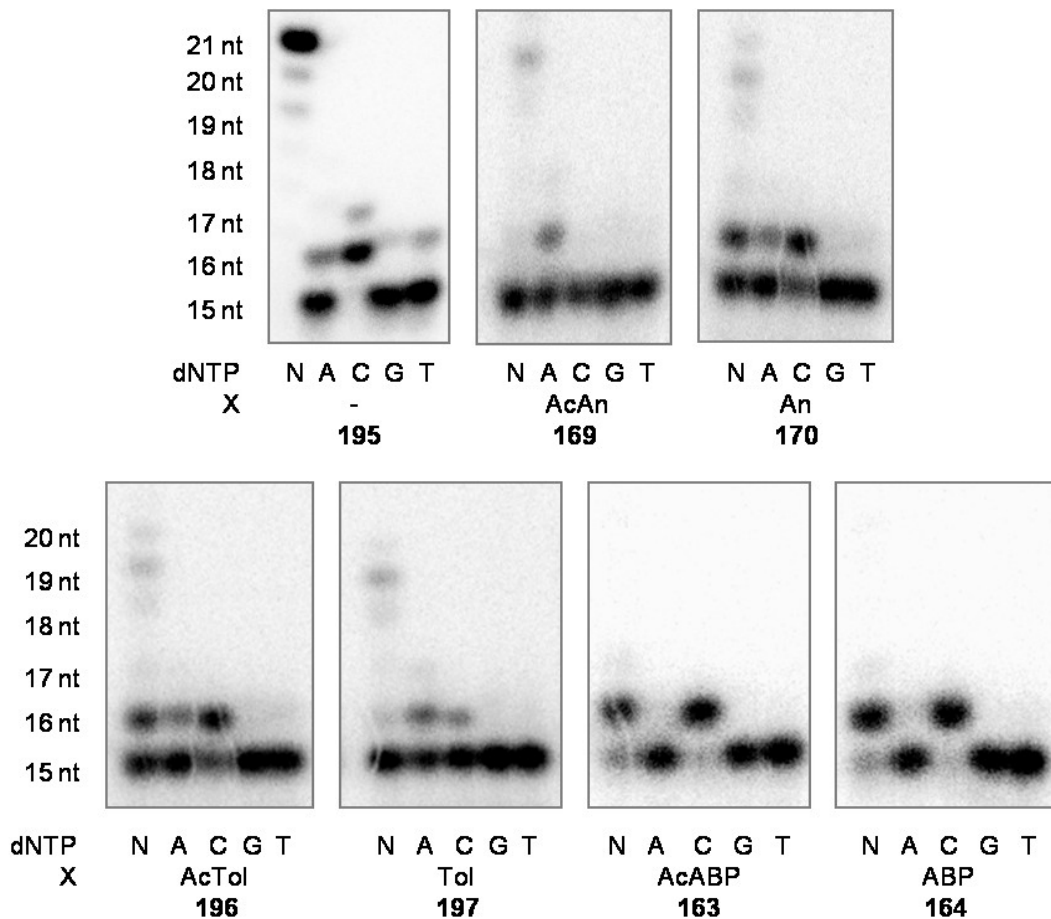
Abb. 111: Autoradiogramm der 12.5%-igen denaturierenden PAA-Gele der Reaktion mit der DNA-Polymerase *Pfu*

Bei der Reaktion des Primers mit dem Referenz-Templat **195** ist wie erwartet der Einbau des dCTP, sowie bei Zugabe der vier dNTP's, die vollständige Verlängerung des Primers zu beobachten. Aufgrund der Reaktionszeit von 15 Minuten ist ein leichter Abbau eines Nucleotides zu erkennen (14 nt). Bei den modifizierten Oligonucleotiden **169** (AcAn), **170** (An), **202** (AcAf) und **203** (Af) erfolgte kein Einbau eines dNTP's, aufgrund der hohen Genauigkeit und der 3'-5'-Exonucleasefunktion der *Pfu* Polymerase.

FIREPol[®]

Desweiteren wurde die Polymerase *FIREPol*[®] (Familie A) aus *E. coli* verwendet. Diese Polymerase weist eine Fehlerrate von 2.5×10^{-5} bp auf.





X: Modifikation
dNTP: 2'-Desoxynucleosidtriphosphate
A: dATP **C:** dCTP **G:** dGTP **T:** dTTP **N:** dNTP
nt: Nucleotide; Länge des Primers

Abb. 112: Autoradiogramm der 12.5%-igen denaturierenden PAA-Gele der Reaktion mit der DNA Polymerase *FIREPoI*[®]

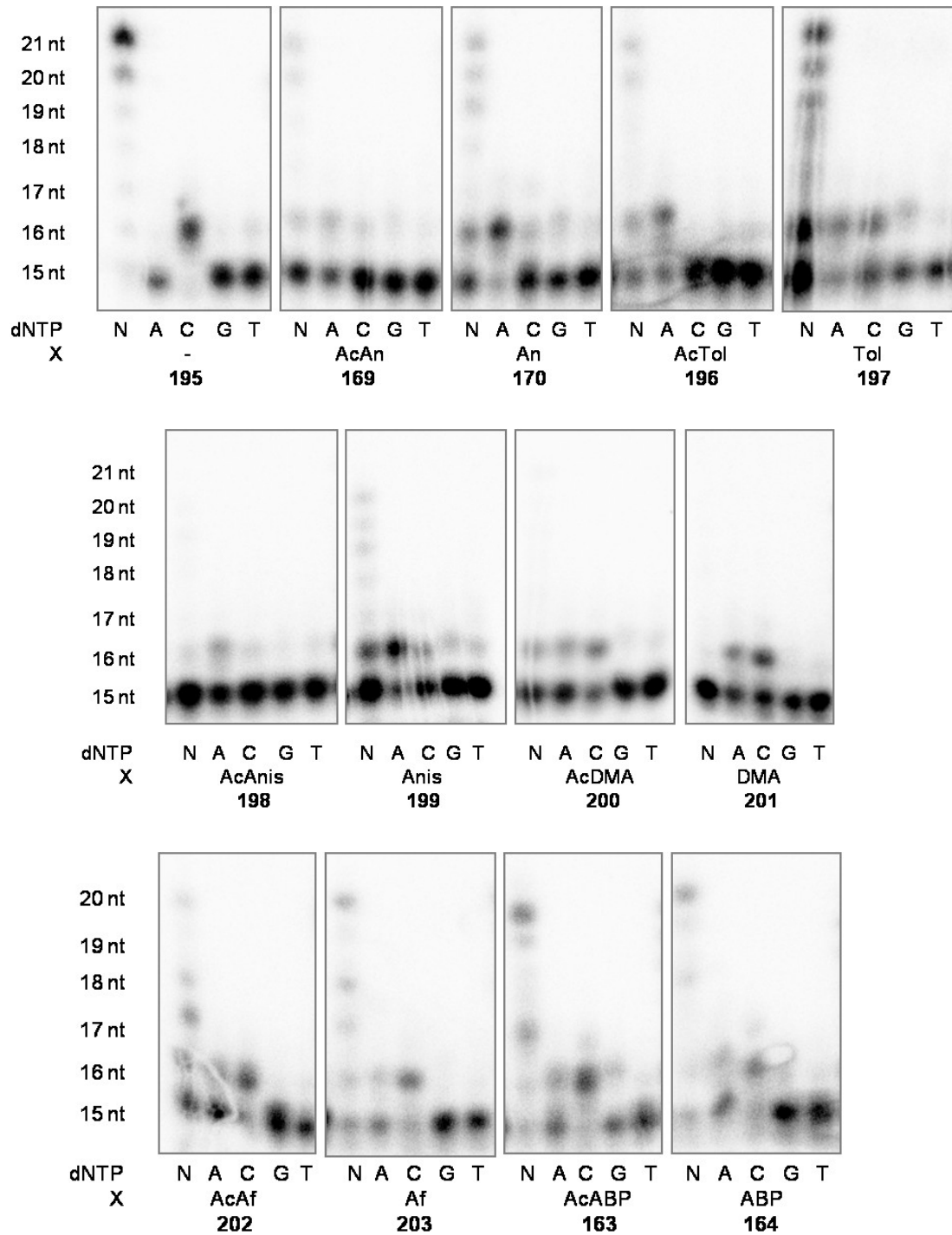
Die Polymerase *FIREPoI*[®] weist bereits beim Referenzstrang **195** eine hohe Fehlerrate auf (Abb. 112). Bei der Zugabe aller vier dNTP's ist eine vollständige Elongation des Stranges zu beobachten. Zusätzlich baut die Polymerase noch ein weiteres Nucleotid über den Templatstrang hinaus ein, so dass wir anstelle der 20 Nucleotide nun 21 beobachten können. Diese Verlängerung eines weiteren dATP's ist eine charakteristische Eigenschaft der *FIREPoI*[®] Polymerase und für die folgenden Untersuchungen nicht relevant. Neben dem kanonischen Einbau des komplementären dCTP's erfolgen an dem Referenzstrang **195** zahlreiche Fehleinbauten. So wird neben dem komplementären dCTP ebenfalls, wenn auch in geringerer Häufigkeit, der Einbau von dATP und dTTP, sowie ein zweites dCTP an der darauffolgenden Base beobachtet. Ebenso wie bei der Referenz **195**, ist der

Fehleinbau von dATP bei den monocyclischen Modifikationen (AcAn **169**, An **170**, AcTol **196**, Tol **197**) zu beobachten. Auffällig ist, dass beim AcAn-modifizierten Oligonucleotid **169** nur das dATP eingebaut wird und der kanonische Einbau des dCTP's überhaupt nicht erfolgt. Zusätzlich kann trotz Fehlpaarung zum Teil die vollständige Elongation des Templates beobachten werden. Anhand der An- **170**, AcTol- **196** und Tol- **197** modifizierten Oligonucleotide ist diese Fehlpaarung ebenfalls zu beobachten, aber im Gegensatz zu dem AcAn-modifizierten **169** erfolgt auch der kanonische Einbau des dCTP's. Im Gegensatz zu den beiden monocyclischen NH-Oligonucleotiden **170** und **197** erfolgt beim Ac-Tol-modifizierten Oligonucleotid **196** der kanonische Einbau des dCTP mit einer geringeren Häufigkeit als das Nucleotid dATP. Eine weitere Auffälligkeit ist, dass die monocyclischen Oligonucleotide nur zum Teil vollständig verlängert werden. Bei den unacetylierten Sequenzen (An **169**, Tol **197**) erfolgt nach Einbau des ersten Nucleotides ein deutlich zu detektierender Kettenabbruch, wogegen die acetylierten Oligonucleotide entweder garnicht oder vollständig verlängert werden. Im Vergleich zu den monocyclischen Modifikationen ist bei den polycyclischen ein vollständiger Kettenabbruch, nach Einbau des ersten Nucleotides, zu beobachten. Ebenso erfolgt kein Fehleinbau, sondern nur der kanonische Einbau eines komplementären dCTP's. Die Modifikation hindert die Polymerase daran weitere Nucleotide einzubauen und es folgt der Kettenabbruch, im Gegensatz zu den monocyclisch-modifizierten Oligonucleotiden, bei denen trotz Fehlpaarung teilweise eine vollständige Elongation zu detektieren war.

Pol β

Weiterhin wurde die humane Polymerase *Pol β* (Familie X) verwendet. Sie ist eine Reparaturpolymerase, die durch Basen-Excisions-Reparatur Schäden in der DNA beseitigt (Abb. 113, S. 123).





X: Modifikation
dNTP: 2'-Desoxynucleosidtriphosphate
A: dATP **C:** dCTP **G:** dGTP **T:** dTTP **N:** dNTP
nt: Nucleotide; Länge des Primers

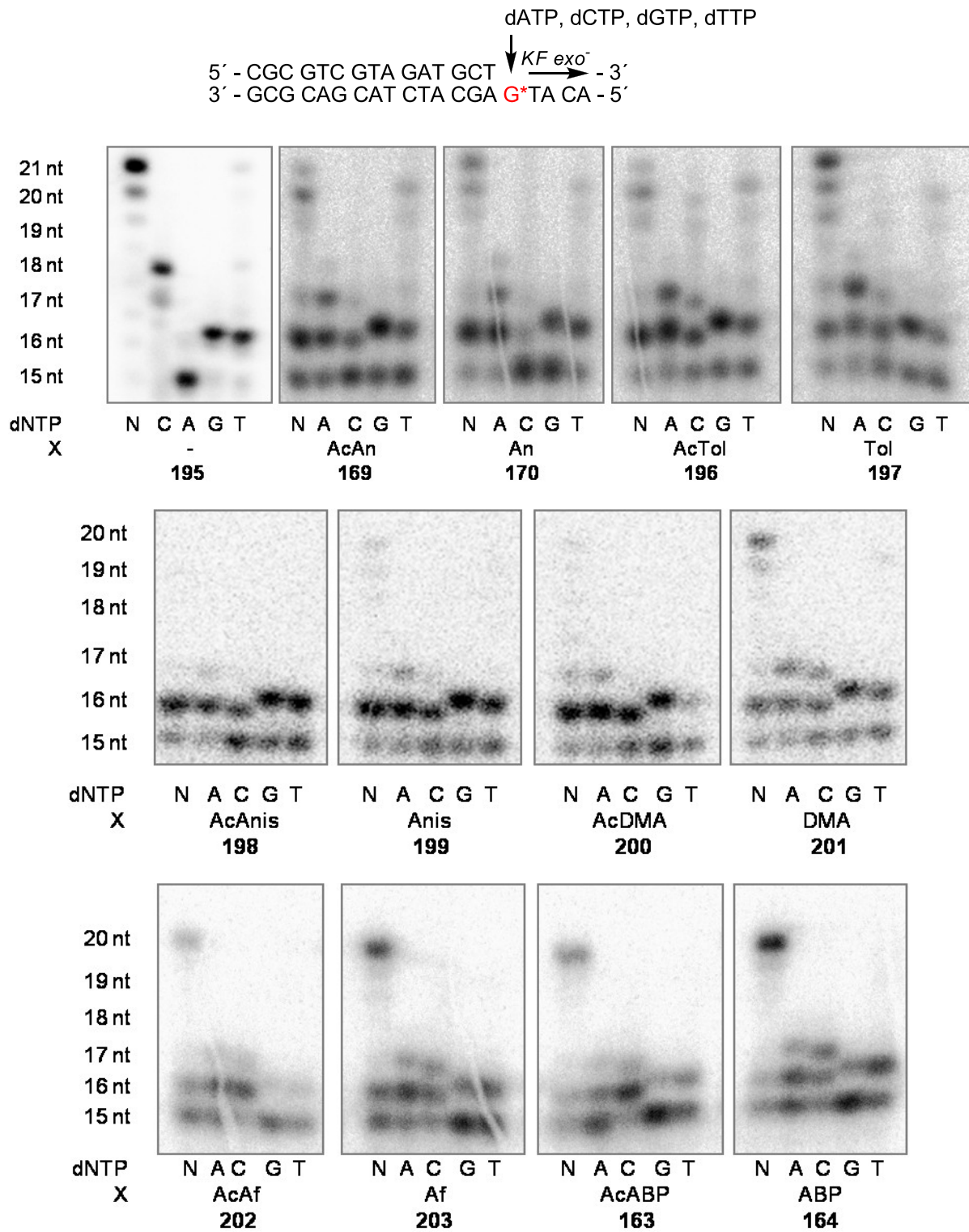
Abb. 113: Autoradiogramm der 14%-igen denaturierenden PAA-Gele der Reaktion mit der DNA Polymerase *Pol β*

Die Referenz, der unmodifizierte Strang **195**, zeigt den kanonischen Einbau des komplementären dCTP's gegenüber der Base G, sowie die vollständige Elongation des Stranges bei Zugabe aller dNTP's. Betrachtet man die monocyclischen Modifikationen (AcAn **169**, An **170**, AcTol **196** und Tol **197**), erfolgte zwar ebenfalls teilweise eine vollständige Elongation mit allen dNTP's, allerdings konnte bei AcAn **169**, An **170** und AcTol **196** kein Einbau des komplementären dCTP's detektiert werden, sondern überwiegend ein dATP. Der Einbau eines dATP's wurde bei allen monocyclisch-modifizierten Templatsträngen beobachtet. Auffällig war bei den monocyclischen Modifikationen (AcAnis **198**, AcDMA **200** und DMA **201**), dass ein Kettenabbruch nach Einbau des ersten Nucleotids auftrat. Die Nucleosidtriphosphate dGTP und dTTP werden in allen Ansätzen in sehr geringen Mengen eingebaut. Bei den polycyclischen Modifikationen (AcAf **202**, Af **203**, AcABP **163** und ABP **164**) ist, wie auch schon bei den monocyclischen, der kanonische Einbau des komplementären dCTP's, sowie der Einbau von dATP zu erkennen. Auffällig ist hierbei, dass während der Elongation nicht nur der vollständig verlängerte Primer zu detektieren war, sondern auch Abbruchstränge nach 17 und 18 Nucleotiden auftraten. Die polycyclischen Modifikationen könnten somit zu Zwei- bzw. Drei-Basendeletionen führen, wie sie für heterocyclische Modifikationen bereits von *Rizzo* beschrieben wurden.^[133] Somit haben die monocyclischen Modifikationen, wie in den in Abbildung 113 (S. 123) gezeigten Polymerase-Untersuchungen, einen größeren Einfluss (bezogen auf die Häufigkeit eines Fehleinbaus) auf die Polymerasen als die polycyclischen. Der höhere Einfluss der monocyclischen Modifikation auf einen nicht-kanonischen Einbau bestätigt sich auch hier und lässt auf eine Allgemeingültigkeit schließen.

Wird vergleichend die Auswirkung der C8-NH-Arylamin-Addukte auf die von *Böge* synthetisierten 30mere betrachtet, so erfolgt auch hier bei den polycyclisch modifizierten Templaten nur der Einbau von dCTP, während bei den monocyclischen Templaten auch der Einbau von dATP zu beobachten ist. Diese Ergebnisse sind identisch mit denen aus Abbildung 113 (S. 123) beim 20mer-Oligonucleotid.

Klenow Fragment exo^- (KF exo^-)

Abschließend wurde die Polymerase *KF exo^-* (Familie A) aus *E. coli* verwendet. Diese Polymerase weist aufgrund der fehlenden *proofreading* Funktion die höchste Fehlerrate (100×10^{-6} bp) der hier gezeigten Polymerasen auf.



X: Modifikation
 dNTP: 2'-Desoxynucleosidtriphosphate
 A: dATP C: dCTP G: dGTP T: dTTP N: dNTP
 nt: Nucleotide; Länge des Primers

Abb. 114: Autoradiogramm der 12.5%-igen denaturierenden PAA-Gele der Reaktion mit der DNA Polymerase *KF* *exo*⁻

Die Polymerase *KF* exo^- zeigt bereits beim Referenzstrang **195** einen sehr hohen Fehleinbau (Abb. 114, S. 125). Neben dem kanonischen Einbau von dCTP wurden zusätzlich dGTP und dTTP eingebaut. Auffällig ist zum Einen, dass das dATP nicht eingebaut wurde und zum Anderen, dass das dCTP nicht einmal, sondern dreimal eingebaut wurde. Die monocyclisch-modifizierten Oligonucleotide AcAn **169**, An **170**, AcTol **196**, sowie Tol **197** weisen ebenso wie der Referenzstrang **195** eine hohe Fehlerrate auf, da sie nahezu jedes Nucleosidtriphosphat ein bis zweimal einbauen und bei der Zugabe aller vier dNTP's ist, wie beim Referenzstrang **195** eine vollständige Elongation zu beobachten. Dagegen ist bei den AcAnis **198**, Anis **199**, AcDMA **200** und DMA **201** modifizierten Oligonucleotiden eine geringe Erhöhung der Einbaugenauigkeit festzustellen, da die entsprechenden dNTP's vorwiegend einmal eingebaut werden. Eine vollständige Elongation ist bei dem DMA-modifizierten Templat **201** zu erkennen, wogegen die AcAnis **198**, Anis **199** und AcDMA **200** modifizierten Templatstränge das erste Nucleotid einbauen und dann ein Strangabbruch erfolgt. Die polycyclischen Oligonucleotide werden nahezu vollständig elongiert. Der Einbau von dGTP und dTTP erfolgt bei den polycyclischen Modifikationen in geringen Mengen und bei den acetylierten Oligonucleotiden AcAf **202** und AcABP **163** vorwiegend garnicht.

Allgemein können aus den durchgeführten Experimenten erste Vermutungen hinsichtlich der durch die C8-NH- und C8-(N-Acetyl)-arylamino-modifizierten 2'-Desoxyguanosin verursachten Einflüsse auf die Replikation gezogen werden. Zum Einen sind diese Einflüsse abhängig von der verwendeten Polymerase und zum Anderen von der Modifikation. So führen Schäden durch monocyclische Arylamine, verglichen mit den polycyclischen, vermehrt zu einem Fehleinbau. Insbesondere die acetylierten Derivate verursachen schwerwiegende Fehleinbauten, da sie teilweise den kanonischen Einbau des komplementären dCTP's vollständig verhindern, dennoch wird der Primer verlängert. Diese Ergebnisse widersprechen zunächst den im Ames-Test gefundenen Daten, dass polycyclische Arylamin-Addukte carcinogener sind als monocyclische. Allerdings ist auch die Möglichkeit gegeben, dass diese Art von Modifikationen *in vivo* schneller durch Enzyme erkannt und repariert werden.

Sollten sich die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen, so würde der Unterschied in der Carcinogenität durch die verschieden starke Interaktion der Modifikation mit den Enzymen herrühren. Als Ursache dafür kämen strukturelle Unterschiede in Frage. Da durch die durchgeführten Messungen des circularen Dichroismus keine konformative Änderung der Gesamtstrukturen der modifizierten Oligonucleotide gefunden werden konnte, sollte eine Methode zur strukturellen Analyse modifizierter Oligonucleotide etabliert werden, um diese in Zukunft untersuchen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Grundlagen zur Kristallisation und damit zur strukturellen Analyse modifizierter Oligonucleotide geschaffen werden.

4.9 Röntgenstrukturanalyse der DNA

Um die Basenpaarung der modifizierten Duplices untersuchen zu können, sollten in Kooperation mit Dipl.-Chem. Dominik Oberthür (AK Prof. Betzel, Biochemie, Universität Hamburg) erste Versuche zur Kristallisation durchgeführt werden. Im Vergleich zu NMR-Techniken hat die Röntgenstrukturanalyse den Vorteil, dass sie wenig zu analysierender Substanz benötigt. Dies war ein Vorteil, da die Herstellung und Reinigung der modifizierten DNA nur sehr geringe Mengen ergab.

Für die Kristallisation wurden zwei unmodifizierte dsDNA-Oligomere, die 12mer *NarI*- und die 20mer-Sequenz, gewählt. Anhand der unmodifizierten Oligonucleotide sollte zunächst ein Verfahren für eine Kristallisation erarbeitet werden.

Ziel ist es, durch die Wahl eines geeigneten Puffers eine monodisperse Lösung zu erhalten. Unerwünscht sind Einzelstränge sowie die Bildung höherer Aggregate, wie z.B. eine Triplehelix.

Kristallisationsbedingungen

Für die Kristallisation der modifizierten DNA wurde zunächst anhand der unmodifizierten DNA nach den optimalen Kristallisationsbedingungen gesucht.

Als Ausgangskonzentration wurden 5.0 mg/mL Oligonucleotid verwendet. Gelöst wurde die DNA einerseits in einem Natriumcacodylat-Puffer, zum Anderen in einem Annealing-Puffer der Firma Sigma Aldrich. Für eine optimale Hybridisierung wurden die DNA-Stränge in der entsprechenden Menge Puffer gelöst. Die 12mer-Oligonucleotide wurden bei 75 °C, die 20mere bei 90 °C für jeweils fünf Minuten erhitzt und über einen Zeitraum von 1-2 Stunden langsam wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde die dsDNA bei 4 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Monodispersität wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) der Probe vermessen. Bei der dynamischen Lichtstreuung handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung von Molekülradien und Aggregationsformen von Stoffen anhand der hydrodynamischen Radien der in einer Lösung enthaltenen Partikel. Dies erfolgt über die Messung der Brown'schen Molekularbewegung. Dabei werden größere Teilchen durch die Viskosität des Mediums stärker abgebremst als kleinere. Wird mit einem Laser auf eine gelöste Probe gestrahlt, so wird das Licht von den darin enthaltenen Partikeln und Molekülen gestreut und bildet ein Interferenzmuster. Durch die Brown'sche Molekularbewegung ändert sich dieses Muster ständig.

Anhand der Analyse dieser Schwankungen ist es möglich, auf die Größenverteilung der in der Lösung vorliegenden Teilchen zu schließen.^[134]

Ein Beispiel einer solchen DLS-Messserie ist in Abbildung 115 am Beispiel des *Narl*-Oligonucleotids **171** dargestellt.

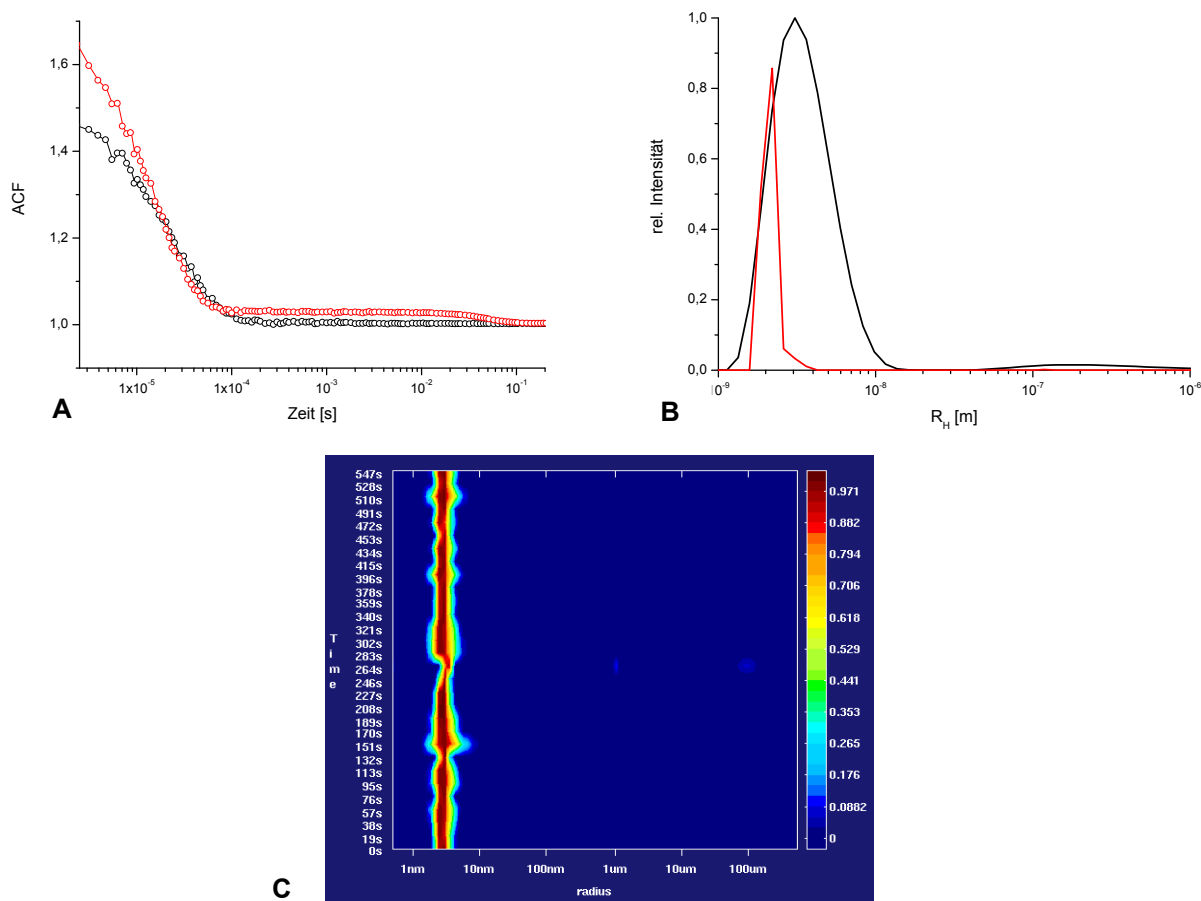


Abb. 115: Zusammenfassung einer typischen DLS-Messserie des *Narl*-Oligonucleotids **171**:

A) ACF-Kurve einer DLS-Einzelmessung

B) Zugehörige Radienverteilung der Einzelmessung, ausgewertet durch das Programm CONTIN.^[135] Der hydrodynamische Radius der DNA beträgt 2.90 nm.

C) Messserie, die die zeitliche Entwicklung der Radiusverteilung illustriert.

Idealerweise sollte die DNA eine schmale Bande bei einem geringen Radius aufweisen. Dies konnte, wie in Abbildung 115 C zu sehen, nachgewiesen werden. Die Autokorrelationsfunktionen (ACF), wie in Abbildung 115 A beispielhaft dargestellt, wurden durch das Programm CONTIN^[135] ausgewertet, welches aus den aufgenommenen Daten eine Verteilung der Radien der Partikel berechnet. Diese Verteilung ist in Abbildung 115 B dargestellt.

In Abbildung 115 C (S. 129) ist zusätzlich die Verteilung der Radien als Funktion der Zeit wiedergegeben. Die relative Häufigkeit jeder Radiusfraktion ist durch eine Farbskala dargestellt. Anhand dieser Beispiele konnte ein hydrodynamischer Radius von 2.90 nm gemessen werden. Der Fehler beträgt hierbei ± 0.12 nm.

Trotz zahlreicher verwendeter Kristallisationsverfahren, wie z.B. *Capillar Counter Diffusion* oder dem „*sitting drop*“-Verfahren („sitzender Tropfen“), wurden die besten Ergebnisse anhand des „*hanging drop*“-Verfahrens („hängenden Tropfens“) erhalten (Abb. 116). Diese wurden in Linbro-Platten durchgeführt, wobei die Sättigung kontinuierlich durch Dampfdiffusion des Wassers erfolgte.

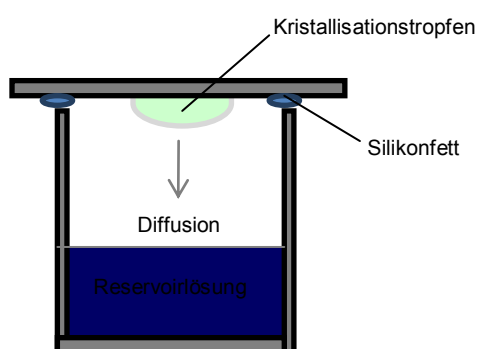


Abb. 116: „*hanging drop*“-Verfahren zur Kristallisation

In Abbildung 116 ist das „*hanging drop*“-Verfahren zur Kristallisation dargestellt. Hierbei werden 1 - 2 μ L DNA-Lösung mit einem gleichen Volumen des Präzipitanten auf einen silikonbeschichteten Objektträger gegeben. In der Reservoirlösung befindet sich die jeweilige MPD-Konzentration (MPD = 2-Methyl-2,4-pentandiol). Durch Diffusion tritt im Laufe der Zeit Wasser aus dem Kristallisationstropfen in die Reservoirlösung über, so dass die Konzentration im DNA-Tropfen kontinuierlich ansteigt. Außerdem ist MPD volatil und diffundiert aus dem Reservoir in den Tropfen, was die Dampfdiffusion zusätzlich beschleunigt. Eine mögliche Kristallisation wird mikroskopisch verfolgt.

Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde unter verschiedenen Bedingungen des *Natrix Screens* (Hampton Research) und des *Nucleic Acid Mini Screen* (NAMS, Hampton Research) bei 4 °C, 15 °C, 20 °C und 30 °C durchgeführt (s. Anhang, S. 301 und S. 302).

Erste Kristallisationsexperimente des Dodecamer DNA-Duplex ergaben sphärolithische Kristalle, welche schnell wuchsen und eine starke Doppelbrechung zeigten, wenn sie mit polarisiertem Licht bestrahlt wurden. Die Optimierung dieser

Bedingungen führte zum Wachstum von kleinen Kristallen ($< 150 \mu\text{m}$), die als DNA-Kristalle unter UV-Licht identifiziert werden konnten. Nach weiterer Optimierung konnten größere Kristalle (ab $300 \mu\text{m}$) erhalten werden, die jedoch entweder eine sehr schwache Diffraction (Abb. 117 links), Faserbeugung oder keine Diffraction (Abb. 117 rechts) aufwiesen.

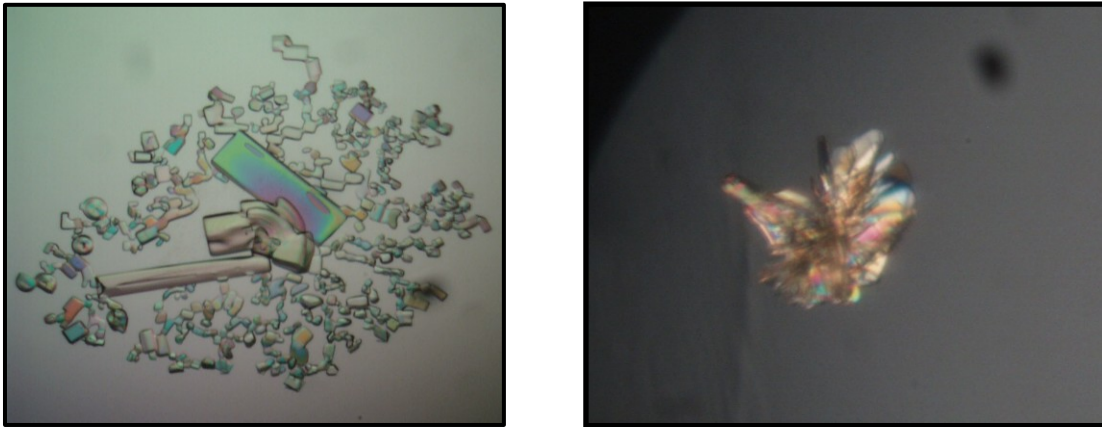


Abb. 117: Auswahl der erhaltenen zu kleinen (links) oder inhomogenen Kristalle (rechts)

In einem Ansatz konnte nach fünf Monaten ein Kristall beobachtet werden, welcher eine andere Morphologie als die bisherigen Kristalle aufwies (Abb. 118, S. 132). Dieser Kristall konnte unter UV-Licht mittels des *fluorescent dye Sybr® Gold* als DNA-Kristall analysiert (Abb. 118 links, S. 132) und anschließend mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht werden.

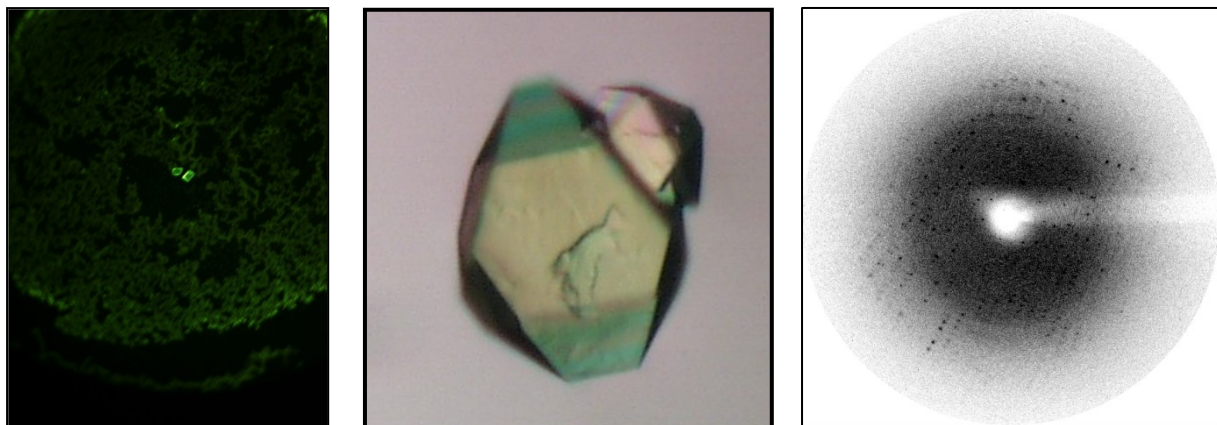


Abb. 118: von links nach rechts: UV-Bild zeigt, dass es sich um DNA-Kristalle handelt; größere Kristalle mit gleicher Morphologie; Beugungsbild von Röntgenbeugungsuntersuchungen mit einer Drehanode

Aus dem in Abbildung 118 (rechts) dargestellten Beugungsbild konnte aufgrund der geringen Auflösung keine Struktur ermittelt werden.

Kristall des unmodifizierten NarI-Duplex

Der erste, strukturell zu analysierende Kristall des unmodifizierten *NarI*-Duplexes (5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3) konnte in einem Ansatz nach zwei Wochen aus einem 1:1 Gemisch der DNA und dem *Nucleic Acid Mini Screen* Nummer 3 (20 mM Cobalthexamin; 40 mM Natriumcacodylat-Puffer, pH 5.5; 12 mM Natriumchlorid; 80 mM Kaliumchlorid; 10% v/v MPD) nach Äquilibrierung gegen 500 μ L 35% (v/v) MPD in Linbro-Platten bei 4 °C erhalten werden. Nach einwöchiger Inkubation bei 4 °C wurde die Platte für drei Stunden auf Raumtemperatur erwärmt, bevor sie eine weitere Woche bei 4 °C inkubiert wurde.

Der erhaltene Einkristall besitzt eine Größe von 500 x 300 x 300 μ m und ist zusammen mit dem dazugehörigen Diffraktionsbild in Abbildung 119 (S. 133) gezeigt.

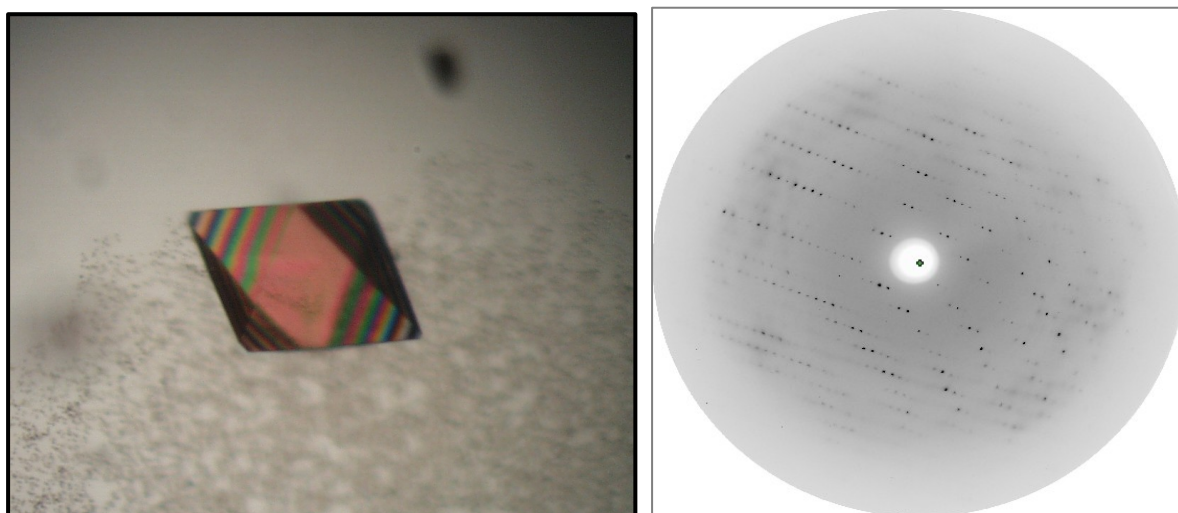


Abb. 119: links: Einkristall des *Narl*-Duplex nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen im hängenden Tropfen einer Linbro 24-Platte; rechts: Diffraktionsbild des DNA-Kristalls mit der Raumgruppe $P2_12_12_1$ und einer Auflösungsgrenze von 2.4 Å

Die Röntgenbeugungsdaten wurden an der Konsortiums-Beamline X13 (HASYLAB, DESY) mit einer Auflösung von 2.4 Å aufgezeichnet. Die Diffraktionsdatensammlung erfolgte direkt anhand des durch einen Stickstoffstrom gefrorenen Kristalls bei 100 K unter Verwendung eines *Nylon Cryoloop* (Hampton). Aufgrund der hohen MPD-Konzentration war eine zusätzliche Gefrierschutzbehandlung des Kristalls zur Vermeidung der Bildung von Wassereis nicht notwendig.

Die Analyse der an der Beamline aufgezeichneten Daten in einem Winkel von 0° bis 90° ergaben eine tetragonal-primitive Symmetrie (P4) mit den Zellkonstanten $a = b = 38.0$ Å, $c = 70.3$ Å. Allerdings ergaben detaillierte Analysen mittels Pointless (CCP4^[136]) und Xtriage (PHENIX^[137]) eine orthorombisch-primitive Symmetrie mit den Zellkonstanten $a = 38.39$ Å, $b = 38.60$ Å, $c = 70.88$ Å. Dies wurde durch die Analyse der systematischen Absenzen bestätigt. Diese Fehlinterpretation der Kristallsymmetrie lag in den nahezu identischen Zellparametern a und b . Aufgrund der hohen Standardabweichung war die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellkonstanten a und b gleich sind höher, als dass diese sich um 0.3 Å unterscheiden. Bezogen auf das CCP4 Software-Paket^[138,139] gehören die Kristalle zur Raumgruppe $P2_12_12_1$. Abschließend konnte das Phasenproblem durch molekularen Ersatz durch die Anwendung des Programms MOLREP^[140] gelöst werden. Da bisher keine DNA mit vergleichbarer Sequenz in der pdb-Datenbank registriert ist und molekularer Ersatz bei Verwendung von ähnlichen Strukturen bei der Modellsuche fehlschlug, wurde

eine ideale 12mer dsDNA (A- und B-DNA-Form) mit Hilfe des Programmes COOT^[141] erstellt. Die Verwendung der idealen B-DNA ergab weder mit MOLREP^[140] noch mit PHASER^[142] eine Lösung. Dagegen konnte unter Verwendung der idealen A-DNA als Suchmodell in MOLREP^[140] das Phasenproblem gelöst werden. Weitere Verfeinerungen des initialen Modells aus MOLREP^[140] wurden mittels REFMAC^[138,139] und COOT^[141] durchgeführt, bis keine Verbesserung der einzelnen Parameter (R_{work} , R_{free} , FOM, Bindung r.m.s.d. und Winkel r.m.s.d.) mehr erreicht werden konnte. Die erhaltenen Endwerte sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Tab. 23: Details der Diffraktionssammlung und Verfeinerungsparameter des unmodifizierten *Narl*-Kristalls

Data collection statistics	
Beamline	Consortiums beamline X13; HASYLAB, DESY
Temperature (K)	100
Wavelength (Å)	0.8123
Spacegroup	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit-cell parameters: <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	38.39 38.69 70.88
Resolution range	18.53 - 2.46 (2.60 - 2.46)
Measured reflections	21773
Unique reflections	4074
Completeness (%)	98.2 (92.4)
Multiplicity	5.3
Average $I/\sigma(I)$	12 (3.6)
R_{merge} (%) ^b	8.0 (38.3)
Refinement statistics	
R_{work} / R_{free} (%)	17.5 / 22.2
Asymmetric unit content	One DNA duplex
DNA atoms	514
Water molecules	13
Other atoms	18
R.m.s.d. bonds (Å)	0.014
R.m.s.d. angles (°)	2.83

^a Die Werte in Klammer gelten für die höchste Auflösung.

^b R_{merge} ist definiert als $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, wobei $I_i(hkl)$ aus der i^{th} Messung der Intensität der Reflexion hkl ist und $\langle I(hkl) \rangle$ die durchschnittliche Intensität von mehreren Beobachtungen.

Die anfängliche Auflösung des Modells wurde mit COOT^[141] durchgeführt und die endgültigen Koordinaten nach Verfeinerung mit PyMOL^[143] ausgerichtet (Abb. 120).

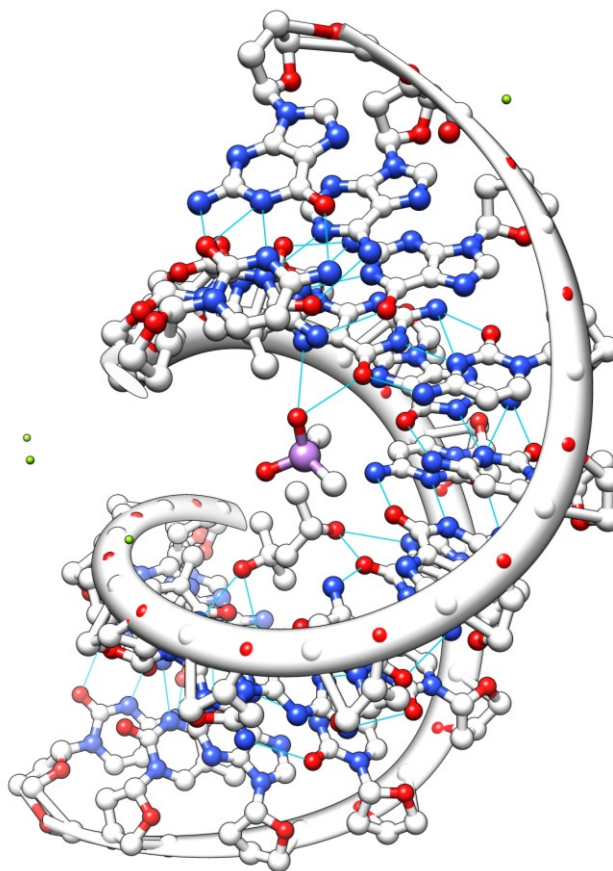


Abb. 120: Modell des unmodifizierten *NarI*-Oligonucleotids **171** mit intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen

Die Kristallstrukturanalyse in Abbildung 120 zeigt den Duplex, welcher mit 14 Wasserstoffbrückenbindungen pro Molekül stabilisiert ist. Dieser weicht, wie in Abbildung 121 gezeigt, von der idealen A-DNA-Struktur ab. Die unmodifizierte *NarI*-DNA **171** (blau) ist im Vergleich zur idealen A-DNA (violett) stärker gebogen.

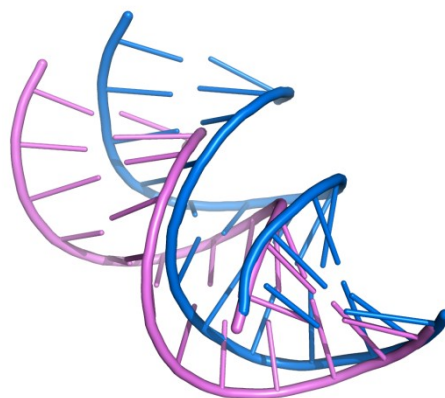


Abb. 121: Vergleich der idealen A-DNA (violett) und der *NarI* Duplex Struktur (blau)

Andererseits sind die Größen der kleinen (10.3 Å gegen 11.0 Å (ideal)) und großen Furche (6.6 Å gegen 6.3 Å (ideal)) nahezu identisch (diese Daten wurde aus Berechnungen mit w3DNA^[144] abgeleitet).

Die dichte Packung der DNA-Moleküle neben großen Kanälen erklärt sowohl das schnelle und reproduzierbare Kristallwachstum unter den optimalen Kristallisationsbedingungen als auch die Zerbrechlichkeit der Kristalle. Vor allem die komplexe Anordnung der DNA-Moleküle fördert die Kristallisation. Die dichte Packung der DNA-Moleküle könnte ebenfalls eine Erklärung für die hohe Qualität der Elektronendichtekarte in Anbetracht der moderaten Auflösung sein (Abb. 122).

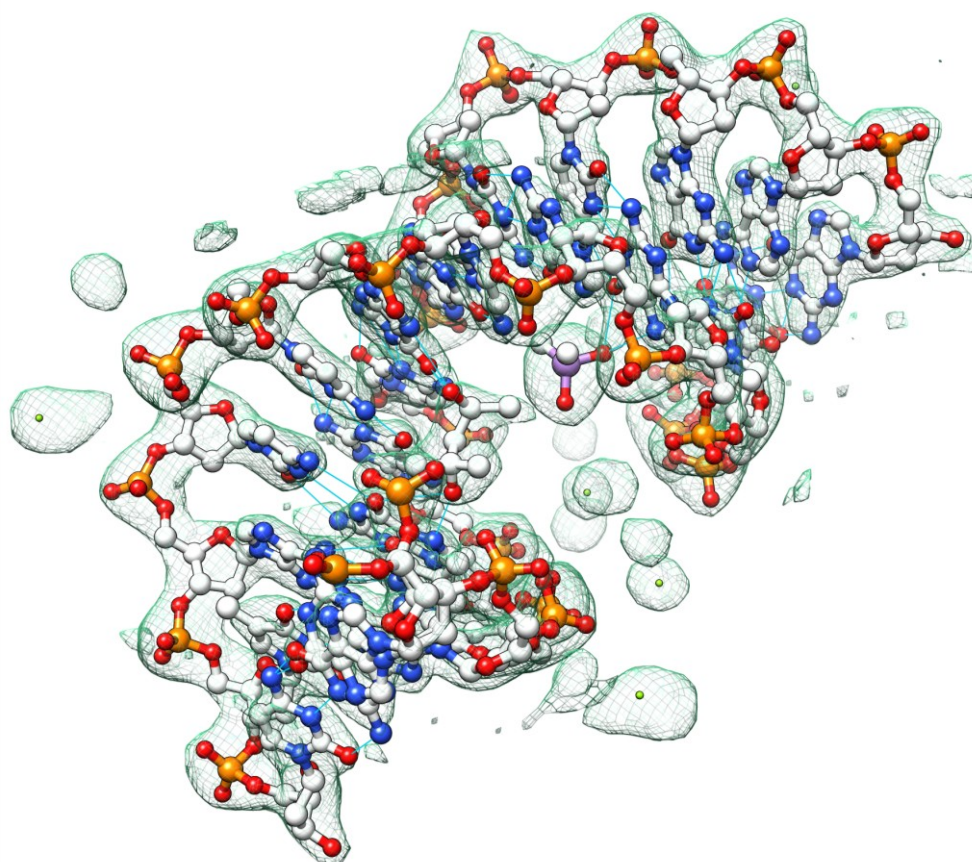


Abb. 122: Das erhaltene Modell des *NarI*-Duplex **171** überlagert von einer 2FO-FC-Elektronendichtekarte

Bisher sind nur zwei weitere Dodecamer DNA-Strukturen mit der A-DNA Form in der pdb-Datenbank publiziert worden, beide an palindromen Sequenzen. Darüber hinaus sind in der Datenbank ausschließlich B-DNA Formen von 12mer-Oligomeren bekannt. Somit konnte mit der verwendeten Methode eine neue, dreidimensionale Struktur vorgestellt werden.

In der folgenden Abbildung ist der schematische Verlauf des DNA-Rückgrats mit der zugehörigen Elektronendichtekarte abgebildet (Abb. 123).

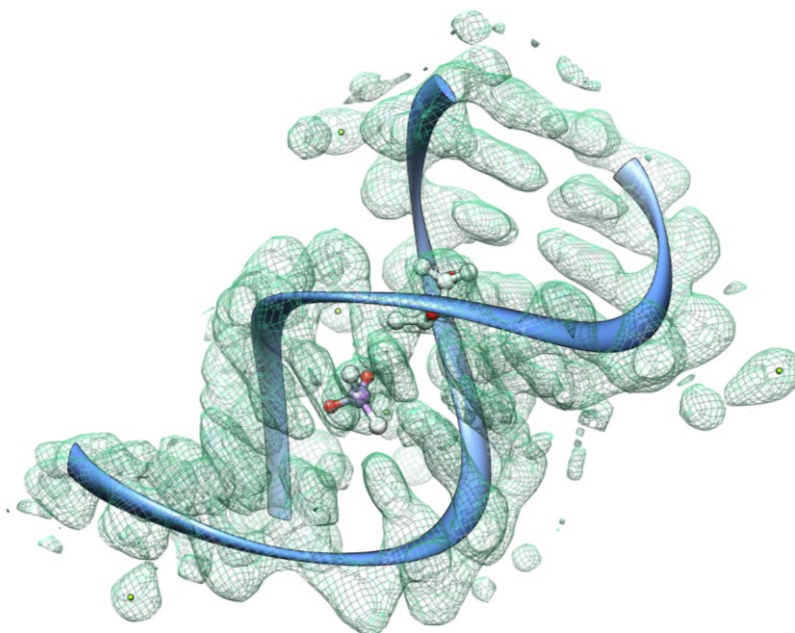


Abb. 123: 2FO-FC-Elektronendichtekarte der *NarI*-Struktur **171**.
Blau: schematischer Verlauf des DNA-Rückgrats

Es ist bekannt, dass DNA die Tendenz hat, in A-DNA-Konformation zu kristallisieren und in der B-DNA-Konformation in Lösung vorzuliegen.^[145] Anhand CD-spektroskopischer Untersuchungen (Kapitel 4.6, S. 103) konnte gezeigt werden, dass das *NarI*-Oligonucleotid in Lösung in der B-DNA-Konformation vorkommt. Die Konformation der DNA ist in Lösung flexibel und hängt zu einem gewissen Grad von den Interaktionspartnern ab. Eine DNA mit B-DNA Konformation kann unter bestimmten Bedingungen, wie z.B dem Wechsel des Lösungsmittels oder Wasserentzug, in A-DNA umgewandelt werden.^[146] Diese konformative Flexibilität hängt nicht nur von der Interaktion mit anderen Molekülen, z.B. Proteinen, Ionen oder Fällungsmitteln ab, sondern auch von der Sequenz. G-reiche Sequenzen sind dafür bekannt, die A-Konformation zu bevorzugen.^[146]

Kristallisation des 20mer DNA-Duplex

Erste Kristallisationsexperimente des unmodifizierten 20mer DNA-Duplexes führten zum Wachstum sphärolytischer Kristalle, die denen der ersten Kristallisationsexperimente mit dem Dodecamer ähneln. Die optimierten Kristallisationsbedingungen des Dodecamers führten beim 20mer-Oligonucleotid **195** zum Wachstum von unregelmäßig geformten Kristallen. Anders als bei der Optimierung der Kristallisation des unmodifizierten Dodecamer DNA-Duplexes **171** wurden keine großen Kristalle mit typischer Morphologie erhalten. Die Untersuchung der Röntgenbeugungseigenschaften der Kristalle wurde an der Konsortium Beamline X13 durchgeführt. Die Kristalle des unmodifizierten 20mer DNA-Duplex zeigten ein schwaches Beugungsmuster, Faserbeugung oder keine Beugung.

Die längste DNA-Duplex-Struktur, die in der pdb-Datenbank bekannt ist und durch Röntgenbeugung ermittelt wurde, ist eine Sequenz mit 17 Nucleotiden. Die Struktur längerer Oligonucleotide konnte im Fall von komplexen Molekülen, wie z.B. bei Quadruplexen oder im Komplex mit Proteinen, gelöst werden. Je länger die Kette, desto mehr weicht die Gesamtstruktur von einer Kugelform ab. Die länglichen, zylindrischen Moleküle neigen dazu, in Fasern zu kristallisieren und nicht als Einkristalle. Außerdem besitzen diese Moleküle mehrere Möglichkeiten, sich entlang der Helix anzuordnen. Dies führt zu intrinsisch ungeordneten Kristallen ohne Beugung. Um das Kristallwachstum zu fördern, werden daher weitere Kristallisationsbedingungen untersucht.

Kristallisation der modifizierten Oligonucleotide

Hierzu wurden sowohl die modifizierten 12mer- als auch die 20mer-Oligonucleotide verwendet.

Narl-Sequenz

Kristalle der *Narl*-Sequenz, modifiziert mit der C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-Gruppe **172**, wurden in einem Ansatz nach zwei Wochen bei 4 °C unter folgenden Bedingungen erhalten: 5.0 mg/mL DNA, 5% MPD, 20 mM Na-Cacodylat (pH 5.5), 10 mM Cobalthexamin, 6 mM NaCl und 40 mM KCl nach Äquilibrierung gegen 35% MPD. Die Diffraktionseigenschaften wurden an der Konsortium Beamline X13 (HASYLAB, DESY) bei 100 K ermittelt. Die Kristalle zeigten jedoch nur eine schwache Beugung von 18 Å und wiesen eine hohe Temperaturempfindlichkeit auf. Im Gegensatz zu den unmodifizierten Kristallisationsplatten konnten hier nach dem Abkühlen keine weiteren Kristalle erhalten werden.

20mer-Sequenz

Modifizierte 20mer Kristalle (C8-NH-4-biphenyl **164** und C8-NH-2-fluorenyl **203**) konnten aus einem Ansatz nach zwei Wochen bei 20 °C unter den gleichen Bedingungen wie bei der *Narl*-Sequenz erhalten werden. Diese wurden direkt in flüssigem Stickstoff ohne zusätzliche Gefrierschutzbehandlung eingefroren und werden in Kürze Röntgenbeugungsuntersuchungen unterzogen.

5. Pro-Oligonucleotide

Im Gegensatz zu den bisher dargestellten, an C8-Position des 2'-Desoxyguanosins modifizierten Oligonucleotiden sollten zusätzlich Rückgrat-modifizierte Oligonucleotide synthetisiert werden, um somit den Zugang zu Pro-Oligonucleotiden zu ermöglichen. Durch Substitution des negativ geladenen Oligonucleotid-Phosphatrückgrats mit einem lipophilen Rest sollte die passive Zellaufnahme durch Membrandiffusion verbessert und die Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau erhöht werden. Diese Modifikation ist nur temporär stabil, so dass sie nach einer definierten Halbwertszeit gespalten wird. Für die Synthese solcher Rückgrat-modifizierten Oligonucleotide wurde zunächst die *iso*Butyryloxybenzyl-Gruppe eingeführt, da diese nach erfolgreicher Synthese der Zielverbindung flexibel im Hinblick weiterführender Modifikationen zur Einstellung der Lipophilie und Enzymstabilität ist.

Um schnell und effizient beliebige DNA-Sequenzen untersuchen zu können, ist ein monomerer Phosphoramiditbaustein notwendig, welcher analog zur Standard-Phosphoramiditmethode mittels automatisierter Festphasensynthese in Oligonucleotide eingebaut werden kann.

In der folgenden Abbildung ist retrosynthetisch die Darstellung des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidinyl]-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidits **61** dargestellt (Abb. 124).

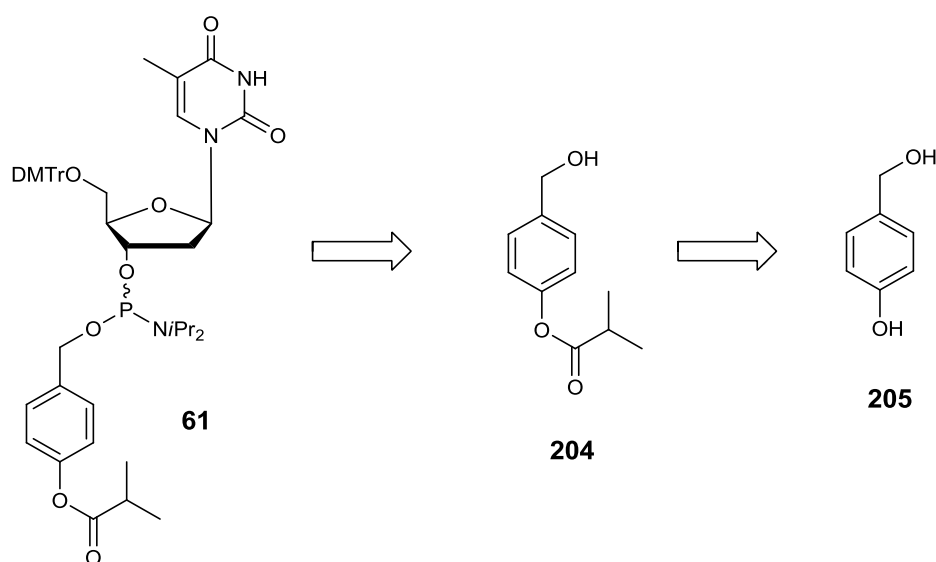


Abb. 124: Retrosynthese des Zielmoleküls **61**

5.1 Synthese des *iso*Butyryloxybenzyl-maskierten Phosphoramidits **61**

Wie in der retrosynthetischen Analyse dargestellt, wurde zunächst der Phenylester **204** benötigt. In literaturbekannten Synthesen wurde bei der Darstellung solcher Phenylester aus dem entsprechenden Alkohol und dem Säurechlorid häufig auf eine doppelte Acylierung hingewiesen.^[147-149] Da jedoch die Alternative über milde, aber zuvor in mehreren Stufen synthetisierte Acylierungsmittel verläuft, erfolgte direkt die Darstellung aus 4-Hydroxybenzylalkohol **205** mit *iso*Butyrylchlorid (Abb. 125).

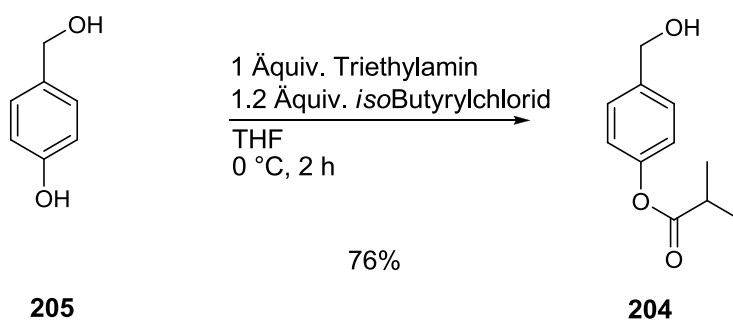


Abb. 125: Acylierung des 4-Hydroxybenzylalkohols **205**

Um eine hohe Selektivität zu erreichen, wurde bei 0 °C gearbeitet und ein Äquivalent Triethylamin zur Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe zugegeben. Mögliche Verunreinigungen in dem Produktgemisch sind der 4-Hydroxybenzylalkohol **205**, das doppelt acylierte Addukt sowie der Benzylester. Diese konnten jedoch leicht abgetrennt und das 4-(Hydroxymethyl)phenyl-*isobutyrate* **204** in einer Ausbeute von 76% isoliert werden. Der 4-Hydroxybenzylalkohol **205** sowie der Benzylester konnten durch Extraktion mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung abgetrennt werden. Das doppelt acylierte Addukt konnte leicht säulenchromatographisch isoliert werden.

Zur Darstellung des Zielmoleküls **61** musste zunächst das Phosphoramidit synthetisiert werden. Generell waren hierfür verschiedene Synthesewege denkbar, welche im Folgenden beschrieben werden.

Route I

Hierbei sollte eine, in unserer Arbeitsgruppe etablierte Route über ein 4-*iso*Butyryloxybenzyl-chlor-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidit **206** angewendet werden (Abb. 126, S. 142).^[150]

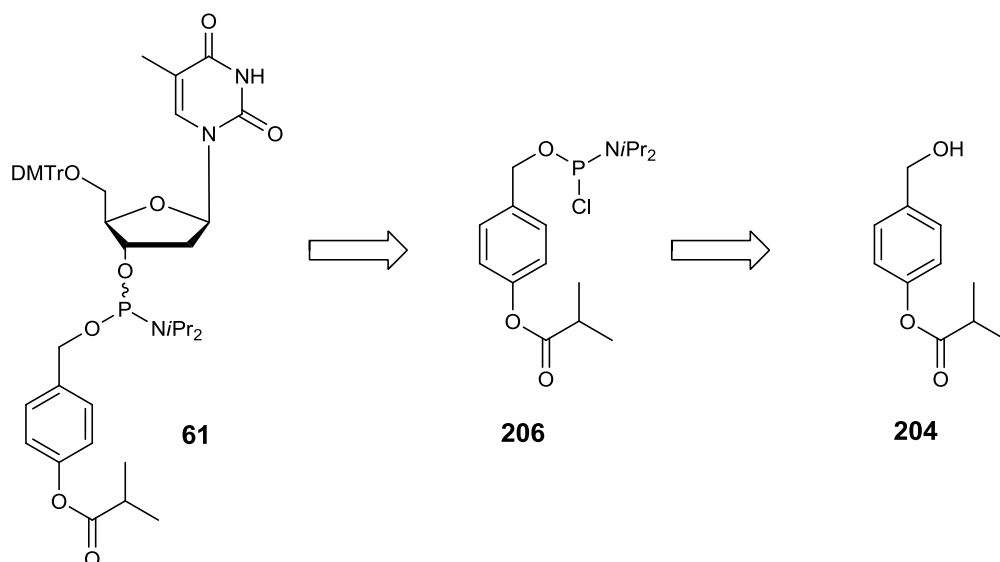


Abb. 126: Retrosynthese zur Darstellung des *iso*Butyryloxybenzyl-maskierten Phosphoramidits **61** über Route I

Zur Darstellung des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-chlor-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidits **61** wurde als erstes das Dichlorphosphoramidit **208** synthetisiert (Abb. 127).

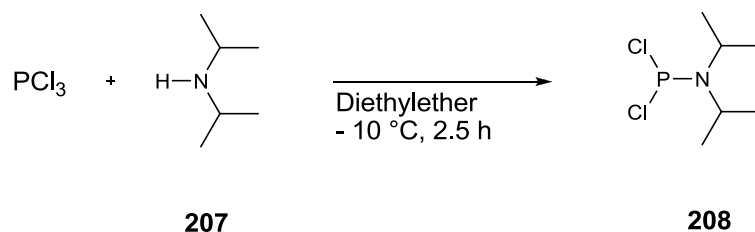


Abb. 127: Synthese des Dichlorphosphoramidits **208**

Dies gelang durch die Umsetzung von Phosphortrichlorid mit Diisopropylamin (DIPA) bei - 10 °C und einer Reaktionszeit von 2.5 Stunden. Nach Filtration unter Inertgas wurde das Dichlorphosphoramidit **208** direkt in der nächsten Stufe umgesetzt.

Aus dem Dichlorphosphoramidit **208** konnte das 4-*iso*Butyryloxybenzyl-chlor-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidit **206** dargestellt werden (Abb. 128, S. 143).

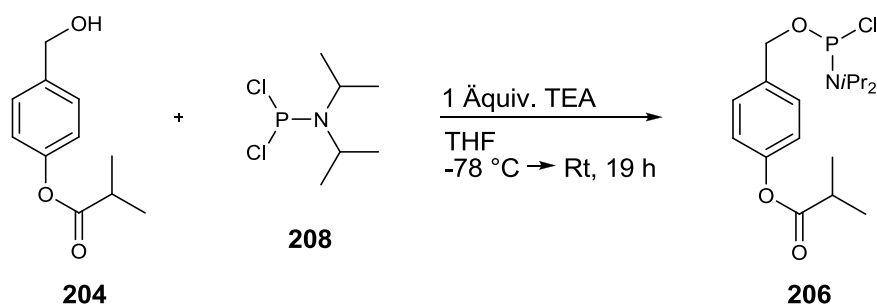


Abb. 128: Synthese des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-chlor-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidits **206**

Die Reaktion wurde in Tetrahydrofuran mit Triethylamin als Base durchgeführt. Die Zugabe des Dichlorphosphoramidits **208** erfolgte bei -78 °C. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Gegensatz zu den stabilen, doppelt maskierten Phosphoramiditen von Jessen^[150] war es aufgrund der Instabilität des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-chlor-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidits **206** nicht möglich, dieses zu reinigen.

Die Instabilität des Produktes **206** stellte ein großes Problem bei der Synthese dieser Verbindung dar, so dass sie mitsamt der Verunreinigungen in der nächsten Stufe eingesetzt wurde (Abb. 129).

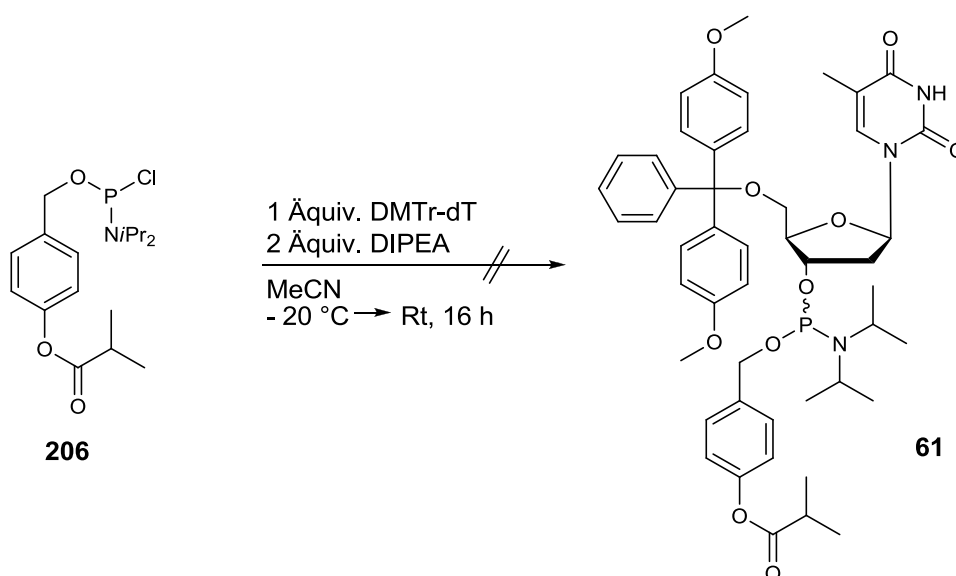


Abb. 129: Versuch der Synthese des Zielmoleküls **61**

Dazu wurde DMTr-dT in Acetonitril gelöst, mit DIPEA versetzt und das 4-*iso*Butyryloxybenzyl-chlor-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidit **206** bei -20 °C zugetropft. Vor der Aufarbeitung wurde ein ^{31}P -NMR-Spektrum gemessen, um einen möglichen Zerfall des Produktes **61** während der Reinigung ausschließen zu können (Abb. 130).

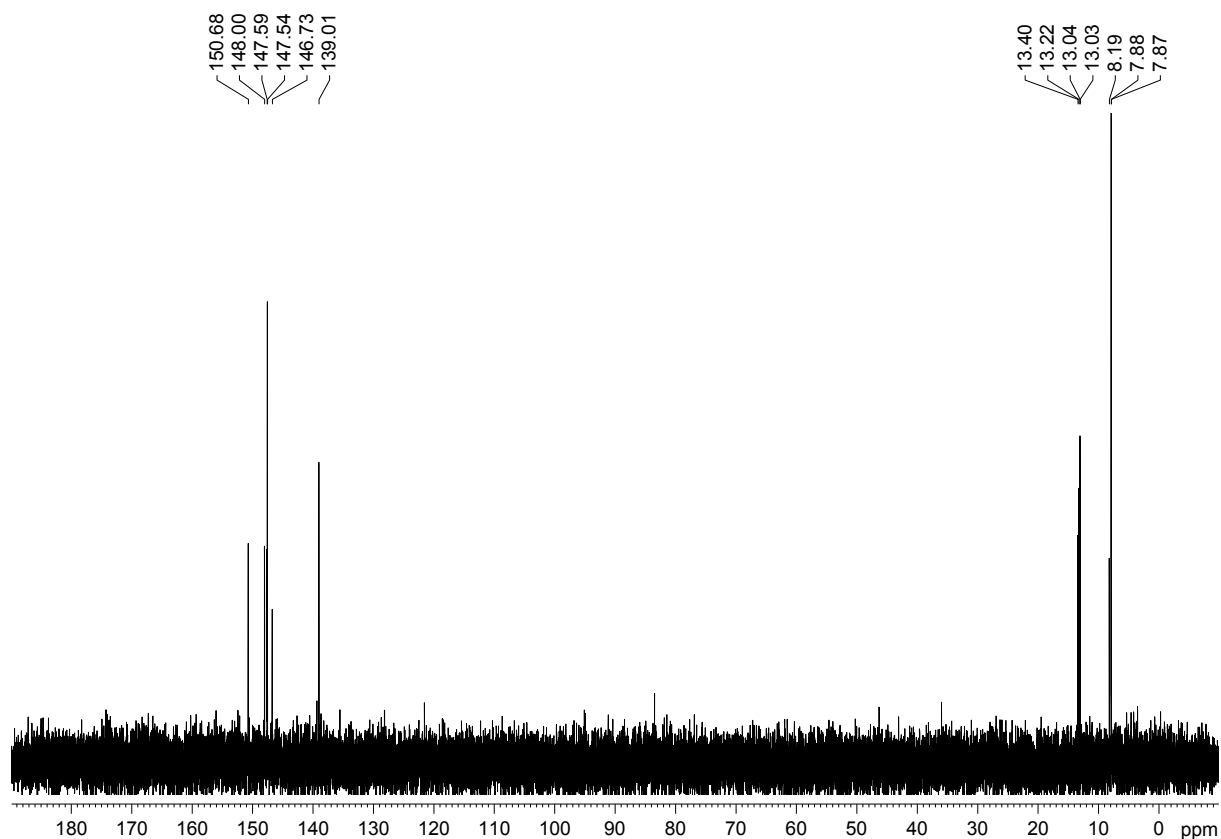


Abb. 130: ^{31}P -NMR-Spektrum des Rohgemisches **61** in Benzol- d_6

Anhand des vorliegenden ^{31}P -NMR-Spektrums ist eine eindeutige Zuordnung der Signale nicht möglich, da sich in dem Bereich zwischen 139 und 148 ppm, in welchem sich das Produkt befinden sollte, zu viele Signale auftreten. Nach säulenchromatographischen Reinigungen über Alox (neutral, Akt.stufe III) unter deutlichem Substanzverlust wurde das in Abbildung 131 (S. 145) dargestellte ^{31}P -NMR-Spektrum erhalten.

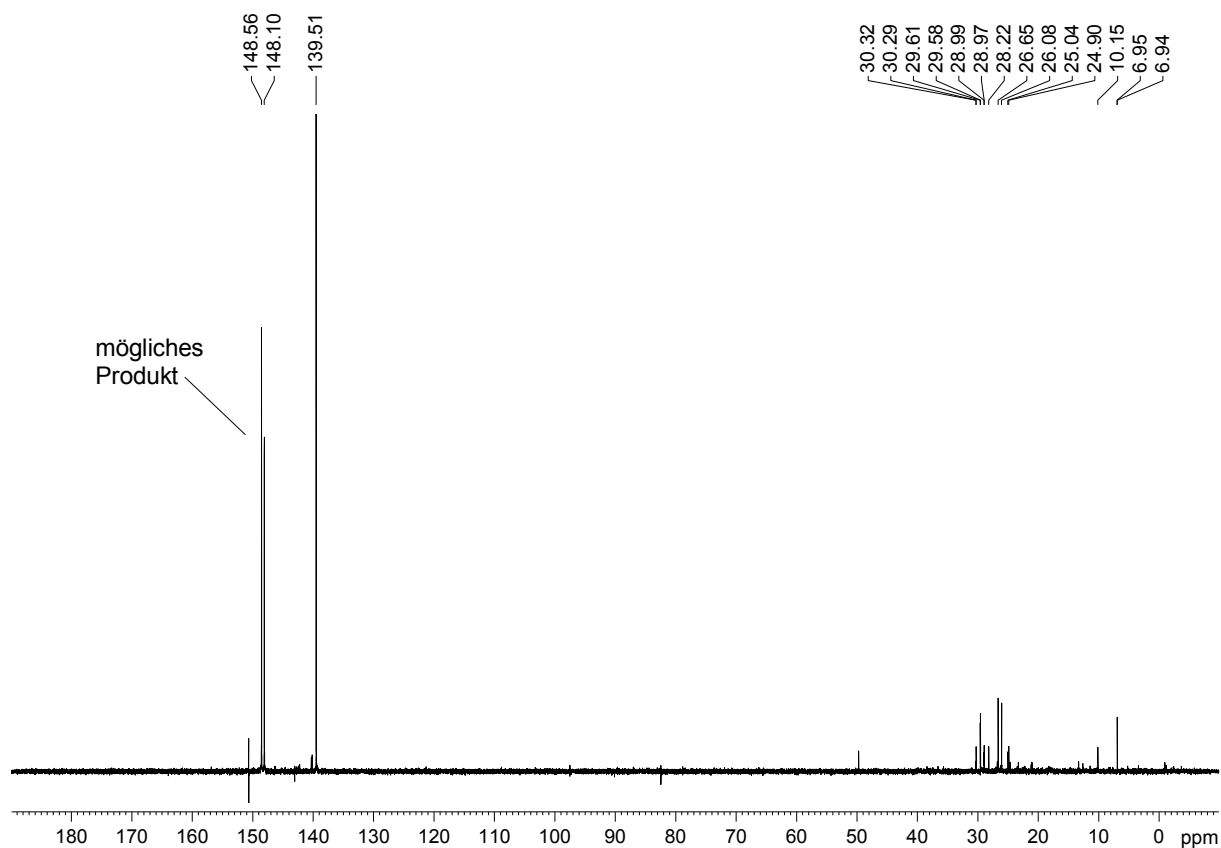


Abb. 131: ^{31}P -NMR-Spektrum des Zielmoleküls **61** in Benzol- d_6 nach vier säulenchromatographischen Reinigungen

Anhand des hier vorliegenden ^{31}P -NMR-Spektrums ist deutlich zu erkennen, dass das Produkt nicht rein isoliert werden konnte. Ein Teil der Verunreinigungen im Bereich von 139-149 ppm konnte abgetrennt werden, aber ebenso sind deutlich mehr Zerfallsprodukte im Bereich von 5-30 ppm zu erkennen. Aufgrund des hohen Substanzverlustes durch die zahlreichen chromatographischen Reinigungen wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet. Das Problem dieser Syntheseroute bestand in den beiden Vorstufen **206** und **208**, welche nicht rein isoliert werden konnten.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Route entwickelt.

Route II

Analog zu *Beaucage* sollte 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidit **209** synthetisiert werden (Abb. 132, S. 146).^[151]

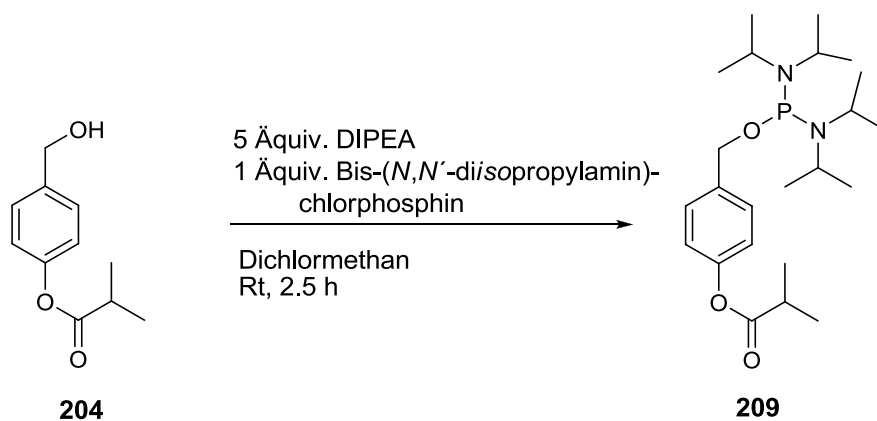


Abb. 132: Synthese des Diisopropylamin-Phosphoramidits **209**

Hierzu wurde der Benzylalkohol **204** mit DIPEA sowie Bis-(*N,N'*-diisopropylamin)-chlorphosphin versetzt und schnellstmöglich mittels Chromatotron gereinigt. Hierbei konnte der fortschreitende Zerfall beobachtet und kein Produkt isoliert werden. Als nächstes wurde die Reinigung mittels Alox (neutral, Akt.stufe III) gewählt. Das gewünschte Produkt wurde auch nach dreifacher chromatographischer Reinigung nicht rein isoliert. Das zugehörige ^{31}P -NMR-Spektrum ist in Abbildung 133 abgebildet.

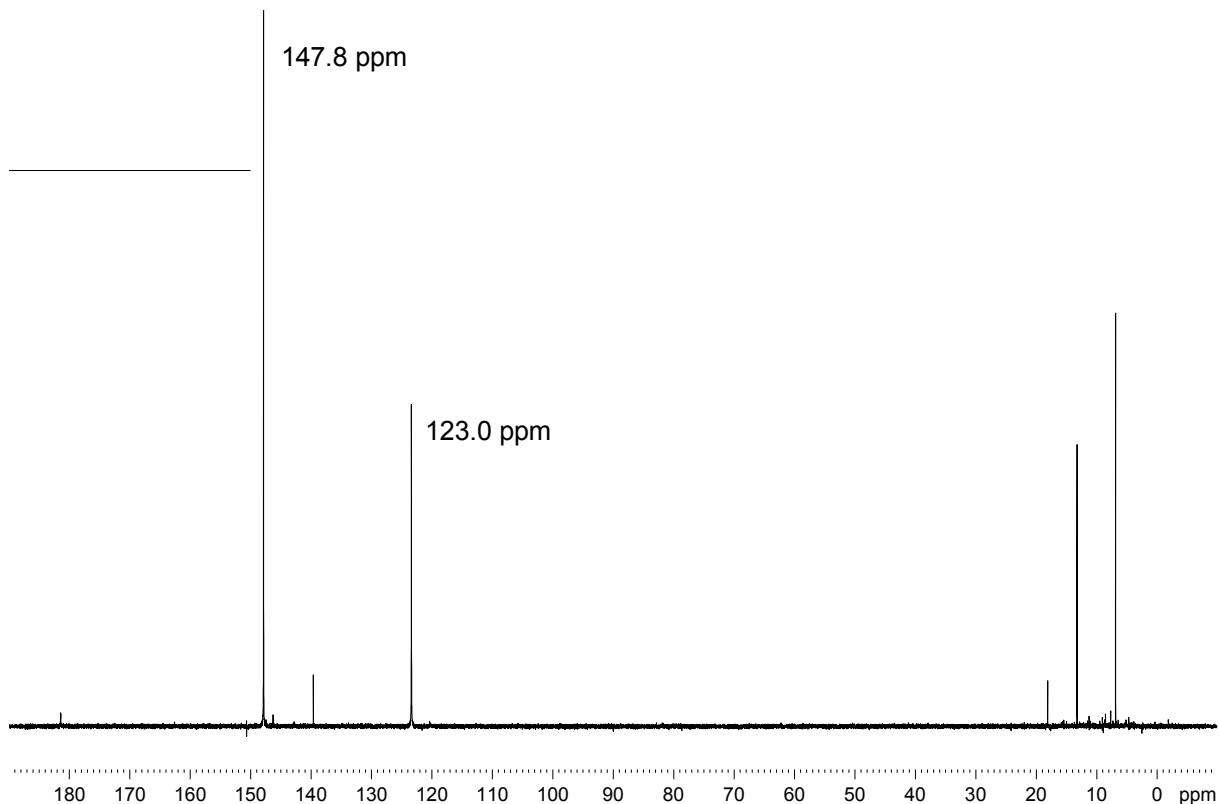


Abb. 133: ^{31}P -NMR-Spektrum des über Alox gereinigten Phosphoramidits **209** in Benzol- d_6

Wie in den vorherigen ^{31}P -NMR-Spektren konnte auch hier keine reine Verbindung isoliert werden. Da das Phosphoramidit **209** weniger Verunreinigungen aufwies als das Phosphoramidit **208** in der Syntheseroute zuvor, sollte die direkte Umsetzung mit dem DMTr-geschützten Nucleosid erfolgen (Abb. 134).

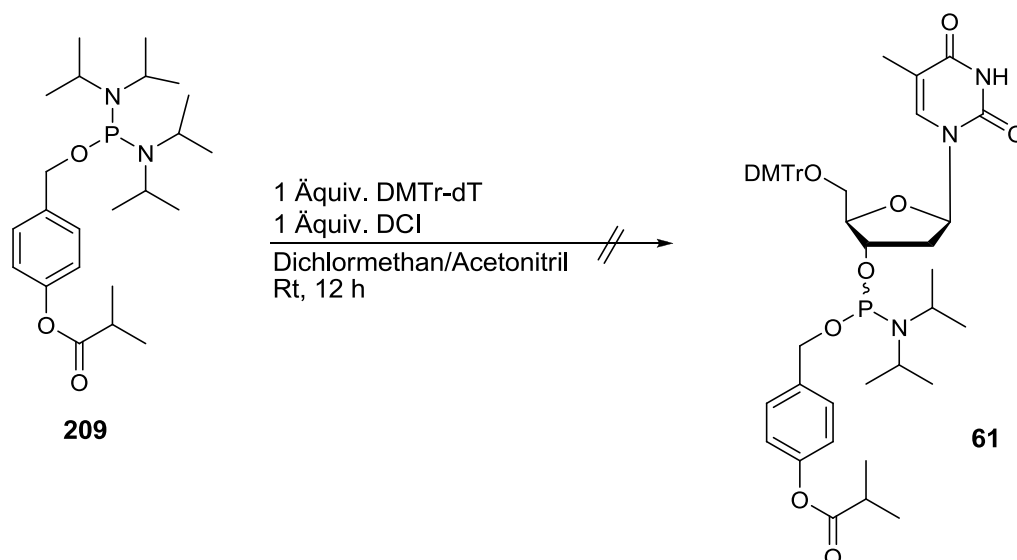


Abb. 134: Versuch der Synthese des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidinyl]-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidits **61**

Für die Umsetzung des Diisopropylaminphosphoramidits **209** mit dem DMTr-geschützten Nucleosid wurden die Standardbedingungen der C8-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite verwendet (vgl. Kapitel 4.1.4, S. 66). Nach einmaliger Reinigung des Rohproduktes über Alox (neutral, Akt.stufe III) wurde das in Abbildung 135 (S. 148) dargestellte ^{31}P -NMR-Spektrum erhalten.

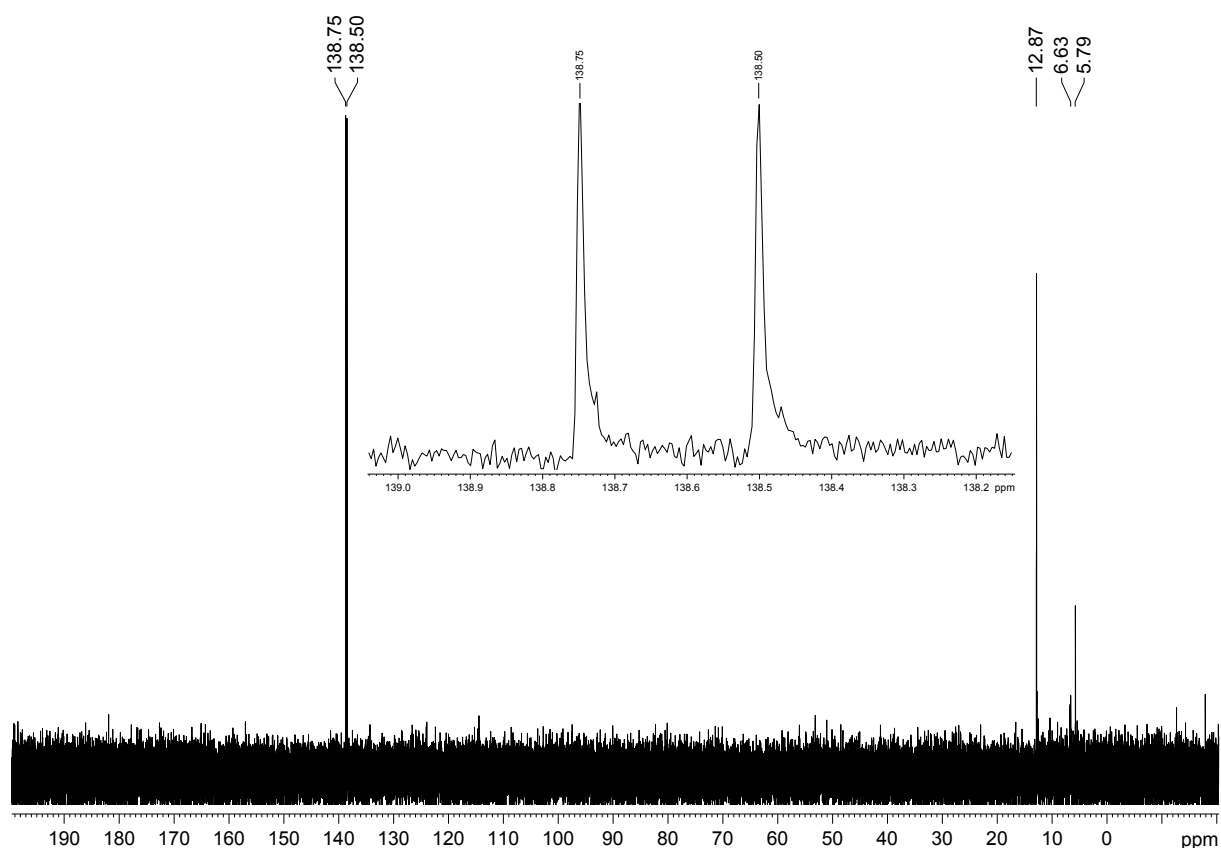


Abb. 135: ^{31}P -NMR-Spektrum des über Alox gereinigten Zielmoleküls **61** in Benzol- d_6

Anhand des hier dargestellten ^{31}P -NMR-Spektrums sind zwei Signale bei 138.8 ppm und bei 138.5 ppm sowie einige Zerfallsprodukte im Bereich von 0-15 ppm zu erkennen. Da diese beiden Signale bei 138 ppm möglicherweise das Produkt darstellen, dies jedoch anhand weiterer NMR-spektroskopischer Analysen nicht exakt nachgewiesen werden konnte, wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt (Abb. 136, S. 149). Die exakte Masse des Zielmoleküls **61** beträgt 867.39 g/mol.

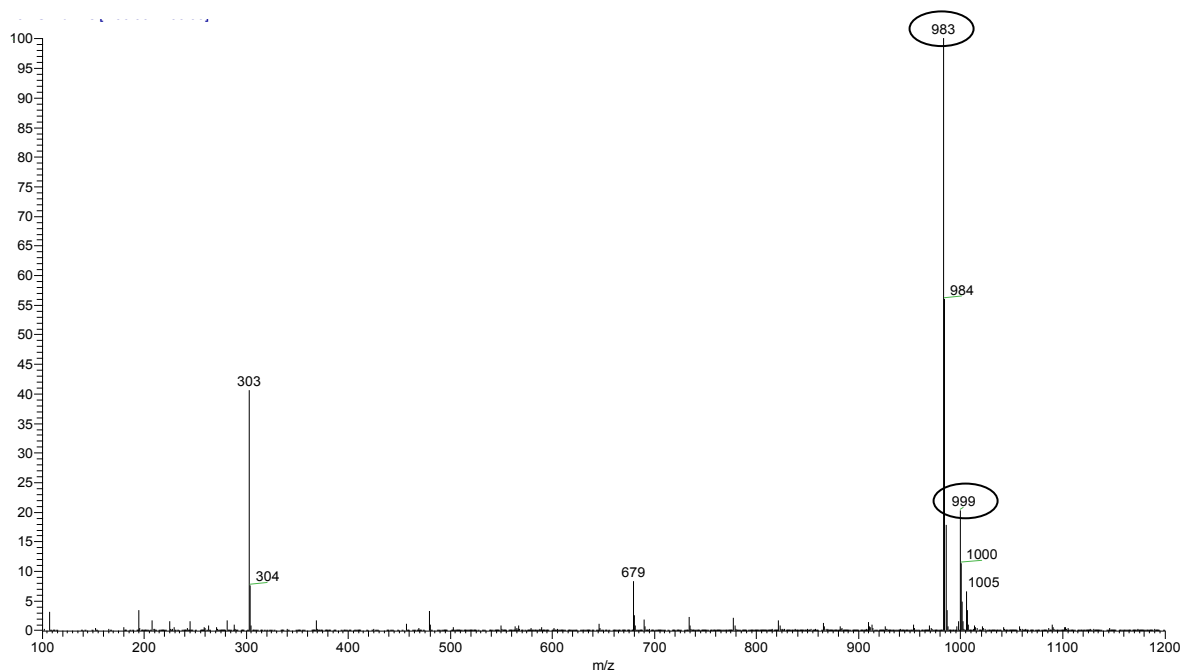
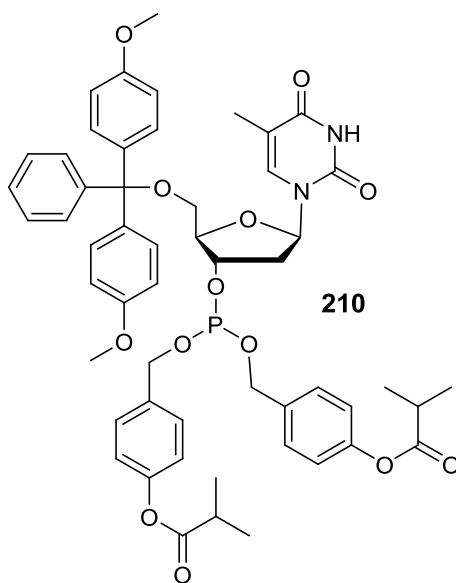


Abb. 136: ESI-Massenspektrum des möglichen Zielmoleküls **61**

Das abgebildete Massenspektrum weist bei 867 m/z jedoch kein Signal auf, dagegen ein Signal bei 983 m/z. Diesem Signal konnte basierend auf möglichen Nebenreaktionen das zweifach maskierte Phosphoramidit mit einer Masse von 960.36 g/mol plus Natrium (983 g/mol) und plus Kalium (999 g/mol) zugeordnet werden (Abb. 137).



210

exakte Masse: 960.3598

Abb. 137: zweifach geschütztes Phosphoramidit **210**

Route III

Der dritte Weg verlief analog zu den Darstellungen der C8-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite (Abb. 138).

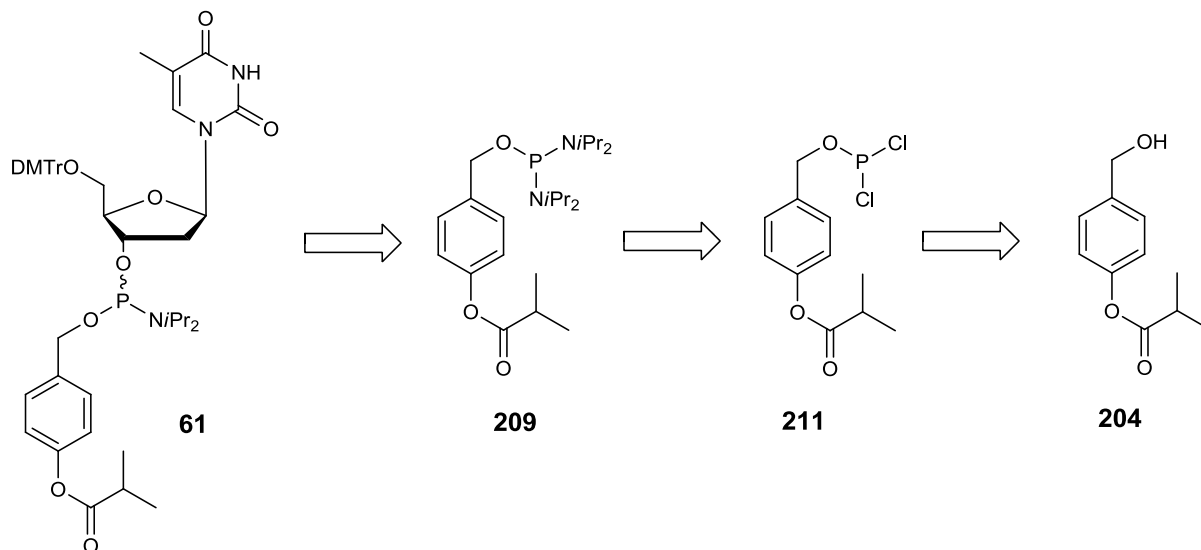


Abb. 138: Retrosynthese zur Darstellung des *iso*Butyryloxybenzyl-maskierten Phosphoramidits **61** über Route III

Zunächst wurde das Dichlorphosphoramidit **211** synthetisiert (Abb. 139).

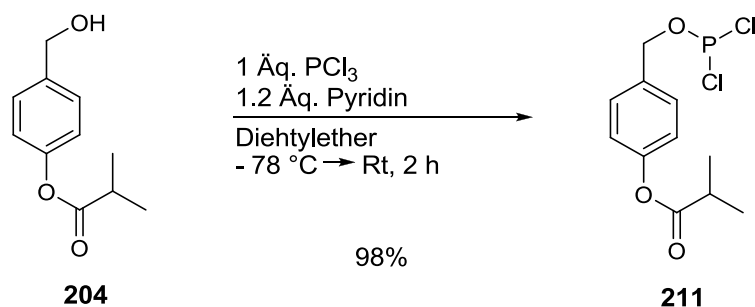


Abb. 139: Synthese des Dichlorphosphoramidits **211**

Der Benzylalkohol **204** wurde in Diethylether gelöst, mit Pyridin versetzt und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Phosphortrichlorid versetzt. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 98% erhalten werden.

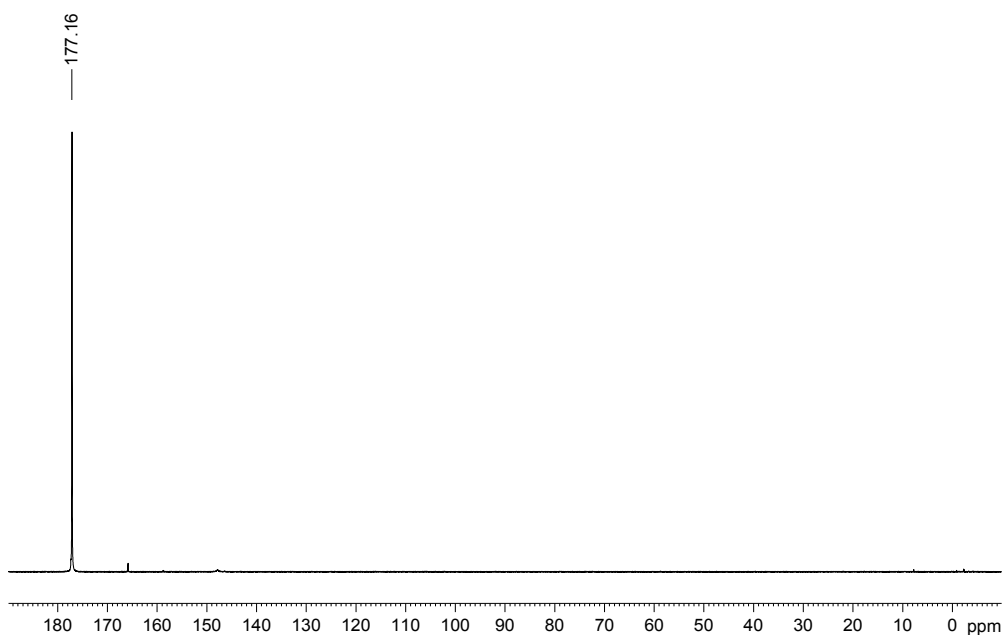


Abb. 140: ^{31}P -NMR-Spektrum des Dichlorphosphoramidits **211** in Benzol- d_6

Anhand des in Abbildung 140 gezeigten ^{31}P -NMR-Spektrums des Rohgemisches ist deutlich zu erkennen, dass das gewünschte Dichlorphosphoramidit **211** mit einem Signal bei 177.2 ppm gebildet wurde.

Somit konnte die Umsetzung zum 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **209** erfolgen (Abb. 141).

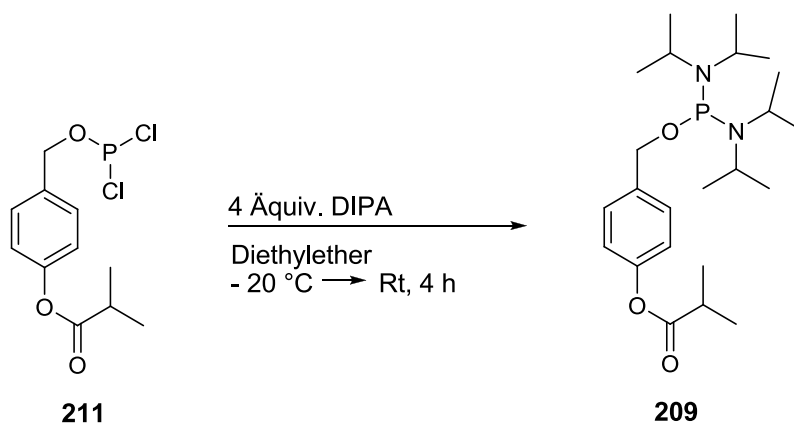


Abb. 141: Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidit **209**

Dazu wurde Dichlorphosphoramidit **211** in Diethylether gelöst, auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und mit vier Äquivalenten DIPA versetzt. In der folgenden Abbildung 142 (S. 152) ist das ^{31}P -NMR-Spektrum dargestellt.

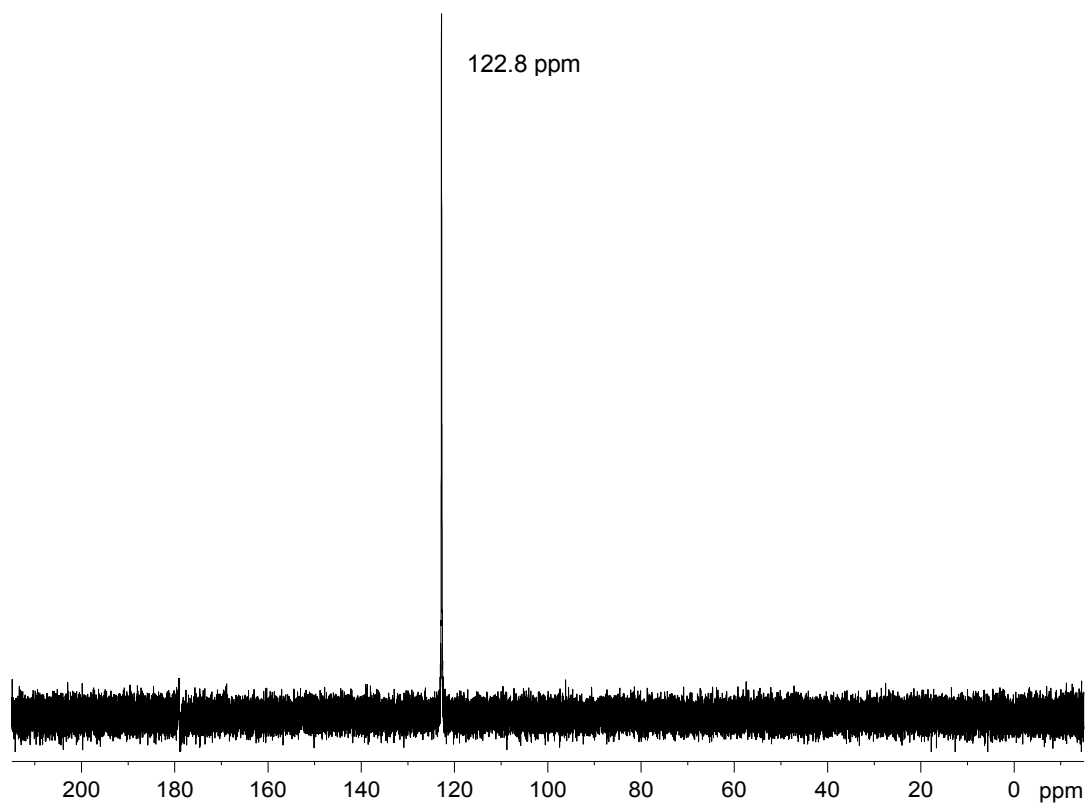


Abb. 142: ^{31}P -NMR-Spektrum des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidits **209** in Benzol- d_6

Das ^{31}P -NMR-Spektrum zeigt deutlich die quantitative Umsetzung des Dichlorphosphoramidits **211** zum Diisopropylaminphosphoramidit **209** mit einem Phosphorsignal bei 122.8 ppm.

Aufgrund der Reinheit der ^{31}P -NMR-Spektrum des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidits **209** erfolgte die direkte Umsetzung zur Zielverbindung **61** ohne weitere Aufarbeitung (Abb. 143, S. 153).

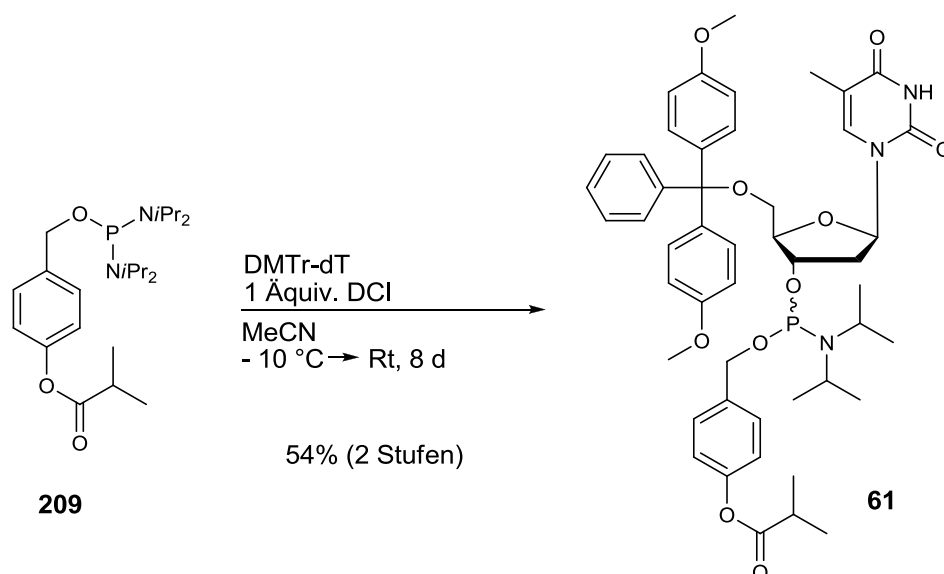


Abb. 143: Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidinyl]-*(N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **61**

Für die Phosphitylierung des Nucleosids wurde das Phosphoramidit **209** in Acetonitril gelöst. Gleichzeitig wurde das DMTr-geschützte Nucleosid ebenfalls in Acetonitril gelöst, mit DCI versetzt und auf - 10 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Phosphoramidits zum Nucleosid. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung für acht Tage gerührt. Dies ist sehr ungewöhnlich für diese Reaktion, da das mit DCI aktivierte Phosphoramidit im Allgemeinen sehr schnell mit dem Nucleosid reagiert. Eine Änderung der Reaktionsdauer konnte auch durch erneute Synthese des Zielmoleküls **61** nicht erreicht werden. Das Rohprodukt wurde über Alox (neutral, Akt.stufe III) säulenchromatographisch gereinigt und konnte mit einer Ausbeute von 54% über zwei Stufen erhalten werden. Im Folgenden sind die NMR-Spektren des Zielmoleküls **61** dargestellt.

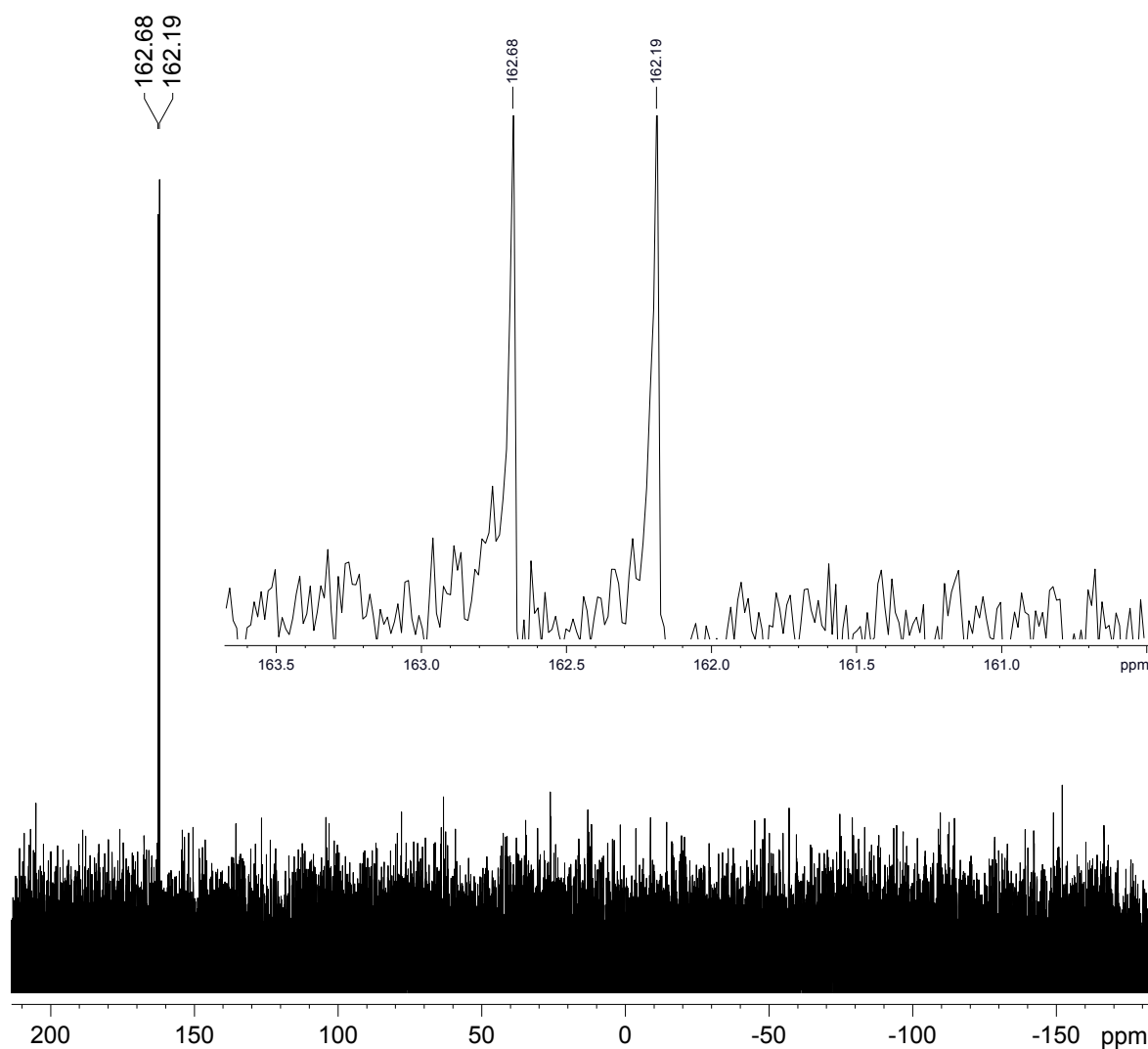


Abb. 144: ^{31}P -NMR-Spektrum der Zielverbindung **61** in Benzol- d_6

Aufgrund der vorliegenden Diastereomere sind in dem abgebildeten ^{31}P -NMR-Spektrum zwei Signale bei 162.7 ppm und 162.2 ppm zu erkennen (Abb. 144).

Mit Hilfe der Synthesebedingungen der C8-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Phosphoramidite konnte erstmals erfolgreich das 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidiny]-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **61** mit einer Gesamtausbeute von 53% über drei Stufen dargestellt werden. Um im Anschluss Untersuchungen bezüglich der Lipophilie und Enzymstabilität des Rückgrat-modifizierten Monomerbausteines **61** durchführen zu können, sollte dieses in ein Oligonucleotid der Sequenz 5'-d(TTT TTT)-3' eingebaut werden.

5.2 Synthese des modifizierten Oligonucleotides

Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte, wie in Kapitel 4.4 (S. 83) dargestellt, mittels Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode. Als Trägermaterial wurde neben dem kommerziell erhältlichen Succinyl-CPG-Träger auch ein synthetisierter Oxalyl-CPG-Träger verwendet.

Um die Synthese- und Abspaltungsbedingungen des modifizierten Oligonucleotids zu untersuchen, wurde die Synthese zunächst dahingehend vereinfacht, indem nur die Nucleobase Thymidin eingebaut wurde. In diesem Fall waren keine Schutzgruppen für den Heterocyclus notwendig. Dadurch reduzieren sich die Abspaltungsbedingungen deutlich von den zuvor verwendeten zwei Stunden bei 45 °C in Ammoniak und β -Mercaptoethanol, da sowohl die Reaktionszeit als auch die erhöhte Temperatur zur Abspaltung der Schutzgruppen der Nucleobasen notwendig sind. Somit sollte trotz der labilen *iso*Butyryloxybenzyl-Maske zunächst anhand des Standard-Succinyl-CPG-Trägers die Synthese des Oligonucleotids erfolgen.

Um die optimalen Abspaltungsbedingungen für das modifizierte Oligonucleotid **212** zu erhalten, wurden zunächst die pH-Werte verschiedener literaturbekannter Abspaltreagenzien getestet (Tab. 24).

Tab. 24: Testreihe zur Entschützung des modifizierten Oligonucleotids **212**

Spaltungsreagenzien	pH-Wert
NH ₃ (25% in Wasser)	12.79
NH ₃ /EtOH	12.80
0.05 M K ₂ CO ₃ in CH ₃ OH	12.97
5% DIPA in CH ₃ OH	11.88
Ethylendiamin-mix	> 14

Die Standardabspaltungsbedingungen nach *Zhou* sind in Ammoniak (25% in Wasser) und benötigen eine Stunde bei Raumtemperatur.^[152] Für diese Lösung wurde ein pH-Wert von 12.79 gemessen. Zusätzlich wurde eine von *Iyer* publizierte „*ultra-mild*“-Bedingung verwendet, in der das Roholigonucleotid für vier Stunden bei Raumtemperatur mit einer 0.05 M Kaliumcarbonat-Lösung in Methanol versetzt wurde.^[153] Diese Lösung besitzt einen pH-Wert von 12.97. Als letzte Variante wurde eine von *Gillet* und *Schärer* verwendete 5%-ige Lösung aus DIPA in Methanol über vier Stunden bei Raumtemperatur genutzt.^[60] Hier konnte ein pH-Wert von 11.88

gemessen werden. Der pH-Wert der Abspalllösung von *Amberg* wies einen pH-Wert von über 14 auf.^[154] Aufgrund der hohen Basizität wurden diese Bedingungen nicht getestet.

Um nun die optimalen Abspaltungsbedingungen für das modifizierte Oligonucleotid (5'-d(TTT TTT)-3') zu ermitteln, wurde dieses mittels automatisierter Festphasensynthese in einer Ausbeute (Trityl-Assay) von 72% dargestellt. Anschließend in fünf gleiche Proben unterteilt und unter den zuvor erwähnten Abspaltungsbedingungen inkubiert. In den nachfolgenden Rohchromatogrammen sind die Ergebnisse der verschiedenen Abspaltungsbedingungen dargestellt (Abb. 145).

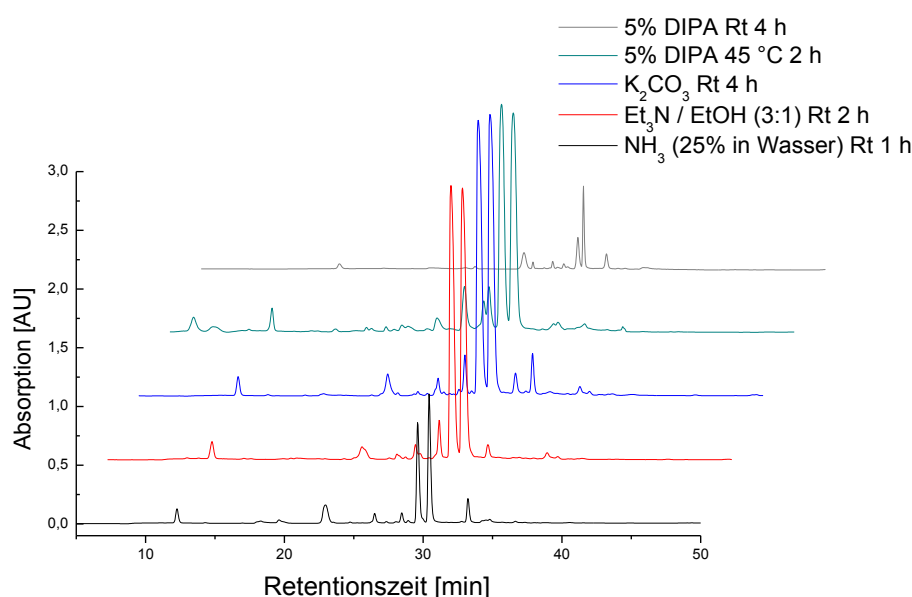


Abb. 145: Rohchromatogramme der Entschützungsversuche des modifizierten Oligonucleotids **212**

Insgesamt wurden für alle fünf Abspaltungsbedingungen vergleichbare Chromatogramme erhalten. In jedem Chromatogramm sind zwei große Signale bei etwa 30 Minuten zu erkennen, die möglicherweise dem modifizierten Oligonucleotid und dem Abbruchstrang (5mer unmodifiziert) bzw. dem unmodifizierten 6mer entsprechen könnten. Einzig bei der Variante mit DIPA über vier Stunden bei Raumtemperatur sind die Signale trotz gleicher Substanzmenge sehr schwach, was auf eine nicht vollständige Spaltung von der festen Phase hinweist. Um nun einen Nachweis der einzelnen isolierten Oligonucleotide zu erhalten, wurde eine weitere Probe der Entschützung durch Kaliumcarbonat mittels HPLC-MS analysiert und konnte den in folgender Abbildung dargestellten Oligonucleotiden zugeordnet werden (Abb. 146, S. 157).

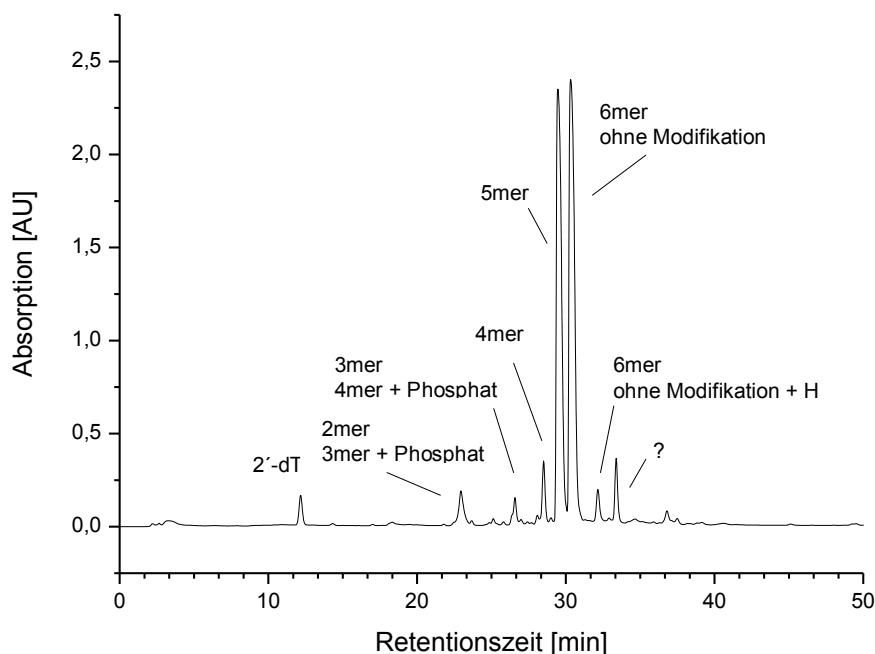


Abb. 146: Rohchromatogramm der Entschützung mittels Kaliumcarbonat des modifizierten Oligonucleotids **212**

Anhand des in Abbildung 146 dargestellten Rohchromatogramms konnten nahezu alle Signale einem Oligonucleotid zugeordnet werden. Die zwei großen Signale bei 29.8 min und 30.2 min konnten nicht dem gewünschten Produkt **212** zugeordnet werden, sondern dem 5mer (Abbruchstrang) und dem 6mer ohne Modifikation. Von den zwei kleinen Signalen bei 31.0 min und 32.5 min konnte das eine dem unmodifizierten 6mer Oligonucleotid plus einem Proton zugeordnet werden. Das Signal bei 32.5 min konnte nicht identifiziert werden. Unabhängig von dem nicht identifizierten Signal konnte das gewünschte modifizierte Oligonucleotid (5'-d(TTT TTT)-3') **212** unter den gewählten Abspaltungsbedingungen nicht isoliert werden.

Da der Succinyl-CPG-Träger unter den genannten Abspaltungsbedingungen zwar von dem Oligonucleotid getrennt werden konnte, gleichzeitig aber die Abspaltung der Maske erfolgte, wurde nach einem leichter abspaltbaren Linker gesucht. Dies entspricht dem von *Letsinger*^[155] 1991 publizierten Oxalyl-Linker, welcher innerhalb von fünf Minuten bei Raumtemperatur in Ammoniak spaltbar und in einer einzigen Reaktion zu synthetisieren ist (Abb. 147, S. 158).

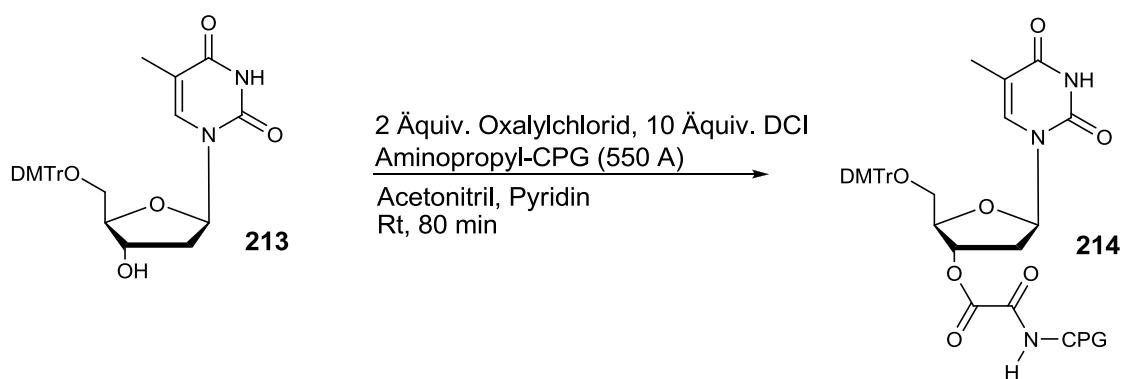


Abb. 147: Synthese des Oxalyl-CPG-gebundenen DMTr-dTs **214**

Hierzu wurde Dicyanoimidazol in Acetonitril gelöst und langsam mit Oxalylchlorid versetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus DMTr-dT **213** in Acetonitril/Pyridin zu dem Oxalylchlorid gegeben. Nach einer Stunde wurde die Lösung mit dem Aminopropyl-CPG-Träger (550 Å) versetzt. Nach 20-minütigem Rühren wurde das Reaktionsgemisch durch mehrere Waschschrirte gereinigt. Nach dem Trocknen des Trägers konnte mittels des Trityl-Assays (Kapitel 9.5.2, S. 184) eine Trägerbeladung von 44 $\mu\text{mol/g}$ ermittelt werden. Im Anschluss erfolgte die Synthese des unmodifizierten 6mer-Oligonucleotids (5'-d(TTT TTT)-3') um die optimalen Abspaltungsbedingungen zu ermitteln. Im ersten Schritt wurde die in der Literatur vorgegebene Zeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur getestet (Abb. 148, S. 159).^[155]

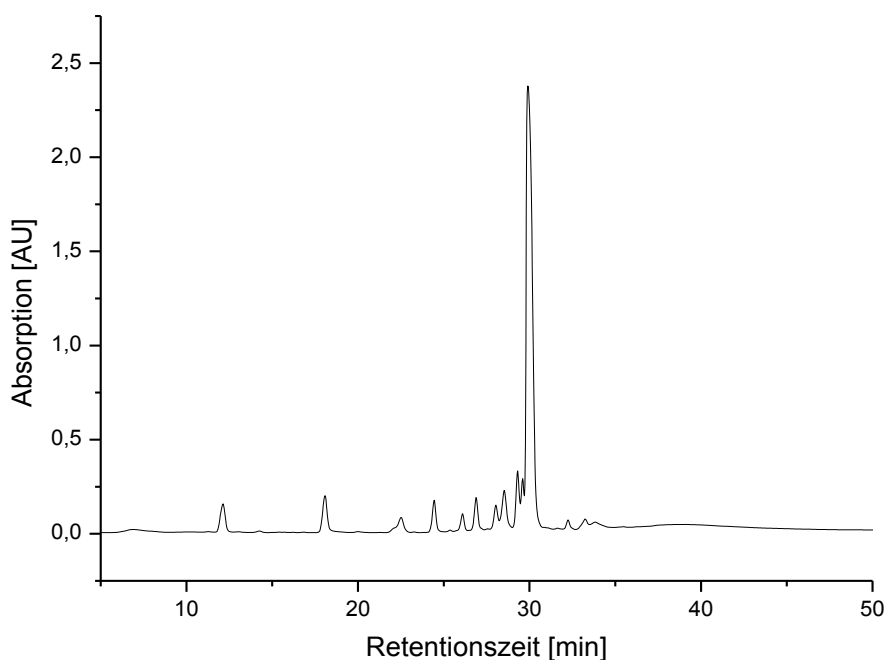


Abb. 148: Rohchromatogramm des unmodifizierten 6mer-Oligonucleotids **215** nach Abspaltung mittels Ammoniak innerhalb von 5 min vom Oxaly-CPG-Träger

Nach der Isolierung und massenspektrometrischer Analyse konnte dem Signal bei etwa 30 Minuten das unmodifizierte 6mer-Oligonucleotid zugeordnet werden. Somit ist eine Abspaltungszeit von fünf Minuten ausreichend, um das Oligonucleotid vom Oxaly-CPG-Träger zu spalten.

Als Nächstes erfolgte die Synthese des modifizierten Oligonucleotids, welches unter gleichen Bedingungen abgespalten werden sollte. Die Synthese des modifizierten Oligonucleotides **216** verlief mit einer Kupplungsausbeute von 54% und wurde im Anschluss mittels Ammoniak innerhalb von fünf Minuten bei Raumtemperatur gespalten. In der folgenden Abbildung ist das Rohchromatogramm dargestellt (Abb. 149, S. 160).

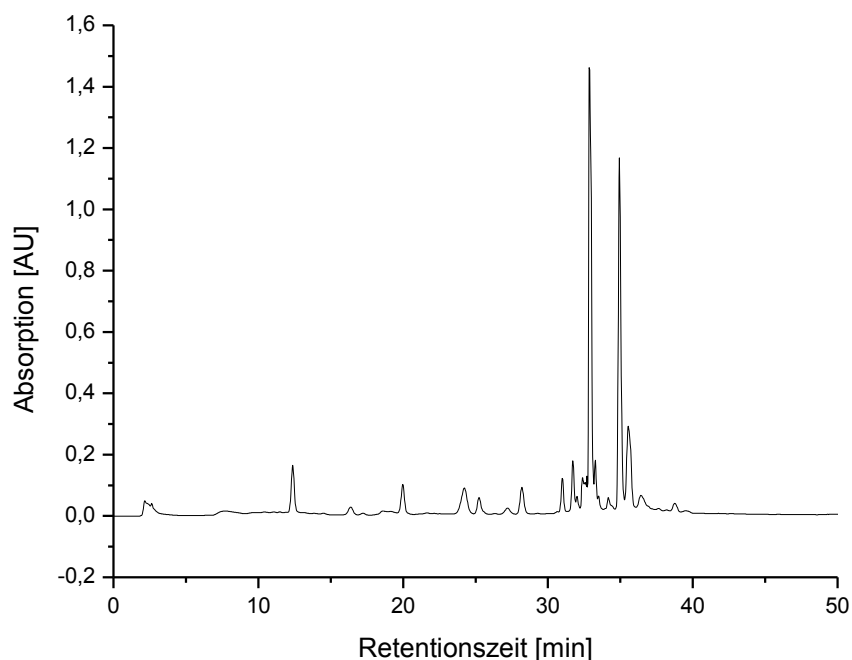


Abb. 149: Rohchromatogramm des modifizierten 6mer Oligonucleotids **216** nach Abspaltung mittels Ammoniak innerhalb von 5 min vom Oxaly-CPG-Träger

Nach Isolierung der einzelnen Signale und massenspektrometrischer Analyse wurde die gewünschte Masse nicht erhalten. Einzig die Masse des 5mer Oligonucleotides konnte jedem einzelnen der drei Hauptsignale (32.4 min, 35.0 min, 35.8 min) zugeordnet werden. Dieses Ergebnis ist fraglich, da die Signale verschiedene Retentionszeiten aufweisen und somit verschiedene Oligonucleotide darstellen müssten. Zur genauen Analyse der einzelnen Signale sollte auch hier eine HPLC-MS-Messung durchgeführt werden. Diese belegte jedoch nur die zuvor erhaltenen Ergebnisse, dass sowohl das große Signal bei etwa 32.4 Minuten als auch die beiden kleineren Signale bei etwa 35 Minuten dem 5mer Oligonucleotid zugeordnet werden konnten. Auch die Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie brachte keine Ergebnisse, was jedoch auf die Labilität der modifizierten Oligonucleotidsequenz zurückzuführen ist.

Um einen möglichen Beweis für die modifizierte Oligonucleotidsequenz zu erhalten, wurde das zuvor isolierte 6mer Oligonucleotid **215** (Abb. 148, S. 159) mit dem modifizierten Roholigonucleotid **216** coinjiziert (Abb. 150, S. 161).

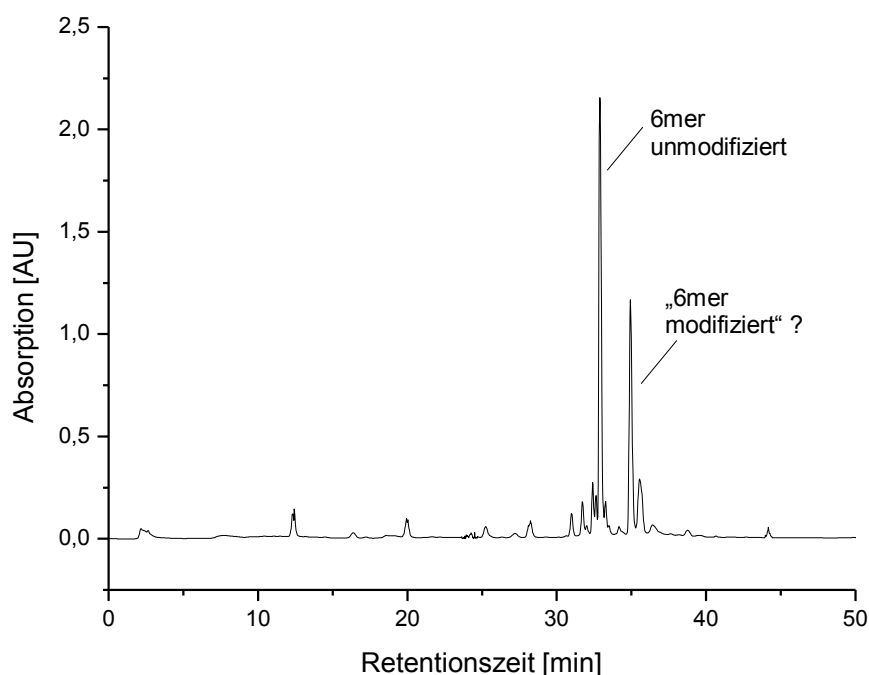


Abb. 150: Rohchromatogramm der Coinjektion des modifizierten 6mer-Oligonucleotids **216** mit dem unmodifizierten gereinigten 6mer Oligonucleotid **215**

Das in Abbildung 150 dargestellte Rohchromatogramm der Coinjektion des ungereinigten modifizierten 6mer Oligonucleotides **216** und des reinen unmodifizierten 6mer-Oligonucleotides **215** aus Abb. 148 (S. 159) zeigt eindeutig die Zunahme der Intensität des Signals bei einer Retentionszeit von 33 Minuten von 1.5 auf 2.3. Diese Zunahme gibt einen eindeutigen Hinweis darauf, dass das Signal dem unmodifizierten 6mer Oligonucleotid **215** zugeordnet werden kann, da die injizierte Menge des modifizierten Roholigonucleotids **216** konstant geblieben ist. Da in Abbildung 148 (S. 159) das 5mer-Oligonucleotid vor dem 6mer-Oligonucleotid **215** eluiert, ist dieses entgegen der massenspektrometrischen Analyse, in dem Chromatogramm der Coinjektion (Abb. 150) keinem Signal zuzuordnen. Somit muss es sich bei einem der beiden Signale bei einer Retentionszeit von 35 Minuten um ein modifiziertes 6mer-Oligonucleotid handeln. Ob es sich hierbei um die gewünschte Modifikation handelt, bleibt jedoch unklar, da eine eindeutige Zuordnung nicht durchgeführt werden konnte. Möglicherweise ist die Modifikation zu labil und wird mittels der bisher verwendeten Analysemethoden abgespalten. Somit sollte in zukünftigen Arbeiten eine analytische Identifikationsmethode etabliert werden.

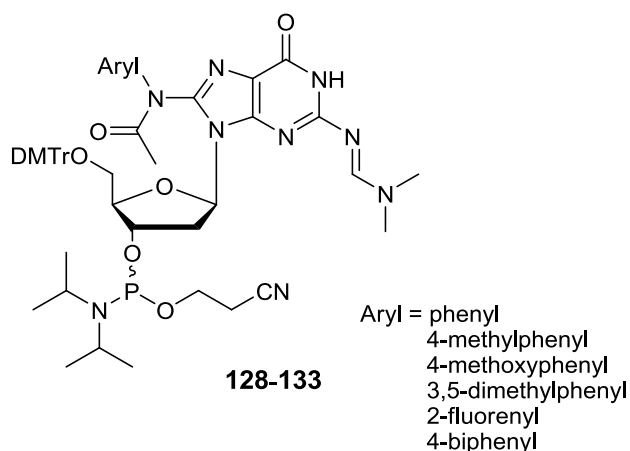
6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Kenntnisse über die Auswirkungen sequenzspezifisch in modifizierte Oligonucleotide eingebaute 2'-Desoxyguanosin Arylamin-Addukte zu erhalten.

Diese nach Metabolisierung unter Bildung von hochreaktiven Nitreniumionen umgewandelten Verbindungen reagieren mit den Nucleobasen der DNA und führen in unterschiedlichem Maße zur Bildung von Mutationen. Um die Auswirkungen solcher Modifikationen in DNA-Doppelsträngen untersuchen zu können, wurden zunächst die C8-NH- und C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Nucleosid-Addukte synthetisiert und anschließend in die entsprechenden Phosphoramidite überführt.

Als ein weiterer wesentlicher Teil dieser Arbeit sollten nach dem erfolgten Einbau der Phosphoramidite in ausgewählte DNA-Sequenzen, die Eigenschaften der modifizierten DNA-Duplices bestimmt und möglicherweise erste Informationen über den Einfluss mono- bzw. polycyclischer aromatischer Amine auf molekularer Ebene erhalten werden.

Zunächst wurde eine Optimierung der Synthese von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Addukten und deren anschließende Überführung in die modifizierten Phosphoramidite **128-133** vorgenommen. Hierbei wurde die exocyclische Aminofunktion der Base, zur Verkürzung der Schutzgruppenabspaltung nach der Oligonucleotidsynthese, mit einer möglichst basenlabilen Schutzgruppe versehen.



Nach der zweistufigen Synthese der Hydroxamsäuren **84-91** in Ausbeuten von 52-86% (S. 47) und der zweistufigen Synthese des 3',5'-Bis(TBDMS)-geschützten und O⁶-Benzotriazol-aktivierten Nucleosids **45**, mit einer sehr guten Ausbeute von 77% (S. 50), gelang die Einführung der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-Modifikation in C8-Position über eine einfache und höchst effektive Darstellungsmethode (S. 54). Im Anschluss erfolgte die Synthese der jeweiligen *N*-acetylierten Phosphoramidite für die

Oligonucleotidsynthese. Dafür wurden die geschützten Addukt **95-101** in einer weiteren Stufe vollständig entschützt. Aufgrund der basenlabilen Acetylgruppe erfolgte die Desilylierung nicht mehr wie bisher mit TBAF. Die Entschützung der 3'- und 5'-Positionen mittels TBAF/Essigsäure lieferte die entsprechenden Addukte in guten Ausbeuten von 69-96% (S. 60).

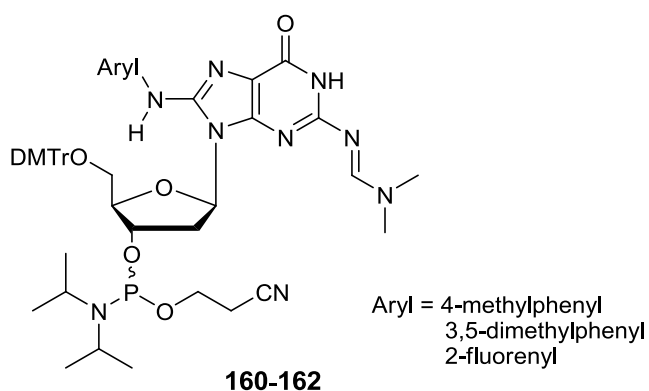
Dabei führten die entschützten Addukte **104-109** zu einer Konformationsänderung. Mit Hilfe von NOESY-NMR spektroskopischen Untersuchungen konnte die *syn*-Konformation der glycosidischen Bindung für alle C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-modifizierten Addukte **104-109** nachgewiesen werden. Diese wird aufgrund der neu eingeführten Acetylgruppe bevorzugt eingenommen, da eine Stabilisierung des Moleküls in der zuvor bevorzugten *anti*-Konformation nicht mehr gegeben scheint (S. 60). Die daraus resultierende Folge auf Oligonucleotidebene wäre, dass die acetylierte Base in den DNA-Duplex hinein ragt, mit den Nachbarbasen interkaliert und den Heterocyclus in die große Furche der B-DNA schiebt. Beim unacetylierten Addukt, welches in der *anti*-Konformation vorliegt, liegt der modifizierte Teil in der großen Furche und stört die Basenpaarung nicht. Diese Konformationsänderung sollte in zukünftigen Arbeiten anhand der durchgeführten Kristallisationsexperimente eindeutig nachgewiesen werden.

Für die Umsetzung zum gewünschten acetylierten Phosphoramidit erfolgte anschließend die Blockierung der exocyclischen Aminofunktion mit der Formamidin-Schutzgruppe und die primäre 5'-Hydroxygruppe mit der DMTr-Schutzgruppe. Abschließend konnten die geschützten Addukte **119-124** in die entsprechenden Phosphoramidite überführt, die Bausteine zur Oligonucleotidsynthese generiert und damit die allgemeine Anwendbarkeit dieser Syntheseroute belegt werden. Die Darstellung der C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Phosphoramidite **128-133** gelang mit Gesamtausbeuten von 17-42% über sieben Stufen und stellt somit eine effiziente neue Syntheseroute dar (S. 67).

Zur Darstellung der C8-NH-Arylamino-modifizierten Addukte **160-162** wurden die jeweiligen Modifikationen mittels einer Palladium-katalysierten Kreuzkupplung in die C8-Position eingeführt und anschließend in die Phosphoramidite überführt. Nach einer dreistufigen Synthese des geschützten und bromierten Bausteins **137** (S. 71) gelang die Einführung der C8-Arylamino-Modifikation mittels einer Buchwald-Hartwig-Kupplung in Ausbeuten von 37-64% (S. 78). Die geschützten Addukte **145-147**

konnten in zwei Stufen vollständig entschützt und anschließend die exocyclische Aminofunktion mit der Formamidin-Schutzgruppe blockiert werden (S. 80).

Dabei führten die Addukte **154-156** im Vergleich zu den acetylierten zur bevorzugten *anti*-Konformation, wie



durch NOESY-NMR-spektroskopischen Untersuchungen belegt werden konnte (S. 60). Abschließend wurden diese Addukte über zwei weitere Stufen in die entsprechenden Phosphoramidite **160-162** überführt (S. 82).

Mit den C8-NH- und C8-(N-Acetyl)-arylamin-modifizierten Phosphoramiditen **128-133** und **160-162** wurden unter Verwendung eines modifizierten Standard-Syntheseprotokolls (s. Anhang, S. 298) verschiedene dG-„geschädigte“ Oligonucleotide synthetisiert (S. 83). Durch die Blockierung der exocyclischen Aminofunktion mit der Formamidin-Schutzgruppe konnten verkürzte Abspaltzeiten von zwei Stunden bei 45 °C mit Ammoniak und β -Mercaptoethanol verwendet und somit die Abspaltung der Acetylgruppe vollständig verhindert werden (S. 90).

Bei den Oligonucleotidsequenzen handelte es sich zum Einen um die *Narl*-Sequenz (5'-d(CTC **G**GC **G**CC ATC)-3'), einem Hotspot für Arylamin-Modifikationen. Hier konnten die C8-(N-Acetyl)-arylamin modifizierten Phosphoramidite **128-133** und **160-162** erfolgreich in Position 4 und 7 eingebaut und anhand von Schmelzpunktexperimenten sowie CD-spektroskopischen Untersuchungen deren Einfluss auf das Hybridisierungsverhalten und die Konformation der entstehenden DNA-Helix ermittelt werden. Dabei bleibt als Ergebnis festzuhalten, dass die acetylierten Addukte **172** (AcAn mod 4), **174** (AcAf mod 4), **176** (AcAn mod 7) und **178** (AcAf mod 7) einen großen Einfluss auf den T_m -Wert haben und zu einer deutlichen Senkung und somit Destabilisierung des Duplex führen. Interessanterweise senkt das monocyclisch-modifizierte Oligonucleotid der C8-(N-Acetyl)-phenyl-Modifikation **172** den T_m -Wert um bis zu 16 °C im Vergleich zum Referenzstrang **171** (S. 93). Ein Einfluss einer Modifikation auf die Konformation konnte in keinem Fall beobachtet werden (S. 103). Als weitere Sequenz wurde das selbstkomplementäre 12mer-Oligonucleotid 5'-d(GTA GAA TTC TTC)-3' gewählt. Dieses besitzt eine Erkennungssequenz

(5'-d(GAA TTC)-3') für die Endonuclease *EcoRI*. Hier wurden die C8-(*N*-Acetyl)-arylamino modifizierten Phosphoramidite **128-133** erfolgreich in Position 1 und 4 eingebaut. Aus den Untersuchungen ging hervor, dass im Vergleich zu den unacetylierten Addukten, die C8-(*N*-Acetyl)-arylamino Modifikationen in Position 4 einen größeren Einfluss auf die Schmelztemperatur haben (S. 95). So war in keinem Fall ein T_m -Wert oberhalb von 14 °C zu beobachten. Ebenso konnte bei den in Position 1 modifizierten Oligonucleotiden ein größerer Einfluss auf den T_m -Wert, ausgehend von den acetylierten Addukten im Vergleich zu den unacetylierten, beobachtet werden (S. 98). Ein Einfluss auf die Konformation war jedoch erneut nicht zu erkennen. Zusätzlich zu dem Einfluss auf den T_m -Wert und die Konformation wurden die Auswirkungen auf die Aktivität des Restriktionsenzym *EcoRI* durch einen entsprechenden Abbau untersucht. Eine Modifikation direkt an der Schnittstelle führte zu einer vollständigen Inaktivierung des *EcoRI*-Enzyms. Dieses ist, aufgrund der eingeführten Modifikation, nicht mehr in der Lage an seine Erkennungsstelle zu binden und den Strang zu spalten. Dagegen hat eine Modifikation außerhalb der Schnittstelle eine Senkung der Enzym-Aktivität zur Folge. Bei den C8-NH-arylamino Modifikationen konnte der größte Einfluss auf die Enzym-Aktivität bei den monocyclischen Arylamino-Modifikationen festgestellt werden. Hier lag eine Verminderung dieser um vier Stunden im Vergleich zum Abbau des unmodifizierten Oligonucleotids ($\tau_{1/2} = 2.5$ h) vor. Dagegen liegt die Verminderung der Enzym-Aktivität der polycyclischen C8-NH-4-Biphenyl Modifikation bei 0.9 Stunden. Überraschenderweise ist der Einfluss der C8-(*N*-Acetyl)-arylamino modifizierten Oligonucleotide genau umgekehrt. Hier konnte der größte Einfluss auf die Enzym-Aktivität bei den polycyclischen Modifikationen festgestellt werden. Dieser lag bei dem C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-Oligonucleotid **189** bei einer Halbwertszeit von 4.4 Stunden und bei dem C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-Oligonucleotid **193** bei 5.6 Stunden (S. 115).

Zur Klärung der Auswirkungen von C8-NH- und C8-(*N*-Acetyl)-arylamino Modifikationen auf die Funktion verschiedener Polymerasen wurden modifizierte 20mer-Oligonucleotide mit der Sequenz 5'-d(ACA TGA GCA TCT ACG ACG CG)-3' synthetisiert und als Template in Primer-Verlängerungs-Untersuchungen mit verschiedenen Polymerasen (*Pfu*, *FIREPol*[®], *Pol β* und *Klenow exo*) eingesetzt (S. 116). Als Ergebnis dieser Untersuchungen lässt sich festhalten, dass die C8-

DNA-Addukte starker Carcinogene bei diesen Versuchen eine geringere Rate an Fehleinbauten besitzen als die monocyclischen DNA-Schäden. So findet hier für die monocyclischen Modifikationen neben dem kanonischen Einbau von dCTP mit derselben Häufigkeit auch der nicht-kanonische Einbau von dTTP und dATP statt. Somit scheinen auch in diesen Fällen die monocyclischen Modifikationen einen höheren Einfluss auf die Enzyme zu haben.

Abschließend konnten erstmals strukturelle Informationen mittels Kristallisation der *NarI*-Sequenz erhalten werden. Die Kristalle des unmodifizierten 12mer-Oligonucleotids wurden nach zwei Wochen aus einem 1:1 Gemisch der DNA und dem *Nucleic Acid Mini Screen* Nummer 3 (Anhang S. 302) nach Äquilibrierung gegen 500 µL 35% (v/v) MPD in Linbro-Platten bei 4 °C erhalten. Als Ergebnis ist hier festzuhalten, dass das unmodifizierte Oligonucleotid eine A-DNA-Konformation aufweist (S. 134). Weitere vielversprechende Ansätze zur Kristallisation der modifizierten 12mer- und 20mer-Oligonucleotide waren bei der Beendigung dieser Arbeit nicht abgeschlossen und werden an anderer Stelle publiziert.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit wichtige Anhaltspunkte bezüglich der Auswirkungen mono- und polycyclischer aromatischer Amine auf Oligonucleotidebene ermittelt werden. So haben monocyclische C8-(*N*-Acetyl)-arylamino Modifikationen einen stärkeren Einfluss auf die Schmelztemperatur und auf enzymatische Aktivitäten als die polycyclischen Modifikationen. Dieser Einfluss führt möglicherweise zu einer schnelleren Erkennung einer solchen Läsion und damit zu einer schnelleren Reparatur, als dieses für polycyclische Derivate der Fall ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zusätzlich Rückgrat-modifizierte Oligonucleotide synthetisiert, um somit den Zugang zu Pro-Oligonucleotiden zu ermöglichen. Durch Substitution des negativ geladenen Oligonucleotid-Phosphatrückgrats mit einem lipophilen Rest sollte die passive Zellaufnahme durch Membrandiffusion verbessert und die Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau erhöht werden. Diese Modifikation ist nur temporär stabil, so dass sie nach einer definierten Halbwertszeit vom Oligonucleotid gespalten wird und dieses als Antisense-Oligonucleotid wirken kann. Für die Synthese solcher Rückgrat-modifizierter Oligonucleotide wurde zunächst die *iso*Butyryloxybenzyl-Gruppe eingeführt, da diese nach erfolgreicher Synthese der Zielverbindung flexibel im Hinblick auf weiterführende Modifikationen zur Einstellung der Lipophilie und Enzymstabilität ist.

Hierzu wurde erstmals eine geeignete Syntheseroute zur Darstellung des *iso*Butyryloxybenzyl-modifizierten 2'-Desoxythymidinphosphoramidits **61** entwickelt. Die optimale Darstellung des Zielmoleküls **61** gelang hierbei über das 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **209**, welches zuvor in drei Stufen aus 4-Hydroxybenzylalkohol **205** synthetisiert wurde (S. 151). Vorteile dieser Darstellung waren die im Vergleich zu anderen Synthesewegen geringen Neben- und Zerfallsprodukte, so dass sich eine Reinigung der Zwischenprodukte als unnötig herausstellte. Die Umsetzung zum *iso*Butyryloxybenzyl-modifizierten 2'-Desoxythymidinphosphoramidit **61** konnte anschließend mit einer Gesamtausbeute von 53% über vier Stufen erzielt werden (S. 153).

Nach einem abgewandelten Syntheseprotokoll (s. Anhang, S. 298), wurde das am Phosphatrückgrat-modifizierte Phosphoramidit **61** in ein Oligonucleotid der Sequenz 5'-d(TTT TTT)-3' **212** eingebaut. Hierbei wurde zunächst der Standard-CPG-Träger verwendet. Unter den angewendeten Abspaltungsbedingungen wurde, aufgrund der Labilität der Modifikation, nicht das gewünschte Produkt **212**, sondern das unmodifizierte 6mer-Oligonucleotid isoliert (S. 157). Daher wurde die Synthese unter Verwendung eines leichter abspaltbaren Trägers, dem Oxalyl-Linker, wiederholt (S. 158). Allerdings konnte auch hier keines der bei der Reinigung erhaltenen drei Signale mittels massenspektrometrischer Analyse dem modifizierten 6mer-Oligonucleotid zugeordnet werden (S. 160). Zur Analyse des Rohchromatogrammes wurde eine Coinjektion des Roh-Oligonucleotides mit dem gereinigten unmodifizierten 6mer-Oligonucleotid durchgeführt. Anhand des Chromatogrammes konnte das unmodifizierte 6mer-Oligonucleotid eindeutig nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden noch zwei weitere Signale bei späteren Retentionszeiten detektiert (S. 161). Da kürzere Oligonucleotide vor dem 6mer-Oligonucleotid eluieren, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um das *iso*Butyryloxybenzyl-modifizierte Oligonucleotid **216** handelt. Für einen eindeutigen Nachweis müsste in zukünftigen Arbeiten eine Methode zur Charakterisierung der modifizierten Oligonucleotide etabliert werden.

7. Summary

Poly- and monocyclic aromatic amines belong to the class of chemical carcinogens that form covalently bonded adducts with DNA after metabolic activation. If these damages are not repaired, they can compromise the fidelity of DNA replication and cause mutations and possibly cancer. Until now no reason has been found for their different carcinogenic potential. The predominant site of reaction is the C8-position of 2'-deoxyguanosine **40**. To properly study the biochemical effect and the structure of these DNA-adducts, it was the aim of this thesis, to develop strategies for the site-specific incorporation of these dG-carcinogen-adducts into oligonucleotides.

To determine the effects of the C8-NH- and C8-(N-acetyl)-arylamine-adducts, they were synthesized first and then transformed into phosphoramidites. The first part of this work deals with the synthetic pathway to the acetylated 2'-dG phosphoramidites. The primary goal was to achieve an optimization of the synthesis of C8-(N-acetyl)-adducts to shorten the period of time for the alkaline cleavage after oligonucleotide synthesis using a base labile protecting group for the exocyclic amino function of 2'-dG. The key step for this synthesis was the O⁶-benzotriazol activated 2'-dG coupling with the corresponding hydroxamic acid (see page 54). After the complete deprotection of the TBDMS-groups the formamidine group was introduced to block the exocyclic amino function. After that compounds **110-115** were converted into the corresponding oligonucleotide building blocks **128-133** by dimethoxytritylation and phosphitylation. The complete synthesis of these adducts took seven steps with an overall yield of 17-42%.

The second part of this work is concerned with the synthesis of the C8-NH-arylamine 2'-dG phosphoramidites. The key step was the Pd-catalyzed Buchwald-Hartwig cross-coupling (see page 78). After the complete deprotection of these adducts **151-153** the formamidine group was introduced to block the exocyclic amino function. Finally, compounds **154-156** were converted into the corresponding phosphoramidites **160-162** by dimethoxytritylation and phosphitylation (see page 82). The C8-NH- and C8-(N-acetyl)-arylamine-modified phosphoramidites **128-133** and **160-162** were incorporated into three different oligonucleotide sequences.

First, the *NarI*-sequence with a modification in position 4 or 7 5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3', and a self complementary sequence with a recognition site for the *EcoRI* enzyme 5'-d(GTA GAA TTC TAC)-3' were used to investigate the effects of the modification on hybridization and structure of the resulting DNA-helices. The result of these CD- and T_m -value studies was that no difference in structure was observed, but a higher decrease of the monocyclic modifications of the T_m -value.

Using the oligonucleotides of the *EcoRI*-sequence a restriction assay was performed. As a result, a total prevention of the 12mer-oligonucleotide was achieved by modifying the dG-nucleotide at the cleavage site. If the modification was outside the recognition sequence a higher influence for the C8-polycyclic-adducted oligonucleotides than for the monocyclic-modified one was observed, leading to a higher half-life (see page 115). To study the influence of C8-NH- and C8-(*N*-acetyl)-arylamine adducts on the effectiveness of DNA-polymerases, oligonucleotides of the following sequence were synthesized 5'-d(ACA TGA GCA TCT ACG ACG CG)-3' and used as templates in primer-extension experiments. Four different polymerases were used, *Pfu*, *FIREPol*[®], *KF exo*⁻ and *Pol β* (see page 116). The primer-extension experiments with the modified oligonucleotides revealed differences between the four polymerases and between the modifications. The most important result was that there was a much more significant misinsertion of nucleotides for the monocyclic, acetylated modification (dATP instead of dCTP) opposite the modified base. This effect was also observed for the strong carcinogen adducts, however, it was very small in comparison.

First experiments for the crystallization of the oligonucleotide were performed to gain information about the structure of modified oligonucleotides. The first obtained three dimensional structure of the *NarI* dodecamer DNA presented here is unique and showed an A-DNA conformation (see page 134). Promising experiments for the crystallization of the modified 12mer and 20mer sequences are currently underway in our laboratories and were not terminated when this thesis was finished.

8. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe modifizierter Oligonucleotide mit verschiedenen Addukten unterschiedlich starker Carcinogene synthetisiert und sowohl strukturell, als auch molekularbiologisch untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse geben erste Hinweise auf die mögliche Ursache der unterschiedlichen Carcinogenitäten mono- bzw. polycyclischer acetylierter und unacetylierter Arylamine durch deren unterschiedlicher Interaktion mit verschiedenen Enzymen. Dabei scheinen diese Wechselwirkungen nicht nur abhängig von der Art des aromatischen Systems, sondern auch von der Art der Modifikation zu sein. Um weitere Informationen hierüber zu erhalten, ist es nötig, neben zusätzlichen acetylierten Modifikationen (z.B. Nitrophenol und 2-Nitro-3-methyl-imidazo[4,5-f]chinolin) auch einen geeigneten Syntheseweg zur Darstellung der acetylierten O^6 -Addukte zu finden. Da diese nicht über die in dieser Arbeit verwendete Benzotriazol-aktivierten Route zugänglich sind, wäre eine alternative Darstellung über eine Buchwald-Hartwig-Reaktion mit anschließender Acetylierung möglich (Abb. 151).

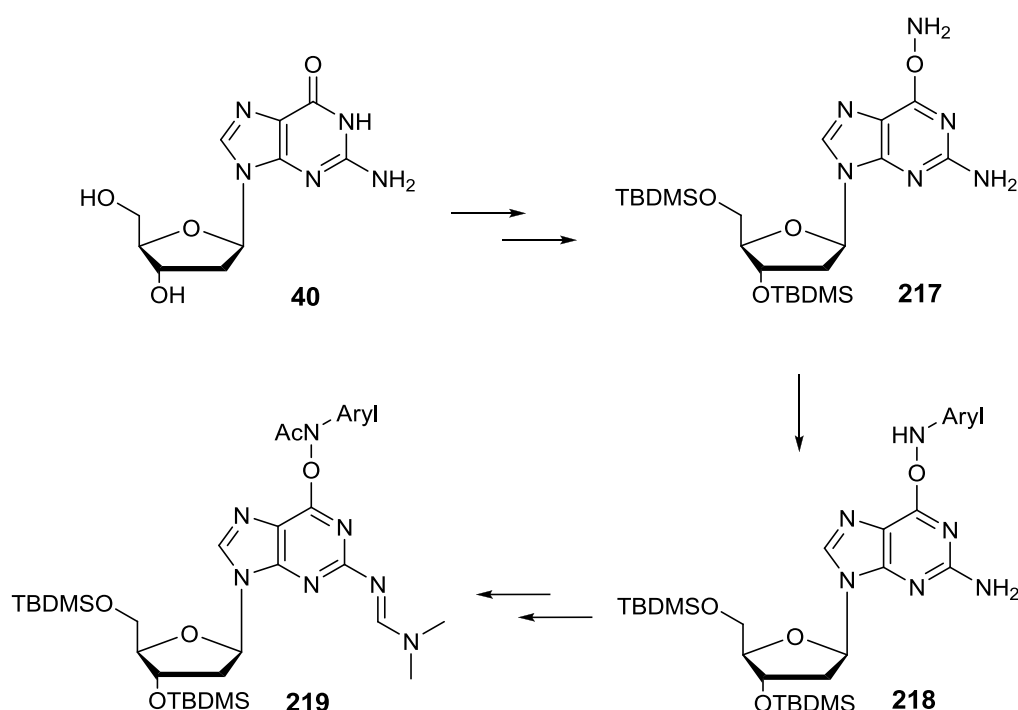


Abb. 151: mögliche Syntheseroute zur Darstellung der O^6 -Acetylarlylamin-Addukte

Außer der Synthese modifizierter Phosphoramidite sollte in folgenden Arbeiten das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung der Eigenschaften modifizierter Oligonucleotide gelegt werden. Hierbei sollte neben den bereits in dieser Arbeit angewandten Methoden (T_m -Wert, CD, Restriktionsabbau, Polymerase-Untersuchungen) auch die Untersuchung in Repair-Assays möglich gemacht werden, um Aussagen über die Resistenz der unterschiedlichen Modifikationen gegenüber den Reparaturmechanismen der Zelle machen zu können.^[156]

Eine weitere Möglichkeit, Informationen bezüglich des Verhaltens von C8-dG-Addukten in biologischen Systemen zu erhalten, könnte beispielsweise die Einführung von C8-dG-Addukten an der Schnittstelle der Topoisomerase I (top I) sein. Topoisomerasen sind zusammen mit Helikasen dafür verantwortlich, dass die DNA nach der Verdopplung wieder funktionsfähig wird. Wird beispielsweise die Topoisomerase I blockiert, so ist eine geordnete Weitergabe genetischer Informationen für die betroffenen Zellen nicht mehr möglich. Topoisomerase-Hemmer wie z.B. Camptothecin werden in der Krebstherapie verwendet und können DNA-Brüche und den damit verbundenen programmierten Zelltod auslösen.^[157]

Auch die in dieser Arbeit begonnene Kristallisation der modifizierten Oligonucleotide sollte in folgenden Arbeiten weitergeführt werden, um die Auswirkungen der Modifikationen auf die Basenpaarung näher zu untersuchen.

Anhand der in einem zweiten Teil dieser Arbeit dargestellten alternativen Synthesemöglichkeit von *iso*Butyryloxybenzyl-modifizierten 2'-Desoxythymidinphosphoramiditen **61** wurde die Grundlage für die Synthese Rückgrat-modifizierter Phosphoramiditen geschaffen. In weiteren Arbeiten sollte die Optimierung der Abspaltbedingungen des hier dargestellten Einbaus des Phosphoramidites in Oligonucleotide und die Etablierung einer analytischen Identifikationsmethode um eine anschließende Anwendung auf literaturbekannte Antisense-Sequenzen ermöglicht werden.

Experimenteller Teil

9. Allgemeines

9.1 Lösungsmittel

- Acetonitril: C_2H_3N [41.05]; Sdp.: 81-82 °C; $d = 0.78$
- puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O : 0.001%; Fluka Nr. 0069
 - zur Synthese; Merck Nr. 800015
 - technische Qualität; über Calciumhydrid getrocknet und bei Normaldruck destilliert
- Dichlormethan: CH_2Cl_2 [84.93]; Sdp.: 39-40 °C; $d = 1.33$
- puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O : 50 ppm; Fluka Nr. 66749
 - technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert
- Diethylether: $C_4H_{10}O$ [74.12]; Sdp.: 35 °C, $d = 0.87$
- technische Qualität; über Kalium getrocknet und bei Normaldruck destilliert
- 1,2-Dimethoxyethan: $C_4H_{10}O_2$ [90.12]; Sdp.: 84-86 °C; $d = 0.87$
- technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert
- N,N*-Dimethylformamid: $C_3H_7N_1O_1$ [73.09]; Sdp.: 153 °C; $d = 0.94$
- puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O : 0.001%; Fluka Nr. 40248
- 1,4-Dioxan: $C_4H_8O_2$ [88.11]; Sdp.: 101 °C; $d = 1.03$
- technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert
- Essigsäureethylester: $C_4H_8O_2$ [88.11]; Sdp.: 77 °C; $d = 0.90$
- technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert

- n*-Hexan: C_6H_{14} [86.17]; Sdp.: 69 °C; $d = 0.65$
a) technische Qualität; über Normaldruck destilliert
- Methanol: CH_4O [32.04]; Sdp.: 64 °C; $d = 0.79$
a) puriss. Absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 65542
b) technische Qualität; über Normaldruck destilliert
- Petrolether (50-70): Sdp.: 50 - 70 °C
a) technische Qualität; über Normaldruck destilliert
- Pyridin: $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ [79.10]; Sdp.: 115 °C; $d = 0.98$
a) puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O : 50 ppm; Fluka Nr. 82704
b) technische Qualität; über Calciumhydriddispersion getrocknet und bei Normaldruck destilliert
- Tetrahydrofuran: $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ [72.11]; Sdp.: 65-66 °C; $d = 0.89$
a) puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O : 50 ppm; Fluka Nr. 87371
b) technische Qualität; über Kalium getrocknet und bei Normaldruck destilliert
- Toluol: C_7H_8 [92.14]; Sdp.: 110 °C; $d = 0.99$
a) technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert
- Triethylamin: $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ [101.2]; Sdp.: 89 °C; $d = 0.72$
a) technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert

9.2 Reagenzien und Enzyme

Alle Edukte und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Acros, Aldrich, Fluka und Riedel de Hæn in Synthesequalität bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. 2'-Desoxyguanosin sowie 2'-Desoxythymidin wurden von ChemGenes, USA, und die Reagenzien für den DNA Synthesizer von Proligo bezogen.

Acetylchlorid: C_2H_3ClO [78.49], Sdp.: 52 °C, Merck Nr. 8222521000, unter Inertgas destilliert

Benzoylchlorid: C_6H_5OCl [140.57], Sdp.: 197 °C, unter Inertgas destilliert

racemisches 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl:

$C_{44}H_{32}P_2$ [633.70], Acros Nr. 368640050, unter Argon

Tris(dibenzylidenaceton)-dipalladium(0):

$C_{51}H_{42}O_3Pd_2$ [915.70], Strem Nr. 463000, unter Argon

dA-CE Phosphoramidit

(*N*⁶-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(*N,N*-diisopropyl)]-phosphoramidit):

$C_{47}H_{52}N_7O_7P_1$ [857.93], Ellabiotech, CAS-Nr.: 98796-53-3, unter Argon, bei -20 °C aufbewahrt

dC-CE Phosphoramidit

(*N*⁴-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(*N,N*-diisopropyl)]-phosphoramidit):

$C_{46}H_{52}N_5O_8P_1$ [833.91], Ellabiotech, CAS-Nr.: 102212-98-6, unter Argon, bei -20 °C aufbewahrt

dG-CE Phosphoramidit

(*N*²-Dimethylformamid-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyguanosin-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N,N*-diisopropyl)]-phosphoramidit):

C₄₄H₅₄N₇O₈P₁ [839.92], Ellabiotech, CAS-Nr.: 93183-15-4, unter Argon, bei -20 °C aufbewahrt

dT-CE Phosphoramidit

(5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxythymidin-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N,N*-diisopropyl)]-phosphoramidit):

C₄₀H₄₉N₄O₈P₁ [744.81], Ellabiotech, CAS-Nr.: 98796-51-1, unter Argon, bei -20 °C aufbewahrt

dG-CPG-1000 Å, dC-CPG-1000 Å:

Ellabiotech, c = 29 µmol

EcoRI-Enzym: aus *Escherichia Coli*; Fermentas ER 0271; 5000 Units

T4 Polynucleotidkinase (T4-PNK):

Fermentas EK0031; 500 Units

[γ-³²P] - ATP (3000 Ci/mmol):

Hartmann Analytic SRP-30; (30 mCi)/mL

DNA Loading Dye (6 x):

Fermentas R0611, St. Leon-Rot; 5x1 mL

2'-Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs):

Fermentas R0182; 4x100 µmol einer 100 mM Lösung

FIREPol[®] DNA Polymerase:

aus *Escherichia Coli*; Solis BioDyne 01-01-00500; 500 Units

Klenow-Fragment:

exo⁻: aus *Escherichia Coli*; Fermentas EP0421; 300 Units

Pfu DNA Polymerase (native):

aus *Pyrococcus furiosus*; Fermentas EP0571; 100 Units

Phusion[®]:

aus *Escherichia Coli*; Finnzymes F-530L; 500 Units

human DNA Polymerase β :

aus *Escherichia Coli*; TREVIGEN[®] 4020-100-EB; 100 Units

9.3 Puffer, Lösungen und Medien

DTT-Puffer (pH = 7.5) für den *EcoRI*-Restriktionsabbau:

Es wurden 190 mg (0.94 mmol) Magnesiumchlorid, 1.17 g (20.0 mmol) Natriumchlorid und 1.21 g (9.98 mmol) Tris-(hydroxymethyl)aminomethan in ca. 180 mL Reinstwasser gelöst, mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt und auf ein Gesamtvolumen von 200 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Anschließend wurden noch 15.4 mg (99.8 mmol) Dithiothreitol hinzugefügt.

Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA-Puffer) pH = 6.9 für die HPLC

(Trennung der Oligonucleotide):

Es wurden 5.60 mL (5.88 g, 97.9 mmol) Eisessig und 13.8 mL (10.1 g, 99.5 mmol) Triethylamin in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst, auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt und mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL aufgefüllt.

Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA-Puffer) pH = 8.0 für die HPLC

(*EcoRI*-Abbau):

Es wurden 3.0 mL (3.15 g, 52.4 mmol) Eisessig und 5.0 mL (3.65 g, 36.1 mmol) Triethylamin sowie 50.0 mL Acetonitril in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst, auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt und mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL aufgefüllt.

Phosphatpuffer (pH 6.8) für die T_m - und CD-Messungen:

Für den Phosphatpuffer mit 140 mM NaCl, 10.0 mM Phosphat und 1.00 mM Na₂EDTA wurden 818 mg (14.0 mmol) Natriumchlorid, 85.0 mg (0.71 mmol) Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 69.0 mg (0.39 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 37.0 mg (0.10 mmol) Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat in 90 mL Reinstwasser gelöst, auf einen pH-Wert von 6.8 eingestellt, mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL aufgefüllt und autoklaviert.

Natriumcacodylat-Puffer (Kristallisation):

10 mM Natriumcacodylat (pH 7.0) und 0.1 mM Magnesiumchlorid

Sigma-Aldrich Annealing-Puffer (Kristallisation):

50 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5) und 1 mM EDTA

Klenow-Puffer (10 x):

500 mM Tris-HCl (pH 8.0); 50 mM MgCl₂; 10 mM DTT

RECTM Puffer 8 (10 x): human pol β

50 mM Tris-HCl (pH 8.8); 10 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 1.0 mM DTT, 1% Glycerol

Pfu-Puffer mit 20 mM MgSO₄ (10 x):

200 mM Tris-HCl (pH 8.8); 100 mM (NH₄)₂SO₄; 100 mM KCl;
1 mg/mL BSA, 1% (v/v) Triton X-100, 20 mM MgSO₄

T4-PNK Reaktionspuffer A:

500 mM Tris-HCl (pH 7.6); 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 1.0 mM
Spermidin

TAE-Puffer (50 x): 2 M Tris (pH 7.8); 0.25 M NaOAc; 0.005 M EDTA

RNA Loading Dye (2 x):

95% (v/v) Formamid; 0.025% (w/v) SDS; 0.025% (w/v)
Bromphenolblau; 0.025% (w/v) Xylen Cyanol FF; 0.025% (w/v)
Ethidiumbromid, 0.5 mM EDTA

9.4 Chromatographie und Geräte

9.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Platten wurden auf eine Größe von 1-8x10 cm zugeschnitten; die Laufstrecke betrug 5-10 cm. Alle R_f-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Als zusätzliches Färbereagenz wurde ein Gemisch aus Ethanol (20 mL), konz. Schwefelsäure (0.5 mL), Essigsäure (0.1 mL), Wasser (20 mL) und 4-Methoxybenzaldehyd (0.5 mL) verwendet.

Zur Zuordnung der Hydroxylamine und Hydroxamsäuren erfolgte die Detektion in einer Iodkammer.

9.4.2 Präparative Säulenchromatographie

Substanzgemische zwischen 0.1-15 g wurden über eine Säule mit leichtem Überdruck gereinigt. Als Trennmateriale wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 0.035-0.070 mm, 60 Å [60.08]; SiO₂ (Acros Organics / Merck) verwendet.

Bei säure- bzw. basenlabilen Verbindungen wurde Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral, Aktivitätsstufe III mit der Korngröße 0.063-0.200 mm (70 - 230 mesh ASTM) (Merck) verwendet.

9.4.3 Circulare präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron)

Unempfindliche Substanzgemische mit weniger als 1 g Rohmenge wurden über eine Platte mit einer Schichtdicke von 1-4 mm gereinigt. Als Trennmateriale wurde Kieselgel Merck Typ 7749 mit Gipszusatz und Fluoreszenzindikator [60 PF₂₅₄] verwendet.

9.4.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer Merck-Hitachi-Anlage mit der Software *Chromatography Data Station Software HPLC System Manager* Version 3.1.1. durchgeführt. Bei dem Interface handelte es sich um das Model L-7000, bei der Pumpe um das Model L-7100, bei dem automatischen Probenwechsler um das Model L-7200 und bei dem Dioden Array Detektor um das Model L-7455. Es wurde eine *RP-18* endcapped 5 µm Li Chrosphor 100, EcoCART 125-3 Säule verwendet.

HPLC-Methoden:

- 1) Reinigung 12mere: Acetonitril-Gradient von 0-23% in TEAA-Puffer (pH 6.9) bis 50 Minuten, dann 100% Acetonitril für 5 Minuten. Anschließend 5 Minuten 100% Wasser und zum Ende 100% TEAA-Puffer für 10 Minuten.

- 2) Reinigung 20mere: Acetonitril-Gradient von 0 - 26% in TEAA-Puffer (pH 6.9) bis 50 Minuten, dann 100% Acetonitril für 5 Minuten. Anschließend 5 Minuten 100% Wasser und zum Ende 100% TEAA-Puffer für 10 Minuten.

3) Enzymatischer Abbau mittels *EcoRI*:

Acetonitril-Gradient von 0-25% in TEAA-Puffer (pH 8.0) bis 20 Minuten, dann für 5 Minuten 100% Acetonitril und abschließend 100% TEAA-Puffer für 10 Minuten.

9.4.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung der Universität Hamburg in den Instituten für Organische und Anorganische Chemie aufgenommen. Es standen folgende Geräte zur Verfügung:

¹H-NMR

Bruker AMX 400 (400 MHz), Bruker DMX 500 (500 MHz), Bruker AV 400 (400 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-*d*₆ ($\delta = 2.50$ ppm), CDCl₃ ($\delta = 2.50$ ppm) und C₆D₆ ($\delta = 7.26$ ppm). Die Aufnahmen erfolgten bei 400 bzw. 500 MHz in 5 mm Röhren über einen Messbereich von - 2 bis + 14 ppm.

¹³C-NMR

Bruker AMX 400 (101 MHz), Bruker AV 400 (101 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-*d*₆ ($\delta = 39.52$ ppm), CDCl₃ ($\delta = 77.16$ ppm) und C₆D₆ ($\delta = 128.00$ ppm). Die Aufnahmen erfolgten bei 100.6 MHz in einem Messbereich von 0 bis 200 ppm.

³¹P-NMR

Bruker DMX 500 (202 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard (85% Phosphorsäure).

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektren finden folgende Abkürzungen Verwendung:

s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, ddd = dreifaches Dublett, dt = Dublett vom Triplett, t = Triplett, q = Quadruplett, quin = Quintett, sept = Septett, m = Multiplett. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch die Aufnahme zweidimensionaler Spektren (*H,H*-COSY, HSQC, HMBC, NOESY).

9.4.6 Massenspektrometrie (MS)

FAB (*Fast Atom Bombardment*):

Die FAB-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem doppelfokussierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical gemessen. Als Stoßgas wurde Xenon, als Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol verwendet.

EI (Elektronenstoß-Ionisation):

Die EI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem doppelfokussierenden VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer aufgenommen.

ESI (Elektrospray-Ionisation):

Die ESI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem Spektrometer der Marke Agilent Technologies, Modell 6224 TOF LC/MS1200 Series gemessen.

9.4.7 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden in einseitig offenen Schmelzpunktröhrchen mit einem Schmelzpunkt-Bestimmungsgerät apotec der Firma Otto Stein ermittelt.

9.4.8 Infrarot-Spektrometer

Die IR-Spektren wurden an einem IR-Spektrometer der Firma Bruker, Modell Alpha P ATR bzw. an einem IR-Spektrometer AVATAR 370 FT-IR bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400 - 4000 cm^{-1} aufgenommen. Die Substanzen wurden als Feststoffe oder Flüssigkeit vermessen.

9.4.9 Polarimeter

Der Drehwert der chiralen Verbindungen wurde an einem Perkin Elmer Polarimeter 341 mit einer Hg-Lampe (546 nm) und an einem Perkin Elmer Polarimeter mit einer Na-Lampe (598 nm, D-Linie) bei Raumtemperatur aufgenommen. Der am Polarimeter abgelesene Wert ist der optische Drehwert α , welcher in den spezifischen Drehwert $[\alpha]_{\lambda}^t$ mit der Formel $[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha * 100}{c * l}$ umgerechnet wurde.

9.4.10 Zentrifuge

Das Absetzen fester Rückstände erfolgte mit Hilfe einer Biofuge der Firma Heraeus, Modell Pico.

9.4.11 UV-Spektrometer

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer (CARY 1E) der Firma Varian aufgenommen.

9.4.12 Thermomixer

Die Abspaltung der Oligonucleotide vom festen Träger und die Inkubation bei konstanten Temperaturen wurden in einem Eppendorf Thermomixer, Modell 5436, durchgeführt.

9.4.13 Speed-Vac-Probenkonzentrator

Die Oligonucleotide wurden in einem Speed-Vac-Probenkonzentrator, einer Zentrifuge mit integrierter Membranpumpe, der Firma Eppendorf getrocknet.

9.4.14 DNA/RNA-Synthesizer

Die modifizierten und unmodifizierten Oligonucleotide wurden in einem DNA-Synthesizer der Firma Applied Biosystems, Modell 394 DNA/RNA Synthesizer, synthetisiert. Die Synthesen wurden dabei nach der Phosphoramidit-Methode durchgeführt.

9.4.15 Zirkularer Dichroismus (CD)

Die Messungen des zirkularen Dichroismus wurden an einem CD Instrument Model J-810-1505 der Firma Jasco[®] durchgeführt.

9.4.16 Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer Christ/Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

9.4.17 Phosphoimaging

Radioaktiv markierte Oligonucleotide wurden an einem Personal Molecular Imager[®]FX der Firma BIO-RAD detektiert.

9.4.18 Gel Trocknung

Die Gele wurden vor dem Phosphoimaging an einem GelAir Dryer der Firma Bio-Rad getrocknet.

9.4.19 Mastercycler

Die Inkubation der verschiedenen Polymerasen bei unterschiedlichen Temperaturen wurde an einem Mastercycler personal der Firma Eppendorf durchgeführt.

9.4.20 Gelkammer

Die Gelelektrophorese wurde in einer Kammer EV232 Electrophoresis power-supply der Firma peQLab durchgeführt.

9.5 Synthese von Oligonucleotiden

9.5.1 Synthese

Die Synthese der DNA-Oligonucleotide wurde im 1 µM-Maßstab mit Hilfe der Phosphoramiditmethode durchgeführt. Für unmodifizierte DNA-Stränge wurde das Standardprotokoll der DNA-Synthese verwendet (s. Anhang, S. 296).

Für die Synthese der modifizierten DNA-Oligonucleotide wurde dieses Protokoll abgewandelt, ein weiterer Kupplungsschritt eingeführt und die Kupplungszeit erhöht (s. Anhang, S. 298).

9.5.2 Bestimmung der Beladung des Oxalyl-CPG-Trägers^[158]

Zur Bestimmung der Trägerbeladung wurde 1.00 mg Träger in 10.0 mL einer 0.1 M Toluolsulfonsäure-Lösung in Acetonitril gelöst. Dadurch kommt es zur Abspaltung der DMTr-Gruppe, wobei das Dimethoxytrityl-Kation die Lösung orange färbt. Von dieser Lösung wird 1.0 mL bei einer Wellenlänge von 498 nm im UV/VIS-Spektrophotometer vermessen. Aus dem Extinktionswert lässt sich anschließend die Beladung des Trägers nach folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{Extinktion} * 10 \text{ mL}}{\text{Einwaage des Trägers [mg]}} * 14.3 = x \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$$

9.5.3 Bestimmung der Trägermenge des Oxalyl-CPG-Trägers

Die einzusetzende Menge an Trägersubstanz für eine 1.0 µM-Synthese aus der Formel:

$$\frac{1000}{\text{Beladung des Trägers} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right]} = x \text{ mg}$$

9.5.4 Entschützung und Trägerabspaltung

Am Ende der DNA-Synthese wurde von allen Oligonucleotiden die letzte DMTr-Schutzgruppe mit dem Synthesemodus „Trityl-off“ entfernt. Die weitere Entschützung und die Abspaltung vom Träger wurden manuell durchgeführt.

Die noch festphasengebundenen unmodifizierten und modifizierten Oligonucleotide wurden mit 1 mL 25% Ammoniak-Lösung und 17.5 μ L β -Mercaptoethanol versetzt und für 2 h im Thermomixer bei 45 °C inkubiert. Der Überstand wurde mittels Spritzenfilter von der festen Phase befreit, der Rückstand dreimal mit je 200 μ L Reinstwasser gewaschen und die Oligonucleotidlösung in einem Speed-Vac-Probenkonzentrator getrocknet.

9.5.5 Reinigung der Oligonucleotide

Das getrocknete Roh-Oligonucleotid wurde in 100 μ L Reinstwasser aufgenommen und in je 50 μ L Aliquots über eine RP-18 Säule an der HPLC gereinigt. Hierbei wurden manuell jeweils 1.0 - 1.5 mL Fraktionen in Eppendorf-Tubes aufgefangen und anschließend mittels analytischer Läufe die Reinheit der Fraktionen untersucht. Gleiche Fraktionen wurden vereint, mittels Gefriertrocknung eingeeengt (nicht ganz bis zur Trockne), und bei Bedarf noch einmal getrennt.

9.6 Analytik der Oligonucleotide

9.6.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD_{260})

Eine OD_{260} -Einheit ist die Menge an Oligonucleotid, die in 1.00 mL Wasser gelöst, im Spektralphotometer (1 cm Küvettendicke) bei 260 nm einen Absorptionswert von 1.0 erzeugt. Um die OD_{260} -Menge zu bestimmen, wurde das gereinigte Oligonucleotid in 100 μ L Reinstwasser gelöst und 10 μ L davon mit 990 μ L Reinstwasser auf 1000 μ L Gesamtlösung verdünnt. Diese Lösung wurde in einer Quarzküvette in einem UV/VIS-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Der Absorptionswert (A_{260}) wurde mit dem Faktor 10 (zehnfache Verdünnung) multipliziert und ergibt so den OD_{260} -Wert.

Mittels des Oligo Calculators 3.26 der Northwestern University (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) wurden die Stoffmengen sowie die Mengen der Oligonucleotide ausgehend vom gemessenen OD_{260} -Wert berechnet. Bei modifizierten Basen wurde dieser Wert durch die zuvor berechnete Masse des Oligonucleotids dividiert und somit die Menge des tatsächlich vorhandenen Oligonucleotids ermittelt.

9.6.2 Präparation der Oligonucleotide für das ESI - MS

Es erfolgte eine Verdünnung der Oligonucleotide mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 50 pmol/ μ L.

9.6.3 Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m -Wert)

Die T_m -Werte wurden im 1 μ M-Maßstab vermessen. 1 nmol je Strang, gelöst in 1 mL eines 10 mM Phosphat-Puffers mit 140 nM NaCl und 1 mM EDTA, pH 6.8. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 80 °C durchgeführt. Die Probe wurde jeweils sechsmal von 5 °C auf 80 °C erhitzt und sechsmal von 80 °C auf 5 °C abgekühlt. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug hierbei 0.5 °C/min, wobei alle 0.5 °C ein Datenpunkt aufgenommen wurde. Die Absorption der Probelösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm verfolgt. Von der resultierenden sigmoiden Kurve wurde das Maximum der 1. Ableitung zur Bestimmung des Schmelzpunktes berechnet und der Mittelwert der einzelnen Werte ermittelt.

9.6.4 Messung des circularen Dichroismus

Für die Messung des circularen Dichroismus wurden die Lösungen der Schmelzpunktbestimmung verwendet und die molare Elliptizität zwischen 230-320 nm gemessen.

9.6.5 Enzymatischer Abbau der Oligonucleotide

Die Oligonucleotidkonzentration wurde entsprechend einer optischen Dichte (OD_{260}) von 0.4 berechnet und konzentriert. Danach wurde das Oligonucleotid in 100 μ L DTT-Puffer aufgenommen, für drei Minuten auf 70 °C erhitzt und über eine Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt. Vor Zugabe des Enzyms wurde eine „Nullprobe“ entnommen, für die 14.5 μ L der Probe und 40 μ L Reinstwasser vermessen wurden. Es folgte die Inkubation mit 27.0 μ L *EcoRI* (270 Units) bei 23 °C im Thermomixer. Die Probenentnahme erfolgte abhängig von der Halbwertszeit des Strangabbaus. Je Probe wurden 18.8 μ L Reaktionslösung und 41.2 μ L Reinstwasser verwendet und direkt mittels HPLC vermessen. Für die Bestimmung der Halbwertszeit wurden die Integrale des Oligonucleotids und der beiden Restriktionsprodukte bestimmt und die Menge des geschnittenen Oligonucleotids zu den jeweiligen Zeitpunkten mittels folgender Formel bestimmt:^[159]

$$\mu\text{M gespaltenes Oligonucleotid} = \frac{[\text{Fläche (GTAG)}][\epsilon_{260}(\text{GTAGAATTCTAC})][\mu\text{M}(\text{GTAGAATTCTAC})_{\text{orig.}}]}{[(\text{Gesamtfläche}) * [\epsilon_{260}[(\text{GTAG})]]]}$$

Nach Auftragen des natürlichen Logarithmus der berechneten Menge gegen die Zeit, konnte unter der Annahme einer Reaktion 1. Ordnung, die Halbwertszeit nach folgender Formel berechnet werden:

$$\tau^{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

k ergibt sich aus der Gleichung des Graphen (Steigung)

9.7 Methoden

9.7.1 Trennung und Reinigung mittels Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde verwendet, um Nucleinsäuren in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Größe zu trennen.^[75] Die Fragmente wurden mittels Polyacrylamidgelen getrennt.

9.7.1.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse von doppelsträngiger, radioaktiv markierter DNA erfolgte mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (PAA-Gele) ist in Tabelle 25 dargestellt. Es wurden analytische Gele der Größe 130 mm x 80 mm x 0.75 mm verwendet.

Tab. 25: Zusammensetzung 10%iger nativer Polyacrylamidgele

Komponente	Endkonzentration
TAE-Puffer	1 x
Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 (w/v)	10%
TEMED (v/v)	0.1%
APS (w/v)	0.1%

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS) gestartet und war nach etwa 30 Minuten abgeschlossen. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 6 x Loading Dye versetzt und in die Taschen des Gels überführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Nach Beendigung der PAGE wurde das Gel getrocknet (8.4.18) und die Nucleinsäuren mittels Autoradiographie (8.4.17) detektiert.

9.7.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse von DNA erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese. Verwendet wurden 10-15%ige denaturierende PAA-Gele. Je nach Anwendung wurden analytische und präparative PAA-Gele oder Sequenziergele verschiedener Größen verwendet (Tab. 26).

Tab. 26: Größe der PAA-Gele entsprechend ihrer Verwendung

Anwendung	Gelgröße
Analytisches Gel	130 mm x 80 mm x 0.75 mm
Präparatives Gel	245 mm x 180 mm x 1.5 mm
Sequenziergel	370 mm x 180 mm x 0.5 mm

Die Zusammensetzung ist in Tabelle 25 (S. 190) gezeigt, wobei die denaturierende Wirkung durch Zugabe von Harnstoff (8 M) anstelle des TAE-Puffers erreicht wurde. Vor der Beladung des jeweiligen Gels wurden die DNA-Proben mit gleichem Volumen eines 2 x RNA-Loading Dyes versetzt und für drei Minuten bei 80 °C denaturiert. Das Gel wurde mit den Proben beladen und die Elektrophorese in 1 x TAE durchgeführt. Bei analytischen Gelen erfolgte sowohl der Vorlauf als auch die elektrophoretische Trennung der Nucleinsäuren bei 8 W, bei präparativen PAA-Gelelektrophoren und den Sequenziergelen bei 20-24 W. Nach Trocknung des entsprechenden Geles (8.4.18) erfolgte die Detektion der Nucleinsäuren mittels Autoradiographie (8.4.17).

9.7.2 Nachweis von Nucleinsäuren mittels Autoradiographie

Mit dem Isotop ^{32}P radioaktiv markierte Nucleinsäuren konnten nach Auftrennung mittels PAA-Gel autoradiographisch detektiert werden.

Dafür wurden die Gele in eine *Exposure Cassette* (Bio-Rad, München, D) gelegt und mit einem *Imaging Screen* (Bio-Rad, München, D) bedeckt. Die durch den Zerfall des Phosphor-Isotops entstandene β -Strahlung wurde auf dem Screen detektiert und mit dem *Molecular Imager FX* (Bio-Rad, München, D) dokumentiert.

9.7.3 Diffusionselution von DNA aus Polyacrylamidgelen

DNA, welche elektrophoretisch mittels eines präparativen, denaturierenden PAA-Gels gereinigt wurde, konnte mittels Diffusion eluiert werden. Dazu wurde die DNA durch Autoradiographie (8.4.17) detektiert und der entsprechende Bereich des Gels mit einem Skalpell ausgeschnitten. Nach Überführung des Gelstückes in ein 1.5 mL Eppendorf-Tube wurden zweimal 350 μL einer 0.3 M NaOAc-Lösung (pH 5.2) zugegeben und jeweils für 45 Minuten bei 42 °C in einem Thermomixer bei 1400 rpm inkubiert. Die in der vereinten Lösung (700 μL) enthaltene DNA wurde mit Hilfe einer Alkoholpräzipitation (9.7.4) gewonnen.

9.7.4 Alkoholpräzipitation von Nucleinsäuren

Die aus der Diffusionselution erhaltene, gelöste DNA wurde durch Zugabe von Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dazu wurden 1/10 Vol. 0.3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Vol. absolutes Ethanol oder 1 Vol. Isopropanol zu der DNA-Lösung gegeben. Die Präzipitation erfolgte für 14 Stunden bei - 20 °C. Anschließend wurde für 1 h bei 4 °C und 16 000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 100 μL 70%-igem Ethanol gewaschen und weitere 30 Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Nucleinsäurepellet wurde bei 37 °C getrocknet und anschließend in 10 μL Reinstwasser aufgenommen.

9.7.5 Radioaktive Markierung von 5'-DNA-Termini

Um den 5'-Terminus des 15mer-Oligonucleotids (Primer) radioaktiv zu markieren, wurde sich die Fähigkeit der T4-Polynucleotidkinase (T4-PNK) zu Nutze gemacht, Phosphatgruppen von Nucleosidtriphosphaten auf DNA zu übertragen. Zur Markierung von dephosphorylierten, synthetischen Oligonucleotiden wurde die *forward reaction* des Enzyms verwendet. Als Substrat für diese Reaktionen wurde [γ - ^{32}P]-ATP verwendet. Der Ansatz einer PNK-Reaktion ist in Tabelle 27 dargestellt.

Tab. 27: Reaktionsansatz der Markierungsreaktion mit der T4-Polynucleotidkinase

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Oligonucleotid	2-4 μL	10 ng/ μL
PNK-Reaktionspuffer A, 10 x	4 μL	1 x
T4-Polynucleotidkinase [10 U/ μL]	2 μL	0.5 U/ μL
[γ - ^{32}P]-ATP [10mCi/mL]	3 μL	0.75 mCi/mL
ddH ₂ O	Ad 40 μL	

Die Reaktion erfolgte für 45 min bei 37 °C. Anschließend wurde die T4-PNK durch Inkubation für 10 min bei 70 °C inaktiviert. Der radioaktiv markierte Primer wurde durch Gelelektrophorese (8.7.1) aufgetrennt und mittels Diffusionselution (8.7.3) gereinigt.

9.7.6 Hybridisierung

Zur Darstellung von dsDNA-Stränge wurde zu den jeweiligen modifizierten/unmodifizierte Oligonucleotiden (=Templat) der komplementäre radioaktiv markierte Primer (8.7.5) an das 3'-Ende hybridisiert. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 28 zu sehen.

Tab. 28: Hybridisierung der ssDNA mit dem komplementären radioaktiv-markierten Primer

Komponente	Konzentration
Templat	5 pmol
Primer	3 pmol
Hybridisierungspuffer	Ad 15 μL

Die Hybridisierungsansätze wurden fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (mind. eine Stunde), um eine optimale Anlagerung komplementärer Oligonucleotide zu gewährleisten.

Eine Überprüfung der jeweiligen Hybridisierung erfolgte mittels 10%igem nativem PAA-Gel (8.7.11). Für jeden Hybridisierungsansatz wurde ebenfalls eine Negativkontrolle ohne Templat angesetzt.

9.7.7 Primer Verlängerungs Assays

Nach erfolgreicher Hybridisierung des entsprechenden Templates mit dem radioaktiv markierten Primer (8.7.6) konnten diese unter Verwendung verschiedener Polymerasen zu dsDNA vervollständigt werden (Tab. 29).

Tab. 29: Reaktionsbedingungen der Primer-Verlängerungs-Reaktion

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Hybridisierungsansatz	4 µL	16 pmol
Polymerasepuffer (10 x)	2 µL	1 x
dNTP's [25 µM]	2 µL	10 pmol
Polymerase [2-5 U/µL]	2 µL	0.2 - 0.5 U/µL
ddH ₂ O	Ad 20 µL	

Die Reaktion erfolgte unter den für die entsprechende Polymerase optimalen Bedingungen (Tab. 30).

Tab. 30: Reaktionsoptima der verschiedenen Polymerasen

Polymerase	Zusatz	Inkubationszeit	Temperatur
<i>FIREPol</i> [®]	1 µL MgCl ₂ (25 mM)	30 min	72 °C
<i>KF exo</i> ⁻	-	5 min	37 °C
<i>Pfu</i>	1 µL MgSO ₄ (25 mM)	15 min	72 °C
<i>human Pol β</i>	-	15 min	37 °C

Die Inaktivierung der Polymerase erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. 2 x RNA Loading Dye.

Die Verlängerung um die einzelnen Nucleotide wurde anhand von denaturierender PAGE (12.5%) überprüft und autoradiographisch (8.4.17) detektiert.

10. Synthesen

10.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Reaktionen unter Stickstoffatmosphäre und mit getrockneten Lösungsmitteln durchgeführt.

10.1.1 Synthese der *N*-Arylhydroxylamine (**AAV 1**)

Für die Reaktion wurden katalytische Mengen des unter Wasser gelagerten Raney/Nickels im Vakuum getrocknet. In der Zwischenzeit wurde das Nitrobenzol-Derivat in 10 mL (pro g Nitroverbindung) Ethanol/Dichlorethan (1:1) suspendiert, auf 0 °C gekühlt und langsam unter Stickstoffatmosphäre zu dem trockenen Raney/Nickel gegeben. Für die folgende Umsetzung ist die Stickstoffatmosphäre nicht weiter nötig. Unter weiterer Kühlung wurden langsam 6.5 Äquivalente Hydrazinmonohydrat (80%) hinzu getropft. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur der Reaktionslösung nicht über 0 °C anstieg.

Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (Toluol bzw. CH₂Cl₂, Iodkammer). Nach Reaktionsende wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Das Produkt wurde durch Umkristallisation aus Toluol erhalten.

10.1.2 Synthese der *N*-Arylhydroxamsäuren (**AAV 2**)

Die Synthese wurde ohne Schutzgas durchgeführt. Für die Synthese wurde 1 Äquivalent des Hydroxylamins in Diethylether gelöst, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (1 mL pro mmol) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Unter Eiskühlung wurden 1.2 Äquivalente Acetylchlorid langsam hinzu getropft und so lange gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte.

Die organische Phase wurde dreimal mit 1 M Natronlauge gewaschen. Die vereinten wässrigen Phasen wurden zweimal mit Diethylether extrahiert und mit 2 M Salzsäure angesäuert. Das Produkt wurde mit Diethylether extrahiert und die Etherphase über Natriumsulfat getrocknet. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt.

10.1.3 Synthese der C8-(N-Acetyl)-arylamino-3',5'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin-Derivate (AAV 3)

Für die Reaktion wurde 1 Äquivalent O⁶-Benzotriazolyl-3',5'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-dG in absolutem 1,2-Dimethoxyethan gelöst und mit je 2 Äquivalenten Cäsiumcarbonat sowie 2 Äquivalenten der entsprechenden Hydroxamsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte.

Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 3%) gereinigt.

10.1.4 Entfernung der Silylether-Schutzgruppen der Acetylarylamino-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Derivate (AAV 4.1)

Für die Synthese wurde 1 Äquivalent C8-(N-Acetyl)-arylamino-3',5'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin-Derivat in abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 10 Äquivalenten Triethylamin sowie 12.5 Äquivalenten Triethylamintrihydrofluorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte.

Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 30%) gereinigt.

10.1.5 Entfernung der Silylether-Schutzgruppen der Acetylarylamino-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Derivate (AAV 4.2)

Für die Synthese wurde 1 Äquivalent C8-(N-Acetyl)-arylamino-3',5'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin-Derivat in abs. Tetrahydrofuran gelöst. Vor der Zugabe wurden 6 Äquivalente TBAF und 12 Äquivalente Essigsäure (99%) vermischt und anschließend langsam zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 10%).

10.1.6 Synthese der N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-arylamino-2'-desoxyguanosin-Derivate (AAV 5)

Für die Synthese wurde 1 Äquivalent des jeweiligen C8-(*N*-Acetyl)-arylamino-2'-desoxyguanosin-Derivates in abs. Pyridin gelöst und mit 2 Äquivalenten *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte.

Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt dreimal mit Toluol coevaporiert und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 8%) gereinigt.

10.1.7 DMTr-Schätzung der Acetylarylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Derivate (AAV 6)

Für die Synthese wurde 1 Äquivalent des entsprechenden N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-arylamino-2'-desoxyguanosin-Derivates in abs. Pyridin gelöst und mit 1 Äquivalent DMTr-Chlorid versetzt. Bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung so lange gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt dreimal mit Toluol coevaporiert.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 5%) gereinigt.

10.1.8 Phosphitylierung der N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-arylamino-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin-Derivate (AAV 7)

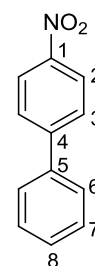
Für die Synthese wurde 1 Äquivalent des DMTr-geschützten Adduktes in abs. Dichlormethan/abs. Acetonitril (1:1) gelöst. Zur Reaktionslösung wurde 1 Äquivalent 4,5-Dicyanoimidazol und 1.1 Äquivalente Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 5%) gereinigt und anschließend durch Gefriertrocknung aus Benzol isoliert.

10.2 Synthese der C8-[(N-Acetyl)-]arylamino-Addukte

Synthese von 4-Nitrobiphenyl **63**

Es wurden 5.00 g (29.5 mmol) 4-Aminobiphenyl **62** in 200 mL Toluol gelöst und nach Zugabe von 33.0 g (148 mmol) *m*-Chlorperbenzoesäure bei 130 °C unter Rückfluss für vier Stunden erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung fiel ein gelber Niederschlag aus, welcher filtriert und anschließend dreimal mit Diethylether gewaschen wurde. Das Filtrat wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE; 9:1 v/v).

**63**

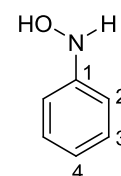
Reaktionszeit: 4 h. - **Ausbeute:** 3.46 g (17.4 mmol, 59%) eines gelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₂H₉NO₂. - **DC:** R_F-Wert (PE/EE; 9:1 v/v): 0.51. - **Smp.:** 116 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.29 - 8.26 (m, 2H, H-2), 7.94 - 7.92 (m, 2H, H-3), 7.77 - 7.75 (m, 2H, H-6), 7.54 - 7.52 (m, 2H, H-7), 7.48 - 7.47 (m, 1H, H-8). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 146.7 (C1), 146.6 (C4), 137.8 (C5), 129.2 (C7), 129.1 (C3), 127.9 (C6), 127.3 (C8), 124.1 (C2). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3075, 2928, 1594, 1574, 1506, 1478, 1448, 1404, 1388, 1338, 1326, 1295, 1284, 1157, 1115, 1100, 1077, 1005, 851, 773, 738, 692, 476. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 199.0633 [M], gef.: 200.0712 [M+H]⁺.

Synthese von N-Phenylhydroxylamin **67**

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 10.3 mL (12.3 g, 100 mmol) Nitrobenzol **64** sowie 31.6 mL (32.6 g, 650 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.

Reaktionszeit: 30 min. - **Ausbeute:** 9.03 g (82.9 mmol, 83%) eines weißen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** C₆H₇NO. - **DC:** R_F-Wert

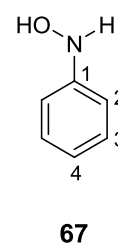
**67**

(Toluol): 0.18. - **Smp.:** 84 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.32 (d, ³J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, NH), 8.25 (bs, 1H, OH), 7.19 (dd, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 2H, H-3), 6.87 (d, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, 2H, H-2), 6.78 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 1H, H-4). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 152.0 (C1), 128.7 (C3), 119.2 (C4), 113.0 (C2). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3239, 3095, 2797, 1591, 1517, 1491, 1467, 1417, 1220, 1154, 1086, 1053, 1023, 921, 895, 833, 790, 477, 689, 594, 500, 432, 405. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 109.0528 [M], gef.: 109.1035 [M].

Versuch zur Synthese von *N*-Phenylhydroxylamin **67**

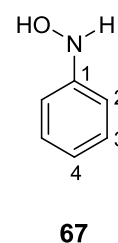
Versuch A:

Es wurden 419 μL (500 mg, 4.07 mmol) Nitrobenzol **64** in 20 mL Methanol gelöst. Nach Zugabe von 246 mg (2.03 mmol) Antimon-Staub wurden langsam 231 mg (6.10 mmol) Natriumborhydrid portionsweise in die Reaktionslösung gegeben. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur konnte dünn-schichtchromatographisch (Toluol) nur eine Reduktion zum entsprechenden Amin festgestellt werden.



Versuch B:

Es wurden 419 μL (500 mg, 4.07 mmol) Nitrobenzol **64** in 20 mL Methanol gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 246 mg (2.03 mmol) Antimon-Staub wurden langsam 231 mg (6.10 mmol) Natriumborhydrid portionsweise in die Reaktionslösung gegeben. Nach fünf-stündigem Rühren unter Eiskühlung konnte dünn-schichtchromatographisch (Toluol) nur ein Gemisch aus Edukt **64** und Amin festgestellt werden.

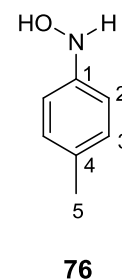


Synthese von *N*-(4-Methylphenyl)hydroxylamin **76**

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 3.01 g (28.1 mmol) *p*-Toluidin **72** sowie 8.89 mL (9.15 g, 183 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.

Reaktionszeit: 30 min. - **Ausbeute:** 2.60 g (21.1 mmol, 75%) eines beige, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}$. - **DC:** R_f -Wert (Toluol): 0.15. - **Smp.:** 91 °C. - **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.14 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH), 8.07 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 1H, OH), 6.97 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, 2H, H-2), 6.77 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, 2H, H-3), 2.19 (s, 3H, H-5). - **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 150.4 (C1), 129.9 (C2), 128.7 (C4), 113.7 (C3), 20.5 (C5). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3275, 3027, 2910, 1608, 1510, 1462, 1375, 1291, 1267, 1222, 1179, 1162, 1022, 938, 909, 817, 736, 705, 637, 561, 522, 512, 483, 445, 412. - **MS:** (EI, m/z): ber.: 123.0684 [M], gef.: 123.1 [M].

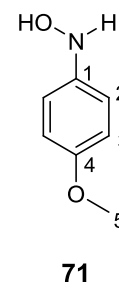


Synthese von *N*-(4-Methoxyphenyl)hydroxylamin 71

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

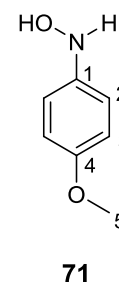
Es wurden 10.0 g (65.3 mmol) 4-Nitroanisol **70** sowie 20.6 mL (21.3 g, 424 mmol) Hydrazinhydrat (80%) verwendet.

Reaktionszeit: 1 h. - **Ausbeute:** 8.5 g (61.12 mmol, 94%) eines farblosen, kristallinen und glänzenden Feststoffs. - **Summenformel:** C₇H₉NO₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂): 0.63. - **Smp.:** 78.5 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.16 (s, 1H, NH), 7.89 (s, 1H, OH), 6.83 - 6.75 (m, 4H, H-2, H-3), 3.67 (s, 3H, H-5). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 153.1 (C4), 145.6 (C1), 115.1 (C2), 114.5 (C3), 55.2 (C5). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3256, 3114, 3029, 2832, 2049, 1990, 1870, 1613, 1596, 1496, 1455, 1438, 1392, 1296, 1243, 1182, 1166, 1154, 1104, 1057, 1025, 929, 889, 830, 813, 747, 704, 568, 532, 515, 487, 478, 435, 415. - **MS:** (EI, m/z): ber.: 139.0633 [M], gef.: 139.1 [M].



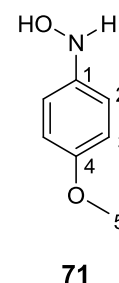
Versuch zur Synthese von *N*-(4-Methoxyphenyl)hydroxylamin 71

Es wurden 500 mg (3.27 mmol) 4-Nitroanisol **70** in 20 mL Isopropanol gelöst. Nach Zugabe von 32.7 mg Pt/C (~10% Pt), 150 μ L (46.1 mg, 2.06 mmol) DMSO und 82.0 μ L (59.7 mg, 0.59 mmol) abs. TEA wurde die Reaktionslösung unter Wasserstoffatmosphäre für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch alle 10 Minuten verfolgt (Toluol). Es konnte allerdings keine Produktbildung detektiert werden, sondern nur die Bildung des Amin-Derivates.



Versuch zur Synthese von *N*-(4-Methoxyphenyl)hydroxylamin 71

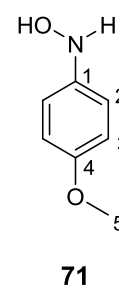
Es wurden 500 mg (3.27 mmol) 4-Nitroanisol **70** in 30 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 836 g (13.1 mmol) Zink-Staub versetzt und für 30 Minuten mit Ultraschallbad behandelt. Nach Zugabe von 2.06 g (32.7 mmol) Ammoniumformiat wurde die Reaktionslösung weitere 30 Minuten mit Ultraschall behandelt. Mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle konnte allerdings nur das Amin-Derivat detektiert werden.



Versuch zur Synthese von *N*-(4-Methoxyphenyl)hydroxylamin **71**

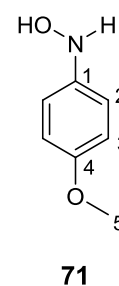
Versuch A:

Es wurden 1.00 g (6.54 mmol) 4-Nitroanisol **70** in 20 mL abs. Methanol gelöst. Nach Zugabe von 398 mg (3.27 mmol) Antimon-Staub wurden langsam 742 mg (19.6 mmol) Natriumborhydrid portionsweise in die Reaktionslösung gegeben. Trotz der langsamen Zugabe wurde die Reaktionslösung sehr heiß. Anhand dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Toluol) wurde nur das reduzierte Amin ermittelt.



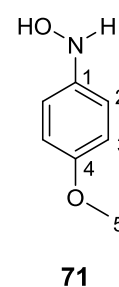
Versuch B:

Es wurden 300 mg (1.96 mmol) 4-Nitroanisol **70** in 15 mL abs. Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 119 mg (0.99 mmol) Antimon-Staub wurden langsam 37.1 mg (0.981 mmol) Natriumborhydrid portionsweise in die Reaktionslösung gegeben. Nach vierstündigem Rühren bei Raumtemperatur konnte keine dünnschichtchromatographische Veränderung festgestellt werden, so dass weitere 111 mg (2.94 mmol) Natriumborhydrid zugegeben wurden. Nach weiteren 16 Stunden wurde die Reaktionslösung verworfen, da dünnschichtchromatographisch (Toluol) keine Veränderung festgestellt werden konnte.



Versuch C:

Es wurden 300 mg (1.96 mmol) 4-Nitroanisol **70** in 15 mL abs. Methanol gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 119 mg (0.99 mmol) Antimon-Staub wurden langsam 111 mg (2.94 mmol) Natriumborhydrid portionsweise in die Reaktionslösung gegeben. Nach einstündigem Rühren unter Eiskühlung konnte dünnschichtchromatographisch (Toluol) nur eine Reduktion zum entsprechenden Amin festgestellt werden.

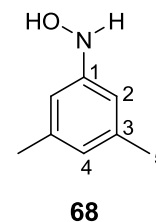


Darstellung von *N*-(3,5-Dimethylphenyl)hydroxylamin **68**

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 10.0 g (66.2 mmol) 5-Nitro-*m*-xylol **65** sowie 21.0 mL (21.6 g, 430 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.

Reaktionszeit: 30 min. - **Ausbeute:** 8.10 g (59.1 mmol, 89%) eines weißen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** C₈H₁₁NO. - **DC:** R_F-

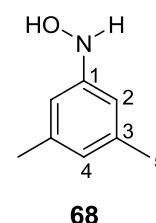


Wert (Toluol): 0.3 und (CH₂Cl₂): 0.58. - **Smp.:** 105.2 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.16 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, NH), 8.07 (s, 1H, OH), 6.44 (s, 2H, H-2), 6.38 (s, 1H, H-4), 2.17 (s, 6H, H-5). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 152.0 (C1), 137.2 (C3), 120.9 (C2), 110.8 (C4), 21.1 (C5). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3228, 3114, 3011, 2911, 2832, 1616, 1600, 1519, 1464, 1412, 1372, 1304, 1265, 1085, 1037, 962, 948, 891, 866, 856, 837, 810, 760, 694, 642, 563, 537, 510, 478. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 137.0841 [M], gef.: 137.0828 [M].

Versuch zur Synthese von *N*-(3,5-Dimethylphenyl)hydroxylamin **68**

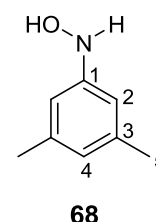
Versuch A:

Es wurden 500 mg (3.31 mmol) 5-Nitro-*m*-xylol **65** in 20 mL Methanol gelöst. Nach Zugabe von 200 mg (1.66 mmol) Antimon-Staub wurden langsam 189 mg (4.96 mmol) Natriumborhydrid portionsweise in die Reaktionslösung gegeben. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur konnte dünnschichtchromatographisch (Toluol) nur eine Reduktion zum entsprechenden Amin festgestellt werden.



Versuch B:

Es wurden 500 mg (3.31 mmol) 5-Nitro-*m*-xylol **65** in 20 mL Methanol gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 200 mg (1.66 mmol) Antimon-Staub wurden langsam 189 mg (4.96 mmol) Natriumborhydrid portionsweise in die Reaktionslösung gegeben. Nach dreistündigem Rühren unter Eiskühlung konnte dünnschichtchromatographisch (Toluol) nur ein Gemisch aus Edukt **65** und Amin festgestellt werden.



Versuch zur Synthese von *N*-(4-Cyanophenyl)hydroxylamin 78

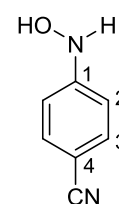
Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 5.00 g (33.8 mmol) 4-Nitrobenzonitril **74** sowie 17.8 mL (11.0 g, 220 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.

Das Rohprodukt wurde direkt in der nächsten Stufe umgesetzt.

Reaktionszeit: 1 h. - **Ausbeute:** Rohprodukt ist ein gelber Feststoffs. -

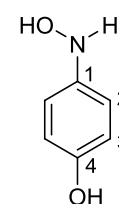
Summenformel: C₇H₆N₂O. - **DC:** R_f-Wert (Toluol): 0.10. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 134.0480 [M], gef.: 134.0399 [M].

**78****Versuch zur Synthese von *N*-(4-Hydroxyphenyl)hydroxylamin 77**

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (7.19 mmol) 4-Nitrophenol **73** sowie 1.82 mL (1.49 g, 46.7 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.

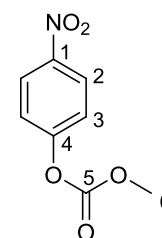
Das gewünschte Produkt konnte nicht erhalten werden.

**77****Darstellung von Methyl-4-nitrophenylcarbonat 80**

In eine Lösung aus 5.87 g (42.2 mmol) 4-Nitrophenol **73** und 3.48 mL (3.42 g, 43.2 mmol) Pyridin in 64 mL Dichlormethan wurden unter Eiskühlung 3.99 g (42.2 mmol) Methylchloroformiat in 16 mL Dichlormethan zugetropft.

Anschließend wurde die Reaktionslösung für 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei der Verlauf der Reaktion dünnschichtchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v) verfolgt wurde. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mit 25 mL Wasser, 25 mL einer 0.5 M Natriumhydroxidlösung und 25 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/CH₃OH; 99:1 v/v).

Reaktionszeit: 14 h. - **Ausbeute:** 7.63 g (42.1 mmol, 91%) eines beigefarbenen Feststoffes. - **Summenformel:** C₈H₇NO₅. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂): 0.58. - **Smp.:** 113 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.32 (d, ³J_{H-H} = 9.2 Hz, 2H, H-2), 7.56 (d, ³J_{H-H} = 9.6 Hz, 2H, H-3), 3.87 (s, 3H, H-6). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz,

**80**

DMSO- d_6): 155.2 (C1), 152.5 (C4), 145.1 (C5), 125.2 (C2), 122.4 (C3), 55.8 (C6). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3119, 3084, 1755, 1616, 1595, 1519, 1491, 1441, 1350, 1275, 1223, 1163, 935, 854, 773, 716, 665, 497, 402. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 197.0324 [M], gef.: 198.0402 [M+H]⁺.

Darstellung von *N*-(4-Methoxycarbonyloxyphenyl)hydroxylamin **81**

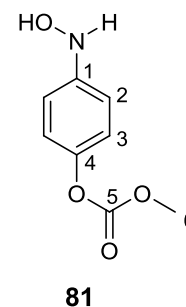
Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (5.52 mmol) Methyl-4-nitrophenylcarbonat **80** sowie 1.12 mL (1.15 g, 35.9 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.

Das Produkt konnte nicht rein erhalten werden.

Reaktionszeit: 35 min. - **Ausbeute:** keine Ausbeutebestimmung möglich. - **Summenformel:** C₈H₉NO₄. - **DC:** R_F-Wert (Toluol): 0.16. -

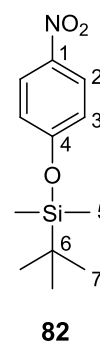
Smp.: 62 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.12 (bs, 2H, NH, OH), 7.96 (d, ³J_{H-H} = 9.6 Hz, 2H, H-3), 6.54 (d, ³J_{H-H} = 9.2 Hz, 2H, H-2), 3.54 (s, 3 H, H-6). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 154.9 (C5), 150.3 (C1), 146.0 (C4), 119.4 (C3), 113.9 (C2), 54.9 (C6). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3323, 3218, 3012, 2963, 2132, 1735, 1716, 1636, 1620, 1588, 1564, 1499, 1457, 1433, 1287, 1196, 1175, 1108, 1073, 951, 836, 816, 757, 720, 701, 643, 502, 484. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 183.0532 [M], gef.: 184.0555 [M+H]⁺.



Darstellung von 4-Nitrophenyl-(*tert*butyldimethylsilyl)ether **82**

Es wurde 1.00 g (7.19 mmol) 4-Nitrophenol **73** in 50 mL abs. Pyridin gelöst und mit 1.08 g (7.17 mmol) TBDMS-Chlorid, sowie 980 mg (14.4 mmol) Imidazol hinzugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 1.35 g (5.55 mmol, 77%) eines beigefarbenen Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₂H₁₉NO₃Si. - **DC:** R_F-Wert (Toluol): 0.91. - **Smp.:** 38 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.18 - 8.10 (m, 2H, H-3), 7.08 - 7.04 (m, 2H, H-2), 0.96 (s, 9H, H-7), 0.25 (s, 6H, H-5). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 163.8 (C1), 161.1 (C4), 126.0 (C2), 115.6 (C3), 25.7 (C7), 25.2 (C7), 17.8 (C6), -3.4 (C5), -4.8 (C5). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2952, 2929, 2886, 2855, 2709, 2358, 2223, 2119, 2012, 1589, 1507, 1491, 1341, 1258, 1158,



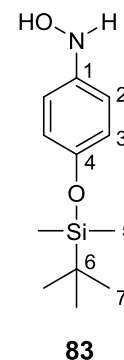
1107, 1098, 1009, 898, 803, 786, 756, 722, 977, 498. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 253.1134 [M], gef.: 254.1113 [M+H]⁺.

Versuch zur Synthese von *N*-(4-*tert*butyldimethylsilyloxy)phenyl)hydroxylamin **83**

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (4.11 mmol) 4-Nitrophenyl-(*tert*butyldimethylsilyl)ether **82** sowie 1.04 mL (853 mg, 26.7 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.

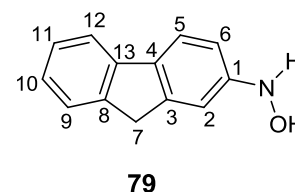
Das gewünschte Produkt konnte nicht erhalten werden.



Darstellung von *N*-(2-Fluorenyl)hydroxylamin **79**

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 10.0 g (47.3 mmol) 2-Nitrofluoren **75** sowie 15.0 g (15.4 g, 308 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.



Reaktionszeit: 1 h. - **Ausbeute:** 7.41 g (37.6 mmol, 80%)

eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₃H₁₁NO. - **DC:** R_f-Wert (Toluol): 0.27.-

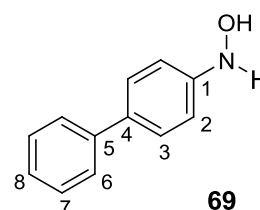
Smp.: 211.3 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.39 - 8.38 (m, 2H, NH, OH), 7.71 - 7.65 (m, 2H, H-9, H-5), 7.48 (d, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, H-12), 7.29 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, H-10), 7.18 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, H-11), 7.07 (s, 1H, H-2), 6.86 - 6.84 (dd, ²J_{H,H} = 1.5 Hz, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 1H, H-6), 3.82 (s, 2H, H-7). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 151.6 (C1), 143.9 (C3), 142.0 (C8), 141.7 (C13), 132.8 (C4), 126.5 (C9), 125.0 (C12), 124.7 (C10), 119.9 (C11), 118.5 (C5), 111.8 (C2), 109.6 (C6), 36.3 (C7). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr): 3446, 3360, 3254, 2920, 2349, 2284, 1950, 1615, 1585, 1480, 1454, 1418, 1401, 1349, 1316, 1304, 1278, 1264, 1211, 1194, 1177, 1156, 1136, 1122, 1099, 1050, 1025, 1000, 951, 903, 870, 859, 827, 814, 764, 731, 711, 691, 573, 418. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 197.0841 [M], gef.: 197.0841 [M].

Darstellung von *N*-(4-Biphenyl)hydroxylamin 69

Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt.

Es wurden 3.00 g (15.1 mmol) 4-Nitrophenyl **66** sowie 7.94 mL (4.92 g, 98.0 mmol) Hydrazinhydrat (80%) eingesetzt.

Reaktionszeit: 40 min. - **Ausbeute:** 2.45 g (13.2 mmol, 88%) eines dunkelgelben Feststoffes. - **Summenformel:** C₁₂H₁₁NO. -



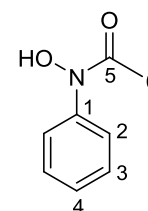
DC: R_f-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/v): 0.76. - **Smp.:** 211.3 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.41 (s, 2H, NH, OH), 7.59 - 7.40 (m, 6H, H-2, H-3, H-6), 7.26 (s, 1H, H-8), 6.93 - 6.95 (m, 2H, H-7). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 151.6 (C1), 140.4 (C5), 131.0 (C4), 129.1 (C2), 127.4 (C3), 125.8 (C6), 122.7 (C7), 113.3 (C8). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3252, 3056, 3029, 2922, 2852, 1599, 1520, 1482, 1436, 1421, 1388, 1339, 1265, 1218, 1197, 1167, 1121, 1036, 1003, 894, 840, 757, 724, 686, 544, 496. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 185.0841 [M], gef.: 185.0840 [M].

Darstellung von *N*-Acetyl-*N*-phenylhydroxamsäure 84

Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt.

Es wurden 3.00 g (27.5 mmol) *N*-Phenylhydroxylamin **67**, 2.36 mL (2.59 g, 33 mmol) Acetylchlorid und 27.5 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingesetzt.

Reaktionszeit: 1 h. - **Ausbeute:** 3.5 g (23 mmol, 84%) eines gelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** C₈H₉NO₂. - **DC:** R_f-Wert



(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.84. - **Smp.:** 120 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.62 (s, 1H, OH), 7.61 (d, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, 2H, H-2), 7.38 - 7.34 (m, 2H, H-3), 7.14 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 1H, H-4), 2.20 (s, 3H, H-6). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 170.1 (C5), 142.0 (C1), 128.7 (C3), 123.3 (C4), 119.3 (C2), 22.8 (C6). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3134, 2900, 1625, 1590, 1381, 1353, 1119, 751, 686, 505. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 151.0633 [M], gef.: 152.0659 [M+H]⁺.

Darstellung von *N*-Acetyl-*N*-(4-methylphenyl)hydroxamsäure 85

Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt.

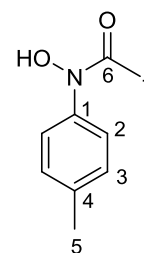
Es wurden 5.00 g (40.6 mmol) *N*-(4-Methylphenyl)hydroxylamin **76**, 3.20 mL (3.52 g, 44.7 mmol) Acetylchlorid und 41.0 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingesetzt.

Reaktionszeit: 1 h. - **Ausbeute:** 6.58 g (39.9 mmol, 98%) eines braunen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** C₉H₁₁NO₂. - **DC:** R_f-

Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.57. - **Smp.:** 68 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm]

(400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.54 (s, 1H, OH), 7.49 (d, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 2H, H-2), 7.16 (d, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 2H, H-3), 2.28 (s, 3H, H-5), 2.19 (s, 3H, H-7). - **¹³C-NMR:** δ [ppm]

(101 MHz, DMSO-*d*₆): 170.1 (C6), 139.4 (C1, C4), 128.8 (C3), 121.0 (C2), 22.3 (C7), 20.7 (C5). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3123, 2884, 1635, 1609, 1501, 1418, 1384, 1352, 1305, 1289, 1247, 1228, 1184, 1132, 1100, 1040, 1023, 1012, 914, 819, 802, 755, 679, 643, 608, 581, 552, 506. - **MS:** (EI-HR, m/z): ber.: 165.0790 [M], gef.: 166.0862 [M+H]⁺.

**85****Darstellung von *N*-Acetyl-*N*-(4-methoxyphenyl)hydroxamsäure 86**

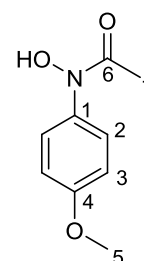
Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt.

Es wurden 8.50 g (61.1 mmol) *N*-(4-Methoxyphenyl)hydroxylamin **71**, 4.80 mL (5.23 g, 67.2 mmol) Acetylchlorid und 61.0 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingesetzt.

Reaktionszeit: 1.5 h. - **Ausbeute:** 6.14 g (33.9 mmol, 55%) eines dunkelgelben Feststoffes. - **Summenformel:** C₉H₁₁NO₃. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂): 0.27. - **Smp.:** 127 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆):

10.50 (bs, 1H, OH), 7.46 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 2H, H-2), 6.92 (d, ³J_{H,H} = 9.0 Hz, 2H, H-3), 3.75 (s, 3H, H-7), 2.14 (bs, 3H, H-5). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆):

152.0 (C1), 137.2 (C3), 120.5 (C4), 114.0 (C5), 110.8 (C2), 55.2 (C7), 22.0 (C6). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3137, 2905, 2837, 1601, 1552, 1504, 1440, 1386, 1298, 1245, 1179, 1169, 1154, 1094, 1028, 988, 969, 912, 831, 798, 772, 752, 724, 669, 638, 598, 556, 521, 433. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 181.0739 [M], gef.: 182.0817 [M+H]⁺.

**86**

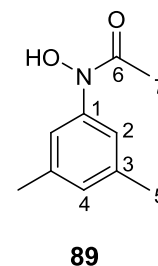
Darstellung von *N*-Acetyl-*N*-(3,5-dimethylphenyl)hydroxamsäure 89

Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt.

Es wurden 450 mg (3.29 mmol) *N*-(3,5-Dimethylphenyl)hydroxylamin **68**, 0.28 mL (0.31 g, 3.95 mmol) Acetylchlorid und 3.30 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingesetzt.

Reaktionszeit: 1 h. - **Ausbeute:** 548 mg (3.08 mmol, 93%) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₀H₁₃NO₂. - **DC:** R_f-Wert

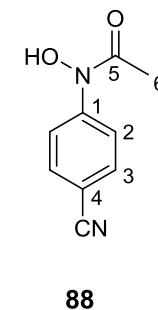
(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.67. - **Smp.:** 49 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.49 (s, 1H, OH), 7.23 (s, 2H, H-2), 6.79 (s, 1H, H-4), 2.26 (s, 6H, H-5), 2.17 (s, 3H, H-7). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 141.5 (C6), 137.3 (C1, C3), 126.1 (C2, C4), 22.4 (C5), 21.0 (C7). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3150, 3011, 2914, 2860, 1640, 1589, 1469, 1429, 1377, 1344, 1296, 1267, 1175, 1113, 1056, 1035, 997, 959, 889, 842, 809, 687, 634, 618, 601, 581, 553, 535, 514, 474, 394. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 179.0946 [M], gef.: 180.1045 [M+H]⁺.

**Versuch zur Synthese von *N*-Acetyl-*N*-(4-Cyanophenyl)hydroxamsäure 88**

Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt.

Es wurden 3.97 g (28.9 mmol) *N*-(4-Cyanophenyl)hydroxylamin **78**, 2.48 mL (2.70 g, 34.7 mmol) Acetylchlorid und 30.0 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingesetzt.

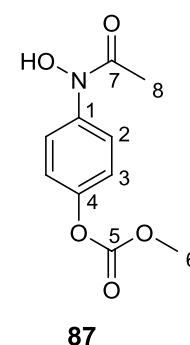
Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute:** Rohprodukt ist ein hellgelber Feststoff. - **Summenformel:** C₉H₈N₂O₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂): 0.30. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 176.0586 [M], gef.: 177.0664 [M+H]⁺.

**Versuch zur Synthese von *N*-Acetyl-*N*-(4-methoxycarbonyloxyphenyl)hydroxamsäure 87**

Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt.

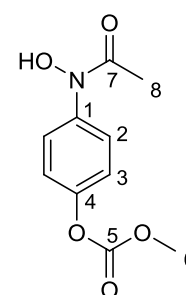
Es wurden 3.78 g (22.6 mmol) *N*-(4-Methoxycarbonyloxyphenyl)hydroxylamin **81**, 1.80 mL (1.94 g, 25.2 mmol) Acetylchlorid und 23 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingesetzt.

Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das gewünschte Produkt jedoch nicht isoliert werden.



Versuch zur Synthese von *N*-Acetyl-*N*-(4-methoxycarbonyloxyphenyl)-hydroxamsäure **87**

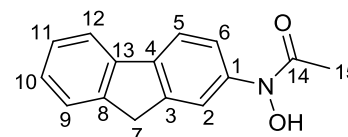
Es wurden 500 mg (2.70 mmol) *N*-(4-Methoxycarbonyloxyphenyl)-hydroxylamin **81** in 20 mL Pyridin gelöst und mit 983 mg (8.05 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin versetzt. Anschließend wurden 0.26 mL (279 mg, 2.73 mmol) Essigsäureanhydrid langsam zugetropft und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 68 Stunden gerührt. Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden.

**87**

Darstellung von *N*-Acetyl-*N*-(2-fluorenyl)hydroxamsäure **90**

Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt.

Es wurden 100 mg (0.51 mmol) *N*-(Fluorenyl)-hydroxylamin **79**, 0.04 mL (0.04 g, 0.61 mmol) Acetylchlorid und 0.5 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingesetzt.

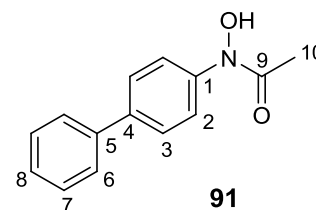
**90**

Reaktionszeit: 1 h. - **Ausbeute:** 94.6 mg (0.40 mmol, 78%) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₅H₁₃NO₂. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.64. - **Smp.:** 153.6 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.68 (s, 1H, OH), 7.88 - 7.87 (m, 3H, H-2, H-9, H-5), 7.64 - 7.62 (m, 1H, H-6), 7.58 - 7.56 (m, 1H, H-12), 7.39 - 7.36 (m, 1H, H-10), 7.31 - 7.27 (m, 1H, H-11), 3.93 (s, 2H, H-7), 2.22 (s, 3H, H-15). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 143.2 (C14), 143.0 (C1, C3, C8), 140.6 (C4), 140.5 (C13), 126.7 (C9), 126.4 (C5), 126.3 (C10, C12), 125.0 (C11), 119.7 (C6), 119.6 (C2), 36.4 (C7), 22.4 (C15). - **IR:** δ [cm⁻¹] (KBr): 3149, 2848, 1620, 1484, 1453, 1428, 1395, 1304, 1286, 1252, 1215, 1179, 1138, 1090, 1029, 1002, 945, 870, 832, 764, 727, 622. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 239.0946 [M], gef.: 240.1030 [M+H]⁺.

Darstellung von *N*-Acetyl-*N*-(4-biphenyl)hydroxamsäure **91**

Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt.

Es wurden 0.5 g (2.7 mmol) *N*-(4-Biphenyl)hydroxylamin **69**, 200 μ L (220 mg, 2.96 mmol) Acetylchlorid und 2.70 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingesetzt.

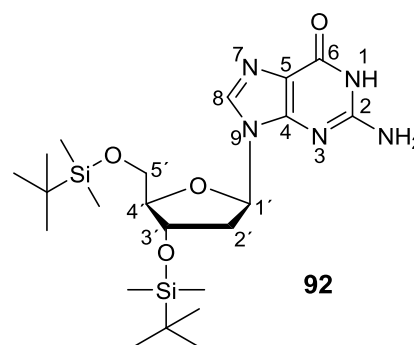


Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute:** 602 mg (2.65 mmol, 98%)

eines gelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₄H₁₃NO₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.81. - **Smp.:** 150 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.57 (s, 1H, OH), 7.62 - 7.60 (m, 2H, H-2), 7.57 - 7.54 (m, 4H, H-3, H-6), 7.36 - 7.32 (m, 2H, H-7), 7.25 - 7.23 (m, 1H, H-8), 2.12 (s, 3H, H-10). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 141.0 (C9), 139.5 (C1, C4, C5), 128.9 (C7), 127.3 (C2, C3), 126.6 (C6), 126.4 (C8), 22.61 (C10). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3325, 3200, 2953, 2928, 2899, 2856, 1671, 1637, 1571, 1513, 1470, 1447, 1388, 1323, 1253, 1227, 1190, 1088, 1018, 968, 944, 882, 775, 740, 670, 632, 531, 475, 464, 426, 402. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 227.0946 [M], gef.: 228.1019 [M+H]⁺.

Darstellung von 3',5'-*O*-Bis-(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **92**

Es wurden 10.0 g (35.1 mmol) 2'-Desoxyguanosin **40** zweimal mit je 15 mL abs. Pyridin coevaporiert. Nach Zugabe von 60 mL abs. Pyridin, 15.8 g (105 mmol) TBDMS-Chlorid und 9.50 g (140 mmol) Imidazol wurde die Reaktionslösung 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Nach beendeter Reaktion wurden 2 mL Methanol zu

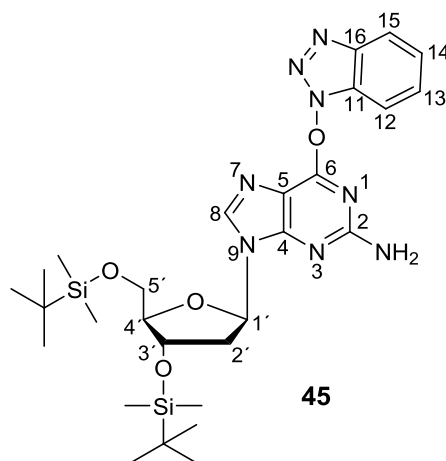
der Reaktionsmischung gegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde dreimal mit Toluol coevaporiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 20%) gereinigt.

Reaktionszeit: 18 h. - **Ausbeute:** 16.62 g (33.6 mmol, 96%) eines weißen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₂H₄₁N₅O₄Si₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.31. - **Smp.:** 261 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: - 67.0 ° (c 0.10, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.72 (s, 1H, NH), 7.87 (s, 1H,

H-8), 6.59 (s, 2H, NH₂), 6.10 (dd, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, H-1'), 4.49 (ddd, ³J_{H,H} = 2.9 Hz, ³J_{H,H} = 2.9 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, H-3'), 3.82 - 3.79 (m, 1H, H-4'), 3.72 (dddd, ²J_{H,H} = 15.6 Hz, ²J_{H,H} = 11.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, 2H, H-5'a, H-5'b), 2.67 - 2.60 (m, 1H, H-2'a), 2.24 (ddd, ²J_{H,H} = 13.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, 1H, H-2'b), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.10 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.06 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.04 (s, 3H, Si(CH₃)₂). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 156.7 (C6), 153.7 (C2), 135.1 (C8), 133.5 (C4), 130.6 (C5), 87.0 (C4'), 82.1 (C3'), 72.1 (C1'), 62.8 (C5'), 36.6 (C2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 22.3 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), 17.7 (SiC(CH₃)₃), -4.8 (Si(CH₃)₂), -5.0 (Si(CH₃)₂). - IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3163, 2951, 2926, 2855, 2737, 1689, 1602, 1536, 1484, 1381, 1026, 967, 774. - MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 495.2697 [M], gef.: 496.2789 [M+H]⁺.

O⁶-Benzotriazol-3',5'-O-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **45**

Es wurden 13.6 g (27.4 mmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-dG **92** und 25.0 g (56.8 mmol) BOP in 250 mL abs. DMF gelöst und mit 9.32 mL (7.08 g, 54.8 mmol) DIPEA versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 14 h wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst, mit Wasser extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Ethylacetat/Petrolether (1:2) gereinigt.



Reaktionszeit: 14 h. - **Ausbeute:** 13.4 g (21.93 mmol, 80%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₈H₄₄N₈O₄Si₂. - **DC:** R_f-Wert (EE/PE; 1:2 v/v): 0.28. - **Smp.:** 88 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 7.6 ° (c 0.34, CHCl₃). - ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.30 (s, 1H, H-8), 8.11 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 1H, H-14), 7.75 (d, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 1H, H-15), 7.64 (dd, ³J_{H,H} = 8.0 Hz, ³J_{H,H} = 8.0 Hz, 1H, H-12), 7.55 - 7.51 (m, 1H, H-13), 6.74 (bs, 2H, NH₂), 6.25 (dd, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 4.54 (ddd, ⁴J_{H,H} = 3.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.4 Hz, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, 1H, H-3'), 3.86 - 3.83 (m, 1H, H-4'), 3.70 (dddd, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ²J_{H,H} = 11.1 Hz, ²J_{H,H} = 15.6 Hz, 2H, H-5'a, H-5'b), 2.82 - 2.75 (m, 1H, H-2'a), 2.31 (ddd, ⁴J_{H,H} = 3.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ²J_{H,H} = 13.2 Hz, 1H,

H-2'b), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.86 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.04 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.03 (s, 3H, Si(CH₃)₂). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.1 (C6), 158.9 (C2), 156.7 (C4), 142.6 (C15), 139.7 (C8), 129.2 (C10), 128.9 (C12), 124.9 (C13), 119.3 (C14), 111.8 (C5), 109.0 (C11), 86.9 (C4'), 82.6 (C1'), 71.8 (C3'), 62.4 (C5'), 38.8 (C2'), 26.1 (SiC(CH₃)₃), 24.6 (SiC(CH₃)₃), 17.9 (SiC(CH₃)₃), 17.5 (SiC(CH₃)₃), -5.1 (Si(CH₃)₂), -6.5 (Si(CH₃)₂). - IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3400, 3207, 2954, 2929, 2896, 2857, 1640, 1572, 1515, 1471, 1445, 1431, 1402, 1321, 1280, 1257, 1227, 1191, 1110, 1091, 1020, 968, 946, 917, 883, 837, 814, 781, 743, 671, 633. - MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 612.3024 [M], gef.: 613.3102 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **94**

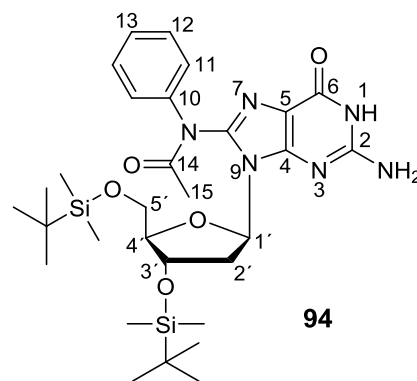
Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt.

Es wurden 5.00 g (8.17 mmol) *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **45**, 10.2 g (16.2 mmol) *N*-Acetyl-*N*-phenylhydroxamsäure **84** sowie 5.31 g (16.3 mmol) Cäsiumcarbonat eingesetzt.

Reaktionszeit: 14 h. - **Ausbeute:** 3.58 g (5.69 mmol,

70%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₃₀H₄₈N₆O₅Si₂. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 19:1 v/v): 0.17. - **Smp.:** 227 - 229 °C (Zersetzung). - **Drehwert:**

[α]_{589nm}^{23°C}: 55.5 ° (c 0.11, CHCl₃). - ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.65 (s, 1H, NH), 7.62 - 7.60 (m, 2H, H-11), 7.36 - 7.33 (m, 2H, H-12), 7.15 - 7.12 (m, 1H, H-13), 6.40 (bs, 2H, NH₂), 6.09 - 5.90 (m, 1H, H-1'), 4.58 - 4.49 (m, 1H, H-3'), 3.75 - 3.66 (m, 4H, H-2'a, H-4', H-5'a, H-5'b), 3.17 - 3.06 (m, 1H, H-2'b), 2.19 (s, 3H, H-15), 0.86 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.80 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.07 - 0.06 (m, 6H, Si(CH₃)₂), -0.04 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 170.2 (C14), 156.2 (C2, C6), 153.5 (C4), 141.6 (C10), 128.6 (C8), 122.9 (C12), 118.9 (C13), 118.7 (C11), 115.1 (C5), 87.3 (C4'), 83.2 (C1'), 72.2 (C3'), 63.8 (C5'), 38.9 (C2'), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 25.5 (SiC(CH₃)₃), 22.4 (C-15), 17.8 (SiC(CH₃)₃), 17.5 (SiC(CH₃)₃), -5.4 (Si(CH₃)₂), -5.5 (Si(CH₃)₂). - IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3165, 2953, 2929, 2856, 1700, 1683, 1633, 1609, 1572, 1542, 1497, 1369, 1327, 1287, 1252, 1080, 1060, 1032, 835, 810, 776, 712, 691, 666. - MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 628.3225 [M], gef.: 629.3303 [M+H]⁺.



Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **95**

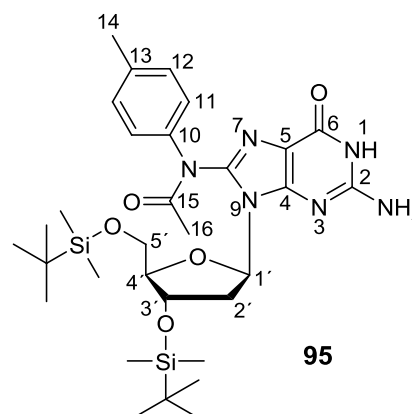
Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt.

Es wurden 4.01 g (6.55 mmol) *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **45**, 2.16 g (13.1 mmol) *N*-Acetyl-*N*-(4-methylphenyl)-hydroxamsäure **85** sowie 4.25 g (13.0 mmol) Cäsiumcarbonat eingesetzt.

Reaktionszeit: 24 h. - **Ausbeute:** 3.29 g (5.12 mmol, 78%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:**

C₃₁H₅₀N₆O₅Si₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.33. - **Smp.:** 175 °C. -

Drehwert: $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23^\circ\text{C}}$: 84 ° (c 0.64, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.82 (bs, 1H, NH), 7.29 - 7.11 (m, 4H, H-11, H-12), 6.39 (s, 2H, NH₂), 5.99 - 5.97 (m, 1H, H-1'), 4.53 - 4.46 (m, 1H, H-3'), 3.84 - 3.61 (m, 3H, H4', H-5'a, H-5'b), 3.17 - 3.16 (m, 1H, H-2'a), 2.29 (s, 3H, H-14), 2.10 - 2.08 (m, 1H, H-2'b), 1.99 (s, 3H, H-16), 0.86 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.08 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.06 (s, 3H, Si(CH₃)₂), -0.04 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 169.2 (C15), 156.2 (C6, C2), 152.3 (C4), 138.3 (C10), 129.1 (C13), 128.9 (C8), 117.2 (C11, C12), 113.1 (C5), 87.3 (C4'), 87.0 (C1'), 72.3 (C3'), 63.1 (C5'), 37.9 (C2'), 25.7, 25.6 (SiC(CH₃)₃), 20.5 (C16), 17.5 (C14, SiC(CH₃)₃), -4.8 (Si(CH₃)₂), -4.9 (Si(CH₃)₂), -5.4 (Si(CH₃)₂), -5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3151, 2928, 2856, 1703, 1631, 1602, 1542, 1509, 1463, 1434, 1365, 1317, 1285, 1251, 1184, 1080, 1029, 956, 833, 812, 775, 729, 681, 601, 542, 506, 401. - **MS:** (EI, m/z): ber.: 642.3381 [M], gef.: 643.3454 [M+H]⁺.



95

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **96**

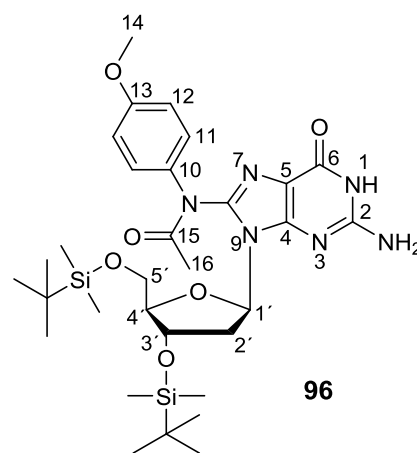
Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt.

Es wurden 845 mg (1.38 mmol) *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **45**, 500 mg (2.76 mmol) *N*-Acetyl-*N*-(4-methoxyphenyl)-hydroxamsäure **86** sowie 900 mg (2.76 mmol) Cäsiumcarbonat eingesetzt.

Reaktionszeit: 22 h. - **Ausbeute:** 649 mg (0.99 mmol, 72%) eines hellbraunen Feststoffs. -

Summenformel: C₃₁H₅₀N₆O₆Si₂. - **DC:** R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.18. - **Smp.:** 156 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23^\circ\text{C}}$: 52 ° (c 0.22, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.82 (bs, 1H, NH), 7.55 - 7.10 (m, 2H, H-12), 6.94 (bs, 2H, H-11), 6.35 (s, 2H, NH₂), 6.01 (s, 1H, H-1'), 4.54 (s, 1H, H-3'), 3.88 - 3.60 (m, 8H, H-14, H-4', H-5'a, H-5'b, H-2'a, H-2'b), 1.97 (s, 3H, H-16), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.09 (bs, 6H, Si(CH₃)₂), 0.04 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 176.2 (C15), 156.2 (C2, C6), 153.1 (C4), 140.7 (C10), 131.0 (C8), 120.8 (C12), 115.0 (C11, C13), 114.2 (C5), 87.3 (C4'), 83.4 (C1'), 72.3 (C3'), 63.2 (C5'), 55.3 (C14), 31.4 (C2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 23.7 (C-16), 17.9 (SiC(CH₃)₃), 17.6 (SiC(CH₃)₃), - 5.4 (Si(CH₃)₂), - 5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3145, 2952, 2928, 2855, 1702, 1632, 1606, 1569, 1541, 1508, 1462, 1435, 1365, 1316, 1287, 1246, 1181, 1105, 1081, 1060, 1029, 1006, 947, 830, 775, 731, 712, 682, 665, 626, 600, 552, 528, 402. - **MS:** (EI, m/z): ber.: 658.3330 [M], gef.: 659.3402 [M+H]⁺.



Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **98**

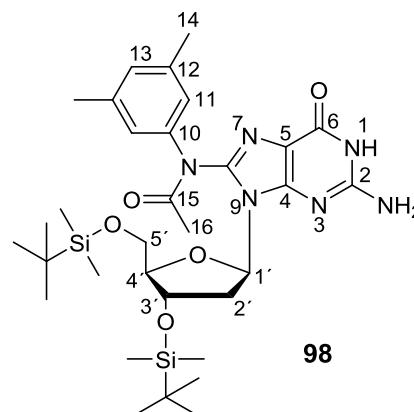
Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt.

Es wurden 5.01 g (8.18 mmol) *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **45**, 2.96 g (16.5 mmol) *N*-Acetyl-*N*-(3,5-dimethylphenyl)-hydroxamsäure **89** sowie 5.35 g (16.4 mmol) Cäsiumcarbonat eingesetzt.

Reaktionszeit: 20 h. - **Ausbeute:** 4.88 g (7.44 mmol, 91%) eines orangen Feststoffs. - **Summenformel:**

C₃₂H₅₂N₆O₅Si₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.56. - **Smp.:** 165 °C

(Zersetzung). - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 93.6 ° (c 0.21, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.83 (bs, 1H, NH), 6.94 (s, 3H, H-11, H-13), 6.37 (s, 2H, NH₂), 5.99 (s, 1H, H-1'), 4.54 (s, 1H, H-3'), 3.76 - 3.60 (m, 5H, H-4', H-5'a, H-5'b, H-2'a, H-2'b), 2.25 (s, 6H, H-14), 2.00 (s, 3H, H-16), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.09 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.03 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 176.2 (C15), 156.2 (C2, C6), 150.6 (C4), 140.6 (C10), 138.4 (C8), 123.6 (C12), 115.0 (C5, C11, C13), 87.3 (C4'), 83.4 (C1'), 72.5 (C3'), 63.1 (C5'), 31.4 (C2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 22.5 (C14, SiC(CH₃)₃), 21.0 (C16), 17.8 (SiC(CH₃)₃), - 5.5 (SiC(CH₃)₂), - 5.6 (SiC(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3151, 2928, 2855, 1705, 1683, 1631, 1602, 1541, 1471, 1365, 1311, 1252, 1185, 1107, 1078, 1030, 958, 833, 775, 711, 674. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 656.3538 [M], gef.: 657.3612 [M+H]⁺.



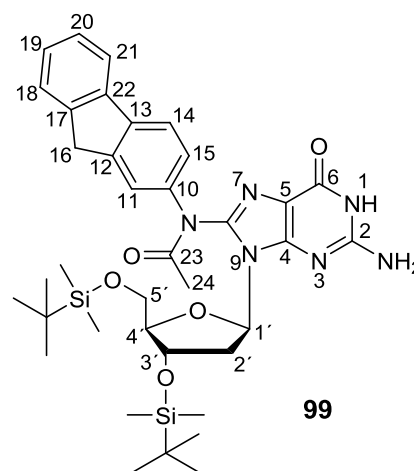
98

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **99**

Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt.

Es wurden 5.01 g (8.18 mmol) *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **45**, 3.89 g (16.2 mmol) *N*-Acetyl-*N*-(2-fluorenyl)hydroxamsäure **90** sowie 5.35 g (16.3 mmol) Cäsiumcarbonat eingesetzt.

Reaktionszeit: 20 h. - **Ausbeute:** 4.88 g (7.77 mmol, 95%) eines braunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₃₇H₅₂N₆O₅Si₂. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1



v/v): 0.66. - **Smp.:** 155 °C (Zersetzung). - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 207 ° (c 0.52, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.25 (s, 1H, NH), 7.84 - 7.92 (m, 3H, H_{arom.}), 7.63 - 7.65 (m, 1H, H_{arom.}), 7.56 - 7.58 (m, 1H, H_{arom.}), 7.35 - 7.39 (m, 1H, H_{arom.}), 7.27 - 7.32 (m, 1H, H_{arom.}), 6.76 (s, 2H, NH₂), 6.10 (dd, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, H-1'), 4.48 (q, ⁴J_{H,H} = 2.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.9 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, H-3'), 3.92 (s, 2H, H-16), 3.79 - 3.82 (m, 1H, H-4'), 3.60 - 3.72 (m, 2H, H-5'a + H-5'b), 2.61 - 2.67 (m, 1H, H-2'a), 2.20 - 2.23 (m, 1H, H-2'b), 2.06 (s, 3H, H-24), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.10 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.04 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 170.7 (C23), 156.6 (C2, C4, C6), 140.6 (C10, C12, C13, C17, C22), 127.5 (C8), 126.7 (C18), 125.5 (C14), 125.0 (C19, C20, C21), 124.9 (C11, C15), 116.5 (C5), 87.7 (C4'), 86.8 (C1'), 72.7 (C3'), 62.7 (C5'), 36.8 (C2'), 36.4 (C16), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 23.9 (C24), 17.9 (SiC(CH₃)₃), - 5.0 (Si(CH₃)₂), - 5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3150, 2928, 2855, 1701, 1579, 1540, 1487, 1456, 1406, 1366, 1286, 1251, 1107, 1078, 1029, 1005, 953, 833, 777, 731, 667. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 716.3538, gef.: 717.3610 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **100**

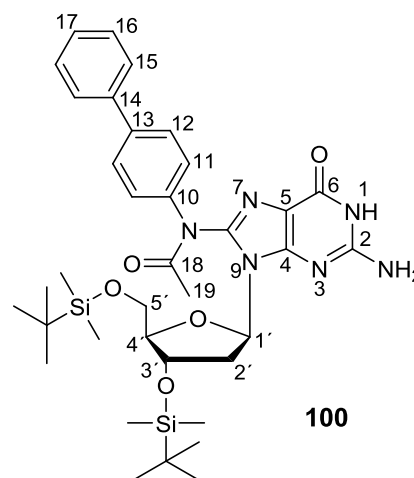
Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt.

Es wurden 2.43 g (3.97 mmol) *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **45**, 1.80 g (7.93 mmol) *N*-Acetyl-*N*-(4-biphenyl)hydroxamsäure **91** sowie 2.60 g (7.98 mmol) Cäsiumcarbonat eingesetzt.

Reaktionszeit: 13.5 h. - **Ausbeute:** 2.14 g (3.04 mmol, 77%) eines hellbraunen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** C₃₆H₅₂N₆O₅Si₂. - **DC:**

R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 19:1 v/v): 0.28. - **Smp.:** 235 °C (Zersetzung). - **Drehwert:**

[α]_{589nm}^{23°C}: 79 ° (c 0.53, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.84 (s, 1H, NH), 7.71 - 7.67 (m, 4H, H-12, H-15), 7.67 - 7.61 (m, 2H, H-11), 7.51 - 7.42 (m, 2H, H-16), 7.41 - 7.32 (m, 1H, H-17), 6.40 (s, 2H, NH₂), 5.91 - 6.13 (m, 1H, H-1'), 4.69 - 4.42 (m, 1H, H-3'), 3.87 - 3.56 (m, 3H, H-4', H-5'a, H-5'b), 3.16 (m, 2H, H-2'a, H2'b), 2.05 (s, 3H, H-19), 0.85 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.79 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 169.5 (C18), 156.2 (C2, C4, C6), 139.5 (C10, C13, C14), 129.0 (C15, C16), 127.6 (C5, C8), 126.6 (C11), 126.4 (C12), 124.9 (C17), 87.3 (C4'), 83.3 (C1'), 72.2 (C3'), 63.3 (C5'), 36.0 (C2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 22.8 (C19, SiC(CH₃)₃), 5.4 Si(CH₃)₂), 5.5 Si(CH₃)₂), -4.8 Si(CH₃)₂), -5.3 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3668, 3312, 3150, 2954, 2928, 2857, 1987, 1928, 1701, 1682, 1636, 1594, 1573, 1511, 1471, 1448, 1339, 1284, 1253, 1190, 1103, 1078, 1027, 1007, 970, 945, 881, 693, 632, 576, 555, 532, 502, 475, 464, 430, 403. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 704.3538 [M], gef.: 705.3612 [M+H]⁺.



100

Darstellung von C8-(N-Acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosin 104

Die Reaktion wurde nach AAV 4.1 durchgeführt.

Es wurden 1.50 g (2.39 mmol) C8-(N-Acetyl)-phenyl-3',5'-
O-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **94**,

3.36 mL (2.45 g, 24.2 mmol) Triethylamin und 4.90 mL
(4.85 g, 30.0 mmol) Triethylamintrihydrofluorid eingesetzt.

Reaktionszeit: 15 h. - **Ausbeute:** 953 mg (2.38 mmol,

99%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₈H₂₀N₆O₅. - **DC:** R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.68. - **Smp.:** 134 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 55 ° (c 0.29,

CH₂Cl₂/CH₃OH 1:1). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.83 (s, 1H, NH),

7.50 - 7.35 (m, 5H, H-11, H-12, H-13), 6.44 (bs, 2H, NH₂), 6.10 - 6.04 (m, 1H, H-1'),

5.24 (bs, 1H, 3'-OH), 4.96 (bs, 1H, 5'-OH), 4.40 - 4.35 (m, 1H, H-3'), 3.83 - 3.80 (m,

1H, H-4'), 3.67 - 3.53 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.18 - 3.16 (m, 1H, H-2'a), 2.21 - 2.17 (m,

1H, H-2'b), 2.02 (s, 3H, H-15). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 176.7

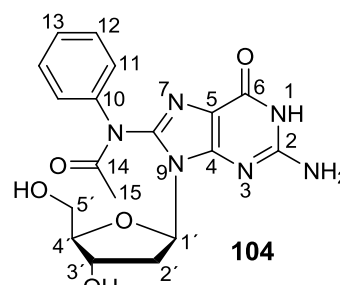
(C14), 159.3, 159.2 (C2, C6), 153.4 (C4), 146.9 (C5, C10), 128.9 (C8), 126.1 (C12),

125.0 (C11, C13), 87.9 (C4'), 83.6 (C1'), 71.3 (C3'), 62.3 (C5'), 45.5 (C2'), 22.3

(C15). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3305, 3160, 2933, 1681, 1632, 1592, 1538, 1367, 1052,

693. - **UV:** λ_{max} [nm] MeCN: 268. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 400.1495 [M], gef.:

401.1574 [M+H]⁺.

**Darstellung von C8-(N-Acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosin 104**

Die Reaktion wurde nach AAV 4.2 durchgeführt.

Es wurden 1.00 g (1.50 mmol) C8-(N-Acetyl)-phenyl-3',5'-
O-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **94**,

1.37 mL (1.25 g, 4.77 mmol) Tetra-*n*-butyl-ammonium-
fluorid und 600 μ L (573 mg, 9.54 mmol) Essigsäure (99%)
eingesetzt.

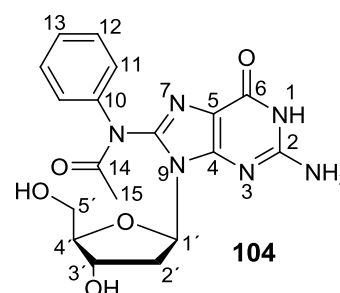
Reaktionszeit: 12 h. - **Ausbeute:** 568 mg (1.42 mmol, 89%) eines gelben Feststoffs.

- **Summenformel:** C₁₈H₂₀N₆O₅. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.68. -

Smp.: 134 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 55 ° (c 0.29, CH₂Cl₂/CH₃OH 1:1). - **¹H-NMR:** δ

[ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.83 (s, 1H, NH), 7.50 - 7.35 (m, 5H, H-11, H-12, H-

13), 6.44 (bs, 2H, NH₂), 6.10 - 6.04 (m, 1H, H-1'), 5.24 (bs, 1H, 3'-OH), 4.96 (bs, 1H,

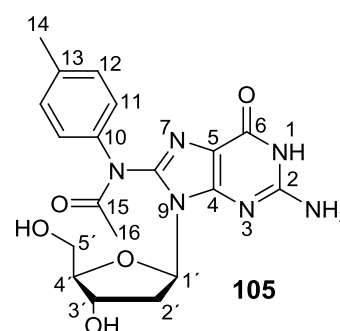


5'-OH), 4.40 - 4.35 (m, 1H, H-3'), 3.83 - 3.80 (m, 1H, H-4'), 3.67 - 3.53 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.18 - 3.16 (m, 1H, H-2'a), 2.21 - 2.17 (m, 1H, H-2'b), 2.02 (s, 3H, H-15). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 176.7 (C14), 159.3, 159.2 (C2, C6), 153.4 (C4), 146.9 (C5, C10), 128.9 (C8), 126.1 (C12), 125.0 (C11, C13), 87.9 (C4'), 83.6 (C1'), 71.3 (C3'), 62.3 (C5'), 45.5 (C2'), 22.3 (C15). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3305, 3160, 2933, 1681, 1632, 1592, 1538, 1367, 1052, 693. - **UV**: λ_{\max} [nm] MeCN: 268. - **MS**: (FAB-HR, m/z): ber.: 400.1495 [M], gef.: 401.1574 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin 105

Die Reaktion wurde nach AAV 4.1 durchgeführt.

Es wurden 2.70 g (4.20 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **95**, 5.82 mL (4.25 g, 42.0 mmol) Triethylamin und 8.55 mL (8.46 g, 52.5 mmol) Triethylamintrihydro-fluorid eingesetzt.



Reaktionszeit: 17 h. - **Ausbeute**: keine Bestimmung

möglich; gelber Feststoff. - **Summenformel**: C₁₉H₂₂N₆O₅. - **DC**: R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.30. - **Smp.**: 175 °C. - **Drehwert**: $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 84 ° (c 0.64,

CHCl₃). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.51 (bs, 1H, NH), 7.44 - 7.23 (m,

4H, H-11, H-12), 6.73 (bs, 2H, NH₂), 6.06 - 6.01 (m, 1H, H-1'), 5.31 (s, 1H, 3'-OH),

4.43 - 4.33 (m, 1H, H-3'), 3.92 (s, 1H, 5'-OH), 3.82 - 3.80 (m, 1H, H-4'), 3.66 - 3.48

(m, 3H, H-2'a, H-5'a, H-5'b), 2.37 - 2.34 (m, 1H, H-2'b), 2.30 (s, 3H, H-14), 1.99 (s,

3H, H-16). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 176.4 (C15), 156.3 (C2, C6),

153.9 (C4), 149.1 (C5, C10), 128.8 (C8), 125.1 (C12), 120.0 (C11, C13), 88.1 (C4'),

82.5 (C1'), 71.2 (C3'), 62.2 (C5'), 48.6 (C2'), 20.5 (C16), 20.2 (C14). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]

(ATR): 3340, 3231, 1684, 1647, 1601, 1568, 1540, 1510, 1474, 1396, 1369, 1320,

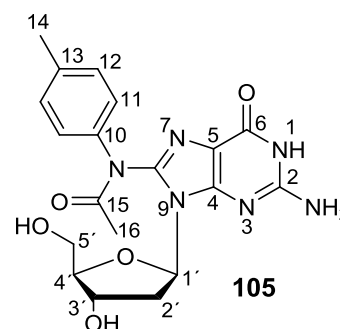
1286, 1176, 1102, 1038, 786, 712, 645, 581, 538, 474. - **UV**: λ_{\max} [nm] MeCN: 267. -

MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 414.1652 [M], gef.: 415.1722 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin 105

Die Reaktion wurde nach AAV 4.2 durchgeführt.

Es wurden 3.28 g (5.11 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **95**, 8.80 mL (8.04 g, 30.7 mmol) Tetra-*n*-butylammoniumfluorid und 3.88 mL (3.68 g, 61.3 mmol) Essigsäure (99%) eingesetzt.



Reaktionszeit: 17 h. - **Ausbeute:** 2.04 g (4.93 mmol,

96%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₉H₂₂N₆O₅. - **DC:** R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.30. - **Smp.:** 175 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23^\circ\text{C}}$: 84 ° (c 0.64,

CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.51 (bs, 1H, NH), 7.44 - 7.23 (m,

4H, H-11, H-12), 6.73 (bs, 2H, NH₂), 6.06 - 6.01 (m, 1H, H-1'), 5.31 (s, 1H, 3'-OH),

4.43 - 4.33 (m, 1H, H-3'), 3.92 (s, 1H, 5'-OH), 3.82 - 3.80 (m, 1H, H-4'), 3.66 - 3.48

(m, 3H, H-2'a, H-5'a, H-5'b), 2.37 - 2.34 (m, 1H, H-2'b), 2.30 (s, 3H, H-14), 1.99 (s,

3H, H-16). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 176.4 (C15), 156.3 (C2, C6),

153.9 (C4), 149.1 (C5, C10), 128.8 (C8), 125.1 (C12), 120.0 (C11, C13), 88.1 (C4'),

82.5 (C1'), 71.2 (C3'), 62.2 (C5'), 48.6 (C2'), 20.5 (C16), 20.2 (C14). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]

(ATR): 3340, 3231, 1684, 1647, 1601, 1568, 1540, 1510, 1474, 1396, 1369, 1320,

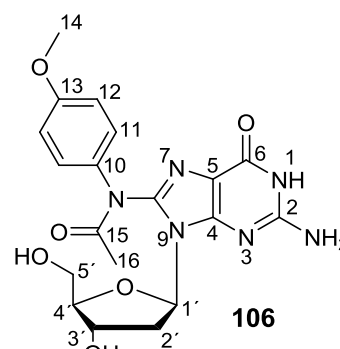
1286, 1176, 1102, 1038, 786, 712, 645, 581, 538, 474. - **UV:** λ_{max} [nm] MeCN: 267. -

MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 414.1652 [M], gef.: 415.1722 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin 106

Die Reaktion wurde nach AAV 4.2 durchgeführt.

Es wurden 2.25 g (3.41 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **96**, 5.88 mL (5.60 g, 21.4 mmol) Tetra-*n*-butylammoniumfluorid und 2.35 mL (2.47 g, 41.1 mmol) Essigsäure (99%) eingesetzt.



Reaktionszeit: 20 h. - **Ausbeute:** 1.31 g (3.04 mmol,

89%) eines farblosen Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₉H₂₂N₆O₆. - **DC:** R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.61. - **Smp.:** 155 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23^\circ\text{C}}$: 65 ° (c 0.45,

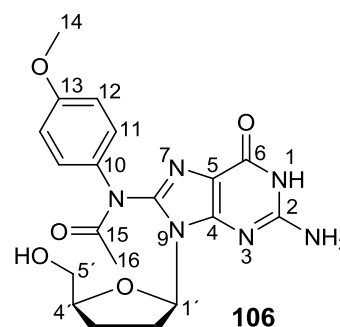
CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.85 (bs, 1H, NH), 7.54 - 7.16 (m,

2H, H-12), 6.98 (bs, 2H, H-11), 6.47 (bs, 2H, NH₂), 6.07 (s, 1H, H-1'), 5.21 (bs, 1H, OH), 4.94 (bs, 1H, OH), 4.37 (s, 1H, H-3'), 3.83 (bs, 1H, H-4'), 3.76 (s, 3H, H-14), 3.70 - 3.58 (m, 1H, H-5'a), 3.57 - 3.46 (m, 1H, H-5'b), 3.19 - 3.13 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 2.00 (s, 3H, H-16). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 172.7 (C15), 156.2 (C4), 153.5 (C2, C6), 138.5 (C10, C12), 128.0 (C8), 114.9 (C11, C13), 125.0 (C5), 88.2 (C4'), 85.2 (C1'), 71.2 (C3'), 62.1 (C5'), 57.5 (C2'), 23.1 (C14), 21.2 (C16). - IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3317, 3155, 2931, 1676, 1630, 1596, 1540, 1507, 1438, 1399, 1366, 1320, 1285, 1246, 1171, 1099, 1084, 1053, 1028, 987, 965, 946, 835, 814, 782, 728, 686, 600, 583, 542, 452. - UV: λ_{\max} [nm] MeCN: 262. - MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 430.1601 [M], gef.: 431.1664 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin 106

Die Reaktion wurde nach AAV 4.1 durchgeführt.

Es wurden 2.53 g (3.85 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **96**, 5.41 mL (3.90 g, 38.5 mmol) Triethylamin und 2.01 mL (2.11 g, 48.1 mmol) Triethylamintrihydrofluorid eingesetzt.



Reaktionszeit: 20 h. - **Ausbeute:** 0.81 g (1.88 mmol,

49%) eines farblosen Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₉H₂₂N₆O₆. - **DC:** R_f-Wert

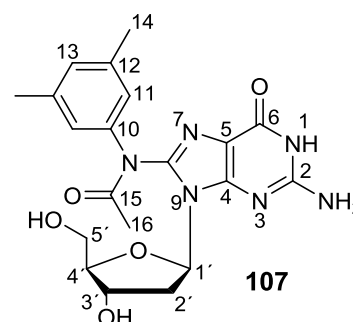
(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.61. - **Smp.:** 155 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23^\circ\text{C}}$: 65 ° (c 0.45,

CHCl₃). - ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.85 (bs, 1H, NH), 7.54 - 7.16 (m, 2H, H-12), 6.98 (bs, 2H, H-11), 6.47 (bs, 2H, NH₂), 6.07 (s, 1H, H-1'), 5.21 (bs, 1H, 3'-OH), 4.94 (bs, 1H, 5'-OH), 4.37 (s, 1H, H-3'), 3.83 (bs, 1H, H-4'), 3.76 (s, 3H, H-14), 3.70 - 3.58 (m, 1H, H-5'a), 3.57 - 3.46 (m, 1H, H-5'b), 3.19 - 3.13 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 2.00 (s, 3H, H-16). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 172.7 (C15), 156.2 (C4), 153.5 (C2, C6), 138.5 (C10, C12), 128.0 (C8), 114.9 (C11, C13), 125.0 (C5), 88.2 (C4'), 85.2 (C1'), 71.2 (C3'), 62.1 (C5'), 57.5 (C2'), 23.1 (C14), 21.2 (C16). - IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3317, 3155, 2931, 1676, 1630, 1596, 1540, 1507, 1438, 1399, 1366, 1320, 1285, 1246, 1171, 1099, 1084, 1053, 1028, 987, 965, 946, 835, 814, 782, 728, 686, 600, 583, 542, 452. - UV: λ_{\max} [nm] MeCN: 262. - MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 430.1601 [M], gef.: 431.1664 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin 107

Die Reaktion wurde nach AAV 4.1 durchgeführt.

Es wurden 2.66 g (4.05 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **98**, 5.52 mL (4.03 g, 39.8 mmol) Triethylamin und 7.92 mL (7.83 g, 48.6 mmol) Triethylamintrihydrofluorid eingesetzt.

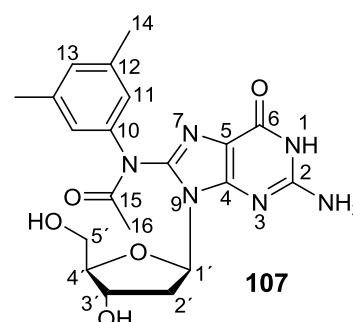


Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** keine Ausbeutebestimmung möglich. - **Summenformel:** C₂₀H₂₄N₆O₅. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.18. - **Smp.:** 194.3 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23^\circ\text{C}}$: 5.0 ° (c 0.5, CH₂Cl₂/CH₃OH 1:1). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.81 (s, 1H, NH), 6.96 (bs, 3H, H-11, H-13), 6.41 (bs, 2H, NH₂), 6.04 (s, 1H, H-1'), 5.25 (d, 1H, ³J_{H,H} = 4.1 Hz, 3'-OH), 4.96 (s, 1H, 5'-OH), 4.38 - 4.34 (m, 1H, H-3'), 4.10 (s, 1H, H-2'a), 3.83 (s, 1H, H-4'), 3.66 - 3.64 (m, 1H, H-5'a), 3.53 - 3.51 (m, 1H, H-5'b), 2.96 - 2.91 (m, 1H, H-2'b), 2.26 (s, 6H, H-14), 2.00 (s, 3H, H-16). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 156.1 (C15), 153.3 (C2, C6), 148.0 (C4), 138.4 (C10, C12), 128.0 (C8), 125.9 (C11, C13), 125.0 (C5), 88.5 (C4'), 84.3 (C1'), 71.5 (C3'), 62.5 (C5'), 49.0 (C2'), 22.9 (C14), 21.2 (C16). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3432, 3070, 2976, 2939, 2803, 2679, 2492, 1691, 1475, 1434, 1399, 1170, 1071, 1038, 852, 739, 640, 482. - **UV:** λ_{max} [nm] MeCN: 263. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 428.1808 [M], gef.: 429.1477 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin 107

Die Reaktion wurde nach AAV 4.2 durchgeführt.

Es wurden 3.06 g (4.66 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **98**, 7.65 mL (7.29 g, 27.9 mmol) Tetra-*n*-butylammoniumfluorid und 3.20 mL (3.36 g, 55.9 mmol) Essigsäure (99%) eingesetzt.



Reaktionszeit: 20 h. - **Ausbeute:** 1.77 g (4.13 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₀H₂₄N₆O₅. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.18. - **Smp.:** 195 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23^\circ\text{C}}$: 5.0 ° (c 0.5, CH₂Cl₂/CH₃OH; 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 10.82 (bs, 1H,

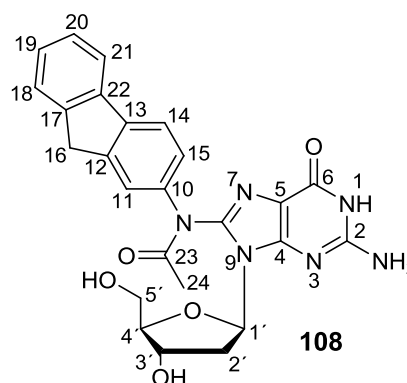
NH), 6.96 (bs, 3H, H-13, H-11), 6.49 (bs, 2H, NH₂), 6.10 - 5.98 (m, 1H, H-1'), 5.03 (bs, 2H, 3'-OH, 5'-OH), 4.38 (s, 1H, H-3'), 3.83 (s, 1H, H-4'), 3.65 (dd, ²J_{H,H} = 11.5 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, H-5'a), 3.65 (dd, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, H-5'b), 3.20 - 3.11 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 2.27 (s, 6H, H-14), 2.00 (s, 3H, H-16). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 156.2 (C15), 153.5 (C2, C6), 142.0 (C4), 138.5 (C10, C12), 128.0 (C8), 125.9 (C11, C13), 125.0 (C5), 88.1 (C4'), 84.0 (C1'), 71.1 (C3'), 62.1 (C5'), 57.5 (C2'), 23.0 (C14), 21.3 (C16). - IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3325, 3148, 2923, 2874, 1677, 1632, 1592, 1539, 1434, 1398, 1366, 1303, 1280, 1260, 1100, 1084, 1053, 989, 966, 852, 835, 781, 715, 691, 674, 600, 561, 542, 450, 434, 403. - UV: λ_{\max} [nm] MeCN: 263. - MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 428.1808 [M], gef.: 429.1477 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-2'-desoxyguanosin 108

Die Reaktion wurde nach AAV 4.1 durchgeführt.

Es wurden 2.24 g (3.57 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **99**, 4.95 mL (3.61 g, 35.7 mmol) Triethylamin und 6.98 mL (6.90 g, 42.8 mmol) Triethylamintrihydrofluorid eingesetzt.

Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** keine Ausbeutebestimmung möglich. - **Summenformel:** C₂₅H₂₄N₆O₅.



- **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.18. - **Smp.:** 199 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23^\circ\text{C}}$: 4.3 ° (c 0.5, CH₂Cl₂/CH₃OH; 1:1 v/v). - ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.86 (s, 1H, NH), 7.94 - 7.89 (m, 2H, H_{arom.}), 7.59 - 7.58 (m, 2H, H_{arom.}), 7.40 - 7.31 (m, 3H, H_{arom.}), 6.44 (s, 2H, NH₂), 6.13 (s, 1H, H-1'), 5.23 (s, 1H, 3'-OH), 4.97 (s, 1H, 5'-OH), 4.40 (s, 1H, H-3'), 3.95 (s, 2H, H-16), 3.85 (s, 1H, H-4'), 3.65 - 3.53 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.17 (d, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 2H, H-2'a, H-2'b), 2.06 (s, 3H, H-24). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 161.8 (C23), 156.2 (C6), 153.4 (C2), 150.3 (C4), 143.3 (C10, C12, C13), 140.1 (C17, C22), 127.0 (C8), 126.8 (C14, C18), 125.1 (C19, C20, C21), 120.5 (C11), 120.2 (C15), 115.1 (C5), 88.1 (C4'), 84.0 (C1'), 71.1 (C3'), 62.1 (C5'), 40.6 (C2'), 36.4 (C16), 22.7 (C24). - IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr): 3431, 3070, 2976, 2939, 2739, 2679, 2492, 1691, 1605, 1475, 1434, 1399, 1170, 1038, 739, 482. - UV: λ_{\max} [nm] MeCN: 276. - MS: (FAB-HR, m/z): ber.: 488.1808 [M], gef.: 489.1873 [M+H]⁺.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-2'-desoxyguanosin **108**

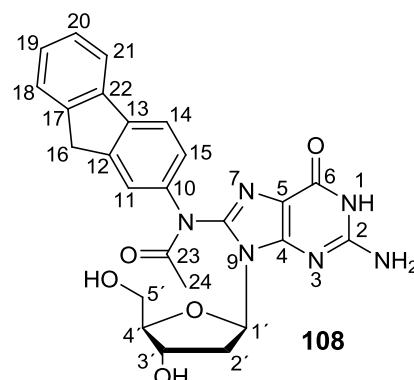
Die Reaktion wurde nach AAV 4.2 durchgeführt.

Es wurden 1.92 g (2.69 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **99**, 4.63 mL (4.23 g, 16.1 mmol) Tetra-*n*-butylammoniumfluorid und 2.04 mL (1.94 g, 32.3 mmol) Essigsäure (99%) eingesetzt.

Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 1.25 g (2.54 mmol, 94%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:**

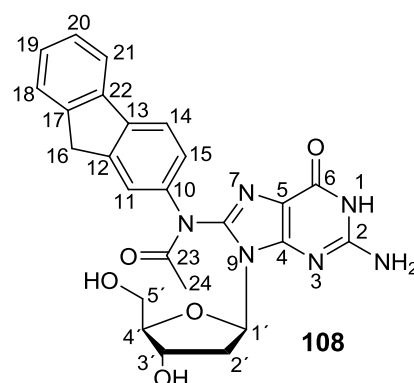
C₂₅H₂₄N₆O₅. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.18. - **Smp.:** 199 °C. -

Drehwert: $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 4.3 ° (c 0.5, CH₂Cl₂/CH₃OH; 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.86 (s, 1H, NH), 7.94 - 7.89 (m, 2H, H_{arom.}), 7.59 - 7.58 (m, 2H, H_{arom.}), 7.40 - 7.31 (m, 3H, H_{arom.}), 6.44 (s, 2H, NH₂), 6.13 (s, 1H, H-1'), 5.23 (s, 1H, 3'-OH), 4.97 (s, 1H, 5'-OH), 4.40 (s, 1H, H-3'), 3.95 (s, 2H, H-16), 3.85 (s, 1H, H-4'), 3.65 - 3.53 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.17 (d, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 2H, H-2'a, H-2'b), 2.06 (s, 3H, H-24). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 161.8 (C23), 156.2 (C6), 153.4 (C2), 150.3 (C4), 143.3 (C10, C12, C13), 140.1 (C17, C22), 127.0 (C8), 126.8 (C14, C18), 125.1 (C19, C20, C21), 120.5 (C11), 120.2 (C15), 115.1 (C5), 88.1 (C4'), 84.0 (C1'), 71.1 (C3'), 62.1 (C5'), 40.6 (C2'), 36.4 (C16), 22.7 (C24). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr): 3431, 3070, 2976, 2939, 2739, 2679, 2492, 1691, 1605, 1475, 1434, 1399, 1170, 1038, 739, 482. - **UV:** λ_{max} [nm] MeCN: 276. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 488.1808 [M], gef.: 489.1873 [M+H]⁺.



Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-2'-desoxyguanosin **108**

Es wurden 200 mg (0.28 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **99** in 20 mL abs. THF gelöst und mit 230 µL (220 mg, 2.79 mmol) Pyridin sowie 250 µL (277 mg, 2.79 mmol) eines Pyridin*HF*Komplexes versetzt. Nach 16stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit 370 µL (280 mg,



2.70 mmol) Methoxytrimethylsilan versetzt und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach destillativem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 15%) gereinigt. Das gewünschte Produkt **108** konnte nicht erhalten werden.

Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-2'-desoxyguanosin **109**

Die Reaktion wurde nach AAV 4.2 durchgeführt.

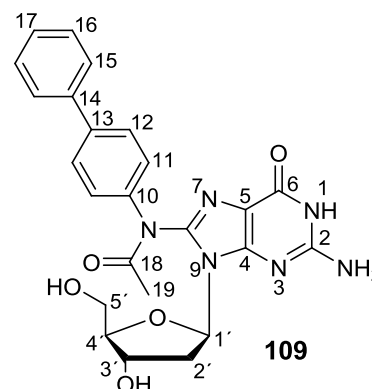
Es wurden 1.40 g (1.99 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-3',5'-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin

100, 3.50 mL (3.20 g, 12.0 mmol) Tetra-*n*-butylammonium-fluorid und 1.40 mL (1.50 g, 24.0 mmol) Essigsäure (99%) eingesetzt.

Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 1.31 g (1.37 mmol, 69%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:**

C₂₄H₂₄N₆O₅. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.31. - **Smp.:** 91 °C. -

Drehwert: $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23\text{C}}$: 48.6 ° (c 1.05, CH₂Cl₂/CH₃OH; 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.73 (bs, 1H, NH), 7.75 - 7.70 (m, 4H, H-12, H-15), 7.69 - 7.65 (m, 2H, H-11), 7.49 - 7.44 (m, 2H, H-16), 7.40 - 7.34 (m, 1H, H-17), 6.84 (s, 2H, NH₂), 6.10 (m, 1H, H-1'), 5.19 (bs, 1H, 3'-OH), 4.80 (bs, 1H, 5'-OH), 4.38 (s, 1H, H-3'), 3.83 (s, 1H, H-4'), 3.64 (dd, ²J_{H,H} = 10.9 Hz, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, H-5'a), 3.55 - 3.45 (m, 1H, H-5'b), 2.97 (s, 1H, H-2'a), 2.06 (s, 3H, H-19). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 173.2 (C18), 156.6 (C6), 154.1 (C2), 150.4 (C4), 139.2 (C10, C13, C14), 129.0, 127.7 (C15, C16), 127.5 (C5, C8), 126.7 (C11, C12), 125.5 (C17), 88.2 (C1'), 84.0 (C4'), 71.2 (C3'), 62.1 (C5'), 36.9 (C2'), 22.3 (C19). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3675, 3304, 2962, 2927, 2001, 1897, 1685, 1635, 1594, 1539, 1513, 1486, 1448, 1367, 1322, 1281, 1101, 1080, 1054, 1007, 965, 850, 765, 732, 693, 601, 442, 387. - **UV:** λ_{max} [nm] MeCN: 270. - **MS:** (ESI-HR, m/z): ber.: 476.1808 [M], gef.: 477.1886 [M+H]⁺.



Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosin **110**

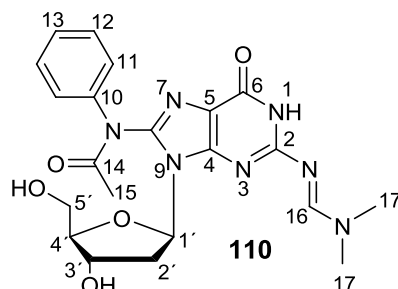
Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt.

Es wurden 2.04 g (5.09 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosin **104** und 1.74 mL (1.50 g, 10.2 mmol) *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal eingesetzt.

Reaktionszeit: 14 h. - **Ausbeute:** 1.99 g (4.37 mmol, 86%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:**

C₂₁H₂₅N₇O₅. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH, 7:3 v/v): 0.77. - **Smp.:** 142 °C. -

Drehwert: $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 84 ° (c 0.54, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.53 (bs, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, H-16), 7.45 - 7.34 (m, 5H, H-11, H-12, H-13), 6.14 - 6.11 (m, 1H, H-1'), 5.28 - 5.27 (m, 1H, 3'-OH), 4.87 - 4.84 (m, 1H, 5'-OH), 4.46 - 4.44 (m, 1H, H-3'), 3.90 - 3.86 (m, 1H, H-4'), 3.68 - 3.62 (m, 1H, H-5'a), 3.57 - 3.51 (m, 1H, H-5'b), 3.13 (s, 3H, H-17), 3.05 - 3.01 (m, 3H, H-17), 3.02 - 2.95 (m, 1H, H-2'a), 2.15 - 2.13 (m, 1H, H-2'b), 2.03 (s, 3H, H-15). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 190.9 (C16), 178.0 (C14), 158.2 (C2, C6), 157.0 (C4), 141.4 (C10), 129.2 (C8), 126.7 (C12), 124.7 (C11, C13), 112.3 (C5), 87.8 (C4'), 83.9 (C1'), 70.8 (C3'), 61.4 (C5'), 40.7 (C2'), 34.5 (C17), 26.8 (C15). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3291, 2928, 1681, 1629, 1595, 1521, 1491, 1422, 1354, 1322, 1280, 1182, 1112, 1051, 986, 967, 945, 786, 718, 695, 564, 514. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 455.1917 [M], gef.: 456.1977 [M+H]⁺.



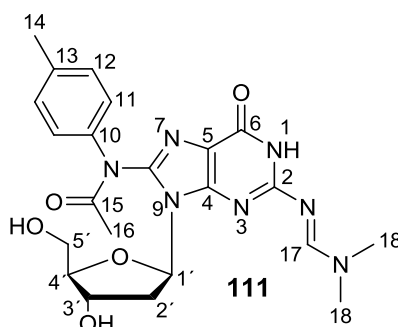
Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin **111**

Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt.

Es wurden 2.58 g (6.23 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin **105** und 2.14 mL (1.84 g, 12.5 mmol) *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal eingesetzt.

Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 2.83 g (6.04 mmol, 97%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:**

C₂₂H₂₇N₇O₅. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH, 7:3 v/v): 0.71. - **Smp.:** 193 °C. -



Drehwert: $[\alpha]_{589nm}^{23^\circ C}$: 81 ° (c 0.48, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.53 (bs, 1H, NH), 8.48 (s, 1H, H-17), 7.40 - 7.26 (m, 4H, H-11, H-12), 6.13 - 6.12 (m, 1H, H-1'), 5.31 - 5.30 (m, 1H, 3'-OH), 4.88 (s, 1H, 5'-OH), 4.48 - 4.43 (m, 1H, H-3'), 3.87 - 3.83 (m, 1H, H-4'), 3.68 - 3.66 (m, 1H, H-5'a), 3.57 - 3.56 (m, 1H, H-5'b), 3.14 (s, 3H, H-18), 3.04 - 3.01 (m, 4H, H-2'a, H-18), 2.31 (s, 3H, H-14), 2.15 - 2.13 (m, 1H, H-2'b), 2.03 (s, 3H, H-16). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 174.2 (C15), 158.3 (C17), 157.1 (C2, C6), 149.1 (C10), 129.3 (C8), 128.6 (C12), 127.6 (C11, C13), 113.2 (C5), 87.9 (C4'), 83.9 (C1'), 70.9 (C3'), 61.9 (C5'), 40.8 (C2'), 34.6 (C18, C19), 20.5 (C16), 18.8 (C14). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3231, 2921, 1680, 1629, 1524, 1507, 1422, 1353, 1320, 1283, 1180, 1112, 1052, 987, 968, 786, 727, 515. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 469.2074 [M], gef.: 470.2152 [M+H]⁺.

Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **112**

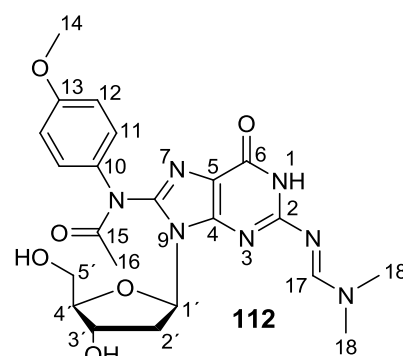
Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt.

Es wurden 1.30 g (3.02 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **106** und 1.03 mL (889 mg, 6.04 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-diethyl-acetal eingesetzt.

Reaktionszeit: 17 h. - **Ausbeute:** 1.26 g (2.60 mmol, 86%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:**

C₂₂H₂₇N₇O₆. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.24. - **Smp.:** 152 °C. -

Drehwert: $[\alpha]_{589nm}^{23^\circ C}$: 87 ° (c 0.5, CH₂Cl₂/MeOH; 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.48 (bs, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, H-17), 7.45 (s, 1H, H-12), 7.27 (s, 1H, H-12), 6.98 (s, 2H, H-11), 6.13 (s, 1H, H-1'), 5.29 (s, 1H, 3'-OH), 4.90 (bs, 1H, 5'-OH), 4.56 - 4.49 (m, 1H, H-3'), 3.85 (bs, 1H, H-4'), 3.76 (s, 3H, H-14), 3.70 - 3.61 (m, 1H, H-5'a), 3.60 - 3.50 (m, 1H, H-5'b), 3.18 - 3.14 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 3.13 (s, 3H, H-18), 3.03 (s, 3H, H-18), 2.01 (s, 3H, H-16). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 168.3 (C15), 158.3 (C17), 157.1 (C2, C6), 140.5 (C10, C12), 138.6 (C8), 129.2 (C13, C11), 128.0 (C5), 118.2 (C4), 99.5 (C4'), 87.9 (C1'), 70.9 (C3'), 55.4 (C5'), 48.4 (C2'), 34.5 (C18), 22.3 (C14), 19.2 (C16). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3234, 2930, 1676, 1628, 1524, 1505, 1421, 1353, 1320, 1283, 1243, 1170, 1108, 1052, 1026, 986, 967,



835, 785, 731, 580, 527, 480. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 485.2023 [M], gef.: 486.2089 [M+H]⁺.

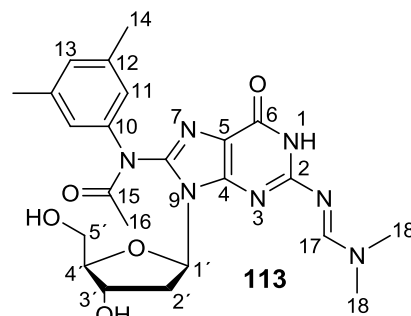
Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin **113**

Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt.

Es wurden 1.77 g (4.13 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin **107** und 1.42 mL (1.22 g, 8.26 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal eingesetzt.

Reaktionszeit: 17 h. - **Ausbeute:** 1.66 g (3.43 mmol, 83%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₃H₂₉N₇O₅. - **DC:** R_F-Wert

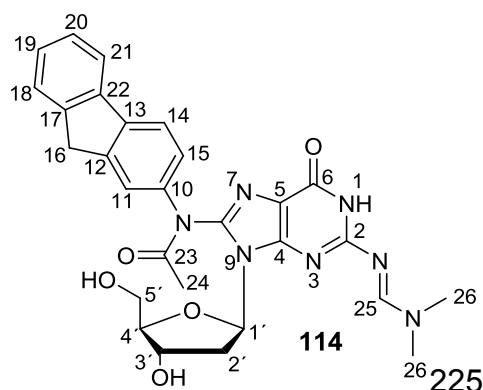
(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.26. - **Smp.:** 176 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 43.8 ° (c 0.31, CH₂Cl₂/CH₃OH, 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.52 (s, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, H-17), 7.07 - 6.98 (m, 3H, H-11, H-13), 6.10 (t, ⁴J_{H,H} = 3.7 Hz, ³J_{H,H} = 9.9 Hz, 1H, H-1'), 5.29 (d, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, 3'-OH), 4.89 - 4.86 (m, 1H, 5'-OH), 4.45 (s, 1H, H-3'), 3.85 - 3.84 (m, 1H, H-4'), 3.69 - 3.64 (m, 1H, H-5'a), 3.58 - 3.52 (m, 1H, H-5'b), 3.14 (s, 3H, H-18), 3.03 (s, 3H, H-18), 2.98 - 2.93 (m, 1H, H-2'a), 2.27 (s, 6H, H-14), 2.01 (s, 3H, H-16), 1.82 - 1.81 (m, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 181.5 (C17), 175.6 (C15), 158.2 (C2, C6), 149.5 (C4), 140.7 (C10, C12), 132.5 (C8), 123.9 (C11), 123.1 (C13), 121.5 (C5), 87.8 (C4'), 87.6 (C1'), 71.6 (C3'), 55.2 (C5'), 40.7 (C2'), 34.5 (C18), 22.4 (C14), 20.7 (C16). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3307, 2926, 1679, 1629, 1524, 1422, 1353, 1306, 1278, 1180, 1113, 1052, 988, 968, 853, 786, 720, 690, 663, 600, 574, 553, 534, 507, 465. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 483.2230 [M], gef.: 484.2303 [M+H]⁺.



Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-2'-desoxyguanosin **114**

Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt.

Es wurden 2.05 g (4.19 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-2'-desoxyguanosin **108** und 1.44 mL (1.23 g, 8.38 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal eingesetzt.



Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 2.05 g (3.77 mmol, 90%) eines braunen Feststoffs.
 - **Summenformel:** C₂₈H₂₉N₇O₅. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.35. -
Smp.: sehr hygroskopisch. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 58.8 ° (c 0.22, CH₂Cl₂/CH₃OH; 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.53 (s, 1H, NH), 8.49 (bs, 1H, H-25), 7.92 - 7.90 (m, 1H, H_{arom.}), 7.80 - 7.76 (m, 1H, H_{arom.}), 7.60 - 7.58 (m, 1H, H_{arom.}), 7.41 - 7.31 (m, 4H, H_{arom.}), 6.19 (bs, 1H, H-1'), 5.39 (bs, 1H, 3'-OH), 4.92 (bs, 1H, 5'-OH), 4.51-4.44 (m, 1H, H-3'), 3.95 (s, 2H, H-16), 3.87 (s, 1H, H-4'), 3.67 (s, 1H, H-5'a), 3.56 (s, 1H, H-5'b), 3.17 - 3.14 (m, 4H, H-26, H-2'a), 3.03 (s, 6H, H-26), 2.23 (s, 1H, H-2'b), 2.07 (s, 3H, H-24). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 187.4 (C25), 172.3 (C23), 158.3 (C2), 157.1 (C6), 149.6 (C4), 143.4 (C10, C12, C13), 140.1 (C17, C22), 136.1 (C8), 127.1 (C18), 126.8 (C14), 125.1 (C19, C20, C21), 123.9 (C11, C15), 120.3 (C5), 87.9 (C1', C4'), 70.9 (C3'), 61.9 (C5'), 40.8 (C2'), 37.5 (C16), 36.4 (C26), 26.5 (C24), 23.0 (C14). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3425, 2981, 1684, 1631, 1529, 1456, 1425, 1397, 1286, 1174, 1115, 1037, 714, 474. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 543.2230 [M], gef.: 544.2295 [M+H]⁺.

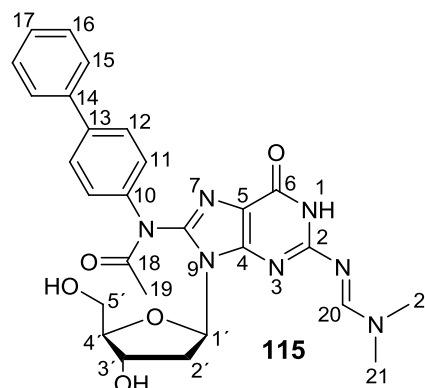
Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-*N*-4-biphenyl-2'-desoxyguanosin **115**

Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt.

Es wurden 1.26 g (1.31 mmol) C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-2'-desoxyguanosin **109** und 0.44 mL (0.38 g, 2.60 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal eingesetzt.

Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 0.93 g (0.93 mmol, 71%) eines gelben Feststoffs. -
Summenformel: C₂₇H₂₉N₇O₅. - **DC:** R_f-Wert

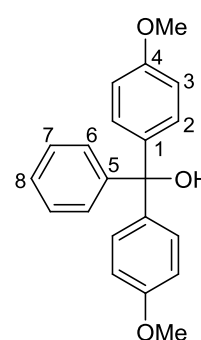
(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.36. - **Smp.:** 68 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 53.6 ° (c 0.85, CH₂Cl₂/CH₃OH, 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.55 (s, 1H, NH), 8.49 (s, 1H, H-20), 7.79 - 7.71 (m, 2H, H-11), 7.71 - 7.64 (m, 2H, H-12), 7.52 - 7.44 (m, 4H, H-15, H-16), 7.41 - 7.33 (m, 1H, H-17), 6.16 (s, 1H, H-1'), 5.30 (s, 1H, 3'-OH), 4.87 (s, 1H, 5'-OH), 4.47 (s, 1H, H-3'), 3.85 (s, 1H, H-4'), 3.72 - 3.60 (m, 1H, H-5'a), 3.61 - 3.47 (m, 1H, H-5'b), 3.14 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 3.04 (s, 6H, H-21), 2.07



(s, 3H, H-19). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 173.1 (C20), 173.0 (C18), 158.3 (C2), 157.3 (C6), 149.6 (C4), 128.9 (C10, C13, C14), 127.6 (C11, C15), 127.5 (C5, C8), 126.7 (C12, C16, C17), 88.0 (C1'), 87.9 (C4'), 70.9 (C3'), 61.9 (C5'), 45.7 (C2'), 40.7 (C21), 34.5 (C19). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3307, 3055, 3033, 2926, 2871, 2179, 1680, 1629, 1523, 1485, 1422, 1354, 1323, 1283, 1178, 1113, 1054, 1031, 989, 846, 787, 766, 748, 732, 700, 575, 508, 447, 406. - **MS**: (FAB, m/z): ber.: 531.2230 [M], gef.: 532.2 [M+H]⁺.

Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylcarbinol **117**

Es wurden 1.76 g (72.4 mmol) Magnesiumspäne mit 7.00 mL abs. THF versetzt und unter Rühren 700 μL (1.05 g, 5.61 mmol) 4-Bromanisol **116** zugetropft. Nach Reaktionsbeginn (exotherme Reaktion) wurden weitere 8.00 mL (12.0 g, 64.2 mmol) 4-Bromanisol **116** in 17.5 mL abs. THF dem Reaktionsgemisch langsam zugefügt und für zwei Stunden zum Sieden erhitzt. Im Anschluss wurden 4.30 mL (4.50 g, 30.0 mmol) Benzoesäureethylester in 4.30 mL abs. THF zugegeben und weitere 30 Minuten zum Sieden erhitzt.



117

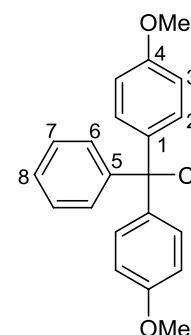
Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit etwa 20 g zerstoßenem Eis hydrolysiert. Durch Zugabe von 40.0 mL 10%iger Schwefelsäure wurde der entstandene Niederschlag gelöst, die wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase dreimal mit je 25 mL Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden dreimal mit je 30 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in 15 mL Toluol gelöst und azeotrop destilliert. Das Produkt **117** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute**: 8.81 g (27.5 mmol, 92% bezogen auf Benzoesäureethylester) eines gelben Öls. - **Summenformel**: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_3$. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.28 - 7.26 (m, 2H, H-6), 7.23 - 7.20 (m, 3H, H-7, H-8), 7.11 - 7.07 (m, 4H, H-2), 6.87 - 6.83 (m, 4H, H-3), 6.24 (s, 1H, OH), 3.73 (s, 6H, OCH_3). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 157.8 (C4), 148.3 (C5), 140.2 (C1), 128.9 (C2), 127.6 (C6), 127.4 (C7), 126.4 (C8), 112.7 (C3), 79.9 (COH), 54.9 (OCH_3). - **IR**: $\tilde{\nu}$

[cm^{-1}] (ATR): 3485, 3058, 3032, 3001, 2954, 2933, 2835, 1608, 1509, 1463, 1445, 1298, 1250, 1177, 1157, 830.

Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **118**

Es wurden 8.71 g (27.2 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylcarbinol **117** in 8.00 mL abs. Toluol gelöst und 7.00 mL (7.70 g, 98.0 mmol) frisch destilliertes Acetylchlorid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel mittels Kälte-destillation entfernt und der Rückstand in 8.60 mL Cyclohexan und 0.20 mL (0.22 g, 28.0 mmol) Acetylchlorid in der Siedehitze gelöst. Das Produkt kristallisierte über drei Tage unter Lichtausschluss im Kühlschrank aus. Die hellgelben Kristalle wurden unter Inertgas filtriert, viermal mit je 10 mL abs. Cyclohexan gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.



118

Reaktionszeit: 2.5 h. - **Ausbeute:** 7.67 g (22.7 mmol, 83%) eines farblosen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{ClO}_2$. - **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 7.30 - 7.26 (m, 2H, H-6), 7.23 - 7.17 (m, 3H, H-7, H-8), 7.09 - 7.05 (m, 4H, H-2), 6.86 - 6.82 (m, 4H, H-3), 3.72 (s, 6H, OCH_3). - **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 157.8 (C4), 148.3 (C5), 140.2 (C1), 128.9 (C2), 127.6 (C6), 127.4 (C8), 126.4 (C7), 112.8 (C3), 79.9 (CCl), 55.0 (OCH_3).

Auf weitere Charakterisierungen wurde aufgrund der Luft- und Lichtempfindlichkeit des Produktes verzichtet.

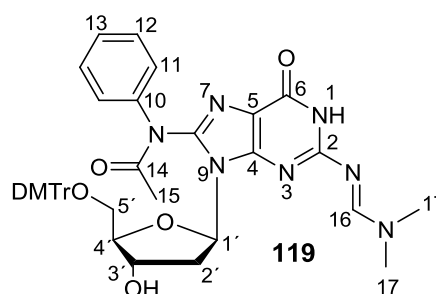
Darstellung von N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **119**

Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt.

Es wurden 200 mg (0.44 mmol) N^2 -Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2'-desoxyguanosin **110** und 150 mg (0.44 mmol) DMTr-Chlorid **118** eingesetzt.

Reaktionszeit: 14 h. - **Ausbeute:** 298 mg (0.390 mmol, 89%) eines hellbraunen Feststoffs. -

Summenformel: $\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_7$. - **DC:** R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; 9:1 v/v): 0.13.- **Smp.:**



111 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 21° (c 0.1, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.48 (s, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, H-16), 7.41 - 7.11 (m, 14H, H_{arom.}), 6.74 - 6.67 (m, 5H, H_{arom.}), 6.23 - 6.17 (m, 1H, H-1'), 5.39 - 5.31 (m, 1H, 3'-OH), 4.62 - 4.58 (m, 1H, H-3'), 3.94 - 3.89 (m, 1H, H-4'), 3.70 - 3.68 (m, 8H, OCH₃, H-5'a, H-5'b), 3.29 - 3.23 (m, 1H, H-2'a), 3.08 - 3.01 (m, 1H, H-2'b), 3.00 (s, 3H, H-17), 2.94 (s, 3H, H-17), 2.04 (s, 3H, H-15). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 157.8 (C16), 157.4 (C2, C4, C6, C14), 144.8 (C10), 129.4 (C8), 129.2 (C12), 127.5 (C11), 126.4 (C13), 112.7 (C5), 85.7 (C4'), 83.0 (C1'), 70.7 (C3'), 54.8 (OCH₃), 48.5 (C2', C5'), 34.5 (C17), 22.5 (C15). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr): 2931, 1734, 1653, 1594, 1569, 1491, 1436, 1357, 1286, 1055, 844. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 757.3224 [M], gef.: 758.3336 [M+H]⁺.

Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **120**

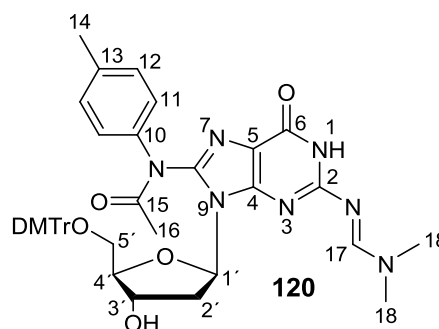
Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt.

Es wurden 2.10 g (4.64 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin **111** und 1.56 g (4.64 mmol) DMTr-Chlorid **118** eingesetzt.

Reaktionszeit: 1.5 h. - **Ausbeute:** 3.22 g (4.17 mmol, 90%) eines hellbraunen Feststoffs. -

Summenformel: C₄₃H₄₅N₇O₇. - **DC:** R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.38. - **Smp.:** 136 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 27° (c 0.1, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 11.55 (bs, 1H, NH), 8.58 - 8.57 (m, 1H, H-17), 7.39 - 7.06 (m, 13H, DMTr-H, H-11, H-12), 6.90 - 6.83 (m, 4H, DMTr-H), 6.21 (s, 1H, H-1'), 5.32 (bs, 1H, 3'-OH), 4.62 (bs, 1H, H-3'), 3.91 - 3.90 (m, 1H, H-4'), 3.73 - 3.66 (m, 11H, H-14, DMTr-OCH₃, H-5'a, H-5'b), 3.18 - 3.10 (m, 6H, H-18), 3.10 (bs, 1H, H-2'a), 2.94 (s, 1H, H-2'b), 2.07 (s, 3H, H-16). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 179.0 (C17), 169.5 (C15), 157.8 (C2), 149.6 (C4), 148.3 (C6), 140.2 (C10), 129.6 (C8), 129.4 (C12), 127.4 (C11), 126.4 (C13), 112.7 (C5), 91.9 (C1', C4'), 71.7 (C3'), 57.6 (OCH₃-DMTr), 55.0 (C2', C5'), 51.3 (C18), 23.0 (C16), 19.2 (C14). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2999, 2931, 2834, 1684, 1629, 1606, 1580, 1528, 1505, 1462, 1440, 1423, 1345, 1294, 1244, 1173, 1112, 1078, 1028, 901, 825, 789,



753, 726, 700, 636, 581, 526. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 771.3380 [M], gef.: 772.3440 [M+H]⁺.

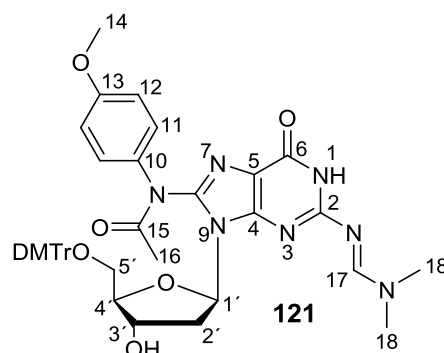
Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **121**

Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt.

Es wurden 1.24 g (2.55 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **112** und 869 mg (2.55 mmol) DMTr-Chlorid **118** eingesetzt.

Reaktionszeit: 19 h. - **Ausbeute:** 1.31 g (1.66 mmol, 65%) eines hellbraunen Feststoffs. -

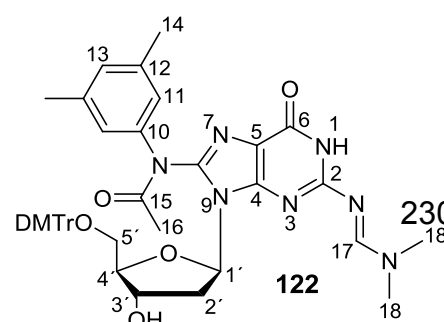
Summenformel: C₄₃H₄₅N₇O₈. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.41. - **Smp.:** 159 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 24° (c 0.1, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 11.36 (bs, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, H-17), 7.34 - 7.22 (m, 9H, DMTr-H), 7.01 - 6.95 (m, 4H, H-11, H-12), 6.78 - 6.69 (m, 4H, DMTr-H), 6.22 - 6.16 (m, 1H, H-1'), 5.32 (bs, 1H, 3'-OH), 4.15 - 4.05 (m, 1H, H-3'), 3.97- 3.91 (m, 1H, H-4'), 3.77 (s, 3H, H-14), 3.74 - 3.66 (m, 8H, OCH₃, H-5'a, H-5'b), 3.17 (bs, 2H, H-2'a, H-2'b), 3.01 (s, 3H, H-18), 3.00 (s, 3H, H-18), 1.99 (s, 3H, H-16). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 157.9 (C17), 157.7 (C15), 157.2 (C2, C6), 149.6 (C4), 135.6 (C8), 129.5 (C11), 127.5 (C13), 123.9 (C5), 112.9 (C4'), 87.3 (C1'), 85.2 (C3'), 55.3 (C5'), 55.4 (C14), 54.9 (OCH₃), 40.0 (C2'), 34.6 (C18), 15.3 (C16). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3234, 2930, 2836, 1681, 1627, 1607, 1526, 1505, 1463, 1422, 1344, 1322, 1288, 1244, 1173, 1111, 1078, 1027, 986, 827, 786, 754, 726, 701, 581, 527. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 787.3330 [M], gef.: 788.3393 [M+H]⁺.



Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **122**

Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt.

Es wurden 0.68 g (1.4 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin **115**



und 0.48 g (1.41 mmol) DMTr-Chlorid **118** eingesetzt.

Reaktionszeit: 15 h. - **Ausbeute:** 1.01 g (1.29 mmol, 92%) eines dunkelgelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₄₄H₄₇N₇O₇. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.13. - **Smp.:** 111 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 36.8° (c 0.5, CH₂Cl₂/CH₃OH; 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 11.39 (bs, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, H-17), 7.27 - 6.95 (m, 12H, H_{arom.}), 6.70 - 6.59 (m, 4H, H_{arom.}), 6.20 (s, 1H, H-1'), 5.33 (s, 1H, 3'-OH), 3.97 (s, 1H, H-4'), 3.69 - 3.67 (m, 6H, OCH₃), 3.33 (s, 1H, H-5'a), 3.07 (s, 1H, H-5'b), 3.01 (s, 3H, H-18), 2.94 (s, 4H, H-18, H-2'a), 2.25 - 2.22 (m, 7H, H-14, H-2'b), 2.04 (s, 3H, H-16). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 157.9 (C17), 157.8 (C15), 157.4 (C2, C6), 145.0 (C4), 135.6 (C10, C12), 129.5 (C8), 129.3 (C11), 127.5 (C13), 126.4 (C5), 112.8 (C4'), 85.1 (C1'), 83.2 (C3'), 55.0 (C5'), 54.9 (OCH₃), 40.8 (C2'), 34.6 (C18), 20.7 (C14, C16). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2915, 1680, 1629, 1609, 1527, 1507, 1423, 1302, 1247, 1175, 1112, 1076, 962, 827, 787, 754, 725, 582, 552. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 785.3537 [M], gef.: 786.3606 [M+H]⁺.

Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **123**

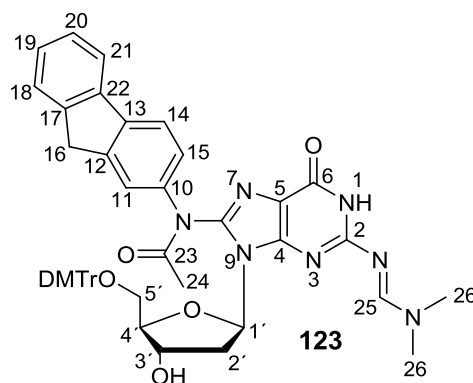
Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt.

Es wurden 2.00 g (3.77 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-2'-desoxyguanosin **114** und 1.91 g (5.65 mmol) DMTr-Chlorid **118** eingesetzt.

Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 2.50 g (2.96 mmol, 79%) eines hellbraunen Feststoffs. -

Summenformel: C₄₉H₄₇N₇O₇. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.47. - **Smp.:** 180 °C. -

Drehwert: $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 194.9° (c 0.3, CH₂Cl₂/CH₃OH; 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.48 (s, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, H-25), 7.91 - 7.87 (m, 2H, H_{arom.}), 7.63 - 7.52 (m, 2H, H_{arom.}), 7.37 - 7.24 (m, 5H, H_{arom.}), 7.13 - 7.12 (m, 7H, H_{arom.}), 6.69 - 6.61 (m, 4H, H_{arom.}), 6.28 (bs, 1H, H-1'), 5.74 (s, 1H, 3'-OH), 5.35 (s, 1H, H-3'), 4.63 (s, 1H, H-4'), 3.96 - 3.90 (m, 3H, H-16, H-5'a), 3.68 (bs, 7H, OCH₃, H-5'b), 3.29 - 3.27 (m, 1H, H-2'a), 3.13 - 3.06 (m, 1H, H-2'b), 3.01 (bs, 3H, H-26), 2.95 (s, 3H, H-26), 2.09 (s, 3H, H-24). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 157.9



(C25), 157.8 (C23), 157.4 (C2), 157.2 (C6), 144.8 (C4), 144.0 (C10), 143.3 (C12, C13), 140.1 (C17, C22), 135.6 (C8), 127.5 (C18), 126.8 (C14), 126.4 (C19, C20, C21), 125.1 (C11, C15), 120.2 (C5), 112.9 (C1'), 112.8 (C4'), 83.2 (C3'), 54.9 (C5', OCH₃), 40.8 (C2', C16), 36.4 (C24, C26), 34.6 (C14). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2982, 1681, 1628, 1525, 1505, 1454, 1422, 1397, 1285, 1244, 1174, 1111, 1076, 1028, 826, 786, 768, 735, 700, 580. - **MS**: (FAB-HR, m/z): ber.: 845.3537 [M], gef.: 846.3593 [M+H]⁺.

Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **124**

Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt.

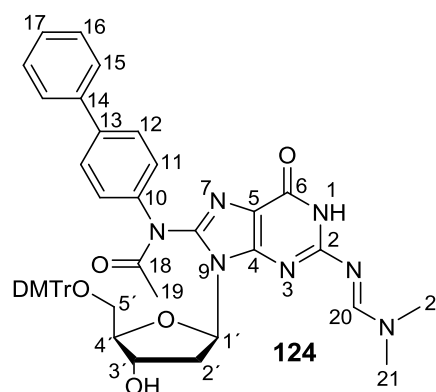
Es wurden 0.93 g (0.93 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-2'-desoxyguanosin **115** und 316 mg (0.93 mmol) DMTr-Chlorid **118** eingesetzt.

Reaktionszeit: 22 h. - **Ausbeute**: 0.60 g (0.39 mmol, 42%) eines gelben Feststoffs.

Summenformel: C₄₈H₄₇N₇O₇. - **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.50. - **Smp.**: 150 °C. -

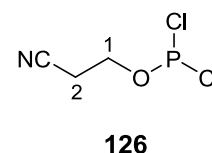
Drehwert: $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 42.6 ° (c 1.09, CHCl₃). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆):

11.22 (s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, H-20), 7.58 - 7.49 (m, 6H, H_{arom.}), 7.36 - 7.32 (m, 3H, H_{arom.}), 7.27 - 7.24 (m, 3H, H_{arom.}), 7.14 - 7.12 (m, 3H, H_{arom.}), 7.06 - 7.01 (m, 7H, H_{arom.}), 6.14 - 6.10 (m, 1H, H-1'), 5.23 (s, 1H, 3'-OH), 4.50 (s, 1H, H-3'), 3.82 (s, 1H, H-4'), 3.62 - 3.60 (s, 1H, H-5'a, H-5'b), 3.56 (s, 6H, OCH₃), 3.07 - 3.03 (m, 1H, H-2'a), 3.02 - 2.98 (m, 1H, H-2'b), 2.90 (s, 3H, H-21), 2.84 (s, 3H, H-21), 1.97 (s, 3H, H-19). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (126 MHz, DMSO-*d*₆): 180.4 (C20), 169.0 (C18), 157.9 (C6), 157.8 (C2), 157.5 (DMTr-C_{tertiär}), 157.2 (C4), 144.9 (C10, C13, C14), 139.2, 135.6 (DMTr-C_{quartär}), 129.5, 129.4 (DMTr-C_{quartär}), 129.0 (C11), 127.6 (C5, C8), 126.7, 126.5 (C12, C15, C16), 125.5 (DMTr-C_{quartär}), 112.9 (C17), 85.8 (C1'), 85.2 (C4', C3'), 55.0 (C5'), 54.9 (OCH₃), 48.6, 45.3 (C2'), 40.8 (C21), 34.7 (C19). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3033, 2978, 2945, 2739, 2600, 2530, 2496, 2179, 1682, 1629, 1526, 1507, 1481, 1443, 1423, 1397, 1286, 1247, 1172, 1113, 1072, 1033, 829, 807, 787, 766, 729, 699, 582, 551, 512, 462. - **MS**: (FAB-HR, m/z): ber.: 833.3537 [M], gef.: 834.3607 [M+H]⁺.



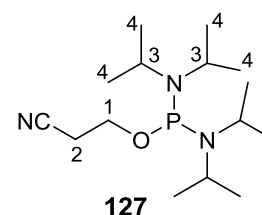
Darstellung von 2-Cyanoethylphosphordichloridit **126**

Es wurden 8.60 mL (13.7 g, 0.10 mol) frisch destilliertes Phosphortrichlorid in 8.10 mL (0.10 mol) abs. Pyridin und 20 mL abs. Diethylether gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf -78 °C gekühlt und tropfenweise über zwei Stunden mit 6.80 mL (7.21 g, 0.10 mol) frisch destilliertem 3-Hydroxypropionsäurenitril versetzt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur und anschließendem 12stündigen Rühren wurde der entstandene Niederschlag unter Schutzgas filtriert und viermal mit je 10 mL abs. Diethylether gewaschen. Das entstandene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt. Eine Charakterisierung konnte aufgrund der hohen Licht- und Luftempfindlichkeit nicht erfolgen.



Darstellung von Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127**

Das frisch erhaltene 2-Cyanoethylphosphordichloridit **126** wurde in 100 mL abs. Diethylether gelöst und bei -10 °C innerhalb einer Stunde mit 86.7 mL (62.1 g, 0.61 mol) *N,N'*-Diisopropylamin versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und anschließendem 12-stündigen Rühren wurde der entstandene Niederschlag unter Schutzgas filtriert und dreimal mit je 30 mL abs. Diethylether gewaschen. Das Lösungsmittel wurde mittels Kälte-destillation entfernt. Der ölige Rückstand wurde mit 200 mg Calciumhydrid versetzt und im Ölpumpenvakuum bei 110 °C destilliert.

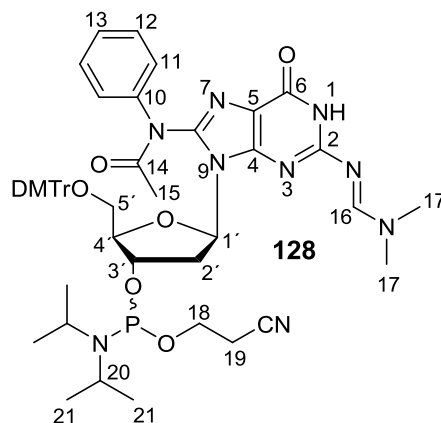


Reaktionszeit: 13 h. - **Ausbeute:** 18.8 g (62.3 mmol, 62% über 2 Stufen) eines farblosen Öls. - **Summenformel:** C₁₅H₃₂N₃OP. - **Sdp.:** 110 °C im Vakuum. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 3.50 - 3.40 (m, 4H, H-3), 3.31 - 3.27 (m, 2H, H-1), 1.77 - 1.75 (m, 2H, H-2), 1.18 - 1.13 (m, 24H, H-4). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, Benzol-*d*₆): 127.6 (CN), 59.4 (C1), 44.6 (C3), 24.3 (C4), 23.8 (C4), 19.9 (C2). - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (202 MHz, Benzol-*d*₆): 123.34. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3332, 2952, 2929, 1633, 1605, 1565, 1414, 1256, 835. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 301.2283 [M], gef.: 301 [M].

Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **128**

Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt.

Es wurden 250 mg (0.33 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **119**, 80 mg (0.68 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol und 0.11 mL (0.11 g, 0.36 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** eingesetzt.



Reaktionszeit: 1 h. - **Ausbeute:** 269 mg

(0.28 mmol, 85%) eines weißen Feststoffs. - **Summenformel:** C₅₁H₆₀N₉O₈P. - **DC:**

R_f-Wert (CHCl₃/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.26. - **Smp.:** 68 - 70 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 74 °

(c 0.06, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 11.29 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H-16), 7.62 - 6.62 (m, 18H, H_{arom.}), 6.31 (dd, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 4.86 - 4.82 (m, 1H, H-3'), 4.38 - 4.35 (m, 1H, H-4'), 3.56 - 3.30 (m, 19H, OCH₃, H-20, H-2'a, H-5'a, H-5'b, H-18, H-19, H-17), 2.78 - 2.75 (m, 1H, H-2'b), 2.04 (s, 3H, H-15), 1.15 - 0.96 (m, 12H, H-21).

- **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, Benzol-*d*₆): 178.7, 159.3, 159.2, 158.2, 147.6, 147.5, 145.3, 145.3, 136.3, 133.2, 130.9, 130.8, 130.7, 130.6, 130.5, 129.3, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 118.4, 118.2, 114.6, 113.7, 113.6, 87.1, 86.6, 85.6, 75.0, 74.8, 74.0, 73.8, 64.1, 64.0, 58.7, 58.6, 58.5, 58.5, 55.1, 54.9, 54.8, 43.6, 43.6, 43.5, 43.5, 38.6, 38.4, 37.7, 30.2, 24.8, 24.7, 24.6, 20.6, 20.5, 20.3.

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (202 MHz, Benzol-*d*₆): 147.4, 147.1. - **IR:** ν̄ [cm⁻¹] (KBr): 2968, 2932, 1700, 1696, 1680, 1672, 1629, 1554, 1517, 1493, 1368, 1326, 1116, 1079, 979. - **MS:** (ESI-HR, m/z): ber.: 957.4302 [M], gef.: 980.4199 [M+Na]⁺.

Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **129**

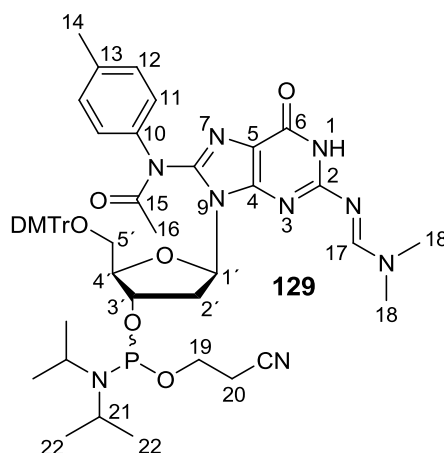
Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt.

Es wurden 500 mg (0.65 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **120**, 76.8 mg (0.65 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol und 0.33 mL (1.04 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** eingesetzt.

Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute:** 521 mg (0.54 mmol, 83%) eines weißen Feststoffs. -

Summenformel: C₅₂H₆₂N₉O₈P. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.40. -

Smp.: 126 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 36° (c 0.10, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 11.35 (bs, 1H, NH), 8.50 - 8.47 (m, 1H, H-17), 7.78 - 7.76 (m, 4H, H_{arom.}), 7.61 - 7.59 (m, 4H, H_{arom.}), 7.32 - 7.30 (m, 2H, H_{arom.}), 7.25 - 7.22 (m, 1H, H_{arom.}), 7.13 - 7.11 (m, 2H, H_{arom.}), 6.89 - 6.88 (m, 4H, H_{arom.}), 6.55 (bs, 1H, H-1'), 5.43 (bs, 1H, H-3'), 4.56 (bs, 1H, H-4'), 3.83 - 3.78 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.68 (bs, 2H, H-21), 3.61 - 3.59 (m, 7H, OCH₃, H-2'a), 3.44 - 3.43 (m, 1H, H-2'b), 3.05 - 3.01 (m, 3H, H-14), 2.90 - 2.88 (m, 3H, H-18), 2.74 (bs, 3H, H-18), 2.18 (s, 3H, H-16), 1.53 - 1.49 (m, 4H, H-19, H-20), 1.32 - 1.30 (m, 6H, H-22), 1.25 - 1.24 (m, 6H, H-22). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, Benzol-*d*₆): 173.0, 159.1, 152.4, 141.4, 138.1, 136.3, 134.0, 131.7, 130.6, 130.4, 128.6, 128.2, 128.0, 127.8, 117.9, 113.5, 111.4, 86.7, 85.7, 72.6, 70.9, 66.9, 65.5, 58.6, 57.7, 55.0, 54.9, 43.7, 43.6, 41.7, 34.9, 31.3, 30.9, 24.6, 24.0, 20.0, 19.9, 13.8. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (202 MHz, Benzol-*d*₆): 162.8, 162.4. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3056, 2998, 2932, 2835, 1685, 1629, 1606, 1580, 1528, 1506, 1462, 1440, 1423, 1345, 1294, 1244, 1173, 1112, 1078, 1029, 901, 826, 789, 753, 726, 700, 636, 582, 523. - **MS:** (ESI-HR, m/z): ber.: 971.4459 [M], gef.: 971.4546 [M].



Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **130**

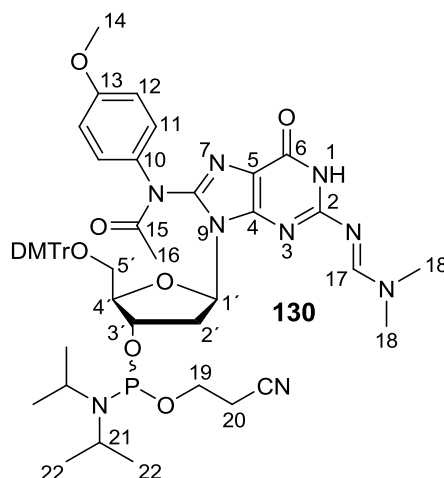
Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt.

Es wurden 1.29 g (1.64 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **121**, 197 mg (1.60 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol und 0.58 mL (0.57 g, 1.86 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** eingesetzt.

Reaktionszeit: 19 h. - **Ausbeute:** 568 mg (0.58 mmol, 35%) eines weißen Feststoffs. -

Summenformel: C₅₂H₆₂N₉O₉P. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.61. -

Smp.: 143 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 74 ° (c 0.06, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 10.83 (s, 1H, NH), 8.25 (s, 1H, H-17), 7.44 - 7.34 (m, 4H, H_{arom.}), 7.13 - 6.55 (m, 13H, H_{arom.}), 6.39 (s, 1H, H-1'), 5.32 - 5.15 (m, 1H, H-3'), 4.50 - 4.30 (m, 1H, H-4'), 3.68 - 3.13 (m, 16H, OCH₃, H-21, H-2'a, H-5'a, H-5'b, H-19, H-20, H-18, H-19), 1.89 (s, 3H, H-16), 1.16 - 0.99 (m, 12H, H-22). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, Benzol-*d*₆): 159.2, 159.0, 158.9, 157.9, 157.7, 150.1, 146.1, 146.0, 145.7, 145.6, 143.5, 136.6, 136.3, 136.2, 136.1, 130.7, 130.6, 130.2, 128.5, 119.6, 118.7, 117.6, 114.7, 113.6, 113.6, 87.3, 86.6, 86.4, 85.7, 58.9, 58.6, 57.7, 54.9, 54.8, 46.1, 43.7, 43.6, 43.5, 40.8, 40.7, 40.1, 37.2, 34.9, 34.7, 24.6, 24.5, 24.4, 21.2, 20.2, 20.0, 19.8, 13.7. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 162.6, 162.4. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2963, 2930, 2836, 1683, 1628, 1607, 1527, 1506, 1462, 1442, 1423, 1345, 1325, 1288, 1246, 1200, 1175, 1112, 1075, 1029, 976, 898, 828, 787, 755, 726, 702, 683, 638, 582, 525. - **MS:** (ESI-HR, m/z): ber.: 987.4408 [M], gef.: 1010.4294 [M+Na]⁺.



Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **131**

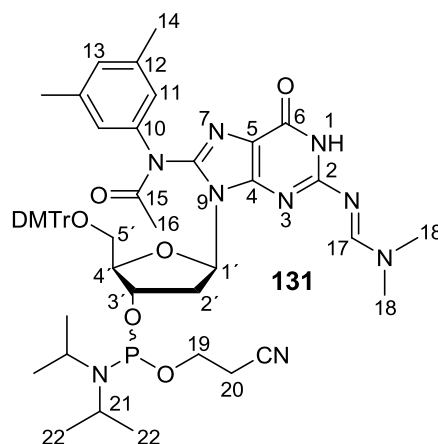
Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt.

Es wurden 370 mg (0.47 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **122**, 111 mg (0.94 mmol) 4,5-Dicyanoimidazolund 0.16 mL (0.16 g, 0.52 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** eingesetzt.

Reaktionszeit: 19 h. - **Ausbeute:** 346 mg (0.35 mmol, 74%) eines weißen Feststoffs. -

Summenformel: C₅₃H₆₄N₉O₈P. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.61.-**Smp.:**

128 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 91 ° (c 0.1, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 10.77 (s, 1H, NH), 8.26 - 8.18 (m, 1H, H-17), 7.13 - 6.52 (m, 16H, H_{arom.}), 6.40 (s, 1H, H-1'), 5.32 - 5.18 (m, 1H, H-3'), 4.42 (bs, 1H, H-4'), 3.74 - 2.91 (m, 16H, OCH₃, H-21, H-2'a, H-5'a, H-5'b, H-18), 2.71 - 2.58 (m, 4H, H-2'b, H-14), 2.52 (s, 3H, H-14), 2.03 (s, 3H, H-16), 1.85 - 1.68 (m, 4H, H-19, H-20), 1.12 - 0.96 (m, 12H, H-22). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, Benzol-*d*₆): 172.9, 159.1, 157.8, 145.8, 143.4, 136.5, 136.4, 136.2, 130.7, 130.6, 130.3, 128.6, 127.0, 126.9, 120.0, 119.9, 117.6, 113.5, 113.4, 86.7, 86.6, 59.0, 58.9, 57.9, 55.0, 54.9, 43.8, 43.7, 43.6, 40.8, 34.9, 34.8, 24.7, 24.6, 24.5, 24.4, 21.2, 20.1, 20.0. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 162.8, 162.7. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3236, 2964, 2930, 2837, 2248, 1682, 1629, 1608, 1527, 1506, 1463, 1443, 1423, 1345, 1303, 1247, 1200, 1175, 1155, 1114, 1066, 1029, 976, 898, 878, 854, 827, 788, 754, 725, 701, 639, 581, 881, 519, 462, 396, 385. - **MS:** (ESI-HR, m/z): ber.: 985.4615 [M], gef.: 986.4681 [M+H]⁺.



Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **132**

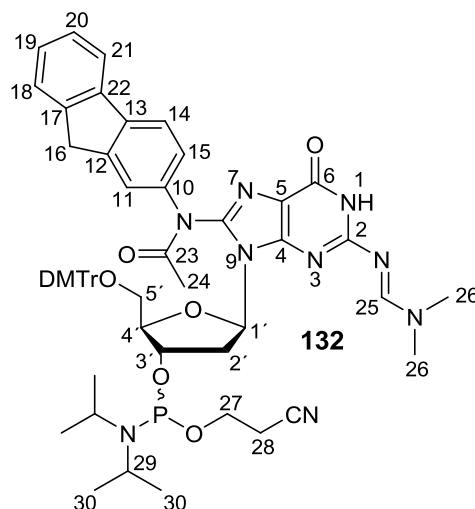
Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt.

Es wurden 0.39 mg (0.46 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **123**, 55 mg (0.46 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol und 0.17 mL (0.17 g, 0.51 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** eingesetzt.

Reaktionszeit: 3.5 h. - **Ausbeute:** 317 mg (0.30 mmol, 66%) eines hellgelben Feststoffs. -

Summenformel: C₅₈H₆₄N₉O₈P. - **DC:** R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.68. - **Smp.:** 125 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 19.2 ° (c 0.42, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 11.33 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H-25), 7.86 - 6.66 (m, 20H, H_{arom.}), 6.44 (bs, 1H, H-1'), 5.29 - 5.19 (m, 1H, H-3'), 4.41 (bs, 1H, H-4'), 3.64 - 3.23 (m, 16H, OCH₃, H-29, H-2'a, H-5'a, H-5'b, H-26), 2.87 - 2.81 (m, 1H, H-2'b), 2.73 - 2.72 (m, 6H, H-16, H-27, H-28), 2.55 - 2.53 (m, 3H, H-24), 1.10 - 1.01 (m, 12H, H-30). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, Benzol-*d*₆): 181.5, 159.1, 159.0, 157.9, 157.8, 145.7, 145.6, 144.8, 144.0, 143.5, 141.2, 136.3, 136.2, 130.6, 130.4, 128.6, 128.4, 127.0, 125.3, 120.7, 120.3, 118.5, 117.7, 113.4, 59.0, 58.8, 57.8, 54.9, 46.0, 43.7, 43.5, 40.8, 37.0, 34.9, 24.6, 24.4, 21.2, 20.2, 20.0. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 147.4, 147.3. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2964, 1686, 1630, 1526, 1508, 1456, 1424, 1344, 1291, 1249, 1177, 1114, 1076, 1031, 977, 899, 828, 788, 768, 735, 703, 643, 583, 519, 469, 424. - **MS:** (ESI-HR, m/z): ber.: 1045.4615 [M], gef.: 1046.4684 [M+H]⁺.



Darstellung von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **133**

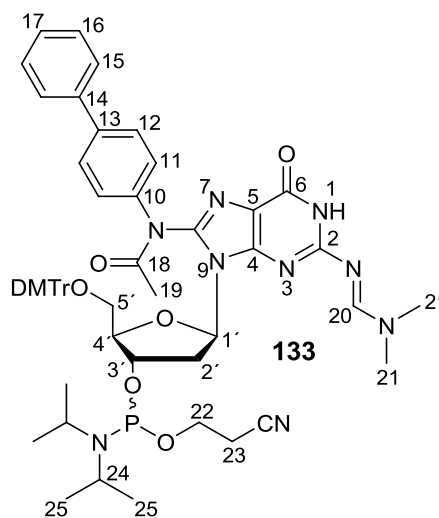
Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt.

Es wurden 0.56 g (0.36 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **124**, 220 μ L (210 mg, 0.697 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** und 80 mg (0.68 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol eingesetzt.

Reaktionszeit: 5.5 h. - **Ausbeute:** 186 mg (0.180 mmol, 46%) eines weißen Feststoffs. -

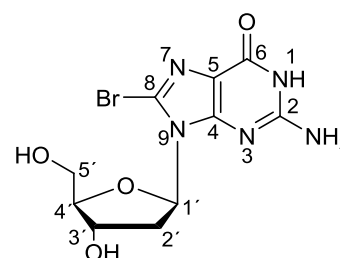
Summenformel: C₅₇H₆₄N₉O₈P. -**DC:** R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.58. - **Smp.:** 80 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23^\circ C}$: - 30.3 ° (c 0.11, CHCl₃/CH₃OH; 9:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 11.24 (bs, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, H-20), 7.73 - 6.64 (m, 22H, H_{arom.}), 6.38 (s, 1H, H-1'), 4.38 (s, 1H, H-3'), 3.64 - 3.54 (m, 1H, H-4'), 3.37 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 3.33 - 3.14 (m, 2H, H-22), 2.89 - 2.70 (m, 2H, H-24), 2.58 (dd, ²J_{H,H} = 21.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, H-5'a), 2.47 - 2.44 (m, 2H, H-23), 2.38 (d, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 1H, H-5'b), 1.73 (dd, ²J_{H,H} = 13.4 Hz, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 1H, H-2'a), 1.46 (t, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 1H, H-2'b), 1.15 - 0.85 (m, 18H, H-21, H-25). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (126 MHz, Benzol-*d*₆): 181.5, 159.1, 159.0, 157.9, 157.8, 145.7, 145.6, 144.8, 144.0, 143.5, 141.2, 136.3, 136.2, 130.6, 130.4, 128.6, 128.4, 127.0, 125.3, 120.7, 120.3, 118.5, 117.7, 113.4, 59.0, 58.8, 57.8, 54.9, 46.0, 43.7, 43.5, 40.8, 37.0, 34.9, 24.6, 24.4, 21.2, 20.2, 20.0. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 162.7, 162.4. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2965, 2929, 1685, 1628, 1608, 1526, 1508, 1487, 1462, 1424, 1345, 1326, 1289, 1249, 1177, 1114, 1075, 1031, 978, 898, 828, 788, 764, 728, 700, 584, 551, 516. - **MS:** (ESI-HR, m/z): ber.: 1033.4615 [M], gef.: 1034.4658 [M+H]⁺.



Synthese von 8-Brom-2'-desoxyguanosin 138

Für diese Reaktion wurde keine Schutzgasatmosphäre benötigt. Es wurden 500 mg (1.75 mmol) 2'-Desoxyguanosin **40** in 20 mL dest. Wasser suspendiert, mit 452 mg (2.53 mmol) *N*-Bromsuccinimid versetzt, zwei Minuten im Ultraschallbad suspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



138

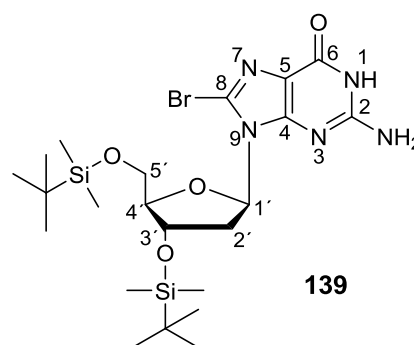
Reaktionszeit: 15 min. - **Ausbeute:** 482 mg (1.40 mmol, 80%) eines orange-rosa Feststoffs. - **Summenformel:** C₁₀H₁₂BrN₅O₄. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.10. - **Smp.:** > 200 °C (Zersetzung). - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: - 21.0 ° (c 0.5, CH₂Cl₂/CH₃OH; 1:1 v/v). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.99 (bs, 1H, NH), 6.62 (bs, 2H, NH₂), 6.19 (dd, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 4.45 (ddd, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 3.0 Hz, 1H, H-3'), 3.82 (ddd, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, H-4'), 3.65 (dd, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 1H, H-5'a), 3.55 (dd, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 1H, H-5'b), 3.19 (ddd, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 1H, H-2'a), 2.15 (ddd, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 3.0 Hz, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 168.6 (C6), 165.2 (C2), 147.6 (C8), 141.3 (C4), 137.3 (C5), 90.2 (C4'), 83.7 (C1'), 67.2 (C3'), 65.1 (C5'), 38.8 (C2'). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3357, 3158, 2954, 1677, 1658, 1603, 1581, 1515, 1460, 1364, 1347, 1335, 1290, 1271, 1254, 1194, 1170, 1111, 1081, 1064, 1024, 999, 959, 844, 789, 776, 746, 687, 645, 625, 594, 556, 538, 459. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 345.0073 [M], gef.: 346.0149 [M+H]⁺.

Synthese von 8-Brom-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **139**

Es wurden 5.00 g (14.4 mmol) 8-Brom-2'-desoxyguanosin **138**, 5.40 g (36.0 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und 4.93 g (72.0 mmol) Imidazol in 50 mL abs. Pyridin gelöst und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

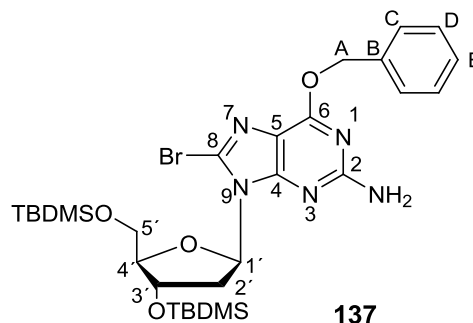
Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und anschließend dreimal mit je 30 mL Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 4%) gereinigt.

Reaktionszeit: 3 h. - **Ausbeute:** 4.98 g (8.69 mmol, 60%) eines gelb-braunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₂H₄₀BrN₅O₄Si₂. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.25. - **Smp.:** 72 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 33.0 ° (c 0.2, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.90 (s, 1H, NH), 6.50 (bs, 2H, NH₂), 6.18 (s, 1H, H-1'), 4.59 (ddd, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, 1H, H-3'), 3.77 (ddd, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, 1H, H-4'), 3.65 (dd, ²J_{H,H} = 11.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, 1H, H-5'a), 3.46 (dd, ²J_{H,H} = 11.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, H-5'b), 3.18 (ddd, ²J_{H,H} = 13.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, H-2'a), 2.18 (ddd, ²J_{H,H} = 13.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, H-2'b), 0.99 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.92 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.15 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.05 (s, 3H, Si(CH₃)₂), -0.01 (s, 3H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.2 (C6), 159.0 (C2), 136.3 (C8), 126.8 (C4), 114.4 (C5), 87.0 (C4'), 85.0 (C3'), 72.2 (C1'), 67.0 (C5'), 35.8 (C2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 17.9 (SiC(CH₃)₃), 17.7 (SiC(CH₃)₃), -4.7 (Si(CH₃)₂), -4.9 (Si(CH₃)₂), -5.5 (Si(CH₃)₂), -5.6 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3131, 2951, 2928, 2885, 2856, 1687, 1627, 1594, 1520, 1470, 1361, 1251, 1108, 1079, 1030, 1006, 951, 832, 775, 729, 679, 666. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 573.1802 [M], gef.: 573.1822 [M].

**139**

Synthese von **O⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 137**

Es wurden 4.00 g (6.96 mmol) 8-Brom-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **139** und 4.34 g (13.9 mmol) Triphenylphosphin in 40 mL abs. 1,4-Dioxan gelöst und mit 2.00 mL (2.08 g, 19.2 mmol) Benzylalkohol versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und 3.70 mL (3.81 g, 18.8 mmol)



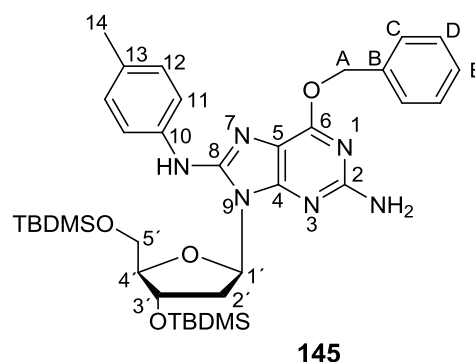
Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Lösung weitere zwei Stunden gerührt. Daraufhin das Lösungsmittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (9:1 v/v) gereinigt.

Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute:** 3.46 g (5.22 mmol, 75%) eines gelben Öls. -

Summenformel: C₂₉H₄₆N₅O₄Si₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂): 0.25. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 18.1 ° (c 0.4, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7.52 - 7.50 (m, 2H, H-C), 7.44 - 7.41 (m, 2H, H-D), 7.33 - 7.30 (m, 1H, H-E), 6.49 (bs, 2H, NH₂), 6.20 (s, 1H, H-1'), 5.52 (d, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-A), 4.69 (dd, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, 1H, H-3'), 3.80 (ddd, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, H-4'), 3.66 (dd, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 2.1 Hz, 1H, H-5'a), 3.44 (dd, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, H-5'b), 3.25 (ddd, ³J_{H,H} = 13.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 1H, H-2'a), 2.20 (ddd, ²J_{H,H} = 13.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, 1H, H-2'b), 0.91 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.83 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.02 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.2 (C6), 159.0 (C2), 154.6 (C8), 136.3 (CB), 128.4 (CC), 128.3 (CD), 128.1 (CE), 124.8 (C4), 114.4 (C5), 87.0 (C4'), 85.0 (C3'), 72.2 (CA, C1'), 67.0 (C5'), 35.8 (C2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 17.7 (SiC(CH₃)₃), -4.7 (Si(CH₃)₂), -4.9 (Si(CH₃)₂), -5.5 (Si(CH₃)₂), -5.6 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2953, 2929, 2857, 1737, 1638, 1571, 1514, 1470, 1445, 1430, 1401, 1372, 1227, 1190, 1089, 1068, 1019, 944, 917, 881, 833, 777, 741, 693, 671, 633, 502, 397. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 665.2428 [M], gef.: 666.0 [M+H]⁺.

Synthese von *O*⁶-Benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **145**

Es wurden 2.50 g (2.79 mmol) *O*⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **137** in 50 mL abs. 1,2-Dimethoxyethan gelöst und mit 887 mg (4.19 mmol) Kaliumphosphat, 255 mg (0.28 mmol) Pd₂(dba)₃, 520 mg (0.84 mmol) *rac*-BINAP sowie 598 mg (5.58 mmol) *p*-Toluidin versetzt. Dieses



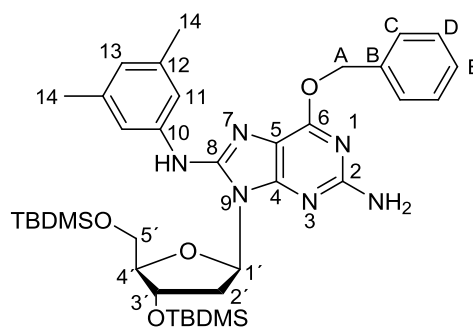
Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C für 6 Tage gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben und 10 mL gesättigte Natriumchlorid-Lösung. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gradienten (5% → 20%) gereinigt.

Reaktionszeit: 6 d. - **Ausbeute:** 703 mg (1.02 mmol, 37%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₃₆H₅₄N₆O₄Si₂. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.46. -

Smp.: 79 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 22.3 ° (c 1.0, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.49 (s, 1H, NH), 7.50 - 7.47 (m, 4H, H-C, H-D), 7.40 - 7.33 (m, 3H, H-11, H-E), 7.08 - 7.06 (m, 2H, H-12), 6.32 - 6.28 (m, 1H, H-1'), 6.02 (s, 2H, NH₂), 5.48 (s, 2H, H-A), 4.64 - 4.61 (m, 1H, H-3'), 3.88 - 3.80 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.70 - 3.66 (m, 1H, H-5'b), 3.43 - 3.38 (m, 1H, H-2'a), 2.23 (s, 3H, H-14), 2.14 - 2.08 (m, 1H, H-2'b), 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.02 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 157.6 (C2), 157.4 (C6), 146.5 (C8), 138.2 (C13), 137.0 (C10), 129.9 (CB), 129.0 (CC), 128.6 (CD), 128.3 (C11), 128.1 (CE), 127.9 (C4), 118.6 (C12), 111.3 (C5), 87.1 (C1'), 82.9 (C4'), 72.6 (C3'), 66.8 (CA), 63.0 (C5'), 36.5 (C2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 25.4 (SiC(CH₃)₃), 20.3 (C14), 18.0 (SiC(CH₃)₃), -4.7 (Si(CH₃)₂), -4.9 (Si(CH₃)₂), -5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3375, 2950, 2927, 2884, 2856, 1601, 1562, 1498, 1462, 1412, 1360, 1335, 1301, 1250, 1220, 1105, 1087, 1061, 1028, 1005, 966, 949, 830, 811, 775, 732, 696, 666, 504, 397. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 690.3745 [M], gef.: 691.3766 [M+H]⁺.

Synthese von O⁶-Benzyl-8-N-(3,5-dimethylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **146**

Es wurden 2.50 g (2.79 mmol) O⁶-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **137** in 50 mL abs. 1,2-Dimethoxyethan gelöst und mit 887 mg (4.19 mmol) Kaliumphosphat, 255 mg (0.28 mmol) Pd₂(dba)₃, 520 mg (0.84 mmol) *rac*-BINAP sowie 676 mg (5.58 mmol) 3,5-Dimethylanilin versetzt. Dieses



146

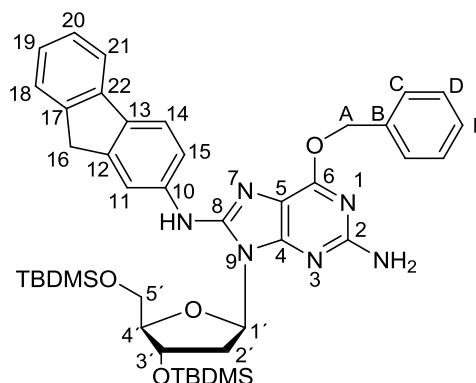
Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C für sechs Tage gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben und 10 mL gesättigte Natriumchlorid-Lösung. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gradienten (5% → 20%) gereinigt.

Reaktionszeit: 6 d. - **Ausbeute:** 1.26 g (1.79 mmol, 64%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₃₇H₅₆N₆O₄Si₂. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.48. -

Smp.: 122 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 17.4 ° (c 1.0, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.41 (s, 1H, NH), 7.50 - 7.47 (m, 2H, H-D), 7.40 - 7.32 (m, 4H, H-C, H-11), 7.13 (s, 1H, H-E), 6.56 (s, 1H, H-13), 6.29 - 6.25 (m, 1H, H-1'), 6.08 (s, 2H, NH₂), 5.50 (s, 2H, H-A), 4.61 - 4.58 (m, 1H, H-3'), 3.85 - 3.80 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3.70 - 3.68 (m, 1H, H-5'b), 2.21 (s, 6H, H-14), 2.12 - 2.06 (m, 2H, H-2'a, H-2'b), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.82 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.01 - -0.02 (m, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 157.8 (CB), 157.6 (C6), 153.9 (C2), 146.1 (C8), 140.8 (C4), 137.5 (C5), 128.3 (C13), 128.2 (C11), 127.9 (CC, CD, CE), 122.8 (C12), 115.6 (C10), 87.0 (C4'), 83.0 (C3'), 72.6 (C1'), 66.4 (CA), 63.0 (C5'), 36.5 (C2'), 25.8 (Si(CH₃)₂), 25.7 (Si(CH₃)₂), 21.2 (C14), 18.0 (SiC(CH₃)₃), 17.8 (SiC(CH₃)₃), -4.7 (SiC(CH₃)₃), -4.9 (SiC(CH₃)₃), -5.5 (SiC(CH₃)₃). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3376, 3331, 2949, 2927, 2857, 1615, 1594, 1564, 1543, 1523, 1496, 1464, 1451, 1412, 1361, 1307, 1252, 1221, 1209, 1184, 1135, 1108, 1087, 1063, 1024, 1003, 967, 938, 887, 865, 830, 811, 783, 775, 732, 683, 665, 541, 525, 510, 481, 436, 421, 397. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 704.3902 [M], gef.: 705.3898 [M+H]⁺.

Synthese von O^6 -Benzyl-8-*N*-(2-aminofluorenyl)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **147**

Es wurden 2.50 g (2.79 mmol) O^6 -Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **137** in 50 mL abs. 1,2-Dimethoxyethan gelöst und mit 887 mg (4.19 mmol) Kaliumphosphat, 255 mg (0.28 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 520 mg (0.84 mmol) *rac*-BINAP sowie 1.01 g (5.58 mmol) 2-Aminofluoren versetzt. Dieses Reaktionsgemisch wurde bei

**147**

80 °C für sechs Tage gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben und 10 mL gesättigte Natriumchlorid-Lösung. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gradienten (5% → 20%) gereinigt.

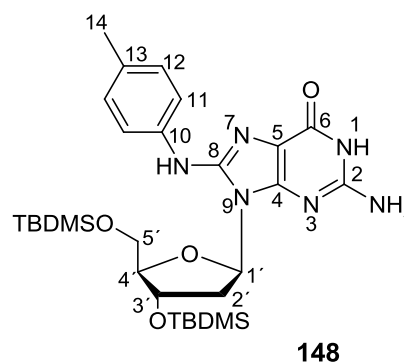
Reaktionszeit: 6 d. - **Ausbeute:** 1.01 g (1.32 mmol, 47%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{42}H_{56}N_6O_4Si_2$. - **DC:** R_f -Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.37. -

Smp.: 90 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 19.0 ° (*c* 0.9, $CHCl_3$). - **1H -NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$): 8.69 (s, 1H, NH), 7.76 (s, 1H, H-14), 7.75 - 7.58 (m, 1H, H-11), 7.52 - 7.51 (m, 1H, H-21), 7.49 - 7.41 (m, 3H, H-15, H-C), 7.39 - 7.06 (m, 7H, H-D, H-E, H-18, H-19, H-20), 6.36 - 6.33 (m, 1H, H-1'), 6.08 (s, 2H, NH_2), 5.51 (s, 2H, H-A), 4.65 - 4.63 (m, 1H, H-3'), 3.90 - 3.84 (m, 2H, H-16), 3.73 - 3.70 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3.47 - 3.40 (m, 1H, H-5'b), 2.17 - 2.15 (m, 1H, H-2'a), 0.98 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.91 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.13 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$), 0.08 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$). - **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $DMSO-d_6$): 157.6 (C2), 153.9 (C6), 146.1 (C8), 143.8 (C13), 142.4 (C22), 141.3 (C17), 140.0 (C12), 137.0 (C10), 134.5 (CB), 128.4 (CC), 128.2 (CD), 127.9 (CE), 126.6 (C15), 124.9 (C11), 124.2 (C4), 120.4 (C20), 120.1 (C18), 119.0 (C19), 117.9 (C21), 114.4 (C14), 110.3 (C5), 87.1 (C4'), 83.0 (C1'), 72.6 (CA), 66.4 (C3'), 63.0 (C5'), 59.7 (C16), 36.5 (C2'), 25.8 ($Si(CH_3)_2$), 25.7 ($Si(CH_3)_2$), 18.0 ($Si(CH_3)_2$), 17.8 ($Si(CH_3)_2$), -4.7 ($Si(CH_3)_3$), -4.9 ($Si(CH_3)_3$), -5.4 ($Si(CH_3)_3$). - **IR:**

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3350, 2949, 2927, 2856, 1593, 1560, 1495, 1467, 1454, 1416, 1353, 1311, 1251, 1216, 1181, 1107, 1092, 1063, 1031, 1005, 967, 933, 829, 776, 766, 730, 694, 666, 559, 548, 421. - **MS**: (FAB-HR, m/z): ber.: 764.3902 [M], gef.: 765.3956 [M+H]⁺.

Synthese von 8-*N*-(4-Methylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **148**

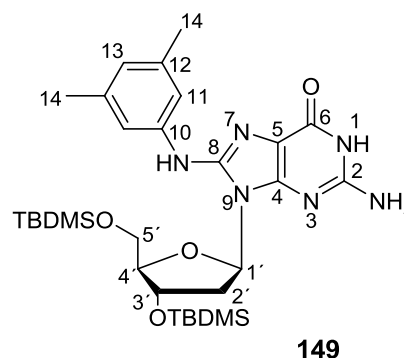
Es wurden 703 mg (1.02 mmol) *O*⁶-Benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **145** in 40 mL abs. Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Minuten in ein Ultraschallbad gehalten und unter Wasserstoffatmosphäre für sechs Stunden gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das saubere Produkt erhalten.



Reaktionszeit: 6 h. - **Ausbeute:** 501 mg (0.83 mmol, 81%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₉H₄₈N₆O₄Si₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.36. - **Smp.:** 111 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{23\text{C}}$: -13.2 ° (c 0.8, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.55 (s, 1H, H-1), 8.22 (s, 1H, NH), 7.38 - 7.36 (m, 2H, H-12), 7.06 - 7.04 (m, 2H, H-11), 6.22 - 6.17 (m, 3H, H-1', NH₂), 4.52 - 4.51 (m, 1H, H-3'), 3.81 - 3.73 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.72 - 3.69 (m, 1H, H-5'b), 3.18 - 3.17 (m, 1H, H-2'a), 2.23 (s, 3H, H-14), 2.10 - 2.04 (m, 1H, H-2'b), 0.88 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.83 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.10 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.01 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 157.6 (C6), 155.5 (C2), 148.1 (C8), 145.9 (C13), 140.2 (C10), 129.0 (C11), 124.8 (C4), 116.0 (C12), 112.2 (C5), 88.3 (C1'), 84.4 (C4'), 74.6 (C3'), 65.0 (C5'), 38.1 (C2'), 24.6 (SiC(CH₃)₃), 22.8 (C14), 20.2 (SiC(CH₃)₃), -4.2, -5.1 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2951, 2927, 2856, 1675, 1597, 1564, 1514, 1471, 1462, 1360, 1251, 1079, 1029, 832, 812, 775, 666. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 600.3276 [M], gef.: 601.3300 [M+H]⁺.

Synthese von 8-*N*-(3,5-Dimethylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **149**

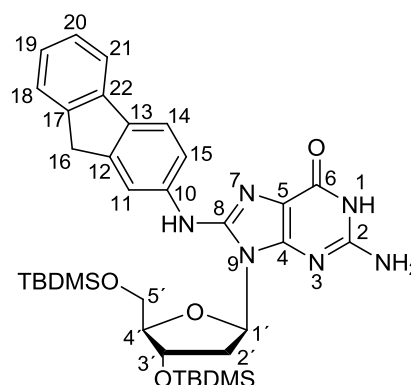
Es wurden 1.26 g (1.66 mmol) *O*⁶-Benzyl-8-*N*-(3,5-dimethylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **146** in 40 mL abs. Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Minuten in ein Ultraschallbad gehalten und unter Wasserstoffatmosphäre für 18 Stunden gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das saubere Produkt erhalten.



Reaktionszeit: 18 h. - **Ausbeute:** 0.98 g (1.60 mmol, 96%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₃₀H₅₀N₆O₄Si₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.33. - **Smp.:** 179 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: -29.0 ° (c 0.4, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.62 (s, 1H, H-1), 8.06 (s, 1H, NH), 6.99 (s, 2H, H-11), 6.51 (s, 1H, H-13), 6.23 - 6.16 (m, 3H, H-1', NH₂), 4.51 - 4.50 (m, 1H, H-3'), 3.81 - 3.70 (m, 3H, H-4', H-5'a, H-5'b), 3.12 - 3.05 (m, 1H, H-2'a), 2.20 (s, 6H, H-14), 2.08 - 2.03 (m, 1H, H-2'b), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.83 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.01 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 156.8 (C6), 153.8 (C2), 151.2 (C8), 145.9 (C4), 144.3 (C5), 139.1 (C12), 120.9 (C13), 119.5 (C11), 114.4 (C10), 112.2 (C5), 94.8 (C4'), 88.3 (C1'), 75.3 (C3'), 65.3 (C5'), 38.8 (C2'), 26.4 (SiC(CH₃)₃), 28.1 (C14), 19.4 (SiC(CH₃)₃), -4.9, -5.9 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2950, 2927, 2856, 1674, 1584, 1561, 1471, 1347, 1253, 1107, 1079, 1029, 1006, 940, 830, 774, 727, 666. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 614.3432 [M], gef.: 615.3438 [M+H]⁺.

Synthese von 8-*N*-(2-Aminofluorenyl)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **150**

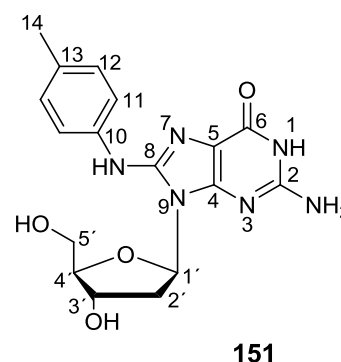
Es wurden 1.26 g (1.66 mmol) *O*⁶-Benzyl-8-*N*-(2-aminofluorenyl)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **147** in 40 mL abs. Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Minuten in ein Ultraschallbad gehalten und unter Wasserstoffatmosphäre für 2 Tage gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das saubere Produkt erhalten.

**150**

Reaktionszeit: 2 d. - **Ausbeute:** 823 mg (1.22 mmol, 73%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₃₅H₅₀N₆O₄Si₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.48. - **Smp.:** 153 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: - 27.3 ° (c 0.6, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.71 (bs, 1H, H-1), 8.44 (s, 1H, NH), 7.78 - 7.72 (m, 1H, H-14), 7.52 - 7.48 (m, 2H, H-11, H-21), 7.42 - 7.39 (m, 2H, H-15, H-18), 7.33 - 7.29 (m, 1H, H-19), 7.26 - 7.17 (m, 1H, H-20), 6.25 - 6.21 (m, 3H, H-1', NH₂), 4.53 - 4.52 (m, 1H, H-3'), 3.86 (s, 2H, H-16), 3.81 - 3.70 (m, 3H, H-4', H-5'a, H-5'b), 3.22 - 3.17 (m, 1H, H-2'a), 2.11 - 2.06 (m, 1H, H-2'b), 0.86 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.82 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.8 (C6), 158.8 (C2), 150.4 (C8), 145.8 (C13), 145.5 (C22), 141.7 (C17), 141.5 (C12), 139.0 (C10), 130.0 (C15), 127.6 (C11), 126.9 (C4), 122.3 (C20), 120.1 (C18), 119.9 (C19), 117.5 (C21), 115.1 (C14), 112.3 (C5), 89.4 (C4'), 88.2 (C1'), 73.3 (C3'), 65.7 (C5'), 59.1 (C16), 37.8 (C2'), 26.8 (SiC(CH₃)₃), 19.1 (SiC(CH₃)₃), -4.7, -5.6 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2950, 2927, 2884, 2855, 1677, 1587, 1560, 1494, 1457, 1433, 1348, 1256, 1108, 1027, 1006, 971, 939, 832, 813, 775, 765, 729, 698, 667, 583, 517, 500, 485, 474, 437, 420, 398, 388. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 674.3432 [M], gef.: 675.3508 [M+H]⁺.

Synthese von 8-*N*-(4-Methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **151**

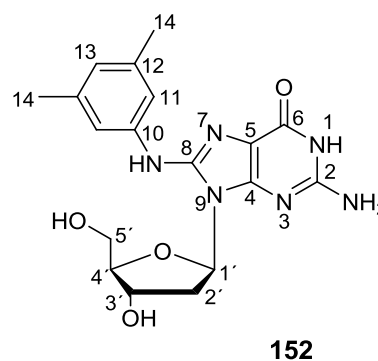
Es wurden 550 mg (1.47 mmol) 8-*N*-(4-Methylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **148** in 40 mL abs. Dichlormethan/abs. Tetrahydrofuran (1:1 v/v) gelöst und mit 2.04 mL (1.49 g, 14.7 mmol) Triethylamin sowie 3.00 mL (2.97 g, 18.4 mmol) Triethylamintrihydrofluorid versetzt. Nach vier Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde direkt in der nächsten Stufe umgesetzt.



Reaktionszeit: 4 h. - **Ausbeute:** Rohprodukt ist ein gelben Öl. - **Summenformel:** C₁₇H₂₀N₆O₄.

Synthese von 8-*N*-(3,5-Dimethylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **152**

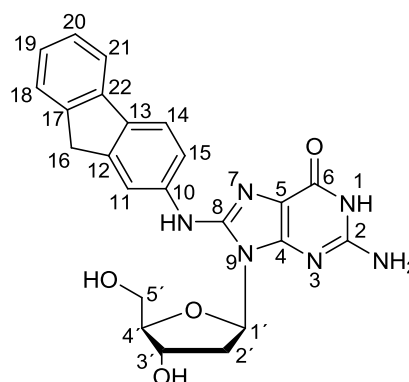
Es wurden 1.05 g (1.57 mmol) 8-*N*-(3,5-Dimethylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **149** in 40 mL abs. Dichlormethan/abs. Tetrahydrofuran (1:1 v/v) gelöst und mit 2.18 mL (1.59 g, 15.7 mmol) Triethylamin sowie 3.20 mL (3.17 g, 19.6 mmol) Triethylamintrihydrofluorid versetzt. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde direkt in der nächsten Stufe umgesetzt.



Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** Rohprodukt ist ein gelben Öl. - **Summenformel:** C₁₈H₂₂N₆O₄.

Synthese von 8-*N*-(2-Amino-2-fluorenyl)-2'-desoxyguanosin **153**

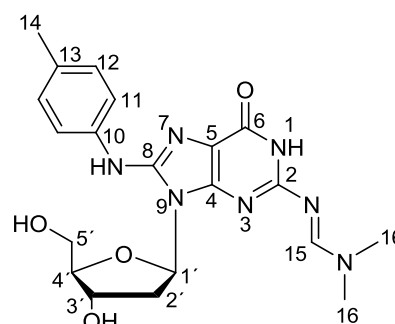
Es wurden 800 mg (1.19 mmol) 8-*N*-(2-Amino-2-fluorenyl)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **150** in 40 mL abs. Dichlormethan/abs. Tetrahydrofuran (1:1 v/v) gelöst und mit 1.65 mL (1.20 g, 11.9 mmol) Triethylamin sowie 2.43 mL (2.41 g, 14.9 mmol) Triethylamintrihydrofluorid versetzt. Nach sechs Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde direkt in der nächsten Stufe umgesetzt.

**153**

Reaktionszeit: 6 h. - **Ausbeute:** Rohprodukt ist ein gelben Öl. - **Summenformel:** C₂₃H₂₂N₆O₄.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **154**

Das 8-*N*-(4-Methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **151** wurde in 30 mL abs. Pyridin gelöst, mit 500 µL (430 mg, 2.91 mmol) *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal versetzt und für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 35%) gereinigt.

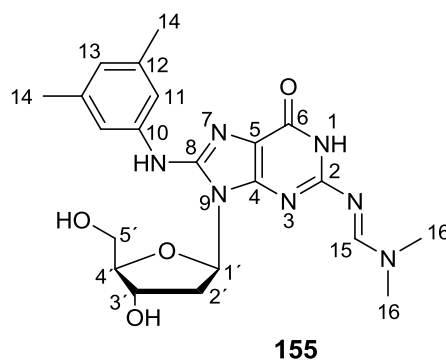
**154**

Reaktionszeit: 20 h. - **Ausbeute:** 533 mg (1.25 mmol, 85% über 2 Stufen) eines braunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₀H₂₅N₇O₄. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.80. - **Smp.:** 153 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 31.0 ° (c 0.9, CH₂Cl₂/CH₃OH). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.26 (bs, 1H, H-1), 8.53 (s, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, H-15), 7.80 - 7.76 (m, 2H, H-12), 7.35 - 7.20 (m, 2H, H-11), 6.45 - 6.41 (m, 1H, H-1'), 5.92 (s, 1H, 5'-OH), 5.40 (s, 1H, 3'-OH), 4.48 (s, 1H, H-3'), 3.94 (s, 1H, H-5'a), 3.91 - 3.90 (m, 1H, H-4'), 3.78 (s, 1H, H-5'b), 3.16 (s, 3H, H-16), 3.03 (s, 3H, H-16), 2.11 - 2.07 (m, 1H, H-2'a). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 157.5

(C15), 156.6 (C2), 155.9 (C6), 148.1 (C8), 144.2 (C13), 139.9 (C10), 128.1 (C4), 126.6 (C11), 116.5 (C12), 114.1 (C5), 87.2 (C1'), 82.7 (C4'), 71.1 (C3'), 61.2 (C5'), 45.6 (C2'), 34.5 (C16), 8.7 (C14). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3405, 1628, 1599, 1557, 1531, 1477, 1456, 1427, 1397, 1344, 1110, 704, 648, 474. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 427.1968 [M], gef.: 428.2024 [M+H]⁺.

Synthese von **N²-Formamidin-8-*N*-(3,5-dimethylphenylamino)-2'-desoxy-guanosin 155**

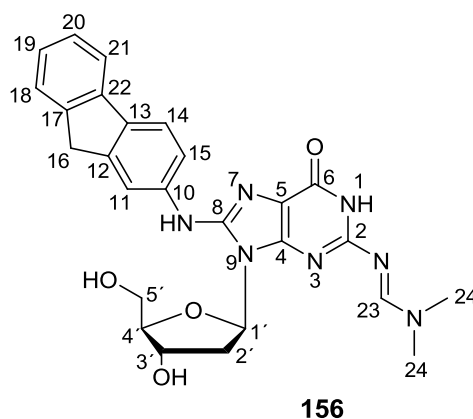
Das 8-*N*-(3,5-Dimethylphenylamino)-2'-desoxy-guanosin **152** wurde in 30 mL abs. Pyridin gelöst, mit 540 μ L (462 mg, 3.14 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal versetzt und für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% \rightarrow 35%) gereinigt.



Reaktionszeit: 18 h. - **Ausbeute:** 576 mg (1.31 mmol, 83% über 2 Stufen) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₁H₂₇N₇O₄. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.83. - **Smp.:** 150 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 11.3 ° (c 0.5, CH₂Cl₂/CH₃OH). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.25 (s, 1H, H-1), 8.25 (s, 2H, NH, H-15), 7.32 (s, 2H, H-11), 6.55 (s, 1H, H-13), 6.44 - 6.40 (m, 1H, H-1'), 5.84 - 5.82 (m, 1H, 5'-OH), 5.37 - 5.38 (m, 1H, 3'-OH), 4.45 - 4.44 (m, 1H, H-3'), 3.91 - 3.90 (m, 1H, H-5'a), 3.76 - 3.74 (m, 2H, H-4', H-5'b), 3.15 (s, 3H, H-16), 3.02 (s, 3H, H-16), 2.24 (s, 6H, H-14). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 160.2 (C15), 158.9 (C6), 156.3 (C2), 155.8 (C8), 148.1 (C4), 144.3 (C5), 140.6 (C10), 137.4 (C13), 122.4 (C12), 115.2 (C11), 87.1 (C4'), 82.6 (C3'), 71.0 (C1'), 61.1 (C5'), 45.7 (C2'), 34.6 (C16), 21.2 (C14). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3301, 2925, 2857, 2175, 2039, 2023, 1998, 1966, 1671, 1624, 1560, 1498, 1475, 1420, 1391, 1341, 1262, 1181, 1139, 1110, 1096, 1060, 1031, 992, 940, 831, 803, 774, 731, 686, 650, 581, 560, 378. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 441.2125 [M], gef.: 442.2278 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-(2-aminofluorenyl)-2'-desoxyguanosin **156**

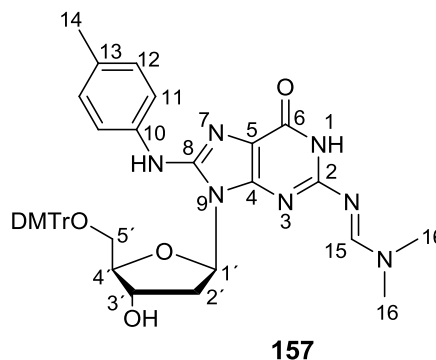
Das 8-*N*-(2-Aminofluorenyl)-2'-desoxyguanosin **153** wurde in 30 mL abs. Pyridin gelöst, mit 410 μ L (350 mg, 2.38 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal versetzt und für 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% \rightarrow 35%) gereinigt.



Reaktionszeit: 30 h. - **Ausbeute:** 499 mg (0.99 mmol, 83% über 2 Stufen) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₆H₂₇N₇O₄. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 6:1 v/v): 0.72. - **Smp.:** > 200 °C (Zersetzung). - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 9.0 ° (c 0.4, CH₂Cl₂/CH₃OH). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.23 (bs, 1H, H-1), 8.63 - 8.47 (m, 2H, H-23, NH), 7.64 - 7.62 (m, 4H, H-11, H-14, H-15, H-21), 7.08 - 7.06 (m, 3H, H-18, H-19, H-20), 6.45 - 6.41 (m, 1H, H-1'), 5.84 (s, 1H, 5'-OH), 5.36 (s, 1H, 3'-OH), 4.44 (s, 1H, H-3'), 4.09 (s, 1H, H-5'a), 3.92 - 3.91 (m, 2H, H-16), 3.75 (s, 2H, H-4', H-5'b), 3.17 (s, 3H, H-24), 3.15 (s, 3H, H-24), 2.67 - 2.66 (m, 1H, H-2'a), 2.08 - 2.03 (m, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.6 (C23), 159.0 (C10), 157.7 (C6), 155.2 (C2), 151.6 (C8), 146.3 (C13), 145.1 (C22), 143.3 (C17), 142.2 (C12), 140.6 (C14), 136.2 (C4), 126.4 (C11), 125.0 (C20), 122.1 (C18), 120.0 (C19), 117.9 (C21), 117.3 (C5), 115.6 (C15), 87.6 (C4'), 82.9 (C1'), 71.4 (C3'), 63.3 (C16), 50.1 (C5'), 39.5 (C2'), 34.8 (C24). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3075, 2928, 1594, 1574, 1506, 1478, 1448, 1404, 1388, 1338, 1326, 1295, 1284, 1157, 1115, 1100, 1077, 1005, 851, 773, 738, 692, 476. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 501.2125 [M], gef.: 502.2225 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-(4-methylamino)-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **157**

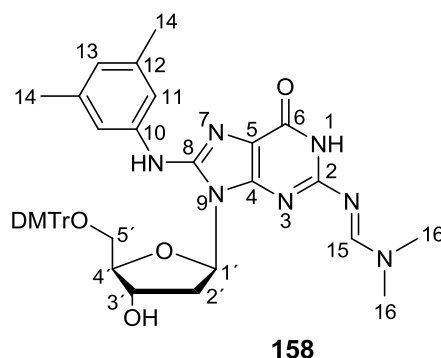
Es wurden 620 mg (1.47 mmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-(4-methylamino)-2'-desoxyguanosin **154** in 35 mL abs. Pyridin gelöst, mit 592 mg (1.76 mmol) DMTr-Chlorid **118** versetzt und für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 5%) gereinigt.



Reaktionszeit: 18 h. - **Ausbeute:** 281 mg (0.39 mmol, 27%) eines braunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₄₁H₄₃N₇O₆. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.30. - **Smp.:** 173 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 14.3 ° (c 0.6, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.21 (s, 1H, H-1), 8.52 (s, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, H-15), 7.55 - 7.53 (m, 2H, H-11), 7.30 - 7.21 (m, 8H, H_{arom.}), 7.10 - 7.04 (m, 2H, H-12), 6.75 - 6.70 (m, 5H, H_{arom.}), 6.45 - 6.40 (m, 1H, H-1'), 5.40 - 5.35 (m, 1H, 3'-OH), 4.47 - 4.40 (m, 1H, H-3'), 3.89 - 3.82 (m, 1H, H-5'a), 3.70 - 3.65 (m, 2H, H-4', H-5'b), 3.65 (s, 6H, OCH₃), 3.20 - 3.14 (m, 1H, H-2'a), 3.00 (s, 3H, H-16), 2.95 (s, 3H, H-16), 2.25 (s, 3H, H-14), 2.20 (bs, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 157.8 (C15), 157.0 (C2), 156.1 (C6), 149.0 (C8), 146.0 (C13), 139.2 (C10), 130.5 (C4), 129.1 (C11), 120.1 (C12), 118.2 (C5), 86.7 (C1'), 84.3 (C4'), 72.9 (C3'), 64.0 (C5'), 55.0 (OCH₃), 37.6 (C2'), 24.5 (C16), 21.0 (C14). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2918, 1659, 1626, 1604, 1574, 1560, 1523, 1507, 1462, 1444, 1421, 1338, 1291, 1243, 1173, 1110, 1090, 1069, 1031, 960, 916, 903, 826, 810, 790, 778, 755, 727, 700, 582, 558, 497. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 729.3275 [M], gef.: 730.3355 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-(3,5-dimethylamino)-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **158**

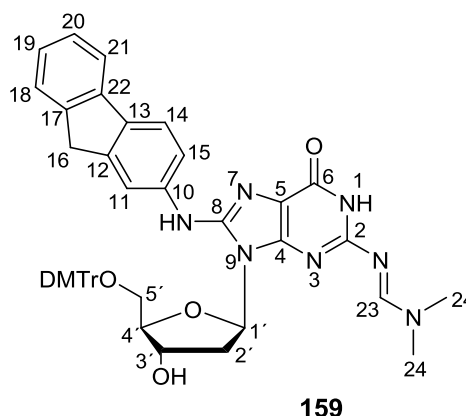
Es wurden 570 mg (1.31 mmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-(3,5-dimethylamino)-2'-desoxyguanosin **155** in 35 mL abs. Pyridin gelöst, mit 532 mg (1.57 mmol) DMTr-Chlorid **118** versetzt und für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 5%) gereinigt.



Reaktionszeit: 18 h. - **Ausbeute:** 508 mg (0.68 mmol, 52%) eines braunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₄₂H₄₅N₇O₆. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.35. - **Smp.:** 166 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 11.1 ° (c 0.2, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.30 (s, 1H, H-1), 8.42 (s, 1H, NH), 8.22 (s, 1H, H-15), 8.11 (s, 1H, H-13), 7.22 - 7.15 (m, 11H, H_{arom.}), 6.75 - 6.69 (m, 4H, H_{arom.}), 6.31 - 6.29 (m, 1H, H-1'), 5.29 (bs, 1H, 3'-OH), 4.55 - 4.53 (m, 1H, H-3'), 3.87 - 3.83 (m, 2H, H4', H-5'a), 3.66 (s, 6H, OCH₃), 3.24 - 3.11 (m, 1H, H-5'b), 2.99 (s, 6H, H-16), 2.23 - 2.20 (m, 3H, H-2'a, H-14), 2.00 - 1.92 (m, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 160.0 (C15), 159.8 (C6), 158.2 (C2), 149.9 (C8), 147.2 (C4), 137.2 (C5), 131.8 (C13), 139.4 (C11), 119.0 (C12), 118.2 (C10), 114.2 (OCH₃), 86.7 (C4'), 86.0 (C3'), 80.6 (C1'), 65.5 (C5'), 55.0 (C16), 35.1 (C2'), 19.8 (C14). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2823, 1762, 1634, 1583, 1523, 1517, 1502, 1434, 1401, 1378, 1300, 1263, 1200, 1119, 1068, 953, 900, 873, 832, 789, 774, 749, 707, 580, 559, 492. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 743.3431 [M], gef.: 744.3441 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-(2-aminofluorenyl)-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **159**

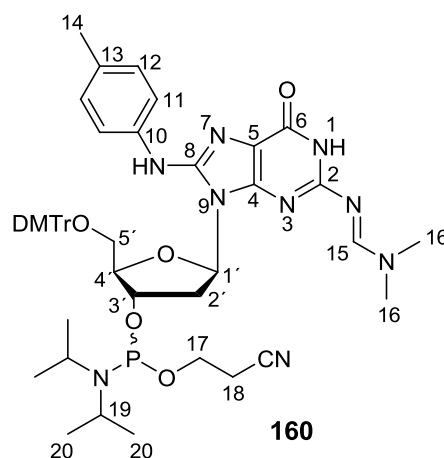
Es wurden 590 mg (1.19 mmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-(2-aminofluorenyl)-2'-desoxyguanosin **156** in 35 mL abs. Pyridin gelöst, mit 483 mg (1.43 mmol) DMTr-Chlorid **118** versetzt und für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 5%) gereinigt.



Reaktionszeit: 0 h. - **Ausbeute:** 236 mg (0.30 mmol, 25%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₄₇H₄₅N₇O₆. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.20. - **Smp.:** 191 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 4.0 ° (c 0.7, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.30 (bs, 1H, H-1), 8.80 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, H-23), 8.01 - 7.83 (m, 2H, H_{arom.}), 7.80 - 7.69 (m, 2H, H_{arom.}), 7.60 - 7.56 (m, 1H, H_{arom.}), 7.52 - 6.83 (m, 15H, H_{arom.}), 6.43 - 6.41 (m, 1H, H-1'), 5.36 - 5.34 (s, 1H, 3'-OH), 4.51 - 4.44 (s, 1H, H-3'), 3.98 - 3.84 (m, 1H, H-5'a), 3.90 - 3.87 (m, 2H, H-16), 3.72 - 3.68 (m, 2H, H-4', H-5'b), 3.18 - 3.11 (m, 6H, H-24), 2.77 - 2.72 (m, 1H, H-2'a), 2.11 - 2.26 (m, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 158.5 (C23), 158.2 (C_{arom.}), 156.5 (C6), 153.2 (C2), 150.5 (C8), 146.2 (C_{arom.}), 144.3 (C_{arom.}), 142.7 (C_{arom.}), 143.7 (C_{arom.}), 140.9 (C_{arom.}), 135.3 (C4), 127.7 (C_{arom.}), 125.3 (C_{arom.}), 124.8 (C_{arom.}), 121.0 (C_{arom.}), 119.3 (C_{arom.}), 118.7 (C_{arom.}), 117.2 (C5), 116.3 (C_{arom.}), 86.7 (C4'), 82.8 (C1'), 70.4 (C3'), 64.8 (C16), 63.9 (C5'), 55.8 (OCH₃), 38.4 (C2'), 34.4 (C24). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2930, 1669, 1626, 1575, 1557, 1525, 1507, 1455, 1422, 1339, 1299, 1246, 1174, 1111, 1029, 979, 946, 825, 764, 728, 700, 581, 557, 546, 502. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 803.3431 [M], gef.: 804.3490 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-(4-methylamino)-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit 2'-desoxyguanosin **160**

Es wurden 280 mg (0.38 mmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-(4-methylamino)-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **157** zweimal mit je 15 mL abs. Acetonitril coevaporiert. In 30 mL abs. Dichlormethan/abs. Acetonitril (1:1 v/v) gelöst, mit 89.0 mg (0.76 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol sowie 202 μ L (193 mg, 0.76 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% \rightarrow 1%) gereinigt.



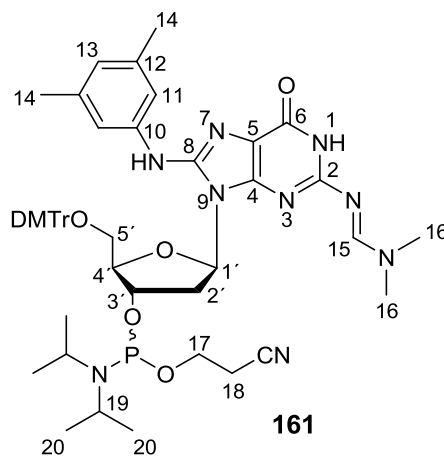
Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute:** 251 mg (0.27 mmol, 72%) eines weißen Feststoffs.

- **Summenformel:** C₅₀H₆₀N₉O₇P. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.49. -

Smp.: 104 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 19.0 ° (c 0.1, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 11.89 (s, 1H, H-1), 8.45 (s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, H-15), 7.89 - 6.78 (m, 18H, H_{arom.}), 6.44 - 6.40 (m, 1H, H-1'), 4.95 - 4.66 (m, 1H, H-3'), 4.34 - 4.29 (m, 1H, H-4'), 3.72 - 3.46 (m, 19H, H-5'a, H-5'b, OCH₃H-2'a, H-16, H-19, H-17), 2.88 - 2.80 (s, 1H, H-2'b), 2.55 - 2.50 (m, 5H, H-14, H-18, H-2'b), 1.22 - 1.13 (m, 12H, H-20). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, Benzol-*d*₆): 159.6, 157.4, 156.4, 149.3, 147.1, 146.4, 146.2, 138.3, 137.2, 134.1, 134.0, 131.6, 129.9, 129.6, 128.3, 121.5, 121.4, 119.4, 118.4, 117.7, 115.9, 114.0, 113.7, 89.2, 86.8, 85.7, 76.3, 75.1, 75.0, 74.6, 65.1, 65.0, 55.0, 44.1, 43.6, 41.7, 38.5, 37.7, 31.2, 25.6, 21.4, 20.0. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 147.8, 147.6. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2962, 2930, 2836, 1674, 1626, 1576, 1526, 1507, 1463, 1424, 1339, 1301, 1248, 1201, 1176, 1113, 1069, 1030, 978, 945, 899, 828, 790, 777, 754, 726, 701, 582, 555, 516. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 929.4353 [M], gef.: 930.4420 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-(3,5-dimethylamino)-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit 2'-desoxyguanosin **161**

Es wurden 500 mg (0.670 mmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-(3,5-dimethylamino)-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **158** zweimal mit je 15 mL abs. Acetonitril coevaporiert. In 30 mL abs. Dichlormethan/abs. Acetonitril (1:1 v/v) gelöst, mit 157 mg (1.34 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol sowie 356 μ L (340 mg, 1.34 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** versetzt und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.



Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% \rightarrow 1%) gereinigt.

Reaktionszeit: 3 h. - **Ausbeute:** 333 mg (0.35 mmol, 52%) eines weißen Feststoffs.

- **Summenformel:** C₅₁H₆₂N₉O₇P. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.60. -

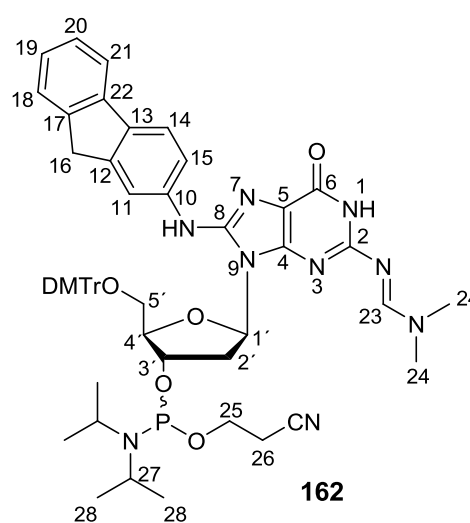
Smp.: 124 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 21.0 ° (c 0.1, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm]

(400 MHz, Benzol-*d*₆): 11.45 (s, 1H, H-1), 8.50 (s, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, H-15), 7.55 - 6.45 (m, 18H, H_{arom.}), 6.40 - 6.32 (m, 1H, H-1'), 4.99 - 4.83 (m, 1H, H-3'), 4.23 - 3.82 (m, 1H, H-4'), 3.72 - 3.24 (m, 13H, OCH₃, H-19, H-2'a, H-5'a, H-5'b, H-17), 2.80 - 2.60 (m, 7H, H-16, H-2'b), 2.49 - 2.30 (m, 2H, H-18), 2.23 - 2.20 (m, 6H, H-14), 1.10 - 0.95 (m, 12H, H-20). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, Benzol-*d*₆): 160.1, 159.5, 158.5, 158.1, 157.2, 147.6, 146.5, 145.9, 141.1, 141.0, 139.4, 138.5, 137.2, 117.6, 117.5, 113.8, 88.2, 87.6, 86.1, 85.9, 79.3, 79.2, 75.1, 73.9, 64.1, 62.9, 60.1, 58.2, 57.9, 55.0, 44.2, 43.6, 42.1, 40.0, 35.4, 34.7, 25.8, 24.6, 22.0, 21.6, 20.7, 20.6, 20.2, 17.0.

- **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 148.9, 148.4. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2931, 2837, 2725, 2220, 1669, 1628, 1608, 1577, 1560, 1529, 1508, 1463, 1441, 1396, 1341, 1297, 1248, 1175, 1151, 1103, 1079, 1056, 1031, 980, 828, 790, 755, 726, 701, 667, 636, 582, 564, 521. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 943.4510 [M], gef.: 944.4140 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-(2-aminofluorenyl)-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **162**

Es wurden 230 mg (0.29 mmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-(2-aminofluorenyl)-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **159** zweimal mit je 5 mL abs. Acetonitril coevaporiert. In 30 mL abs. Dichlormethan/abs. Acetonitril (1:1 v/v) gelöst, mit 363 mg (0.58 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol sowie 154 μ L (147 mg, 0.58 mmol) Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit **127** versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das

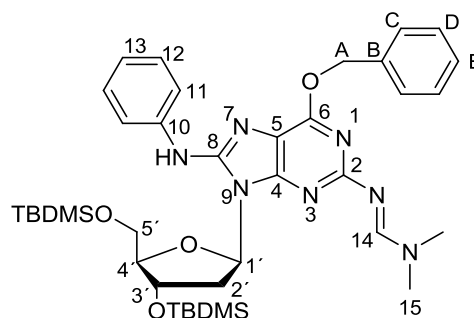


Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% \rightarrow 1%) gereinigt.

Reaktionszeit: 2.5 h. - **Ausbeute:** 241 mg (0.24 mmol, 83%) eines weißen Feststoffs. - **Summenformel:** C₅₆H₆₂N₉O₇P. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.48. - **Smp.:** 110 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23^\circ C}$: 10.0 ° (c 0.1, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 11.15 (bs, 1H, H-1), 8.62 (s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, H-23), 8.01 - 7.92 (m, 2H, H_{arom.}), 7.79 - 7.70 (m, 2H, H_{arom.}), 7.65 - 7.24 (m, 13H, H_{arom.}), 7.22 - 7.14 (m, 2H, H_{arom.}), 7.12 - 7.10 (m, 2H, H_{arom.}), 6.50 - 6.40 (m, 1H, H-1'), 5.11 - 4.99 (m, 1H, H-3'), 4.52 - 4.36 (m, 1H, H-4'), 3.88 - 3.72 (m, 7H, H-5'a, H-5'b, H-16, H-25, H-27), 3.45 - 3.20 (m, 6H, OCH₃), 2.74 - 2.45 (m, 7H, H-24, H-2'a), 2.00 - 1.89 (m, 1H, H-2'b), 1.00 - 0.88 (m, 12H, H-28). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, Benzol-*d*₆): 160.5, 159.8, 159.0, 158.8, 157.4, 155.7, 150.3, 144.5, 137.3, 136.7, 131.7, 129.5, 129.4, 129.3, 128.6, 127.8, 114.3, 60.2, 55.6, 44.2, 35.9, 25.0, 24.9, 22.0, 21.0, 20.9, 9.5, 8.9. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 148.7, 148.5. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2917, 1672, 1626, 1576, 1527, 1507, 1444, 1424, 1338, 1301, 1248, 1175, 1113, 1067, 1031, 979, 945, 901, 828, 790, 777, 754, 727, 701, 583, 554. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 1003.4510 [M], gef.: 1004.5073 [M+H]⁺.

Synthese von N^2 -Formamidin- O^6 -benzyl-8- N -(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **135**

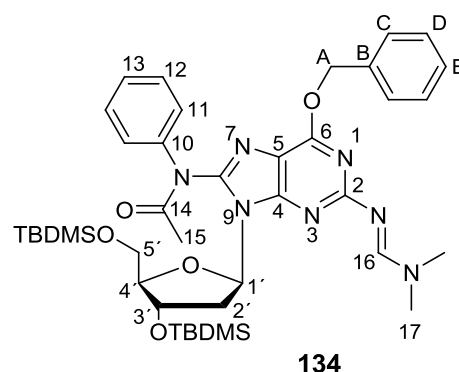
Es wurden 2.00 g (2.90 mmol) O^6 -Benzyl-8- N -(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **136** in 30 mL abs. Pyridin gelöst, mit 990 μ L (853 mg, 5.80 mmol) N,N -Dimethylformamid-diethylacetal versetzt und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% \rightarrow 5%) gereinigt.

**135**

Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 740 mg (0.99 mmol, 34%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{39}H_{61}N_7O_4Si_2$. - **DC:** R_f -Wert (CH_2Cl_2/CH_3OH ; 7:3 v/v): 0.55. - **Smp.:** 101 $^{\circ}C$. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23^{\circ}C}$: 29 $^{\circ}$ (c 0.8, $CHCl_3$). - **1H -NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$): 8.49 (s, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, H-14), 7.50 - 7.47 (m, 4H, H-C, H-D), 7.40 - 7.33 (m, 3H, H-11, H-E), 7.08 - 7.06 (m, 2H, H-12), 6.32 - 6.28 (m, 1H, H-1'), 6.02 (s, 2H, NH_2), 5.48 (s, 2H, H-A), 4.64 - 4.61 (m, 1H, H-3'), 3.88 - 3.80 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.70 - 3.66 (m, 1H, H-5'b), 3.43 - 3.38 (m, 1H, H-2'a), 3.16 (s, 3H, H-15), 3.03 (s, 3H, H-15), 2.14 - 2.08 (m, 1H, H-2'b), 0.90 (s, 9H, $SiC(CH_3)_3$), 0.81 (s, 9H, $SiC(CH_3)_3$), 0.11 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$), 0.02 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$). - **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $DMSO-d_6$): 157.6 (C2), 157.5 (C14), 157.4 (C6), 146.5 (C8), 138.2 (C13), 137.0 (C10), 129.9 (CB), 129.0 (CC), 128.6 (CD), 128.3 (C11), 128.1 (CE), 127.9 (C4), 118.6 (C12), 111.3 (C5), 87.1 (C1'), 82.9 (C4'), 72.6 (C3'), 66.8 (CA), 63.0 (C5'), 36.5 (C2'), 34.6 (C15), 25.7 ($SiC(CH_3)_3$), 25.6 ($SiC(CH_3)_3$), 25.4 ($SiC(CH_3)_3$), 18.0 ($SiC(CH_3)_3$), -4.7 ($Si(CH_3)_2$), -4.9 ($Si(CH_3)_2$), -5.5 ($Si(CH_3)_2$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3385, 2950, 2884, 2852, 1601, 1562, 1498, 1462, 1412, 1335, 1302, 1250, 1220, 1105, 1087, 1061, 1028, 1005, 966, 949, 830, 811, 775, 732, 696, 666, 505, 397. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 747.4324 [M], gef.: 748.5011 [$M+H$] $^+$.

Synthese von *N*²-Formamidin-*O*⁶-benzyl-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **134**

Es wurden 700 mg (0.94 mmol) *N*²-Formamidin-*O*⁶-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **135** in 30 mL abs. Pyridin gelöst, mit 348 mg (2.85 mmol) 4-DMAP und 270 μ L (291 mg, 2.85 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt und für 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

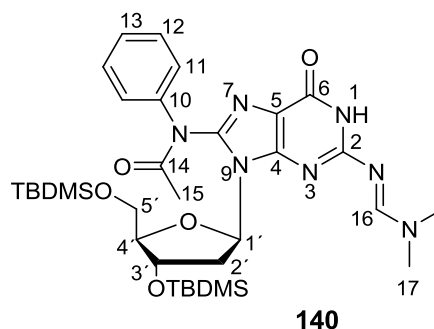


Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% \rightarrow 5%) gereinigt.

Reaktionszeit: 17 h. - **Ausbeute:** 189 mg (0.24 mmol, 25%) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₄₁H₆₃N₇O₅Si₂. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.26. - **Smp.:** 122 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23C}$: 43 ° (c 0.5, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.51 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, H-16), 7.53 - 7.48 (m, 4H, H-C, H-D), 7.42 - 7.36 (m, 3H, H-11, H-E), 7.09 - 7.05 (m, 2H, H-12), 6.34 - 6.27 (m, 1H, H-1'), 6.05 (s, 2H, NH₂), 5.50 (s, 2H, H-A), 4.67 - 4.62 (m, 1H, H-3'), 3.89 - 3.81 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.71 - 3.65 (m, 1H, H-5'b), 3.42 - 3.39 (m, 1H, H-2'a), 3.15 (s, 3H, H-17), 3.03 (s, 3H, H-17), 2.15 - 2.08 (m, 1H, H-2'b), 2.01 (s, 3H, H-15), 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.80 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.01 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 168.3 (C14), 157.8 (C2), 157.4 (C16), 157.2 (C6), 146.0 (C8), 138.2 (C13), 136.6 (C10), 129.8 (CB), 129.0 (CC), 128.4 (CD), 128.0 (C11), 128.1 (CE), 127.2 (C4), 118.1 (C12), 111.0 (C5), 87.1 (C1'), 83.0 (C4'), 72.5 (C3'), 66.9 (CA), 63.2 (C5'), 36.0 (C2'), 34.5 (C17), 25.8 (SiC(CH₃)₃), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.2 (SiC(CH₃)₃), 19.2 (C15), 18.0 (SiC(CH₃)₃), -4.9 (Si(CH₃)₂), -5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3366, 2952, 2891, 2862, 1758, 1561, 1500, 1474, 1422, 1334, 1302, 1219, 1107, 1088, 1030, 1006, 965, 950, 844, 800, 712, 697, 665. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 789.4429 [M], gef.: 790.4878 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-3',5'-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **140**

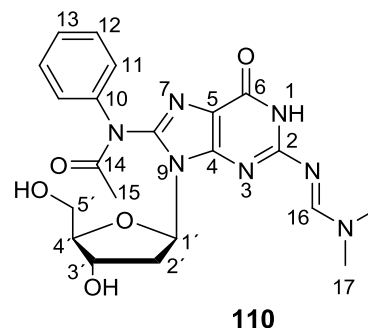
Es wurden 189 mg (0.24 mmol) *N*²-Formamidin-*O*⁶-benzyl-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-3',5'-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **134** in 40 mL abs. Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Minuten in ein Ultraschallbad gehalten und unter Wasserstoffatmosphäre für 16 Stunden gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das saubere Produkt erhalten.



Reaktionszeit: 16 h. - **Ausbeute:** 140 mg (0.20 mmol, 82%) eines hellbraunen Feststoffs. - **Summenformel:** C₃₄H₅₅N₇O₅Si₂. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.32. - **Smp.:** 131 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{23°C}$: 33 °(c 0.4, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.51 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, H-16), 7.42 - 7.36 (m, 2H, H-11), 7.09 - 7.05 (m, 2H, H-12), 6.34 - 6.27 (m, 1H, H-1'), 6.05 (s, 2H, NH₂), 4.67 - 4.62 (m, 1H, H-3'), 3.89 - 3.81 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.71 - 3.65 (m, 1H, H-5'b), 3.42 - 3.39 (m, 1H, H-2'a), 3.15 (s, 3H, H-17), 3.03 (s, 3H, H-17), 2.15 - 2.08 (m, 1H, H-2'b), 2.01 (s, 3H, H-15), 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.80 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.01 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 168.3 (C14), 157.8 (C2), 157.4 (C16), 157.2 (C6), 146.0 (C8), 138.2 (C13), 136.6 (C10), 128.0 (C11), 127.2 (C4), 118.1 (C12), 111.0 (C5), 87.1 (C1'), 83.0 (C4'), 72.5 (C3'), 66.9 (CA), 63.2 (C5'), 36.0 (C2'), 34.5 (C17), 25.8 (SiC(CH₃)₃), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.2 (SiC(CH₃)₃), 19.2 (C15), 18.0 (SiC(CH₃)₃), -4.9 (Si(CH₃)₂), -5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 2951, 2927, 2884, 2856, 1675, 1601, 1597, 1564, 1514, 1473, 1462, 1413, 1360, 1303, 1251, 1079, 1029, 955, 832, 812, 775, 666. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 697.3803 [M], gef.: 698.3760 [M+H]⁺.

Synthese von *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin **110**

Es wurden 140 mg (0.20 mmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-3',5'-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **140** in 40 mL abs. Dichlormethan/abs. Tetrahydrofuran (1:1 v/v) gelöst und mit 280 μ L (203 mg, 2.00 mmol) Triethylamin sowie 408 μ L (404 mg, 2.50 mmol) Triethylamintrihydrofluorid versetzt. Nach elf Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% \rightarrow 15%) gereinigt.



Reaktionszeit: 11 h. - **Ausbeute:** 29 mg (0.06 mmol, 31%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** C₂₂H₂₇N₇O₅. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 7:3 v/v): 0.72. - **Smp.:** 172 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 79 ° (c 0.4, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.50 (bs, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, H-17), 7.42 - 7.22 (m, 4H, H-11, H-12), 6.15 (bs, 1H, H-1'), 5.33 - 5.32 (m, 1H, 3'-OH), 4.80 (s, 1H, 5'-OH), 4.50 - 4.40 (m, 1H, H-3'), 3.85 - 3.81 (m, 1H, H-4'), 3.66 - 3.65 (m, 1H, H-5'a), 3.56 - 3.55 (m, 1H, H-5'b), 3.16 (s, 3H, H-17), 3.05 - 3.02 (m, 4H, H-2'a, H-17), 2.16 - 2.14 (m, 1H, H-2'b), 2.04 (s, 3H, H-15). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 172.2 (C14), 160.3 (C16), 158.2 (C2, C6), 149.2 (C10), 130.1 (C8), 129.7 (C12), 127.9 (C11, C13), 120.6 (C5), 90.2 (C4'), 84.0 (C1'), 70.8 (C3'), 61.9 (C5'), 35.8 (C2'), 33.5 (C17), 20.4 (C15). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3231, 2921, 1680, 1629, 1524, 1507, 1422, 1353, 1320, 1283, 1180, 1112, 1052, 987, 968, 786, 727, 515. - **MS:** (FAB-HR, m/z): ber.: 469.2074 [M], gef.: 470.2002 [M+H]⁺.

10.3 Oligonucleotide

NarI-Sequenz (12mer)

Synthese des unmodifizierten Oligonucleotids **171**

5' - d(CTCGGCGCCATC) - 3'

M: 3582.4

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 27.33 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 892.16 (-4), 1189.34 (-3)

Synthese des Gegenstranges des unmodifizierten Oligonucleotids **171a**

5' - d(GATGGCGCCGAG) - 3'

M: 3711.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 26.48 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 924.39 (-4), 1232.76 (-3)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids **172**

5' - d(CTCG^[Ac-phenyl]GCGCCATC) - 3'

M: 3715.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 26.24 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1237.2047 (-3), 1856.3253 (-2)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids **173**

5' - d(CTCG^[phenyl]GCGCCATC) - 3'

M: 3673.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 18.56 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1223.1408(-3), 1835.7396(-2)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids **174**

5' - d(CTCG^[Ac-2-fluorenyl]GCGCCATC) - 3'

M: 3803.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 32.69 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1266.8105 (-3), 1900.7225 (-2)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids **175**5' - d(CTCG^[2-fluorenyl]GCGCCATC) - 3'

M: 3761.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 34.27 min.

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1252.8283 (-3), 1879.7499 (-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **176**5' - d(CTCGGCG^[Ac-phenyl]CCATC) - 3'

M: 3715.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 27.07 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1237.5489 (-3), 1856.8290 (-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **177**5' - d(CTCGGCG^[phenyl]CCATC) - 3'

M: 3673.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 27.44 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1223.5451 (-3), 1835.8245(-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **178**5' - d(CTCGGCG^[Ac-2-fluorenyl]CCATC) - 3'

M: 3803.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 33.49 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1266.5546 (-3), 1900.3501 (-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **179**5' - d(CTCGGCG^[2-fluorenyl]CCATC) - 3'

M: 3761.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 34.13 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1252.8816 (-3), 1879.8320 (-2)

EcoRI-Sequenz (12mer)Synthese des unmodifizierten Oligonucleotids **180**

5' - d(GTAGAA TTC TAC) - 3'

M: 3644.5

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 27.71 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 910 (-4), 1214 (-3)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **181**5' - d(GTAG^[Ac-phenyl]AA TTC TAC) - 3'

M: 3777.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 29.65 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1258.2045 (-3), 1887.3565(-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **167**5' - d(GTAG^[Ac-4-methylphenyl]AA TTC TAC) - 3'

M: 3791.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 27.20 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1262.5721 (-3), 1894.3740(-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **165**5' - d(GTAG^[Ac-4-methoxyphenyl]AA TTC TAC) - 3'

M: 3807.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 29.41 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1267.7357 (-3), 1902.1561(-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **183**5' - d(GTAG^[Ac-3,5-dimethylphenyl]AA TTC TAC) - 3'

M: 3805.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 31.09 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1267.2333 (-3), 1901.3682 (-2)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids **185**5' - d(GTAG^[Ac-2-fluorenyl]AA TTC TAC) - 3'

M: 3865.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 30.37 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 965.9495 (-4), 1287.5599 (-3), 1931.3215 (-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **187**5' - d(GTAG^[Ac-4-biphenyl]AA TTC TAC) - 3'

M: 3853.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 34.37 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1283.5518 (-3), 1925.8563(-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **190**5' - d(G^[Ac-phenyl]TAGAA TTC TAC) - 3'

M: 3777.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 31.20 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 943.1290 (-4), 1257.8408 (-3), 1887.8356 (-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **191**5' - d(G^[phenyl]TAGAA TTC TAC) - 3'

M: 3735.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 34.85 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1244.2112 (-3), 1866.8218(-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **189**5' - d(G^[Ac-2-fluorenyl]TAGAA TTC TAC) - 3'

M: 3865.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 31.31 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1287.1950 (-3), 1931.3168(-2)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids 1925' - d(G^[2-fluorenyl]TAGAA TTC TAC) - 3'

M: 3823.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 48.40 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1273.1739 (-3), 1910.2855(-2)**Synthese des modifizierten Oligonucleotids 193**5' - d(G^[Ac-4-biphenyl]TAGAA TTC TAC) - 3'

M: 3853.6

HPLC: Retentionszeit (Methode 1): 37.09 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1283.5642 (-3), 1925.8593 (-2)

20mer-SequenzSynthese des modifizierten Oligonucleotids **169**5' - d(ACA TG^[Ac-phenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6244.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 26.24 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1560.0092 (-4), 2080.3592(-3)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **170**5' - d(ACA TG^[phenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6202.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 26.85 min

MS: ESI, m/z (Ladung): 1549.5708 (-4), 2066.3972 (-3)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids **196**5' - d(ACA TG^[Ac-4-methylphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6258.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 26.91 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 2085.0596 (-3), 1563.5462 (-2)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **197**5' - d(ACA TG^[4-methylphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6216.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 28.99 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1552.9393 (-4), 2071.0644 (-3)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **198**5' - d(ACA TG^[Ac-4-methoxyphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6274.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 27.87 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 2090.3694 (-3)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids **199**5' - d(ACA TG^[4-methoxyphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6232.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 29.17 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 2076.3803 (-3)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **200**5' - d(ACA TG^[Ac-3,5-dimethylphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6272.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 30.37 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 2089.3924 (-3)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **201**5' - d(ACA TG^[3,5-dimethylphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6230.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 31.15 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1556.5283 (-4), 2075.3888(-3)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **202**5' - d(ACA TG^[Ac-2-fluorenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6332.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 30.43 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1581.7852 (-4), 2109.7314 (-3)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **203**5' - d(ACA TG^[2-fluorenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6290.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 30.88 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1571.2878 (-4), 2095.4083 (-3)

Synthese des modifizierten Oligonucleotids **163**5' - d(ACA TG^[Ac-4-biphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6320.1

HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 33.41 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1578.9994 (-4), 2105.6909 (-3)Synthese des modifizierten Oligonucleotids **164**5' - d(ACA TG^[4-biphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) - 3'

M: 6278.1

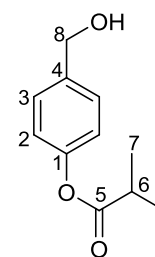
HPLC: Retentionszeit (Methode 2): 34.37 min

MS: (ESI⁻), m/z (Ladung): 1568.5305 (-4), 2091.7392 (-3)

10.4 Synthesen der Pro-Nucleotide

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-*isobutyrat* **204**

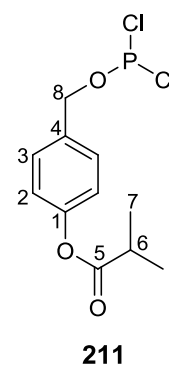
Es wurden 10.0 g (80.4 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol **205** in 100 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst, mit 11.3 mL (8.20 g, 81.2 mmol) abs. Triethyl-amin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurden 10.1 mL (10.3 g, 96.6 mmol) *iso*-Butyrylchlorid in die Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH; 20:1 v/v). Nach zweistündigem Rühren unter Eiskühlung wurde die Suspension filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit je 20 mL gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung sowie einmal mit 20 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nochmals unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels eines Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 5%) gereinigt.

**204**

Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute:** 11.9 g (61.1 mmol, 76%) eines viskosen, gelben Öls. - **Summenformel:** C₁₁H₁₄O₃. - **DC:** R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 20:1 v/v): 0.40. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7.36 (d, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 2H, H-2), 7.06 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 2H, H-3), 5.25 (t, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, OH), 4.51 (d, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 2H, H-8), 2.80 (sept, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 1H, H-6), 1.24 (s, 3H, H-7), 1.22 (s, 3H, H-7). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 175.1 (C5), 149.2 (C4), 140.0 (C1), 127.4 (C2), 121.2 (C3), 62.4 (C8), 33.3 (C6), 18.6 (C7). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3357, 2975, 2936, 2877, 1752, 1607, 1507, 1468, 1419, 1387, 1348, 1235, 1199, 1181, 1163, 1129, 1094, 1042, 1013, 940, 916, 867, 842, 805, 760, 578, 503. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 194.0943 [M], gef.: 193.9 [M].

Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(chlor)phosphoramidit **211**

Es wurden 2.20 mL (3.45 g, 10.3 mmol) frisch destilliertes Phosphortrichlorid in 40 mL abs. Diethylether gelöst, mit 0.96 mL (0.94 g, 12.4 mmol) abs. Pyridin versetzt und die Reaktionslösung auf -78 °C gekühlt. In einem zweiten Kolben wurden 2.00 g (10.3 mmol) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-*isobuty*rat **204** in 15 mL abs. Diethylether gelöst. Bei -78 °C wurde der Alkohol über 30 Minuten zu der Reaktionslösung getropft. Nach anschließendem Erwärmen auf



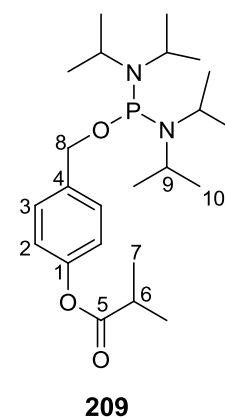
Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung noch weitere zwei Stunden gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch (PE/EE; 3:1 v/v) verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde die Suspension über eine Schutzgasfritte mit kleiner Porengröße (G4) filtriert und das Lösungsmittel über eine externe Kühlfalle unter vermindertem Druck entfernt.

Das Rohprodukt wurde direkt zu **209** umgesetzt.

Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute:** 2.97 g (10.1 mmol, 98%) eines viskosen, gelben Öls. - **Summenformel:** C₁₁H₁₃Cl₂O₃P. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 3:1 v/v): 0.40. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 177.2.

Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **209**

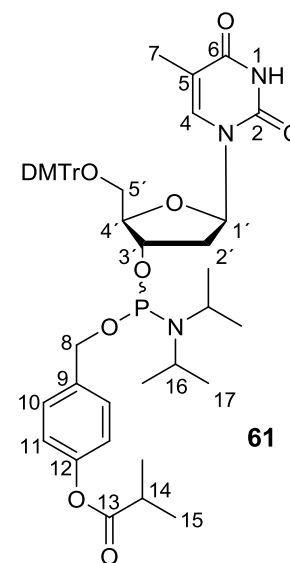
Es wurden 200 mg (1.02 mmol) 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(chlor)phosphoramidit **211** in 30 mL abs. Diethylether gelöst und auf -10 °C gekühlt. Über eine Stunde wurden 600 µL (40.3 mg, 4.08 mmol) frisch destilliertes Diisopropylamin bei -20 °C zugetropft. Nach vier Stunden wurde die Reaktionslösung direkt in die Umsetzung zu 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidinyl]-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **61** eingesetzt.



Reaktionszeit: 4 h. - **Ausbeute:** keine Ausbeutebestimmung möglich, da das Produkt nicht gereinigt wurde. Das Rohprodukt ist ein farbloser Feststoff. - **Summenformel:** C₂₃H₄₁N₂O₃P. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 3:1 v/v): 0.70. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 122.8.

Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin zweimal mit je 5 mL Acetonitril coevaporiert und anschließend in 50 mL Acetonitril gelöst. Daraufhin wurden 64 mg (0.85 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol zugegeben und die Reaktionslösung auf -10 °C gekühlt. Anschließend wurden 2 Äquivalente des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **209** über eine Stunde zuge- tropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v) verfolgt. Nach neun Tagen wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mittels eines Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 1%) gereinigt.

Es wurden 0.46 g (0.85 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin zweimal mit je 5 mL Acetonitril coevaporiert und anschließend in 50 mL Acetonitril gelöst. Daraufhin wurden 64 mg (0.85 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol zugegeben und die Reaktionslösung auf -10 °C gekühlt. Anschließend wurden 2 Äquivalente des 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **209** über eine Stunde zuge- tropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v) verfolgt. Nach neun Tagen wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mittels eines Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 1%) gereinigt.

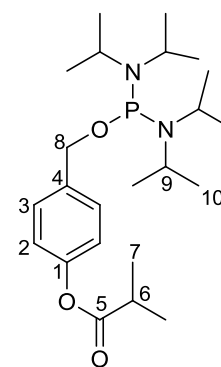


Reaktionszeit: 9 d. - **Ausbeute:** 236 mg (0.27 mmol, 32%) eines farblosen Feststoffs. - **Summenformel:** C₄₈H₅₈N₃O₁₀P. - **DC:** R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v): 0.80. - **Smp.:** 81 °C. - **Drehwert:** [α]_{589nm}^{23°C}: 21.4 ° (c 0.6, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 7.58 - 7.56 (m, 2H, H-4, NH), 7.43 - 7.40 (m, 4H, H_{arom.}), 7.31 - 7.25 (m, 1H, H_{arom.}), 7.21 - 7.13 (m, 6H, H_{arom.}), 7.10 - 6.99 (m, 2H, H_{arom.}), 6.77 - 6.74 (m, 4H, H_{arom.}), 6.61 - 6.54 (m, 1H, H-1'), 4.83 - 4.74 (m, 1H, H-3'), 4.72 - 4.45 (m, 2H, H-8), 4.30 - 4.20 (m, 1H, H-4'), 3.58 - 3.55 (m, 3H, H-14, H-16), 3.54 - 3.38 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.31 - 3.30 (m, 6H, 2xOMe), 2.55 - 2.48 (m, 1H, H-2'a), 2.24 - 2.15 (m, 1H, H-2'b), 1.54 (bs, 3H, H-7), 1.16 - 1.15 (m, 3H, H-17), 1.13 - 1.10 (m, 9H, H-17), 1.06 - 1.04 (m, 3H, H-15), 0.98 - 0.94 (m, 3H, H-15). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, Benzol-*d*₆): 159.3 (C2), 152.0 (C6), 139.7 (C_{arom.}), 135.9 (C_{arom.}), 135.4 (C_{arom.}), 134.6 (C_{arom.}), 130.6 (C13), 130.2 (C_{arom.}), 127.3 (C4), 122.7 (C_{arom.}), 122.0 (C_{arom.}), 121.8 (C_{arom.}), 111.0 (C5), 85.3 (C4'), 85.2 (C1'), 65.5 (C8), 64.5 (C3'), 63.7 (C5'), 54.8 (OCH₃), 44.7 (CH*i*Pr), 44.6 (CH*i*Pr), 43.5 (CH*i*Pr), 43.4 (CH*i*Pr), 40.2 (C2'), 24.7 (*i*Pr), 23.6 (*i*Pr), 22.9 (*i*Pr), 22.8 (*i*Pr), 22.5 (*i*Pr), 20.9 (*i*Pr), 18.9 (*i*Pr), 18.8 (*i*Pr), 12.3 (C7). - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 148.6, 148.1 oder 162.6, 162.1. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (ATR): 3336, 3118, 2931, 2220, 1672, 1631, 1606, 1578, 1527, 1508, 1444, 1423, 1394, 1344, 1327, 1290, 1248, 1176, 1088, 1033, 829, 787, 765,

728, 700, 666, 638, 582, 551, 523, 502. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 867.3860 [M], gef.: 890.6 [M+Na]⁺.

Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **209**

Es wurden 200 mg (1.03 mmol) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-*isobuty*rat **204** in 30 mL abs. Dichlormethan gelöst und über 10 Minuten 180 µL (140 µg, 1.03 mmol) abs. DIPEA zugetropft. Weiterhin wurden in einem separaten Kolben 270 mg (1.03 mmol) Bis-(*N,N'*-diisopropylamin)-chlorphosphin in 10 mL abs. Dichlormethan gelöst und langsam in die Reaktionslösung getropft. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch (PE/EE; 3:1 v/v) verfolgt. Nach 2 Stunden wurde das Lösungsmittel unter



209

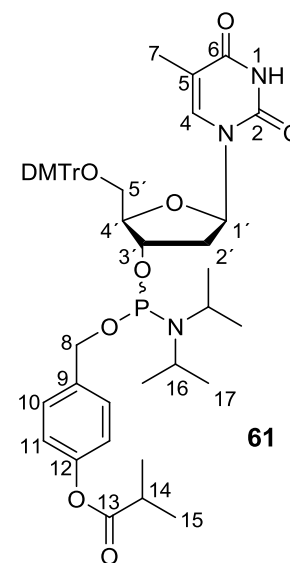
vermindertem Druck destillativ entfernt und direkt zu 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidinyl]-(*N,N'*-diisopropyl-amin)phosphoramidit **61** umgesetzt.

Reaktionszeit: 2 h. - **Ausbeute:** keine Ausbeutebestimmung möglich, da das Produkt nicht gereinigt wurde. Das Rohprodukt ist ein farbloser Feststoff. -

Summenformel: C₂₃H₄₁N₂O₃P. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 3:1 v/v): 0.70. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 122.8.

Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin zweimal mit je 5 mL Acetonitril coevaporiert und anschließend in 35 mL Dichlormethan/Acetonitril (1:1 v/v) gelöst. Daraufhin wurden 140 mg (1.18 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol zugegeben. In einem separaten Kolben wurde ein Äquivalent 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidit **209** in 10 mL Dichlormethan/Acetonitril (1:1 v/v) gelöst und sehr langsam zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v) verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mittels eines Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 4%) gereinigt. Aufgrund der verunreinigten Vorstufe **209**, konnte kein Produkt **61** isoliert werden.

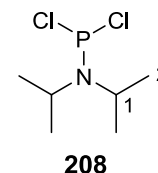
Es wurden 643 mg (1.18 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin zweimal mit je 5 mL Acetonitril coevaporiert und anschließend in 35 mL Dichlormethan/Acetonitril (1:1 v/v) gelöst. Daraufhin wurden 140 mg (1.18 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol zugegeben. In einem separaten Kolben wurde ein Äquivalent 4-*iso*Butyryloxybenzyl-bis-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidit **209** in 10 mL Dichlormethan/Acetonitril (1:1 v/v) gelöst und sehr langsam zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (CH₂Cl₂/CH₃OH; 9:1 v/v) verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel



unter vermindertem Druck destillativ entfernt und über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mittels eines Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 4%) gereinigt. Aufgrund der verunreinigten Vorstufe **209**, konnte kein Produkt **61** isoliert werden.

Synthese von Dichlor-*N,N'*-diisopropylaminphosphoramidit **208**

Es wurden 2.20 mL (3.45 g, 25.0 mmol) Phosphortrichlorid und 7.10 mL (5.11 g, 50.0 mmol) *N,N'*-Diisopropylamin (DIPA) **207** jeweils in 10 mL Diethylether gelöst und auf -10 °C gekühlt. Das DIPA wurde tropfenweise zum Phosphortrichlorid gegeben und für zwei Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

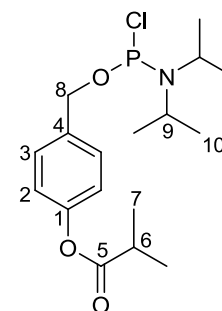


Reaktionszeit: 2.5 h. - **Ausbeute:** keine Ausbeutebestimmung möglich, da das Produkt nicht gereinigt wurde. Das Rohprodukt ist eine hellgelbe Flüssigkeit. -

Summenformel: C₆H₁₄Cl₂NP. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆): 3.82 (sept, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 2H, H-1), 1.19 (d, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 12H, H-2). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, Benzol-*d*₆): 38.2 (C1), 18.7 (C2). - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 169.5. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 201.0241 [M], gef.: 202.06 [M+H]⁺.

Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-chlor-(*N,N'*-diisopropylamin)-phosphoramidit **206**

Es wurden 1.04 g (5.15 mmol) Dichlor-*N,N'*-diisopropylamin-phosphoramidit **208** in 20 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf -78 °C gekühlt. In einem separaten Kolben wurden 1.00 g (5.15 mmol) 4-(Hydroxymethyl)-phenylisobutyrat **204** ebenfalls in 20 mL abs. THF gelöst und auf -78 °C gekühlt, anschließend wurden 0.72 mL (0.53 g, 5.2 mmol) Triethylamin zugegeben.

**206**

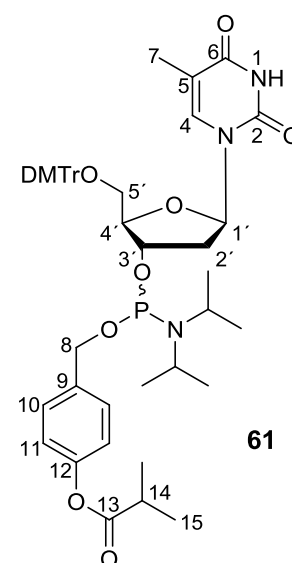
Dieses Gemisch wurde unter Rühren zum gelösten Dichlor-*N,N'*-diisopropylphosphinamin getropft und die Kühlung entfernt. Nach 19 Stunden wurde die Reaktionslösung unter Inertgas filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Aufgrund der Instabilität der Verbindung wurde das Rohprodukt direkt in der nächsten Stufe umgesetzt.

Reaktionszeit: 19 h. - **Ausbeute:** keine Ausbeutebestimmung möglich aufgrund der leichten Zersetzung des Produktes. Das Rohprodukt ist ein farbloser Feststoff. -

Summenformel: C₁₇H₂₇ClNO₃P. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 3:1 v/v): 0.06. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 139.7. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 359.1417 [M], gef.: 360.2 [M+H]⁺.

Synthese von 4-*iso*Butyryloxybenzyl-3'-O-[5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin]-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **61**

Es wurden 1.08 g (1.98 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin zweimal mit je 5 mL Acetonitril coevaporiert und anschließend in 25 mL Acetonitril gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf -20 °C gekühlt und mit 870 µL (660 mg, 4.55 mmol) DIPEA versetzt. In einem separaten Kolben wurden 927 mg (2.58 mmol) 4-*iso*Butyryloxybenzyl-chlor-(*N,N'*-diisopropylamin)phosphoramidit **206** in 10 mL abs. Acetonitril gelöst und langsam zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration unter Inertgas wurde das

**61**

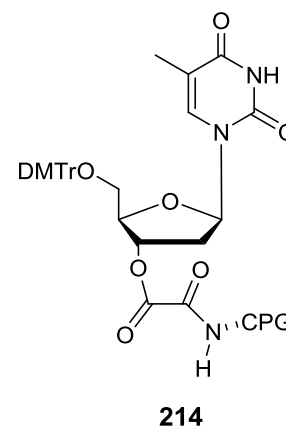
Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Es folgte eine

chromatographische Reinigung über Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) mittels eines Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0% → 2%).

Das Produkt konnte jedoch auch nach mehrfacher Reinigung nicht rein erhalten werden.

Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-[(oxalyl)-N-CPG]-2'-desoxythymidin **214**

Es wurden 137 mg (1.15 mmol) 4,5-Dicyanomimidazol in 2.00 mL abs. Acetonitril gelöst und tropfenweise mit mit 20.0 µL (29.2 mg, 1.23 mmol) Oxalylchlorid versetzt. Der entstandene farblose Niederschlag wurde durch Zugabe von 100 µL abs. Pyridin gelöst. In einem zweiten Reaktionskolben wurden 65.4 mg (0.12 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin **213** in 500 µL abs. Acetonitril und 250 µL abs. Pyridin gelöst und langsam in die erste Reaktionslösung



gegeben. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 200 mg Aminopropyl-CPG-Träger (550 Å) versetzt. Nach weiterem 20minütigem Rühren bei Raumtemperatur konnte die Reaktionsmischung unter Inertgas filtriert werden. Anschließend wurde der Feststoff mit Acetonitril gewaschen. Die überschüssigen Oxalyl-Triazolidgruppen wurden mit Methanol und 0.5% Essigsäure gecapped, worauf erneut mit Acetonitril gewaschen wurde. Daraufhin wurden die noch freien Aminogruppen mittels des Cap A (0.3 M DMAP in THF) und Cap B (0.6 M Essigsäureanhydrid in THF) des Synthesizers blockiert, mit Pyridin und erneut mit Acetonitril gewaschen. Nach dem Trocknen des Trägers wurde die Trägerbeladung mit Hilfe eines Trityl-Assays (Kapitel 9.5.2, S. 186) bestimmt.

Beladung: 44 µmol/g

11. Gefahrstoffverzeichnis

Das folgende Verzeichnis umfasst Verbindungen und Lösemittel, mit denen während dieser Promotion gearbeitet wurde. Die Gefahrstoffe sind mit den jeweiligen Gefahrensymbolen sowie H- und P-Sätzen gekennzeichnet.

Substanz	H-Sätze	P-Sätze	KMR-Kategorie
Aceton	225-319-336	210-233-305+351+338	-
Acetonitril	225-332-302-312-319	210-305+351+338-403+235	-
Acetylchlorid	225-314	210-280-305-351+338-310	-
Acrylamid	350-340-361f-301- 372-332-312-319-315- 317	201-280-301+310- 305+351+338-308+313	1a
4-Aminobiphenyl	350-302	201-308+313	1a
Ammoniak	221-331-314-400	210-260-280-273-304+340- 303+361+353	-
Ammoniumchlorid	302-319	305+351+338	-
Anilin	351-341-331-311-301- 372-318-317-400	273-280-308+313-302+352- 305+351+338-309-310	2
<i>p</i> -Anisidin	330-310-300-373-400	201-260-264-273-280-284	2
APS	272-302-315-317-319- 334-335	220-261-280-305+351+338- 342+311	-
Benzol	225-350-340-372-304- 319-315	201-210-308+313-301+310- 331-305+351+338-302+352	1a
Benzoylchlorid	332-312-302-314-317	280-305+351+338-310	-
Benzylalkohol	332-302	271	-
BOP	335-315-319	302+352-305+351+338	-
<i>N</i> -Bromsuccinimid	302-314	280-305+351+338-310	-
<i>iso</i> -Butyrylchlorid	225-314	210-280-305+351+338-310	-
Calciumhydrid	260	231+232-370+378-422	-
Cäsiumcarbonat	315-319-335	261-305+351+338	-
Chloroform	302-315-351-373	302+352-314	1b
DCI	302	260-262	-
Dichlorethan	225-350-302-319-335- 315	201-210-302+352-304+340- 305+351+338-308+313	2
Dichlormethan	351	281-308+313	2
Diethylether	224-302-336	210-240-403+235	-
Diisopropylamin	225-332-302-314	210-280-301+330+331- 305+351+338	-
Diisopropylazo- dicarboxylat	315-319-335-351-373	261-281-305+351+338	-
1,2-Dimethoxyethan	225-360FD-332	201-210-308+313	-
4-Dimethyl- aminopyridin	310-301-315-319	302+352-305+351+338	-
3,5-Dimethylanilin	280-273-304+340- 302+352-309+310	273-280-302+352-309-310	-

<i>N,N</i> -Dimethylformamid	360D-226-332-312-319	201-302+352-305+351+338-308+313	-
<i>N,N</i> -Dimethylformamiddiethylacetal	225-315-319-332	210-302+352-305+351+338	-
1,4-Dioxan	225-351-319-335	210-261-281-305+351+338	2
DMSO	315-319	305-351-313	-
DTT	302-315-319	302+352-305+351+338	-
Essigsäure	226-314	280-301+330+331-307+310-305+351+338	-
Essigsäureanhydrid	226-332-302-314	280-301+330+331-305+351+338-309+310	-
Essigsäureethylester	225-319-336	210-240-305+351+338	-
Ethanol	225	210	-
Hexan	225-304-315-336-361f-373-411	210-261-273-281-301+310-331	-
Hydrazinhydrat (80%)	226-350-331-311-301-314-317-410	301+310-303+361+353-305+351+338-320-361-405-501	-
4-Hydroxybenzylalkohol	319	305+351+338	-
Imidazol	302-314-361d	280-301+330+331-305+351+381-309-310	-
Kieselgel	-	260	-
Methanol	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352	-
β-Mercaptoethanol	301-310-330-315-318-410	280-273-302+352-304+340-305+351+338-309-310	-
Natriumcacodylat	301-331-410	261-273-301+310-311-501	-
Natriumhydrid	260	223-231+232-370+378	-
Natriumhydroxid	314	280-301+330+331-309-310-305+351+338	-
4-Nitroanisol	412	273	-
Nitrobenzol	351-361f-331-311-301-372-411	273-281-314	-
4-Nitrobenzonnitril	300-311-331	261-264-280-301+310-311	-
4-Nitrobiphenyl	350-411	201-273-308+313	-
2-Nitrofluoren	351	281	-
5-Nitro- <i>m</i> -xylol	301-311-331-373	261-280-301+310-311	-
4-Nitrophenol	301-373-312-332	280-302+352-309+310	-
Petrolether	224-304	240-301+310-331-403+235	-
Phosphortrichlorid	300-314-330-373	260-264-280-284-301+310-305+351+338	-
Pyridin	225-332-312-302	210-233-302+352	-
<i>rac</i> -BINAP	315-319-335	280-305+351+338	-
Salzsäure	314-335	260-301+330+331-303+361+353-305+351+338-405-501	-
Silbernitrat	272-314-410	273-280-301+330+331-305+351+338-309+310	-
TBDMS-Cl	228-314	210-280-301+330+331-305+351+338	-
TBAF	314	280-305+351+338-310	-
TEMED	225-332-302-314	210-233-280-301+330+331-305+351+338-309+310	-
Tetrahydrofuran	225-319-335	210-233-243-305+351+338	-

<i>p</i> -Toluidin	351-331-311-301-319- 317-400	273-280-302+352-304+340- 305+351+338-309+310	2
Toluol	225-361d-304-373- 315-336	210-301+310-331-302+352	-
Triethylamin	225-332-312-302-314	210-280-303+361+353- 305+351+338-310-312	-
Triethylamin- Trihydrofluorid	300-310-314-330	260-264-280-284-302+350- 305+351+338	-
Trifluoressigsäure	332-314-412	271-273-301+330+331- 305+351+338-309+310	-
Triphenylphosphin	302-317-373	280	-
TRIS	315-319-335	261-305+351+338	-

KMR-Kategorie:

1a) im Menschen nachgewiesen

1b) im Tierversuch nachgewiesen

2) Verdachtstoffe

12. Literatur

- [1] Spivak, J.L., The Anaemia of Cancer: Death by a thousand Cuts, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 543-555.
- [2] Schmoll, H.J., Höffken, K., Possinger, K., *Herkunft und Entstehung von Tumoren (Äthiologie)* **2006**, 235-78.
- [3] Cairns, J., *Krebs-Tumoren, Zellen, Gene*, Heidelberg, **1990**, 10-21.
- [4] Chiang, A.C., Molecular Basis of Metastasis, *N. Engl. J. Med.* **2008**, 359, 2814-2823.
- [5] <http://www.who.int/mediaentre/factsheets/fs297/en/index.html>, letzter Zugriff: 07.06.2011
- [6] <http://www.who.int/cancer/nccp/europeanconsultation/en/index6.html>, letzter Zugriff: 07.06.2011
- [7] Marquardt, H., Schäfer, S.G., *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1997**, 124-146.
- [8] Rademacher, P., Chemical Carcinogens, *Chemie in unserer Zeit* **1975**, 9 (3), 79-84.
- [9] van Oosterwijk, M.F., Filon, R., de Groot, A.J.L., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., Lack of transcription-coupled repair of acetylamino-fluorene DNA adducts in human fibroblasts contrasts their efficient inhibition of transcription, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (22), 13599-604.
- [10] Gillet, L.C.J., Schärer, O.D., Preparation of C8-Amine and Acetylamine Adducts of 2'-Deoxyguanosine Suitably Protected for DNA Synthesis, *Org. Lett.* **2002**, 4 (24), 4205-8.
- [11] Gunz, D., Hess, M.T., Naegeli, H., Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (41), 25089-98.
- [12] *Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie*, Herder **1995**, 2, 267-9.
- [13] Schmähl, D., *Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren*, Editio Cantor Verlag, Aulendorf, **1970**.
- [14] Süss, R., Kinzel, V., Scribner, J.D., *Krebs, Experimente und Denkmodelle*, Berlin, Heidelberg, New York, **1970**.

- [15] Nassauer, M., Über bösartige Blasengeschwülste bei Arbeitern der organisch-chemischen Großindustrie, *Frankfurter Zeitschrift für Pathologie* **1920**, *22*, 353-399.
- [16] Leichtenstern, O., Über Harnblasenentzündung und Harnblasengeschwülste bei Arbeitern in Farbfabriken, *Deutsche Medicinische Wochenschrift* **1898**, *24*, 709 ff.
- [17] Hueper, W.C., Occupational and Environmental Cancers of the Urinary System, *Yale University Press* **1969**.
- [18] Debnath, A.K., Debnath, G., Shusterman, A.J., Hansch, C.A., A QSAR investigation of the role of hydrophobicity in regulating mutagenicity in the Ames test: 1. Mutagenicity of aromatic and heteroaromatic amines in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, *Environ. Mol. Mutagen.* **1992**, *19* (1), 37-52.
- [19] Patrianakos, C., Hoffmann, D., Chemical studies in tobacco smoke LXIV. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke, *J. Anal. Toxicol.* **1979**, *3*, 150-4.
- [20] Luceri, F., Pieraccini, G., Moneti, G., Dolara, P., Primary aromatic amines from side-stream cigarette smoke are common contaminants of indoor air, *Toxicol. Ind. Health* **1993**, *9*, 405-413.
- [21] Cramer, J.W., Miller, J.A., Miller, E.C., *N*-Hydroxylation: A New Metabolic Reaction Observed in the Rat with the Carcinogen 2-Acetylaminofluorene, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 885-8.
- [22] Frederick, C.B., Mays, J.B., Ziegler, D.M., Guengerich, F.P., Kadlubar, F.F., Cytochrome P-450- and Flavin-Containing Monooxygenase-Catalyzed Formation of the Carcinogen *N*-Hydroxy-2-aminofluorene and Its Covalent Binding to Nuclear DNA, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 2671-7.
- [23] Borosky, G.L., Ultimate Carcinogenic Metabolites from Aromatic and Heterocyclic Aromatic Amines: A Computational Study in Relation to their Mutagenic Potential, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *20*, 171-180.
- [24] Boteju, L.W., Hanna, P.E., Bioactivation of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorenes by *N,O*-acyltransferase: substituent effects on covalent binding to DNA, *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 1651-7.

- [25] Bartsch, H., Dworkin, M., Miller, J.A., Miller, E.C., Electrophilic *N*-acetoxyaminoarenes Derived from Carcinogenic *N*-hydroxy-*N*-acetylaminoarenes by Enzymatic Deacetylation and Transacetylation in Liver, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *286*, 272-298.
- [26] Kumar, N.V.A., Rangappa, K.S., Synthesis and Characterization of Thymidine Adducts of Arylamines, *Synth. Comm.* **2003**, *33*, 259-264.
- [27] Cui, L., Sun, H.-L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Skipper, P.L., Identification of Adducts Formed by Reaction of *N*-Acetoxy-3,5-dimethylaniline with DNA, *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1730-6.
- [28] Gupta, R.C., Dighe, N.R., Formation and removal of DNA adducts in rat liver Treated with *N*-hydroxy derivatives of 2-acetylaminofluorene, 4-acetylaminobiphenyl and 2-acetylaminophenanthrene, *Carcinogenesis* **1984**, *5*, 343-9.
- [29] Zajc, B., Lakshman, M.K., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Epoxide and Diol Epoxide Adducts of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at the Exocyclic Amino Group of Deoxyguanosine, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *239*, 3409-12.
- [30] Saffhill, R., Margison, G.P., O'Connor, P.J., Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Alkylating Agents, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *823*, 111-145.
- [31] Humphreys, W.G., Kadlubar, F.F., Guengerich, F.P., Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: Evidence for initial adduct formation at the *N*⁷ position, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8278-82.
- [32] Novak, M., Kennedy, S.A, Selective Trapping of *N*-Acetyl-*N*-(4-biphenyl)-nitrenium and *N*-Acetyl-*N*-(2-fluorenyl)nitrenium Ions by 2'-dG in Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 574-5.
- [33] Randerath, K., Reddy, M.V., Gupta, R.C., ³²P-labeling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6126-9.
- [34] Gupta, R.C., Enhanced sensitivity of phosphorus-32 postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 5656-62.
- [35] Randerath, K., Randerath, E., ³²P-postlabeling methods for DNA adduct detection: overview and critical evaluation, *Drug Metabol. Rev.* **1994**, *26*, 67-85.

- [36] Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E., Improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 782-6.
- [37] Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.* **1975**, *31*, 347-63.
- [38] Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D., Carcinogens are mutagens. Simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 2281-5.
- [39] Kriek, E., Miller, J.A., Juhl, U., Miller, E., 8-(*N*-2-Fluorenylacetamido)-guanosine, an arylamidation reaction product of guanosine and the carcinogen *N*-acetoxy-*N*-2-fluorenylacetamide in neutral solution, *Biochemistry* **1967**, *6*, 177-182.
- [40] Famulok, M., Bosold, F., Boche, G., Synthesis of *O*-acetyl-*N*-(4-biphenyl)hydroxylamine (*N*-acetoxy-4-aminobiphenyl), a final metabolite of the 4-aminobiphenyl carcinogens and its reaction with deoxyguanosine, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 349-50.
- [41] Famulok, M., Synthese von *N*-Acetoxyverbindungen carcinogener Arylamine und ihre *in vitro*-Reaktion mit (Bio)Nucleophilen: Entscheidende elektrophile Metaboliten Aromatischer Amine, Dissertation, Philips-Universität Marburg/Lahn **1989**.
- [42] Kosugi, M., Kameyama, M., Migita, T., Palladium-catalyzed aromatic amination of aryl bromides with *N,N*-diethylaminotributyltin, *Chem. Lett.* **1983**, *6*, 927-8.
- [43] Louie, J., Hartwig, J.F., Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609-12.
- [44] Guram, A.S., Rennels, R.A., Buchwald, S.L., Barta, N.S., Pearson, W.H., Palladium-catalyzed amination of aryl halides with amines, *Inorg. Chem.* **1996**, *8*, 1-5.

- [45] Lakshman, M.K., Keeler, J.C., Hilmer, J.H., Martin, J.Q., Palladium-Catalyzed C-N Bond Formation: Facile and General Synthesis of N^6 -Aryl 2'-Deoxyadenosine Analogues, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6090-1.
- [46] Elmquist, C.E., Stover, J.S., Wang, Z., Rizzo, C.J., Site-Specific Synthesis and Properties of Oligonucleotides Containing C8-Deoxyguanosine Adducts of the Dietary Mutagen IQ, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11189-201.
- [47] Gräsl, S., Synthese C8-Arylamin-modifizierter 2'-Desoxyguanosinderivate und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Hamburg **2005**.
- [48] Graesl, S., Meier, C., Synthesis of Oligonucleotide Building Blocks of 2'-Deoxyguanosine Bearing a C8-Arylamine Modification, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2003**, *22*, 1119-21.
- [49] Meier, C., Gräsl, S., Detmer, I., Marx, A., Synthesis of oligonucleotides bearing an arylamine modification in the C8-position of 2'-deoxyguanosine, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2005**, *24*, 691-4.
- [50] Böge, N., Arylamin-modifizierte Oligonucleotide, *Diplomarbeit*, Hamburg 2005.
- [51] Takamura-Enya, T., Ishikawa, S., Mochizuki, M., Wakabayashi, K., A practical approach for the chemical synthesis of 2'-deoxyguanosine-C8 adducts with mutagenic/carcinogenic amino- or nitro-arenes, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5969-73.
- [52] Takamura-Enya, T., Ishikawa, S., Mochizuki, M., Wakabayashi, K., Chemical Synthesis of 2'-Deoxyguanosine-C8 Adducts with Heterocyclic Amines: An Application to Synthesis of Oligonucleotides Site-Specifically Adducted with 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 770-8.
- [53] Cho, B.P., Beland, F.A., Marques, M.M., NMR structural studies of a 15-mer DNA sequence from a ras protooncogene, modified at the first base of codon 61 with the carcinogen 4-aminobiphenyl, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9587-602.
- [54] Cho, B.P., Beland, F.A., Marques, M.M., NMR structural studies of a 15-mer DNA duplex from a ras protooncogene modified with the carcinogen 2-aminofluorene: conformational heterogeneity, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1373-84.
- [55] Böge, N., Synthese von Arylamin-modifizierten 2'-dG-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Hamburg **2008**.

- [56] Krüger, S., Synthese von C8-*N*-Acetylarlyamin-modifizierten 2'-dG-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide, *Diplomarbeit*, Hamburg **2008**.
- [57] Zhou, Y., Romano, L.J., Solid-phase synthesis of oligonucleotides containing site-specific *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-2-(acetylamino)fluorene adducts using 9-fluorenylmethoxycarbonyl as the base-protecting group, *Biochemistry* **1993**, *32*, 14043-52.
- [58] Zhou, Y., Chladek, S., Romano, L.J., Synthesis of Oligonucleotides Containing Site-specific Carcinogen Adducts. Preparation of the 2-Cyanoethyl *N,N*-Diisopropylphosphoramidite of *N*-(2'-Deoxyguanosin-8-yl)-2-(acetylamino)-fluorene with Fmoc as the Base-Protecting Group, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 556-63.
- [59] Gillet, L.C.J., Schärer, O.D., Preparation of C8-Amine and Acetylamine Adducts of 2'-Deoxyguanosine Suitably Protected for DNA Synthesis, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4205-8.
- [60] Gillet, L.C.J., Alzeer, J., Schärer, O.D., Site-specific incorporation of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 1961-9.
- [61] Böge, N., Krüger, S., Schröder, M., Meier, C., A new short and efficient synthetic route to C8-*N*-acetylarlyamine 2'-deoxyguanosine phosphoramidites, *Synthesis* **2007**, *24*, 3907-14.
- [62] Khorana, H.G., Studies on nucleic acids: total synthesis of a biologically functional gene, *Bioorg. Chem.* **1978**, *7*, 351-93.
- [63] Heidmann, W., Koster, H., Oligonucleotide synthesis on a polymeric support with avoidance of failure sequences, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1976**, *15*, 547-8.
- [64] Beaucage, S.L., Caruthers, M.H., Deoxynucleoside phosphoramidites. A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-62.
- [65] Gillet, L.C.J., Schärer, O.D., Molecular Mechanisms of Mammalian Global Genome Nucleotide Excision Repair, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 253-76.

- [66] Hess, M.T., Gunz, D., Luneva, N., Geacintov, N.E., Naegeli, H., Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 7069-76.
- [67] Buterin, T., Hess, M.T., Luneva, N., Geacintov, N.E., Amin, S., Kroth, H., Seidel, A., Naegeli, H., Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1849-56.
- [68] Yan, S., Wu, M., Buterin, T., Naegeli, H., Geacintov, N.E., Broyde, S., Role of Base Sequence Context in Conformational Equilibria and Nucleotide Excision Repair of Benzo[a]pyrene Diol Epoxide-Adenine Adducts, *Biochemistry* **2003**, *42*, 2339-54.
- [69] Lin, J., Kadlubar, F.F., Spitz, M.R., Zhao, H., Wu, X., A modified host cell reactivation assay to measure DNA repair capacity for removing 4-aminobiphenyl adducts: A pilot study of bladder cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2005**, *14*, 1832-6.
- [70] Sancar, A., Franklin, K.A., Sancar, G., Tang, M.S., Repair of psoralen and acetylaminofluorene DNA adducts by ABC excinuclease, *J. Mol. Biol.* **1985**, *184*, 725-34.
- [71] Tamura, N., King, C.M., Comparative survival of aminobiphenyl- and aminofluorene-substituted plasmid DNA in Escherichia coli Uvr endonuclease deficient strains, *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 535-40.
- [72] Shapiro, R., Ellis, S., Hingerty, B.E., Broyde, S., Effect of Ring Size on Conformations of Aromatic Amine-DNA Adducts: The Aniline-C8 Guanine Adduct Resides in the B-DNA Major Groove, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 335-341.
- [73] Cho, B.P., Beland, F.A., Marques, M.M., NMR structural studies of a 15-mer DNA duplex from a ras protooncogene modified with the carcinogen 2-aminofluorene: conformational heterogeneity, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1373-84.
- [74] Maults, M.J., Barends, T.R.M., Glas, A.F., Cryle, M.J., Domratcheva, T., Schneider, S., Schlichting, I., Carell, T., Crystal Structure and Mechanism of a DNA (6-4) Photolyase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076-80.

- [75] Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C. W., *Lehrbuch der Biochemie*, Weinheim, **2002**, 45-59.
- [76] Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd, *Science* **1995**, *269*, 496-512.
- [77] Venter, J.C.A., Mark, D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. *et al.*, The sequence of the human genome, *Science* **2001**, *291*, 1304-51.
- [78] Lander, E.S.L., Lauren, M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [79] Uhlmann, E., Antisense-Oligonucleotide - ein universelles Therapieprinzip, *Chemie in unserer Zeit* **1998**, *3*, 150-160.
- [80] Engels, J.W., Uhlmann, E., Gene synthesis, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 733-52.
- [81] Barber, I., Rayner, B., Imbach, J.-L., The prooligonucleotide approach. I. Esterase-mediated reversibility of dithymidine S-alkyl-phosphorothioates to dithymidine phosphorothioates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 563-8.
- [82] Barber, I., Tosquellas, G., Morvan, F., Rayner, B., Imbach, J.-L., The pro-oligodeoxyribonucleotide approach. II. Synthesis and stability studies of chimeric oligodeoxyribonucleotide models, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1441-4.
- [83] Tosquellas, G., Barber, I., Morvan, F., Rayner, B., Imbach, J.-L., The prooligonucleotide approach. III. Synthesis and bioreversibility of a chimeric phosphorodithioate prooligonucleotide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 457-62.
- [84] Tosquellas, G., Morvan, F., Rayner, B., Imbach, J.-L., The prooligonucleotide approach. IV. Synthesis of chimeric prooligonucleotides with six enzymolabile masking groups and unexpected desulfurization side reaction, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 263-8.

- [85] Mignet, N., Morvan, F., Rayner, B., Imbach, J.-L., The pro-oligoribonucleotide approach. V: Influence of the phosphorus atom environment on the hydrolysis of enzymo-labile dinucleoside phosphotriesters, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 851-4.
- [86] Tosquellas, G., Alvarez, K., Dell'aquila, C., Morvan, F., Vasseur, J.-J., Imbach, J.-L., Rayner, B., The pro-oligonucleotide approach: solid phase synthesis and preliminary evaluation of model pro-dodeca-thymidylates, *Nucl. Acids Res.* **1998**, 26, 2069-74.
- [87] Perigaud, C., Gosselin, G., Lefebvre, I., Girardet, J.L., Benzaria, S., Barber, I., Imbach, J.-L., Rational design for cytosolic delivery of nucleoside monophosphates: "SATE" and "DTE" as enzyme-labile transient phosphate protecting groups, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 2521-6.
- [88] Peyrottes, S., Egron, D., Lefebvre, I., Gosselin, G., Imbach, J.-L., Perigaud, C., SATE pronucleotide approaches: an overview. *Mini-rev. med. chem.* **2004**, 4, 395-408.
- [89] Vives, E., Dell'Aquila, C, Bologna, J.C., Morvan, F., Rayner, B., Imbach, J.-L., Lipophilic pro-oligonucleotides are rapidly and efficient internalized in HeLa cells, *Nucl. Acids Res.* **1999**, 27, 4071-6.
- [90] Iyer, R.P., Yu, D., Agrawal, S., Prodrugs of oligodeoxyribonucleotides: the acyloxyalkyl esters of oligodeoxyribonucleotide phosphorothioates, *Bioorg. Chem.* **1995**, 23, 1-21.
- [91] Iyer, R.P., Yu, D., Devlin, T., Ho, N.-H., Agrawal, S., Acyloxyaryl prodrugs of oligonucleoside phosphorothioates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1917-22.
- [92] Iyer, R.P., Yu, D., Agrawal, S., Stereospecific bio-reversibility of dinucleoside S-alkyl phosphorothiolates to dinucleoside phosphorothioates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 2471-6.
- [93] Tosquellas, G., Morvan, F., Imbach, J.-L., Rayner, B., First Synthesis of Alternating SATE-Phosphotriester/Phosphodiester Prooligonucleotides on Solid Support, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2913-18.
- [94] Alul, R.H., Singmann, C.N., Zhang, G., Letsinger, R.L., Oxalyl-CPG: a labile support for synthesis of sensitive oligonucleotide derivatives, *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19, 1527-32.

- [95] Pon, R.T., Yu, S., Hydroquinone-O,O'-diacetic acid ('Q-linker') as a replacement for succinyl and oxalyl linker arms in solid phase oligonucleotide synthesis, *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 3629-35.
- [96] Pirrung, M.C., Liu, Y., Deng, L., Halstead, D.K., Li, Z., May, J.F., Wedel, M., Austin, D.A., Webster, N.J.G., Methyl scanning: total synthesis of dimethyl-asterriquinone B1 and derivatives for identification of sites of interaction with and isolation of its receptor(s), *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4609-24.
- [97] Ayyangar, N.R., Brahme, K.C., Kalkote, U.R., Srinivasan, K.V., Facile transfer-reduction of nitroarenes to *N*-arylhydroxylamines with hydrazine in the presence of Raney nickel, *Synthesis* **1984**, *11*, 938-41.
- [98] Takenaka, Y., Kiyosu, T., Choi, J.-C., Sakakura, T., Yasuda, H., Selective synthesis of *N*-aryl hydroxylamines by the hydrogenation of nitroaromatics using supported platinum catalysts, *Green Chemistry* **2009**, *11*, 1385-90.
- [99] Ren, P., Dong, T., Wu, S., Synthesis of *N*-arylhydroxylamines by antimony catalyzed reduction of nitroarenes, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 1547-52.
- [100] Shi, Q.X., Lu, R.W., Jin, K., Zhang, Z.X., Zhao, D.F., Ultrasound-promoted highly chemoselective reduction of aromatic nitro compounds to the corresponding *N*-arylhydroxylamines using zinc and HCOONH₄ in CH₃CN, *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 226-7.
- [101] Rahmathulla, S.M., Hall, J.E., Bender, B.C., McCurdy, D.R., Tidwell, R.R., Boykin, D.W., Prodrugs for Amidines: Synthesis and Anti-Pneumocystis carinii Activity of Carbamates of 2,5-Bis(4-amidinophenyl)furan, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3994-4000.
- [102] Woo, J., Sigurdsson, S.T., Hopkins, P.B., DNA Interstrand Cross-Linking Reactions of Pyrrole-Derived, Bifunctional Elektrophiles: Evidence for a Common Target Site in DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3407-15.
- [103] Nelson, S.D., Nelson, W.L., Trager, W.F., *N*-hydroxyamide metabolites of lidocaine. Synthesis, characterization, quantitation, and mutagenic potential, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 721-5.
- [104] Höfle, G., Steglich, W., Vorbrüggen, H., 4-Dialkylaminopyridin als hochwirksame Acylierungskatalysatoren, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 602-615.
- [105] Bae, S., Lakshman, M.K, O⁶-(Benzotriazol-1-yl)inosine Derivatives: Easily Synthesized, Reactive Nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 782-9.

- [106] Arnold, S., Synthese eines carbozyklischen Analogons des Formamidopyrimidin dA DNA Schadens zur Untersuchung von DNA-Replikations- und Reparaturprozessen, *Dissertation*, München **2007**.
- [107] Szombati, Z., Synthese von C8-(N-Acetyl)- und C8-NH-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyadenosin-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Hamburg **2011**.
- [108] Gannet, P.M., Sura, T.P., An Improved Synthesis of 8-Bromo-2'-desoxyguanosine, *Synth. Commun.* **1993**, 23, 1611-5.
- [109] Johnson, F. Huang, C.Y., Yu, P.L., Synthetic and oxidative studies on 8-(arylamino)-2'-desoxyguanosine and -guanosine-derivatives, *Environ. Health Perspect.* **1994**, 102, 143-9.
- [110] Shibutani, S., Gentles, R., Johnson, F., Grollman, A.P., Isolation and characterisation of oligodeoxynucleotides containing dG-N²-AAF and oxidation products of dG-C8-AF, *Carcinogenesis* **1991**, 12, 813-8.
- [111] Puglisi, J.D., Tinoco, I., Absorbance melting curves of RNA, *Methods Enzymol.* **1989**, 180, 304-325.
- [112] <http://www.medfuehrer.de/aktuelleThemen/Krebs-Onkologen-Onkologische-Praxen/Krebsbehandlung>. letzter Zugriff: 24.07.2011
- [113] Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R.W., *Circular Dichroism: Principles and Applications* Viley-VCH, New York, **2000**.
- [114] Seela, F., Driller, H., Herdering, W., De Clerq, E., Dodecanucleotides containing (E)-5-(3-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: Influence of bulky major groove substituents on duplex stability and endodeoxyribonuclease EcoRI recognition, *Nucl. & Nucl.* **1988**, 7, 347-63.
- [115] Kelman, Z., O'Donnell, M., DNA replication: enzymology and mechanisms, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1994**, 4, 185-95.
- [116] Hubscher, U., Maga, G., Spadari, S., Eukaryotic DNA polymerases, *Annu Rev Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 71, 133-63.
- [117] Kornberg, A., Baker, T.A., *DNA Replication 2nd ed.*, New York, **1992**.
- [118] Lehman, I.R., Zimmerman, S.B., Adler, J., Bessman, M.J., Simms, E.S., Kornberg, A., Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. V. Chemical Composition of Enzymatically Synthesized Deoxyribonucleic Acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, 44, 1191-6.

- [119] Kunkel, T.A., Bebenek, K., DNA replication fidelity, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 497-529.
- [120] Wood, R.D., DNA repair in eukaryotes, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 135-67.
- [121] Moon, A.F., Garcia-Diaz, M., Batra, V.K., Beard, W.A., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wilson, S.H., Pedersen, L.C., The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases, *DNA Repair (Amst)* **2007**, *6*, 1709-25.
- [122] Prakash, S., Johnson, R.E., Prakash, L., Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 317-53.
- [123] Goodman, M.F., Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 17-50.
- [124] Joyce, C.M., Steitz, T.A., Function and structure relationships in DNA polymerases, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 777-822.
- [125] Steitz, T.A., DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17395-8.
- [126] Johnson, K.A., Conformational coupling in DNA polymerase fidelity, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 685-713.
- [127] Nair, D.T., Johnson, R.E., Prakash, L., Prakash, S., Aggarwal, A.K. Human DNA polymerase iota incorporates dCTP opposite template G via a G.C + Hoogsteen base pair, *Structure* **2005**, *13*, 1569-77.
- [128] Cramer, J., Rangam, G., Marx, A., Restle, T., Varied Active-Site Constraints in the Klenow Fragment of *E. coli* DNA Polymerase I and the Lesion-Bypass Dbh DNA Polymerase, *Chembiochem.* **2008**, *9*, 1181.
- [129] Summerer, D., Marx, A., DNA Polymerase Selectivity: Sugar Interactions Monitored with High-Fidelity Nucleotides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3693-95.
- [130] Lundberg, K.S., High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, *Gene* **1991**, *108*, 1-6.
- [131] Rattray, A.J., Strathern, J.N., Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead, *Annu. Rev. Genet.* **2003**, *37*, 31-66.

- [132] Hübscher, U., Maga, G., Spadari, S., Eukaryotic DNA polymerases, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 133-163.
- [133] Stover, J.S., Chowdhury, G., Zang, Z., Guengerich, F.P., Rizzo, C.J., Translesion Synthesis Past the C8 and N²-Deoxyguanosine Adducts of the Dietary Mutagen 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the NarI Recognition Sequence by Prokaryotic DNA Polymerases, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1506-17.
- [134] Berne, B.R., Pecora, R., *Dynamic Light Scattering*, Wiley, New York, **1976**.
- [135] Provencher, W., CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations, *Comp. Phys. Comm.* **1982**, *27*.
- [136] Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S., Overview of the CCP4 suite and current developments, *Acta Cryst.* **2011**, *67*, 235-42.
- [137] Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., PHENIX: a comprehensive Python-based system für macromolecular structure solution, *Acta Cryst.* **2010**, *66*, 213-21.
- [138] Vagin, A.A., Steiner, R.A., Lebedev, A.A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., Murshudov, G.N., Refmac5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use, *Acta Cryst.* **2004**, *60*, 2184-95.
- [139] Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., Dodson, E., A graphical user interface to the CCP4 program suite, *Acta Cryst.* **2003**, *59*, 1131-7.
- [140] Vagin, A.A., Teplyakov, A., MOLREP: an automated program for molecular replacement, *J. Appl. Cryst.* **1997**, *30*, 1022-5.
- [141] Emsley, P., Cowtan, K., Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Cryst.* **2004**, *60*, 2126-32.
- [142] McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., Phaser crystallographic software, *J. Appl. Cryst.* **2007**, *40*, 658-674.

- [143] Schrodinger, L.L.C., The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. In ed. , **2010**.
- [144] Zheng, G., Lu, X.-J. ,Olson, W.K., Web 3DNA a web server for the analysis, reconstruction, and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures, *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*, 240-6.
- [145] Naranya, N., Weiss, M.A., Crystallographic Analysis of a Sex-Specific Enhancer Element: Sequence-Dependent DNA Structure, Hydration, and Dynamics, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 469-490.
- [146] Venkadesh, S., Mandal, P.K., Gautham, N., The structure of a full turn of N a- dna duplex d(CGC GGG TAC CCG CG), *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *407*, 307-312.
- [147] Mukaiyama, T., Pai, F.-C., Onaka, M., Narasaka, K., A Useful Method For Selective Acylation of Alcohols Using 2,3'-Bipyridyl-6-yl Carboxylate and Cesium Fluoride, *Chem. Lett.* **1980**, 563-6.
- [148] Paradisi, M.P., Zecchini, G.P., Torrini, I., Selective Acylations of Aminophenols and Hydroxyalkylphenols with 1-Acetyl-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]-pyridin;, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5029-32.
- [149] Saito, A., Shimizu, B., Synthesis of Mesoionic Triazolopyridine. III Applications of NAcyl Mesoionic Triazolopyridines as Acylating Reagents, *Biull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 2974-80.
- [150] Jessen, H.J., Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten, *Dissertation*, Hamburg **2008**.
- [151] Grajkowski, A., Pedras-Vasconcelos, J., Wang, V., Ausin, C., Hess, S., Verthelyi, D., Beaucage, S.L., Thermolytic CpG-containing DNA oligonucleotides as potential immunotherapeutic prodrugs, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 3550-60.
- [152] Zhou, Y., Ts' O, P.O.P., Solid-phase synthesis of oligo-2-pyrimidinone-2'-deoxyribonucleotides and oligo-2-pyrimidinone-2'-deoxyriboside methyl-phosphonates, *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*, 2652-9.
- [153] Zhu, Q., Delaney, M.O., Greenberg, M.M., Observation and elimination of N-acetylation of oligonucleotides prepared using fast-deprotecting phosphoramidites and ultra-mild deprotection, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1105-7.

- [154] Amberg, S., Engels, J., Synthesis and properties of nonpolar DNA (arylalkyl)phosphonates, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2503-17.
- [155] Alul, R.H., Singmann, C.N., Zhang, G., Letsinger, R., Oxalyl-CPG: a labile support for synthesis of sensitive oligonucleotide derivatives, *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19*, 1527-32.
- [156] Maga, G., Villani, G., Crespan, E., Wimmer, U., Ferrari, E., Bertocci, B., Hübscher, U., 8-oxo--guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins, *Nature* **2007**, *447*, 606-8.
- [157] Pourquier, P., Pourquier, Y., Topoisomerase I-mediated DNA damage, *Adv. Cancer Res.* **2001**, *80*, 189-216.
- [158] Damha, M.J., Giannaris, P.A., Zabarylo, S.V., An improved procedure for derivatization of controlled-pore glass beads for solid-phase oligonucleotide synthesis, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*, 3813-21.
- [159] Dwyer-Hallquist, P., Kezdy, F.J., Agarwal, K.L., Interaction of the HpaI endonuclease with synthetic oligonucleotides, *Biochemistry* **1982**, *21*, 4693-700.

13. Anhang

Synthese-Protokoll für unmodifizierte Phosphoramidite

Schritt	Funktion	Zeit [s]
1	Begin	
2	MeCN to waste	3
3	MeCN to Column	10
4	Reverse Flush	10
5	Block Flush	4
6	Phos Prep	3
7	Column 1 On	
8	Block Vent	2
9	DCI to Waste	1.7
10	Base+DCI to Column	5
11	DCI to Column	2
12	Base+DCI to Column	5
13	DCI to Column	2
14	Base+DCI to Column	5
15	Push to Column	
16	Column 1 Off	
17	Wait	25
18	Cap Prep	3
19	MeCN to Waste	4
20	Reverse Flush	7
21	Block Flush	3
22	Cap to Column	10
23	Wait	5
24	MeCN to Waste	4
25	Reverse Flush	7
26	Block Flush	3
27	Ox. to Column	8
28	MeCN to Waste	4
29	Block Flush	3
30	Wait	15
31	MeCN to Column	10
32	Flush to Waste	6
33	MeCN to Column	10
34	Reverse Flush	7
35	Block Flush	3
36	Start Detrityl	
37	MeCN to Waste	4
38	MeCN to Column	10
39	Reverse Flush	7

40	Block Flush	3
41	If Monitoring	
42	DCM to Column	35
43	Deblok. to Column	3
44	Monitor Trityl	
45	Deblok. to Column	85
46	Monitor Noise	
47	Deblok. to Column	10
48	Stop Monitor	
49	MeCN to Column	10
50	Reverse Flush	8
51	If not Monitoring	
52	Deblok. to Column	6
53	Trityl Flush	5
54	Deblok. to Column	6
55	Wait	5
56	Trityl Flush	5
57	Deblok. to Column	6
58	Wait	5
59	Trityl Flush	5
60	Deblok. to Column	6
61	Wait	5
62	Trityl Flush	5
63	MeCN to Column	10
64	Trityl Flush	8
65	End Monitoring	
66	MeCN to Column	8
67	Reverse Flush	7
68	Block Flush	4
69	End	

Synthese-Protokoll für modifizierte Phosphoramidite

Schritt	Funktion	Zeit [s]
1	Begin	
2	MeCN to waste	3
3	MeCN to Column	10
4	Reverse Flush	10
5	Block Flush	4
6	Phos Prep	3
7	Column 1 On	
8	Block Vent	2
9	DCI to Waste	2
10	DCI to Column	3
11	Base+DCI to Column	5
12	Base+DCI to Column	5
13	Wait	500
14	DCI to Column	3
15	Base+DCI to Column	5
16	Base+DCI to Column	5
17	Wait	500
18	MeCN to Column	5
19	Push to Column	
20	Block Vent	2
21	DCI to Waste	2
22	DCI to Column	3
23	Base+DCI to Column	5
24	Base+DCI to Column	5
25	Wait	500
26	DCI to Column	3
27	Base+DCI to Column	5
28	Base+DCI to Column	5
29	Wait	500
30	MeCN to Column	5
31	Push to Column	
32	Block Vent	2
33	DCI to Waste	2
34	DCI to Column	3
35	Base+DCI to Column	5
36	Base+DCI to Column	5
37	Wait	500
38	DCI to Column	2

39	Base+DCI to Column	5
40	Base+DCI to Column	5
41	Wait	500
42	MeCN to Column	5
43	Push to Column	
44	Block Vent	2
45	Wait	30
46	Cap Prep	3
47	MeCN to Waste	4
48	Reverse Flush	7
49	Block Flush	3
50	Cap to Column	10
51	Wait	5
52	MeCN to Waste	4
53	Reverse Flush	7
54	Block Flush	3
55	Ox. to Column	8
56	MecN to Waste	4
57	Block Flush	3
58	Wait	15
59	MeCN to Column	10
60	Flush to Waste	6
61	MeCN to Column	10
62	Reverse Flush	7
63	Block Flush	3
64	Start Detrityl	
65	MeCN to Waste	4
66	MeCN to Column	10
67	Reverse Flush	7
68	Block Flush	3
69	If Monitoring	
70	DCM to Column	35
71	Deblok. to Column	3
72	MonitorTrityl	
73	Deblok. to Column	85
74	Monitor Noise	
75	Deblok. to Column	10
76	Stop Monitor	
77	MeCN to Column	10
78	Reverse Flush	8
79	If not Monitoring	
80	Deblok. to Column	6
81	Trityl Flush	5

82	Deblok. to Column	6
83	Wait	5
84	Trityl Flush	5
85	Deblok. to Column	6
86	Wait	5
87	Trityl Flush	5
88	Deblok. to Column	6
89	Wait	5
90	Trityl Flush	5
91	MeCN to Column	10
92	Trityl Flush	8
93	End Monitoring	
94	MeCN to Column	8
95	Reverse Flush	7
96	Block Flush	4
97	End	

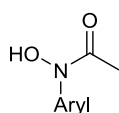
Natrix Kristallisations-Screen

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◊	Tube #	Precipitant
1.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	1.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	1.	2.0 M Lithium sulfate monohydrate
2.	0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate	2.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	2.	2.5 M Ammonium sulfate
3.	0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate	3.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	3.	20% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
4.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate	4.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	4.	10% w/v Polyethylene glycol 400
5.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	5.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	5.	5% w/v Polyethylene glycol 8,000
6.	0.1 M Ammonium sulfate, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	6.	0.05 M MES monohydrate pH 5.6	6.	20% w/v Polyethylene glycol 8,000
7.	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate	7.	0.05 M MES monohydrate pH 6.0	7.	15% w/v 2-Propanol
8.	0.1 M Ammonium acetate, 0.005 M Magnesium sulfate heptahydrate	8.	0.05 M MES monohydrate pH 6.0	8.	0.6 M Sodium chloride
9.	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	9.	0.05 M MES monohydrate pH 6.0	9.	10% w/v Polyethylene glycol 400
10.	0.005 M Magnesium sulfate heptahydrate	10.	0.05 M MES monohydrate pH 6.0	10.	5% w/v Polyethylene glycol 4,000
11.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	11.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	11.	1.0 M Lithium sulfate monohydrate
12.	0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate	12.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	12.	1.8 M Lithium sulfate monohydrate
13.	0.015 M Magnesium acetate tetrahydrate	13.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	13.	1.7 M Ammonium sulfate
14.	0.1 M Potassium chloride, 0.025 M Magnesium chloride hexahydrate	14.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	14.	15% w/v 2-Propanol
15.	0.04 M Magnesium chloride hexahydrate	15.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	15.	5% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
16.	0.04 M Magnesium acetate tetrahydrate	16.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	16.	30% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
17.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate	17.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0	17.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
18.	0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate	18.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	18.	1.3 M Lithium sulfate monohydrate
19.	0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate	19.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	19.	2.0 M Ammonium sulfate
20.	0.1 M Ammonium acetate, 0.015 M Magnesium acetate tetrahydrate	20.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	20.	10% w/v 2-Propanol
21.	0.2 M Potassium chloride, 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate	21.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	21.	10% w/v 1,6-Hexanediol
22.	0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate	22.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	22.	15% w/v Polyethylene glycol 400
23.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	23.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	23.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
24.	0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Calcium chloride dihydrate	24.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	24.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
25.	0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate	25.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	25.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
26.	0.2 M Potassium chloride, 0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate	26.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	26.	10% w/v Polyethylene glycol 8,000
27.	0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate	27.	0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	27.	30% w/v Polyethylene glycol 8,000
28.	0.05 M Magnesium sulfate hydrate	28.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	28.	1.6 M Lithium sulfate monohydrate
29.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	29.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	29.	4.0 M Lithium chloride
30.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	30.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	30.	1.6 M Ammonium sulfate
31.	0.005 M Magnesium chloride hexahydrate	31.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	31.	25% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
32.	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	32.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	32.	20% w/v 1,6-Hexanediol
33.	0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	33.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	33.	30% w/v 1,6-Hexanediol
34.	0.1 M Potassium chloride, 0.005 M Magnesium sulfate hydrate	34.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	34.	15% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
35.	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	35.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	35.	5% v/v Polyethylene glycol 400
36.	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate	36.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	36.	10% w/v Polyethylene glycol 400
37.	0.2 M Potassium chloride, 0.025 M Magnesium sulfate hydrate	37.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	37.	20% w/v Polyethylene glycol 200
38.	0.2 M Ammonium acetate, 0.15 M Magnesium acetate tetrahydrate	38.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	38.	5% w/v Polyethylene glycol 4,000
39.	0.1 M Ammonium acetate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate	39.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	39.	5% w/v Polyethylene glycol 8,000
40.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	40.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	40.	1.6 M Ammonium sulfate
41.	0.1 M Potassium chloride, 0.015 M Magnesium chloride hexahydrate	41.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	41.	10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
42.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	42.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	42.	5% v/v 2-Propanol
43.	0.05 M Ammonium acetate, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	43.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	43.	10% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
44.	0.2 M Potassium chloride, 0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	44.	0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5	44.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
45.	0.025 M Magnesium sulfate hydrate	45.	0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5	45.	1.8 M Ammonium sulfate
46.	0.005 M Magnesium sulfate hydrate	46.	0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5	46.	35% w/v 1,6-Hexanediol
47.	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	47.	0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5	47.	30% w/v Polyethylene glycol 400
48.	0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate	48.	0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5	48.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000

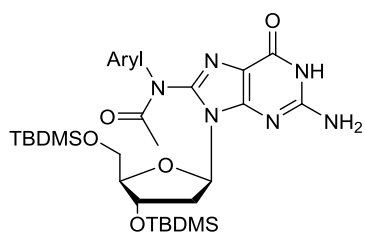
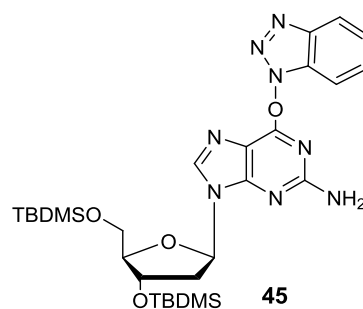
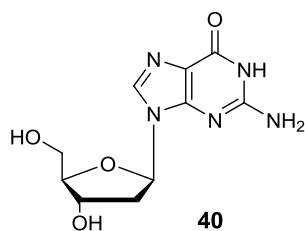
MPD Kristallisations-Screen

1.	10% v/v MPD	1. 40 mM Na Cacodylate pH 5.5	1. 20 mM Cobalt Hexamine	1. None	1. 20 mM Magnesium Chloride
2.	10% v/v MPD	2. 40 mM Na Cacodylate pH 5.5	2. 20 mM Cobalt Hexamine	2. 80 mM Sodium Chloride	2. 20 mM Magnesium Chloride
3.	10% v/v MPD	3. 40 mM Na Cacodylate pH 5.5	3. 20 mM Cobalt Hexamine	3. 12 mM Sodium Chloride / 80 mM Potassium Chloride	3. None
4.	10% v/v MPD	4. 40 mM Na Cacodylate pH 5.5	4. 20 mM Cobalt Hexamine	4. 40 mM Lithium Chloride	4. 20 mM Magnesium Chloride
5.	10% v/v MPD	5. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	5. 12 mM Spermine tetra-HCl	5. 80 mM Potassium Chloride	5. 20 mM Magnesium Chloride
6.	10% v/v MPD	6. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	6. 12 mM Spermine tetra-HCl	6. 80 mM Potassium Chloride	6. None
7.	10% v/v MPD	7. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	7. 12 mM Spermine tetra-HCl	7. 80 mM Sodium Chloride	7. 20 mM Magnesium Chloride
8.	10% v/v MPD	8. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	8. 12 mM Spermine tetra-HCl	8. 80 mM Sodium Chloride	8. None
9.	10% v/v MPD	9. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	9. 12 mM Spermine tetra-HCl	9. 80 mM Sodium Chloride / 12 mM Potassium Chloride	9. 20 mM Magnesium Chloride
10.	10% v/v MPD	10. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	10. 12 mM Spermine tetra-HCl	10. 12 mM Sodium Chloride / 80 mM Potassium Chloride	10. None
11.	10% v/v MPD	11. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	11. 12 mM Spermine tetra-HCl	11. 80 mM Sodium Chloride	11. 20 mM Barium Chloride
12.	10% v/v MPD	12. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	12. 12 mM Spermine tetra-HCl	12. 80 mM Potassium Chloride	12. 20 mM Barium Chloride
13.	10% v/v MPD	13. 40 mM Na Cacodylate pH 6.0	13. 12 mM Spermine tetra-HCl	13. None	13. 80 mM Strontium Chloride
14.	10% v/v MPD	14. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	14. 12 mM Spermine tetra-HCl	14. 80 mM Potassium Chloride	14. 20 mM Magnesium Chloride
15.	10% v/v MPD	15. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	15. 12 mM Spermine tetra-HCl	15. 80 mM Potassium Chloride	15. None
16.	10% v/v MPD	16. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	16. 12 mM Spermine tetra-HCl	16. 80 mM Sodium Chloride	16. 20 mM Magnesium Chloride
17.	10% v/v MPD	17. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	17. 12 mM Spermine tetra-HCl	17. 80 mM Sodium Chloride	17. None
18.	10% v/v MPD	18. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	18. 12 mM Spermine tetra-HCl	18. 80 mM Sodium Chloride / 12 mM Potassium Chloride	18. 20 mM Magnesium Chloride
19.	10% v/v MPD	19. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	19. 12 mM Spermine tetra-HCl	19. 12 mM Sodium Chloride / 80 mM Potassium Chloride	19. None
20.	10% v/v MPD	20. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	20. 12 mM Spermine tetra-HCl	20. 80 mM Sodium Chloride	20. 20 mM Barium Chloride
21.	10% v/v MPD	21. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	21. 12 mM Spermine tetra-HCl	21. 80 mM Potassium Chloride	21. 20 mM Barium Chloride
22.	10% v/v MPD	22. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	22. 12 mM Spermine tetra-HCl	22. 40 mM Lithium Chloride	22. 80 mM Strontium Chloride / 20 mM Magnesium Chloride
23.	10% v/v MPD	23. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	23. 12 mM Spermine tetra-HCl	23. 40 mM Lithium Chloride	23. 80 mM Strontium Chloride
24.	10% v/v MPD	24. 40 mM Na Cacodylate pH 7.0	24. 12 mM Spermine tetra-HCl	24. None	24. 80 mM Strontium Chloride / 20 mM Magnesium Chloride

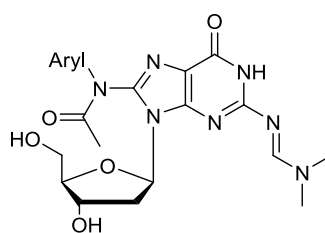
Verbindungsliste



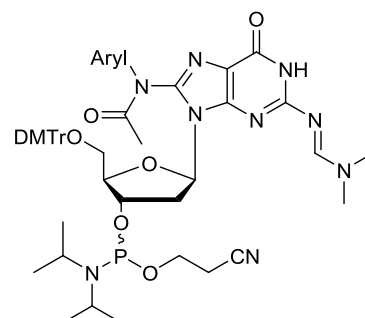
Aryl = Phenyl **84**
 4-Methylphenyl **85**
 4-Methoxyphenyl **86**
 4-Cyanophenyl **88**
 3,5-Dimethylphenyl **89**
 2-Fluorenyl **90**
 4-Biphenyl **91**



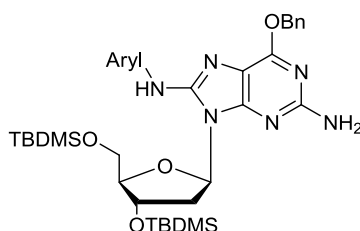
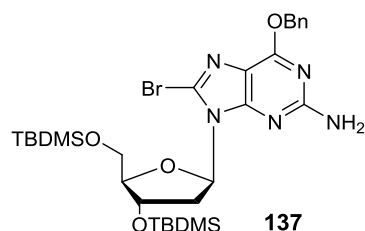
Aryl = Phenyl **95**
 4-Methylphenyl **96**
 4-Methoxyphenyl **97**
 3,5-Dimethylphenyl **99**
 2-Fluorenyl **100**
 4-Biphenyl **101**



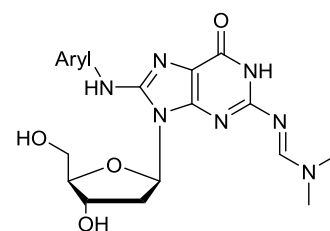
Aryl = Phenyl **110**
 4-Methylphenyl **111**
 4-Methoxyphenyl **112**
 3,5-Dimethylphenyl **113**
 2-Fluorenyl **114**
 4-Biphenyl **115**



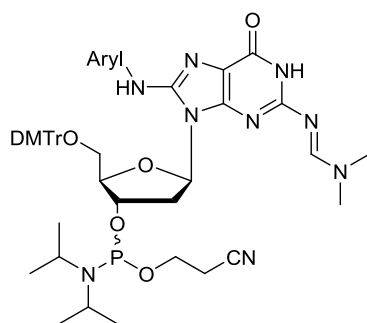
Aryl = Phenyl **128**
 4-Methylphenyl **129**
 4-Methoxyphenyl **130**
 3,5-Dimethylphenyl **131**
 2-Fluorenyl **132**
 4-Biphenyl **133**



Aryl = 4-Methylphenyl **145**
 3,5-Dimethylphenyl **146**
 2-Fluorenyl **147**



Aryl = 4-Methylphenyl **154**
 3,5-Dimethylphenyl **155**
 2-Fluorenyl **156**



Aryl = 4-Methylphenyl **160**
 3,5-Dimethylphenyl **161**
 2-Fluorenyl **162**

NarI-Sequenz(5' - d(CTC **G**GC GCC ATC) - 3')

G = C8-(*N*-Ac)-phenyl **172**
 C8-NH-phenyl **173**
 C8-(*N*-Ac)-2-fluorenyl **174**
 C8-NH-2-fluorenyl **175**

NarI-Sequenz(5' - d(CTC GGC **G**CC ATC) - 3')

G = C8-(*N*-Ac)-phenyl **176**
 C8-NH-phenyl **177**
 C8-(*N*-Ac)-2-fluorenyl **178**
 C8-NH-2-fluorenyl **179**

EcoRI-Sequenz(5' - d(GTA **G**AA TTC TAC) - 3')

G = unmodifiziert **180**
 C8-(*N*-Ac)-phenyl **181**
 C8-NH-Phenyl **182**
 C8-(*N*-Ac)-4-methylphenyl **167**
 C8-NH-4-Methylphenyl **168**
 C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl **165**
 C8-NH-4-Methoxyphenyl **166**
 C8-(*N*-Ac)-3,5-dimethylphenyl **183**
 C8-NH-3,5-Dimethylphenyl **184**
 C8-(*N*-Ac)-2-fluorenyl **185**
 C8-NH-2-Fluorenyl **186**
 C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl **187**
 C8-NH-4-Biphenyl **188**

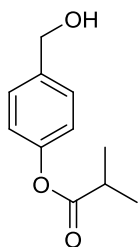
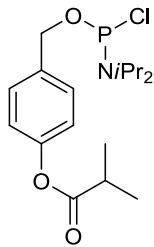
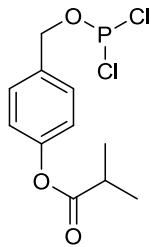
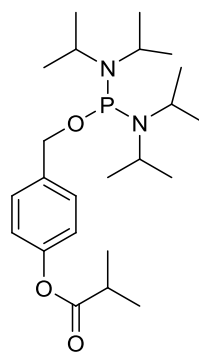
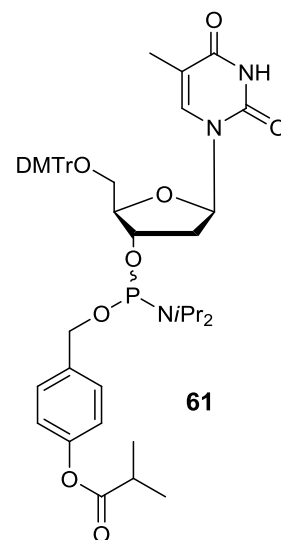
EcoRI-Sequenz

(5' - d(GTA GAA TTC TAC) - 3')

G = C8-(*N*-Ac)-phenyl **190**
 C8-NH-Phenyl **191**
 C8-(*N*-Ac)-2-fluorenyl **189**
 C8-NH-2-Fluorenyl **192**
 C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl **193**
 C8-NH-4-Biphenyl **194**

20mer-Sequenz(5' -d(ACA T**G**A GCA TCT ACG ACG CG) - 3')

G = unmodifiziert **195**
 C8-(*N*-Ac)-phenyl **169**
 C8-NH-Phenyl **170**
 C8-(*N*-Ac)-4-methylphenyl **196**
 C8-NH-4-Methylphenyl **197**
 C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl **198**
 C8-NH-4-Methoxyphenyl **199**
 C8-(*N*-Ac)-3,5-dimethylphenyl **200**
 C8-NH-3,5-Dimethylphenyl **201**
 C8-(*N*-Ac)-2-fluorenyl **202**
 C8-NH-2-Fluorenyl **203**
 C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl **163**
 C8-NH-4-Biphenyl **164**

**204****206****211****209****61**

14. Persönliches

Veröffentlichungen

- Böge, N., Krüger, S., Schröder, M., Meier, C., A new short and efficient synthetic route to C8-*N*-acetylarylamine 2'-deoxyguanosine phosphoramidites, *Synthesis* **2007**, 24, 3907-14.
- Böge, N., Krüger, S., Meier, C., Synthesis of *N*²- and C8-*N*-Ac-DNA-adducts of aromatic amines, *Collection Symp. Ser.* **2008**, 10, 137-41.
- Krüger, S., Meier, C., Synthesis of C8-*N*-acetylarylamine 2'-dG-adducts and their site-specifically incorporation into oligonucleotides, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, 52, 307-8.

Posterbeiträge

S. Krüger, A. Marx, C. Meier; 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids in Kyoto, 08. - 12. September **2008**.

Weitere Daten bleiben aus datenschutzrechtlichen Gründen gesperrt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer mit den im Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Sarah Krüger

Hamburg, den 20.10.2011