



Synthese und Charakterisierung von
C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-
5'-triphosphaten und
C-Nucleosid-modifizierter DNA

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katharina Höfler

Hamburg 2015

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Meier in der Zeit von April 2011 bis September 2014 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke

Datum der Disputation: 24.04.2015

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Meier für die interessante Themenstellung, die Freiheit bei der Bearbeitung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die gute Betreuung während der Arbeit und die hilfreichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Francke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Herrn Prof. Dr. U. Hahn und Frau Dr. B. Werner für die Teilnahme am Dissertationskolloquium.

Dank gilt meinen Kooperationspartnern: Herrn Prof. C. Vogel (Universität Rostock) und Herrn Prof. Dr. J.-L. Mergny (Universität Bordeaux) sowie ihren Mitarbeitern. Frau Dr. M. Trusch, Herrn Dr. T. Hackl, Herrn Dr. E. T. K. Haupt und ihren Mitarbeitern danke ich für die Messung von ESI-, EI- Massenspektren und NMR-Spektren. Weiterhin möchte ich allen ehemaligen und aktiven Mitgliedern des Arbeitskreises danken. Hervorzuheben ist hierbei das Labor 515: Dr. Saskia Wolf, Rosmirt Sielaff, Ivo Sarac, Tristan Gollnest und Frederic Ting für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Dank für die freundliche Unterstützung in den vielfältigsten Labor-technischen Fragestellungen gebührt außerdem: Dr. Dominik Oberthür, Dr. Anna Rath, Marco Klinge, Carsten Winkel, Patrizia Leccese, Tristan Zimmermann, Ivo Sarac und Tristan Gollnest.

Für ihre treue Freundschaft über die Jahre danke ich besonders Kathrin Knop, Patrizia Leccese sowie Birgitta Fried. Für die fürsorgliche Unterstützung und den Zuspruch während des gesamten Weges danke ich Hannfried Höfler und Daniel Höhn herzlich, denen ich diese Arbeit widmen möchte.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungen	VIII
Abkürzungen und Symbole	XIII
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	2
2.1 C8-N-Arylamin-Modifikationen	2
2.1.1 Aromatische Amine	2
2.1.1.1 Metabolismus aromatischer Amine	5
2.1.1.2 Adduktbildung <i>in vivo</i>	7
2.1.2 Nachweis von Karzinogenität	9
2.1.3 Nachweis von DNA-Addukten	10
2.1.4 Synthese der C8-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-Addukte	10
2.1.4.1 Synthese der C8-N-H-Arylamin-Addukte	10
2.1.4.2 Synthese der C8-N-Acetyl-N-Arylamin-Addukte	11
2.1.5 Eigenschaften Arylamin-modifizierter Oligonucleotide	13
2.1.6 Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten	14
2.1.7 DNA-Polymerasen	19
2.1.8 G-Quadruplexe	21
2.2 C-Nucleosid-Modifikationen	22
2.2.1 C-Nucleoside	23
2.2.2 Antisense-Therapie	24
2.2.3 Synthese von Oligonucleotiden	25
3 Aufgabenstellung	28
3.1 C8-Arylamin-Modifikationen	28
3.2 C-Nucleosid-Modifikationen	30
4 Resultate und Diskussion	31
4.1 C8-Arylamin-Modifikationen	31
4.1.1 Synthese der C8-N-Acetyl-N-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Derivate als Schlüsselverbindung	32
4.1.1.1 Synthese der Hydroxamsäuren	33
4.1.1.2 Synthese der geschützten 2'-Desoxyguanosin-Derivate	35
4.1.2 Synthese der C8-N-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate	41
4.1.2.1 Synthese der <i>cycloSal</i> -Phosphattriester	43
4.1.2.2 Synthese der C8-N-Acetyl-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate	51
4.1.2.3 Synthese der C8-N-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate	57
4.1.3 Strukturelle Charakterisierung der C8-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate	67
4.1.3.1 Thermodynamische Berechnungen der C8-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate	69
4.1.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen der C8-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate	75

4.1.4	Biochemische Charakterisierung der C8- <i>N</i> -Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate	78
4.1.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	79
4.1.4.2	Primer-Verlängerungs-Studien.....	80
4.1.5	C8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -Arylamin-modifizierte Quadruplexe.....	86
4.2	C-Nucleosid-Modifikationen	92
4.2.1	Synthese der C-Nucleosid-modifizierten DNA	93
4.2.2	Strukturelle Charakterisierung der C-Nucleosid-modifizierten DNA.....	97
4.2.2.1	Bestimmung der Schmelztemperaturen der C-Nucleosid-modifizierten DNA	98
4.2.2.2	Messung des Circularerdichroismus der C-Nucleosid-modifizierten DNA	102
4.2.2.3	<i>Molecular Dynamics</i> -Simulationen der Spacer-C-modifizierten Oligonucleotide	108
4.2.2.4	Röntgenstrukturanalyse der Spacer-C-Nucleosid-modifizierten DNA.....	112
4.2.3	Biochemische Charakterisierung der C-Nucleosid-modifizierten DNA	115
4.2.3.1	Enzymatischer Restriktionsabbau.....	115
5	Zusammenfassung	119
5.1	C8- <i>N</i> -Arylamin-Modifikationen	119
5.2	C-Nucleosid-Modifikationen	121
6	Summary	123
6.1	C8- <i>N</i> -arylamine modifications	123
6.2	C-nucleoside modifications	124
7	Experimentaltteil	126
7.1	Allgemeines.....	126
7.1.1	Reagenzien	126
7.1.2	Lösungsmittel	126
7.1.3	Enzyme und molekularbiologische Reagenzien	127
7.1.4	Phosphoramidite	127
7.1.5	HPLC-Puffer.....	129
7.1.6	Molekularbiologische Puffer und Lösungen	130
7.2	Chromatographie	131
7.3	Massenspektrometrie.....	133
7.4	Spektroskopie	134
7.5	Geräte	135
7.6	Molekularbiologische Methoden.....	138
7.7	Chemische Synthesen	142
7.7.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	142
7.7.2	Synthesevorschriften der Verbindungen	145
7.8	Oligonucleotide	175
7.8.1	Quadruplex-Sequenzen	175
7.8.2	<i>Nar</i> I-Sequenzen	176
7.8.3	<i>Eco</i> RI-Sequenzen	178
8	Gefahrstoffverzeichnis	179
9	Literatur.....	183
10	Anhang.....	199
10.1	Synthese-Protokoll für unmodifizierte DNA.....	199

10.2	Synthese-Protokoll für modifizierte DNA.....	200
10.3	Syntheseprotokoll für unmodifizierte RNA	201
10.4	Nucleic Acid Mini Screen™	201
	Verbindungsliste	202
	Eidesstattliche Erklärung	204

Abbildungen

Abbildung 1: Beispiele aromatischer Amine	3
Abbildung 2: Menschliche Exposition gegenüber aromatischen Amininen (Arylaminen)	3
Abbildung 3: Metabolismus aromatischer Amine	6
Abbildung 4: Addukte des 2'-Desoxyguanosins	8
Abbildung 5: Mechanismus der C8-Adduktbildung <i>in vivo</i>	9
Abbildung 6: Konformationen der <i>N</i> -glycosidischen Bindung der C8- <i>N</i> -Aryl-2'- desoxyguanosin-Addukte	10
Abbildung 7: Elektrophile Arylaminiierung	11
Abbildung 8: Buchwald-Hartwig-Kupplung	11
Abbildung 9: Synthese nach <i>Gräsl</i>	11
Abbildung 10: Synthese nach <i>Gillet</i> und <i>Schärer</i>	12
Abbildung 11: Synthese nach Böge	12
Abbildung 12: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach <i>Yoshikawa</i>	15
Abbildung 13: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach <i>Ludwig</i> und <i>Eckstein</i>	16
Abbildung 14: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach <i>Ott</i> und <i>Hoard</i>	16
Abbildung 15: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach der Morpholidat-Methode .	17
Abbildung 16: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach der H-Phosphonat-Methode	17
Abbildung 17: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach dem <i>cycloSal</i> -Konzept.....	18
Abbildung 18: Hydrolysemechanismus nach dem <i>cycloSal</i> -Konzept	19
Abbildung 19: Beispiel eines G-Quadruplex mit Hoogsteen-Basenpaarung und monovalentem Kation	21
Abbildung 20: Beispiele natürlicher C-Nucleoside	23
Abbildung 21: Beispiele für C-Nucleosid-Analoga des Adenosins	24
Abbildung 22: Prinzip der Antisense-Therapie	25
Abbildung 23: Automatisierter Synthesekreislauf der Phosphoramidit-Methode	27
Abbildung 24: Chemische Struktur der C8-Arylamin-modifizierten 2'-dG-5'-triphosphate .	29
Abbildung 25: C-Nucleosid-modifizierte DNA	30
Abbildung 26: Synthese der C8- <i>N</i> -Arylamin-modifizierten 5'-Triphosphate 64 und Phosphoramidite 37 aus Verbindung 66	31
Abbildung 27: Retrosyntheschema zur Darstellung der Formamidin-geschützten C8- <i>N</i> - Acetyl- <i>N</i> -Aryl-2'-dG Derivate 66	32
Abbildung 28: Retrosynthese zur Darstellung der Hydroxamsäuren	33
Abbildung 29: Versuch zur Synthese von <i>N</i> -4-Methoxyphenyl-hydroxylamin 71 nach <i>Shi</i> . 33	
Abbildung 30: Versuch zur Synthese von <i>N</i> -4-Methoxyphenyl-hydroxylamin 71 nach <i>Ren</i> 33	

Abbildung 31: Synthese der Hydroxamsäuren nach <i>Nelson</i> und <i>Ayyangar</i>	34
Abbildung 32: Synthese des TBDMS-geschützten 2'-dG 68	35
Abbildung 33: Synthese des Benzotriazol-2'-dG-Derivats 34	35
Abbildung 34: Postulierter Mechanismus der C8-Adduktbildung <i>in vitro</i>	37
Abbildung 35: Synthese der TBDMS-geschützten C8-N-Acetyl-N-aryl-2'-dG Derivate 76-79	38
Abbildung 36: Vergleich der ¹ H-NMR-Spektren von 78 bei verschiedenen Temperaturen in DMSO- <i>d</i> ⁶	39
Abbildung 37: Desilylierung der C8-N-Acetyl-N-aryl-2'-dG Derivate 76-79	40
Abbildung 38: Formamidin-Schätzung der C8-N-Acetyl-N-Arylamin-Addukte 80-83	40
Abbildung 39: <i>CycloSal</i> -Routen zur Darstellung der 5'-Triphosphate	42
Abbildung 40: Versuch zur Darstellung von C8-N-H-4-Methylphenyl-modifiziertem <i>cycloSal</i> - Phosphatriester 89	42
Abbildung 41: Synthese des ungeschützten <i>cycloSal</i> -Nucleotids 91 nach der P(III)-Route	44
Abbildung 42: ³¹ P-NMR-Roh-Spektrum	45
Abbildung 43: ³¹ P-NMR-Spektrum des gereinigten 5-Chlor- <i>cycloSal</i> -8-N-acetyl-N-4- methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat 91	45
Abbildung 44: Versuch der Synthese des geschützten <i>cycloSal</i> -Nucleotids 92 nach der P(III)- Route	46
Abbildung 45: ³¹ P-NMR-Spektrum des Versuchs zur Synthese des geschützten <i>cycloSal</i> - Nucleotids 92 nach der P(III)-Route	46
Abbildung 46: Synthese des 5-Chlor-2-hydroxybenzylalkohols 94	47
Abbildung 47: Synthese des 5-Chlorsaligenylphosphorchloridats 88	47
Abbildung 48: Versuch zur Synthese des ungeschützten <i>cycloSal</i> -Nucleotids nach der P(V)- Route	48
Abbildung 49: Synthese von 5-Chlor- <i>cycloSal</i> -N ² -formamidin-8-N-acetyl-N-4-methoxyphenyl- 2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat 92 nach der Phosphor(V)-Route	48
Abbildung 50: ³¹ P-NMR-Spektrums des 5-Chlor- <i>cycloSal</i> -N ² -formamidin-8-N-acetyl-N-4- methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphats 92 in CDCl ₃	49
Abbildung 51: ¹ H-NMR-Spektrum des des 5-Chlor- <i>cycloSal</i> -N ² -formamidin-8-N-acetyl-N-4- methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphats 92 in CDCl ₃	50
Abbildung 52: ESI-Spektrum des 5-Chlor- <i>cycloSal</i> -N ² -formamidin-8-N-acetyl-N-4- methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphats 92	50
Abbildung 53: Synthese der C8-N-Acetyl-N-aryl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate 99-102	52
Abbildung 54: ³¹ P-NMR-Spektrum des gereinigten 8-N-Acetyl-N-4-methoxyphenyl-2'- desoxyguanosin-5'-triphosphats 101 in D ₂ O	53

Abbildung 55: ^1H -NMR-Spektrum des gereinigten 8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 101 in D_2O	54
Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm des gereinigten C8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 101	54
Abbildung 57: ESI-Spektrum des Nebenproduktes C8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-diphosphat	55
Abbildung 58: MALDI-Spektrum des gereinigten C8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 101	56
Abbildung 59: Versuche zur Deacetylierung von C8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 101	59
Abbildung 60: ^{31}P -NMR-Spektren unter Verwendung von AMA-Reagenz	60
Abbildung 61: ^1H -NMR-Spektrum nach Versuch zur Synthese von 103c in D_2O	61
Abbildung 62: RP-HPLC-Chromatogramme der Hydrolysestudie	62
Abbildung 63: ^{31}P -NMR-Spektrum des C8- <i>N</i> -H-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 105 in D_2O	63
Abbildung 64: ^1H -NMR-Spektrum des C8- <i>N</i> -H-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 104 mit 2-Mercaptoethanol	64
Abbildung 65: ^1H -NMR-Spektrum des gereinigten C8- <i>N</i> -H-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 105 in D_2O	65
Abbildung 66: MALDI-Spektrum des C8- <i>N</i> -H- <i>N</i> -4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 106	65
Abbildung 67: RP-HPLC-Chromatogramm des gereinigten C8- <i>N</i> -H- <i>N</i> -4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 106	66
Abbildung 68: Relevante Torsionswinkel C8-modifizierter 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate	67
Abbildung 69: C3'-endo und C2'-endo Zucker-Konformationen	68
Abbildung 70: Konformation der energieärmsten <i>anti</i> -Konformation des 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphats dGTPa	71
Abbildung 71: Konformation der energieärmsten <i>syn</i> -Konformation des 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphats dGTPd	71
Abbildung 72: Konformation der energieärmsten <i>syn</i> -Konformation des C8- <i>N</i> -H-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 107d	72
Abbildung 73: Konformation der energieärmsten <i>anti</i> -Konformation des C8- <i>N</i> -H-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 107a	73
Abbildung 74: Konformation der energieärmsten <i>syn</i> -Konformation des C8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 99b	74

Abbildung 75: Konformation der energieärmsten <i>anti</i> -Konformation des C8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats 99a	74
Abbildung 76: Relevante Kopplungen im NOESY-NMR-Spektrum von C8- <i>N</i> -H-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 104	76
Abbildung 77: Relevante Kopplungen im NOESY-NMR -Spektrum von C8- <i>N</i> -Acetyl- <i>N</i> -4-Methoxyphenyl-amin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 101	77
Abbildung 78: Agarosegel der PCR mit FIREPol® DNA-Polymerase	79
Abbildung 79: Oligonucleotid-Sequenz der „standing-start“-Reaktionen	81
Abbildung 80: Autoradiogramme der 15%igen denaturierenden PAA-Gele der Reaktionen mit der DNA-Polymerase Klenow Fragment <i>exo</i> ⁻	81
Abbildung 81: Autoradiogramme der 15%igen denaturierenden PAA-Gele der Reaktionen mit der humanen DNA-Polymerase β	83
Abbildung 82: Retrosynthese des Phosphoramidits 108 aus der Formamidin-geschützten Verbindung 86	86
Abbildung 83: Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol 110	87
Abbildung 84: Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid 111	87
Abbildung 85: Synthese von <i>N</i> ² -Formamidin-8- <i>N</i> -acetyl- <i>N</i> -4-methoxyphenyl-5'- <i>O</i> -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin 109	88
Abbildung 86: Synthese von <i>N</i> ² -Formamidin-8- <i>N</i> -acetyl- <i>N</i> -4-methoxyphenyl-5'- <i>O</i> -dimethoxytrityl-3'- <i>O</i> -(<i>N,N'</i> -diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin 108	88
Abbildung 87: HPLC-Chromatogramm des gereinigten C8- <i>N</i> -Acetyl-4-methoxyphenyl-modifizierten Oligonucleotids 114	89
Abbildung 88: MALDI-Massenspektrum von 114	90
Abbildung 89: CD-Spektren der Quadruplexe.....	91
Abbildung 90: Struktur der C-Phosphoramidite 115 und 116	93
Abbildung 91: Rohchromatogramm des Benzodiazepin-modifizierten Oligonucleotids 128	95
Abbildung 92: HPLC-Chromatogramm des gereinigten Oligonucleotids 128	95
Abbildung 93: MALDI-Massenspektrum des modifizierten Oligonucleotids 128	96
Abbildung 94: Rohchromatogramm des RNA-Oligonucleotids 126	96
Abbildung 95: HPLC-Chromatogramm des gereinigten RNA-Oligonucleotids 126	97
Abbildung 96: MALDI-Massenspektrum des unmodifizierten RNA-Oligonucleotids 126	97
Abbildung 97: CD-Spektren und Strukturen verschiedener DNA-Konformationen	102
Abbildung 98: CD-Spektren der <i>NarI</i> mismatch Duplexe.....	103
Abbildung 99: CD-Spektren mit ABASIC-modifizierten Strängen.	104
Abbildung 100: CD-Spektren der Benzodiazepin-modifizierten <i>NarI</i> -Duplexe.....	104
Abbildung 101: CD-Spektren der Thieno-modifizierten <i>NarI</i> -Duplexe	105

Abbildung 102: CD-Spektren der RNA-DNA Duplexe.....	106
Abbildung 103: CD-Spektren der <i>EcoRI</i> DNA-Duplexe	107
Abbildung 104: Struktur des unmodifizierten <i>NarI</i> -Duplexes 122-121	109
Abbildung 105: Struktur I des modifizierten Duplexes 123-117	110
Abbildung 106: Struktur II des modifizierten Duplexes 123-117	111
Abbildung 107: Schematische Darstellung des <i>hanging drop</i> Verfahrens	113
Abbildung 108: Duplex-Lösung 123-121	114
Abbildung 109: Lichtmikroskopische Aufnahme des Kristalls aus Lösung Nr. 17.....	114
Abbildung 110: Restriktionsabbau durch die <i>EcoRI</i> -Endonuclease.....	115
Abbildung 111: Restriktionsabbau des unmodifizierten <i>EcoRI</i> -Oligonucleotids 127	116
Abbildung 112: Restriktionsabbau des modifizierten Oligonucleotids 128	117
Abbildung 113: Restriktionsabbau des modifizierten Oligonucleotids 129	117

Abkürzungen und Symbole

Abkürzung/ Symbol	Erläuterung
μ	Mikro
1,2-DME	1,2-Dichlormethan
Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ABASIC	5'-O-Dimethoxytrityl-2'-desoxyribose-3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äquiv.	Äquivalente
B	Benzo-Modifikation
Benzo	4-[2-(5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-((2-cyanoethyl)(diisopropylamino)phosphino)-1,2-didesoxy- β -D-ribofuranos-1-yl)ethyl]2-phenyl-3H-1,5-benzodiazepin
ber.	berechnet
BMT	Benzomercaptoethanol
Bn	Benzyl
BOP	1-H-Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphat
bp	Basenpaare
Bz	Benzoyl
CD	Circulardichroismus
CDCl ₃	Deuteriertes Chloroform
CPG	Controlled Pore Glass
cycloSal	cycloSaligenyl
d	Dublett
D ₂ O	Deuteriumoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	Dichloressigsäure
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
dd	Doppeldublett
ddd	Dreifachdublett
DFT	Dichtefunktionaltheorie
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO-d ₆	sechsfach deuteriertes Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
ds	double stranded
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
ESI	Elektronensprayionisation
gef.	gefunden

ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HPLC	High performance liquid chromatography
HR	High resolution
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> Butyryl
IEX	Ionenaustauschchromatographie
<i>i</i> PrPac	<i>iso</i> Propylphenoxyacetyl
IR	Infrarot
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
m	Multiplett
M	Molar
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MS	Massenspektrometrie
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	Nuclear magnetic resonance
nt	Nucleotide
Nu	Nucleophil
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Petrolether
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ph	Phenyl
ppm	parts per million
PS	Polystyrol
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	reversed phase
Rt	Raumtemperatur
s	Singulett
S	Thieno-Modifikation
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Schutzgruppe
Smp.	Schmelzpunkt
t	triplett
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
tert.	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFO	Triplex-bildene Oligonucleotide
THF	Tetrahydrofuran

4-*N*-Benzoyl-6-[(5-*O*-dimetoxyl-1,2-dideoxy- β -D-ribofuranos-1-yl)methyl]thieno[2,3-*d*]pyrimidin

Thieno	
T_m	Schmelztemperatur
TMSCI	Trimethylsilylchlorid
TOF	time of flight
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/ v	Volumen/ Volumen
W	Watt
w/ w	Masse/ Masse
X	ABASIC-Modifikation
δ	Chemische Verschiebung
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

Täglich geht das menschliche Erbgut zahlreiche chemische Reaktionen ein. Unter physiologischen Bedingungen reagieren die Bestandteile der Nucleinsäuren, die Nucleobasen, die Ribose und die Phosphatgruppen. Einige dieser Reaktionen sind essentiell und regulieren wichtige Prozesse im Organismus. Beispielsweise wird die Genexpression gesteuert, in dem die DNA (Desoxyribonucleinsäure) lokal durch die Methylierung ihrer Nucleobasen verändert wird.^[1] Die menschliche RNA ist einer komplexen posttranskriptionalen Veränderung durch Capping, Polyadenylierung und Spleißen unterworfen.^[2]

Eine Vielzahl der Änderungen innerhalb der DNA erfolgt jedoch willkürlich durch Strangbrüche, Modifikationen, Dimerisierung oder Verlust von Nucleobasen. Solche Veränderungen können z.B. durch chemische Agenzien, ultraviolette oder ionisierende Strahlung hervorgerufen werden. Sind die körpereigenen Reparaturmechanismen wie die Mismatch-, Basenexzisions- (BER) oder Nucleotidexzisionsreparatur (NER) nicht in der Lage die Struktur der DNA wiederherzustellen, kann die enthaltene Information nicht mehr einwandfrei gelesen werden. Die Folgen für den menschlichen Organismus sind Apoptose, Mutation oder Krebs.

Die durch chemische Agenzien hervorgerufenen Veränderungen, sind Gegenstand des ersten Abschnittes dieser Arbeit. Der Fokus liegt auf den aromatischen Aminen, die schon seit dem Ende des 19. Jahrhunderts als krebserzeugende Stoffe bekannt sind.^[3,4] Die Entstehung von Krebs wird dabei auf eine strukturelle Veränderung der DNA zurückgeführt, die durch die Reaktion der aromatischen Amine mit den Nucleobasen der DNA hervorgerufen wird.^[5-7]

Veränderungen der DNA können jedoch bei gezieltem Einsatz auch positive Effekte auf den Organismus haben. In Hinblick auf die Möglichkeit zur Behebung von Fehlfunktionen sind diese Veränderungen der DNA Gegenstand des zweiten Abschnittes dieser Arbeit. Im Zentrum dieser Betrachtungen liegen die strukturellen und biochemischen Einflüsse auf doppelsträngige DNA und RNA durch eine Modifikation zwischen einem Heterocyclus und dem Zuckergerüst in Form von C-Nucleosiden.

2 Kenntnisstand

Zum besseren Verständnis der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen werden im Folgenden die notwendigen theoretischen Grundlagen dargelegt. Analog zu den in Kapitel 1 beschriebenen Abschnitten erfolgt eine Gliederung in zwei Unterkapitel.

Kapitel 2.1 befasst sich mit den C8-*N*-Arylamin-Modifikationen der aromatischen Amine (Arylamine), welche willkürlich die Nucleobase Guanin an Position 8 durch Aufnahme in den Organismus schädigen.

Kapitel 2.2 beschreibt die C-Nucleosid-Modifikationen, welche künstlich als Modifikation an der Verknüpfungseinheit zwischen Heterocyclus und Riboseeinheit erzeugt werden und zur Therapie verschiedener Krankheiten dienen können.

2.1 C8-*N*-Arylamin-Modifikationen

In diesem Kapitel werden die Zusammenhänge zwischen der Belastung durch Arylamine im Organismus und der Entstehung von Krebs erläutert. Dies dient zum besseren Verständnis der in dieser Arbeit untersuchten strukturellen und biochemischen Wechselwirkung von monocyclischen Arylaminen mit 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphaten, den Monomerbausteinen zur DNA-Synthese.

2.1.1 Aromatische Amine

Charakteristisch für aromatische Amine (Arylamine) ist die exocyclische Aminogruppe, die an ein aromatisches Ringsystem geknüpft ist. Man unterscheidet zwischen monocyclischen und polycyclischen Arylaminen von denen die Verbindungen **1-6** beispielhaft in Abbildung 1 dargestellt wurden. Die monocyclischen aromatischen Amine **1-4** weisen eine geringere Karzinogenität auf als die polycyclischen aromatischen Amine 4-Aminobiphenyl **5** und 2-Aminofluoren **6**. Sie werden daher als „Grenzkarzinogene“ bezeichnet. Damit Grenzkarzinogene ihre volle Karzinogenität erreichen, ist das Vorhandensein eines weiteren Karzinogens, eine Akkumulation oder eine lange Expositionszeit nötig.

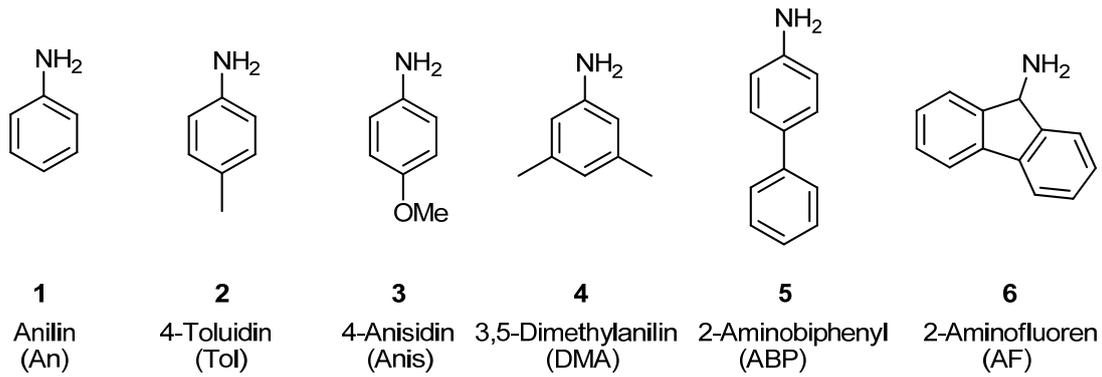


Abbildung 1: Beispiele aromatischer Amine

Erste Zusammenhänge zwischen aromatischen Aminen und der Entstehung von Krebs konnten Ende des 19. Jahrhunderts bei Arbeitern in Färbereien hergestellt werden.^[3,4] Durch die langen Expositionszeiten von aromatischen Aminen, die wichtige Ausgangs- und Zwischenprodukte in der Farbindustrie darstellen, erkrankten die Fabrikarbeiter vermehrt an Harnblasenkarzinomen. Später wurde auch der Konsum von Tabak bzw. **Tabakrauch** mit der Entstehung von Blasenkrebs in Zusammenhang gebracht.^[8-12]

Neuere Studien zeigen jedoch, dass die Exposition gegenüber aromatischen Aminen nicht auf bestimmte Bevölkerungsgruppen begrenzt, sondern allgegenwärtig ist.^[13,14] Wie Abbildung 2 andeutet, gibt es eine Reihe verschiedener Quellen, die zu einem Kontakt mit aromatischen Aminen führen können. Durch dermale, orale oder inhalative Aufnahme von Farbstoffen, Kunststoffen, Pestiziden, Nahrungsmitteln, Pharmazeutika oder Treibstoffen gelangen aromatische Amine in den menschlichen Organismus:

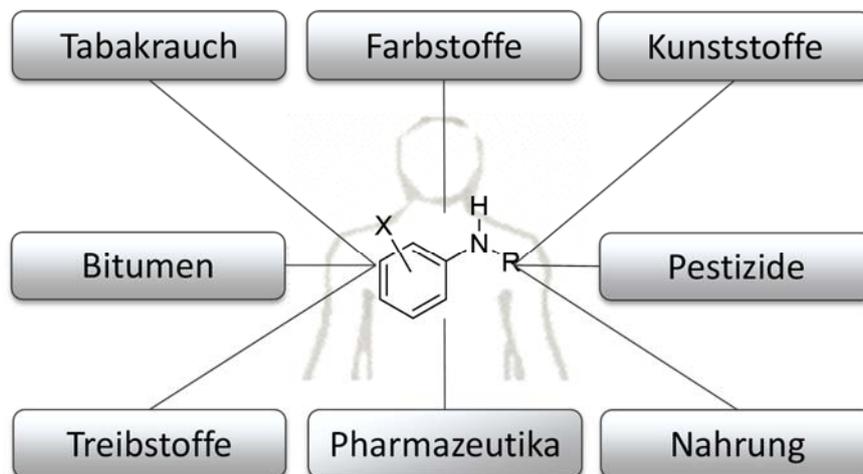


Abbildung 2: Menschliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen (Arylaminen)

Unter den **Farbstoffen** sind die synthetischen Azofarbstoffe weltweit aufgrund ihrer chemischen Vielfalt und Farbintensität in der Lebensmittel-, Textil- und Lederindustrie beliebt. Durch Diazotierung aromatischer Amine entsteht die charakteristische Azobindung dieser Farbstoffklasse. Nach Aufnahme in den Organismus wird die Azobindung in der Leber bzw. im Darm reduktiv gespalten, sodass die primären Arylamine frei werden.^[15,16] Die Europäische Union beschränkt zwar die Verwendung von Azofarbstoffen, die krebserzeugende Arylamine freisetzen können, dennoch sind ausgewählte Azofarbstoffe in Lebensmitteln zugelassen.^[17] Auch in Textilien finden sich Arylamine als Spaltprodukte von Azofarbstoffen, die noch keiner Risikobewertung unterzogen wurden.^[18] Die Einfuhrkontrolle von Produkten, die mit nicht zugelassenen Azoverbindungen gefärbt wurden, bleibt angesichts uneinheitlicher Regulierungen sowohl in der internationalen Verwendung als auch innerhalb der unterschiedlichen Anwendungsgebiete problematisch.

Aus Polyurethanen werden vielfältige Produkte wie Lacke, **Kunststoffe** und Kunstharze hergestellt. Arylamine entstehen aus Zersetzungsprodukten der Polyurethane. Die Darstellung der Polyurethane erfolgt durch Polymerisation von Diolen mit aromatischen Isocyanaten. Als Kleber finden sie unter anderem Anwendung bei multifunktionellen Verpackungsmaterialien, wie sie in der Lebensmittelindustrie benötigt werden. Bei nicht vollständig ausgehärteten Polyurethan-Klebern oder durch ihre Hydrolyse kann es zur Migration von Arylaminen kommen. Durch die Luftfeuchtigkeit, z.B. durch Einatmen oder Kontakt mit Lebensmitteln, können die freigesetzten aromatischen Isocyanatgruppen mit Wasser reagieren. Unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid können so primäre Arylamine entstehen. Zwar sollten diese Lebensmittelverpackungen gewisse Migrationswerte nicht überschreiten, generell ist ihre Verwendung aber gesetzlich erlaubt.^[19]

Als Strukturbestandteile sind Arylamine in vielen **Pestiziden** enthalten. Das Pflanzenschutzmittel Vinclozolin wurde beispielsweise in Deutschland von 1984 bis 2001 bevorzugt im Weinanbau verwendet. Nachdem man erhöhte Werte seines Metaboliten 3,5-Dichloranilin in menschlichem Urin nachgewiesen hatte, ist

Vinclozolin heute in der Europäischen Union nicht mehr zugelassen.^[20] Grundsätzlich ist jedoch die Verwendung von Pflanzenschutzmittel, die aromatische Amine freisetzen in Deutschland nicht rechtswidrig.^[21]

Beim Erhitzen tierischer **Nahrungsmittel** entstehen Arylamin-Derivate, die anschließend direkt durch die Nahrung in den menschlichen Organismus aufgenommen werden.^[22]

Bei den **Arzneimitteln** stehen die Analgetika der Anilin-Derivate im Verdacht. Der bekannteste Vertreter dieser Klasse ist das Paracetamol, welches durch seine zuverlässige Wirkungsweise weltweit Anwendung findet. Im Zusammenhang mit der Einnahme von Paracetamol wird die Entstehung von Blutkrebs durch Überdosierung diskutiert.^[23]

Arylamine lassen sich schließlich auch in **Treibstoffen** und **Bitumen** finden, wo sie durch den Abbau von Nitroaromaten entstehen und durch inhalative Aufnahme den Weg in den menschlichen Organismus finden.^[24]

2.1.1.1 **Metabolismus aromatischer Amine**

Aromatische Amine zählen zur Klasse der „indirekten Karzinogene“, da sie keine unmittelbaren Schädigungen hervorrufen, sondern erst nach einigen Stunden bis Tagen durch den körpereigenen Metabolismus ihr karzinogenes Potential erreichen. Der Metabolismus wird in Phase I (Oxidation) und II (Veresterung) unterschieden. Um eine Detoxifizierung zu ermöglichen, wird in Phase I die lipophile Aryl-Verbindung durch die Einführung funktioneller Gruppen in eine hydrophile Verbindung überführt. Hauptsächlich geschieht dies durch die Oxireduktasen des Cytochrom-P₄₅₀-Enzymsystems, die den Einbau eines Sauerstoffatoms katalysieren. Um die Ausscheidung körperfremder Verbindungen über die Niere und Galle zu erleichtern, wird in Phase II ein Biokonjugat aus dem Phase-I-Metabolit mit einer Sulfat-, Acetyl-, Glucuronsäure- oder Gluthationgruppe gebildet. Da für den Organismus jedoch keine direkte Erkennung giftiger Stoffe möglich ist, können durch den Phase II Metabolismus auch aktivierte Verbindungen wie **16** entstehen, die giftige Stoffwechselprodukte darstellen. Dieser Umstand trifft partiell auf den Metabolismus aromatischer Amine zu, wie Abbildung 3 zeigt.

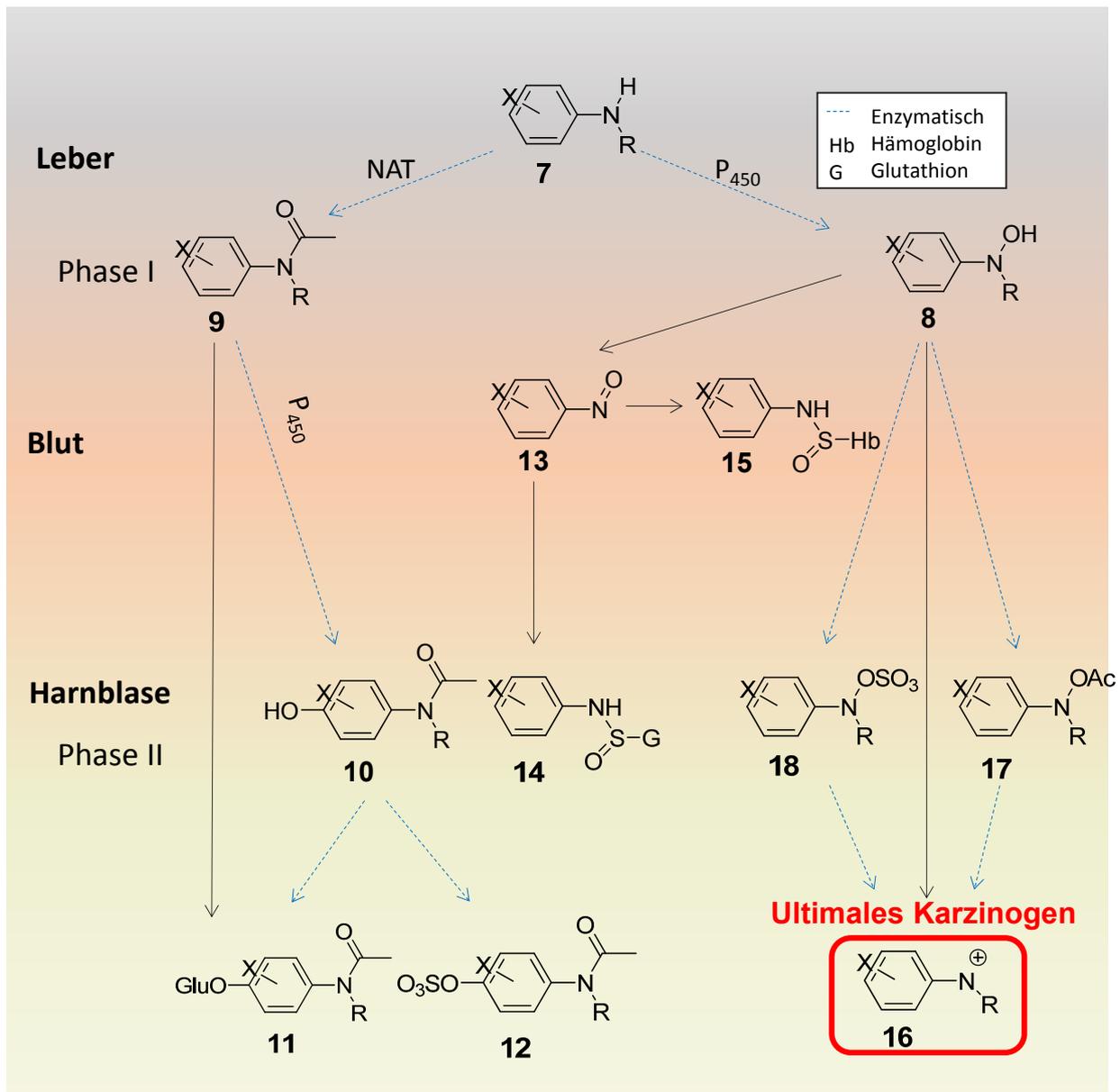


Abbildung 3: Metabolismus aromatischer Amine

In Abhängigkeit der aufgenommenen Dosis aromatischer Amine und genetischer Polymorphismen ergeben sich verschiedene Stoffwechselwege in der Leber. Das aromatische Amin **7** kann zum einen durch eine *N*-Hydroxylierung des Cytochrom- P_{450} -Enzymsystems zum *N*-Hydroxylarylamine **8** umgewandelt werden.^[25] Zum anderen kann eine *N*-Acetylierung durch *N*-Acetyltransferasen (NAT) zum Amid **9** erfolgen. Die *N*-Acetyltransferase des Menschen unterliegt jedoch einem genetischen Polymorphismus, der sich vor allem in der Geschwindigkeit der Acetylierung bemerkbar macht. Für verschiedene Bevölkerungsgruppen kann entweder der Metabolismus durch *N*-Acetylierung oder *N*-Hydroxylierung schneller erfolgen.^[26,27]

Bei der Acetylierung durch *N*-Acetyltransferasen kann das gebildete Amid **9** entweder direkt über die Harnwege oder über Cytochrom-P₄₅₀ vermittelte Hydroxylierung am Ring als Glucuronester **11** oder Sulfatester **12** ausgeschieden werden.

Das *N*-Hydroxylamin **8** gelangt aus der Leber in das Blut oder in die Harnblase. Im Blut kann eine mehrfache Oxidation durch Hämoglobin zum Nitroso-Derivat **13** erfolgen. Die Entgiftung des Nitrosoderivats erfolgt über eine Adduktbildung mit Gluthation oder Hämoglobin.^[28] Das Hämoglobin-Addukt **15** stellt nur im untergeordneten Maße ein Entgiftungsprodukt dar, da mit steigender Dosis die Anzahl an Erythrozyten für den aktiven Sauerstofftransport gemindert wird.

In der Harnblase wird aus dem *N*-Hydroxylamin **8** ein Nitreniumion **16** gebildet. Es kann enzymatisch oder durch direkte Protonierung und anschließende Wasserabspaltung im sauren Milieu der Harnblase entstehen. Das Arylnitreniumion **16** ist ein giftiges Stoffwechselprodukt. Es ist hochreaktiv und bindet kovalent an DNA, weshalb es auch als „ultimales Karzinogen“ bezeichnet wird.^[29]

2.1.1.2 Adduktbildung *in vivo*

Durch Reaktion des Arylnitreniumions **16** mit einer Nucleobase entsteht ein DNA-Addukt. Die Menge an DNA-Addukt wird durch die Art des Karzinogens bestimmt. Für 2'-Desoxycytosin (2'-dC) werden Addukte an den Positionen *N*⁴ und C5 gefunden, für 2'-Desoxyadenosin (2'-dA) an Position C8 und *N*⁶ und für 2'-Desoxythymidin (2'-dT) an Position C6.^[30,31] Hauptaddukte aromatischer Amine werden jedoch bevorzugt mit der Nucleobase Guanin gebildet. Die Ursache hierfür ist das geringere Redoxpotential des Guanins im Vergleich zu den anderen Nucleobasen.^[32] Hauptprodukt ist das C8-dG Addukt **17** aus Abbildung 4, wobei die *N*²-dG Addukte **18** und **19** sowie das O⁶-dG Addukt **20** nur im untergeordneten Maße zu finden sind.^[33]

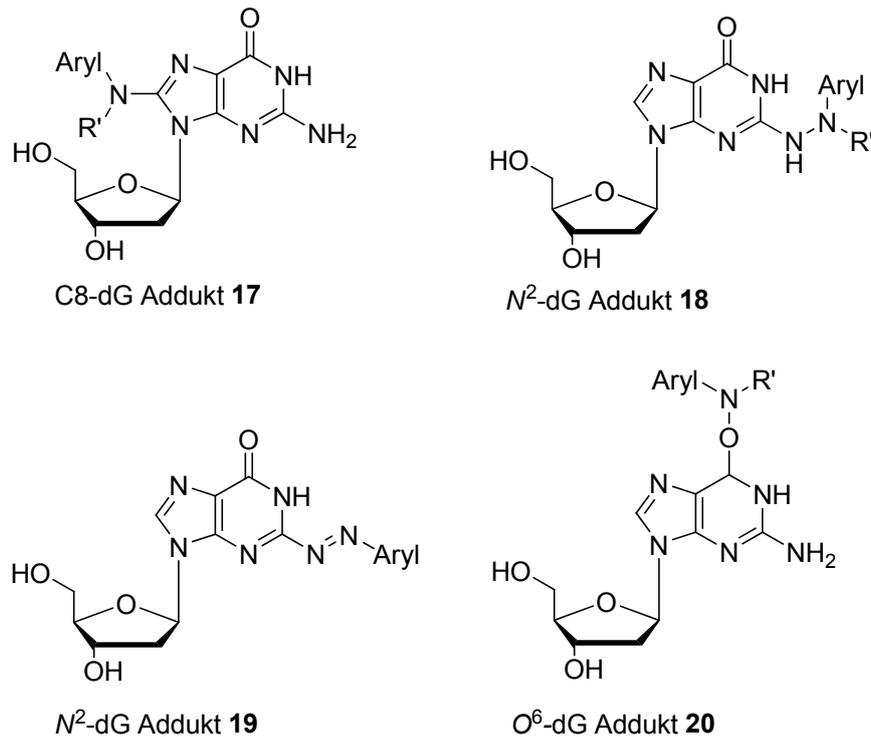
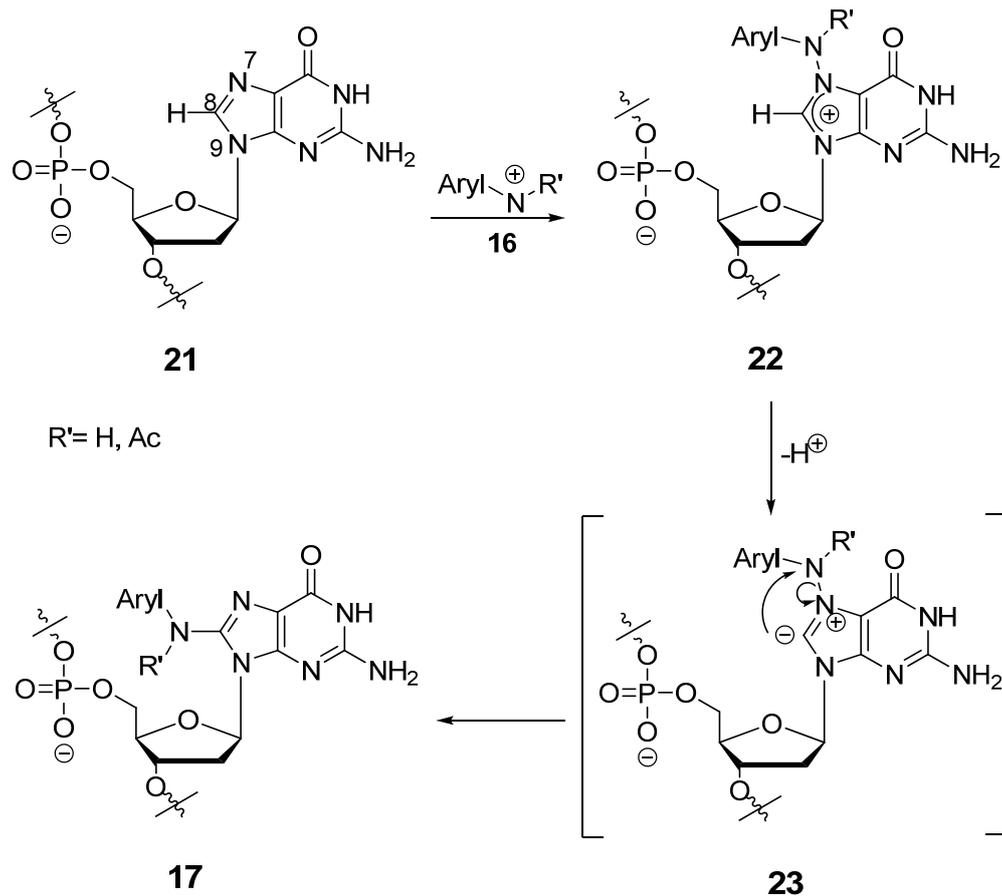


Abbildung 4: Addukte des 2'-Desoxyguanosins

Aus der Einwirkung von alkylierenden Reagenzien mit DNA ist bekannt, dass diese bevorzugt mit den nucleophilen Positionen O^6 und N^7 des Guanins reagieren.^[32] Daher wird für das elektrophile Arylnitreniumion eine Reaktion an diesen Positionen postuliert. Der in der Literatur verwendete Begriff Addukt ist allerdings in diesem chemischen Zusammenhang nicht richtig, da es sich bei dem Mechanismus nicht um eine Additionsreaktion, sondern um eine Substitutionsreaktion handelt.^[34] Abbildung 5 zeigt wie das Arylnitreniumion **16** zunächst an der nucleophilen N^7 -Position des Guanins reagiert. Die positive Ladung wird über die Positionen O^6 , N^7 und C8 delokalisiert. Deprotonierung an der C8-Position führt zu einer Ylid-Struktur **23**, die durch eine der Stevens-Umlagerung ähnliche Reaktion ihre Aromatizität wiedererhält, sodass das C8-dG Addukt **17** entsteht.^[35,36]

Die Reparatur der DNA-Addukte innerhalb der Zelle erfolgt mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und hängt von der jeweiligen Arylamin-Modifikation ab.^[37] Erkennen oder entfernen die zelleigenen Reparaturmechanismen die Addukte nicht, kann die DNA-Modifikation zur Mutation innerhalb des Genoms führen. Erfolgt keine Eliminierung der Zelle durch Apoptose, kann es so zu Replikationsfehlern und zur Tumorbildung kommen.

Abbildung 5: Mechanismus der C8-Adduktbildung *in vivo*

2.1.2 Nachweis von Karzinogenität

Karzinogene Substanzen werden durch ihre mutagene Wirkung im Ames-Test identifiziert.^[38,39] Hierbei wird die zu überprüfende Chemikalie auf einen Nährboden aufgebracht, der kein Histidin enthält. Anschließend werden Histidin auxotrophe Stämme von *Salmonella typhimurium* in Gegenwart eines tierischen Leberextrakts auf diesem Medium kultiviert. Normalerweise ist es diesem Bakterienstamm nicht möglich, das Histidin auf dem histidinfreien Medium zu synthetisieren. Karzinogene Substanzen erzeugen jedoch eine Punktmutation im Bakteriengenom. In diesem Fall kann eine Koloniebildung beobachtet werden, da das Bakterium die Fähigkeit zur Histidinbildung wiedererlangt hat. Eine spontane Rückmutation kann ausgeschlossen werden, da sie nur in einem untergeordneten Maße auftritt. Hat die Substanz keine kanzerogene Wirkung, bleibt das Bakterienwachstum aus. Der Schnelltest wird im Anschluss durch Experimente an Versuchstieren erweitert, denen hohe Dosen der zu überprüfenden Substanz verabreicht werden. Bei karzinogenen Substanzen kann anschließend eine Tumorbildung bei den Tieren beobachtet werden.

2.1.3 Nachweis von DNA-Addukten

Der Nachweis der chemischen DNA-Addukte wird mittels ^{32}P -Postlabeling durchgeführt.^[40] Bei dieser hochsensitiven Methode ist eine Detektion von Addukten aus 10^{10} Nucleotiden möglich. Bei dem Verfahren wird die DNA-Probe enzymatisch in Nucleosid-3'-monophosphate gespalten. Der anschließende Abbau natürlicher Nucleotide mit P1-Nuclease führt zur Anreicherung der Nucleotid-Addukte. Durch die T4-Polynucleotidkinase (PNK) werden die freien 5'-OH-Gruppen der Nucleotid-Addukte enzymatisch mit einer ^{32}P -markierten Phosphatgruppe markiert. Nach chromatographischer bzw. elektrophoretischer Trennung der Desoxyribonucleosid-3'-[5'- ^{32}P]-diphosphate kann so eine Quantifizierung der Addukte erfolgen.^[41]

2.1.4 Synthese der C8-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-Addukte

Die C8-N-Arylamin-Addukte des 2'-Desoxyguanosins weisen eine interessante Eigenschaft der *N*-glycosidischen Bindung auf (Abbildung 6). Während die C8-N-H-Arylamin-2'-desoxyguanosine bevorzugt eine *anti*-Konformation **24** einnehmen, ist für die entsprechenden C8-N-Acetyl-N-Arylamin-Derivate die *syn*-Konformation **25** der *N*-glycosidischen Bindung begünstigt.^[42,43]

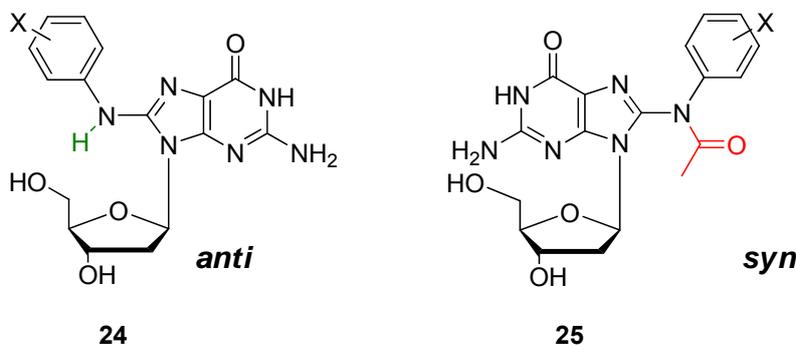


Abbildung 6: Konformationen der *N*-glycosidischen Bindung der C8-N-Aryl-2'-desoxyguanosin-Addukte

2.1.4.1 Synthese der C8-N-H-Arylamin-Addukte

Analog der Adduktbildung *in vivo* (vgl. Kapitel 2.1.1.2) können die C8-N-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-Addukte durch die elektrophile Arylaminierung nach *Boche* wie in Abbildung 7 dargestellt werden.^[44-45] Dabei wird ein Hydroxylamin in ein Nitreniumion umgewandelt und regioselektiv mit 2'-Desoxyguanosin zur Reaktion gebracht. Nachteilig sind jedoch die geringen Ausbeuten, mit denen das gewünschte Produkt erhalten wird.

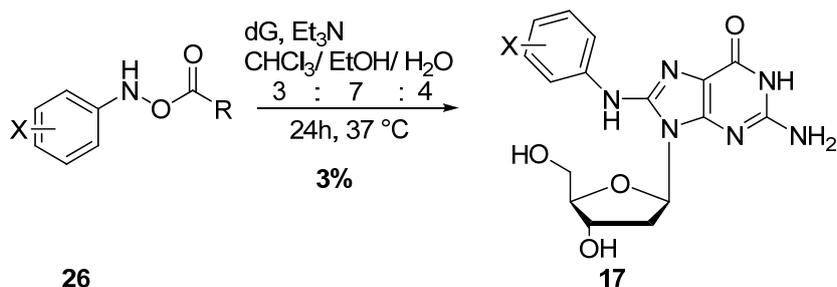


Abbildung 7: Elektrophile Arylaminierung

Die Ausbeuten konnten durch die Palladium-katalysierte C-N-Bindungsknüpfung der Buchwald-Hartwig-Kupplung in Abbildung 8 zwischen einem Arylbromid **27** mit einem Amin **28** deutlich verbessert werden.^[46-47]

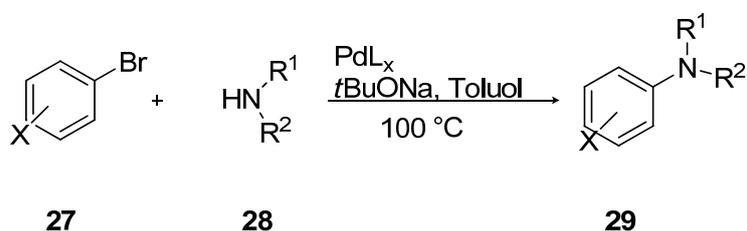
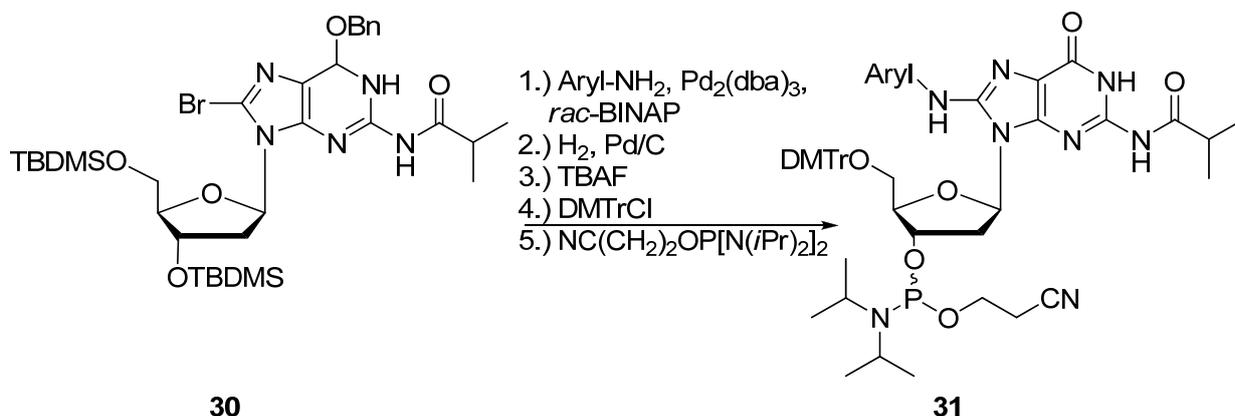


Abbildung 8: Buchwald-Hartwig-Kupplung

Basierend auf der Buchwald-Hartwig-Kupplung gelang *Gräsl* die Synthese von C8-*N*-H-Phosphoramiditen **31** in Abbildung 9, die standardmäßig für den Einbau in Oligonucleotide genutzt werden konnten.^[48-50]

Abbildung 9: Synthese nach *Gräsl*

2.1.4.2 Synthese der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-Addukte

Das erste Acetyl-Derivat konnte durch elektrophile Arylaminierung erhalten werden, lieferte das Produkt jedoch nur in geringen Ausbeuten.^[51,52] *Gillet* und *Schärer* entwickelten auf der Grundlage der Buchwald-Hartwig-Kupplung eine Strategie zur Synthese der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-Addukte, die in Abbildung 10 dargestellt ist.^[5,53]

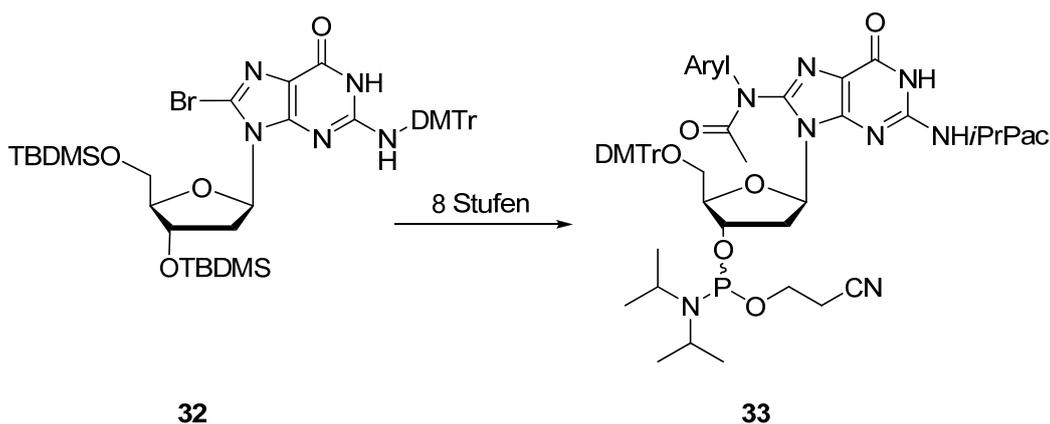


Abbildung 10: Synthese nach Gillet und Schärer

Böge konnte schließlich eine neuartige Synthesestrategie in Abbildung 11 ausarbeiten, die sowohl auf Polycyclen anwendbar ist als auch ohne Metallkatalyse auskommt.^[54]

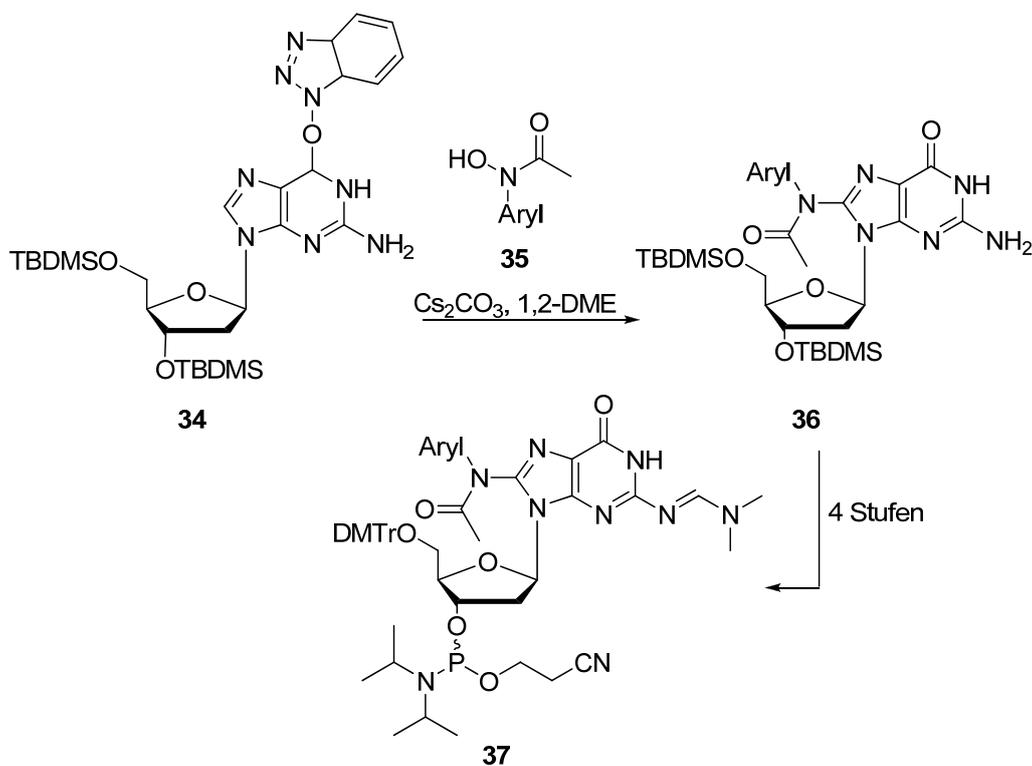


Abbildung 11: Synthese nach Böge

Im Gegensatz zur Buchwald-Hartwig-Kupplung und ihrer aufwändigen Schutzgruppenstrategie, sind weniger Syntheseschritte nötig und es wird eine höhere Gesamtausbeute erreicht. Als Kupplungsreagenz wird das 1-*H*-Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) verwendet. Die Kupplung des aktivierten 2'-Desoxyguanosinbausteins **34** mit einer Hydroxamsäure **35** liefert innerhalb weniger Syntheseschritte das C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-Phosphoramidit **37** für die Oligonucleotid-Synthese.

2.1.5 Eigenschaften Arylamin-modifizierter Oligonucleotide

Bei der durch C8-Adduktbildung verursachten chemischen Karzinogenese ist der Unterschied zwischen den *N*-Acetyl und den *N*-H-Addukten von besonderem Interesse. Es konnte gezeigt werden, dass konformative Veränderung in der DNA zu physicochemischen und biologischen Veränderungen führen, die weitreichende Konsequenzen auf die Struktur haben.^[55,56] Das Maß der Konformationsänderungen hängt von der Art der Modifikationen ab. Addukte, die einen starken Einfluss auf die DNA-Struktur haben, wie C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-Derivate, führten zu einer Strukturänderung innerhalb der Doppelhelix. Dabei kann eine Umwandlung der B-DNA in die denaturierte A/ Z-Konformation erfolgen. Maßgebliche Veränderungen der DNA-Struktur konnten eher erkannt und repariert werden, als Addukte, die eine weniger starke konformative Änderung hervorriefen.^[55,56]

Gräsl und *Böge* konnten keine Veränderung der B-DNA-Struktur durch den Einbau von C8-*N*-H- und C8-*N*-Acetyl-Arylamin-modifizierten Phosphoramiditen in Oligonucleotide beobachten. Im Vergleich zu unmodifizierten Sequenzen konnte den C8-*N*-H- und C8-*N*-Acetyl-modifizierten Duplexen jedoch eine destabilisierende Wirkung auf den Duplex-Stang durch Verringerung der Schmelztemperatur (T_m) nachgewiesen werden.^[42,43,50] Ein enzymatischer Abbau der modifizierten Duplexe zeigte, dass zwischen den *N*-H- und den Acetyl-Addukten Unterschiede in ihren biochemischen Eigenschaften liegen. Monocyclische *N*-H-Modifikationen führten zur Inaktivierung der Restriktionsendonuclease *EcoRI*, während monocyclische C8-*N*-Acetyl-modifizierten Oligonucleotide einen geringeren Einfluss hatten. In Primer-Verlängerungs-Studien zeigten sowohl die polycyclischen C8-*N*-H-Oligonucleotide als auch die polycyclischen C8-*N*-Acetyl-Oligonucleotide eine geringere Fehlereinbaurrate als die entsprechenden monocyclischen Duplexe.

Für C8-*N*-H- und C8-*N*-Acetyl-*N*-2-Fluorenyl-modifizierte DNA-Duplexe konnten *Jain et al.* anhand von Fluoreszenz-, CD- und NMR-Experimenten verschiedene Konformationen messen. Dabei bestimmt die Lage des Karzinogens die Strukturänderung innerhalb der DNA. Durch Wechselwirkungen mit benachbarten Basenpaaren ergibt sich ein Sequenz-abhängiges Gleichgewicht der unterschiedlichen DNA-Populationen.^[57] Für die *N*-H-Addukte wurde ein Gleichgewicht aus *anti* B- und *syn* S-förmiger DNA

gefunden. In der *anti*-B-DNA bleibt die natürliche Watson-Crick-Basenpaarung erhalten und der Fluorenyl-Ring ist außerhalb der Doppelhelix positioniert. Die S-förmige Struktur der DNA entsteht wenn der Fluorenyl-Ring in die Helix interkaliert.^[57] Das *N*-Acetyl-Addukt besitzt ebenfalls ein Gleichgewicht aus *anti* B- und *syn* S-förmiger DNA. Der B-Typ behält die Watson-Crick-Basenpaarung bei, während der S-Typ eine Hoogsteen-Basenpaarung mit Cytosin eingeht.^[58,59] Zusätzlich konnte für das *N*-Acetyl-Addukt ein *W*-Konformer (*wedge*) gefunden werden, welches durch *syn*-Konformation der *N*-glycosidischen Bindung und Hoogsteen-Basenpaarung beschrieben wird, jedoch mit einer erheblichen Verdrehung der Doppelhelix einhergeht.^[58] *Carell* gelang die Strukturaufklärung C8-Arylamin-modifizierter DNA im Komplex mit Polymerasen.^[60,61]

Der Einbau phosphorylierter C8-*N*-Arylamin-Modifikationen als potentielle Substrate für DNA-Polymerasen in einen unmodifizierten Templat-Strang wurde bisher nicht unternommen. Von C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosintriphosphaten sind weder die Strukturen noch die biologischen Auswirkungen bekannt. Ob sie durch Einbau von DNA-Polymerasen an der chemischen Karzinogenese beteiligt sind, ist noch nicht erforscht.

Die entsprechenden 5'-monophosphorylierten Verbindungen der Addukte konnten bereits von *Meier* charakterisiert werden.^[62,63] Im Vergleich zu den Nucleosid-Addukten **24** und **25** aus Abbildung 6 konnte für die C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphate eine Umkehr der Konformation von *anti* nach *syn* beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden sowohl anhand experimenteller NMR-Daten als auch durch Minimal-Potential-Energie-Berechnungen in der Gasphase bestätigt.^[62,63] Als Gründe für die ungewöhnliche *syn*-Konformation kommen sowohl sterische Hinderung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und dem Aryl-Rest als auch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoffatom der Phosphatgruppe und der exocyclischen Aminogruppe in Frage.

2.1.6 Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten

In zahlreichen biologischen Prozessen spielen (2'-Desoxy-) Nucleosid-5'-triphosphate ((d)NTPs) eine wichtige Rolle. Als Grundbausteine der DNA sind sie in der Nuclein-

säure-Synthese sowohl *in vivo* als auch *in vitro* essentiell. In Hinblick auf die Entwicklung funktionaler Nucleinsäuren und modifizierter Oligonucleotide trat auch die chemische Synthese von (d)NTPs in den Vordergrund.

Eines der ersten Verfahren zur Synthese von dNTPs war das in Abbildung 12 dargestellte von *Yoshikawa*.^[64,65] Hierbei wird das Nucleosid **38** mit Phosphorylchlorid zum hochreaktiven Phosphordichloridat **39** umgesetzt. Durch Reaktion mit Bis-(tri-*n*-butylammonium)-pyrophosphat wird ein cyclisches Intermediat **40** gebildet, das schließlich zum (d)NTP **41** hydrolysiert wird.

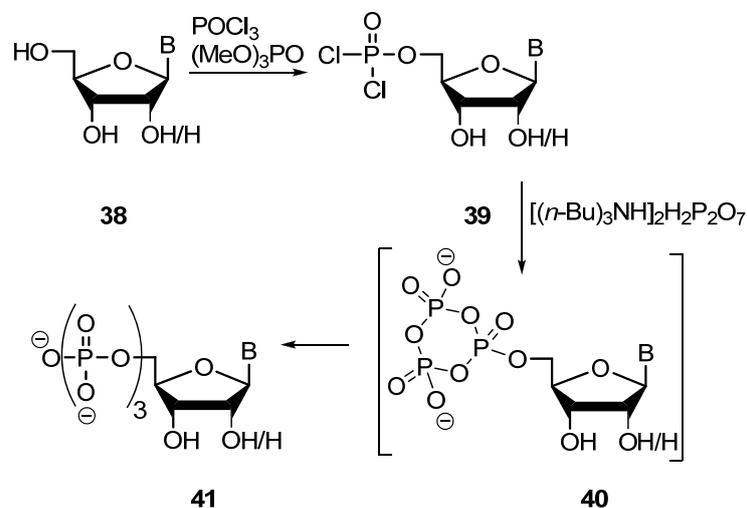


Abbildung 12: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach *Yoshikawa*

Aufgrund des hochreaktiven Phosphorreagenzes kann es aber zur Bildung von Nebenprodukten kommen. Der Ansatz von *Ludwig* und *Eckstein* in Abbildung 13 umgeht diese Problematik durch Verwendung eines weniger reaktiven Salicylphosphorchloridits **42**.^[66]

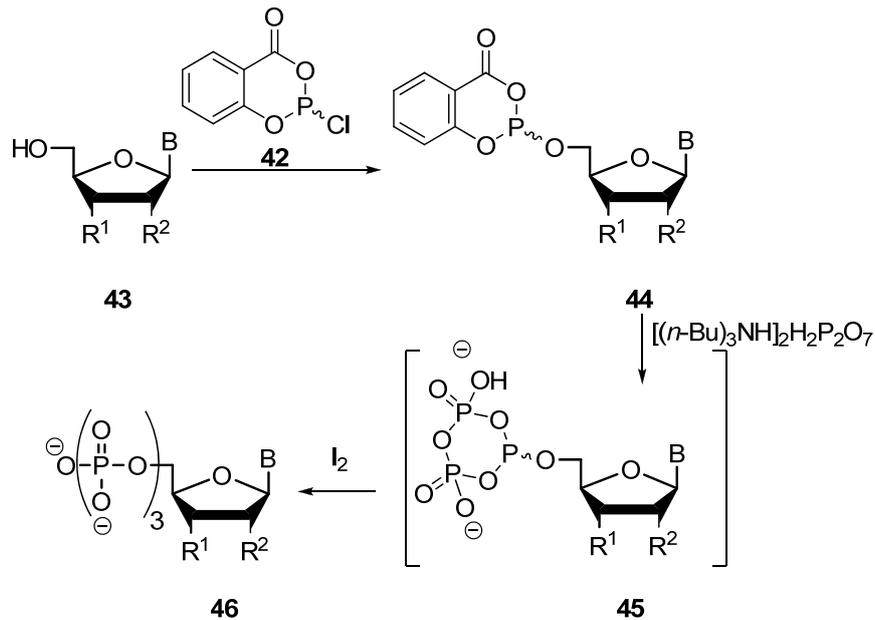


Abbildung 13: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach Ludwig und Eckstein

Der geschützte Nucleosidbaustein **43** macht die selektive Reaktion an der 5'-Hydroxy-Position zum Phosphit **44** möglich. Zweifache nucleophile Substitution des aktivierten Bausteins mit Pyrophosphat führt zu einem cyclischen Intermediat **45** unter Abspaltung von Salicylsäure. Durch anschließende Oxidation und Hydrolyse wird das gewünschte (d)NTP **46** erhalten. Das Ludwig-Eckstein-Protokoll ist auch als *one-pot, three-steps* Methode bekannt und auf modifizierte Nucleoside anwendbar, aber zeitlich aufwändig.

Die in Abbildung 14 dargestellte Synthesestrategie nach Ott und Hoard verwendet als aktivierte NMPs Imidazolate. Durch Reaktion aus Carbonyldiimidazol **47** mit (d)NMP **48** entsteht das Amidat **49**. Die Umsetzung mit Pyrophosphat liefert das (d)NTP **50** in moderaten Ausbeuten.^[67]

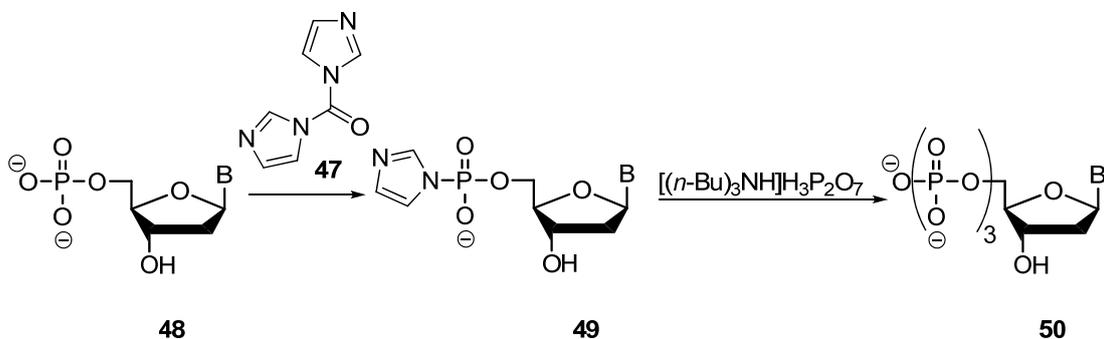


Abbildung 14: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach Ott und Hoard

Bei der Morpholidat-Methode in Abbildung 15 von Moffat und Khorana wird das NMP zur Aktivierung ebenfalls in ein Amidat überführt. Das Morpholidat **51** wird mit Pyrophosphat zum NTP **41** umgesetzt.

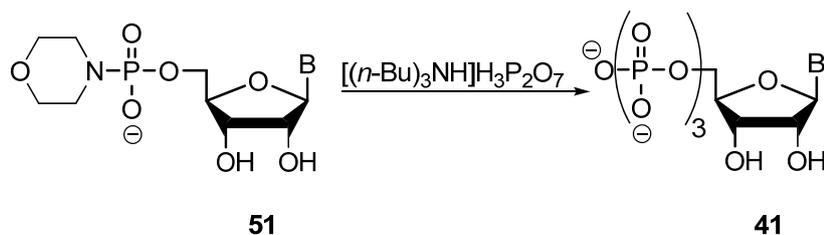


Abbildung 15: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach der Morpholidat-Methode

Von Vorteil ist, dass die Morpholidat-Methode ohne Schutzgruppenstrategie auskommt und sich auch auf die Synthese von Zuckernucleotiden anwenden lässt.^[68,69] Allerdings ist zuvor die Synthese des Monophosphats nötig und die Reaktionszeiten sind relativ lang.

Bei der von *Sun* entwickelten Synthesestrategie in Abbildung 16 werden H-Phosphonate verwendet. Die Aktivierung des 5'-H-Phosphonats **52** erfolgt durch Trimethylsilylchlorid (TMSCl) in Gegenwart von Pyridin. Anschließende Oxidation mit Iod liefert das elektrophile Intermediat **53**. Durch Umsetzung mit Pyrophosphat wird das gewünschte (d)NTP **41** erhalten. Zwar handelt es sich um eine *one-pot* Reaktion, trotzdem ist eine mehrstufige Synthese des H-Phosphonats **52** nötig und die Ausbeuten des dNTPs sind moderat.^[70]

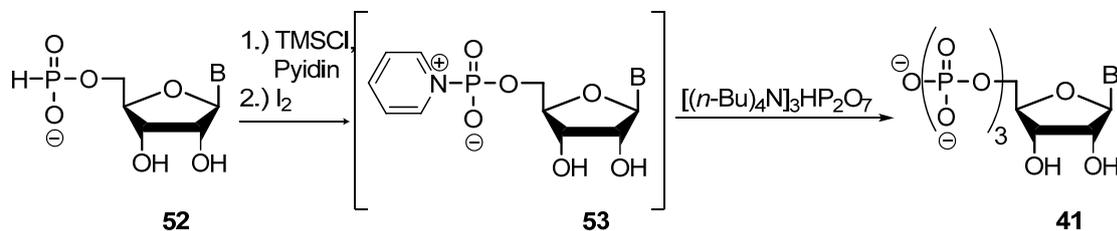
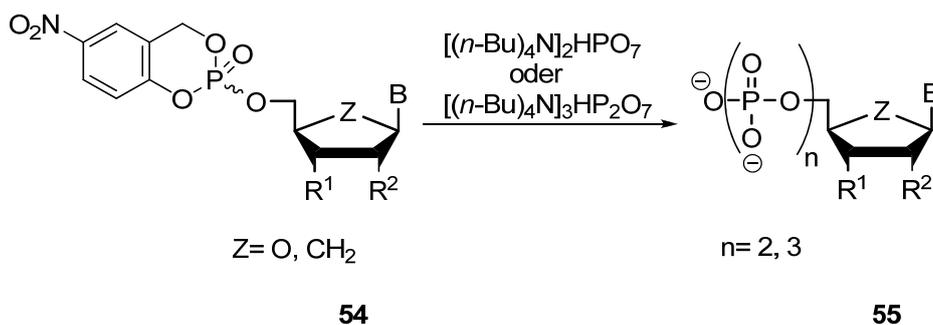


Abbildung 16: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach der H-Phosphonat-Methode

Durch Verwendung aktivierter *cycloSal*-NMPs gelang *Warnecke* die Darstellung eines breiten Spektrums an modifizierten (d)NTPs in guten Ausbeuten.^[71] Im Vergleich zu vorherigen Strategien kann das Nucleosid-5'-Triphosphat mit dem von *Meier et al.* entwickelten *cycloSal*-Konzept in kürzeren Reaktionszeiten und Reinigungsschritten erhalten werden.^[72,73] Das reaktive 5-Nitro-*cycloSal*-NMP **54** in Abbildung 17 wird mit dem entsprechenden Nucleophil zum gewünschten Produkt **55** umgesetzt.

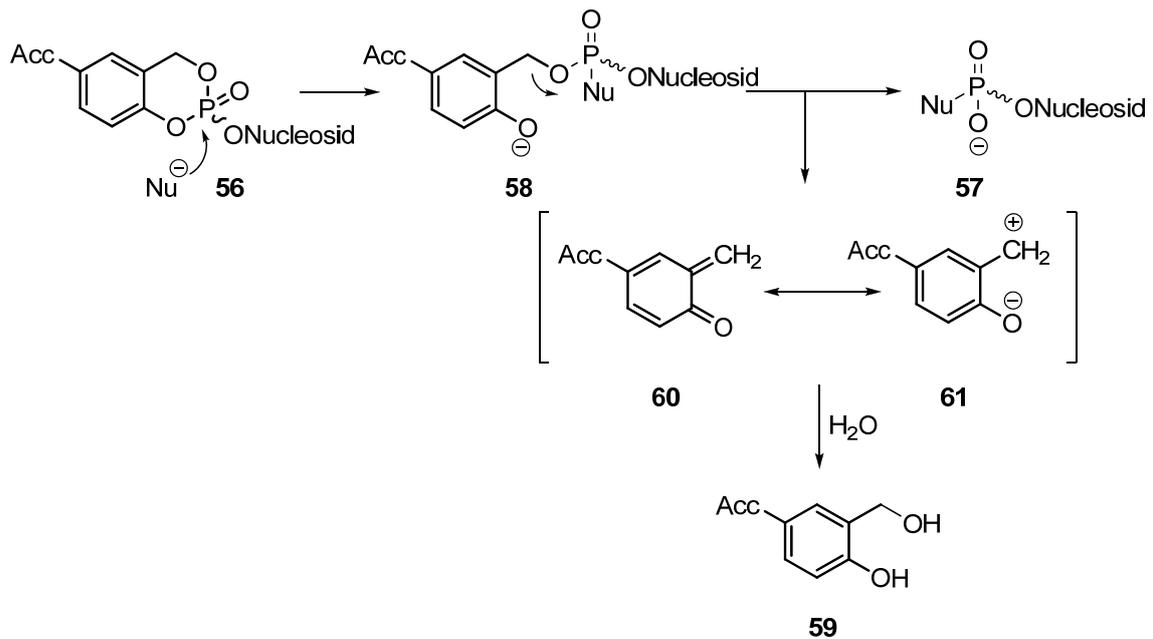
Abbildung 17: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten nach dem *cycloSal*-Konzept

Neben den natürlichen Nucleosid-5'-di- und triphosphaten konnten auf diesem Syntheseweg bereits verschiedene Nucleosidanaloga, Dinucleosid-Polyphosphate und phosphatverbrückte Zuckernucleotide in sehr guten Ausbeuten dargestellt werden.^[74,71,75] Die Vielfältigkeit des *cycloSal*-Konzepts zeigt sich in dessen Übertragung auf die Festphasensynthese zur Darstellung phosphorylierter Biokonjugate und Oligonucleotid-Triphosphaten.^[76,77] Aufgrund der kurzen Reaktionszeiten, guten Ausbeuten und ihrer Anwendbarkeit auf Nucleosidanaloga wurde diese Synthesestrategie für die Darstellung der C8-*N*-Arylamin-modifizierten 5'-Triphosphate ausgewählt.

Das *cycloSal*-Konzept

Die von *Meier* entwickelte *cycloSal*-Methode diente ursprünglich als Prodrug-Konzept.^[70,71] Das Prinzip beruht auf einem spontanen kaskadenartigen Hydrolysemechanismus, der eine nicht-enzymatisch induzierte Wirkstofffreisetzung ermöglicht. Aufgrund der Differenzierbarkeit der Phosphatesterbindungen des *cycloSal*-Triesters **56** kann die Hydrolyse zum NMP **57** gezielt durch Substituenteneffekte beeinflusst werden. Donorsubstituenten in den Position 3 und 5 erhöhen die Stabilität, während Acceptorsubstituenten in der Position 5 die Hydrolyse beschleunigen.^[78]

Nach dem Angriff eines Nucleophils (Nu) wie in Abbildung 18 dargestellt, wird durch Mesomeriestabilisierung über das aromatische System bevorzugt die phenylische Phosphatesterbindung gespalten, wodurch es zu der Bildung des Benzylphosphatdiesters **58** kommt. Resultierend aus einem spontanen Bruch der Benzyl-Phosphatesterbindung, werden unter Wasserabspaltung das NMP **57**, sowie der Salicylalkohol **59** freigesetzt.^[72,73]

Abbildung 18: Hydrolysemechanismus nach dem *cycloSal*-Konzept

2.1.7 DNA-Polymerasen

In Hinblick auf ihr karzinogenes Potential sollte nach erfolgreicher Synthese der C8-*N*-Arylamin-modifizierten 5'-Triphosphate deren biochemische Charakterisierung durch Einbau von DNA-Polymerasen in unmodifizierte Oligonucleotide erfolgen.

In vivo katalysieren DNA-abhängige DNA-Polymerasen die Übertragung genetischer Information während der Replikation auf Tochterzellen. An beiden Teilsträngen des ursprünglichen Doppelstrangs werden zeitgleich zwei komplementäre Stränge synthetisiert. Gemäß der doppelhelikalen Struktur der DNA und der 5'-3'-Syntheserichtung der Polymerasen wird ein bidirektionales semidiskontinuierliches Synthese-Prinzip verfolgt.^[79]

Als charakteristisches Merkmal für fast alle DNA-Polymerasen stellte sich die hochkonservierte Domäne des katalytischen Zentrums heraus.^[80,81] Der Strukturaufbau wird mit einer geöffneten rechten Hand verglichen, bei dem Finger, Handfläche und Daumen aus verschiedenen Subdomänen gebildet werden.^[82,83] Die Finger-Domäne ist für die Substraterkennung und Bindung zuständig, während die Daumen-Subdomäne an den Templatstrang bindet. Die Handflächen-Domäne koordiniert an zwei bivalente Kationen, die der Polymerase als Kofaktoren dienen.^[84] Die Substratspezifität der Polymerasen wird durch das *induced fit* Model beschrieben.^[85] Nach der Koordination des richtigen Nucleotids erfährt das Enzym eine Konformationsänderung an der

Finger- und Daumen-Domäne, sodass eine räumliche Nähe zwischen der freien 3'-Hydroxygruppe des letzten Nucleotids und der α -Phosphatgruppe des einzubauenden dNTPs entsteht, die zeitgleich an einem der Kationen koordiniert sind. Das Kation koordiniert dabei die Ladungen der β - und γ -Phosphatgruppe. Die Konformationsänderung erlaubt einen nucleophilen Angriff der endständigen 3'-Hydroxygruppe auf das α -Phosphat, sodass Pyrophosphat abgespalten wird.^[84] Durch Translokation kann die Polymerase entweder das nächste dNTP einbauen oder nach Termination von dem Templatestrang dissoziieren. Die Prozessivität einer Polymerase kann dabei unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Die durchschnittliche Fehlerrate liegt bei 10^{-5} bis 10^{-4} Mutationen pro vervielfältigtem Basenpaar (bp).^[86,87]

Einige DNA-Polymerasen zeichnen sich jedoch durch ihre Multifunktionalität aus, indem sie Korrekturlesefunktionen (*proof reading*) ausüben. Dabei wird zwischen zwei verschiedenen Exonucleasenfunktionen und einer Endonucleasenfunktion unterschieden. Exonucleasen katalysieren die Hydrolyse endständiger Nucleotide. Erfolgt die Spaltung der Phosphordiesterbindungen aus der Richtung des 3'-Terminus spricht man von einer 3'-5'-Exonucleasenfunktion. Durch Vorhandensein einer 3'-5'-Exonucleasenfunktion kann die Fehlerrate einer Polymerase um weitere 10^{-2} - 10^{-3} Mutationen pro vervielfältigtem Basenpaar verringert sein.^[87] Bei der Hydrolyse des endständigen Nucleotids aus Richtung des 5'-Terminus handelt es sich um eine 5'-3'-Exonucleasenfunktion. Darüber hinaus ist die Korrektur eines nicht komplementären Nucleotids innerhalb eines bereits synthetisierten Strangs durch die 5'-3'-Endonucleasenfunktion und damit Hydrolyse einer internen Phosphordiesterbindung möglich.

Die Klassifizierung der DNA-Polymerasen erfolgt an Hand von Sequenz- und Struktur-Homologien. Die DNA-Polymerasen zellulärer Lebewesen werden aktuell in die sieben Familien A, B, C, D, X, Y und RT unterschieden.^[88] Darunter sind derzeit 15 humane DNA-Polymerasen bekannt.^[89] Davon sind die wichtigsten die mitochondriale Reparatur-Polymerase γ aus Familie A, die replikativen Polymerasen α , δ , ϵ aus Familie B sowie die zelluläre Reparatur-Polymerase β aus Familie X. Letztere ist von besonderem Interesse, da die Überexpression und Mutation des Pol β Gens eng in Verbindung mit der Entstehung einiger Krebsarten steht.^[90,91]

2.1.8 G-Quadruplexe

Guaninreiche Nucleinsäuren können Strukturen höherer Ordnung, sogenannte G-Quadruplexe, ausbilden, wie in Abbildung 19 dargestellt ist.^[92] Diese Sekundärstrukturen bestehen aus gestapelten Schichten von G-Quartetts bzw. G-Tetraden, die durch T-Schleifen unterbrochen werden. Die Quadruplex-Struktur entsteht durch π - π -Wechselwirkungen zwischen den G-Tetraden. Eine Strukturebene wird aus vier Guaninen gebildet, die durch Hoogsteen-Basenpaarung und einem monovalenten Kation im Zentrum stabilisiert werden.

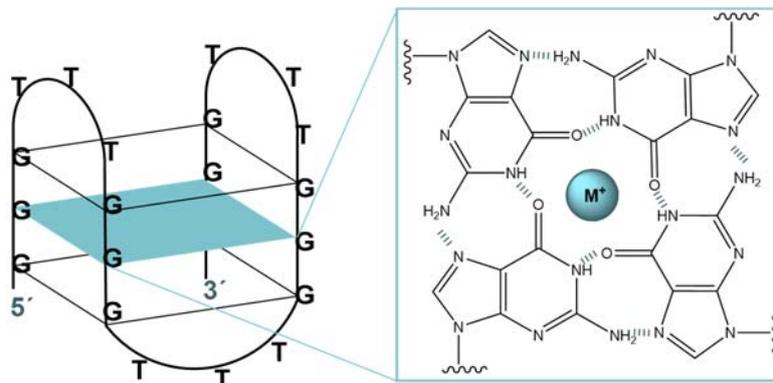


Abbildung 19: Beispiel eines G-Quadruplex mit Hoogsteen-Basenpaarung und monovalentem Kation

In G-Quadruplexen kommt sowohl die *syn*- als auch die *anti*-Konformation der *N*-glycosidischen Bindung vor. Die Konformation zwischen Guanin und Zuckereinheit bestimmt die verschiedenen Topologien der Quadruplexe. Die Molekularität sowie die Ausrichtung der Einzelstränge können dabei variieren, sodass in parallele oder antiparallele Strangpolaritäten unterschieden wird. Während in Strängen mit paralleler Strangpolarität alle Guanine *anti*-Konformation besitzen, können antiparallele Stränge beide Konformationen beinhalten. Es sind sowohl inter- als auch intra-molekulare Strukturen möglich. Aus der Kombination der unterschiedlichen Eigenschaften ergibt sich die hohe Vielfalt der Quadruplex-Topologie.

Sowohl die exakten Sequenzen zur Ausbildung von G-Quadruplexen als auch deren biologische Funktion sind bis heute noch wenig erforscht. Die Ausbildung von Quadruplexen konnte jedoch in Telomeren von eukaryotischen Chromosomen beobachtet werden.^[93] Die Teleomere befinden sich am Ende der Chromosomen und zeichnen sich durch repetitive DNA-Sequenzen mit Längen von bis zu 10 kb (Kilobasen) aus, in denen überwiegend die Nucleobasen Thymin und Guanin vertreten sind. Bei der Zellteilung wird das Telomer verkürzt, da der DNA-Polymerase am Ende des

Chromosoms keine Synthese ohne RNA-Primer möglich ist. Unterschreitet das Telomer eine Länge von 4-5 kb, wird die Zelle durch den Übergang in einen Ruhemodus (Seneszenz) oder durch den programmierten Zelltod (Apoptose) an der weiteren Zellteilung gehindert. Das Telomer schützt so zunächst die Zelle vor dem Verlust genetischer Information und begrenzt gleichzeitig die Anzahl der Zellteilungen (Hayflick-Grenze), um Mutationen im Genom oder Entartungen der Zellen vorzubeugen. Diese Funktionen ergeben sich aus den Thymin- und Guanin-reichen Sequenzen, die eine Sekundärstruktur in Form von Quadruplexen bilden. In den somatischen Zellen verhindern die Quadruplexe die Wiederherstellung der Telomere durch die körpereigene Telomerase, sodass die Hayflick-Grenze eingehalten wird. Bei entarteten Zellen bleibt die Fähigkeit zur Zellteilung durch eine gesteigerte Telomeraseaktivität erhalten, weshalb G-Quadruplexe innerhalb der Krebsforschung von Interesse sind.^[94]

Daneben konnten verschiedene Quadruplex-Sequenzen an Genen und deren Promotorregionen nachgewiesen werden, weshalb ihnen eine regulative Funktion der Genaktivität zugeschrieben wird.

Modifikationen der G-Quadruplexe am Phosphatrückgrat oder der Guaninbase könnten deren Stabilität erhöhen oder neue Funktionalitäten einbringen. Von besonderem Interesse sind dabei Quadruplexe, die an der Position 8 des Guanins eine Modifikation tragen.^[95] Bei diesen Quadruplex-Strukturen konnte eine *syn*-Konformation der glycosidischen Bindung beobachtet werden. Gleichzeitig ist eine Störung der Hoogsteen-Basenpaarung innerhalb der Tetraden ausgeschlossen, da die Modifikation an dieser Position in die Furche der Quadruplex-Struktur hineinzeigt. Die Umwandlung der glycosidischen Bindung durch Modifikation, könnte so eine gezielte Änderung der Quadruplex-Topologie bewirken. Die durch Arylamin-modifizierte Quadruplexe hervorgerufene Konformationsänderung könnte so eine Differenzierung der Quadruplex-Typen ermöglichen.

2.2 C-Nucleosid-Modifikationen

Nachdem die C8-*N*-Arylamin-Modifikationen zum Verständnis des ersten Abschnitts dieser Arbeit im vorangegangenen Kapitel hinreichend dargelegt wurden, befasst sich dieses Kapitel analog mit den für den zweiten Abschnitt notwendigen Grundlagen. Die

C-Nucleosid-Modifikationen werden künstlich an der Verknüpfungseinheit zwischen Heterocyclus und Riboseinheit erzeugt.

2.2.1 C-Nucleoside

Neben Variationen am Heterocyclus und der Zuckereinheit wächst zunehmend das Interesse an Nucleosid-Analoga, die eine Modifikation an der Verknüpfung zwischen beiden Einheiten tragen. Diese Verbindungen zeichnen sich im Gegensatz zu *N*-Nucleosiden durch eine C1'-C-Bindung an Stelle der glycosidischen Bindung aus. Bei den C-Nucleosiden liegt daher kein Acetal vor, sondern die Nucleobase ist über eine (Homo-C-Nucleosid) oder mehrere Kohlenstoffeinheiten (Spacer-C-Nucleosid) an das Kohlenhydratgrundgerüst gebunden. Der Verlust der *N*-glycosidischen Bindung sowie des anomeren Zentrums verleiht C-Nucleosiden zwei besondere Eigenschaften:

- Zum einen besitzen sie eine hohe konformative Flexibilität und Rotationsfreiheit um die C-C-Bindungsachse.
- Zum anderen macht die fehlende Acetalbindung C-Nucleoside stabiler gegen hydrolytische und enzymatische Spaltung.

Der Begriff C-Nucleosid ist daher im chemischen Sinne nicht korrekt, hat sich in der Literatur jedoch etabliert. Natürlich vorkommende C-Nucleoside besitzen eine breite Vielfalt in Struktur und Funktion. Das Pseudouridin **62** aus Abbildung 20 gilt als häufigster nativer Vertreter der C-Nucleoside.^[96] Innerhalb der Transfer-Ribonucleinsäure (*transfer-ribonucleic acid*, t-RNA) ist es an der Stabilisierung des RNA-Duplexes beteiligt und für die Effizienz der Translation verantwortlich.^[97] Ein weiteres C-Nucleosid, welches strukturell mit Uridin verwandt ist, ist das Showdomycin **63**. Es konnte aus *Streptomyces showdoensis* isoliert werden und besitzt antibiotische Wirkung.

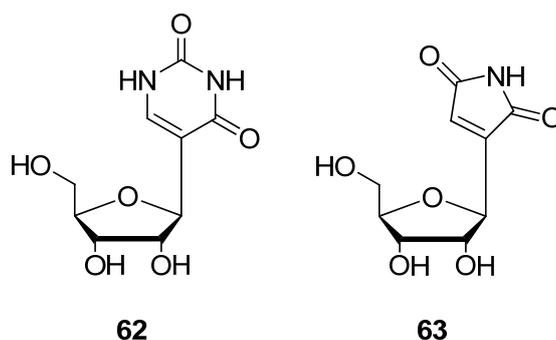


Abbildung 20: Beispiele natürlicher C-Nucleoside

Die pharmazeutische Verwendung von C-Nucleosiden verfolgt verschiedene Ansätze. Viele Verbindungen weisen anti-bakterielle, -virale oder -Krebs Eigenschaften auf, was eine Anwendung während der Transkription als Nucleosid-Analogon möglich macht. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften könnten Nachteile bisheriger Nucleosid-Analoga, wie toxische Nebenwirkungen oder schneller Metabolismus, umgangen werden.^[98] Kürzlich konnten mehrere C-Nucleosid-Analoga des Adenosins synthetisiert werden (Abbildung 21), die Aktivität gegen eine Reihe von RNA-Viren zeigten.^[99,100]

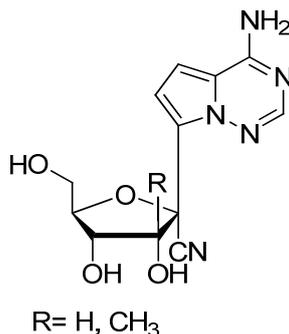


Abbildung 21: Beispiele für C-Nucleosid-Analoga des Adenosins

Der Einbau von C-Nucleosiden in Oligonucleotide, eröffnet weitere vielfältige Möglichkeiten zur medizinischen Anwendung. In Markierungsexperimenten werden oft lipophile aromatische Kohlenwasserstoffe als Fluorophore benötigt, die unter physiologischen Bedingungen angewendet werden müssen. In Form von Oligomeren, bei denen eine Nucleobase durch den Fluorophor ersetzt ist, können diese technischen Probleme umgangen werden.^[101]

2.2.2 Antisense-Therapie

In der Gentherapie sind Oligonucleotide, die mit C-Nucleosiden modifiziert wurden von steigendem Interesse. Dort könnten u.a. Triplex-bildende Oligonucleotide (Triplex-forming Oligonucleotides, TFOs) an doppelsträngige DNA (dsDNA) binden und Gene gezielt ausschalten oder deren Expression stimulieren. Der physiologische pH-Wert der Zelle verhinderte jedoch die für die Stabilität der Triplexe notwendige Ausbildung von Hoogsteen-Wasserstoffbrücken. Durch den Einbau modifizierter C-Nucleoside in TFOs war es möglich die physikalisch-chemischen Eigenschaften so zu ändern, dass bereits bei neutralem pH-Wert die Ausbildung von Hoogsteen-Basenpaaren möglich war und die thermische Stabilität der TFOs deutlich erhöht wurde.^[102]

In der Antisense-Therapie bindet DNA (Antisense-Oligonucleotid) komplementär an mRNA (Sense-Oligonucleotid) und blockiert deren Translation während der Proteinbiosynthese (Abbildung 22). So kann die Expression pathogener Proteine spezifisch inhibiert werden. Dabei kann entweder die Anlagerung oder Funktion des Ribosoms während der Translation unterbunden werden oder der Abbau des DNA-RNA-Hybrids durch RNase H stimuliert werden.^[103]

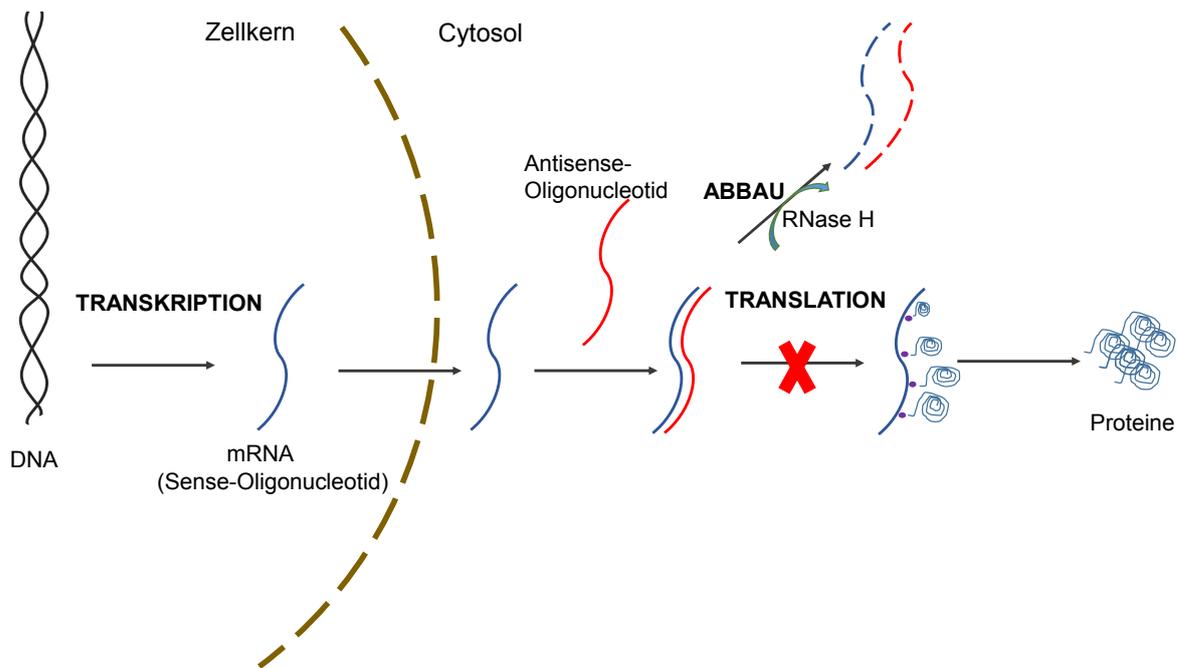


Abbildung 22: Prinzip der Antisense-Therapie

C-Nucleosid-modifizierte Oligonucleotide sollen auch hier die Biostabilität erhöhen, die zelluläre Aufnahme erleichtern und die Affinität des Antisense-Oligonucleotids zum komplementären RNA-Strang erhöhen.^[104]

In diesem Hinblick waren verschiedene C-Nucleosid-Phosphoramidite mit konformativer Flexibilität um die C-C-Bindungsachse in Kooperation mit Prof. C. Vogel der Universität Rostock von Interesse. Durch den Einbau in die DNA und die Hybridisierung der modifizierten DNA-Stränge mit komplementärer DNA sowie RNA, sollten im Rahmen dieser Arbeit die neuartigen Duplexe auf ihre strukturellen und biochemischen Eigenschaften untersucht werden.

2.2.3 Synthese von Oligonucleotiden

Als Oligonucleotid-Synthese wird die gezielte Darstellung von kürzeren Nucleinsäuren im Labormaßstab bezeichnet. Während die labortechnische Synthese üblicherweise

von 3'- in 5'-Richtung erfolgt, beruht die natürliche DNA-Synthese auf Triphosphaten in die entgegengesetzte 5'-3'-Richtung. Formal handelt es sich dabei um eine Kondensationsreaktion zwischen dem 5'-Phosphatende und der 3'-Hydroxygruppe. Die chemische Synthese erfolgt automatisiert an einer Festphase und bedarf der Verwendung einer geeigneten Schutzgruppenstrategie.

Die ersten literaturbekannten Synthesemethoden waren die Phosphortriester-Methode und die H-Phosponat-Methode.^[105,106] Während die H-Phosponat-Methode ohne Schutzgruppen auskam, konnte die Phosphortriester-Methode erstmals automatisiert durchgeführt werden. Lange Kupplungszeiten der Phosphor(V)-triestere minderten jedoch die Kupplungseffizienz und führten zur Entwicklung reaktiverer Phosphor(III)-Verbindungen. Allerdings wiesen die verwendeten Chlorphosphite eine hohe Hydrolyseempfindlichkeit auf, was ihre standardisierte Verwendung erschwerte. Erst die Einführung eines Amins statt eines Chlorids als Austrittsgruppe ermöglichte eine zeitnahe Aktivierung durch Zugabe von schwacher Säure.^[107,108] Die Phosphoramidit-Methode ist heute in der automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden etabliert.

Der Synthesecyclus wird an *controlled pore glass* (CPG) oder Polystyrol (PS) in Verbindung mit Divinylbenzol durchgeführt. Die Festphase ist in der Regel über einen LCAA-Succinyllinker (*long chain alkyl amine*) an das erste Nucleosid gebunden. Die Reaktion an der Festphase bietet den Vorteil, dass die Synthese automatisiert stattfinden kann. Die Reagenzien können im Überschuss eingesetzt werden, da nach der Reaktion die unverbrauchten Chemikalien durch Waschschrte einfach entfernt werden können. Dies führt zu höheren Ausbeuten und besseren Kupplungseffizienzen. Der Synthesecyclus ist in Abbildung 23 dargestellt. Jeder Kreislauf beginnt mit der Detritylierung. Durch Zugabe von Dichlor- oder Trichloressigsäure wird die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMTr) der 5'-Hydroxygruppe des wachsenden DNA-Polymers abgespalten. Das β -Cyanoethyl-geschützte Phosphoramidit wird in Gegenwart von 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) oder 1-*H*-Tetrazol aktiviert und im Kupplungsschritt zur Reaktion mit der freien 5'-Hydroxygruppe des Nucleosids gebracht. Durch Zugabe von wässriger Iodlösung erfolgt die Oxidation des Phosphittriesters zum Phosphattriester. Um Fehlsequenzen zu verhindern, werden im Capping-Schritt nicht verlängerte DNA-Stränge durch Überführung in ihre 5'-Ester am weiteren Synthesekreislauf gehindert. Der Synthesekreislauf kann beliebig oft für das wachsende Oligonucleotid wiederholt werden. Die Abspaltung des fertigen Oligonucleotids von der Festphase erfolgt mit

basischer Lösung. Zeitgleich werden auch die basenlabilen β -Cyanoethyl- und die Schutzgruppen der Nucleobasen entfernt.

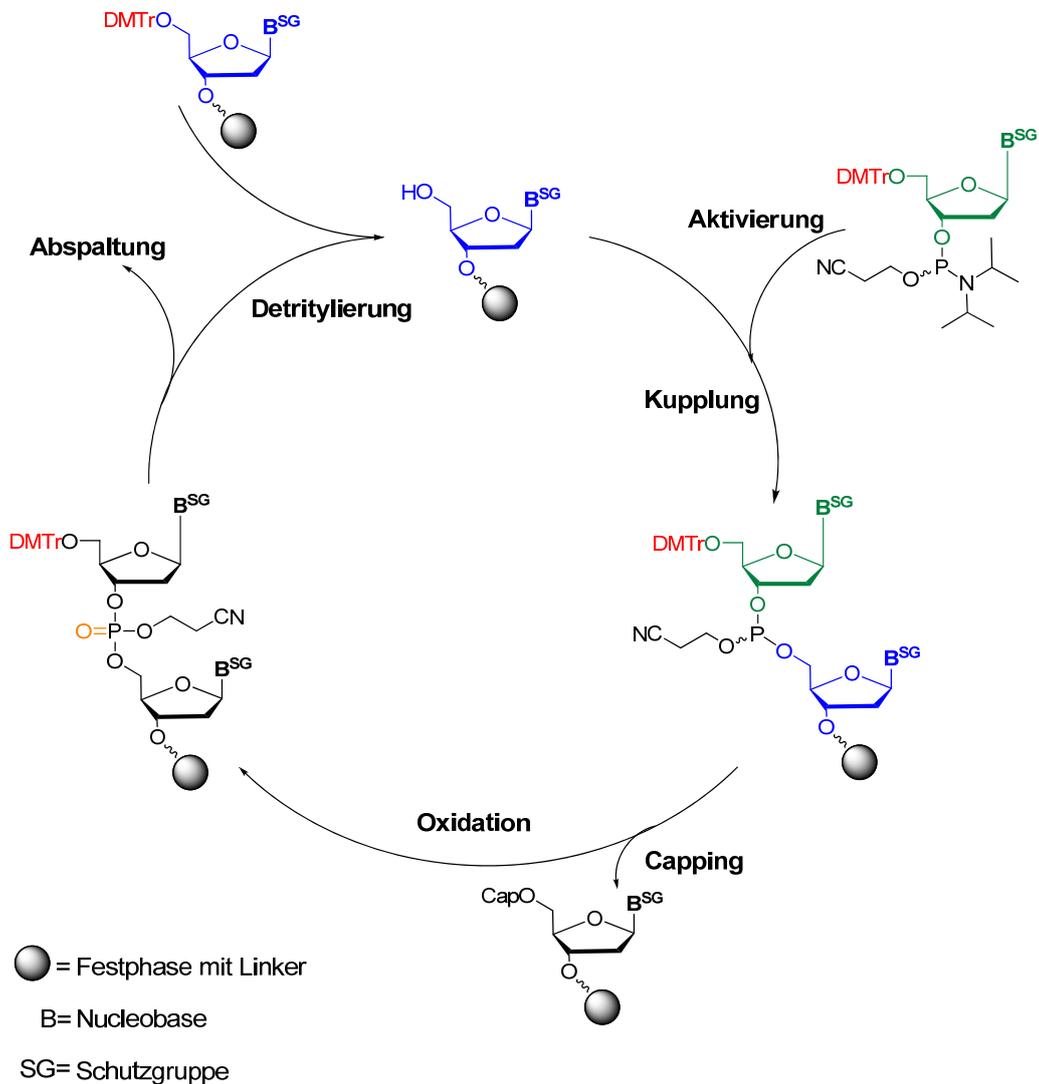


Abbildung 23: Automatisierter Synthesekreislauf der Phosphoramidit-Methode

Den jeweiligen Synthesebedingungen werden Reagenzien, Schutzgruppen der Nucleobasen und Abspaltreagenzien angepasst. Bei der standardmäßigen DNA-Synthese werden als Schutzgruppen für 2'-dA die Benzoyl- (Bz), für 2'-dC Bz- oder Acetyl- und für 2'-dG *iso*-Butyryl- (*i*-Bu) oder Dimethylformamidin-Gruppen (dmf) verwendet. Die Ultramild Variante umfasst die Phenoxyacetyl- (PAC) für 2'-dA und für 2'-dG die *iso*Propyl-Phenoxyacetyl-gruppe (*i*Pr-PAC). In der Ribonucleinsäure-Synthese (RNA-Synthese) wird die *Tertiär*-Butyldimethylsilyl- (TBDMS)- oder die Thiomorpholin-4-carbothioat- (TC)-Variante verwendet. Routinemäßig erfolgt eine Reinigung der Oligonucleotide durch die HPLC (*High-performance liquid chromatography*) und deren Charakterisierung durch die MALDI-Massenspektrometrie (*Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionisation*).

3 Aufgabenstellung

Die Veränderung von DNA kann durch willkürliche Schädigungen oder gezielte Modifikation mittels einer Gentherapie erfolgen. In beiden Fällen ist es von Bedeutung, eine **strukturelle** und **biochemische Charakterisierung** vorzunehmen, um die Auswirkungen auf den Organismus abschätzen zu können.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit werden die durch willkürliche Schädigung entstandenen Auswirkungen von C8-*N*-Arylamin-Modifikationen auf DNA-Monomerbausteine untersucht. Hierfür erfolgt die erstmalige **Synthese** der monocyclischen **C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate** und **C8-*N*-*H*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate**.

Im zweiten Abschnitt werden Veränderungen innerhalb von DNA durch gezielte Modifikationen in Form von C-Nucleosiden betrachtet. Zu diesem Zweck wird erstmals die **Synthese** von **Homo-** und **Spacer-C-Nucleosid-modifizierter DNA** durchgeführt.

3.1 C8-Arylamin-Modifikationen

Die Exposition gegenüber von Arylaminen führt zu einer Schädigung von DNA, die zu der Entstehung von Krebs führen kann.^[3,4] Dieser Typ Modifikation ist kovalent an die Position C8 der Nucleobase Guanin gebunden und kommt sowohl in seiner nicht-acetylierten als auch seiner acetylierten Form vor. Das unterschiedliche kanzerogene Potential beider Formen wird auf die unterschiedlichen Strukturen bzw. Konformationen der *N*-glycosidischen Bindung zurückgeführt, die sich während der Replikation auf die DNA-Polymerasen auswirken.^[5-7] Während die strukturellen und biochemischen Auswirkungen von C8-*N*-Arylamin-Modifikationen auf DNA-Polymere gut erforscht sind, ist ihr Einfluss auf die DNA-Monomerbausteine, die Nucleosid-5'-triphosphate, unbekannt.

Ziel des ersten Abschnitts ist daher die Synthese der in Abbildung 24 gezeigten monocyclischen C8-*N*-**Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin- 64** und C8-*N*-***H*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate 65**, sowie deren vergleichende strukturelle und biochemische Charakterisierung. Die Vorgehensweise wird im Folgenden erläutert:

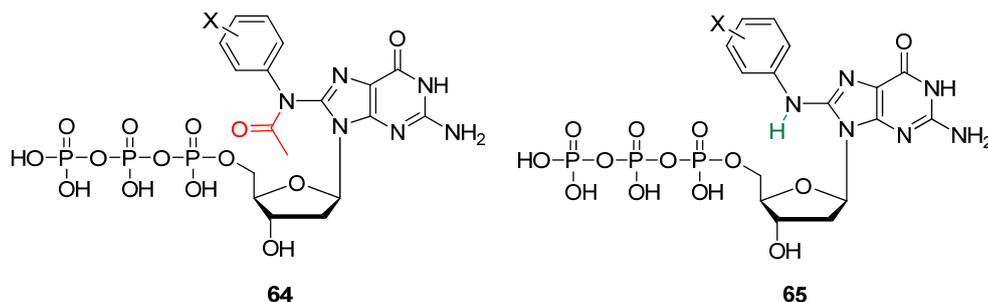


Abbildung 24: Chemische Struktur der C8-Arylamin-modifizierten 2'-dG-5'-triphosphate

Die strukturelle Charakterisierung der Verbindungen **64** und **65** erfolgt durch theoretische und experimentelle Konformationsanalysen in Form von **thermodynamischen Berechnungen** und **NOE-spektroskopischen Untersuchungen**.

Mittels **Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)** und **Primer-Verlängerungs-Studien** wird die biochemische Charakterisierung der C8-*N*-Arylamin-modifizierten 5'-Triphosphate **64** und **65** durchgeführt. Durch PCR kann eine zielgerichtete *in vitro* Synthese C8-*N*-Arylamin-modifizierter DNA unter Verwendung der Triphosphate möglich sein. Statt einer Synthese am DNA-Synthesizer könnten *in vitro* zeitgleich mehr und längere Konstrukte zu Forschungszwecken hergestellt werden. Die Verwendung dieser modifizierten Syntheseprodukte ist zwar für den Organismus irrelevant, jedoch in größeren Mengen für die medizinische Forschung von Interesse. In Primer-Verlängerungs-Studien wird der Einfluss der zuvor ermittelten Konformationen beider Modifikationstypen auf DNA-Polymerasen betrachtet. Hierbei werden die Fragestellungen beantwortet, ob die C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **64** und **65** überhaupt Substrate der DNA-Polymerasen darstellen und ob zwischen beiden Modifikations-Typen bzw. den aromatischen Substitutionsmustern Unterschiede bestehen. Die Ergebnisse ermöglichen eine Aussage über die biologische Relevanz bei der durch Arylamine verursachten Entstehung von Krebs.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.-L. Mergny (Universität Bordeaux) wird innerhalb eines Teilabschnitts der Arbeit zusätzlich die Fähigkeit C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierter DNA zur **Ausbildung von G-Quadruplexen** untersucht. Da C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierte DNA die *syn*-Konformation der glycosidischen Bindung einnimmt, kann durch gezielte Modifikation, die Quadruplex-Topologie verändert werden. Die durch Arylamin-modifizierte

Quadruplexe hervorgerufene Konformationsänderung könnte so eine Differenzierung der Quadruplex-Typen ermöglichen.

3.2 C-Nucleosid-Modifikationen

In diesem Abschnitt der Arbeit werden gezielte Veränderungen in Form von C-Nucleosid-Modifikationen in DNA eingeführt. Dieser Modifikationstyp ist durch mindestens ein weiteres Kohlenstoffatom zwischen der Desoxyribose und dem Heterocyclus geprägt. In der Antisense-Therapie wird C-Nucleosid-modifizierte DNA benötigt, um eine Stabilitätssteigerung von DNA gegenüber enzymatischer Hydrolyse und Erhöhung ihrer thermischen Stabilität bzw. Affinität gegenüber pathogener RNA zu erreichen. Langfristig könnte so die Expression krankhafter Gene inhibiert werden. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Vogel (Universität Rostock) stellte hierfür ein Homo- und ein Spacer-C-Nucleosid-Phosphoramiditderivat zur Verfügung.^[109,110]

Zielsetzung des zweiten Abschnittes dieser Arbeit ist die zielgerichtete Synthese von Homo- und Spacer-C-Nucleosid-modifizierter DNA (Abbildung 25). Nach der Hybridisierung der modifizierten DNA mit verschiedenen RNA- und DNA-Oligonucleotiden, erfolgt deren strukturelle Charakterisierung durch Messung ihrer thermischen Stabilität durch **Schmelzpunktbestimmung**, die Bestimmung ihrer Konformation durch **Circulardichroismus**, **Molecular Dynamics-Simulationen** und **Röntgenstrukturanalyse**. Die biochemische Charakterisierung der C-Nucleosid-modifizierten DNA erfolgt durch **Restriktionsabbau**, indem die Stabilität der modifizierten Hybride gegenüber enzymatischer Hydrolyse untersucht wird.

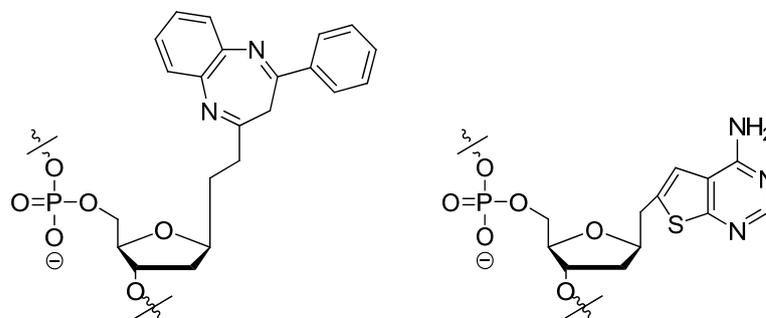


Abbildung 25: C-Nucleosid-modifizierte DNA

4 Resultate und Diskussion

Der bisherigen Systematik folgend wird auch die Darstellung der Resultate in die zwei Modifikationstypen unterteilt.

4.1 C8-Arylamin-Modifikationen

Um die C8-*N*-Arylamin-Modifikationen strukturell und biochemisch charakterisieren zu können, war es notwendig die Verbindungen zunächst zu synthetisieren. Hierzu wurde das Formamidin-geschützte 2'-Desoxyguanosin-Addukt **66** nach Böge synthetisiert (Kapitel 4.1.1), welches als Schlüsselverbindung (s. Abbildung 26) sowohl die Synthese der C8-*N*-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate (Kapitel 4.1.2.2) als auch des Phosphoramidits **37** (Kapitel 4.1.5) zur Oligonucleotid-Synthese der C8-*N*-Arylamin-modifizierten Quadruplexe ermöglichen sollte.

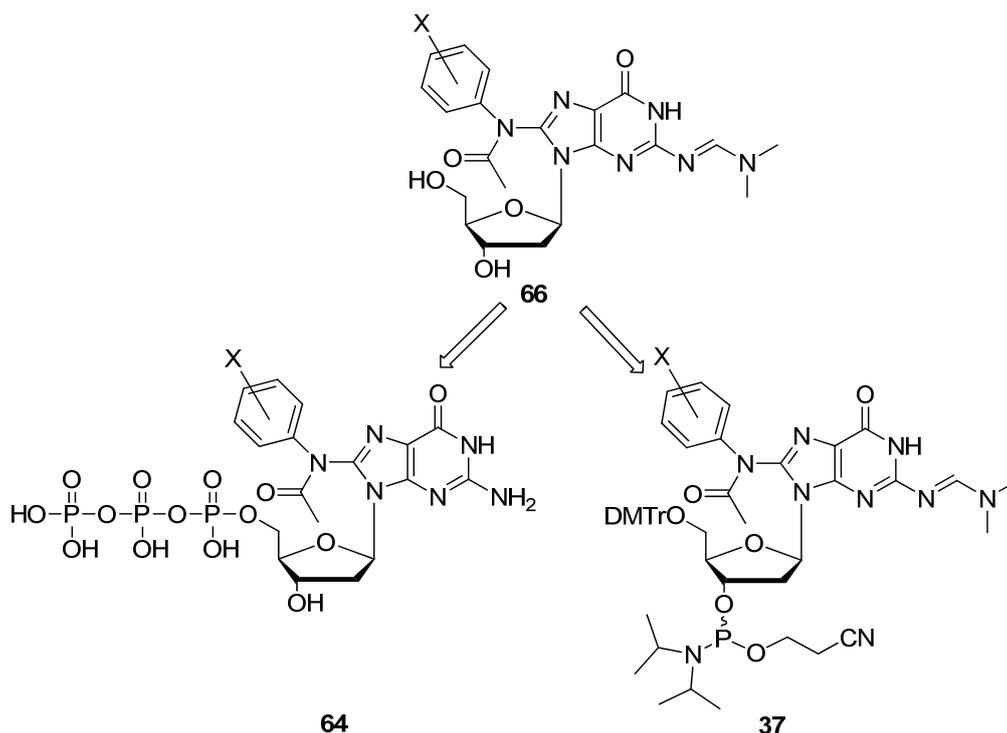


Abbildung 26: Synthese der C8-*N*-Arylamin-modifizierten 5'-Triphosphate **64** und Phosphoramidite **37** aus Verbindung **66**

4.1.1 Synthese der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Derivate als Schlüsselverbindung

Abbildung 27 fasst die kurze und effektive Retrosynthese des Formamidin-geschützten C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosins **66** ausgehend von 2'-Desoxyguanosin **69** nach Böge zusammen.^[54]

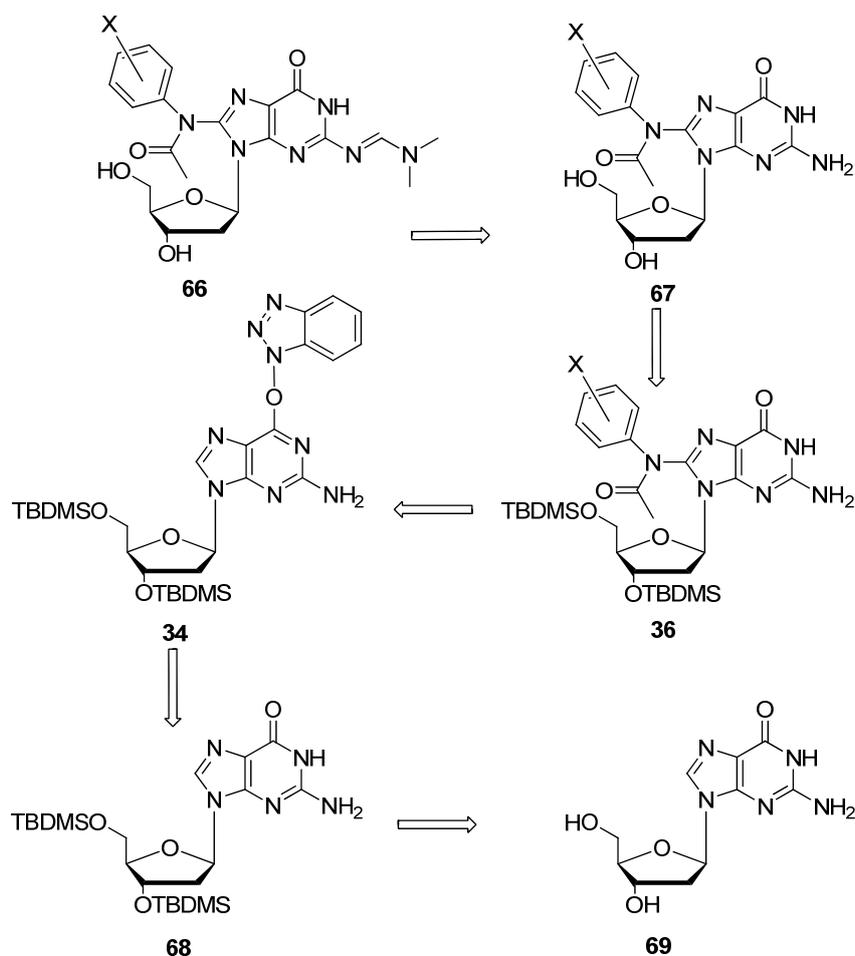


Abbildung 27: Retrosyntheseschema zur Darstellung der Formamidin-geschützten C8-*N*-Acetyl-*N*-Aryl-2'-dG Derivate **66**

Die Schlüsselverbindung **66** sollte über zwei Stufen durch Formamidin-Schutzung der exocyclischen Aminogruppe und Desilylierung aus **36** erhalten werden. Die Modifikation an Position C8 sollte durch eine Kupplungsreaktion zwischen dem Benzotriazol-Derivat **34** und einer Hydroxamsäure eingeführt werden. Das Benzotriazol-Derivat **34** sollte über zwei Stufen über das 3',5'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** durch nucleophile Substitution aus 2'-Desoxyguanosin **69** gewonnen werden.

4.1.1.1 Synthese der Hydroxamsäuren

Die zur Einführung der C8-Modifikation benötigten Hydroxamsäuren sollten über zwei Stufen durch Acetylierung der Hydroxylamine und Reduktion der Nitroaromaten dargestellt werden, wie das Retrosyntheschema in Abbildung 28 zeigt.

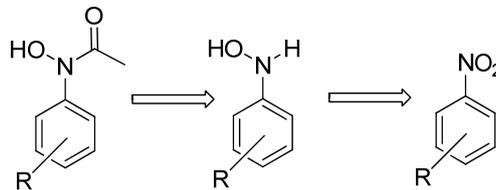
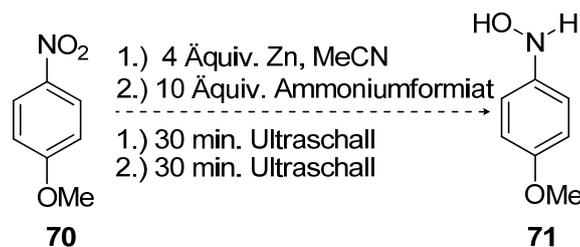


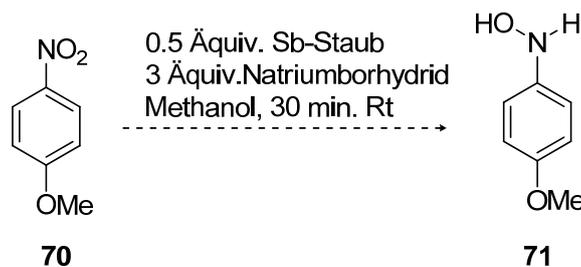
Abbildung 28: Retrosynthese zur Darstellung der Hydroxamsäuren

Zunächst wurden Versuche mit 4-Nitroanisol **70** durchgeführt, die bei erfolgreicher Synthese auf die anderen Nitroaromaten angewendet werden sollten. Abbildung 29 zeigt den Versuch zur Synthese des Hydroxylamins **71** durch Reduktion nach *Shi*.^[111]

Abbildung 29: Versuch zur Synthese von *N*-4-Methoxyphenyl-hydroxylamin **71** nach *Shi*

4-Nitroanisol **70** wurde mit 4 Äquiv. Zink in Acetonitril für 30 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden 10 Äquiv. Ammoniumformiat hinzugegeben. Nach weiteren 30 min im Ultraschall konnte dünnschichtchromatographisch nur die Bildung von Amin, jedoch kein Produkt beobachtet werden.

Eine weitere Synthesereaktion von *N*-Hydroxylaminen nach *Ren* sieht die Reduktion in Gegenwart von Antimon-Staub und Natriumborhydrid vor und ist in Abbildung 30 gezeigt.^[112]

Abbildung 30: Versuch zur Synthese von *N*-4-Methoxyphenyl-hydroxylamin **71** nach *Ren*

4-Nitroanisol **70** wurde in 20 mL Methanol gelöst und mit Antimon-Staub versetzt. Nach vorsichtiger Zugabe von Natriumborhydrid konnte dünn-schichtchromatographisch keine Produkt, sondern nur die Bildung von Amin beobachtet werden.

Da in beiden Versuchen keine Produkt erhalten werden konnte, wurde die Synthese nach *Ayyangar* durchgeführt, die eine Reduktion mit Nickel vorsieht.^[113,114] Dünn-schichtchromatographisch konnte die Bildung des Hydroxylamins beobachtet werden, die sich durch einen geringeren R_f-Wert im Vergleich zum Amin bemerkbar machte. Während der Aufarbeitung ging die Isolierung des Produktes jedoch mit seiner Zersetzung einher. Diese Problematik konnte umgangen werden, indem der Reduktion nach *Ayyangar* nach Entfernen des Nickels unmittelbar die Acetylierung nach *Nelson* angeschlossen wurde. Die Synthese der Hydroxamsäuren erfolgte daher über zwei Stufen wie Abbildung 31 zeigt, ohne die Isolierung der instabilen *N*-Hydroxylamine.

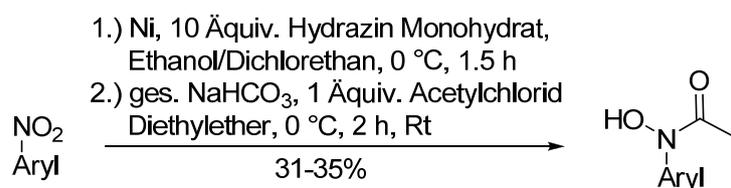


Abbildung 31: Synthese der Hydroxamsäuren nach *Nelson* und *Ayyangar*

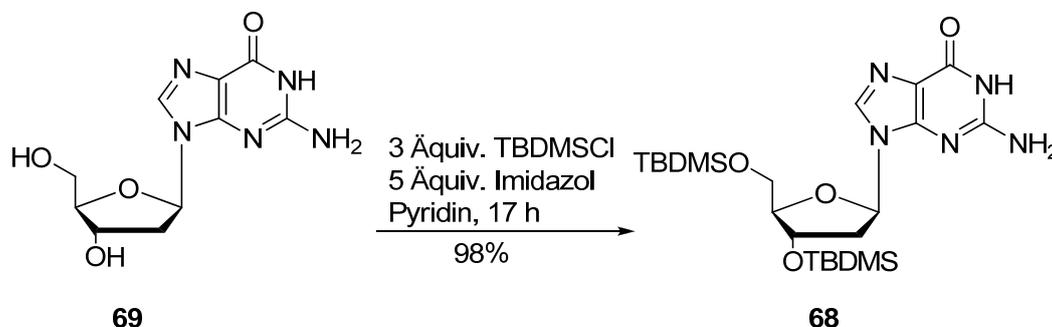
Zur Darstellung der Hydroxamsäuren wurden zu katalytischen Mengen Raney Nickels unter Kühlung der Nitroaromat gelöst in Dichlorethan/ Ethanol (1:1) hinzugegeben. Die Reduktion bei 5 °C erfolgte durch Zugabe von 10 Äquiv. Hydrazin Monohydrat. Nach einer Reaktionszeit von 1.5 h wurde das Nickel durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel eingeeengt. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst, bei 5 °C mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt und 1.0 Äquiv. Acetylchlorid hinzugegeben. Nach wässriger Aufarbeitung konnten die gewünschten Hydroxamsäuren **72-74** über zwei Stufen in Ausbeuten von 31-35% (Tabelle 1) erhalten werden. Aufgrund der zusätzlichen Bildung von Amin während der Reduktion und der teilweisen Zersetzung der *N*-Hydroxylamine blieben die Ausbeuten gering.

Tabelle 1: Ausbeuten der Hydroxamsäuren **72-75** über zwei Stufen

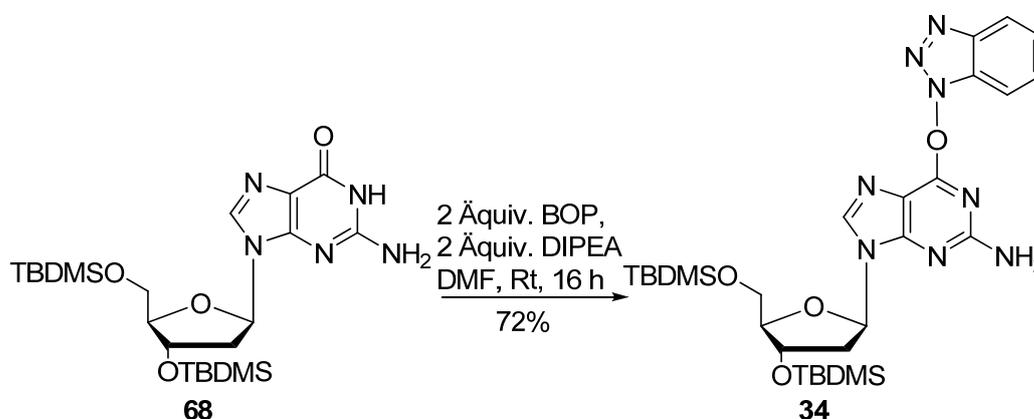
Produkt	Aryl	Ausbeute
72	Phenyl	33%
73	4-Methylphenyl	32%
74	4-Methoxyphenyl	35%
75	3,5-Dimethylphenyl	31%

4.1.1.2 Synthese der geschützten 2'-Desoxyguanosin-Derivate

Nach Woo *et al.* wurden die freien 3'- und 5'- Hydroxygruppen des 2'-Desoxyguanosins durch Überführung in *tert*-Butyldimethylsilylether blockiert, um die Ausbildung unerwünschter Nebenprodukte in den nachfolgenden Reaktionen zu vermeiden.^[115]

Abbildung 32: Synthese des TBDMS-geschützten 2'-dG **68**

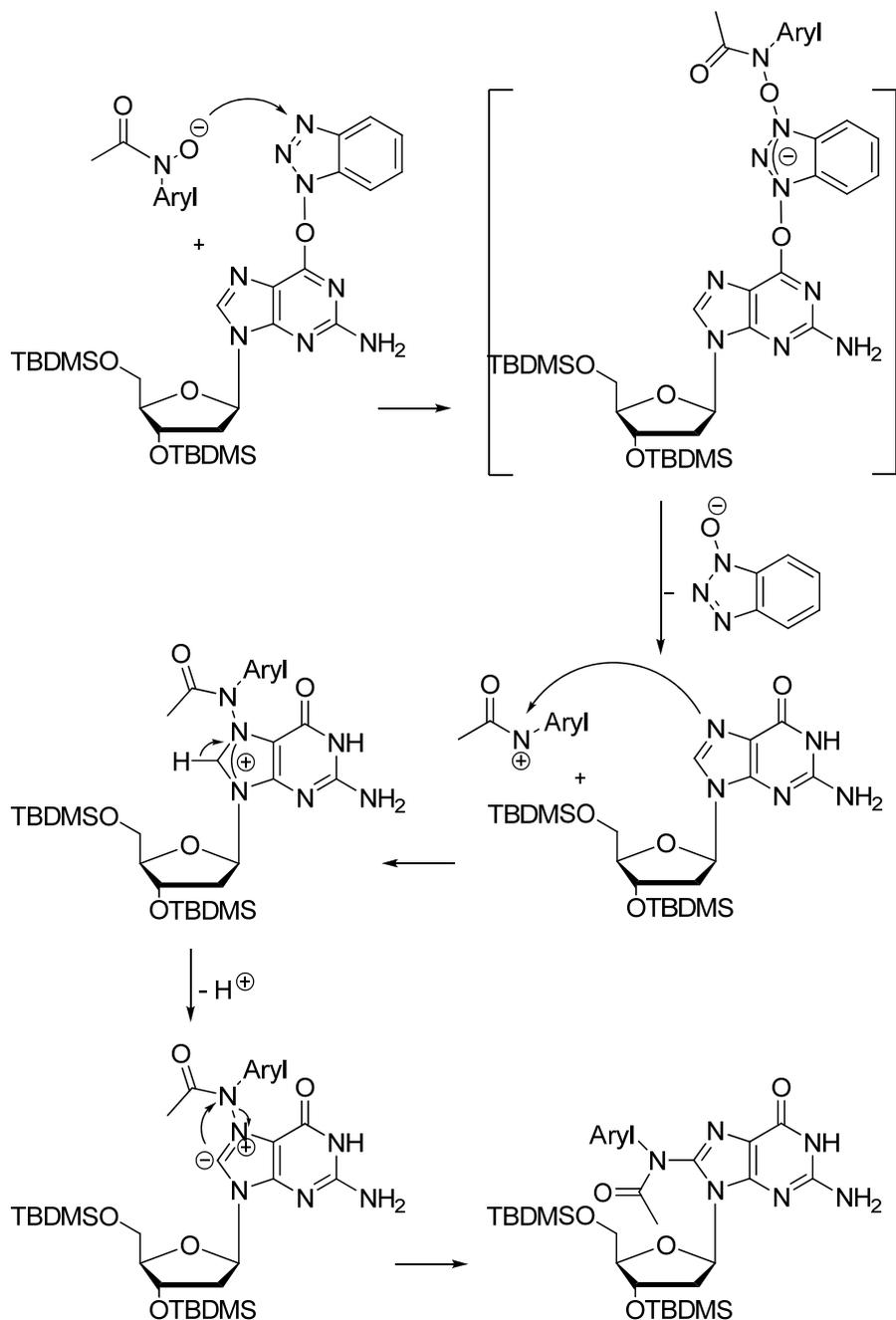
2'-Deoxyguanosin **69** wurde in Pyridin suspendiert und 3 Äquiv. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl) sowie 5 Äquiv. Imidazol hinzugefügt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mehrfach mit Dichlormethan/ Wasser gewaschen, bis das Pyridin vollständig entfernt war. 3',5'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** konnte mit einer sehr guten Ausbeute von 98% in Form eines farblosen Feststoffs erhalten werden. Um die in Kapitel 4.1.1.1 dargestellten Hydroxamsäuren selektiv an Position C8 des 3',5'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosins **68** einzuführen, wird das Kupplungsreagenz Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) genutzt und zunächst das Benzotriazol-2'-dG-Derivat **34** dargestellt.^[42,54]

Abbildung 33: Synthese des Benzotriazol-2'-dG-Derivats **34**

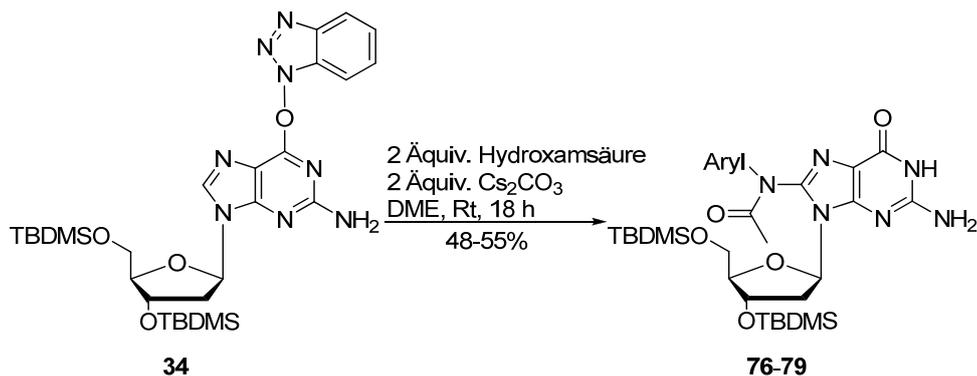
Für die Reaktion wurden 3',5'-*O*-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** sowie 2 Äquiv. BOP in DMF gelöst und mit 2 Äquiv. Diisopropylethylamin (DIPEA) versetzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit PE/ EE 2:1 gereinigt. Trotz des vollständigen Reaktionsumsatzes auf der DC-Folie blieb teilweise Edukt auf dem Säulenmaterial zurück. Möglicherweise handelt es sich um eine teilweise Zersetzung des Produkts, die auch nach längeren Reaktionszeiten dünnschichtchromatographisch beobachtet werden konnte. Das gewünschte Produkt **34** konnte mit einer Ausbeute von 72% isoliert werden.

Zusammen mit den synthetisierten *N*-Hydroxamsäuren **72-75** konnte nun die Reaktion zu den C8-*N*-Acetyl-*N*-aryl-modifizierten 2'-Desoxyguanosinen folgen. Die Kupplung wurde nach der von Böge entwickelten Route durchgeführt.^[54] Ursprünglich wollte Böge analog zu Lakshman an Position O⁶ die Benzotriazol-Einheit durch eine Modifikation substituieren.^[116] Böge stellte jedoch fest, dass die Modifikation dabei selektiv an Position C8 eingeführt wird. Im Gegensatz zur C8-Adduktbildung nach Gillet und Schärer ist bei der Darstellung nach Böge keine Metall-Kreuzkupplungsreaktion nötig.^[5,54] Dadurch kann auf eine Verwendung von Schutzgruppen verzichtet werden, so dass die Anzahl der Syntheseschritte geringer und die Syntheseroute insgesamt effektiver wird. Nach einer der Stevens-Umlagerung ähnlichen Reaktion ist in Abbildung 34 der folgende Mechanismus postuliert.^[42]

Die basenkatalysierte Addition der Hydroxygruppe an die Benzotriazol-Gruppe bewirkt eine Delokalisierung der negativen Ladung. Es kommt zur Abspaltung von Hydroxybenzotriazol und Ausbildung eines Nitreniumions, welches analog dem Mechanismus der C8-Adduktbildung *in vivo* reagiert (Abbildung 5).

Abbildung 34: Postulierter Mechanismus der C8-Adduktbildung *in vitro*

Für die Reaktion wurde *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **34** mit 2 Äquiv. der entsprechenden *N*-Arylhydroxamsäure und 2 Äquiv. Cäsiumcarbonat versetzt. Nachdem dünnschichtchromatographisch kein *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **34** mehr nachgewiesen werden konnte, wurde das Lösungsmittel durch Kälteedestillation entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/ Methanol Gradienten von 0-5% gereinigt.

Abbildung 35: Synthese der TBDMS-gesch\u00fctzten C8-*N*-Acetyl-*N*-aryl-2'-dG Derivate **76-79**

W\u00e4hrend bei der Verwendung von weniger \u00c4quivalenten an Hydroxams\u00e4ure der Reaktionsumsatz unvollst\u00e4ndig blieb, f\u00fchrte die Verwendung \u00fcbersch\u00fcssiger \u00c4quivalente an Hydroxams\u00e4ure zu Mischfraktionen, die auch nach mehrfacher S\u00e4ulenchromatographie nicht abgetrennt werden konnten. *Kr\u00fcger* gelang die Reaktion in Ausbeuten von 70-95%.^[43] Im Vergleich konnten die Produkte hier nur in moderaten Ausbeuten von 48-55% isoliert werden.

Tabelle 2: Ausbeuten der TBDMS-gesch\u00fctzten C8-*N*-Acetyl-*N*-aryl-2'-dG Derivate **76-79**

Produkt	Aryl	Ausbeute
76	Phenyl	48%
77	4-Methylphenyl	55%
78	4-Methoxyphenyl	51%
79	3,5-Dimethylphenyl	55%

Nach der Kupplungsreaktion konnte f\u00fcr alle *N*-Acetyl-modifizierten Verbindungen eine Verbreiterung der NMR-Signale beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde bereits von *Beland* beschrieben und ist auf die Pr\u00e4senz zweier Rotamere in den C8-*N*-Acetyl-*N*-aryl-modifizierten Verbindungen zur\u00fcckzuf\u00fchren.^[117] Die Acetyl-Modifikation an der Position C8 des 2'-Desoxyguanosins f\u00fchrt zu einer elektronischen sowie konformativen Ver\u00e4nderung im Molek\u00fcl. Die Amid-Bindung bewirkt einen partiellen Doppelbindungscharakter um die C-N-Bindung, sodass die freie Rotation durch die Ausbildung von *cis*-/ *trans*-Isomeren eingeschr\u00e4nkt ist. Abbildung 36 zeigt exemplarisch sowohl bei Rt als auch im Hochtemperaturbereich einen Ausschnitt des ¹H-NMR-Spektrums der Verbindung **78**.

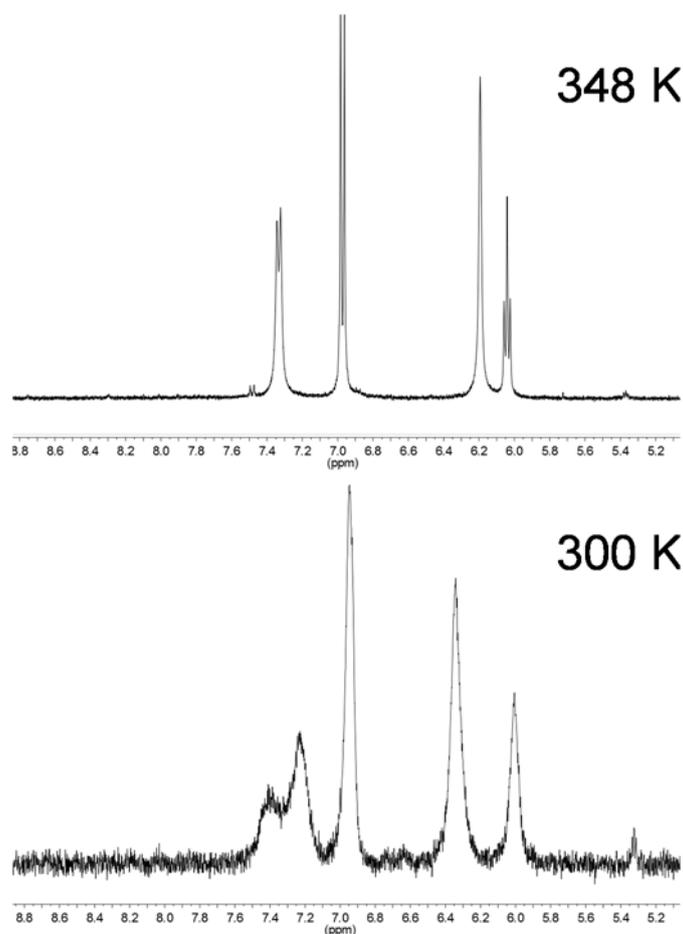


Abbildung 36: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von **78** bei verschiedenen Temperaturen in DMSO-*d*₆

Bereits bei einer Temperatur von 300 K ist die charakteristische Koaleszenztemperatur erreicht, bei der sich die Signalsätze der beiden Rotamere zu einem Durchschnittssignal mit einer natürlichen Linienbreite überlagern. Erst im Hochtemperaturbereich bei 348 K ermöglicht die erhöhte Molekülbewegung wieder eine freie Rotation um die C-N-Bindungsachse, sodass die koaleszenzbedingte Verbreiterung zu einem scharfen Signalsatz übergeht.

Im Anschluss an die Einführung der Modifikation sollte die Verwendung von Fluorid-Ionen zu einer selektiven Entfernung der Silylethergruppen führen. Erste Versuche mit Triethylamin-Trihydrofluorid führten zwar zur vollständigen Deblockierung, allerdings konnten die Triethylamin-Salze säulenchromatographisch nicht entfernt werden. Analog zu *Gillet et al.* wurde daher Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) in THF verwendet. Der Zusatz von Essigsäure soll einer Dearylierung des Nucleosids durch den basischen pH-Wert der TBAF-Lösung entgegenwirken.^[53]

Eine Mischung aus 6 Äquiv. TBAF in THF und 12 Äquiv. Eisessig wurde zum Nucleosid, gelöst in THF, hinzuge tropft und bei Rt bis zum vollständigen Reaktionsumsatz

gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, erfolgte eine säulen-chromatographische Reinigung.

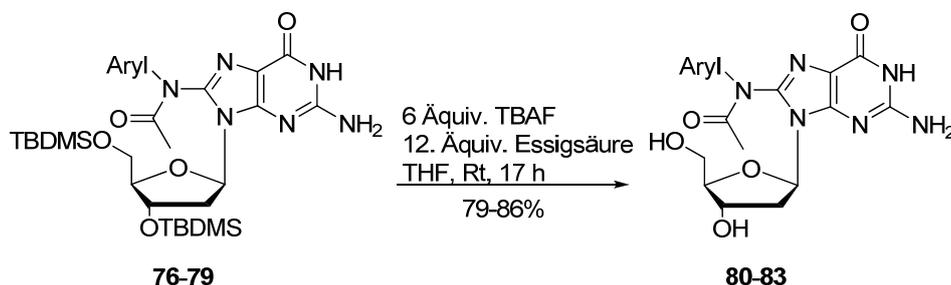


Abbildung 37: Desilylierung der C8-*N*-Acetyl-*N*-aryl-2'-dG Derivate **76-79**

Der Reaktionsumsatz erfolgte quantitativ, die säulenchromatische Reinigung mit einem Methanolgradienten von 0→5% in Dichlormethan führte jedoch zu einer Verschleppung der Tetra-*n*-butylammonium-Ionen. Während *Krüger* mit dieser Reinigungsmethode Ausbeuten von 69-96% erzielte, konnten in dieser Arbeit erst salzfreie Produkte durch mehrfache Reinigung mit einem konstanten Lösungsmittel-Verhältnis von 9:1 Dichlormethan/ Methanol in Ausbeuten von 79-86% erhalten werden.^[43]

Tabelle 3: Ausbeuten der desilylierten C8-*N*-Acetyl-*N*-Aryl-2'-dG Derivate **80-83**

Produkt	Aryl	Ausbeute
80	Phenyl	86%
81	4-Methylphenyl	85%
82	4-Methoxyphenyl	79%
83	3,5-Dimethylphenyl	80%

Um Nebenreaktionen der exocyclischen Aminogruppe für die folgenden Synthesen zu vermeiden, wurde diese selektiv mit einer Formamidin-Gruppe blockiert. Vorarbeiten zeigten bereits, dass eine spätere Entfernung durch Ammoniak ohne Verlust der Acetylgruppe möglich ist.^[42] Für die Reaktion wurde das Nucleosid in Pyridin gelöst und 2 Äquiv. *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal hinzugegeben.

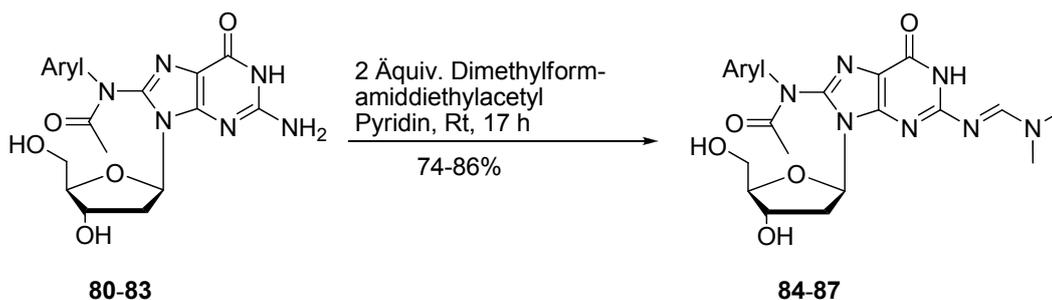


Abbildung 38: Formamidin-Schätzung der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-Addukte **80-83**

Bis zum vollständigen Reaktionsumsatz wurde die Reaktion bei Rt gerührt. Eine säulenchromatographische Aufarbeitung lieferte die Produkte **84-87** in guten Ausbeuten von 74-86%.

Tabelle 4: Ausbeuten der Formamidin-geschützten C8-*N*-Acetyl-*N*-Aryl-2'-dG Derivate **84-87**

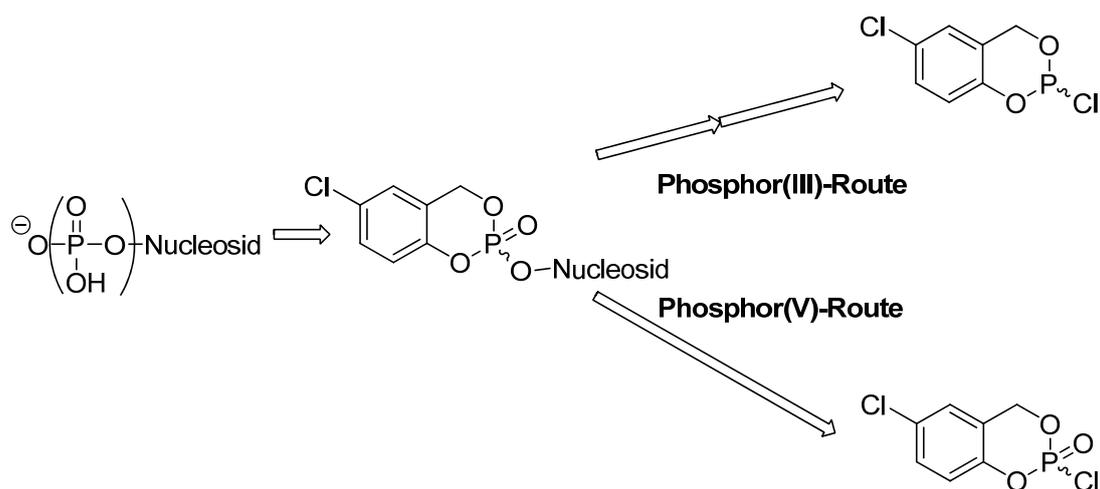
Produkt	Aryl	Ausbeute
84	Phenyl	82%
85	4-Methylphenyl	86%
86	4-Methoxyphenyl	78%
87	3,5-Dimethylphenyl	74%

Abschließend zu diesem Kapitel ist zu nennen, dass in einigen Fällen die 4-Methoxyphenyl-Addukte im Vergleich zum den 3,5-Dimethylphenyl-Addukten einfacher zu reinigen waren. Dies ist möglicherweise in dem zusätzlichen mesomeren Effekt oder einer veränderten Polarität durch das zusätzliche Sauerstoffatom des Methoxy-Substituenten begründet. Eindeutige Substituenteneffekte in der Reaktionsgeschwindigkeit oder in der Ausbeute konnten jedoch nicht beobachtet werden. Auch in Kapitel 4.1.2.2 und 4.1.5, in denen die Formamidin-geschützten Nucleoside **84-87** zur Synthese der C8-*N*-Arylamin-2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate und des C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin Phosphoramidits genutzt wurden, konnte keine Beeinflussung durch die Substituenten erfasst werden.

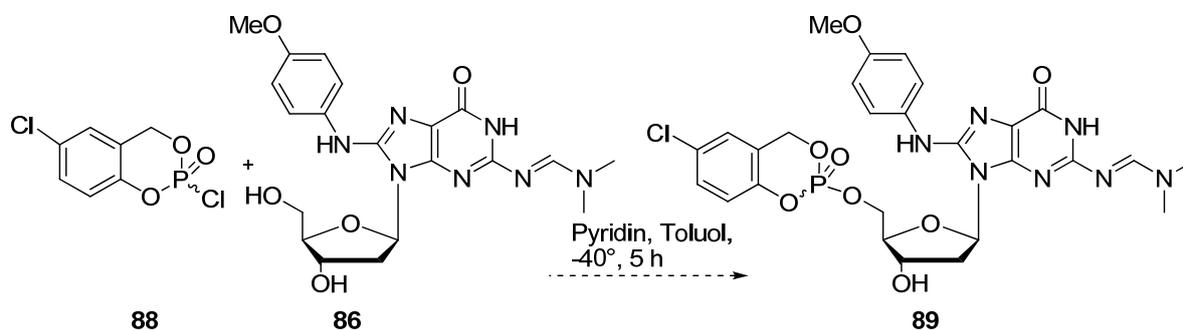
4.1.2 Synthese der C8-*N*-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate

Wie im Kenntnisstand beschrieben, führte eine konvergente Synthesestrategie unter Verwendung von *cycloSal*-Nucleotiden zur erfolgreichen Darstellung von Nucleosid-5'-triphosphaten.

In Abhängigkeit der verwendeten Nucleobase kann, wie in Abbildung 39 gezeigt, die Phosphor(III)- oder die Phosphor(V)-Route verfolgt werden. Die Synthese des *cycloSal*-Phosphattriesters unterscheidet sich durch die Verwendung zweier Phosphor-Reagenzien unterschiedlicher Oxidationsstufen.

Abbildung 39: *CycloSal*-Routen zur Darstellung der 5'-Triphosphate

Böge führte bereits 2008 erste Versuche zur Darstellung C8-*N*-H-Arylamin-modifizierter 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate nach der Phosphor(V)-Route durch.^[42] Über eine Kreuzkupplungsreaktion synthetisierte C8-*N*-H-Addukte setzte er, wie in Abbildung 40 gezeigt, mit 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **88** um. Die Synthese des C8-*N*-H-4-Methoxyphenyl-modifizierten *cycloSal*-Phosphatriesters **89** scheiterte jedoch, da kein Reaktionsumsatz und die Zersetzung des Edukts **86** beobachtet wurden.

Abbildung 40: Versuch zur Darstellung von C8-*N*-H-4-Methylphenyl-modifiziertem *cycloSal*-Phosphatriester **89**

Basierend auf diesen Beobachtungen von Böge und der von Johnson beschriebenen Oxidationsempfindlichkeit der *N*-H-Addukte konnte die Synthese der C8-*N*-H-Arylamin-modifizierten Nucleosid-5'-triphosphate nicht direkt aus ihren *cycloSal*-Phosphortriestern erfolgen.^[42,118] Um die Zersetzung zu vermeiden, musste innerhalb der *cycloSal*-Methode ein neuer Ansatz gewählt werden. Zunächst sollte die Synthese der acetylierten *cycloSal*-Phosphortriester erfolgen, die anschließend in Kapitel 4.1.2.2 zu den entsprechenden C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-5'-triphosphaten umgesetzt werden. Das Ziel bestand darin, die Acetylgruppe der Acetyl-Addukte als Schutzgruppe zur Synthese der C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate zu nutzen. Im An-

schluss sollte eine Deacetylierung der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierten Nucleosid-5'-triphosphate in Kapitel 4.1.2.3 zu den C8-*N*-H-*N*-Arylamin-5'-triphosphaten führen.

4.1.2.1 Synthese der *cycloSal*-Phosphatriester

Wie zuvor beschrieben, ist die Synthese der *cycloSal*-Phosphatriester sowohl über die P(III)- als auch über die P(V)-Route möglich. Im Folgenden werden die beiden verschiedenen Synthesevarianten auf die C8-*N*-Arylamin-Addukte angewendet.

Welche der beiden Routen sich besser zur Synthese der C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate eignet, sollte durch verschiedene Versuche, in denen sowohl die Formamidin-geschützten Nucleoside **84-87** als auch deren ungeschützte Vorstufen **80-83** verwendet werden, geprüft werden. Als Acceptorsubstituent in Position 5 wurde ein Chlor-Atom gewählt, um Nebenreaktionen der ungeschützten Nucleoside zu vermeiden. Stärker elektronenziehende Gruppen, die zusätzlich zum (-)I- einen (-M)-Effekt besitzen (wie zB. -NO₂, -CN, -SO₃CH₃) steigern die Reaktivität am Phosphorzentrum, sodass es zur Ausbildung von Nebenprodukten und dadurch erschwerten Reinigung kommen kann.^[119]

Synthese der *cycloSal*-Phosphatriester nach der P(III)-Route

Dieser Ansatz verfolgt einen schnelleren Reaktionsumsatz durch Verwendung einer reaktiveren Phosphor(III)-Spezies, der jedoch oft den Einsatz von Schutzgruppen erfordert, um die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden.

Bei der Synthese der *cycloSal*-Nucleotide nach der Phosphor(III)-Route wird das Nucleosid mit 5-Chloraligenylchlorphosphit und DIPEA bei -30 °C zum Phosphit(III)triestere umgesetzt. Die anschließende Oxidation zum Phosphor(V)triestere kann über zwei verschiedene Methoden erfolgen.^[119,120] Erstens durch Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BuOOH) und chromatographischer Reinigung oder zweitens durch Oxidation mit dem Oxone[®]-Salz (2KHSO₄*KHSO₄*K₂SO₄) und Extraktion mit Ethylacetat. Die zuletzt genannte Variante ist jedoch mit zwei Nachteilen verbunden. Neben anorganischen Salzen, die im Produkt verbleiben können, beobachtete *Tonn* während der Extraktion die Löslichkeit ungeschützter Nucleotide sowohl in der organischen als auch

in der wässrigen Phase.^[121] Besonders bei modifizierten Nucleotiden ist dies problematisch. Aus diesem Grund wurde innerhalb der Phosphor(III)-Route nur der erste Methodenansatz durch Oxidation mit *t*-BuOOH verfolgt.

▪ P(III)-Route über das ungeschützte Nucleosid

Zunächst wurde die Reaktion des ungeschützten C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosins **82** nach der Phosphor(III)-Route mit *t*-BuOOH als Oxidationsmittel getestet. Um die Stabilität der Verbindung zu überprüfen, wurde das Nucleosid zuvor in einem Testansatz für 10 min mit *t*-BuOOH gerührt. Da keine Zersetzung auf der DC-Folie beobachtet werden konnte, wurde die eigentliche Reaktion durchgeführt.

Das ungeschützte Nucleosid **82** wurde in Acetonitril gelöst und mit 1.1 Äquiv. DIPEA versetzt. Bei -30 °C wurden 1.1 Äquiv. 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **90** hinzugefügt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Rt erwärmt und für weitere 2 h gerührt wurde, konnte dünnschichtchromatographisch die Bildung mehrerer Verbindungen beobachtet werden.

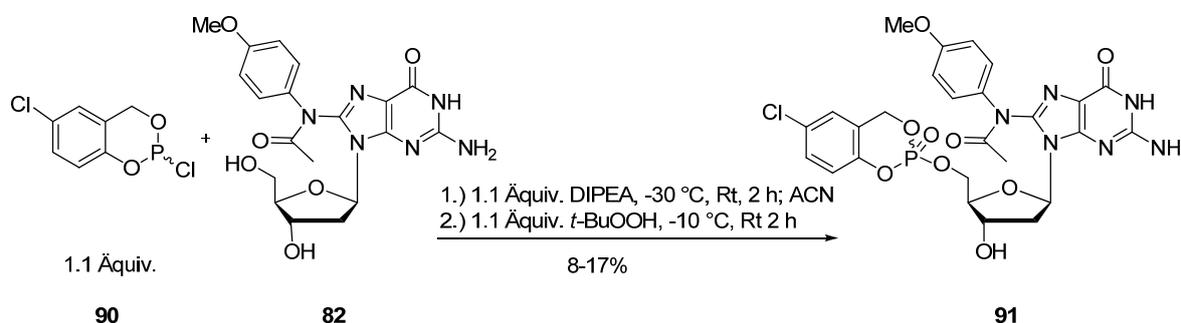
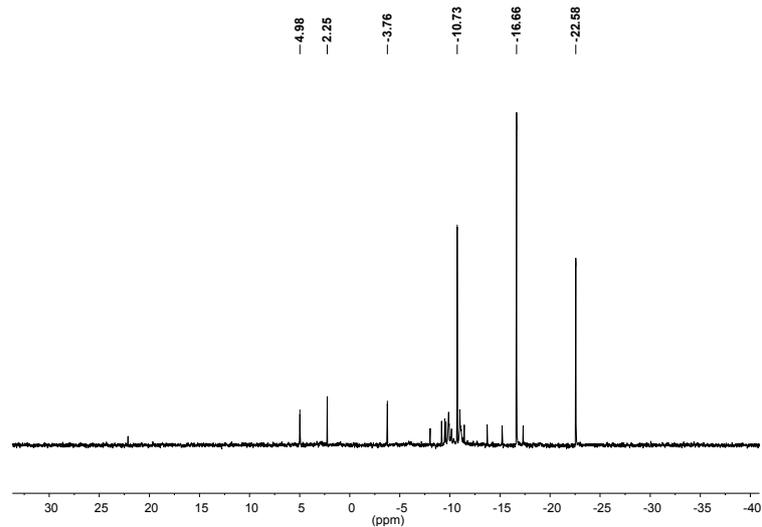
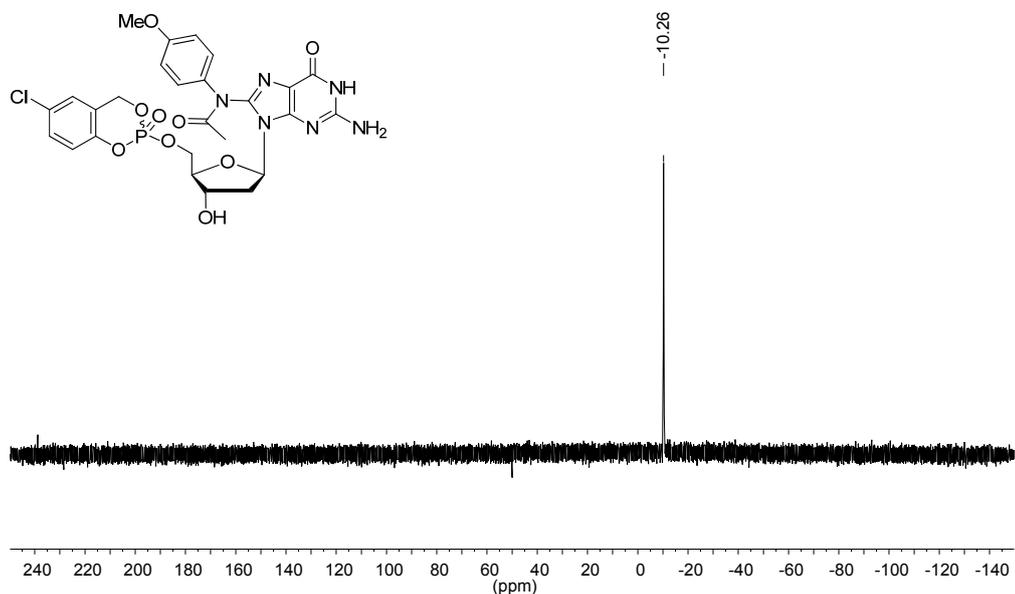


Abbildung 41: Synthese des ungeschützten *cycloSal*-Nucleotids **91** nach der P(III)-Route

Die Zugabe des Oxidationsmittels bewirkte allerdings keine Veränderung, sodass die Reaktion nach weiteren 2 h beendet wurde. In Abbildung 42 ist das ³¹P-NMR-Spektrum des Rohgemisches gezeigt. Neben dem Produkt bei -10.73 ppm, sind weitere Signale verschiedener Phosphorhaltiger Nebenprodukte zu erkennen.

Abbildung 42: ^{31}P -NMR-Roh-Spektrum

Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte das Produkt **91** als Diastereomerenmischung. Das ^{31}P -NMR-Spektrum in Abbildung 43 zeigt, dass sich beide Signale der Diastereomere bei -10.26 ppm überlagern, sodass eine Bestimmung des Verhältnisses nicht möglich war.

Abbildung 43: ^{31}P -NMR-Spektrum des gereinigten 5-Chlor-*cycloSal*-8-*N*-acetyl-*N*-(4-methoxyphenyl)-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **91**

Die Ausbeuten der mehrfach durchgeführten Synthesen betrug jedoch nur 8-17%. Die geringen Ausbeuten sind auf einen geringen Reaktionsumsatz zurückzuführen, da hauptsächlich das Edukt (~ 78%) reisoliert wurde. Zusätzlich kam es zur Bildung von Nebenprodukten durch unselektive Phosphitylierungen z.B. an der freien 3'-Hydroxygruppe oder exocyclischen Aminogruppe.

▪ P(III)-Route über das Formamidin-geschützte Nucleosid

In einem weiteren Ansatz wurde das geschützte Nucleosid *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **86** mit 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **90** umgesetzt.

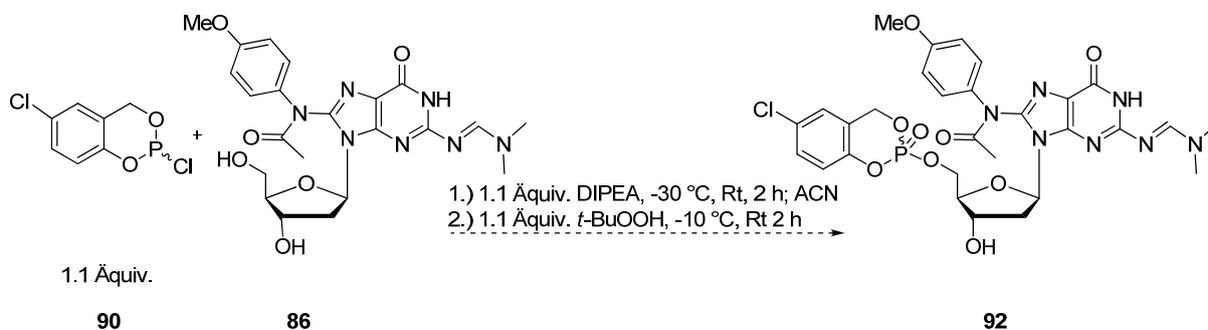


Abbildung 44: Versuch der Synthese des geschützten *cycloSal*-Nucleotids **92** nach der P(III)-Route

Die dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigt jedoch auch hier die Bildung mehrerer Verbindungen an. Eine säulenchromatographische Reinigung brachte nicht den gewünschten Erfolg. Wie der Ausschnitt des ³¹P-NMR-Spektrums in Abbildung 45 bestätigt, wurden verschiedene Triesterspezies gebildet, deren Trennung nicht möglich war.

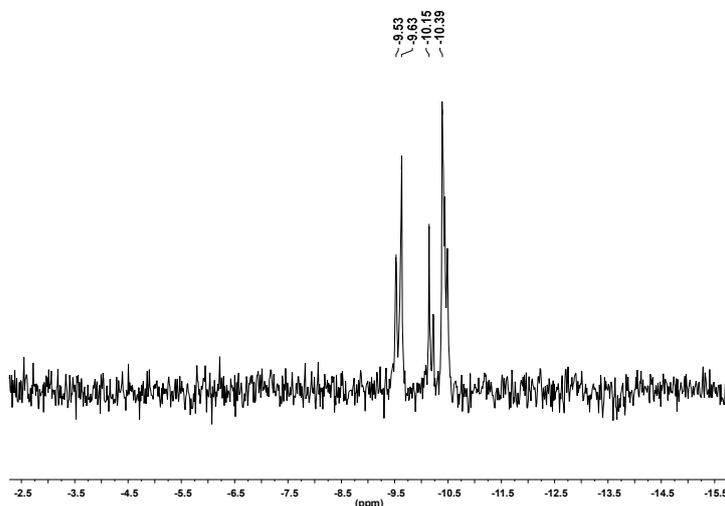


Abbildung 45: ³¹P-NMR-Spektrum des Versuchs zur Synthese des geschützten *cycloSal*-Nucleotids **92** nach der P(III)-Route

Synthese der *cycloSal*-Phosphatriester nach der P(V)-Route

Erste Arbeiten zur Synthese von *cycloSal*-Phosphat(V)triestern gehen auf *Ludek* und *Jessen* zurück.^[122,123] In Folge der direkten Verwendung des Phosphor(V)-chloridats kommt die Synthese ohne den zusätzlichen Oxidationsschritt aus. Hierfür wird das

entsprechende Nucleosid in Pyridin gelöst und direkt mit dem in THF gelösten 5-Chlor-saligenylphosphorchloridat zum Phosphor(V)triester umgesetzt. Der Reaktion schließt sich eine chromatische Reinigung an, bei der die Zugabe von Essigsäure die Hydrolyse des Triesters zum Nucleosidmonophosphat verhindert.

Das Phosphor-Reagenz wurde ausgehend 5-Chlor-2-hydroxybenzylalkohol **94** erhalten, welches aus 5-Chlor-2-hydroxybenzoesäure **93** durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid gewonnen wurde.^[122,123]

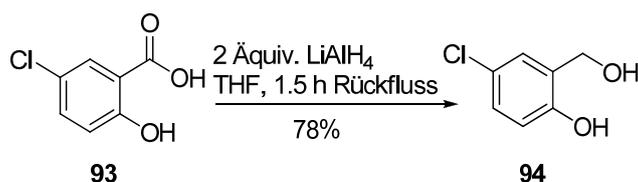


Abbildung 46: Synthese des 5-Chlor-2-hydroxybenzylalkohols **94**

Eine Lösung aus 5-Chlor-2-hydroxybenzoesäure **93** in THF wurde langsam zu einer Suspension aus Lithiumaluminiumhydrid in THF hinzuge tropft und unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lithiumaluminiumhydrid durch Zugabe von Eis hydrolysiert. Die Kristallisation in Chloroform liefert das Produkt in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 78%. Der erhaltene Benzylalkohol wird im nächsten Schritt zum 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **88** umgesetzt.

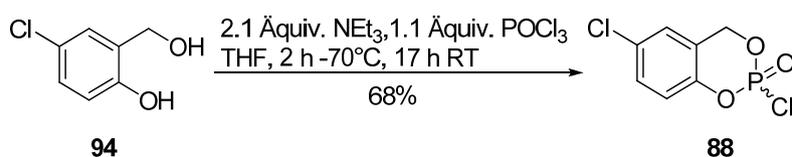


Abbildung 47: Synthese des 5-Chlorsaligenylphosphorchloridats **88**

Hierfür wurde eine Lösung aus 5-Chlor-2-hydroxybenzylalkohol **94** und 2.1 Äquiv. Triethylamin in THF bei -70°C langsam zu einer Lösung aus 1.1 Äquiv. Phosphorylchlorid in THF hinzuge tropft und 17 h bei Rt gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels durch Kälte destillation und säulenchromatographischer Reinigung konnte das 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **88** als Gemisch zweier Enantiomere mit einer Ausbeute von 68% erhalten werden.

- P(V)-Route über das ungeschützte Nucleosid

Um die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden und eine dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zu erleichtern, wurde die Reaktionsabfolge auf die Phosphor(V)-Methode verkürzt. Hierbei wird das 5-Chloraligenylphosphorchloridat **88** als Phosphorylierungsmittel verwendet, sodass der zusätzliche Oxidationschritt entfällt. Die Synthese zum *cycloSal*-Phosphatriester erfolgte unter Zugabe von 1.2 Äquiv. 5-Chloraligenylphosphorchloridat **88** bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, um eine regioselektive Umsetzung an der 5'-Position des ungeschützten C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosins **91** zu erreichen.

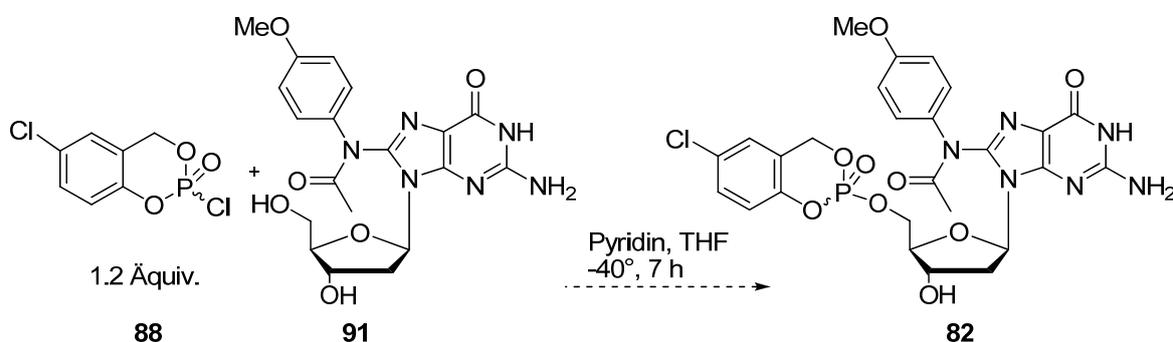


Abbildung 48: Versuch zur Synthese des ungeschützten *cycloSal*-Nucleotids nach der P(V)-Route

Obwohl sich das Edukt **91** durch Zugabe von DMF löste, fand keine Umsetzung zum Produkt statt und es konnte nur Edukt reisoliert werden.

- P(V)-Route über das Formamidin-geschützte Nucleosid

In Folge der besseren Löslichkeit und zur Vermeidung der beobachteten Nebenreaktionen wurde analog das geschützte Nucleosid *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **86** verwendet.

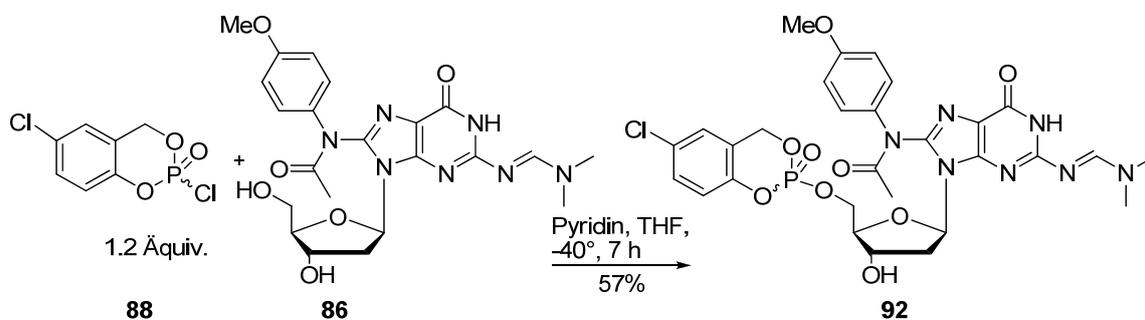


Abbildung 49: Synthese von 5-Chlor-*cycloSal*-*N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **92** nach der Phosphor(V)-Route

Unter Verwendung von 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **88** konnte dünn-schichtchromatographisch der vollständige Umsatz zum *cycloSal*-Phosphattriester ohne Ausbildung von 3'-phosphoryliertem Nebenprodukt detektiert werden. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit einem Dichlormethan/ Methanol-Gemisch (9:1 v/v + 1% Essigsäure) an Kieselgel. Obgleich der Zusatz von Essigsäure der Hydrolyse des basenlabilen Triesters während der Reinigung entgegenwirken soll, ist ein teilweiser Zerfall nicht auszuschließen. 5-Chlor-*cycloSal*-*N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **92** wurde in 57%iger Ausbeute isoliert, wobei keine Nebenprodukte detektiert werden konnten. Abbildung 50 zeigt das ³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung, welches als Diastereomerengemisch vorliegt, deren Verhältnis in diesem Fall nicht bestimmbar war.

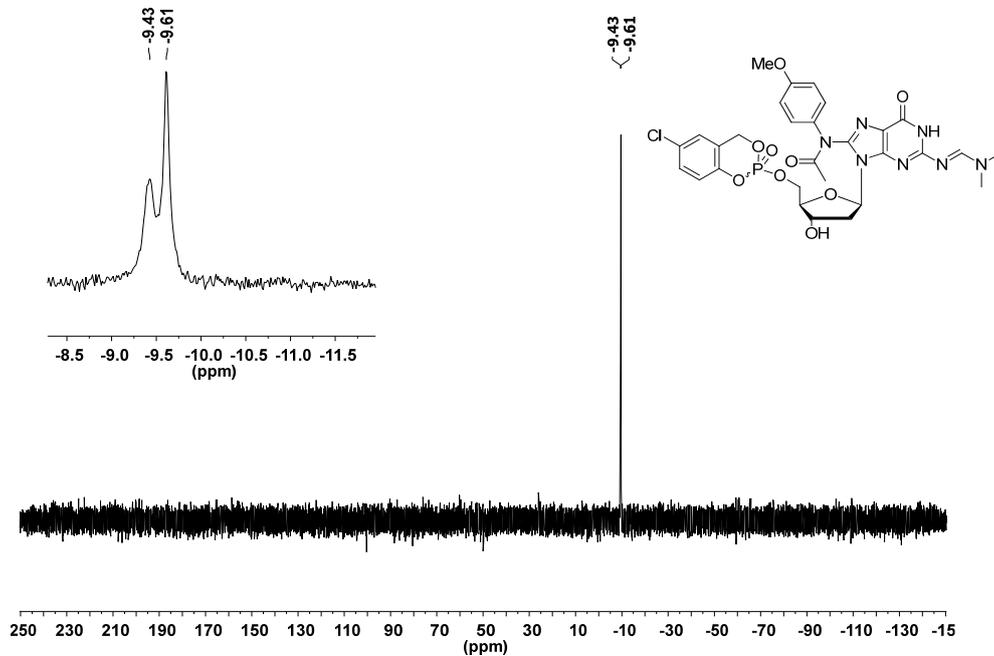


Abbildung 50: ³¹P-NMR-Spektrums des 5-Chlor-*cycloSal*-*N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphats **92** in CDCl₃

Auch das zugehörige ¹H-NMR-Spektrum in Abbildung 51 zeigt die beiden Signalsätze der Diastereomere von Verbindung **92**.

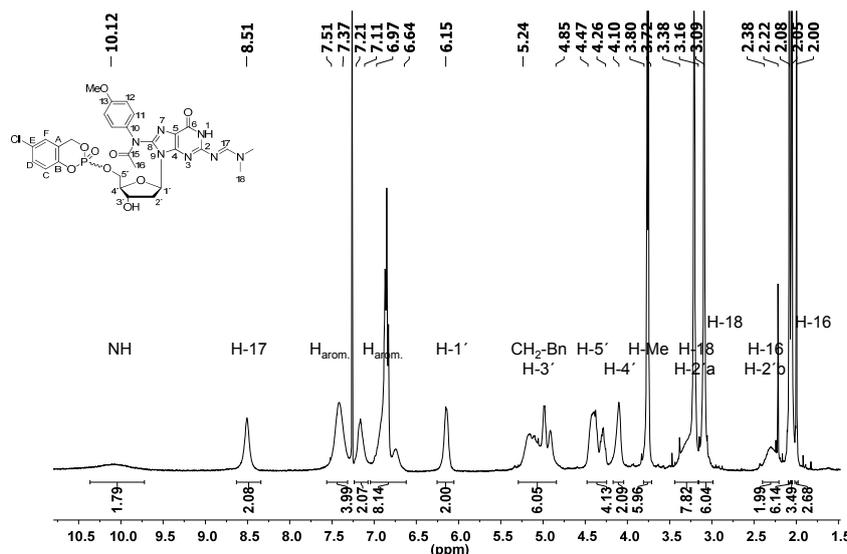


Abbildung 51: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des des 5-Chlor-*cycloSal-N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphats **92** in CDCl_3

Massenspektrometrisch konnte der *cycloSal*-Phosphattriester **92** durch die in 7.3 beschriebenen Ionisierungsparameter am ESI-Q-TOF der Firma Bruker nachgewiesen werden, wie das ESI-Spektrum in Abbildung 52 beweist.

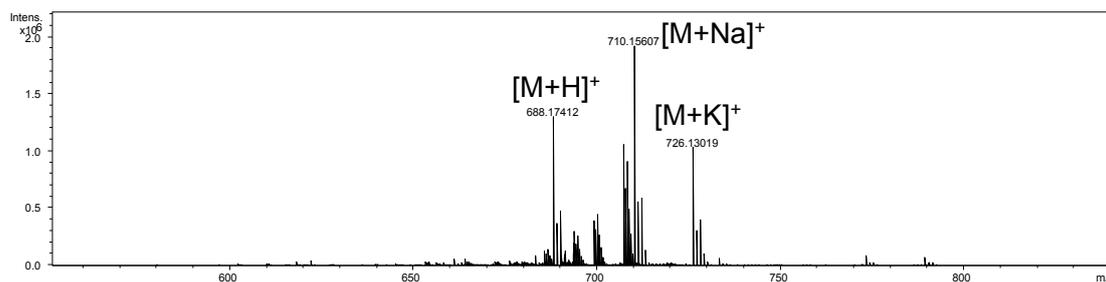


Abbildung 52: ESI-Spektrum des 5-Chlor-*cycloSal-N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphats **92**

Die Exakte Masse $M(\text{ESI}^+, m/z) = 688.1689$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ stimmt mit der gefundenen Masse $M(\text{ESI}^+, m/z) = 688.1741$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ sehr gut überein. Die weiteren Massen entsprechen dem Natrium- $M(\text{ESI}^+, m/z) = 710.1561$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ bzw. dem Kalium-Addukt $M(\text{ESI}^+, m/z) = 627.1302$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ der Verbindung.

Durch Verwendung der Formamidin-Schutzgruppe und des reaktionsträgeren Chlorids **88** konnte eine regioselektive Umsetzung zu den 5-Chlor-*cycloSal*-8-*N*-acetyl-*N*-aryl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphaten **95-97** und **92** erreicht werden. Die säulenchromatographische Reinigung der modifizierten *cycloSal*-Triester führte zu Ausbeuten von 54-57% in sehr guten Reinheiten. Die in der Literatur beschriebenen *cycloSal*-Triester-Ausbeuten liegen durchschnittlich bei 80%, beziehen sich jedoch auf das nicht gereinigte Produkt.^[119,124] Die hier erzielten Ausbeuten liegen daher in einem

guten Bereich, besonders da es sich hier um modifizierte Purin-Basen handelt, deren Reinigung im Vergleich zu nicht modifizierten Pyrimidinen erschwert ist.

Tabelle 5: Ausbeuten der Triester **95-97** und **92**

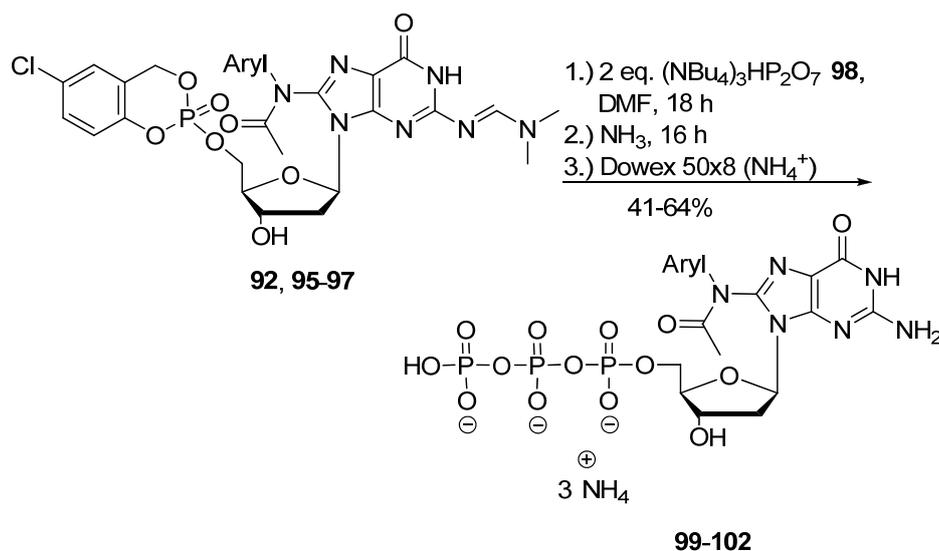
Produkt	Aryl	Ausbeute
95	Phenyl	56%
96	4-Methylphenyl	54%
92	4-Methoxyphenyl	57%
97	3,5-Dimethylphenyl	54%

4.1.2.2 Synthese der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate

Der Erhalt der Acetylgruppe bzw. deren spätere gezielte Entfernung ohne Verlust des Arylrestes war bei der Synthese der C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate von zentraler Bedeutung. Da es sich um sehr polare Verbindungen handelt, wäre eine chromatographische Trennung der verschiedenen Spezies nicht möglich gewesen.

Die Zielverbindungen **64** und **65** werden aus den zuvor synthetisierten *cycloSal*-Phosphatriestern durch Zugabe von Pyrophosphat als Nucleophil gewonnen. Hierfür musste zunächst Dinatriumdihydrogenpyrophosphat in das nucleophilere Bis-(tetra-*n*-butylammonium)dihydrogenpyrophosphat **98** überführt werden.^[119] Durch Austausch der beiden Natrium-Ionen gegen größere und lipophilere Tetra-*n*-butylammonium-Ionen, wird die Ladung des Gegenions isoliert, wodurch dessen Nucleophilie gesteigert wird. Das kommerziell verfügbare Dinatriumdihydrogenpyrophosphat wurde auf der Ionenaustausch-Matrix Dowex (50WX8) mit einer 40%igen Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid-Lösung auf pH= 3.5 titriert. Der nach der Gefriertrocknung erhaltene Feststoff ist ein stark hygroskopisches Salz.

Für eine hohe und selektive Umsetzung des *cycloSal*-Nucleotids sind wasserfreie Bedingungen nötig. Das Syntheseprotokoll wurde durch mehrfaches Mörsern des Nucleophils **98** unter Inertgas und ausreichende Trocknung im Ölpumpenvakuum ergänzt.^[77] Das aufwändige Verfahren erreicht einen hohen Trocknungsgrad und eine feinpulvrige Konsistenz des Phosphat-Salzes. Der Ausschluss von Feuchtigkeit ist für die nachfolgende Reaktion von essentieller Bedeutung, um die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden. Dafür wurden 2 Äquiv. des Phosphat-Salzes **98** in DMF gelöst und zusätzlich eine Stunde über 4 Å Molsieb getrocknet.

Abbildung 53: Synthese der C8-*N*-Acetyl-*N*-aryl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **99-102**

Um einen maximalen Überschuss an Nucleophil zu gewährleisten, wurde eine Lösung aus *cycloSal*-Nucleotid in DMF langsam zum Phosphat-Salz hinzugetropft. Nach 18 h konnte ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet werden, der wässrig aufgearbeitet und zur vollständigen Abspaltung der Formamidin-Schutzgruppe für 16 h bei Rt mit 25%igen Ammoniak behandelt wurde.

Mit ggf. mehrfacher *ultra-performance flash purification* (RP-UPFP) an RP-18-Silicagel und anschließender Ionenaustauschchromatographie an Dowex (50WX8, NH_4^+) wurde das gereinigte Produkt erhalten. Die besten Ergebnisse wurden mit vorheriger Reinigung des deblockierten Nucleosid-5'-triphosphats durch Umkehrphasenchromatographie vor Überführung in ihre Ammoniumsalze erzielt. Im Fall des C8-*N*-Acetyl-*N*-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **102** war die Reinigung durch das Substitutionsmuster des Aromaten erschwert, welches sich in einer niedrigeren Ausbeute von 41% bemerkbar machte. Die vorherige Optimierung des Syntheseprotokolls des Bis-(tetra-*n*-butylammonium)dihydrogenpyrophosphats **98** führte zu sehr guten Ausbeuten der C8-*N*-Acetyl-*N*-Aryl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **99-102** von 41-64%. Im Vergleich dazu liegen die Literatur-Ausbeuten von Triphosphat-Synthesen mit modifizierten Nucleobasen im Bereich von 40-55%.^[119]

Tabelle 6: Ausbeuten der *N*-Acetyl-*N*-Aryl-2'-desoxyguanosin-5'-Triphosphate **99-102**

Produkt	Aryl	Ausbeute
99	Phenyl	64%
100	4-Methylphenyl	61%
101	4-Methoxyphenyl	63%
102	3,5-Dimethylphenyl	41%

Abbildung 54 zeigt das ^{31}P -NMR-Spektrum des 8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **101** mit einem vergrößerten Ausschnitt der relevanten Signale.

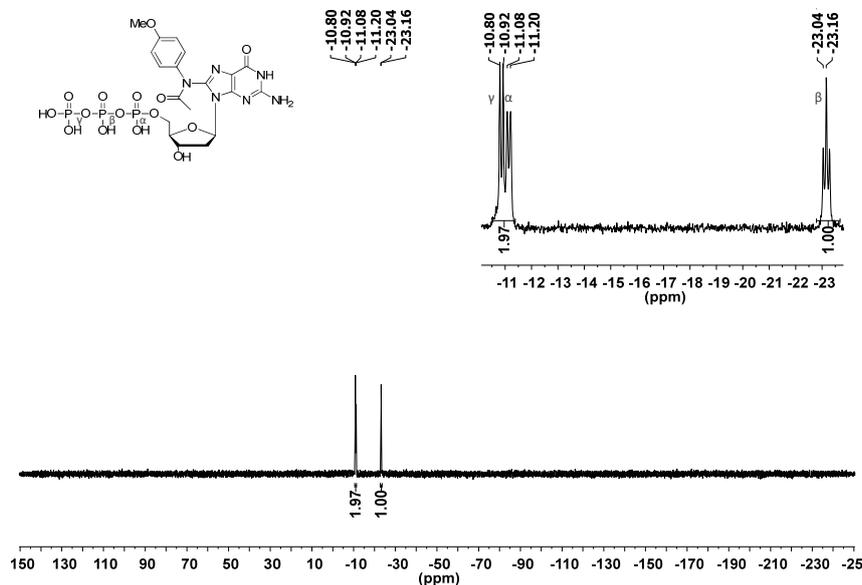


Abbildung 54: ^{31}P -NMR-Spektrum des gereinigten 8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **101** in D_2O

Bei -23.16 ppm ist das Pseudotriplett des P_β -Atoms sowie das Duplett des P_α -Atoms bei -11.14 ppm und das Duplett des P_γ -Atoms bei -10.86 ppm zu erkennen. Verunreinigungen durch Signale von Monophosphat-, Diphosphat-Verbindungen oder Pyrophosphat, welches als Edukt eingesetzt wurde, konnten nicht identifiziert werden.

Auch durch ^1H -NMR-Spektroskopie konnte die erfolgreiche Synthese der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate nachgewiesen werden. Die in Kapitel 4.1.1 erläuterte Signalverbreiterung, verursacht durch die Acetylgruppe, zeigt sich auch in den ^1H -NMR-Spektren der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierten Triphosphate wie die Abbildung 55 der Verbindung **101** exemplarisch zeigt.

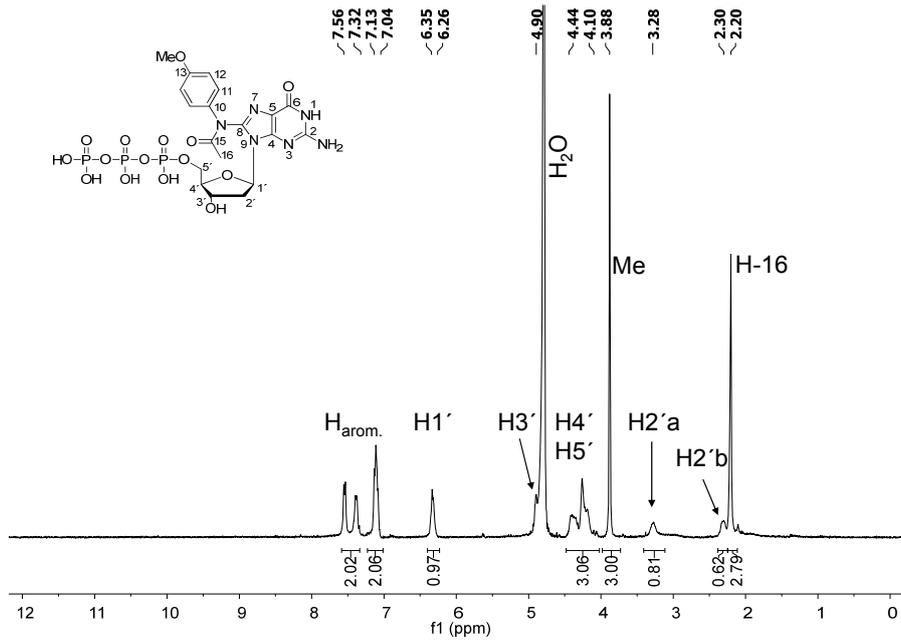


Abbildung 55: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des gereinigten 8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **101** in D_2O

Bei 2.20 ppm erscheint das charakteristische Singulett der Protonen der Acetylgruppe. Wie in allen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der 5'-Triphosphate in D_2O liegt das Protonen-Signal des H-3' Signals unter dem Lösungsmittelsignal bei 4.90 ppm. Die Reinheit der acetylierten Triphosphate wurde auch mittels RP-HPLC überprüft. Eine ausreichende Trennschärfe der Signale im HPLC-Chromatogramm war nur mit TBAA-Puffer durch Methode IV (s. Experimentaltel) möglich und konnte mit anderen Puffern nicht erreicht werden. Für das gereinigte C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101** ist exemplarisch das analytische RP-HPLC-Chromatogramm in Abbildung 56 dargestellt.

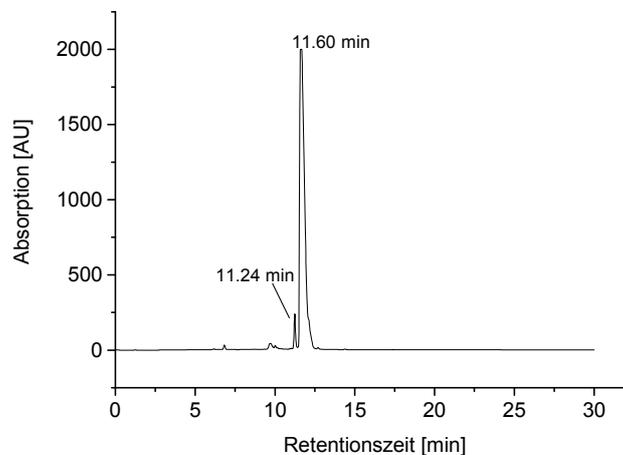


Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm des gereinigten C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **101**

Das RP-HPLC-Chromatogramm bestätigt die in den ^{31}P -NMR-Spektren ermittelten hohen Reinheiten der acetylierten Triphosphate. Die Verbindung **101** bei 11.60 min misst ein Absorptionsmaximum von 265 nm. Daneben ist bei 11.24 min eine kleine Verunreinigung zu erkennen, die sich trotz mehrmaliger RP-Chromatographie nicht abtrennen ließ. Massenspektrometrisch konnte dieses Signal dem acetylierten Diphosphat der Verbindung **101** mit $M(m/z) = 589.0568$ im ESI-Spektrum der Abbildung 57 zugeordnet werden.

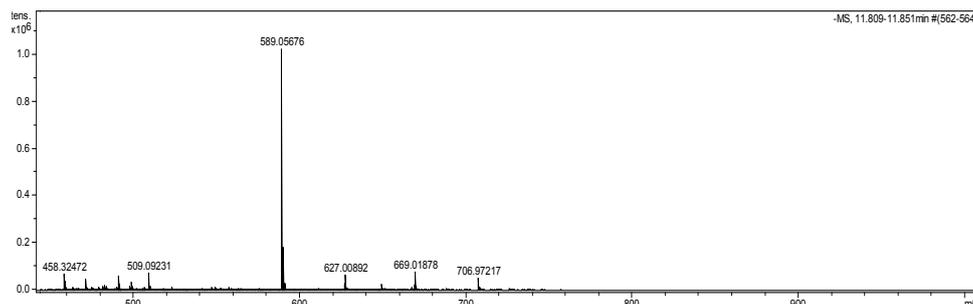


Abbildung 57: ESI-Spektrum des Nebenproduktes C8-N-Acetyl-N-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-diphosphat

Möglicherweise entsteht das Diphosphat während der Synthese im untergeordneten Maße. Da NMR-spektroskopisch keine Nebenprodukte detektiert wurden, liegt die Verunreinigung nur in Spuren vor.

Für die Zuordnung der Signale im RP-HPLC-Chromatogramm wurden die entsprechenden Fraktionen aufgefangen, gefriergetrocknet und die Kationen an Dowex (50WX8, NH_4^+) ausgetauscht. Die Ionenaustauschchromatographie der entsprechenden Fraktionen war aus technischen Gründen unbedingt nötig, um eine Verunreinigung der massenspektrometrischen Geräte mit Tetrabutylammonium-Ionen zu vermeiden, da diese nur sehr schwer aus den analytischen Geräten zu entfernen sind.

Zur Messung der modifizierten Triphosphate wurde die Elektronensprayionisation (ESI) mit einem Lösungsmittelgemisch aus Reinstwasser und Acetonitril (1:1, v/v) mit folgenden Ionisierungsparametern verwendet:

Source: Capillary Voltage: +4000 V, Nebulizer Gas: 3.0 bar, Dry Gas: 9.0 L/ min, Dry Temperature: 220 °C, Transfer: Funnel RF: 300 Vpp, ISCID Energy: 0 eV, Multiple RF: 300 Vpp, Collision-Cell Energy: 5.0 eV, Collision-RF 1200 Vpp, Transfertime: 40 μs , m/z range: 200-1500, Ion Polarity: negative.

Obwohl die Nucleosid-5'-triphosphate eindeutig in den ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren zu sehen sind, gelang der massenspektroskopische Nachweis mit ESI trotz weiterer Optimierungsversuche nicht. Vielmehr legte weiteres Auffinden von acetyliertem Diphosphat in den ESI-Spektren eine Zersetzung der Verbindungen während der Messung oder deren unvollständige Ionisierung nahe. In *Fast Atom Bombardment* (FAB) Messungen konnte *Burgess* die Fragmentierung natürlicher Triphosphate beobachten. Während die FAB-Messungen zum Verlust der Phosphatgruppen und des Heterocyclus führten, erreichte *Burgess* durch MALDI eine sensitivere Ionisierung, die zu reinen Spektren mit nur einem Hauptsignal führten.^[125]

Für die hier synthetisierten 5'-Triphosphate könnte eine nicht-sensitive Ionisierung im ESI-Spektrum zur Detektion von 5'-Diphosphat in übergeordnetem Maße führen. Daher erfolgte eine Ionisierung der Proben an einem MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer UltrafleXtreme™ Smartbeam II Laser der Firma Bruker. Nach *Kammerer* erwies sich 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) mit einer Konzentration von 5 mg/ mL in einem Gemisch aus 0.1% TFA und Acetonitril im Verhältnis 2:1 (v/ v) als geeignete Matrix und Reinstwasser als Lösungsmittel des Analyten.^[126] Im negativ linearen Modus konnten mit dieser schonenden Ionisierungsmethode die korrekten MALDI-Spektren der gereinigten 8-*N*-Acetyl-*N*-Aryl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **99-102** erhalten werden. Abbildung 58 zeigt das MALDI-Spektrum der Verbindung **101**, welches exemplarisch für die anderen Verbindungen steht.

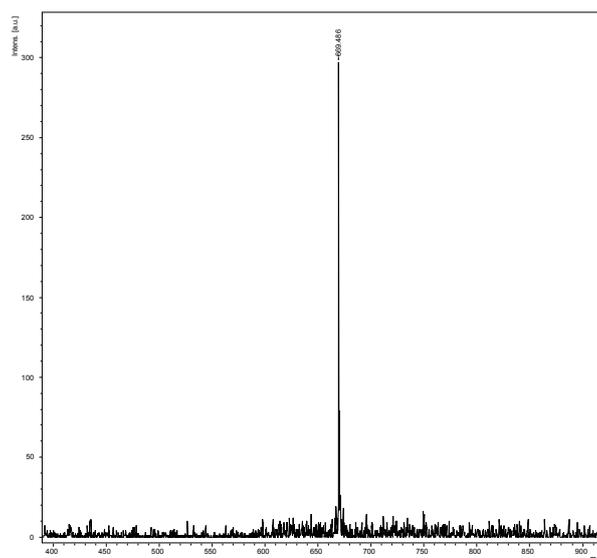


Abbildung 58: MALDI-Spektrum des gereinigten C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **101**

Die gefundene Masse von $M(\text{MALDI}^-, m/z) = 669.486 [M-H]^-$ entspricht der berechneten $M(\text{MALDI}^-, m/z) = 669.051 [M-H]^-$. Weitere Signale, insbesondere Diphosphatsignale, konnten nicht gefunden werden. Diese Beobachtungen lassen folgende Rückschlüsse zu:

- Unter den gewählten Bedingungen war der Nachweis modifizierter Triphosphate mittels ESI nicht möglich.
- Unzureichende Ionisierung oder Fragmentierung der Triphosphate führt im übergeordneten Maße zum Nachweis von Diphosphat oder zur Zersetzung des Triphosphats zu Diphosphat.

Das Protokoll der optimierten Ionisierung zum massenspektrometrischen Nachweis modifizierter 5'-Triphosphate kann Kapitel 7.3 entnommen werden.

4.1.2.3 Synthese der C8-N-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate

Nach erfolgreicher Synthese der C8-N-Acetyl-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **99-102** sollten auch die nicht acetylierten 5'-Triphosphate dargestellt werden. Wie zuvor beschrieben, sind die C8-N-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate aufgrund ihrer Oxidationsempfindlichkeit nicht aus ihren *cycloSal*-Phosphatresten zugänglich.^[42,117] Die Synthese der N-H-modifizierten Triphosphate muss daher über eine orthogonale Schutzgruppenstrategie erfolgen. Dieses Prinzip wird auch während der Phosphoramiditsynthese von Oligonucleotiden angewandt. Dort werden die Aminofunktionen der Nucleobasen oft durch Acetylgruppen blockiert. Daher war die gleichzeitige Verwendung der Acetylgruppe sowohl als Modifikation in den C8-N-Acetyl-N-Arylamin-modifizierten Triphosphaten als auch als Schutzgruppe zur Synthese der C8-N-H-Arylamin-modifizierten Triphosphate naheliegend.

In Anlehnung an die Oligonucleotid-Chemie stellt das selektive Entfernen der Acetylgruppe der bereits synthetisierten C8-N-Acetyl-N-Arylamin-modifizierten Triphosphate eine elegante und komfortable Strategie zur Synthese der C8-N-H-Arylamin-modifizierten Triphosphate dar. Beide Modifikationstypen sind so aus den gleichen Vorstufen zugänglich, sodass auf den zeitlichen und wirtschaftlichen Aufwand einer neuen Syntheseroute verzichtet werden kann.

Obwohl der Begriff der Acetylgruppe einfacher zu verwenden ist, handelt es sich bei der Modifikation aus chemischer Sicht gesehen um ein Derivat eines Carbonsäureamids. Sowohl das Carbonyl-Kohlenstoff-, Sauerstoff- als auch das Stickstoff-Atom des Arylrestes liegen sp^2 -hybridisiert vor. In diesem planaren System bildet sich durch Delokalisierung des freien Elektronenpaars des Stickstoff-Atoms ein partieller Doppelbindungscharakter um die C-N_{Aryl}-Bindungsachse aus. Im Vergleich zu einer einfachen Acetylgruppe ist daher die Hydrolyse im Fall der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierten Triphosphate durch Vorliegen einer resonanzstabilisierten Amid-Bindung erschwert. Zusätzlich handelt es sich um ein tertiär substituiertes Amid, welches neben der sterischen Hinderung vor allem eine verminderte Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu sekundären Amiden, wie sie standardmäßig als acetylgeschützte dA- und dC-Phosphoramidite in der Oligonucleotid-Synthese Verwendung finden, aufweist.

Vorangegangene Arbeiten von *Böge* und *Krüger*, in denen C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-Addukte in DNA eingebaut wurden, zeigten, dass die Acetylgruppe an dieser Position stabil ist.^[42,43] Während der Abspaltung der modifizierten Desoxyguanosin-Oligomere von der Festphase mit Ammoniak konnte keine Deacetylierung beobachtet werden. Bei entsprechend modifizierter 2'-Desoxyadenosin-DNA hingegen wurde eine erhöhte Labilität der Acetylgruppe beobachtet.^[127] Die standardmäßige Abspaltung der modifizierten Desoxyadenosin-Oligomere von der Festphase ging hier mit dem Verlust der Acetyl-Modifikation einher. Erst durch Verwendung milderer Reagenzien gelang hier die Abspaltung der Oligomere von der Festphase ohne Verlust der Modifikation. Obwohl aus chemischer Sicht sowohl bei den acetylierten Desoxyadenosin- als auch den Desoxyguanosin-Oligomeren eine Amid-Bindung vorliegt, zeigen die Ergebnisse, dass die Stabilität der Bindung stark durch die chemische Umgebung beeinflusst wird. Erstmals musste daher die Wirkung der Phosphatgruppen auf die Stabilität der C8-*N*-Acetyl-*N*-aryl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **99-102** untersucht werden.

Um einen ersten Überblick über die Stabilität der Amid-Bindung der synthetisierten Triphosphate zu erhalten, wurden verschiedene Reagenzien an dem C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **101** getestet. Von besonderem Interesse bei der Reaktion war neben dem Erhalt des Arylrestes, die vollständige Deacetylierung. Da die chromatographische Trennung beider polarer Verbindungen

quantitativ nicht durchführbar ist. Dies trifft auch für die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zu, die trotz unterschiedlicher Laufmittelgemische nicht möglich war.

Das Grundprinzip zur Prüfung der erfolgreichen Reaktion beruht auf der Tatsache, dass die Acetylgruppe im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit einem Singulettsignal bei ca. 1.90 ppm und einer erheblichen Signalverbreiterung der übrigen Signale verbunden ist. Eine erfolgreiche Deacetylierung sollte daher mit der Abnahme des Acetylsignals im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und dem gleichzeitigen Auftreten charakteristischer Kopplungsmuster einhergehen. Zur Deacetylierung von C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101** in Abbildung 59 wurden verschiedene Reagenzien bei Rt getestet, die in Tabelle 7 aufgelistet sind.

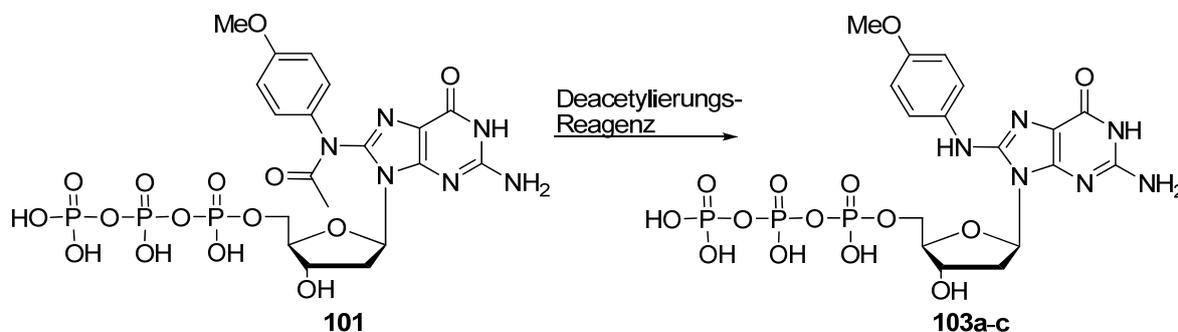


Abbildung 59: Versuche zur Deacetylierung von C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101**

Tabelle 7: Übersicht der Deacetylierungsversuche

Syntheseansatz	Reagenz	Zeit [h]
103a	MeOH/ H ₂ O/ TEA (7:3:1)	18
	MeOH/ H ₂ O/ TEA (7:3:1)	35
	MeOH/ H ₂ O/ TEA (7:3:1)	52
103b	25% NH ₃	18
	25% NH ₃	35
	25% NH ₃	52
103c	AMA-Reagenz	18
	AMA-Reagenz	35

Analog der im Arbeitskreis etablierten Methode zur Deblockierung acetylierter Verbindungen, wurde im Syntheseansatz **103a** ein Gemisch aus MeOH, Wasser und Triethylamin im Verhältnis 7:3:1 bei Rt verwendet. Nach 35 h Reaktionszeit wurde im ^{31}P -NMR-Spektrum neben dem C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-

triphosphat **101** die Bildung eines zweiten Triphosphat-Signalsatzes ähnlicher chemischer Verschiebung detektiert. Diese Beobachtung ging nicht mit einer Abnahme des Acetylsignals im ^1H -NMR-Spektrum einher. Auch nach insgesamt 52 h Reaktionszeit war keine vollständige Deacetylierung im ^1H -NMR-Spektrum erreicht.

Im nächsten Versuch **103b** wurde konzentrierte Ammoniak-Lösung als Deacetylierungs-Reagenz getestet, da sie breite Anwendung in der Oligonucleotid-Synthese findet. Nach 18 h Reaktionszeit wurde eine teilweise Abspaltung der Acetylgruppe im ^1H -NMR-Spektrum sowie ebenfalls die Bildung einer zweiten Triphosphat-Spezies im ^{31}P -NMR-Spektrum beobachtet. Ein quantitativer Umsatz der Reaktion konnte jedoch selbst nach insgesamt 52 h nicht erfasst werden.

Die Mischung von konz. Ammoniak und 40% Methylamin in Wasser im Verhältnis 1:1 (AMA-Reagenz) verspricht innerhalb der Ultrafast Methodik bei der Deblockierung von Oligonucleotiden eine Verkürzung der Reaktionszeit auf eine halbe Stunde. Bei der Verwendung dieses Gemisches zur Synthese von **103c**, konnte bereits nach 18 h eine deutliche Abnahme des Acetyl-Signals im ^1H -NMR-Spektrum sowie die Ausbildung eines zweiten Signal-Satzes für eine Triphosphat-Spezies im ^{31}P -NMR-Spektrum beobachtet werden. Nach insgesamt 35 h deutete sich jedoch eine Zersetzung im ^1H -NMR-Spektrum an, da der Verlust des Acetyl-Signals gleichzeitig mit einer Intensitätsverringerng der anderen Protonen-Signale einherging. Diese Vermutung deckt sich mit den Beobachtungen des ^{31}P -NMR-Spektrums aus Abbildung 60.

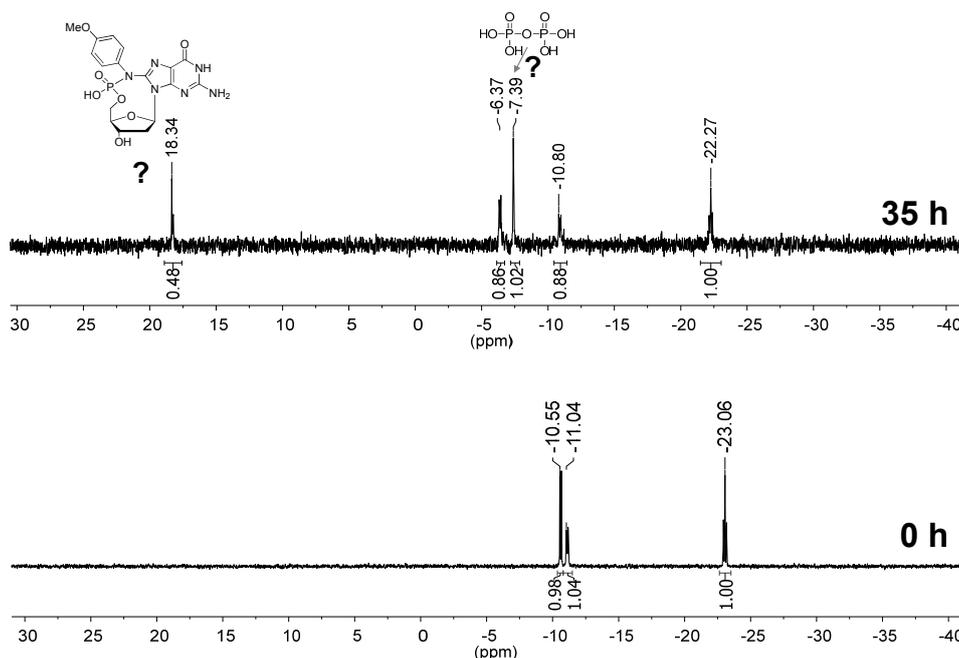


Abbildung 60: ^{31}P -NMR-Spektren unter Verwendung von AMA-Reagenz

Während das Pseudotriplett des P_{β} -Atoms der Ausgangssubstanz bei -23.06 ppm nach 35 h kaum verschoben wird, sind bei -10.80 ppm und -6.37 ppm neue Duplett-Signale mit ähnlichem Integral entstanden. Der neue Signalsatz könnte durch das gewünschte *NH*-Triphosphat entstanden sein. Weitere Singulett-Signale deuten allerdings auf eine zeitgleich abgelaufene Zersetzungsreaktion hin, die übereinstimmend mit den Beobachtungen aus dem ^1H -NMR-Spektrum sind. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem Signal von 18.34 ppm und dem Integral von 0.48 um ein Phosphoramidat. Dieses könnte durch intramolekulare Reaktion des α -Phosphoratoms mit dem Arylamin entstanden sein. Diese Vermutung wird durch das Singulett bei 7.39 ppm mit einem Integral von 1.02 gestützt, bei dem es sich um Pyrophosphat handeln könnte, welches bei einer solchen nucleophilen Substitutionsreaktion freigesetzt wird.

Um eventuell entstandenes Produkt zu isolieren, wurde der Reaktionsansatz durch *ultra-performance flash* Chromatographie an RP-18-Silicagel gereinigt. Die Detektion einer Phosphor-Spezies im ^{31}P -NMR-Spektrum nach der Chromatographie blieb jedoch erfolglos. Stattdessen wurde das UV-aktive *N*-Methyl-4-methoxyphenylamin in Form eines Methylammonium-Salzes isoliert, wie das ^1H -NMR-Spektrum in Abbildung 61 zeigt.

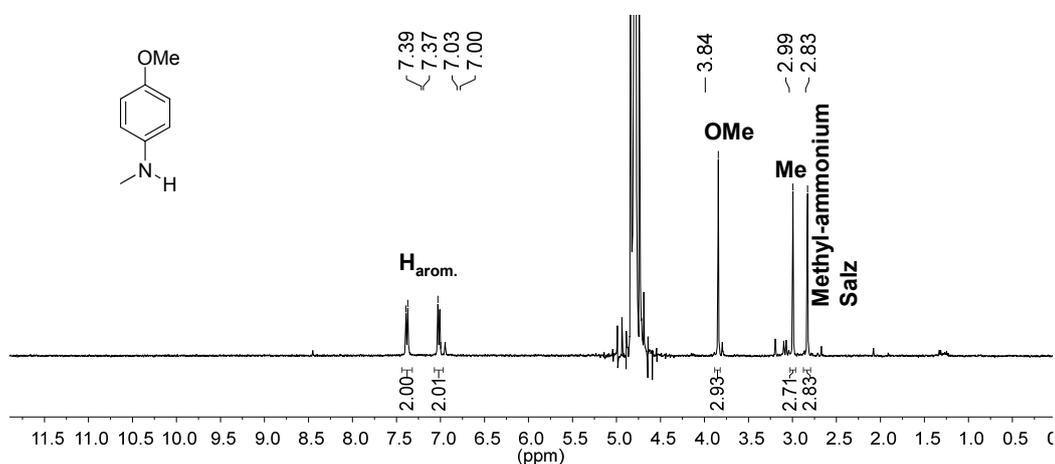


Abbildung 61: ^1H -NMR-Spektrum nach Versuch zur Synthese von **103c** in D_2O

Eine ähnliche Zersetzung während der Abspaltung von Oligonucleotiden ist bei *Reddy* durch Aminierung Benzoyl-geschützter Cytosine als Konkurrenzreaktion zur Hydrolyse beschrieben und könnte hier in ähnlicher Weise erfolgt sein.^[128] Wahrscheinlicher ist jedoch eine Dearylierung des entstehenden Produkts nach erfolgreicher Deacetylierung mit AMA aufgrund der basischen Reaktionsbedingungen. Eine Labilität von *N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosinen im Basischen ist durch *Johnson* beschrieben und

konnte durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel verhindert werden.^[118]

Obwohl es zur vollständigen Zersetzung der Verbindung kam, konnten aus diesen Ergebnissen wertvolle Rückschlüsse für die weitere Synthese der C8-N-H-Arylamin-modifizierten Triphosphate gezogen werden:

- Eine Deacetylierung durch Triethylamin ist nicht möglich.
- Die Deacetylierung durch Ammoniak ist unvollständig und führt zu Mischfraktionen aus acetyliertem und nicht acetyliertem Triphosphat.
- Mit dem basischen AMA-Reagenz ist eine vollständige Entfernung der Acetylgruppe nach 35 h bei Rt möglich. Die bisher verwendeten Reaktionsbedingungen führen jedoch zur Zersetzung des Produkts.

Infolgedessen sollte die Deacetylierung der C8-N-Acetyl-N-phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate mit dem AMA-Reagenz in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol durchgeführt werden und die Reaktionszeit durch Erhöhung der Temperatur verkürzt werden. Um die Thermostabilität der Verbindungen zu überprüfen, wurde ein Gemisch aus 5'-Mono-, 5'-Di- und 5'-Triphosphat des C8-N-Acetyl-N-phenyl-2'-desoxyguanosin-Addukts in Wasser erhitzt. Nach jeweils 5 min bei 54 °C, 72 °C und 95 °C wurde ein Aliquot entnommen, um die mögliche Hydrolyse durch RP-HPLC beobachten zu können.

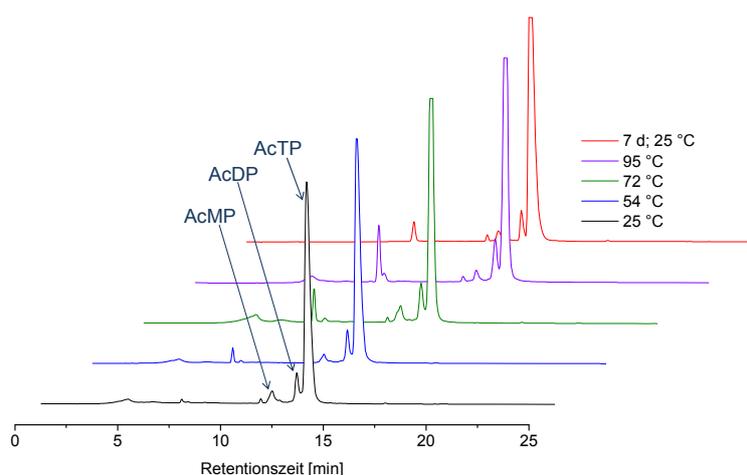


Abbildung 62: RP-HPLC-Chromatogramme der Hydrolysestudie

Abbildung 62 zeigt die zugehörigen RP-HPLC-Chromatogramme der Hydrolysestudie. Das Verhältnis zwischen 5'-Mono- (AcMP), Di- (AcDP) und Triphosphats (AcTP) verändert sich nicht. Eine Hydrolyse des Triphosphats hätte eine Erhöhung des Integrals

für das AcDPs bzw. AcMPs zur Folge. Auch nach weiteren 7 Tagen bei Rt bleiben die Verbindungen gegenüber Hydrolyse stabil. Bei dem kleinen Signal um 7.5 ppm scheint es sich nicht um ein Zersetzungsprodukt, sondern um eine Kontamination zu handeln, da das Integral stark schwankt.

Mittels der optimierten Parameter konnte die Deacetylierung bei einer Temperatur von 55 °C mit AMA-Reagenz und 0.25 M Mercaptoethanol auf eine Stunde verkürzt werden und führte zur erfolgreichen Synthese der C8-N-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate. Das ^{31}P -NMR-Spektrum von C8-N-H-4-Methylarylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat in Abbildung 63 zeigt, dass die Verbindung frei von phosphorhaltigen Nebenprodukten ist.

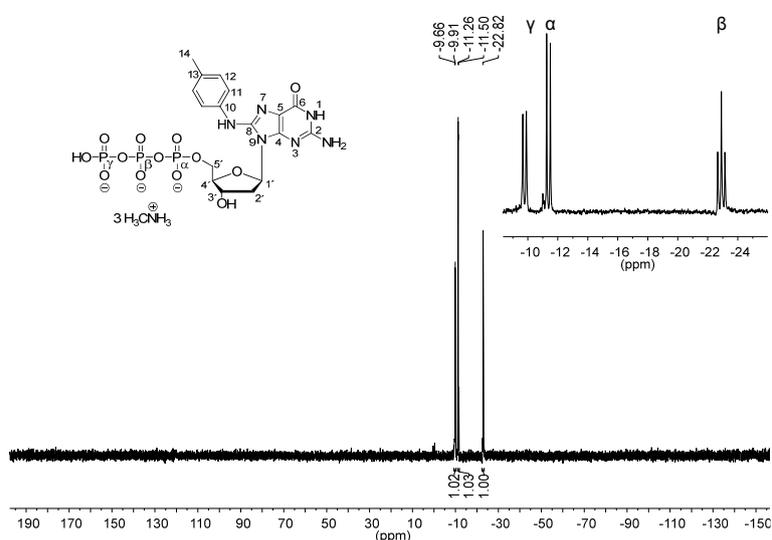


Abbildung 63: ^{31}P -NMR-Spektrum des C8-N-H-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **105** in D_2O

Das ^1H -NMR-Spektrum von C8-N-H-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **104** in Abbildung 64 bestätigt weiterhin, dass die Acetylgruppe bei 1.90 ppm vollständig entfernt werden konnte. Dadurch geht die übliche Verbreiterung der anderen Protonen-Signale verloren und ein Kopplungsmuster wird sichtbar. Wie die im Spektrum bei 3.80 ppm und 2.80 ppm hervorgehobenen Protonensignale beweisen, konnte das 2-Mercaptoethanol jedoch nicht vollständig durch *ultra-performance flash* RP-Chromatographie entfernt werden.

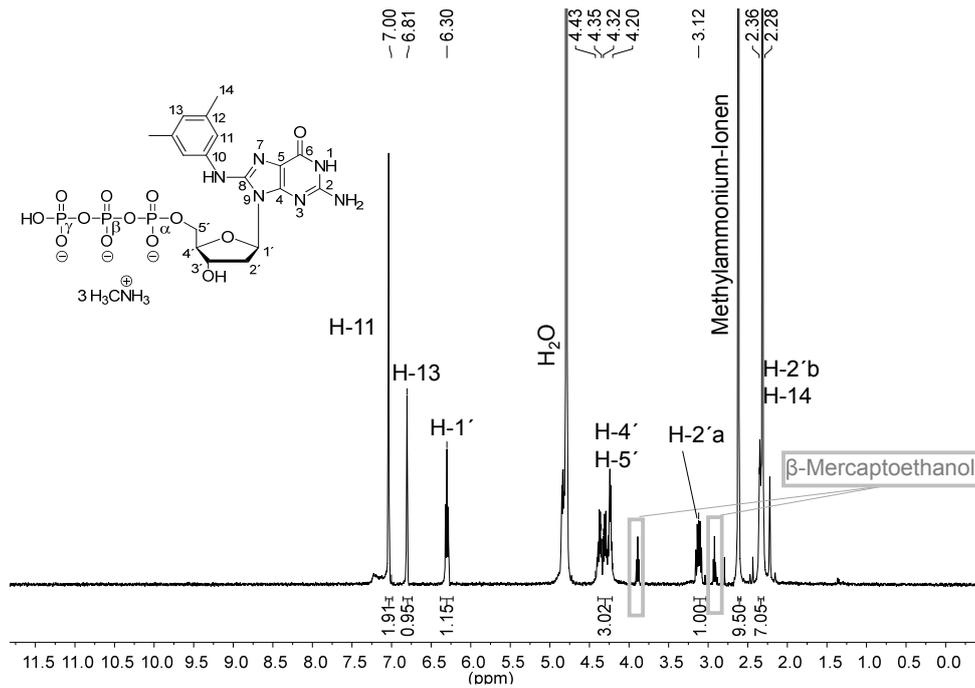


Abbildung 64: ¹H-NMR-Spektrum des C8-*N*-H-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **104** mit 2-Mercaptoethanol

Da die synthetisierten *NH*-Triphosphate später in enzymkatalysierten Reaktionen verwendet werden sollten und 2-Mercaptoethanol eine Denaturierung von Proteinen verursachen kann, musste eine weitere Reinigung erfolgen. Bemühungen, 2-Mercaptoethanol durch Coevaporation mit Wasser, intensives Trocknen im Hochvakuum oder Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex von den *NH*-Triphosphaten zu entfernen, scheiterten angesichts ähnlicher Polaritäten der Komponenten. In Folge dessen wurde eine Trennung der Verbindungen anhand von Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 verfolgt. Das in Abbildung 65 gezeigte ¹H-NMR-Spektrum des C8-*N*-H-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **105** beweist, dass dadurch 2-Mercaptoethanol entfernt werden konnte. Erstmals konnten so die C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate erfolgreich dargestellt und isoliert werden.

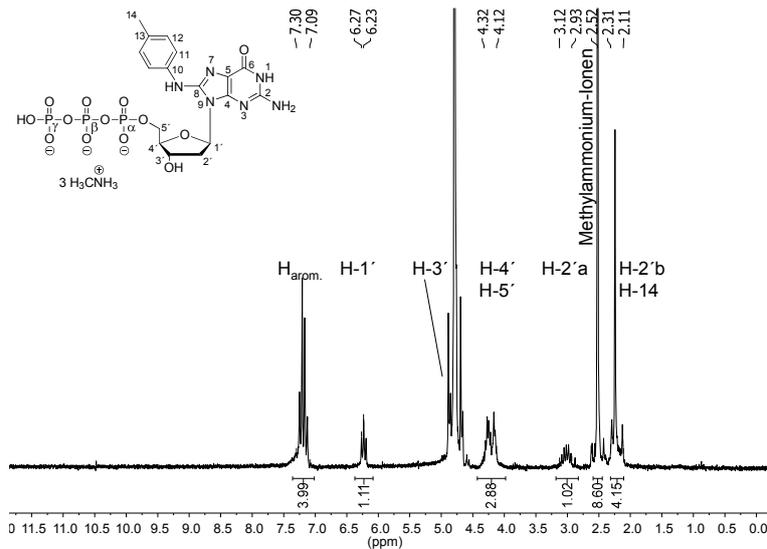


Abbildung 65: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des gereinigten C8-N-H-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **105** in D_2O

Zur Charakterisierung wurde die bereits optimierte MALDI-Methode der C8-N-Acetyl-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate genutzt. Wie das MALDI-Spektrum des C8-N-H-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **106** Abbildung 66 zeigt, stimmt die berechnete Masse $M(\text{MALDI}^-, m/z) = 627.0405$ $[\text{M-H}]^-$ gut mit der gefundenen Masse $M(\text{MALDI}^-, m/z) = 627.158$ $[\text{M-H}]^-$ überein. In Gegenwart eines Natrium- und Methylammonium-Ions entspricht die Masse der Verbindung $M(\text{MALDI}^-, m/z) = 681.038$.

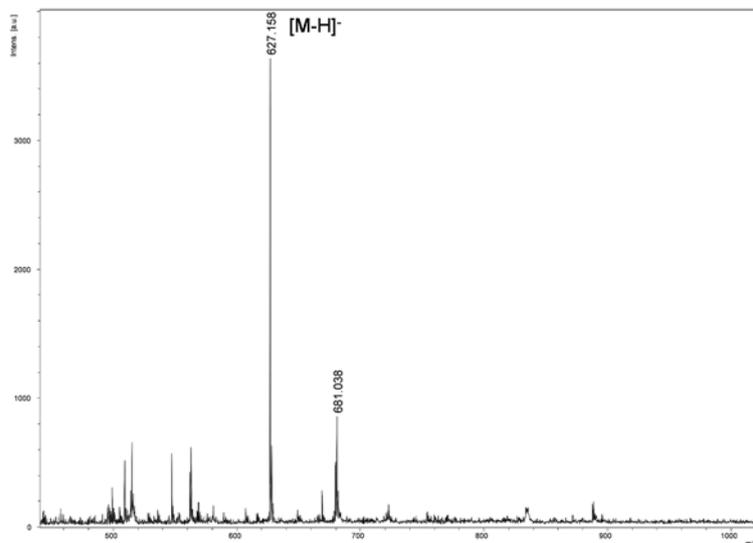


Abbildung 66: MALDI-Spektrum des C8-N-H-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **106**

Anhand der RP-HPLC-Chromatogramme wurden die isolierten Verbindungen auf ihre Reinheit hin überprüft. Das RP-HPLC-Chromatogramm des C8-N-H-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **106** ist in Abbildung 67 dargestellt.

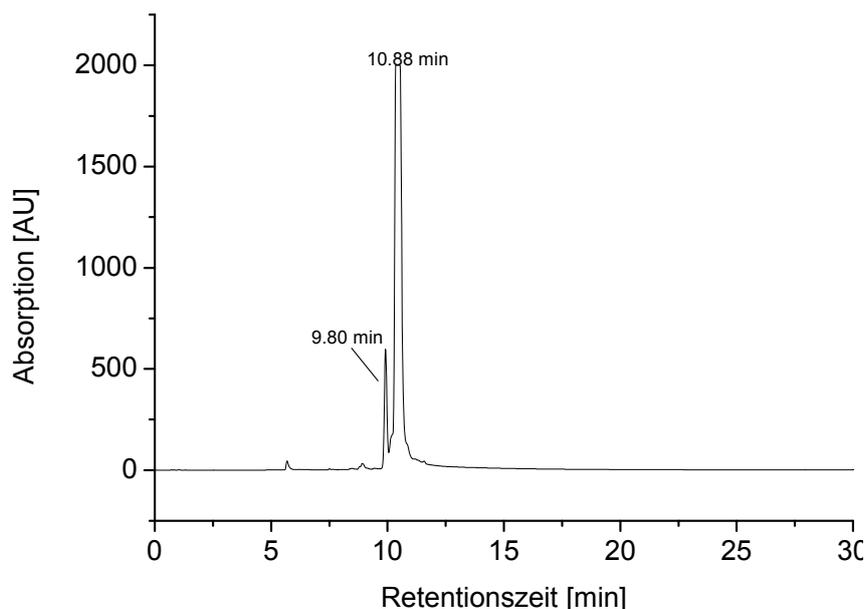


Abbildung 67: RP-HPLC-Chromatogramm des gereinigten C8-N-H-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **106**

Das Produkt besitzt eine Retentionszeit von 10.88 min, während eine kleine Verunreinigung bei einer Retentionszeit von 9.80 min beobachtet werden kann. Ob es sich dabei tatsächlich um die in den ESI-Spektren nachgewiesenen 5'-Diphosphate handelt, konnte im Laufe dieser Arbeit nicht mehr bewiesen werden.

Die C8-N-H-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **104-107** wurden nach Größenausschlusschromatographie in Form ihrer Methylammonium-Salze erhalten. Für die Methylammonium-Ionen konnte über die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren eine Anzahl von drei ermittelt werden. Versuche die Gegenionen durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex in Ammonium-Ionen zu überführen, scheiterten. Aufgrund der freien Arylamingruppe wären ionische Wechselwirkungen zwischen den Verbindungen und der Matrix denkbar, weshalb es nicht möglich war die Verbindungen von der Dowex-Matrix zu lösen.

Zusammenfassend konnten die C8-N-H-Aryl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **104-107** durch Verwendung des AMA-Reagenzes und durch Zusatz von 0.25 M 2-Mercaptoethanol bei 55 °C in sehr guten Ausbeuten, wie Tabelle 8 zeigt, aus ihren acetylierten Vorstufen erhalten werden. Die für die biochemischen Untersuchungen benötigten Reinheiten konnten durch anschließende Größenausschlusschromatographie erreicht werden.

Tabelle 8: Ausbeuten der *NH*-Aryl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate **104-107**

Produkt	Aryl	Ausbeute
107	Phenyl	89%
105	4-Methylphenyl	96%
106	4-Methoxyphenyl	89%
104	3,5-Dimethylphenyl	88%

4.1.3 Strukturelle Charakterisierung der C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate

Das unterschiedliche kanzerogene Potential von C8-*N*-**Acetyl**-*N*-Arylamin- und C8-*N*-**H**-Arylamin-modifizierter DNA wird auf ihre unterschiedlichen Konformationen der *N*-glycosidischen Bindung zurückgeführt, die sich während der Replikation unterschiedlich auf DNA-Polymerasen auswirken.^[6,7] Während die Konformationen von C8-*N*-Arylamin-Modifikationen in Nucleosiden und in DNA-Polymeren bekannt sind, sind die entsprechenden 5'-Triphosphate unzureichend untersucht.

Um die bevorzugten Konformationen der in Kapitel 4.1.2.2 und 4.1.2.3 synthetisierten C8-*N*-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate zu bestimmen, sollten Strukturuntersuchungen durchgeführt werden, die Aussagen über die Konformationen der Modifikation zulassen. Für die strukturelle Charakterisierung wurde ein theoretischer und ein experimenteller Ansatz gewählt: Die theoretische Konformationsanalyse wurde mittels thermodynamischer Berechnungen durchgeführt, während die experimentelle Analyse spektroskopisch erfolgte.

Zur Verständlichkeit werden die verschiedenen Konformationen der C8-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate durch ihre Torsionswinkel in Abbildung 68 beschrieben. Die hier relevanten Torsionswinkel δ , χ , α' , β' und γ' werden im Folgenden näher erläutert:

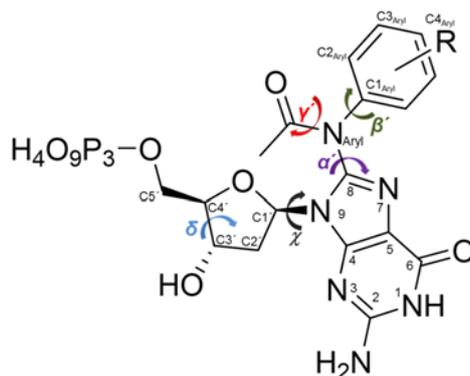


Abbildung 68: Relevante Torsionswinkel C8-modifizierter 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate

Torsionswinkel δ

Bei der Betrachtung der Ringatome C1'-O4'-C4' ergeben sich verschiedene Konformationen der Zuckereinheit. Bei Raumtemperatur dominieren die C2'-endo und C3'-endo-Konformation, bei denen das C2'- bzw. das C3'-Atom aus der Ebene des O5'-Atoms zeigt (Abbildung 69).

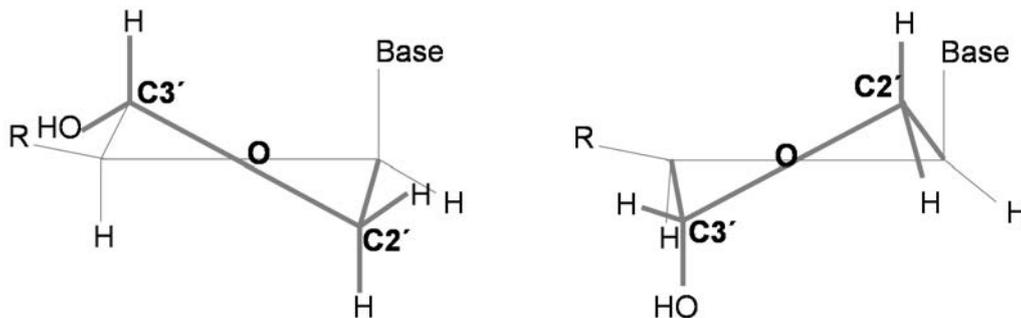


Abbildung 69: C3'-endo und C2'-endo Zucker-Konformationen

Die beiden Zucker-Konformationen stehen mit einer geringen Energiebarriere von ca. 20 kJ/ mol im dynamischen Gleichgewicht. Dennoch liegt A-DNA bevorzugt in der C3'-endo-Konformation vor, während in B-DNA die C2'-endo-Konformation dominiert. Die Zuordnung der Zucker-Konformation im Molekül erfolgt über eine relativ aufwändige Bestimmung des Phasenwinkels der Pseudorotation, der über die fünf inneren Torsionswinkel des Zuckerrings berechnet werden kann. Eine gute Näherung kann aber durch die Bestimmung des Torsionswinkels δ (C5'-C4'-C3'-O3') erreicht werden. Da er mit dem Phasenwinkel der Pseudorotation korreliert, wird er auch als Scharnierwinkel bezeichnet. Liegt der Scharnierwinkel δ bei 120-160° handelt es sich um einen C2'-endo-Zucker, während ein Torsionswinkel von 79-95° für die C3'-endo-Konformation charakteristisch ist.^[129,130]

Torsionswinkel χ

Zusätzlich kann auch die Base relativ zum Zucker verschiedene Konformationen annehmen, die durch den Torsionswinkel χ (O4'-C1'-N9-C4) mit $\chi_{\text{anti}} = 180^\circ \pm 90^\circ$; $\chi_{\text{syn}} = 0^\circ \pm 90^\circ$ beschrieben werden. Allgemein liegen Pyrimidine hauptsächlich wegen der repulsiven Wechselwirkungen zwischen dem O2 und dem Sauerstoffatom der 5'-Phosphatgruppe in der *anti*-Konformation vor. Für Purinderivate ohne eine Aminogruppe an der Position 2 wird die *anti*-Konformation bevorzugt. Bei 2'-Desoxyguanosinphosphaten ist das Gleichgewicht breiter zwischen *anti*- und *syn*-Konformation verteilt. Dies ist

durch die elektrostatischen Wechselwirkungen der *N*2-Aminogruppe mit dem Sauerstoffatom der 5'-Phosphatgruppe begründet. So konnten Konformationen des *syn*-Typs sowohl in Lösung als auch in kristalliner Form gefunden werden.^[130,131] Die durch C8-*N*-Arylamin-Modifikationen hervorgerufenen konformativen Änderungen der *N*-glycosidischen Bindung werden in Zusammenhang mit einer Reihe biologischer Veränderungen des DNA-Reparatursystems und der DNA-Replikation gebracht.^[56,57]

Torsionswinkel α' , β' , γ'

Charakteristisch für C8-modifizierte 2'-Desoxyguanosin-Addukte sind außerdem die Torsionswinkel α' (N9-C8-N_{Aryl}-C1_{Aryl}) und β' (C8-N_{Aryl}-C1_{Aryl}-C2_{Aryl}), die sich jeweils zwischen den zwei Flächen um die Bindungsachse der vier Atome spannen. Trägt die Verbindung eine Acetylgruppe, wird die Geometrie zusätzlich durch den Torsionswinkel γ' (C8-N_{Aryl}-C_{carbonyl}-C_{Methyl}) beschrieben.

4.1.3.1 Thermodynamische Berechnungen der C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate

Die thermodynamischen Berechnungen können sicherlich keine exakten Aussagen zur Molekülstruktur treffen, spiegeln jedoch anhand quantenchemischer Berechnungen gut die Geometrie der Moleküle wieder. Mithilfe von GaussView 5.0.8 wurden die Molekülstrukturen der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin- und C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate erstellt und anschließend deren Energieminima durch das Programmsystem Gaussian09 berechnet.^[132,133] Hierfür wurde das *self-consistent reaction field* (scrf)-Potential mit dem *polarizable continuum model* (pcm) angewendet, um Wasser als Lösungsmittel zu berücksichtigen. Die Strukturen wurden mit der Hartree-Fock-Methode 6-31G voroptimiert und anschließend das semi-empirische Hybridfunktional B3LYP der Dichtefunktionaltheorie (DFT) mit dem Basissatz 6-311G(d,p) angewandt.

Neben den Modifikationen C8-*N*-H-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **107** und C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **99** wurden die unmodifizierten Purin-Nucleotide 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat und 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat als Kontrollen mitberechnet, um die Ergebnisse verifizieren zu können. Von allen Molekülen wurde das Energieminimum der *N*-glycosidischen Bindung in den

beiden häufigsten Zucker-Konformationen C2'- und C3'-endo bestimmt. Die berechneten Torsionswinkel und Energiewerte sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die Energien müssen in Relation zueinander betrachtet werden, da es sich nicht um absolute Werte handelt.

Tabelle 9: Berechnete Energien und Torsionswinkel

Konformer	χ [°]	δ [°]	α' [°]	β' [°]	γ' [°]	E [kJ/ mol]
dATPa	anti, -111	C2'-endo, +146	-	-	-	-6805347
dATPb	syn, +68	C2'-endo, +152	-	-	-	-6805330
dATPc	anti, -116	C3'-endo, +84	-	-	-	-6805325
dATPd	syn, +65	C3'-endo, +90	-	-	-	-6805319
dGTPa	anti, -112	C2'-endo, +146	-	-	-	-7002966
dGTPb	syn, +72	C2'-endo, +156	-	-	-	-7002955
dGTPc	anti, -104	C3'-endo, +87	-	-	-	-7002943
dGTPd	syn, +66	C3'-endo, +92	-	-	-	-7002959
107a	anti, -115	C2'-endo, +151	-120	+29	-	-7755107
107b	syn, +76	C2'-endo, +156	-171	+6	-	-7755103
107c	anti, -134	C3'-endo, +99	+172	-8	-	-7755106
107d	syn, +49	C3'-endo, +87	+167	-9	-	-7755114
99a	anti, -101	C2'-endo, +134	-83	-32	-16	-8155990
99b	syn, +70	C2'-endo, +157	-81	-36	-9	-8155993
99c	anti, -101	C3'-endo, +92	-81	-36	-16	-8155968
99d	syn, -62	C3'-endo, +88	-88	-29	-17	-8155992

Konformation dATP

Für dATP konnte eine Präferenz der *anti*-Konformation des C2'-endo-Zuckers (Struktur **dATPa**) mit einer Energiedifferenz von 17 kJ/ mol zur *syn*-Struktur **dATPb** gefunden werden. Beide 3'-endo Konformationen des dATPs weisen höhere Energiewerte auf, wobei die *syn*-Struktur **dATPd** das Energiemaximum bildet. Dies bestätigt die bei dATP gefundene Dominanz der *anti*-Konformation.

Konformation dGTP

Die Energiedifferenz in Tabelle 9 für beide *N*-glycosidischen Konformationen von dGTP ist geringer. Die *anti*-Struktur C2'-endo Konformation **dGTPa** in Abbildung 70 ist nur noch mit 11 kJ/ mol gegenüber dem *syn*-Typ **dGTPb** derselben Zuckerkonformation bevorzugt. Diese Beobachtungen stimmen mit dem bei 2'-Desoxyguanosinphosphaten beschriebenen Gleichgewicht überein, welches breiter zwischen *anti*- und *syn*-Konformation verteilt ist.

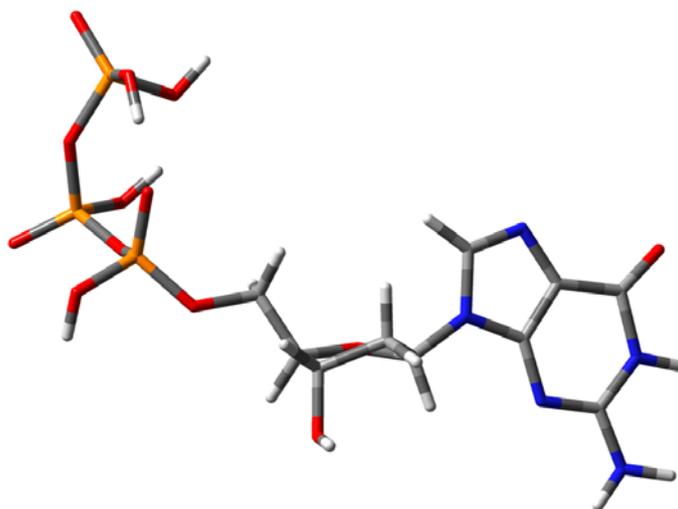


Abbildung 70: Konformation der energieärmsten *anti*-Konformation des 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphats **dGTPa**

Gegenüber dem *syn*-Typ des C3'-endo Konformers **dGTPd** in Abbildung 71 sinkt ΔE sogar auf 8 kJ/ mol. Die energieärmste *syn*-Konformation **dGTPd** in Abbildung 71 zeigt keine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen dem Guanin und den Phosphatresten. Sterische Wechselwirkungen zwischen den Resten werden vermieden, indem die Phosphatreste in die hintere Ebene gedreht sind.

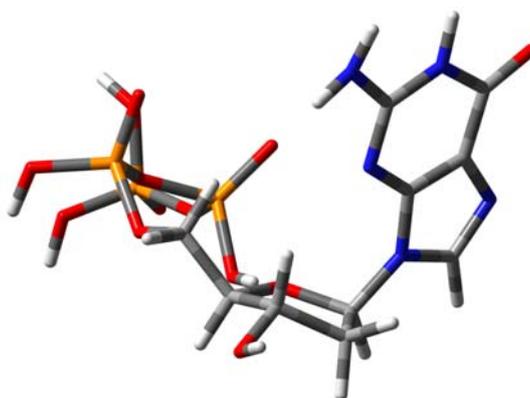


Abbildung 71: Konformation der energieärmsten *syn*-Konformation des 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphats **dGTPd**

Wie auch für die folgenden C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate bestimmt werden konnte, ist die Bindungslänge zwischen der exocyclischen Aminogruppe und C2 des Guanins auf 1.33 Ångström (Å) verkürzt. Kovalente Einfachbindungen zwischen beiden Atomen liegen üblicherweise im Bereich von 1.47 Å, sodass von einer Konjugation des freien Elektronenpaars des Stickstoffatoms zum aromatischen System der Nucleobase ausgegangen werden kann.

C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate, Konformation 107

Für das C8-*N*-H-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **107** weist die *syn*-Konformation des C3'-endo-Zuckers **107d** mit einer Energiedifferenz von 7 kJ/mol zum nächsten Konformer die niedrigste Energie aller Konformationen auf. Bei der Betrachtung von Abbildung 72 fällt ein verkürzter Abstand zwischen einem der Wasserstoffatome der exocyclischen Aminogruppe und dem Sauerstoffatom des β -Phosphoratoms auf. Die Messung ergibt einen Atomabstand von 2.03 Å, der per Definition in den Bindungslängenabstand einer Wasserstoffbrücke mit 1.2-3.0 Å fällt. Diese intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung wird durch die C3'-endo-Konformation des Zuckers ermöglicht, wodurch die genannten Atome in räumliche Nähe gebracht werden. Neben der Wasserstoffbrücke mit einem Energiegewinn von ca. 4 kJ/mol kann auch der Torsionswinkel von $\chi_{syn} = 49^\circ$ statt $\chi_{anti} = -134^\circ$ als energetisch günstiger beschrieben werden, sodass keine sterische Wechselwirkung zwischen den Phosphatgruppen und dem Arylrest entsteht.

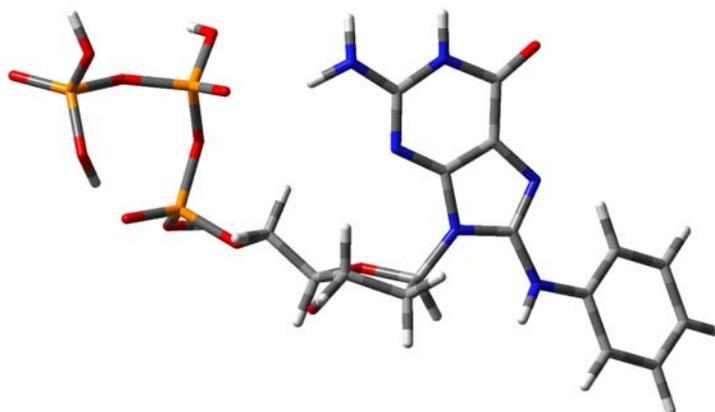


Abbildung 72: Konformation der energieärmsten *syn*-Konformation des C8-*N*-H-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **107d**

Die Energiebeträge zwischen den übrigen Konformeren des C8-*N*-H-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **107** sind geringer. Die energieärmste *anti*-Struktur wird durch die C2'-endo-Konformation **107a** (Abbildung 73) mit nur einer Energiedifferenz von 4 kJ/mol zur *syn*-Konformation der C2'-endo-Struktur **107b** gebildet. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke, insbesondere durch das Wasserstoffatom des C8-N_{aryl}H, konnte nicht beobachtet werden.

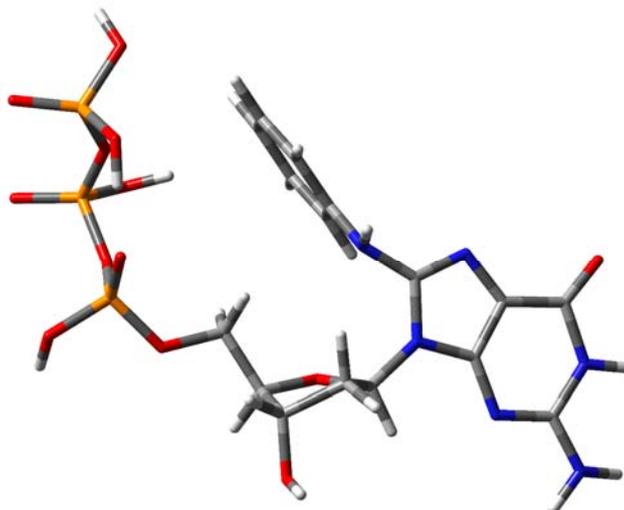


Abbildung 73: Konformation der energieärmsten *anti*-Konformation des C8-*N*-H-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **107a**

C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate, Konformation **99**

In Kapitel 4.1.1, 4.1.1.2 und 4.1.2.3 wurde der Doppelbindungscharakter der Amidbindung bereits ausführlicher diskutiert. Während der Synthese der 5'-Triphosphate konnte eine erhöhte Stabilität der Amidbindung und eine Verbreiterung der NMR-Signale beobachtet werden. Für die thermodynamischen Berechnungen von **99** konnte der Doppelbindungscharakter der Amidbindung durch die Länge der C-N_{Aryl}-Bindung charakterisiert und auf 1.38 Å bestimmt werden. Damit ist die Bindungslänge gegenüber einer normalen C-N-Bindung mit 1.47 Å verkürzt. Dies geht mit einer Abnahme des Torsionswinkels β' einher, wie im Vergleich zwischen Verbindung **99** und **107** in Tabelle 9 beobachtet werden kann. Das *syn/anti*-Gleichgewicht des C8-*N*-Acetyl-*N*-phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **99** ist unabhängig von der Konformation des Zuckers und liegt auf Seiten der *syn*-Konformere **99b** und **99d**. Der Abstand zwischen dem Sauerstoffatom des α -Phosphoratoms und dem Wasserstoffatom H2 des Guanins in Abbildung 74 konnte mit 1.99 Å einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zugeordnet werden.

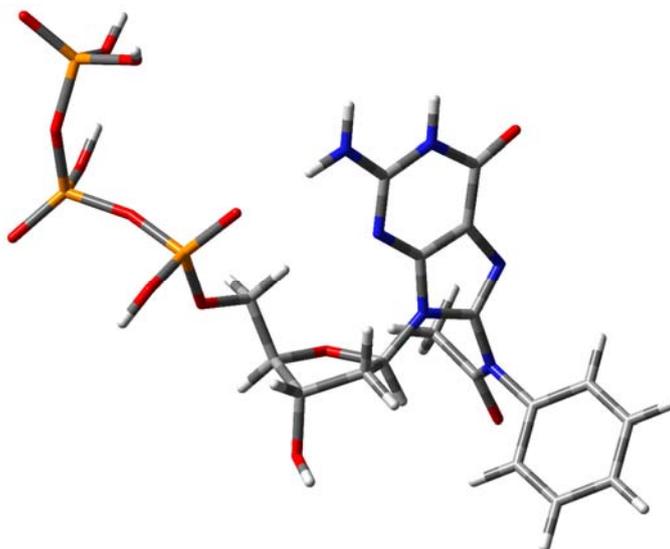


Abbildung 74: Konformation der energieärmsten *syn*-Konformation des C8-*N*-Acetyl-*N*-phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **99b**

Mit nur einer Differenz von $\Delta E = 3 \text{ kJ/mol}$ besitzt das *anti*-Konformer **99a** einen ähnlichen Energiewert wie die *syn*-Konformere. Abbildung 75 zeigt die energieärmste *anti*-Konformation **99a**. Es findet keine Stabilisierung durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen statt und die Struktureinheiten sind räumlich getrennt angeordnet, um sterische Wechselwirkungen zwischen der Aryl-Einheit und dem Phosphatrest zu umgehen. Dies wird an dem Scharnierwinkel δ deutlich, der mit 134° für eine C2'-Konformation ungewöhnlich niedrig liegt.

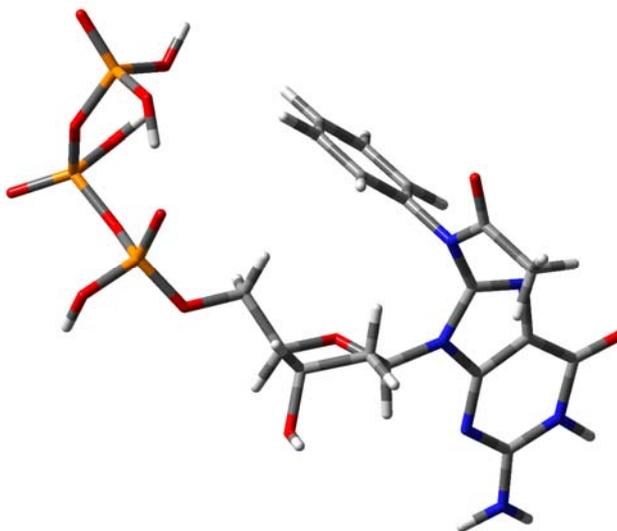


Abbildung 75: Konformation der energieärmsten *anti*-Konformation des C8-*N*-Acetyl-*N*-phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphats **99a**

Interessanterweise ist das Konformations-Gleichgewicht dennoch zugunsten der *syn*-Konformationen verschoben, da sie im Vergleich zum *anti*-Konformer **99c** um 25 kJ/mol energieärmer sind.

Zusammenfassung der thermodynamischen Berechnungen

Die mitgeführten Kontrollrechnungen der unmodifizierten Purine dATP und dGTP erfüllten die Erwartungen. Wie in der Literatur beschrieben, konnte für dATP ein Gleichgewicht auf Seiten des *anti*-Typs gefunden werden. Der Energieunterschied der Berechnungen für das *syn/anti*-Gleichgewicht betrug 17 kJ. Das *syn/anti*-Gleichgewicht für dGTP wird in der Literatur als breiter verteilt beschrieben und machte sich in einer Absenkung der Energiedifferenz auf 11 kJ/mol im Vergleich zum dATP bemerkbar. Unter diesen Umständen konnten die thermodynamischen Berechnungen für die modifizierten Triphosphate angewendet werden.

Die thermodynamische Konformationsanalyse der modifizierten Verbindungen ergab ein energetisches Minimum der *syn*-Konformation sowohl für das C8-*N*-**Acetyl**-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat als auch für das C8-*N*-**H**-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat. Die Präferenz der *syn*-Konformationen unterscheidet sich aber hinsichtlich der Zuckerkonformation und der Energiedifferenz zur nächsten energiereicheren *anti*-Konformation.

Das C8-*N*-**H**-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat zeigt nur für die *syn*-Konformationen der C3'-endo Ribose ein Energieminimum. Die Differenz zur nächsten energiereicheren Konformation liegt bei 7 kJ/mol und kann durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung erklärt werden. Für das C8-*N*-**Acetyl**-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat weisen beide *syn*-Typen die geringsten Energien auf und sind daher unabhängig von der Konformation des Zuckers. Allerdings ist der Unterschied zur nächsten energiereicheren *anti*-Konformation mit einer Energiedifferenz von 3 kJ/mol gering. Die Energiedifferenz der energieärmsten *syn*-Konformation zu energiereichsten *anti*-Konformation beträgt dennoch 25 kJ/mol.

4.1.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen der C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate

Die in Kapitel 4.1.3.1 erhaltenen Daten zur Bestimmung der Konformation der *N*-glycosidischen Bindung der C8-*N*-Arylamin-modifizierten 5'-Triphosphate beruhen auf semi-empirischen Berechnungsverfahren. Um die erhaltenen Ergebnisse zu ergänzen, sollten experimentelle Daten aus NMR-Konformationsanalysen gewonnen werden. Hierfür wurden Kopplungen im Raum durch NOE-Spektroskopie erfasst.

Im zweidimensionalen H,H-NOESY-Experiment (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) werden keine skalare Kopplungen, sondern die durch den Raum verursachte Magnetisierung zwischen Protonenkernen beobachtet. Die räumliche Korrelation zwischen den Protonen kann mit einem Abstand bis von zu 5 Å hergestellt werden. In C8-*N*-Arylamin-modifizierten 5'-Triphosphaten sollte die strukturelle Beziehung zwischen den Protonen im NOESY-Experiment zur Bestimmung der Konformation der *N*-glycosidischen Bindung genutzt werden. Zur besseren Übersichtlichkeit sind im Folgenden Ausschnitte der relevanten Kopplungen dargestellt.

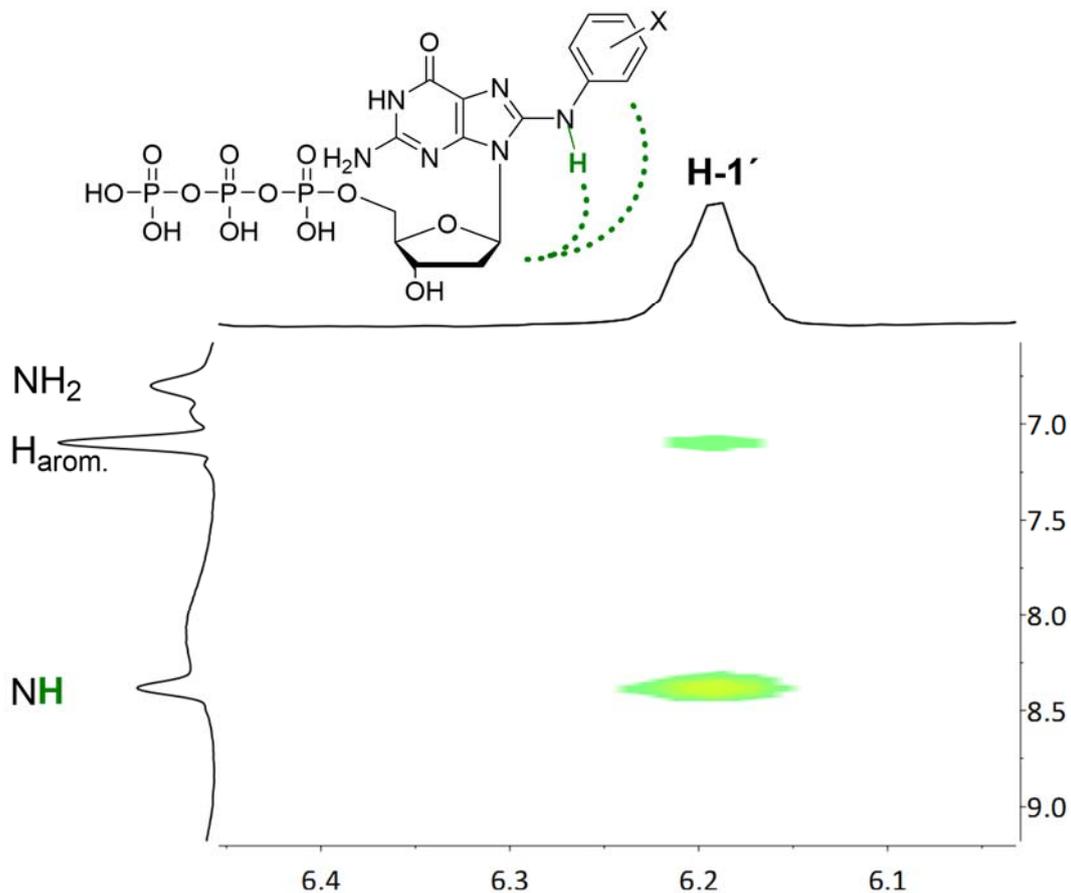


Abbildung 76: Relevante Kopplungen im NOESY-NMR-Spektrum von C8-*N*-H-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **104**

Abbildung 76 zeigt einen Ausschnitt des NOESY-NMR-Spektrums von C8-*N*-H-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **104** in deuteriertem DMSO. Das H-1'-Proton der 2'-Desoxyribose koppelt sowohl mit den aromatischen Protonen als auch mit dem *NH*-Proton. Noch deutlicher wäre eine Kopplung zwischen der NH₂-Gruppe und dem H-5'-Proton. Da zur besseren Löslichkeit der Verbindung in DMSO etwas Wasser hinzugefügt werden musste und sich das H-5'-Signal darunter verbirgt, konnte diese Zuordnung nicht erfolgen. Eine Kopplung zwischen der exocyclischen

NH₂-Gruppe und dem H-1'-Proton wurde jedoch nicht beobachtet, sodass diese räumlich getrennt sind. Das Kopplungsmuster deutet darauf hin, dass C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate in der *syn*-Konformation der *N*-glycosidischen Bindung vorliegen.

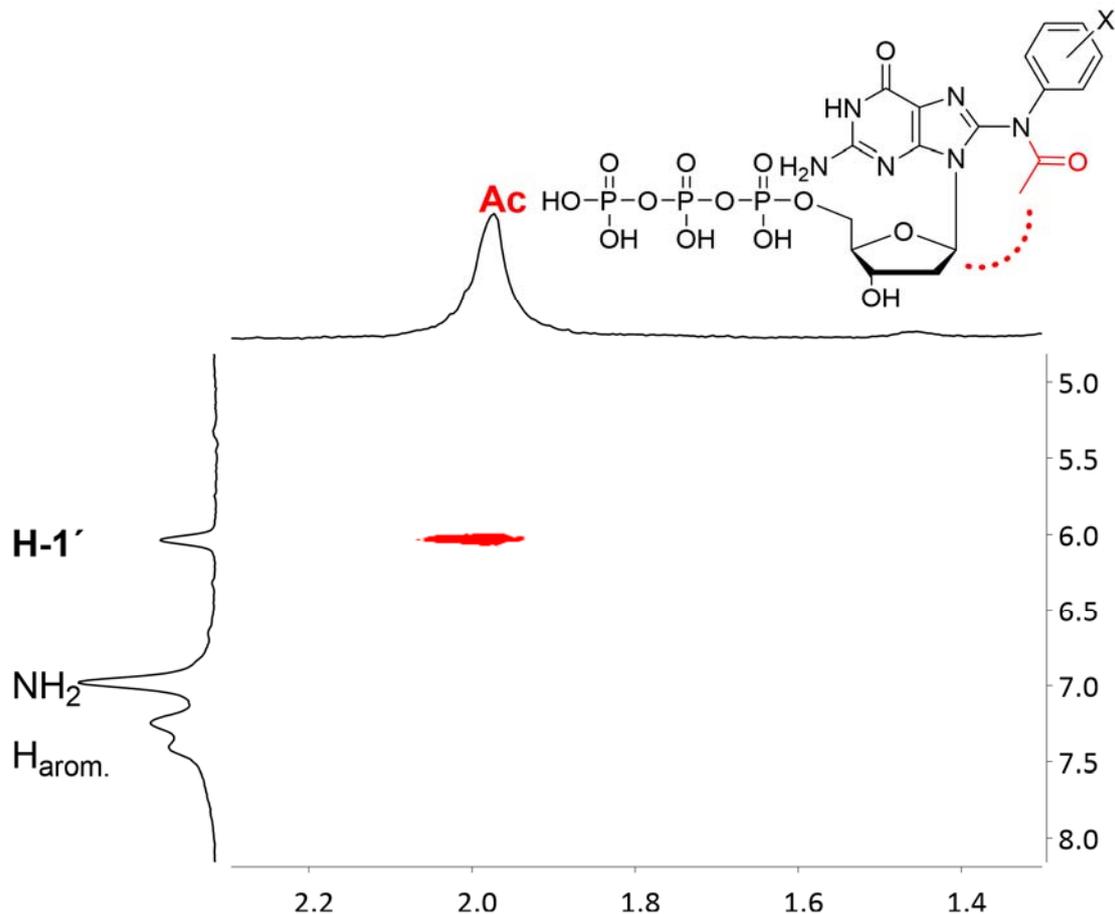


Abbildung 77: Relevante Kopplungen im NOESY-NMR -Spektrum von C8-*N*-Acetyl-*N*-4-Methoxyphenyl-amin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101**

Abbildung 77 zeigt das NOESY-NMR-Spektrum von C8-*N*-Acetyl-*N*-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101** in deuteriertem DMSO. Das H-1'-Proton der 2'-Desoxyribose koppelt mit den Protonen der *N*-Acetylgruppe. Aufgrund des durch das Wassersignal verborgene H-5'-Signal, konnte die Zuordnung zwischen H-5'-Proton und exocyclischer Aminogruppe nicht erfolgen. Außerdem sichtbar, aber nicht im vergrößerten Ausschnitt gezeigt, ist die Kopplung zwischen dem H-1'-Proton des Zuckers und den aromatischen Protonen. Eine Kopplung zwischen den Protonen der exocyclischen NH₂-Gruppe und dem H-1'-Proton wurde nicht beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass auch im Fall der C8-*N*-Acetyl-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate bevorzugt eine *syn*-Konformation der *N*-glycosidischen Bindung eingenommen wird.

Die experimentellen Untersuchungen bestätigen dementsprechend die theoretischen Berechnungen des vorherigen Kapitels 4.1.3.1, wonach die *syn*-Konformation beide Addukt-Typen dominiert. Das Gleichgewicht des natürlichen dGTPs liegt vorwiegend auf der Seite des *anti*-Typs. Interessanterweise stehen die hier erhaltenen Ergebnisse der Nucleotide im Widerspruch zu den Konformationsanalysen der Nucleoside. Für C8-Arylamin-modifizierte Nucleoside wurden in NOESY-Experimenten vorangegangener Arbeiten unterschiedliche Konformationen der *N*-glycosidischen Bindung gefunden.^[43] Während die C8-*N*-Acetyl-Nucleoside die *syn*-Konformation bevorzugten, wurde bei den C8-*N*-H-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosinen eine *anti*-Konformation belegt. Allerdings decken sich die hier erhaltenen Daten mit den experimentellen Beobachtungen von *Meier* und *Boche*, die für C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphate ebenfalls *syn*-Konformation der *N*-glycosidischen Bindung nachweisen konnten.^[62,63]

4.1.4 Biochemische Charakterisierung der C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate

Zuvor wurde bereits die Relevanz von Arylaminen bei der Entstehung von Krebs erläutert. Das unterschiedliche kanzerogene Potential der nicht-acetylierten und acetylierten Form C8-*N*-Arylamin-geschädigter DNA wird auf die unterschiedlichen Konformationen der *N*-glycosidischen Bindung und deren Wirkung auf DNA-Polymerasen zurückgeführt. Für die entsprechenden C8-Arylamin-geschädigten Nucleotide konnte in dieser Arbeit sowohl für die nicht-acetylierte als auch für die acetylierte Form der *syn*-Typ als vorherrschende Konformation der *N*-glycosidischen Bindung ermittelt werden. Die Tatsache, dass beide Addukt-Typen in Nucleotiden die gleiche Konformation der Nucleobase einnehmen, ist für die biochemische Charakterisierung von besonderem Interesse. In einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sollte geprüft werden, ob eine zielgerichtete *in vitro* Synthese von C8-Arylamin-modifizierter DNA durch Verwendung von C8-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphaten möglich ist. Primer-Verlängerungs-Studien sollten die Fragestellung beantworten, ob C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin- und C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate Substrate für DNA-Polymerasen darstellen und ob entgegen ihrer gleichen Konformationen ein Unterschied zwischen den Addukt-Typen bzw. den verschiedenen Aryl-Resten besteht.

4.1.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine zielgerichtete *in vitro* Synthese von C8-*N*-Arylamin-modifizierter DNA durch Verwendung von C8-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphaten wäre in der Forschung von großem praktischen Wert. Mittels einer PCR wäre die Vervielfältigung C8-Arylamin-modifizierter DNA standardmäßig durch Verwendung von C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphaten im Labor möglich. Da eine thermische Zersetzung der Modifikationen während der Hydrolysestudie in Kapitel 4.1.2.3 ausgeschlossen wurde, konnte die PCR unter Verwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen durchgeführt werden. Unter den in PCR-Experimenten üblichen verwendeten DNA-Polymerasen wurden die DreamTaq® und die FIREPol® Polymerasen ausgewählt, da sie nur eine 5'-3'-Exonucleasefunktion jedoch keine 3'-5'-Exonuclease Korrektur besitzen. Der Einbau der C8-*N*-Arylamin-modifizierten Nucleotide sollte daher im Vergleich zu anderen DNA-Polymerasen mit Korrekturlesefunktionen und höheren Genauigkeiten, wie z.B. der *Pfu* DNA-Polymerase, erleichtert sein.

Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt von 1000 bp sowie die zwei flankierenden Primer wurden freundlicherweise von Dr. Anna Rath zur Verfügung gestellt. Für alle Experimente wurde jeweils eine Positiv-Kontrolle (+) mit allen dNTPs und eine Negativkontrolle (-) ohne dGTP durchgeführt. In den Proben wurde das dGTP der natürlichen dNTPs durch eines der C8-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate ersetzt. Die Amplifikation wurde im Anschluß durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

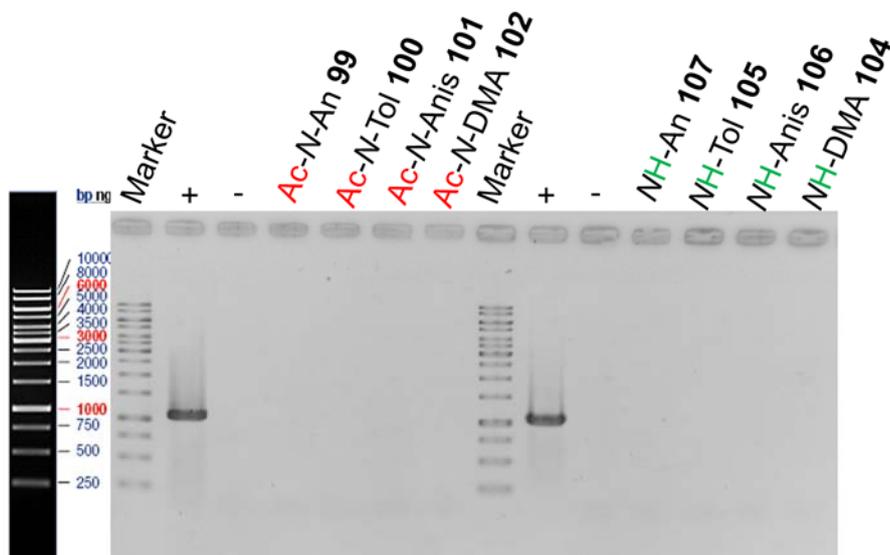


Abbildung 78: Agarosegel der PCR mit FIREPol® DNA-Polymerase

Abbildung 78 zeigt beispielhaft das Agarosegel der PCR mit der FIREPol® DNA-Polymerase und den modifizierten 5'-Triphosphaten als Substrate. Für beide Positiv-Kontrollen kann ein Amplifikations-Produkt bei 1000 bp beobachtet werden. Die Negativ-Kontrollen zeigen, wie erwartet, keine Syntheseprodukte. Sowohl für die C8-*N*-Acetyl- als auch für die C8-*N*-H-Arylamin-5'-triphosphate konnte jedoch kein Amplifikations-Produkt beobachtet werden. Auch Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen an modifiziertem Nucleotid und DreamTaq® DNA-Polymerase führten nicht zu PCR-Produkten. Die Synthese C8-Arylamin-modifizierter DNA im größeren Maßstab durch die entsprechend modifizierten Triphosphate und thermostabile DNA-Polymerasen ist daher unter diesen Bedingungen nicht möglich. Diese Beobachtungen warfen die Fragestellung auf, ob die modifizierten dG*TPs generell Substrate der DNA-Polymerasen darstellen. Da ein erfolgreicher Einbau der Modifikationen aber erst nach mehrfacher Amplifikation auf dem Agarosegel sichtbar wird, ist ein genereller Einbau nicht auszuschließen. Möglich wäre auch, dass die Modifikationen zwar eingebaut werden, aber keine weitere Verlängerung oder Amplifikation möglich ist. Aus diesem Grund wurden Primer-Verlängerungs-Studien mit ³²P-radioaktiv markierten Primern durchgeführt. Die Autoradiographie stellt ein sensitives Verfahren dar, bei der schon die Insertion eines einzelnen Nucleotids beobachtet werden kann.

4.1.4.2 Primer-Verlängerungs-Studien

Die in Kapitel 4.1.3 durchgeführten Konformationsanalysen deckten auf, dass sowohl im C8-*N*-Acetyl- als auch im C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat die *syn*-Konformation dominiert. Dies steht im Gegensatz zum natürlichen dGTP und den C8-*N*-H-Arylamin-modifizierten Nucleosiden, die vorrangig in der *anti*-Konformation vorliegen. In Hinblick auf ihre Karzinogenität sollte der Einfluss der modifizierten 5'-Triphosphate auf die Selektivität von DNA-Polymerasen in Primer-Verlängerungs-Studien untersucht werden.

Da in den zuvor durchgeführten PCR-Experimenten kein Umsatz der modifizierten 5'-Triphosphate durch die standardmäßig verwendeten DNA-Polymerasen beobachtet werden konnte, wurde neben der humanen Polymerase β zunächst das Klenow Fragment *exo*⁻ der DNA Polymerase I eingesetzt. Es besitzt lediglich die 5'-3'-Prozessivität ohne Korrekturlesefunktionen, da sowohl die 3'-5'- als auch die 5'-3'-Exonucleasefunktion der DNA Polymerase I entfernt bzw. inaktiviert wurden.

Für die Primer-Verlängerungs-Studien wurde ein ^{32}P -markierter Primer (25 nt) verwendet, der vor 2'-Desoxycytosin des komplementären Oligonucleotids (30 nt) endet. In einer „standing-start“-Reaktion bindet die DNA-Polymerase direkt an die zu untersuchende Stelle und baut das komplementäre Nucleotid ein.



Abbildung 79: Oligonucleotid-Sequenz der „standing-start“-Reaktionen

Die Analyse der Syntheseprodukte erfolgte elektrophoretisch mithilfe eines denaturierenden Sequenziergels. Wird das jeweilige 2'-Desoxyguanosin-Analogon eingebaut, kann eine Elongation des radioaktiv markierten Primers um ein Nucleotid auf 26 nt beobachtet werden. Um die Elongationen zu verifizieren, wurde bei jedem Experiment eine Positiv- sowie Negativ-Kontrolle mitgeführt und auf das Sequenziergel aufgetragen. Es wurden eine Negativ-Kontrolle (-) ohne dNTPs, eine Probe mit allen natürlichen dNTPs (N), eine Positiv-Kontrolle nur mit dGTP (G) und Ansätze mit einem der nicht-kanonischen dNTPs (dATP (A), dCTP (C) bzw. dTTP (T)) durchgeführt. Erst nach Erhöhung der Konzentration der modifizierten Nucleotide von 2.5 μM auf 20 μM konnte ein Einbau durch die Polymerase beobachtet werden.

Klenow Fragment exo^-

Die DNA-Polymerase Klenow Fragment exo^- verfügt über keine Korrekturlesefunktionen. Ihre Fehlerrate liegt damit bei 10^{-4} bp, wodurch sie die Fähigkeit zur Inkorporation modifizierter Nucleotide besitzt. Des Weiteren fügt das Klenow Fragment exo^- ein oder mehrere Nucleotide zusätzlich an das 3'-Ende von Oligonucleotiden.

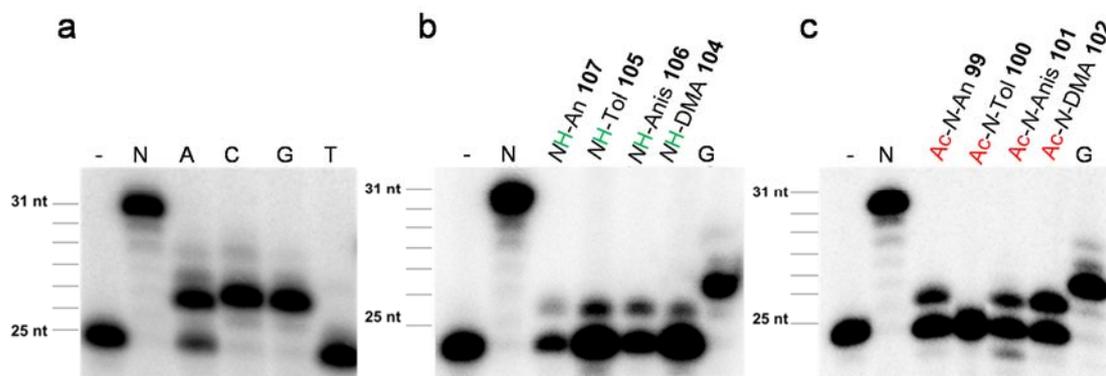


Abbildung 80: Autoradiogramme der 15%igen denaturierenden PAA-Gele der Reaktionen mit der DNA-Polymerase Klenow Fragment exo^-

Die hohe Fehlerrate von Klenow Fragment exo^- zeigt sich bereits bei den Kontroll-Reaktionen mit den natürlichen Nucleotiden in Abbildung 80a. Bis auf dTTP werden sowohl das kanonische dGTP als auch die nicht kanonischen Nucleotide dATP und dCTP mindestens zweimal eingebaut. Sind alle natürlichen Nucleotide vorhanden (N), wird nach der vollständigen Elongation des Primers ein weiteres Nucleotid an das 3'-Ende angefügt, sodass ein 31 nt Syntheseprodukt entsteht. Abbildung 80b zeigt die Elongation in Gegenwart der C8-*N-H*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate. Im Vergleich zu dGTP welches hauptsächlich zweimal eingebaut wird, kommt es bei den Verbindungen **107**, **105**, **106** und **104** nur zur einfachen Insertion vor dem Kettenabbruch. Der Einbau ist nach 5 min jedoch nicht quantitativ, sodass weiterhin das 25 nt Oligomer sichtbar bleibt. In Abbildung 80c ist die Elongation durch die C8-*N-Acetyl-N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate dargestellt. Im Gegensatz zum natürlichen Substrat dGTP erfolgt auch hier eine einmalige Insertion der acetylierten Triphosphate, wobei die Modifikation **102** nicht eingebaut wird. Die Gründe hierfür konnten innerhalb dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Der Vergleich der Intensitäten zwischen Abbildung 80b und Abbildung 80c vermittelt den Eindruck, dass die Einbauraten der C8-*N-Acetyl-N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate leicht erhöht ist, eine exakte Quantifizierung ist aber durch diese Methode nicht möglich. Dennoch scheint zwischen beiden Modifikationstypen kein signifikanter Unterschied in der Selektivität und Prozessivität von DNA-Polymerase Klenow Fragment exo^- vorhanden zu sein. Die zeitliche Auswirkung auf den Substratumsatz konnte nicht näher untersucht werden, könnte jedoch bei längerer Inkubationszeit zum vollständigen Umsatz der modifizierten Triphosphate führen.

Die von *Krüger* modifizierten Oligonucleotide enthielten statt der natürlichen Base G das entsprechende *NH*- bzw. das *Ac*-Addukt. In allen Fällen beobachtete sie den ein- bis zweifachen Einbau aller natürlichen Nucleoside gegenüber den Modifikationen durch Klenow Fragment exo^- , bevor ein Strangabbruch erfolgte. Bei Zugabe aller vier dNTPs konnte sogar die vollständige Elongation der *NH*- und *Ac*-modifizierten Oligonucleotide beobachtet werden. Unterschiede in der Einbaugenauigkeit zwischen beiden Modifikations-Typen konnten nicht festgestellt werden.^[134,135]

Humane DNA-Polymerase β

Die humane DNA-Polymerase β ist eine zelluläre Reparatur-Polymerase aus der Familie X. *In vivo* ist sie maßgeblich an der Reparatur geschädigter DNA durch „short-patch“ Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligt. Dabei wird durch Excision das geschädigte Nucleotid entfernt und ersetzt. Sie besitzt keine 3′-5′-Exonucleasefunktion und repliziert DNA *in vitro* mit einer relativ hohen Fehlerrate von 10^{-4} bp.^[136] Ihre Genauigkeit *in vivo* wird durch einen BER-Protein-Komplex und Korrekturlesen externer 3′-5′-Exonucleasen erhöht.^[137]

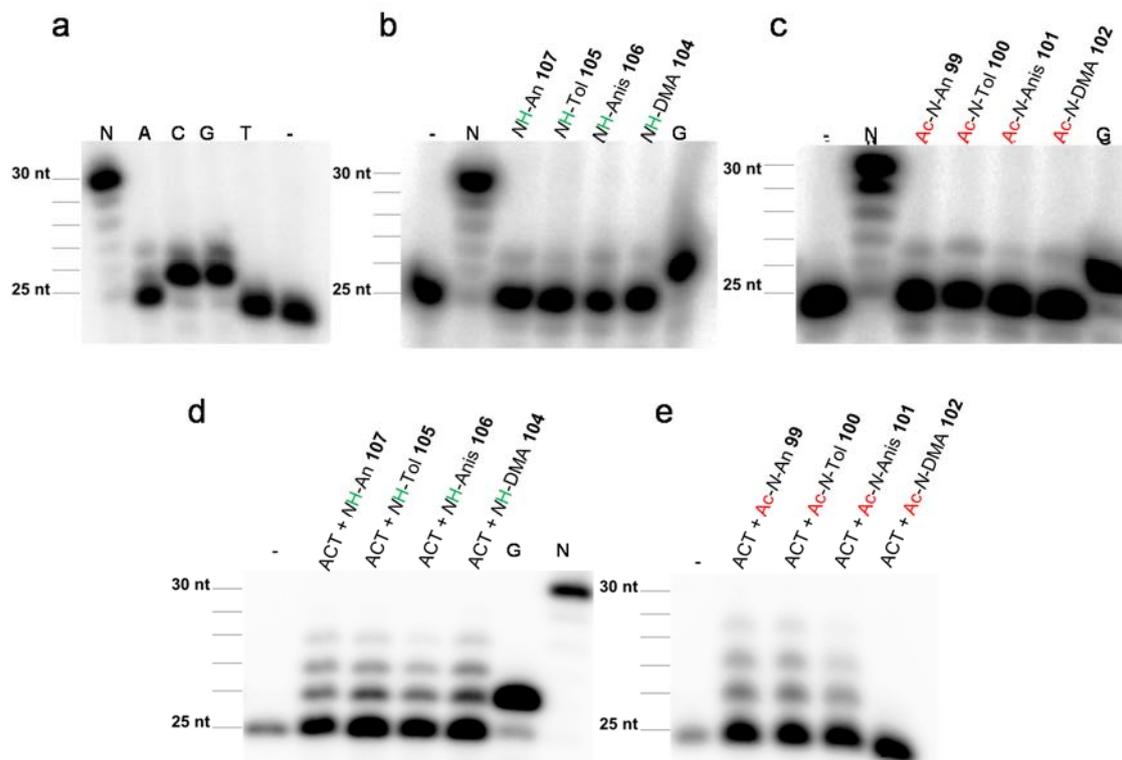


Abbildung 81: Autoradiogramme der 15%igen denaturierenden PAA-Gele der Reaktionen mit der humanen DNA-Polymerase β

In Abbildung 81a sind die Referenzproben aus der Reaktion mit der humanen DNA-Polymerase β zu sehen. Die erste Probe zeigt die vollständige Elongation des Stranges bis 30 nt mit allen dNTPs. Die Zugabe von dATP bewirkt überwiegend keine Inkorporation, dennoch kann eine Fehlpaarung von A mit C zum 26 nt Produkt beobachtet werden. Anschließend wird das im 26 nt Produkt folgende T kanonisch mit A gepaart, sodass auch das 27 nt Produkt sichtbar ist (s. Abbildung 79). Obwohl es sich um eine humane Polymerase handelt, erfolgt aufgrund ihrer hohen Fehlerrate *in vitro* auch eine Elongation mit der nicht-kanonischen Base C. Das gebildete Hauptprodukt von 26 nt wird teilweise sogar ein weiteres Mal verlängert, sodass ebenfalls schwach die Bildung des 27mers zu erkennen ist. Erwartungsgemäß erfolgt bei Zugabe des

komplementären dGTPs der kanonische Einbau entsprechend der Nucleobase C. Das dTTP sowie die Negativ-Probe zeigen wie erwartet keinen Einbau und auch keine Abbauprodukte.

In Abbildung 81b ist neben den Kontroll-Proben, der Einbau der C8-*N*-H-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate zu erkennen. Nach insgesamt 15 min erfolgt zwar ein Einbau der Modifikationen durch die humane Polymerase, jedoch in sehr geringem Maße. Dabei scheint keines der *N*-H-Addukte häufiger eingebaut zu werden. Auffällig ist, dass die *NH*-Addukte im Vergleich mit dGTP bis zu zweimal eingebaut werden. Dennoch bleibt die Einbaurate im Vergleich zu natürlichen Nucleotiden sehr gering.

Abbildung 81c zeigt die Reaktion mit den C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphaten als Substrate. Ein Unterschied in der Einbaurate kann nicht festgestellt werden. Interessanterweise kann auch hier im Vergleich zum natürlichen dGTP ein zweifacher Einbau der acetylierten Modifikationen beobachtet werden, bevor es zum vollständigen Kettenabbruch kommt. Ob der Substratumsatz der modifizierten Triphosphate einem zeitlichen Effekt unterliegt und möglicherweise durch längere Inkubationszeiten steigt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob es trotzdem zu einer vollständigen Elongation kommen kann, wurden die Addukte in Gegenwart der anderen natürlichen dNTPs (dATP, dCTP, dTTP) umgesetzt. Die Ergebnisse der Reaktionen sind in Abbildung 81d und Abbildung 81e dargestellt. Eine vollständige Elongation konnte in keinem der Ansätze beobachtet werden, jedoch erfolgte in allen Fällen bis auf die Verbindung **102** eine Elongation bis zu 28 nt. Da bereits in Abbildung 81a zwischen den natürlichen Nucleotiden Fehlpaarungen durch die humane DNA-Polymerase β *in vitro* beobachtet wurden, kann es sich daher bei den hier entstandenen Syntheseprodukten auch um Addukt-freie Oligonucleotide handeln. Dennoch ist es der humanen DNA-Polymerase β offensichtlich *in vitro* weder möglich die fehlerhaften Syntheseprodukte zu reparieren noch vollständig zu elongieren, sodass es zum Kettenabbruch kommt. *In vivo* wird die Genauigkeit dieser Polymerase durch einen zusätzlichen Proteinkomplex zur Reparatur unterstützt.

Bei den modifizierten Templatsträngen beobachtete Krüger den nicht kanonischen Einbau von dATP statt dCTP mit anschließendem Kettenabbruch. In Gegenwart aller natürlicher Nucleotide konnte sie sogar die vollständige Elongation des modifizierten

Templatstrangs durch Polymerase β verfolgen.^[134,135] Im Vergleich ist eine Elongation bereits modifizierter Stränge *in vivo* wahrscheinlicher als die Kettenverlängerung durch modifizierter Nucleosid-5'-triphosphate. Ihr Einbau ist dennoch möglich und nicht auszuschließen.

Zusammenfassung der Primer-Verlängerungs-Studien

Zusammenfassend deuteten bereits die zuvor durchgeführten PCR-Experimente an, dass C8-Arylamin-modifizierte 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate schlechte Substrate für die DNA-Polymerasen darstellen, was durch die Primer-Verlängerungs-Studien bestätigt wurde. Der Einbau steht jedoch in einem quantitativen Zusammenhang zur verwendeten Menge an modifiziertem Nucleosid-5'-triphosphat. Eine quantitative Aussage ließe sich jedoch nur über weitere Experimente in Abhängigkeit der dG*TP-Konzentration und einer verlängerten Inkubationszeit (zeitlicher Effekt) treffen. Die Primer-Verlängerungs-Studien lassen jedoch eine qualitative Aussage zu. Da die C8-**N-H**- und C8-**N-Acetyl**-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate eingebaut wurden, handelt es sich bei den modifizierten Triphosphaten prinzipiell um Substrate von DNA-Polymerasen, trotz ihrer in Kapitel 4.1.3 nachgewiesenen bevorzugten *syn*-Konformationen. Der Einfluss der Modifikationen ist jedoch stark von der verwendeten DNA-Polymerase abhängig. Die Tatsache, dass zwischen den beiden Modifikations-Typen kein signifikanter Unterschied in der Einbaurrate festgestellt werden konnte, bestätigt die Ergebnisse der Strukturanalysen aus Kapitel 4.1.3, in denen sowohl C8-**N-H**- als auch C8-**N-Acetyl**-Arylamin-modifizierte 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate bevorzugt die *syn*-Konformation der *N*-glycosidischen Bindung einnehmen. Die Interaktion mit dem jeweiligen Enzym scheint strukturell bedingt ähnlich und unabhängig von der Acetylgruppe und dem aromatischen Substitutionsmuster zu sein. Da beide Modifikations-Typen durch die humane DNA-Polymerase erkannt wurden, könnte dies *in vivo* zu Replikationsfehlern führen. Besonders der beobachtete mehrfache Einbau der Modifikation kann erheblichen Einfluss auf die Replikation nehmen. Ob ein Zusammenhang zwischen C8-**N-Arylamin**-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphaten und der Entstehung von Krebs besteht, müsste durch Tests wie sie in Kapitel 2.1.2 beschreiben wurden, nachgewiesen werden.

4.1.5 C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierte Quadruplexe

In der Natur bilden Nucleinsäuren oft höhere Aggregate aus. So ist von Guanin reichen DNA-Sequenzen bekannt, dass sie sogenannte Quadruplexe (s. Kapitel 2.1.8) formen. Modifikationen an der Nucleobase beeinflussen in der Regel die Quadruplex-Strukturen. Interessanterweise bilden Modifikation an der Position C8 eine Ausnahme, da sie die in Quadruplexen vorherrschende Hoogsteen-Basenpaarung nicht behindern. So konnte in Quadruplexen, die an der Position C8 des Guanins durch einen Brom- bzw. Methyl-Rest substituiert waren, eine *syn*-Konformation der *N*-glycosidischen Bindung beobachtet werden. Diese trug zur Beschleunigung der Quadruplexausbildung und zur Erhöhung der thermischen Stabilität der Quadruplexe bei.^[95,138] Da auch von C8-*N*-Acetyl-Arylamin-modifizierter DNA eine Präferenz zur *syn*-Konformation bekannt ist, war es von besonderem Interesse, sie hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Quadruplexen zu untersuchen. Hierfür sollte das Phosphoramidit des *N*-Acetyl-4-Methoxy-Addukts exemplarisch in unterschiedliche Positionen des Hexamers 5'-d(TGG GGT)-3' eingebaut werden. Die Synthese des Phosphoramidits **108** sollte analog der Syntheseroute von *Böge* durch Blockierung der freien 5'-Hydroxygruppe mit Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl) aus der Schlüsselverbindung **86** erfolgen (Abbildung 82).^[54]

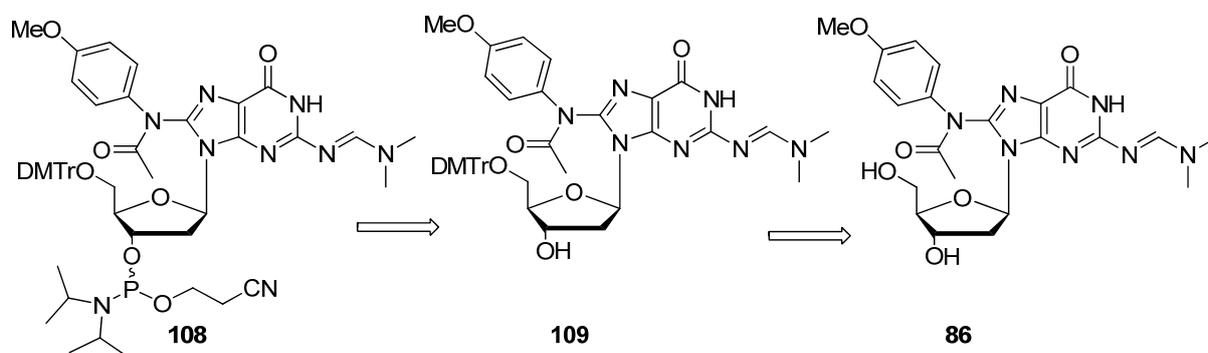
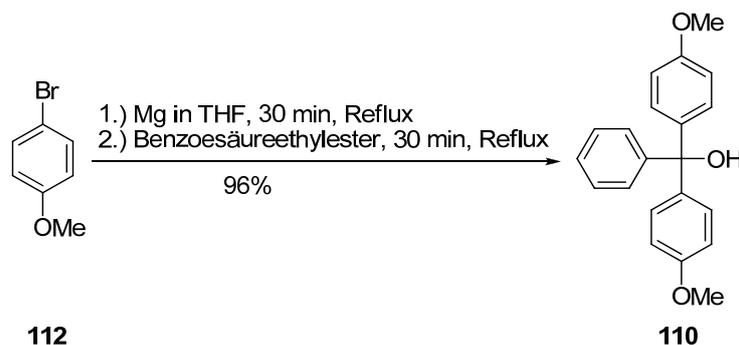
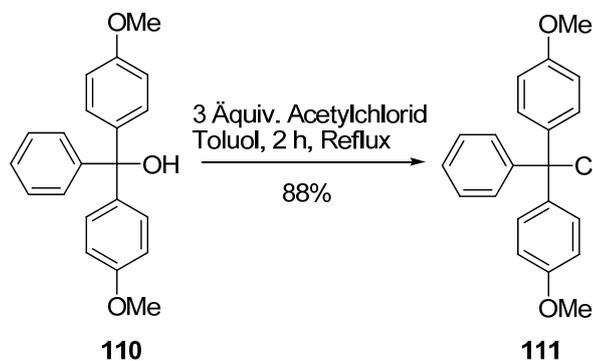


Abbildung 82: Retrosynthese des Phosphoramidits **108** aus der Formamidin-geschützten Verbindung **86**

Dafür musste zunächst 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol **110** als Vorstufe zur säurelabilen Schutzgruppe Dimethoxytriphenylmethylchlorid **111** durch eine Grignard-Reaktion hergestellt werden. Dabei wird zu Magnesiumspänen in THF 4-Bromanisol **112** hinzugegeben und 30 min zum Sieden erhitzt. Anschließend wird das 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol **110** aus der Reaktion von Benzoesäureethylester mit der Magnesium-organischen Verbindung erhalten. Das Produkt konnte durch azeotrope Destillation mit einer Ausbeute von 96% erhalten werden.

Abbildung 83: Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol **110**

Das Dimethoxytriphenylmethylchlorid **111** wird durch nucleophile Substitution 1. Ordnung (S_N1) des 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylcarbinols **110** mit Acetylchlorid in Toluol unter Rückfluss erhalten. Das Produkt konnte durch Kristallisation in Cyclohexan mit 88%iger Ausbeute gewonnen werden.

Abbildung 84: Synthese von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **111**

Die säurelabile Schutzgruppe wurde regioselectiv an die 5'-Hydroxygruppe des N^2 -Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosins **86** durch Verwendung von 1.2 Äquiv. Dimethoxytriphenylmethylchlorid **111** eingeführt. Da Kieselgel leicht sauer reagiert und teilweise zur Abspaltung der Schutzgruppe führt, musste die säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts schnell und unter Verwendung von Triethylamin, welches dem Eluenten hinzugefügt wurde, erfolgen. Das N^2 -Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **109** konnte so in einer Ausbeute von 80% erhalten werden.

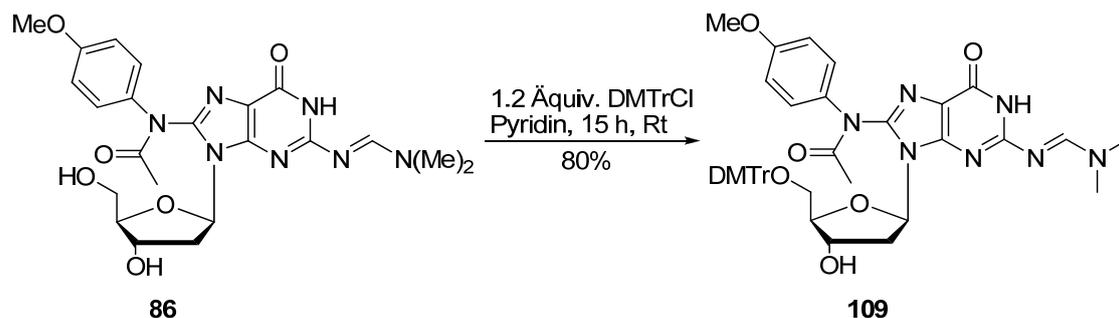


Abbildung 85: Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **109**

Nach der Blockierung der 5'-Hydroxygruppe konnte die Verbindung **109** an der 3'-Hydroxygruppe zum Phosphoramidit umgesetzt werden. Hierfür wurde *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **109** in einem 1:1 Gemisch aus Acetonitril und Dichlormethan mit 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) und Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit versetzt. Um eine Zersetzung der Verbindung bei der Aufarbeitung an Kieselgel zu vermeiden, wird das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe III) und anschließender Gefriertrocknung in Benzol gereinigt.

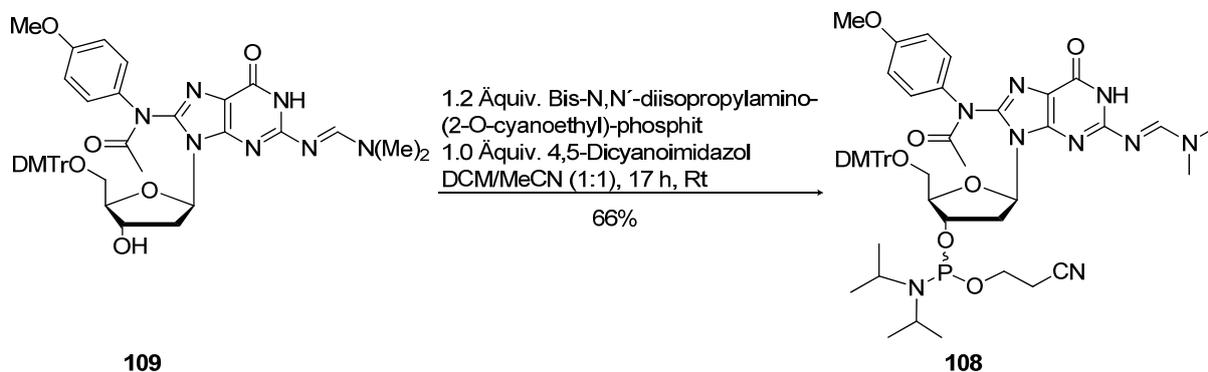


Abbildung 86: Synthese von *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **108**

Die Ausbeuten von *Krüger* zur Synthese der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite liegen im Bereich von 35-85%. Aus ungeklärten Gründen konnte sie die C8-*N*-Acetyl-*N*-4-Methoxyphenyl-Modifikation nur mit einer Ausbeute von 35% isolieren. Während dieser Arbeit konnte das entsprechende *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethyl-phosphit-2'-desoxyguanosin **108** in einer guten Ausbeute von 66% erhalten werden.

Nach erfolgreicher Synthese des Phosphoramidits **108** stand die Verbindung nun für die DNA-Synthese bereit. Mittels der Phosphoramiditsynthese an einem DNA/ RNA-Synthesizer sollte die Verbindung **108** je einmal an Position 2 und 5 der Oligonucleotid-

Sequenz 5'-d(TGG GGT)-3' eingebaut werden. Zur Kontrolle wurde auch die unmodifizierte Sequenz synthetisiert. Für alle Oligonucleotide erfolgte eine quantitative Kuppelung (Trityl-Monitor). Nach Abspaltung der Schutzgruppen und der Oligonucleotide von der Festphase, wurden diese durch *Reversed-phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC; Methode I) gereinigt. Die Elution erfolgte mit einem Acetonitril-Gradient von 0-15% in TEAA-Puffer (pH= 6.9) über 50 min bei Rt. Das unmodifizierte DNA-Oligonucleotid **112** 5'-d(TGG GGT)-3' wies eine Retentionszeit von 26.64 min auf, während sich die Retentionszeiten für das C8-*N*-Acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-modifizierte DNA-Oligonucleotid **113** 5'-d(TG^[Ac-4-methoxyphenyl]G GGT)-3' auf 39.42 min, bzw. für **114** 5'-d(TGG GG^[Ac-4-methoxyphenyl]T)-3' auf 41.95 min verlängerte. Abbildung 87 zeigt exemplarisch das HPLC-Chromatogramm des gereinigten Oligonucleotids **114**. Die durch Druckschwankungen der HPLC hervorgerufene Verschiebung der Basislinie ist für die Analyse irrelevant.

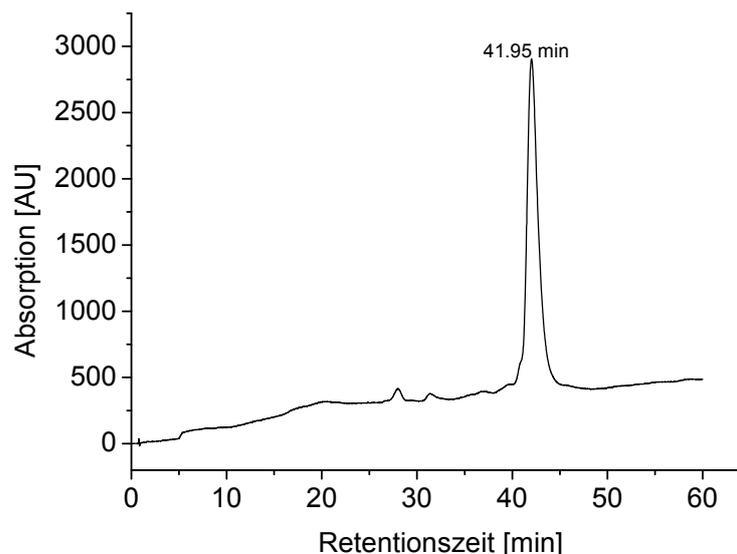
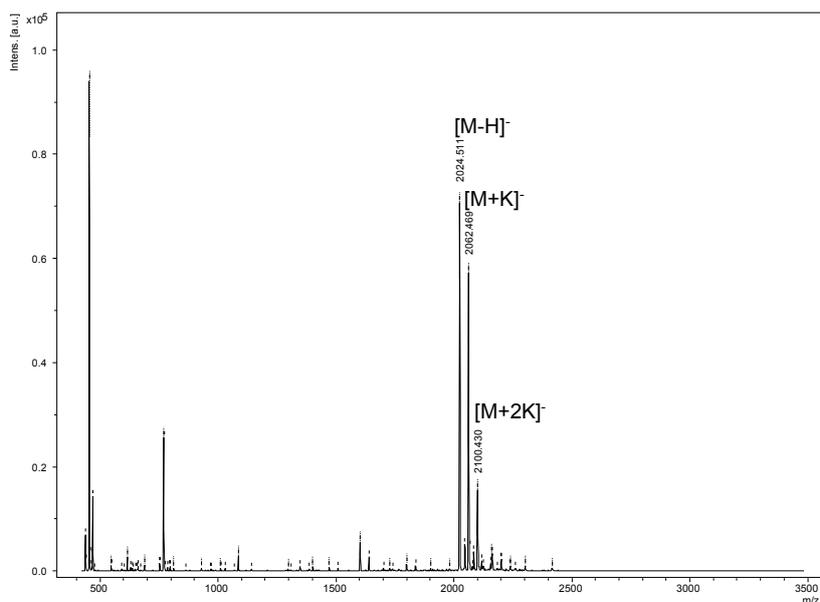


Abbildung 87: HPLC-Chromatogramm des gereinigten C8-*N*-Acetyl-4-methoxyphenyl-modifizierten Oligonucleotids **114**

Die Charakterisierung der DNA-Oligonucleotide erfolgte mit MALDI-MS. Die berechnete Masse des Oligonucleotids KOL-12 beträgt $M(\text{MALDI}^-, m/z) = 2024.4 [M-H]^-$, im MALDI-Massenspektrum der Abbildung 88 ist das Hauptsignal bei $2024.5 [M-H]^-$ sowie die Kaliumaddukte davon zu erkennen.

Abbildung 88: MALDI-Massenspektrum von **114**

Die Untersuchungen der hier synthetisierten DNA-Oligonucleotide auf ihre Quadruplexstrukturen wurden in Kooperation mit der Universität Bordeaux (Prof. Dr. J.-L. Mergny) von Dr. Jun Zhou sowie Dr. Samir Amrane durchgeführt. Abhängig von ihrer Umgebung können sich die DNA-Oligonucleotide zu tetramolekularen Quadruplexen zusammenlagern. Für den Nachweis von Quadruplex-Strukturen eignen sich eine Reihe verschiedener Verfahren, wie Circular dichroismus, $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse oder native Gelelektrophorese. Von den genannten Analysemethoden findet der Circular dichroismus aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit besonders häufig Anwendung und wird daher im Folgenden genauer vorgestellt.

Mit diesem Analyseverfahren lässt sich die absolute Konfiguration optisch aktiver Substanzen bestimmen. Beim Circular dichroismus wechselwirken chirale Moleküle unterschiedlich stark mit circular polarisiertem Licht. Die Differenz der Absorptionen links und rechts circular polarisierter Lichtwellen (Elliptizität) kann graphisch als Funktion der Wellenlänge im CD-Spektrum dargestellt werden. Die verschiedenen DNA-Konformationen bzw. die Quadruplex-Topologien werden durch das Absorptionmuster charakterisiert. Parallel-angeordnete Quadruplex-Stränge besitzen ein positives Absorptionsmaximum bei 265 nm und ein negatives Absorptionsminimum bei 240 nm. Während eine anti-parallele Anordnung ein Absorptionsmaximum bei 295 nm und Absorptionsminimum bei 265 nm aufweist.^[139]

Von den Oligonucleotiden **112**, **113** und **114** wurde eine 100 μM Lösung in Natrium- und Kalium-Puffer hergestellt (10 mM Phosphat-Puffer mit einer 100 mM Ionen-Konzentration). Da die Ergebnisse unabhängig vom Puffersystem zu sein scheinen, sind hier nur die Experimente mit Natrium-Puffer dargestellt.

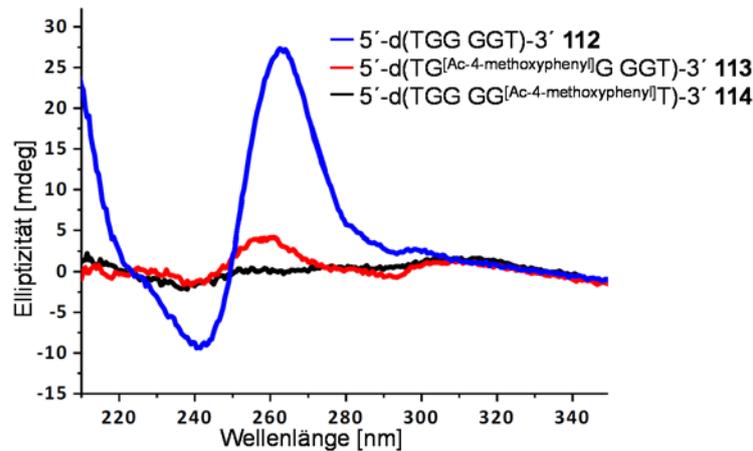


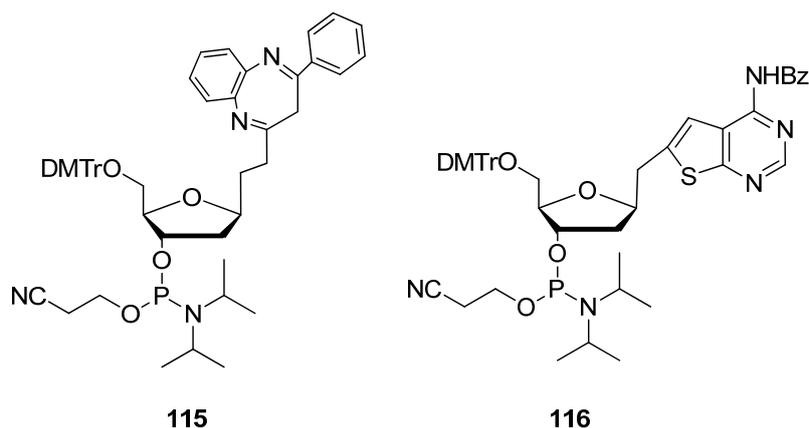
Abbildung 89: CD-Spektren der Quadruplexe

In den CD-Spektren der Quadruplexe in Abbildung 89 ist für das unmodifizierte Oligonucleotid **112** ein Absorptionsmaximum bei 265 nm und ein Absorptionsminimum bei 240 nm zu sehen. Das Absorptionsmuster ist charakteristisch für parallel-angeordnete Quadruplex-Stränge. Die CD-spektroskopische Untersuchung des modifizierten Oligonucleotids **113** weist in ähnlichen Wellenlängenbereichen Maxima und Minima wie das unmodifizierte Oligonucleotid **112** auf. Es handelt sich um einen parallelen Quadruplex, da bei einer anti-parallelen Anordnung eine Verschiebung des Absorptionsmusters zu erwarten ist. Die Intensität der Elliptizität ist niedrig, sodass nur eine geringe Menge an C8-*N*-Acetyl-Arylamin-modifiziertem Quadruplex und eine Vielzahl an Einzelstrang-Molekülen von **113** vorliegen. Der modifizierte Strang **114** scheint dagegen keine Quadruplexstrukturen auszubilden. Sowohl in Gegenwart von Natrium- als auch Kalium-Ionen konnten die gleichen Ergebnisse erhalten werden. Weitere Versuche die Quadruplex-Strukturen mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und nativer Gelelektrophorese nachzuweisen, gelangen nicht. Die Gründe hierfür konnten innerhalb dieser Arbeit nicht mehr ermittelt werden.

4.2 C-Nucleosid-Modifikationen

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, besitzen C-Nucleoside aufgrund der zusätzlichen Methyleneinheit eine Reihe interessanter Eigenschaften, die ein breites Anwendungsbereich eröffnen. Im Rahmen der Antisense-Therapie soll durch C-Nucleosid-Modifikation von DNA ihre Stabilität gegenüber Hydrolyse und Affinität gegenüber pathogener DNA bzw. RNA gesteigert werden. Durch die erhöhte Persistenz dieser Oligonucleotide könnten krankhafte Gene oder Nucleinsäuren langfristig inaktiviert werden.

Die von Dr. *Dilver Peña Fuentes* (Universität Rostock) synthetisierten C-Phosphoramidite in Abbildung 90 sind aufgrund ihrer Struktur besonders interessant.^[109,110] Durch die zusätzliche(n) Kohlenstoffeinheit(en) besitzen sie eine freie Beweglichkeit um die C-C-Bindungsachse, die eine neue Interaktion mit komplementären Nucleinsäuren zulassen könnte. Bei *O*¹-[5'-*O*-Dimethoxytrityl-1'-[(2-ethyl-4-phenyl-3H-1,5-benzodiazepin)]-2'-desoxyribose]-*O*²-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit **115** handelt es sich um ein Spacer-C-Nucleosid. Statt einer Nucleobase ist eine Benzodiazepin-Gruppe an die Riboseeinheit gebunden. In welcher Form dieser große Heterocycclus mit den übrigen Nucleobasen wechselwirkt ist unbekannt. Nach Einbau in DNA wird die Modifikation mit **B** abgekürzt. Das *O*¹-[5'-*O*-Dimethoxytrityl-1'-[(6-methylthieno-[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin-*N*-benzoyl)]-2'-desoxyribose]-*O*²-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit **116** ist ein Homo-C-Nucleosid und ähnelt strukturell dem Adenin, ist jedoch über die Position C8 mit der Zuckereinheit verbunden. Während an der Position 7 ein Stickstoffatom fehlt, ist das Stickstoffatom an der Position 9 durch ein Schwefelatom ersetzt. Um die Nomenklatur zu erleichtern, wird diese Modifikation nach Einbau in die DNA und Entfernen der Benzoyl-Schutzgruppe (Bz) an *N*6 als **S** abgekürzt.

Abbildung 90: Struktur der C-Phosphoramidite **115** und **116**

Die Phosphoramidite **115** und **116** sollten im Rahmen dieser Arbeit in DNA-Oligonucleotide eingebaut und bezüglich ihrer Eigenschaften untersucht werden. Durch Festphasensynthese wurden die beiden Phosphoramidite **115** und **116** gezielt in die *NarI*-Sequenz und *EcoRI*-Sequenz eingebaut. Die *NarI*-Sequenz ist ein Hot-Spot für die Arylamin-induzierte Frameshift-Mutagenese in *Escherichia coli*.^[140] Die Modifikationen wurden an der Position 4 der *NarI*-Sequenz 5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3' integriert. Im Anschluss wurden die Konformationen und T_m -Werte verschiedener DNA- und RNA-Duplexe bestimmt.

Die *EcoRI*-Sequenz 5'-d(GTA GAA TTC TAC)-3' enthält eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuclease *EcoRI*. Der Einbau der Modifikation erfolgte sowohl an der Position 1 außerhalb, als auch an der Position 4 innerhalb dieser Erkennungssequenz. Dies erlaubt Untersuchungen bezüglich der DNA-Konformationen, der T_m -Werte und Einflüsse der Modifikation auf den Restriktionsabbau durch *EcoRI*.

4.2.1 Synthese der C-Nucleosid-modifizierten DNA

Die Synthese der Einzelstränge erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode an einem DNA/ RNA-Synthesizer. Die Syntheseprotokolle des Herstellers und die verlängerten Kupplungsbedingungen für RNA-Oligonucleotide und modifizierte DNA-Oligonucleotide können dem Anhang entnommen werden. Das ABASIC-Phosphoramidit wurde von der Firma ChemGenes bezogen, in das Oligonucleotid **117** eingebaut und wird weiter mit **X** abgekürzt. Bei der ABASIC-Modifikation handelt es sich um ein Nucleosid ohne Nucleobase. Die Überwachung der Kupplungsschritte erfolgte photometrisch durch einen Trityl-Assay. Für alle Oligonucleotide erfolgte eine quantitative Kupplung laut Trityl-Monitor. Die Protokolle zur Abspaltung von dem Trägermaterial und der

Schutzgruppen sind in Kapitel 7.5 dokumentiert. Unmodifizierte DNA-Oligonucleotide der *NarI*-Sequenz wurden kommerziell von der Firma Eurofins MWG in der HPLC-Qualitätsstufe erworben. In Tabelle 10 sind alle ssDNA- und ssRNA-Oligonucleotide mit der *NarI*-Sequenz aufgeführt. Tabelle 11 zeigt die synthetisierten *EcoRI*-Sequenzen.

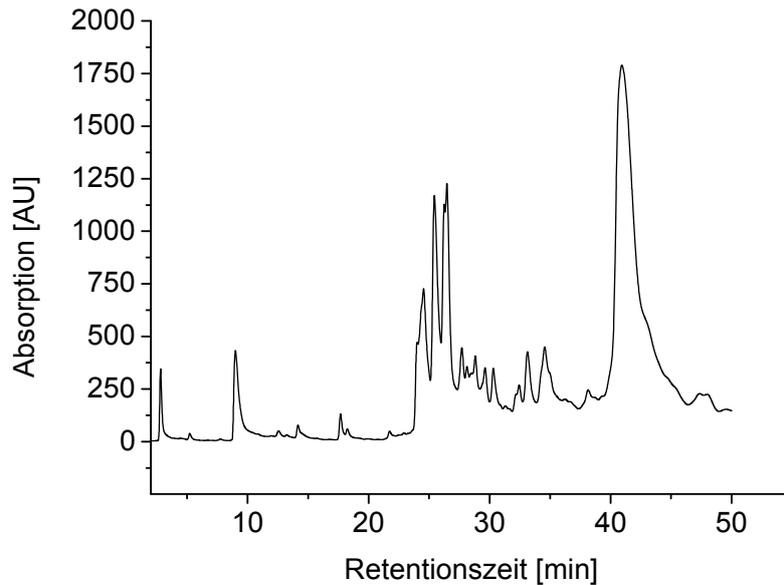
Tabelle 10: Übersicht der *NarI*-Sequenzen

Oligonucleotid	Modifikation	Sequenz
118	Mismatch A	5'-d(GAT GGA GCC GAG)-3'
119	Mismatch G	5'-d(GAT GGG GCC GAG)-3'
120	Mismatch T	5'-d(GAT GGT GCC GAG)-3'
121	Unmod. Bzw. mismatch C	5'-d(GAT GGC GCC GAG)-3'
122	-	5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3'
117	ABASIC X	5'-d(GAT GGX GCC GAG)-3'
123	Benzodiazepin B	5'-d(CTC GGC BCC ATC)-3'
124	Thieno S	5'-d(CTC GGC SCC ATC)-3'
125	-	5'-(gau ggc gcc gag)-3'
126	-	5'-(cuc ggc gcc auc)-3'

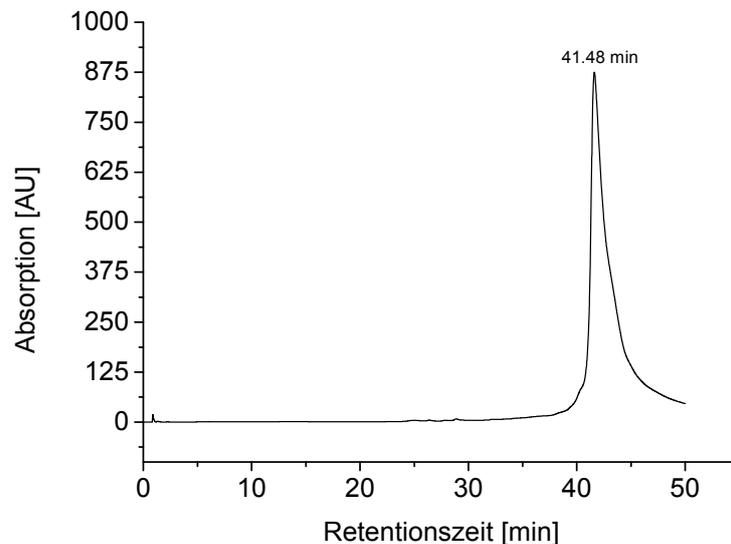
Tabelle 11: Übersicht der *EcoRI*-Sequenzen

Oligonucleotid	Modifikation	Sequenz
127	-	5'-d(GTA GAA TTC TAC)-3'
128	Benzodiazepin B	5'-d(BTA GAA TTC TAC)-3'
129	Benzodiazepin B	5'-d(GTA BAA TTC TAC)-3'
130	Thieno S	5'-d(STA GAA TTC TAC)-3'
131	Thieno S	5'-d(GTA SAA TTC TAC)-3'

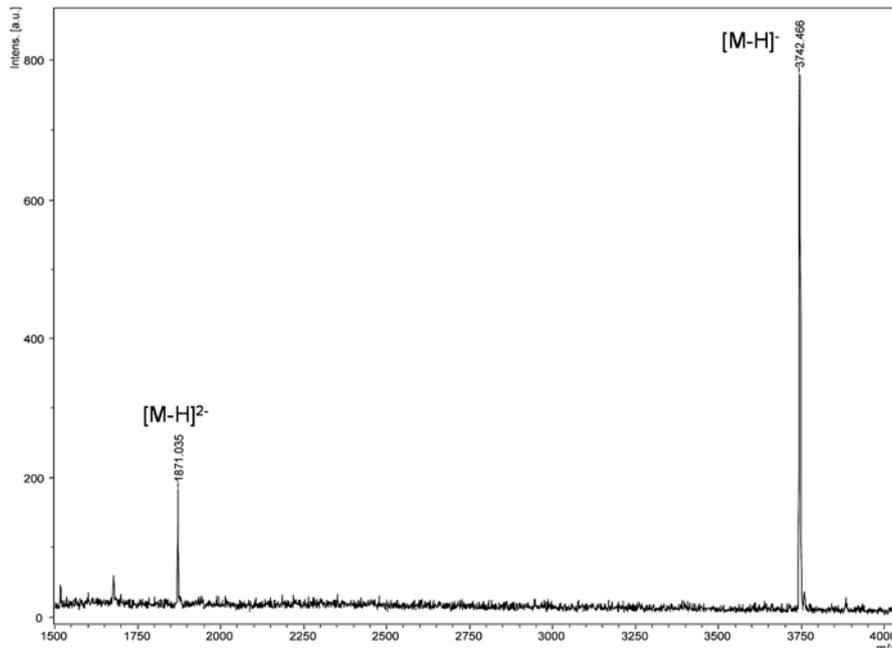
Nach der Abspaltung der Oligonucleotide von der Festphase wurden die Rohprodukte mittels RP-HPLC gereinigt. Abbildung 91 zeigt exemplarisch das Rohchromatogramm des DNA-Oligonucleotids **126**. Neben dem Hauptsignal bei einer Retentionszeit von 40.10 min sind noch Verunreinigungen durch Abbruchstränge zu sehen.

Abbildung 91: Rohchromatogramm des Benzodiazepin-modifizierten Oligonucleotids **128**

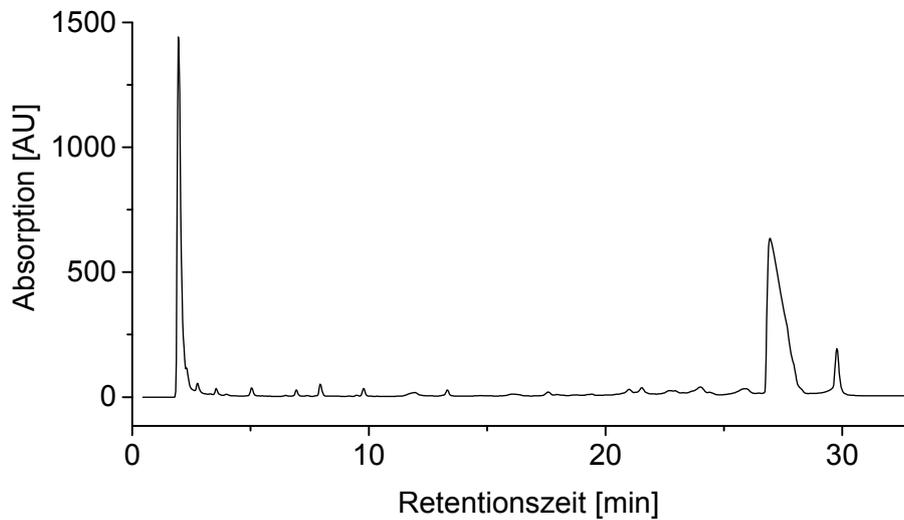
Nach der Isolierung des Produkt-Signals konnte das RP-HPLC-Chromatogramm des gereinigten Oligonucleotids **128** Abbildung 92 erhalten werden. Die Retentionszeit mit der Methode II wurde auf 41.48 min bestimmt.

Abbildung 92: HPLC-Chromatogramm des gereinigten Oligonucleotids **128**

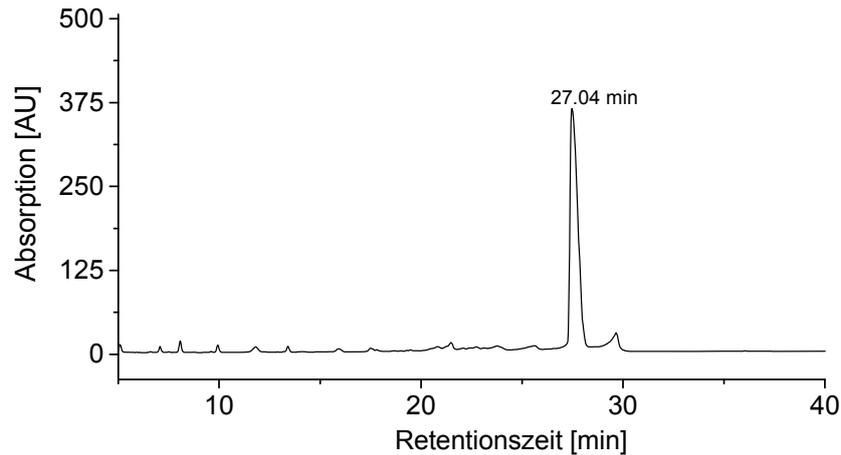
Mit einem eigens hergestellten Oligonucleotidstandard konnten die gereinigten Oligonucleotide massenspektrometrisch charakterisiert werden. Abbildung 93 stellt das MALDI-Massenspektrum des Oligonucleotids **128** mit $M(m/z) = 3742.5 [M-H]^-$ dar. Bei $M(m/z) = 1871.0 [M-H]^{2-}$ handelt es sich um das zweifachgeladene Anion des Oligonucleotids **128**.

Abbildung 93: MALDI-Massenspektrum des modifizierten Oligonucleotids **128**

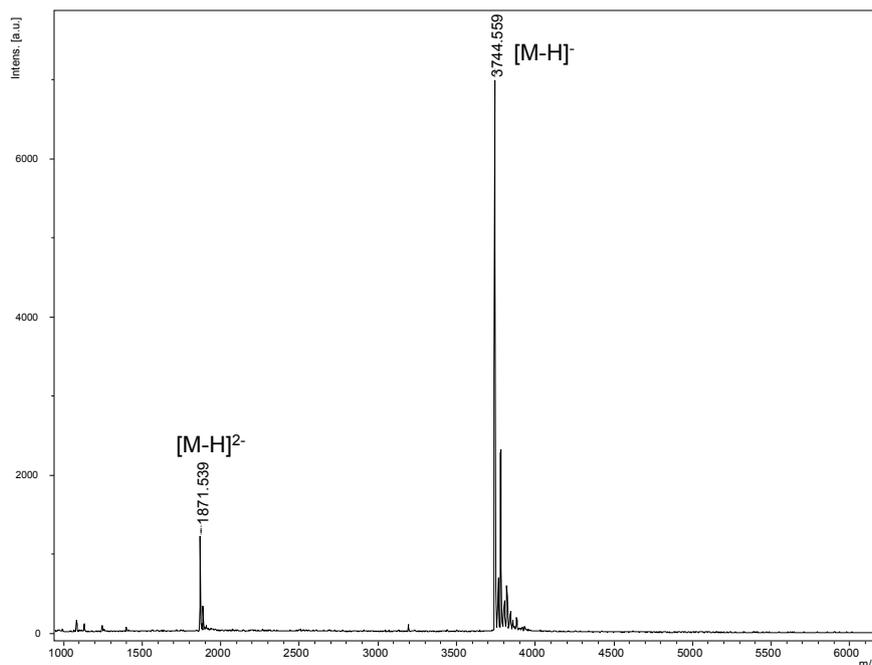
Die unmodifizierten RNA-Oligonucleotide wurden mittels Ethylendiamin von der Trägersubstanz abgespalten und über IEX-Chromatographie gereinigt. In Abbildung 94 ist das Rohchromatogramm des unmodifizierten RNA-Oligonucleotids **126** gezeigt.

Abbildung 94: Rohchromatogramm des RNA-Oligonucleotids **126**

Nach weiterer Reinigung konnte eine Retentionszeit von 27.04 min bestimmt werden.

Abbildung 95: HPLC-Chromatogramm des gereinigten RNA-Oligonucleotids **126**

Die RNA-Oligonucleotide wurden im Anschluss durch Größenausschlusschromatographie entsalzt. Abbildung 96 zeigt das MALDI-Massenspektrum des RNA-Oligonucleotids **126** mit $M(m/z) = 3744.56$ $[M-H]^-$ und 1871.54 $[M-H]^{2-}$.

Abbildung 96: MALDI-Massenspektrum des unmodifizierten RNA-Oligonucleotids **126**

4.2.2 Strukturelle Charakterisierung der C-Nucleosid-modifizierten DNA

Um die Auswirkungen der C-Nucleosidanaloga auf die Basenpaarung und die Struktur doppelsträngiger DNA zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen DNA- und RNA-Oligonucleotiden hybridisiert. Da keines der natürlichen Nucleoside komplementär ist, wurden die Modifikationen je einer der Nucleobasen gegenübergestellt. Die

Charakterisierung erfolgte anhand verschiedener Methoden wie Schmelztemperaturmessungen, CD-Spektroskopie, *Molecular Dynamics* Simulationen und Kristallisation.

4.2.2.1 Bestimmung der Schmelztemperaturen der C-Nucleosid-modifizierten DNA

Ein charakteristisches Merkmal doppelsträngiger DNA ist ihre Schmelztemperatur. Der Schmelzpunkt (T_m -Wert) ist die Temperatur, bei der 50% der DNA als Einzelstrang in Lösung vorliegt. Durch schrittweises Erhitzen kann der Übergang einer geordneten helikalen Struktur doppelsträngiger DNA in ungeordnete Einzelstränge UV-spektroskopisch verfolgt werden. Da die freien π -Elektronensysteme der ungepaarten Basen in einzelsträngiger DNA durch fehlende *base stacking interactions* stärker mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) wechselwirken, steigt die Extinktion einzelsträngiger DNA im Gegensatz zur dsDNA an. Die Basenpaarung der DNA-Sekundärstruktur steht somit im direkten Zusammenhang zur UV-Absorption.^[141] Dieser Effekt wird als Hyperchromizität bezeichnet und kann bei Auftragung der Absorption gegen die Temperatur in einem sigmoidalen Kurvenverlauf beobachtet werden.^[142] Der Wendepunkt also das Maximum der ersten Ableitung entspricht dem T_m -Wert des Doppelstrangs.

Zunächst wurden verschiedene Referenz-Duplexe aus dem unmodifizierten *NarI*-Oligonucleotid 5'-d(CTC GGC **GCC** ATC)-3' **122** mit verschiedenen Mismatch-Strängen gebildet, deren T_m -Werte in Tabelle 12 aufgelistet sind.

Tabelle 12: T_m -Werte der *NarI*-Duplexe mit **122**

Duplexe	Modifikationen	Sequenzen	T_m [°C]
122-121	-	5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG CGG TAG)d-5'	60.5
122-119	mismatchG	5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG GGG TAG)d-5'	50.9
122-118	mismatchA	5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG AGG TAG)d-5'	48.2
122-120	mismatchT	5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG TGG TAG)d-5'	50.2
122-117	ABASIC X	5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG XGG TAG)d-5'	39.5

Im Vergleich zum *NarI*-Duplex **122-121** mit einem T_m -Wert von 60.5 °C sind die T_m -Werte der Mismatch-Duplexe **122-119**, **122-118** und **122-120** um 9.5 °C bis 12.3 °C

verringert. Enthält der komplementäre Strang keine Nucleobase an der gegenüberliegenden Position wie im Falle des Duplexes **122-117** fällt der T_m -Wert um 21.0 °C.

Anschließend wurden die entsprechenden DNA-Duplexe mit dem Benzodiazepin-modifizierten *NarI*-Oligonucleotid 5'-d(CTC GGC **BCC** ATC)-3' **123** gebildet. Die gemessenen T_m -Werte sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: T_m -Werte der *NarI*-Duplexe mit **123**

Duplexe	Modifikationen	Sequenzen	T_m [°C]
123-119	B-G	5'-d(CTC GGC BCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG GGG TAG)d-5'	42.1
123-121	B-C	5'-d(CTC GGC BCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG CGG TAG)d-5'	42.6
123-118	B-A	5'-d(CTC GGC BCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG AGG TAG)d-5'	43.2
123-120	B-T	5'-d(CTC GGC BCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG TGG TAG)d-5'	46.9
123-117	B-X	5'-d(CTC GGC BCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG XGG TAG)d-5'	47.5

Die Benzodiazepin-modifizierten Doppelstränge gehen mit einer deutlichen thermischen Destabilisierung einher. Im Gegensatz zu den unmodifizierten Mismatch-Strängen aus Tabelle 12 sind die T_m -Werte von 13.6 °C um bis zu 18.4 °C gesunken. Die Ursache für die thermische Destabilisierung der Spacer-C-modifizierten Duplexe könnte in der Rotation um die C-C-Bindungsachse liegen. Daraus folgt, dass die Modifikation **B** nach außen gedreht ist und nicht mehr in die DNA interkalieren kann. Diese Vermutung wird durch den gemessenen T_m -Wert des Duplex-Strangs **123-117** gestützt. Hier liegt der Modifikation **B** keine Nucleobase gegenüber und die Destabilisierung bzw. Verzerrung innerhalb der modifizierten Doppelhelix scheint weniger ausgeprägt. Im Gegensatz dazu erfuhr der Strang **122-117** durch Einführung von **X** noch einmal eine deutliche Destabilisierung um 21 °C, die bei **123-117** nicht zu beobachten war. Durch die fehlende Nucleobase ist die Modifikation eventuell in die DNA gedreht und kann mit ihrem planaren π -System an den Stapelwechselwirkungen der Nucleobasen teilnehmen. Hier ist der Schmelzpunkt aller Benzodiazepin-modifizierten DNA-Duplexe mit 47.5 °C am höchsten und nur um 13 °C niedriger als der unmodifizierte *NarI*-Duplex **122-121**.

Tabelle 14 zeigt die gemessenen T_m -Werte der Duplexe mit dem Thieno-modifizierten *NarI*-Oligonucleotid 5'-d(CTC GGC **SCC** ATC)-3' **124**.

Tabelle 14: T_m -Werte der *Narl*-Duplexe mit **124**

Duplexe	Modifikationen	Sequenzen	T_m [°C]
124-119	S-G	5'-d(CTC GGC SCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG G GG TAG)d-5'	43.3
124-121	S-C	5'-d(CTC GGC SCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG C GG TAG)d-5'	46.3
124-118	S-A	5'-d(CTC GGC SCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG A GG TAG)d-5'	47.5
124-120	S-T	5'-d(CTC GGC SCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG T GG TAG)d-5'	49.6
124-117	S-X	5'-d(CTC GGC SCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG X GG TAG)d-5'	43.6

Bezogen auf den Referenzwert des unmodifizierten *Narl* Duplexes **122-121** von 60.5 °C sind die T_m -Werte für die Thieno-modifizierten Duplexe von 10.9 °C um bis zu 17.2 °C niedriger. Trotz der unterschiedlichen Eigenschaften von Spacer- und Homo-C-Nucleosiden, weisen die Thieno-modifizierten DNA-Duplexe ähnliche Destabilisierungen wie die Messwerte aus Tabelle 13 auf. Allerdings zeigt sich hier ein umgekehrter Trend, da der T_m -Wert des DNA-Duplexes **124-117** von 43.6 °C ohne gegenüberliegende Base am niedrigsten ist. Möglicherweise scheint bei der Thieno-Modifikation eine Wechselwirkung zwischen den Heterocyclen zur Stabilisierung der DNA beizutragen. Dies wird bei der Gegenüberstellung von der Adenin-ähnlichen Thieno-Modifikation mit Thymin deutlich. Für den DNA-Duplex **124-120** konnte die höchste Schmelzpunkttemperatur von 49.6 °C gemessen werden. Dieser Wert liegt damit in der Größenordnung der T_m -Werte der Mismatch-Stränge aus Tabelle 12. Eine tatsächliche Komplementarität zwischen Thymin und der Thieno-Modifikation sollte dennoch stärker ausgeprägt sein. Um deren Interaktion und Stabilität mit RNA zu untersuchen, wurden die modifizierten DNA-Oligonucleotide mit dem RNA-Strang 5'-(gau ggc gcc gcc gag)-3' **125** hybridisiert. Die T_m -Werte sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: T_m -Werte der RNA-DNA-Hybride der *Narl*-Sequenzen

Duplexe	Modifikationen	Sequenzen	T_m [°C]
125-126	-	5'-(gau ggc gcc gag)-3' 3'-(cua ccg cgg cuc)-5'	71.4
125-122	c-G	5'-(gau ggc gcc gag)-3' 3'-(CTA CCG GGC CTC)d-5'	63.7
125-132	c-X	5'-(gau ggc gcc gag)-3' 3'-(CTA CCX CGG CTC)d-5'	60.9
125-123	c-B	5'-(gau ggc gcc gag)-3' 3'-(CTA CCB CGG CTC)d-5'	64.2
125-124	c-S	5'-(gau ggc gcc gag)-3' 3'-(CTA CCS CGG CTC)d-5'	61.3

Durch den Austausch eines RNA-Strangs in DNA ist eine deutliche Abnahme der thermischen Stabilität des RNA-RNA-Duplexes von 71.4 °C auf 63.7 °C für das DNA-RNA-Hybrid zu beobachten. Interessanterweise sind die Unterschiede zwischen den T_m -Werten der modifizierten DNA-RNA-Duplexe gering und liegen in der Größenordnung zum unmodifizierten DNA-RNA-Duplex **125-122**. Im Vergleich zum RNA-RNA-Duplex **125-126** sind die Werte um 7.2 °C bis zu 10.1 °C gefallen. Die ABASIC-Modifikation **X** wirkt somit im DNA-RNA-Hybrid nicht destabilisierender als die modifizierten Duplexe **125-124** und **125-123**.

Für die *EcoRI*-Oligonucleotide wurden die Modifikationen jeweils an den Positionen 1 und 4 in die Sequenz 5'-d(GTA GAA TTC TAC)-3' eingeführt. Da es sich um eine selbstkomplementäre (palindromische) Sequenz handelt, war die Synthese eines Gegenstranges für die Duplexausbildung nicht notwendig. Die Daten sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: T_m -Werte der *EcoRI*-Duplexe

Duplexe	Modifikationen	Sequenzen	T_m [°C]
127-127	-	5'-d(GTA GAA TTC TAC)-3'	35.1
128-128	B -Pos. 1	5'-d(B TA GAA TTC TAC)-3'	20.4
129-129	B -Pos. 4	5'-d(GTA B AA TTC TAC)-3'	17.4
130-130	S -Pos. 1	5'-d(S TA GAA TTC TAC)-3'	18.2
131-131	S -Pos. 4	5'-d(GTA S AA TTC TAC)-3'	16.4

Bereits der DNA-Duplex des unmodifizierten *EcoRI*-Oligonucleotids **127** besitzt aufgrund des niedrigeren GC-Gehalts im Vergleich zu den vorherigen *NarI*-Sequenzen einen geringen Schmelzpunkt von 35.1 °C. Als Folge der Selbstkomplementarität enthält jeder modifizierte Duplex die entsprechende Modifikation sogar zweimal. Dies wirkt sich auf die Schmelzpunkte aus, die damit unter T_m sinken, sodass die Duplexe insgesamt einen geringeren Hybridisierungsgrad ausweisen. Dies konnte ebenfalls in einem flacheren sigmoiden Kurvenverlauf beobachtet werden. Duplexe mit der Modifikation an der Position 1 des Stranges sind die etwas stabiler. Liegt die Modifikation innerhalb des Stranges an der Position 4, sind die T_m -Werte noch einmal um 3 °C bzw. 1.8 °C geringer.

4.2.2.2 Messung des Circularendichroismus der C-Nucleosid-modifizierten DNA

Der Circulardichroismus (CD) ist bereits aus Kapitel 4.1.5 bekannt, in dem die Konformation C8-*N*-Arylamin-modifizierter Hexamere auf Ausbildung von Quadruplex-Strukturen untersucht wurde. Von dsDNA sind drei verschiedene Konformationen bekannt, die in Abbildung 97 nach *Baker* anhand der Absorptionsmaxima und -minima ihren CD-Spektren zugeordnet sind.^[143]

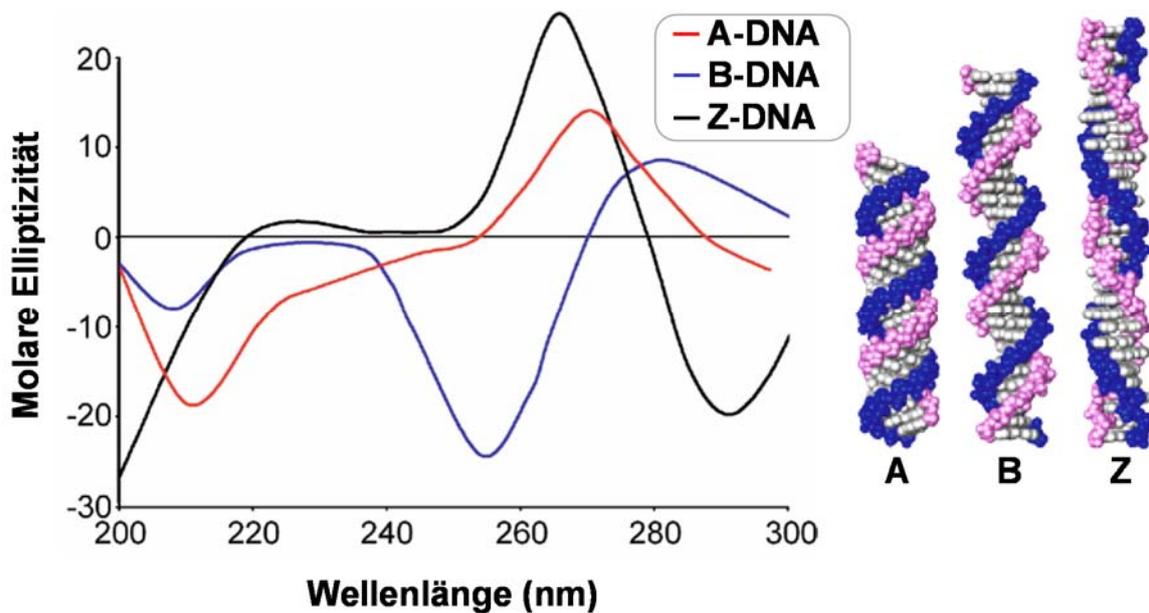
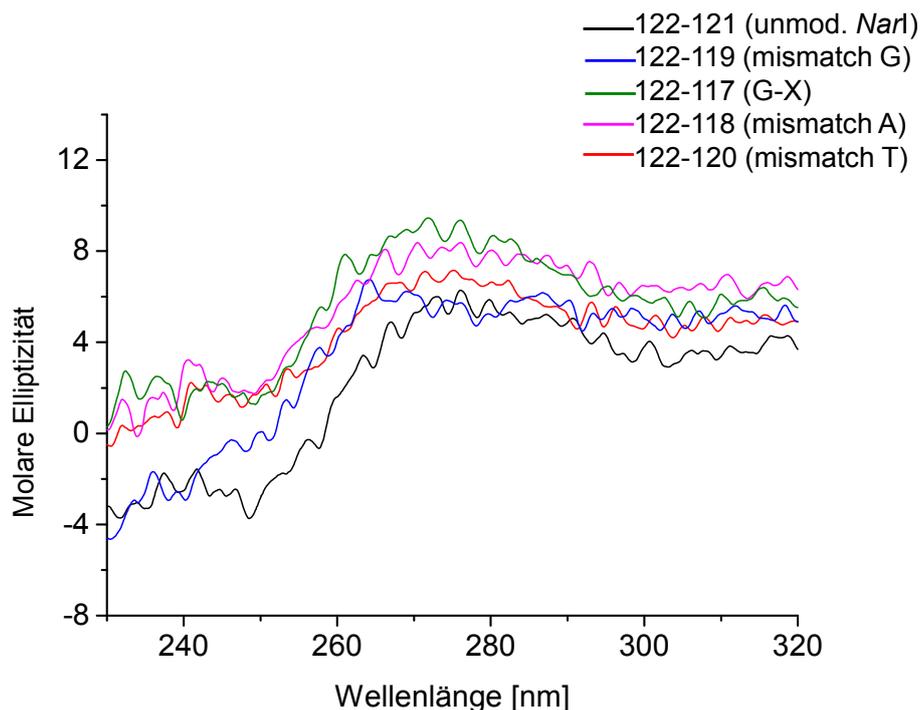


Abbildung 97: CD-Spektren und Strukturen verschiedener DNA-Konformationen

A-DNA hat einen rechtsgängigen Drehsinn der Helix und liegt bei einem Zustand niedriger Hydratisierung vor. Ihr CD-Spektrum weist ein Absorptionsminimum bei 210 nm und ein Maximum bei 265 nm auf. Die rechtsgängige B-DNA ist die natürliche Konformation, die überwiegend in allen Lebewesen beobachtet wird, mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm. Die linksgängige Z-DNA ist nur in stark salzhaltigen Lösungen zu finden. Sie ist in ihrer Ganghöhe länger und im Durchmesser schmäler als die rechtsgängigen Konformere. Ihr CD-Spektrum unterscheidet sich deutlich durch Lage des Maximums bei 260 nm und Minimas von den anderen Spektren.^[143]

Auch die in dieser Arbeit synthetisierten Doppelstränge sollten durch Bestimmung ihrer Konformation charakterisiert werden. Für alle CD-Messungen wurde jeweils dieselbe Lösung wie für die Schmelzpunktbestimmung aus Kapitel 4.2.2.1 verwendet. Die Messungen erfolgten bei 10 °C in einem Wellenlängenbereich von 230-320nm.

Abbildung 98: CD-Spektren der *NarI* mismatch Duplexe

In Abbildung 98 werden die CD-Spektren der Mismatch-DNA-Duplexe mit dem unmodifizierten *NarI*-Duplex verglichen. Das Maximum der molaren Elliptizität liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem Minimum von 250 nm. Allen DNA-Duplexen kann eindeutig B-DNA-Konformation zugeordnet werden. Die Intensität der molaren Elliptizität ist ein Maß für die Ordnung der Duplexe. Je niedriger die Intensität, desto ungeordneter der Duplex. Entgegen dieser Erwartung weist der unmodifizierte *NarI*-Doppelstrang **122-121** die niedrigste Intensität auf. In Abhängigkeit der gegenüberliegenden Nucleobase, sind die Intensitäten aller Mismatch-DNA-Duplexe höher. Diese Beobachtungen stimmen nicht mit den Messdaten der thermischen Stabilität aus Tabelle 12 überein, die niedrigere T_m -Werte für Mismatch-Stränge aufweisen. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, allerdings konnte diese Beobachtung auch bereits bei Mismatch-Strängen mit 2'-Desoxyadenosin gemacht werden.^[144] Ein bathochromer Effekt in Abbildung 98, der zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen durch Einführung delocalisierter π -Elektronen führt, konnte nicht beobachtet werden. Interessanterweise erhöht sich die Intensität der molaren Elliptizität im Fall des Duplexes **122-117** mit ABASIC durch Entfernen einer Nucleobase. Dieser Trend kann auch in Abbildung 99 beobachtet werden, sobald eine Hybridisierung zwischen einer der C-Nucleosid-Modifikation mit ABASIC erfolgt.

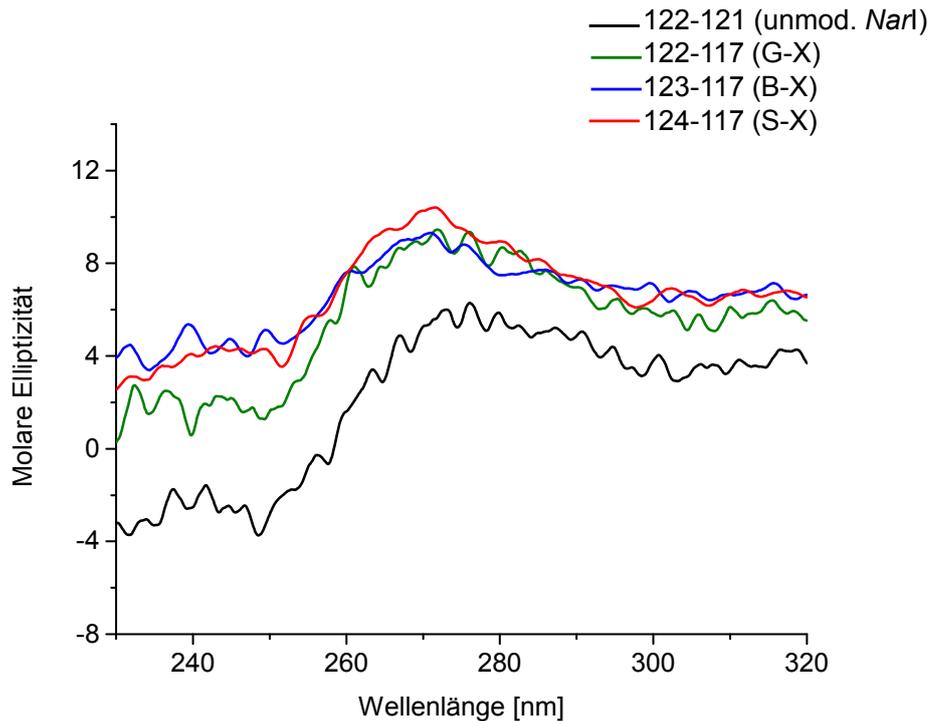
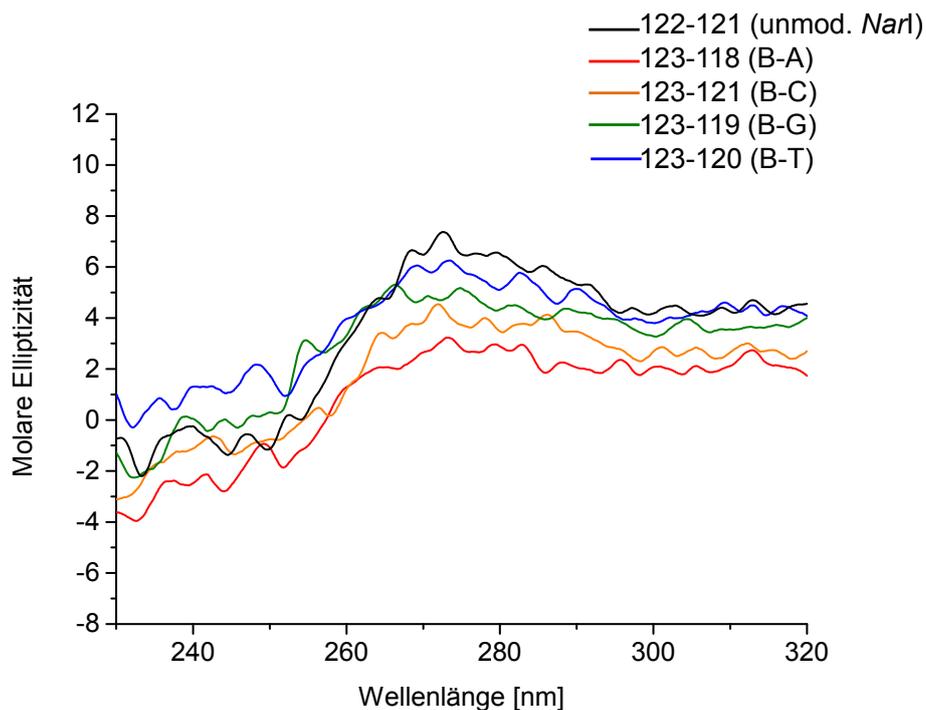


Abbildung 99: CD-Spektren mit ABASIC-modifizierten Strängen.

Während der unmodifizierte *NarI*-Duplex **122-121** die niedrigste Intensität aufweist, liegen die molaren Elliptizitäten der Duplexe mit Modifikationen und ABASIC **123-117** und **124-117** sogar im Bereich des unmodifizierten Strangs mit ABASIC **122-117**. Eine Änderung der B-DNA-Konformation durch eine der Modifikationen wird nicht bewirkt.

Abbildung 100: CD-Spektren der Benzodiazepin-modifizierten *NarI*-Duplexe

Liegt wie in Abbildung 100 der Benzodiazepin-Modifikation hingegen eine der natürlichen Nucleobasen gegenüber, ist die molare Elliptizität im Vergleich zum unmodifizierten Strang **122-121** unterschiedlich stark verringert. Durch Einführung der Modifikation kann ein Verlust der Intensitäten der molaren Elliptizität durch einen flacheren Kurvenverlauf und damit in der Ordnung der Duplex-Systeme beobachtet werden. Für den DNA-Duplex **123-118** ist die Intensität am geringsten, in der Adenin der Benzodiazepin-Modifikation gegenüber liegt, obwohl die Daten aus Tabelle 13 ähnliche T_m -Werte für alle modifizierten Duplexe ergaben. Eine Veränderung der lokalen Maxima oder Minima ist durch Benzodiazepin nicht festzustellen, sodass die B-DNA Struktur trotz der Flexibilität um die C-C-Bindungsachse der Modifikation erhalten bleibt.

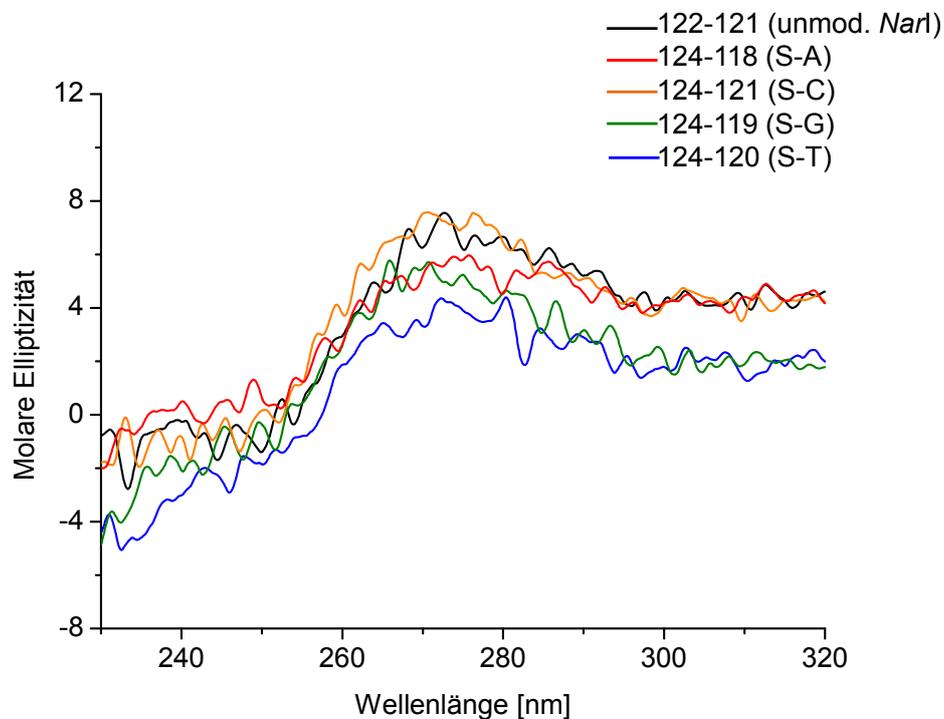


Abbildung 101: CD-Spektren der Thieno-modifizierten *NarI*-Duplexe

Abbildung 101 zeigt die CD-Spektren der Thieno-modifizierten Duplexe. Auch hier liegen die Maxima bzw. Minima der molaren Elliptizität im Bereich von 280 nm und 250 nm. Eine Veränderung der B-DNA Konformation durch den Einbau der Modifikation **S** konnte nicht beobachtet werden. Auffällig ist die hohe Elliptizität des Doppelstrangs **124-121** mit Cytosin als komplementärer Nucleobase, was auf eine gute Hybridisierung der beiden Einzelstränge hinweist. Dies steht im Widerspruch zum unmodifizierten Doppelstrang **122-121** und zum DNA-Duplex **124-120**. Während die CD-Kurve von **124-120** die niedrigste molare Elliptizität aufweist, schien die Komplementarität zunächst aufgrund des hohen Schmelzpunktes in Tabelle 14 besser ausgeprägt.

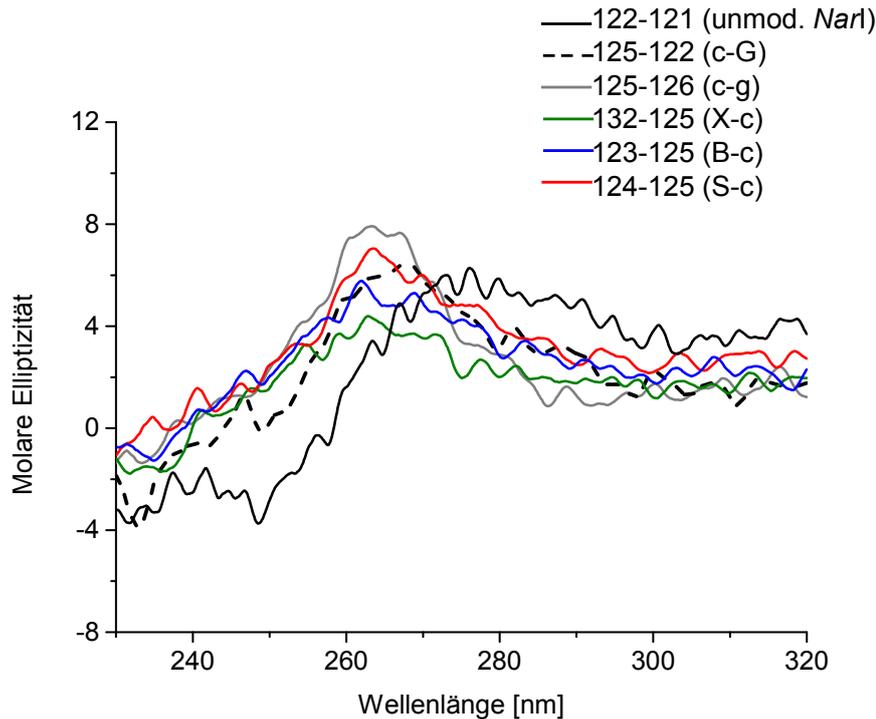
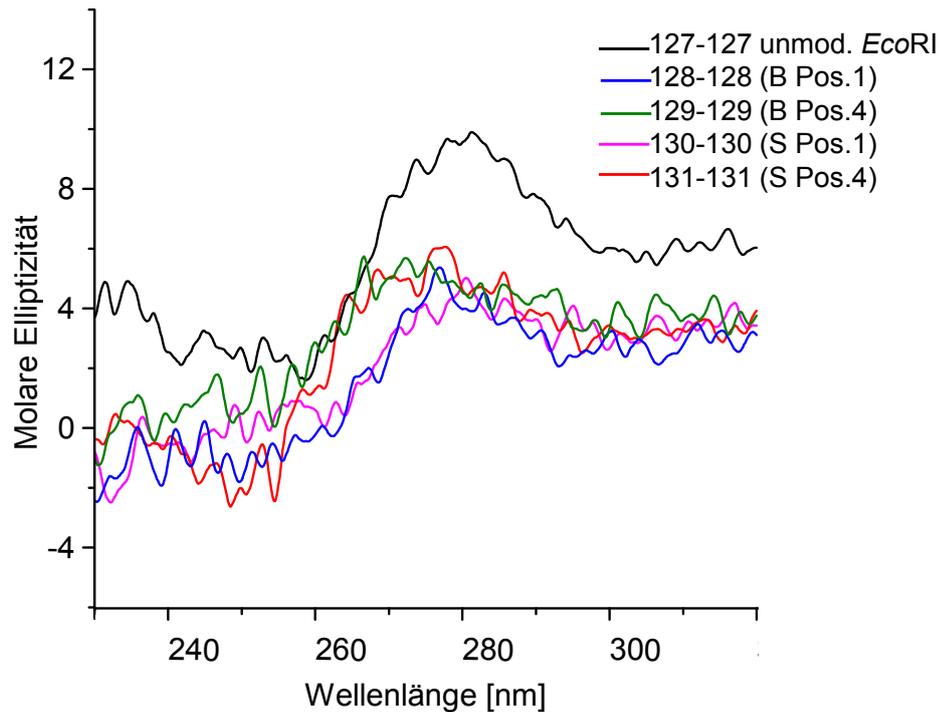


Abbildung 102: CD-Spektren der RNA-DNA Duplexe

Bei doppelsträngiger RNA nimmt die Ribose aufgrund der 2'-Hydroxygruppe bevorzugt eine 3'-endo Konformation ein, die zu einer A-Konformation der DNA führt (s. Kapitel 4.1.3). Das RNA-RNA-Oligonucleotid **125-126** aus Abbildung 102 zeigt diese Konformationsänderung durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 280 nm zu tieferen Wellenlängen auf ca. 265 nm im Vergleich zum unmodifizierten DNA-DNA-*NarI* Duplex **122-121**. Das Absorptionsmaximum des unmodifizierten RNA-DNA Hybrids **125-122** liegt dabei zwischen den beiden Maxima des DNA-DNA-Oligonucleotids **122-121** und des RNA-RNA-Oligonucleotids **125-126**. Überraschenderweise liegen sowohl das Benzodiazepin-modifizierte DNA-RNA Hybrid **123-125** als auch das Thieno-modifizierte DNA-RNA-Hybrid **124-125** eindeutig in A-Konformation vor. Die Intensität der molaren Elliptizität ist dabei ähnlich ausgeprägt und ist unabhängig von dem C-Nucleosid-Typ. Das Hybrid **132-125** aus dem ABASIC Strang 5'-d(CTC GGC XCC ATC)-3' und unmodifizierter RNA weist die niedrigste Intensität auf.

Abbildung 103: CD-Spektren der *EcoRI* DNA-Duplexe

Die CD-Spektren der modifizierten *EcoRI*-Duplexe in Abbildung 103 besitzen alle niedrigere Intensitäten der molaren Elliptizität als der unmodifizierte *EcoRI* Strang **127**. Diese Ergebnisse decken sich mit der in Tabelle 16 gemessenen thermischen Destabilisierung. Die Hybridisierung der Stränge ist dabei unvollständiger bzw. ihre Ordnung im Duplex weniger ausgeprägt. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt für die CD-Kurven der Duplexe **128** und **130** mit der Modifikation an der Position 1. Liegt die Modifikation hingegen in der Position 4 des Stranges **129** und **131** vor, ist das Absorptionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen verschoben.

Zusammenfassend kann aus der CD-Spektroskopie der C-Nucleosid-Duplexe keine Änderung der DNA-Konformationen beobachtet werden. Die B-DNA Struktur bleibt erhalten, auch wenn teilweise die Duplex-Ordnung stark beeinträchtigt wird. In den Hybriden aus RNA und DNA bleibt nach Einführung der C-Nucleosid-Modifikation die A-Konformation doppelsträngiger RNA erhalten. Ob die Modifikationen dennoch lokale Strukturänderung hervorrufen, z.B. indem die Modifikation aus der DNA herausgedreht ist, sollte in *Molecular Dynamics*-Simulationen und der Interaktion der modifizierten DNA mit Enzymen analysiert werden.

4.2.2.3 *Molecular Dynamics*-Simulationen der Spacer-C-modifizierten Oligonucleotide

Wie in Kapitel 4.2.2.1 und 4.2.2.2 schon belegt werden konnte, sind die Spacer-C-Nucleosid-modifizierten Duplexe stark destabilisiert. Über die genaue Struktur lässt sich durch die vorliegenden Analysetechniken jedoch keine Aussage treffen. Es wäre denkbar, dass die Benzodiazepin-Modifikation aufgrund der freien Drehbarkeit um die C-C-Bindungsachse und ihrer Größe nicht in der Lage ist, mit den anderen DNA-Basen zu interkalieren. Um zu klären, ob die Modifikation grundsätzlich zwischen die anderen Basen passt, wurde die Struktur der modifizierten Duplexe durch eine dynamische Simulations Software dargestellt. Die *Molecular Dynamics*-Simulationen (MD) wurden mit dem Programm Maestro 9.4/ Desmond durchgeführt. Als Kraftfeld wurde das OPLS_AA/ 2005 eingesetzt. Zur Vorlage der Struktur diente die *NarI*-Sequenz in Lösung:^[145]



Um die Berechnungen für die modifizierten Stränge zu erleichtern, wurde die Base C zwischen Phosphoratom 18 und P19 entfernt und als ABASIC-Modifikation **X** belassen. Die Nucleobase G zwischen dem P7 und P8 wurde durch die Benzodiazepin-Modifikation **B** ersetzt. Die Modifikation wurde so in die DNA eingesetzt, dass der Phenylring in die große Furche (Struktur I) bzw. in die kleine Furche (Struktur II) der DNA zeigt. Die Sequenzen und berechneten Energiewerte der Duplexe sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: *NarI*-Sequenzen und Energiewerte der *Molecular Dynamics*-Simulationen

Struktur.	Sequenzen	E [kJ/ mol]
122-121	5'-d(CTC GGC GCC ATC)-3' 3'- (GAG CCG CGG TAG)d-5'	-16323
123-117	5'-d(CTC GGC BCC ATC)-3'	-15939
Struktur I	3'- (GAG CCG XGG TAG)d-5'	
123-117	5'-d(CTC GGC BCC ATC)-3'	-15935
Struktur II	3'- (GAG CCG XGG TAG)d-5'	

Die berechneten Energiewerte aus Tabelle 17 weisen darauf hin, dass die modifizierten Duplexe instabiler als der unmodifizierte *NarI*-Duplex sind. Struktur I besitzt eine mit 384 kJ/ mol und Struktur II eine mit 388 kJ/ mol höhere Energie als die Ausgangsverbindung. Diese Ergebnisse werden durch die *Molecular Dynamics*-Simulationen

bestätigt. In den folgenden Abbildungen sind die Phosphoratome grün, Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau, Kohlenstoffatome grau und Wasserstoffatome weiß dargestellt. Für jede Struktur sind der gesamte Duplex (Bildausschnitt a) und zwei vergrößerte Ausschnitte (Bildausschnitt b, c) abgebildet, um die Position der Benzodiazepin-Modifikation innerhalb der DNA zu verdeutlichen.

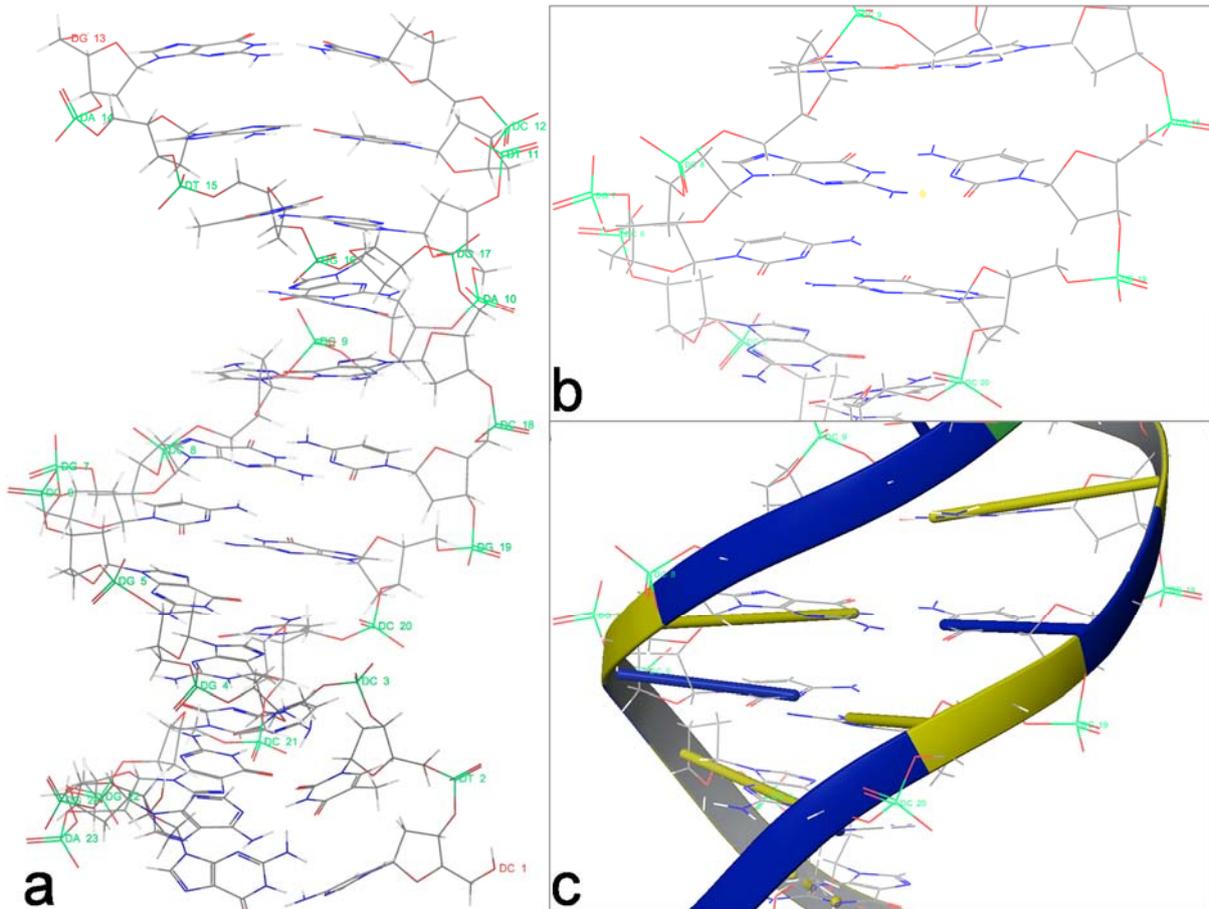
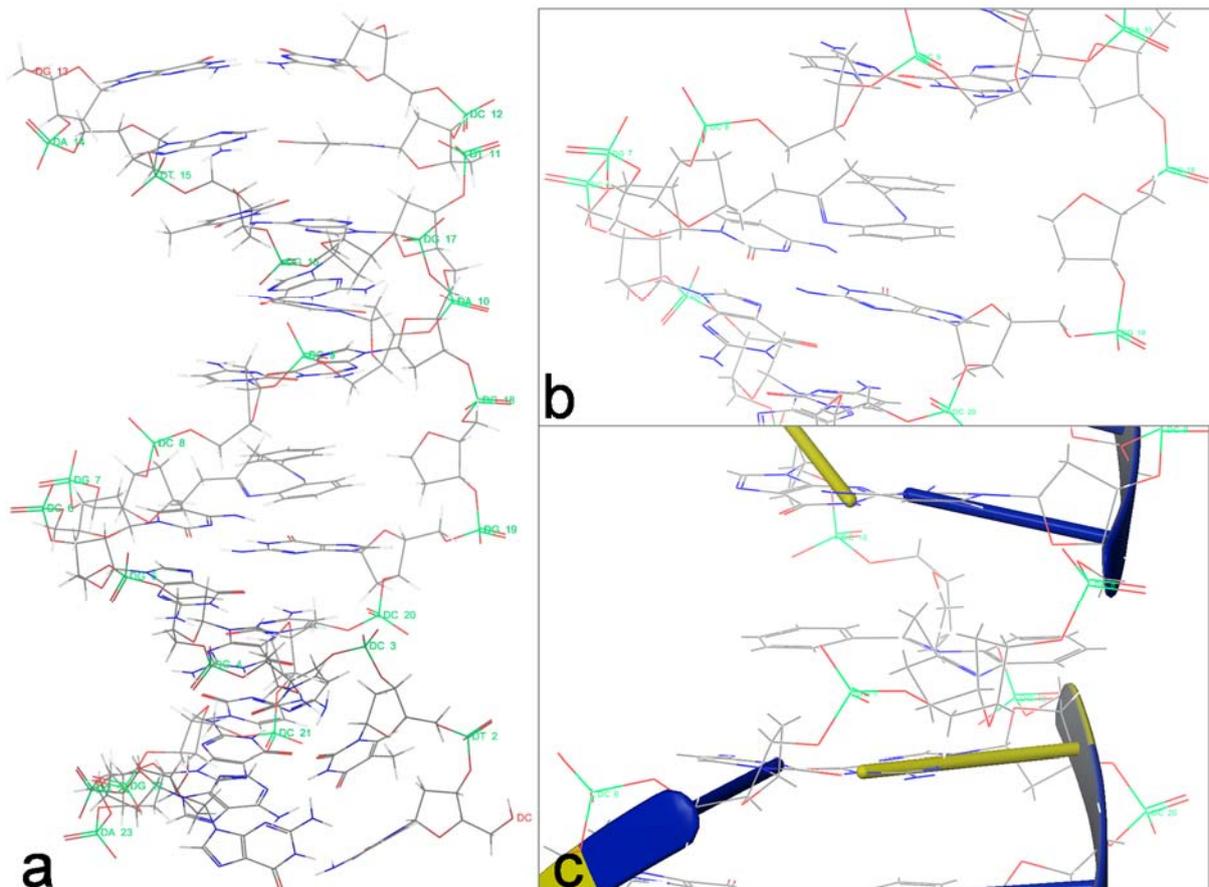
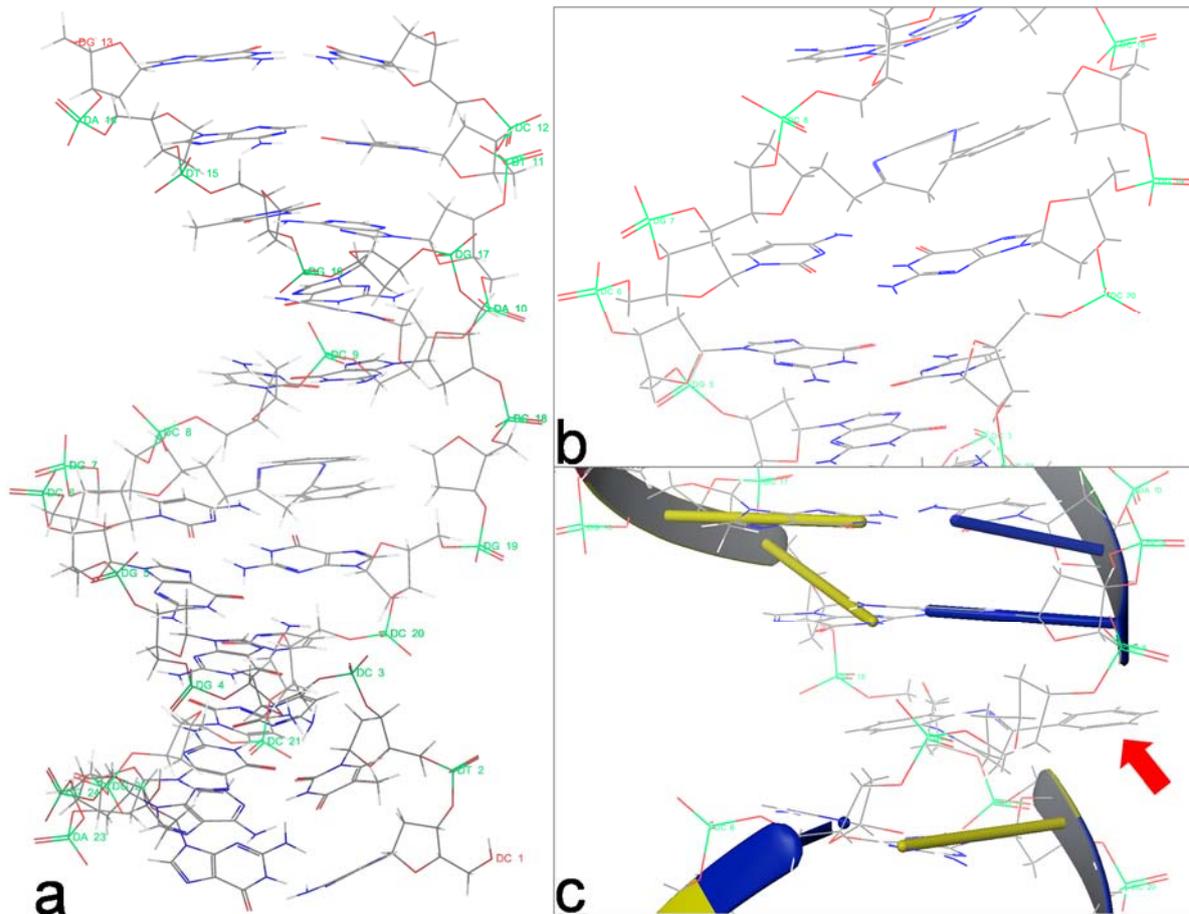


Abbildung 104: Struktur des unmodifizierten *NarI*-Duplexes **122-121**

Abbildung 104 zeigt die *Molecular Dynamics*-Simulation der unmodifizierten *NarI*-Struktur **122-121**. Im vergrößerten Ausschnitt b ist die Basenpaarung zwischen der Nucleobase C (P18 und P19) und G (P7 und P8) zu erkennen. Ausschnitt c verdeutlicht die dreidimensionale Struktur des DNA-Rückgrats während der Basenpaarung.

Abbildung 105: Struktur I des modifizierten Duplexes **123-117**

In Abbildung 105 wurde C entfernt und G durch die Benzodiazepin-Modifikation **B** ersetzt, sodass der Phenylring der Modifikation in die große Furche der DNA in den hinteren Teil der Abbildung ragt. Die vergrößerte Darstellung b von **123-117** Struktur I zeigt, dass sich die Modifikation relativ planar in die DNA-Leiter einfügt und nur die Methylengruppe des ungesättigten Heterocycluses aus der Ebene zeigt. Während der Phenylring ungehindert in der großen Furche liegt, ragt der Benzodiazepin-Rest durch die Verlängerung der C-C-Bindungsachse teilweise in den Raumanspruch der gegenüberliegenden Basen. Dadurch kommt der Benzodiazepin-Rest in Ausschnitt c nahe an das DNA-Rückgrat.

Abbildung 106: Struktur II des modifizierten Duplexes **123-117**

Durch eine Drehung der Modifikation um 180° erhält man Struktur II von **123-117** in Abbildung 106. Der Phenylring der Modifikation ist in Richtung des Betrachters in die kleine Furche der DNA geneigt. Auch hier fügt sich die Modifikation aufgrund ihrer Planarität gut in die Basenabfolge ein. In Ausschnitt c wird jedoch deutlich, dass bei Struktur II der Phenylring in das Phosphatrückgrat hinein und nahezu seitlich aus der DNA herausragt (s. Pfeil). Dies wird durch den berechneten Energiewert bestätigt, der für Struktur II am höchsten ist.

Allgemein konnte durch die *Molecular Dynamics*-Simulationen gezeigt werden, dass sich die Spacer-C-Benzodiazepin-Modifikation basierend auf ihrer Planarität durchaus in die DNA-Basenabfolge einpasst. Das Phosphatrückgrat wird aber, bedingt durch die Größe der Modifikation und ihren Abstand zum Zuckergrundgerüst, gestört. Dies konnte auch durch die Energiewerte in Tabelle 17 berechnet werden, die höher für die modifizierten Strukturen I und II ausfallen. Dabei stellte sich Struktur II als energetisch ungünstiger heraus, da hier der Phenylring in die kleine Furche der DNA zeigt und möglicherweise das Phosphatrückgrat stört. Es ist daher nicht auszuschließen, dass

die Spacer-C-Modifikationen in den Duplexen nach außen gedreht sind und nicht an der Basenpaarung teilnehmen. Dies könnte besonders für Duplexe zutreffen, bei denen eine Gegenbase statt ABASIC eingefügt ist. Eine endgültige Aussage über die genaue Struktur kann jedoch nur durch eine Röntgenstrukturanalyse getroffen werden.

4.2.2.4 Röntgenstrukturanalyse der Spacer-C-Nucleosid-modifizierten DNA

Um weitere Erkenntnisse über die Basenpaarung von Spacer-C-Nucleosiden in DNA-Duplexen zu erlangen, wurden erste Kristallisationsversuche in Kooperation mit Dr. D. Oberthür (AK Prof. Betzel, Universität Hamburg) am Ringbeschleuniger PETRA III am DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) unternommen.

Hierfür wurde das Benzodiazepin-modifizierte Oligonucleotid **123-121** der *NarI*-Sequenz mit Cytosin an gegenüberliegender Position ausgewählt:



Um die genaue räumliche Anordnung der Atome im Molekül zu bestimmen, stehen prinzipiell drei verschiedene Verfahren zur Auswahl. Die erste Methode ist die NMR-Spektroskopie, die sich zur Strukturbestimmung in Flüssigkeiten eignet. Von Nachteil ist jedoch, dass lediglich eine indirekte Aussage über die Atompositionen getroffen wird, da die Strukturanalyse über die nähere Umgebung anderer Atome erfolgt. Zusätzlich wird eine relativ hohe Konzentration des Analyten benötigt. Ein weiteres Verfahren ist die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, *Small-angle X-ray scattering*), bei der die Messung in Lösung erfolgt. Jedoch ist die Auflösung im Vergleich zu anderen Beugungsverfahren limitiert, da die Untersuchung auf Strukturen im oberen Nanometerbereich mit einer Größe bis zu 200 nm beschränkt ist. Als dritte Methode eignet sich die Röntgenstrukturanalyse von Einkristallen. Bei dieser Festkörpermethode wird die Beugung von monochromatischer Röntgenstrahlung an einem Kristallgitter beobachtet. Ein charakteristisches Beugungsmuster ermöglicht die genaue Berechnung der Atompositionen und Symmetrie der Einkristalle. Um die Struktur des Spacer-C-Nucleosid-modifizierten Duplexes zu untersuchen, wurde die Röntgenstrukturanalyse ausgewählt, da sie die Vorteile der guten Auflösung der NMR-Spektroskopie und der geringen Analytmenge der Röntgenkleinwinkelstreuung vereint. Zusätzlich waren aus der Arbeit von *Krüger* die geeigneten Kristallisationsbedingungen des unmodifizierten *NarI* Duplexes bekannt.^[43] Dadurch sollte der mit der Röntgenstrukturanalyse verbundene

Nachteil der zeitintensiven Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen minimiert werden.

Aufgrund der Kristallisationsbedingungen des unmodifizierten *NarI* Duplexes wurde zur Kristallisation des Spacer-C-Nucleosid-modifizierten Duplexes **123-121** die *hanging drop* Methode mit dem *Nucleic Acid Mini Screen* der Firma Hampton Research (s. Anhang) bei 4 °C in Linbro-Platten angewandt. Das Kit enthält 24 Puffer unterschiedlicher pH-Werte, monovalenter, zweiwertiger Kationen, Polyamine und 35%igen Dehydranten 2-Methyl-2,4-pentadiol (MPD). Diese Kombinationen wurden speziell für die Präzipitation von Nucleinsäure-Fragmenten ausgerichtet. In einem Reservoir wird 1 mL Dehydrant vorgelegt. Oberhalb der Lösung wird auf einem Objektträgerglas ein hängender Tropfen in der Größe von 1-3 µL platziert, in dem die DNA-Lösung mit einem der Präzipitaten in einer definierten Konzentration verdünnt wird. Jeder Ansatz wird durch Siliconpaste verschlossen, sodass ein gesättigtes System entsteht. Durch Wasserdampfdiffusion des Tropfens in die Reservoirlösung kristallisiert die DNA langsam aus (Abbildung 107). Die gewählten Kristallisationsbedingungen ermöglichten die direkte Messung der Proben im Stickstoffstrom ohne weitere Gefrierschutzbehandlung.

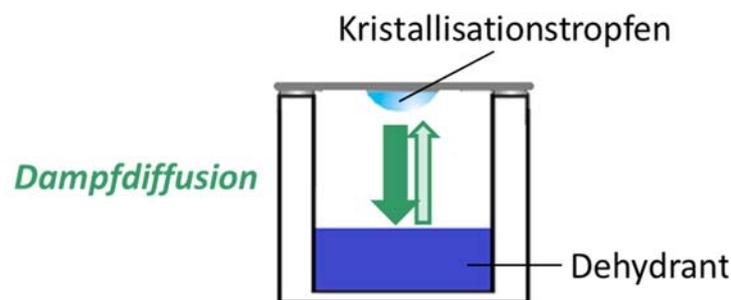


Abbildung 107: Schematische Darstellung des *hanging drop* Verfahrens

Für die Kristallisationsansätze wurde eine Lösung des Spacer-C-Nucleosid-modifizierten Duplexes der Konzentrationen 20 mg/ mL in Hybridisierungspuffer hergestellt. Um eine Kristallisation des Doppelstranges zu gewährleisten, ist eine vorherige Hybridisierung nötig. Hierfür wurden die Stränge für fünf Minuten bei 75 °C denaturiert und langsam über zwei Stunden im Thermomixer abgekühlt. Von Vorteil war, dass sich der Duplex bereits während der Synthese am Synthesizer gefärbt hatte (Abbildung 108). Die Färbung muss dabei im Zusammenhang mit dem delokalisierten Elektronensystem

tem der Modifikation **B** stehen, da diese nach der Oxidation mit Iod auftrat. Die Unterscheidung der DNA-Kristalle von möglichen Salzkristallen kann so optisch ohne chemische Färbung erfolgen.



Abbildung 108: Duplex-Lösung 123-121

Für die erste Kristallisationsversuche wurde die DNA-Lösung mit den einzelnen Pufferlösungen des Kits so verdünnt, dass für jede der Kristallisationsbedingungen eine Endkonzentration von 10 mg/ mL und 7 mg/ mL des Duplexes entstand. Alle Bedingungen wurden in Gegenwart einer 36%igen MPD-Lösung angesetzt, sodass insgesamt 48 verschiedene Kristallisationsbedingungen entstanden, die bei 4 °C gelagert wurden. Aus den Kristallisationsexperimenten von *Krüger* war bereits bekannt, dass das gezielte Auftauen der ersten Initiationskeime nach sieben Tagen bei Rt, die weitere Kristallisation bei 4 °C beschleunigt. Nach weiteren 14 Tagen Inkubation bei 4 °C konnten für die Nucleic Acid Mini Screen Nummer 8 mit einer DNA-Konzentration von 7 mg/ mL und Nr. 17 mit einer Konzentration von 10 mg/ mL die besten Kristalle erhalten werden (s Anhang). Während andere Kristalle eine inhomogene Morphologie aufwiesen, zeigt Abbildung 109 farbige Einkristalle mit geringerem Ausmaß an Verwachsungen.



Abbildung 109: Lichtmikroskopische Aufnahme des Kristalls aus Lösung Nr. 17

Als problematisch erwies sich die extreme Temperaturempfindlichkeit der Kristalle. Die kurze Erwärmung durch das Mikroskopielicht während der Platzierung der Kristalle auf den Proben-Loop führte teilweise zum Schmelzen der Kristalle noch vor Beginn der Messung. Zusätzlich wiesen die Kristalle keine ausreichende Faserbeugung bzw. zu schwache Diffraktion für eine komplexere Datensammlung auf. Daher wurden Optimierungen von den Lösung Nr. 8 und 17 mit DNA-Konzentrationen von 2.0, 3.9, 6.5 und 13.2 mg/ mL und je 10%, 20%, 25%, 30%, 36%, 40% MPD-Lösung als Dehydrant angefertigt, sodass insgesamt 48 weitere Kristallisationsbedingungen getestet werden konnten. Die Inkubation der Proben erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen Bedingungen. Allerdings konnten aus diesem Ansatz ebenfalls keine homogenen Einkristalle erhalten werden. Auch hier erwies sich der niedrige Schmelzpunkt der Einkristalle als problematisch. Die Gründe für die niedrige Schmelztemperatur könnten in der Kürze oder dem schwächeren Hybridisierungsgrad der Duplexe liegen. Allerdings ist die Kristallisation längerer Oligomere schwieriger und Einkristalle höherer Oligomere in der Literatur kaum bekannt.

4.2.3 Biochemische Charakterisierung der C-Nucleosid-modifizierten DNA

Die biochemische Charakterisierung C-Nucleosid-modifizierter DNA sollte anhand ihrer Stabilität gegenüber enzymatischer Hydrolyse erfolgen. Hierfür wurden die Benzodiazepin-modifizierten Stränge der palindromischen *EcoRI* Sequenz einem Restriktionsabbau unterzogen.

4.2.3.1 Enzymatischer Restriktionsabbau

Während eines Restriktionsabbaus schneidet *EcoRI* doppelsträngige DNA innerhalb der Erkennungssequenz 5'-d(GAA TTC)-3', sodass zwei Bruchstücke, sogenannte „sticky ends“, mit einem Überhang von jeweils vier Basen entstehen. Bei Rt kann die Bildung des Tetramers bzw. Octamers aus einem Dodecamer an der HPLC verfolgt werden (Abbildung 110).



Abbildung 110: Restriktionsabbau durch die *EcoRI*-Endonuclease

Der Restriktionsabbau erfolgte unter den von *Böge* optimierten Bedingungen.^[42] Nach Zugabe von Puffer und *EcoRI* wurde sofort eine Probe bei $t = 0$ h genommen. Die Inkubation der Probe erfolgte bei konstanter Temperatur von 23 °C. Nach jeweils unterschiedlichen Zeiten wurden Proben entnommen und durch die HPLC vermessen. Als Positiv-Kontrolle und um einen Vergleich zu den modifizierten Strängen ziehen zu können, wurde das Experiment zunächst mit der unmodifizierten *EcoRI*-Sequenz durchgeführt.

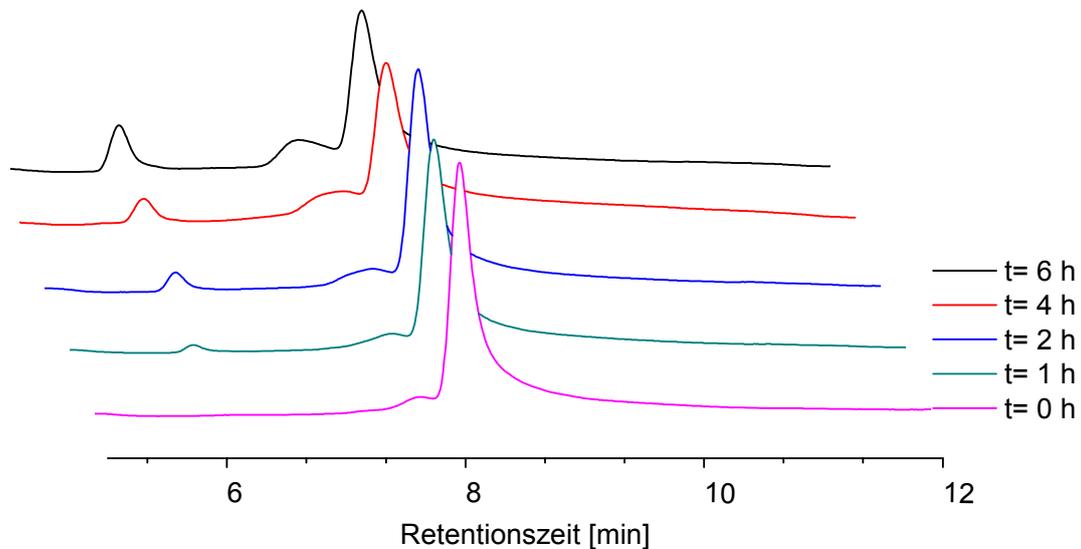
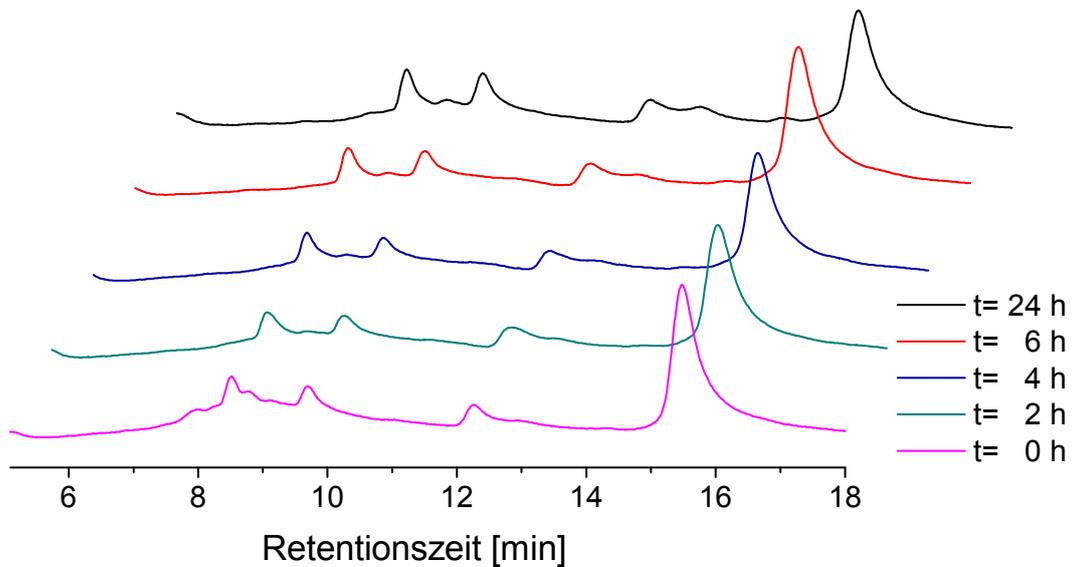


Abbildung 111: Restriktionsabbau des unmodifizierten *EcoRI*-Oligonucleotids **127**

Abbildung 111 zeigt die HPLC-Chromatogramme des positiven Restriktionsabbaus des unmodifizierten Oligonucleotids **127** 5'-d(GTA GAA TTCTAC)-3' durch *EcoRI*. Die Blindprobe bei $t = 0$ h zeigt zunächst nur ein Signal des 12mers bei einer Retentionszeit von 8 min. Der einsetzende Restriktionsabbau führt zur Bildung des Tetramers bei einer Retentionszeit von 6,0 min und des Octamers bei 7,5 min. Während die Integrale der Abbauprodukte größer werden, sinkt das Integral für das Dodecamer. Die Beobachtungen des unmodifizierten Stranges stimmen mit denen von *Böge* überein.

Abbildung 112 zeigt die HPLC-Chromatogramme des Abbaus des modifizierten *EcoRI*-Doppelstrangs 5'-d(BTA GAA TTCTAC)-3' **128** außerhalb der Erkennungssequenz an der Position 1 durch Inkubation mit *EcoRI*.

Abbildung 112: Restriktionsabbau des modifizierten Oligonucleotids **128**

Der Vergleich zu Abbildung 111 zeigt eine deutliche Erhöhung der Retentionszeit des Oligonucleotids **128** durch Einführung der Modifikation auf 15.5 min. Während der Inkubation mit *EcoRI* kann weder eine Verringerung des Integrals bei 15.5 min noch die Ausbildung von Signalen der Abbauprodukte beobachtet werden. Zwar sind weitere Signale bei 8.5 min, 10 min und 13 min zu erkennen, dennoch nimmt ihr Integral während der Inkubation nicht zu.

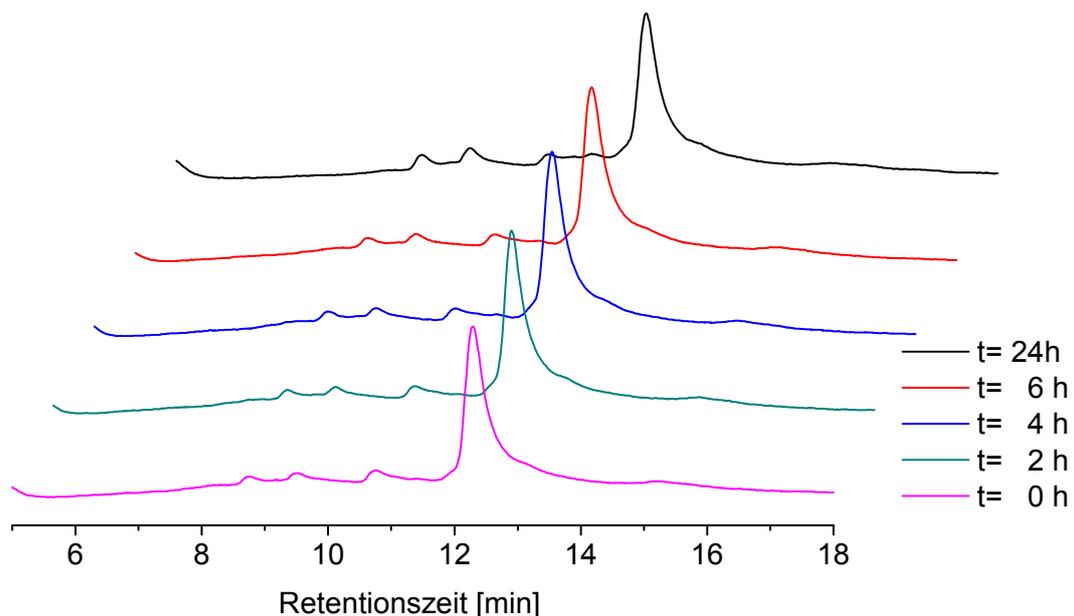
Abbildung 113: Restriktionsabbau des modifizierten Oligonucleotids **129**

Abbildung 113 zeigt den Abbau des modifizierten Oligonucleotids **129** mit der Sequenz 5'-d(GTA BAA TTC TAC)-3', bei dem sich die Modifikation an Position 4 innerhalb der

Erkennungssequenz und Schnittstelle für *EcoRI* befindet. Im Vergleich zum unmodifizierten Doppelstrang **127** ist die Retentionszeit um 4.5 min auf 12.5 min verschoben. Dabei wird deutlich, dass die Retentionszeit nicht nur durch den Einbau der Modifikation an sich, sondern auch durch die Position im Strang bestimmt wird. Bei Retentionszeiten von 8.5 min, 10 min und 11 min sind kleine Signale in den HPLC-Chromatogrammen zu sehen. Da sie bereits bei $t=0$ h vorhanden sind und sich ihr Integral zeitlich nicht verändert, handelt es sich um Abbauprodukte. In Betracht kommen daher möglicherweise Verunreinigungen oder um zu Beginn vorliegende Einzelstränge.

Aus Kapitel 4.2.2.1 und 4.2.2.2 ist bereits die starke Destabilisierung der modifizierten *EcoRI*-Duplexstränge durch Schmelzpunkt-Experimente und CD-Messungen bekannt. Die Denaturierung der Doppelstränge setzte bereits bei unter 20 °C ein, sodass bei der für *EcoRI* notwendigen Temperatur von 23 °C möglicherweise nicht mehr genug Duplex-Moleküle vorlagen. Sind nicht mehr ausreichend Duplexstränge vorhanden, ist die Restriktionsendonuclease nicht mehr in der Lage an die Erkennungssequenz zu binden und die DNA zu schneiden. Diese Tatsache erklärt, weshalb die eingesetzte Restriktionsendonuclease die modifizierte DNA auch dann nicht abbaute, als die Modifikation außerhalb der Erkennungssequenz lag. Dennoch konnten *Böge* und *Krüger* den Restriktionsabbau C8-*N*-Arylamin-modifizierter Duplexe bei 23 °C beobachten, obgleich deren Schmelztemperaturen unter 14 °C lagen.^[42,43,134,135] Für C8-*N*-H-Arylamin-modifizierte Oligonucleotide konnte *Krüger* eine Verringerung des Abbaus um 2 h im Vergleich zum unmodifizierten Strang beobachten. Aufgrund ihrer Modifikation an der Verknüpfung zwischen Heterocyclus und Desoxyribose sind C-Nucleosid-modifizierte Oligonucleotide jedoch in ihrer Struktur komplexer als C8-*N*-Arylamin-modifizierte Oligonucleotide, die ihre Modifikation an der Nucleobase tragen. Ein Vergleich zwischen beiden Modifikations-Typen ist daher schwierig.

5 Zusammenfassung

Veränderungen innerhalb der DNA steuern eine Vielzahl an Prozessen im Organismus. Willkürliche Schädigung wie Strangbrüche, Modifikationen, Dimerisierung oder Verlust von Nucleobasen in der DNA können jedoch zu Apoptose, Mutationen oder Krebs führen. Zielgerichtete Modifikationen in DNA könnten sich dagegen positiv auf ihre Eigenschaften auswirken, sodass ihre Verwendung innerhalb der Gentherapie möglich wird. In dieser Arbeit wurden Arylamine als Beispiel willkürlicher Schädigung und die C-Nucleoside als Beispiel zielgerichteter Modifikation innerhalb von DNA behandelt.

5.1 C8-*N*-Arylamin-Modifikationen

Die krebsauslösende Wirkung gegenüber der Exposition von aromatischen Aminen ist schon seit dem Ende des 19. Jahrhunderts bekannt.^[3,4] Das unterschiedliche kanzerogene Potential C8-*N*-**Acetyl**-*N*-Arylamin- und C8-*N*-**H**-Arylamin-modifizierter DNA wird auf ihre unterschiedlichen Konformationen der *N*-glycosidischen Bindung zurückgeführt, die sich während der Replikation unterschiedlich auf die DNA-Polymerasen auswirken.^[5-7] Der Einfluss von C8-*N*-Arylamin-Modifikationen auf die Monomerbausteine der DNA ist dagegen unbekannt. Durch die **strukturelle und biochemische Charakterisierung** von C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphaten innerhalb dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Klärung der Fragestellung geleistet, welche biologische Relevanz C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate bei der durch Arylamine verursachten Entstehung von Krebs beigemessen werden kann. Außerdem wurde die Nutzbarkeit der modifizierten Triphosphate in der *in vitro* Synthese modifizierter Oligonucleotide getestet.

Zur labortechnischen Synthese phosphorylierter Biomoleküle, insbesondere modifizierter Nucleotide, ist die *cycloSal*-Methode besonders geeignet.^[71,72,73,76,77] Erstmals konnten über diesen Syntheseweg die beiden C8-Addukt-Typen C8-*N*-**Acetyl**-*N*-Arylamin und C8-*N*-**H**-Arylamin des 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphats dargestellt werden. Eine besondere Herausforderung bestand dabei in der Synthese der oxidationsempfindlichen C8-*N*-**H**-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate. Um ihre Zersetzung auf dem direkten Syntheseweg zu vermeiden, musste innerhalb der *cycloSal*-Methode ein neuer Ansatz gewählt werden. Hierbei wurde die Acetylgruppe der Acetyl-

Addukte als Schutzgruppe zur Darstellung der C8-*N*-**H**-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate genutzt. Die Deblockierung ergab quantitativ die C8-*N*-**H**-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate aus ihren acetylierten Verbindungen. Die erfolgreiche **Synthese** und Isolierung der **C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate** (Kapitel 4.1.2.2, S. 51 und 4.1.2.3, S. 57) in sehr guten Ausbeuten ermöglichte im weiteren Verlauf deren strukturelle und biochemische Charakterisierung.

Zur Bestimmung der Konformation der *N*-glycosidischen Bindung wurden verschiedene, voneinander unabhängige theoretische sowie experimentelle Verfahren verwendet. Die theoretische Konformationsanalyse der modifizierten Verbindungen durch **thermodynamische Berechnungen** (Kapitel 4.1.3.1, S. 69) ergab ein energetisches Minimum der *syn*-Konformationen sowohl für die C8-*N*-**Acetyl**-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate als auch für die C8-*N*-**H**-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate. Die experimentellen Untersuchungen durch **NOE-Spektroskopie** (Kapitel 4.1.3.2, S. 75) bestätigen die thermodynamische Konformationsanalyse. Neu ist die Erkenntnis, dass die *syn*-Konformation beide Addukt-Typen der 5'-Triphosphate dominiert. Im Gegensatz hierzu liegt in der Natur das 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat bevorzugt in *anti*-Konformation vor.

Wie sich diese unnatürliche Konformation der C8-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate auf DNA-Polymerasen auswirkt, wurde durch die biochemische Charakterisierung in PCR-Experimenten und Primer-Verlängerungs-Studien untersucht. In den **PCR-Experimenten** (Kapitel 4.1.4.1, S. 79) zeigte sich, dass die modifizierten Triphosphate nicht von den DNA-Polymerasen eingebaut werden konnten. Die Verifizierung der PCR wurde durch entsprechende Kontroll-Proben gewährleistet, sodass die *in vitro* Synthese längerer C8-*N*-Arylamin-modifizierter DNA-Fragmente durch diese Methode ungeeignet scheint. In **Primer-Verlängerungs-Studien** (Kapitel 4.1.4.2, S. 80) konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass sowohl die C8-*N*-**Acetyl**- als auch die C8-*N*-**H**-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate trotz ihrer unnatürlichen *syn*-glycosidischen Konformation Substrate der DNA-Polymerasen sind. Der Vergleich zwischen den modifizierten Triphosphaten zeigte, dass die enzymatische Interaktion nicht in Zusammenhang mit der *N*-Acetylgruppe und dem aromatischen Substitutionsmuster steht. Diese Erkenntnisse bekräftigen die Ergebnisse der Konformationsanalysen, da auch dort die Konformation der *N*-glycosidischen Bindung unab-

hängig vom Addukt-Typ war. Die in der Literatur gezogene Schlussfolgerung, das unterschiedliche kanzerogene Potential beider Addukt-Typen sei auf ihre unterschiedlichen Konformationen zurückzuführen, ist daher, zumindest für die C8-*N*-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate, unzulässig.

Die biologische Relevanz C8-*N*-Arylamin-modifizierter 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate innerhalb der Karzinogenese konnte mittels der humanen DNA-Polymerase β gezeigt werden. Obgleich die Einbaurrate im Vergleich zu nicht-humanen Polymerasen verlangsamt ist, handelt es sich prinzipiell um Substrate humaner Polymerasen. Besonders der beobachtete zweifache Einbau der Modifikationen verdeutlichte, dass *in vivo* durchaus eine Kettenverlängerung nach dem erstmaligen Einbau möglich ist.

In einem kleineren Teilabschnitt der Arbeit wurde erstmals die Synthese **C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-modifizierter Quadruplexe** (Kapitel 4.1.5, S. 86) unternommen. Eine genaue Charakterisierung der Quadruplex-Strukturen führte mit den verwendeten Methoden zu keinem eindeutigen Ergebnis. In der CD-spektroskopischen Analyse konnte eine parallele Quadruplex-Anordnung für das C8-*N*-Acetyl-modifizierte Oligonucleotid **113** beobachtet werden. Gemäß der in Kapitel 2.1.8 (S. 21) beschriebenen Quadruplex-Topologien, führt dies zu dem Schluss, dass eine *anti*-Konformation im Quadruplex vorliegen muss.

5.2 C-Nucleosid-Modifikationen

Zielsetzung der Arbeit war die Synthese und Charakterisierung C-Nucleosid-modifizierter DNA. In der Antisense-Therapie kann eine Stabilitätssteigerung modifizierter DNA gegenüber enzymatischer Hydrolyse und Erhöhung der thermischen Stabilität bzw. Affinität gegenüber pathogener RNA langfristig die Expression krankhafter Gene inhibieren.

Im zweiten Teil der Arbeit gelang erstmals die **Synthese von Homo- und Spacer-C-Nucleosid-modifizierter DNA** (Kapitel 4.2.1, S. 93). Anschließend erfolgte die Hybridisierung dieser neuartigen Konstrukte mit DNA- und RNA-Oligonucleotiden.

Durch **Circulardichroismus**-Messungen (Kapitel 4.2.2.2, S. 102) konnte den modifizierten DNA-DNA-Duplexen B-DNA-Konformation und den DNA-RNA-Duplexen A-

RNA-Konformation nachgewiesen werden. In den **Schmelzpunktbestimmungen** (Kapitel 4.2.2.1, S. 98) führten die Homo- und Spacer-C-Modifikationen zu einer thermischen Destabilisierung, die für DNA-DNA-Duplexe stärker ausgeprägt war als für die DNA-RNA-Duplexe. Durch **Molecular Dynamics-Simulationen** (Kapitel 4.2.2.3, S. 108) konnte gezeigt werden, dass diese Destabilisierung im Zusammenhang mit der freien Rotation um die C-C-Bindungsachse der Modifikationen steht. Die Interkalation mit den natürlichen DNA-Basen ging für die Spacer-C-Benzodiazepin-Modifikation mit einer destabilisierenden Wechselwirkung des DNA-Phosphatrückgrats einher.

Erstmalig konnten Kristalle eines Spacer-C-Nucleosid-modifizierten DNA-Oligonucleotids gezüchtet werden. Die **Röntgenstrukturanalyse** (Kapitel 4.2.2.4, S. 112) ließ jedoch keine eindeutige Aussage über die Struktur der Modifikation innerhalb des Duplexes zu, da die Kristalle eine hohe thermische Instabilität und geringe Faserbeugung aufwiesen.

Gegenüber dem **Restriktionsabbau** (Kapitel 4.2.3.1, S. 115) durch *EcoRI* waren die C-Nucleosid-modifizierten Oligonucleotide stabil. Um eine Anwendung in der Antisense-Therapie voranzubringen, müssen weiterführende Arbeiten zur Verbesserung der thermischen Stabilität durchgeführt werden. In Verbindung mit der beobachteten Stabilität gegenüber enzymatischer Hydrolyse können die Ergebnisse von großem Nutzen sein.

6 Summary

Changes in the structure of DNA control a large number of processes in the organism. However, random damages like strand breaks, modifications, dimerisation or loss of nucleobases in DNA can lead to apoptosis, mutations or cancer. Specific modifications in DNA could be beneficial because an application in gene therapy would be possible. In this thesis, aryl amine damages at the nucleobase guanine are examples for random DNA damages whereas C-nucleosides are examples for specific DNA modifications.

6.1 C8-*N*-arylamine modifications

The carcinogenic effect of aromatic amines has been known since the late 19th century.^[3,4] The different carcinogenic potential between C8-*N*-acetyl-*N*-arylamine and C8-*N*-H-aryl amine-modified DNA is attributed to their different conformations of the *N*-glycosidic bond and the different effects on DNA polymerases during replication.^[5-7] However, effects of C8-*N*-arylamine nucleotides are unknown. In this thesis, C8-*N*-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates were characterized and their biological relevance in carcinogenesis is discussed.

Phosphorylated biomolecules, especially modified nucleotides can be synthesized *via* the *cycloSal*-approach.^[71,72,73,76,77] For the first time, C8-*N*-acetyl- and C8-*N*-H-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates were synthesized. The syntheses of oxidation-sensitive C8-*N*-H-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates led to their decomposition. Therefore, the acetyl group was used as a protecting group for the syntheses of the C8-*N*-H-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates. Deprotection of the acetylated compounds yielded quantitatively C8-*N*-H-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates. The successful preparation and isolation of C8-*N*-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates in very good yields allowed their structural and biochemical characterization.

Independent theoretical and experimental methods were used to determine the conformation of the *N*-glycosidic bond. For both, the C8-*N*-acetyl-*N*-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate and C8-*N*-H-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate, thermodynamic calculations resulted in an energetic minimum for the *syn*-conformation.

These studies were proven by NOE spectroscopy. Results of the conformational analysis revealed *syn* conformation for both 5'-triphosphates adduct types. This in contrast to the natural found 2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate.

Biochemical effects of the *syn* conformation on DNA polymerases were studied in PCR experiments and primer extension studies. Site-specifically *in vitro* synthesis of C8-*N*-arylamine-modified DNA by PCR using C8-arylamine-modified 2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates was not possible. However, despite their unnatural *syn* glycosidic conformation C8-*N*-arylamine-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates were confirmed to be substrates for DNA polymerases in primer extension studies. Enzymatic interaction appeared to be independent from the aromatic substitution and acetylation. These results confirmed the conformational analyses. Compared to non-human polymerases the incorporation rate of C8-arylamine-modified 2'-deoxyguanosine-5'-triphosphates by human polymerase β was slower. A possible biological relevance in chemical carcinogenesis could be demonstrated by the double incorporation of the modifications by the human DNA polymerase. *In vivo* further chain extension may be possible.

Furthermore, C8-*N*-acetyl-arylamine-modified quadruplexes were synthesized for the first time. Characterization of the quadruplex structures with the used methods was inconclusive. By CD spectroscopy parallel quadruplex arrangement of the oligonucleotide **113** was observed. According to quadruplex topology in chapter 2.1.8 the quadruplex adopts *anti* conformation of the glycosidic bond.

6.2 C-nucleoside modifications

The aim of this study was the investigation of C-nucleoside-modified DNA. Increased thermal and enzymatic stability of the C-nucleoside-modified DNA may improve complementary binding to pathogenic genes. For this reason, these properties of C-nucleoside-modified DNA may be beneficial in future antisense therapy.

In this thesis, homo- and spacer-C-nucleoside-modified DNA was synthesized for the first time. Subsequently, these novel constructs were hybridized with DNA and RNA oligonucleotides.

Circular dichroism measurements confirmed B-DNA conformation of the modified DNA-DNA duplexes and A-RNA conformation of DNA-RNA duplexes. Thermal destabilization in the melting point determinations was more pronounced for DNA-DNA duplexes as for the DNA-RNA duplexes. Molecular dynamics simulations were carried out for the spacer-C modification. Destabilization of the modification was related to their free rotation around the carbon-carbon bond axis. Intercalation of the spacer-benzodiazepine C modification within the natural nucleobases was associated with a destabilizing DNA phosphate backbone interaction.

For the first time spacer-C-nucleoside-modified DNA was crystallized. However, because of low fiber diffraction and thermal instability the crystals were unsuitable to be used in X-ray analysis.

C-nucleoside-modified oligonucleotides were stable to enzymatic digestion. In order to enable their application in antisense therapy, the thermal stability must be improved. Together with the observed enzymatic stability, the results will be beneficial for antisense therapy.

7 Experimententeil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Reagenzien

Acetylchlorid: unter Inertgasatmosphäre destilliert

Phosphorylchlorid: unter Inertgasatmosphäre destilliert

Diisopropylethylamin: mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgasatmosphäre destilliert

7.1.2 Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen, wie beschrieben gereinigt bzw. mehrere Tage unter Rückfluss getrocknet und unter Inertgasatmosphäre destilliert. Alle anderen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung verwendet und/ oder bereits getrocknet vom Hersteller bezogen.

Acetonitril: über Calciumhydrid getrocknet

Deuteriertes Chloroform: über 4 Å Molsieb aufbewahrt

Deuteriertes DMSO: über 4 Å Molsieb aufbewahrt

1,2-Dichlorethan: Acros Seal, H₂O: 0.005%, Acros Organic 326840010

Dichlormethan: destilliert bzw. über Calciumhydrid getrocknet

Diethylether: destilliert

1,2-Dimethoxyethan: über Kalium getrocknet

N,N-Dimethylformamid: über Molsieb, H₂O: 0.001%, Sigma Aldrich 40248

Essigsäureethylester: destilliert

Methanol: destilliert

Petrolether (50-70):	destilliert
Pyridin:	über Molsieb, H ₂ O: 0.005%, Sigma Aldrich 82704
Tetrahydrofuran:	über Kalium mit Benzophenon getrocknet
Toluol:	über Molsieb, H ₂ O: 0.005%, Sigma Aldrich 89677

7.1.3 Enzyme und molekularbiologische Reagenzien

FIREPol® DNA-Polymerase	Solis BioDyne, 01-01-00500
DreamTaq® DNA-Polymerase	Thermo Scientific, EP0701
Klenow Fragment, exo ⁻	Thermo Scientific, EP0421
Humane Polymerase β	Trevigen, 4020-100-K Chimerx, 1077-01
T4 Polynucleotidkinase	Fermentas, EK0031
GeneRuler™ 1 kb DNA Marker	Thermo Scientific 250-10.000 bp, SM311
[γ - ³² P]-ATP	Hartmann Analytic, SRP-301, 10 mCi/ mL
dNTPs 100 mM	Thermo Scientific, R0181

Sofern nicht anderes vermerkt, wurden für die enzymatischen Reaktionen die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

7.1.4 Phosphoramidite

iPr-Pac-dG-CE Phosphoramidit

N-4-*Isopropyl*-phenoxyacetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-desoxyguanosin-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N,N*-diisopropyl)]phosphoramidit:

C₅₁H₆₀N₇O₉P [946.05], Glen Research

Pac-dA-CE Phosphoramidit

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

C₄₈H₅₄N₇O₈P [887.97], Glen Research

dA-CE Phosphoramidit

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

C₄₇H₅₂N₇O₇P [857.95], Link Technologies

dC-CE Phosphoramidit

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

C₄₆H₅₂N₅O₈P [833.93], Link Technologies

dmf-dG-CE Phosphoramidit

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

C₄₃H₅₃N₈O₇P [824.92], Link Technologies

dT-CE Phosphoramidit

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

C₄₀H₄₉N₄O₈P [744.84], Link Technologies

ABASIC Phosphoramidit

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1,2-dideoxy-D-ribose-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N,N*-diisopropyl)]-phosphoramidit:

C₃₅H₄₅N₂O₆P [620.72], ChemGenes

TC-rA-CE Phosphoramidit

2'-O-(1,1-Dioxo-1λ⁶-thiomorpholin-4-carbothioat)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁶-benzoyladenodin-3'-O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit:

C₅₂H₅₉N₈O₁₀PS₂ [1018.23], SAFC

TC-rC-CE Phosphoramidit

2'-O-(1,1-Dioxo-1λ⁶-thiomorpholin-4-carbothioat)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N²-acetylcytidin-3'-O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit:

C₄₆H₅₇N₆O₁₁PS₂ [965.08], SAFC

TC-rG-CE Phosphoramidit

2'-O-(1,1-Dioxo-1λ⁶-thiomorpholin-4-carbothioat)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N²-isobutyrylguanosin-3'-O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit:

C₄₉H₆₁N₈O₁₁PS₂ [1033.16], SAFC

TC-rU-CE Phosphoramidit

2'-O-(1,1-Dioxo-1λ⁶-thiomorpholin-4-carbothioat)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-uridin-3'-O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit:

C₄₄H₅₄N₅O₁₁PS₂ [924.03], SAFC

7.1.5 HPLC-Puffer

TBAA-Puffer für die Analytik der Triphosphate

2 mM Tetrabutylammoniumacetat pH= 6.5

TEAA-Puffer für DNA-Oligonucleotide

100 mM Triethylamin pH= 6.9

Natriumperchlorat-Puffer für die IEX der RNA-Oligonucleotide

100 mM NaClO₄/ 25 mM Tris/ 10% Acetonitril (v/ v) pH 8.0

Tris-Puffer für die IEX der RNA-Oligonucleotide

25 mM Tris/ 10% Acetonitril (v/ v) pH 8.0

DTT-Puffer für den *Eco*RI-Restriktionsabbau

50 mM Tris/ 10 mM NaCl/ 10 mM MgCl/ 0.5 mM DTT pH 7.5

7.1.6 Molekularbiologische Puffer und Lösungen

Phosphatpuffer für T_m- und CD-Messungen

140 mM NaCl/ 7 mM NaH₂PO₄ / 3 mM Na₂HPO₄/ 1mM EDTA pH 6.8

TAE-Puffer

40 mM Tris/ 5 mM Natriumacetat/ 0.1 mM EDTA pH 7.8

20% Acrylamid-Lösung

8 M Harnstoff/ 20% Acrylamid/ Bisacrylamid (19:1)/ 0.1% TEMED in TAE-Puffer

8 M Harnstoff-Lösung

8 M Harnstoff in Reinstwasser

6x DNA-Loading Puffer (nativ)

100 mM EDTA/ 1% SDS (v/ v)/ 60% Glycerol/ 0.03% Bromphenolblau/ (w/ w), 0.03% Xylen Cyanol (w/ w) in TAE-Puffer

2x RNA-Loading Puffer (denaturierend)

95% Formamid (v/ v), 0.5 mM EDTA/ 0.25% SDS (v/ v), 0.025% Bromphenolblau (w/ w)/ 0.025% Xylen Cyanol (w/ w) in TAE-Puffer

Hybridisierungspuffer

20 mM Tris/ 50 mM NaCl pH 7.4

10% APS-Lösung

10% Ammoniumpersulfat (w/ v) in Reinstwasser

7.2 Chromatographie**Reversed-phase ultra-performance flash purification (RP-UPFP)**

Die Läufe wurden an einer PuriFlash® 430 Anlage der Firma Interchim durchgeführt. Es wurde eine Chromabond® Flash RS 40 C-18ec Säule der Firma Macherey-Nagel verwendet. Auto-sampling erfolgte ab einer Absorption von 2 mAU bei einer Wellenlänge zwischen 245-400 nm. Zur Reinigung der modifizierten Nucleosid-5'-triphosphate wurde ein Acetonitril-Gradient von 5-100% in Reinstwasser bis 35 min bei Rt angewendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 20 mL/ min.

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Die RP-HPLC-Läufe wurden an einer Hitachi-Anlage durchgeführt. Das Gerät bestand aus einem *Diode Array Detector L 2455*, einem *Autosampler L2200* und einer *Pump L2130*. Es wurde eine *Eco Cart® 125-3 LiChrospher® RP-18 endcapped (5 µm)* Säule der Firma Merck verwendet. Die DNA Oligonucleotide wurden in jeweils 50 µL Aliquoten an der RP-HPLC gereinigt. Die Detektion erfolgte bei 260 nm. Die aufgefangenen Fraktionen wurden vereinigt, im Ölpumpenvakuum getrocknet und jeweils in 100 µL Reinstwasser gelöst und ggf. ein zweites Mal gereinigt. Für die Analytik der Triphosphate wurde eine 4 mM Lösung in Wasser hergestellt von der ein Probevolumen von 10-15 µL injiziert wurde.

RP-HPLC-Methoden:

I.) Reinigung der Quadruplex-DNA-Oligonucleotide

Acetonitril-Gradient von 0-15% in TEAA-Puffer (pH= 6.9) bis 50 min bei Rt.

II.) Reinigung der *NarI*-DNA-Oligonucleotide

Acetonitril-Gradient von 0-20% in TEAA-Puffer (pH= 6.9) bis 50 min bei Rt.

III.) Restriktionsabbau durch *EcoRI*

Acetonitril-Gradient von 0-23% in TEAA-Puffer (pH= 8.0) bis 20 min, dann 5 min 100% Acetonitril und anschließend 100% TEAA-Puffer (pH= 8.0) für 10 min bei Rt.

IV.) Analytik der Triphosphate

Acetonitril-Gradient von 5-95% in TBAA-Puffer (pH= 6.5) bis 20 min bei Rt.

Ionenaustauschchromatographie an Dowex (50WX8, NH₄⁺):

Zur Regeneration des Ionenaustauscharzes Dowex[®] 50WX8, 50-100 mesh wurde eine wässrige Ammoniaklösung verwendet. Anschließend wurde der Ionenaustauscher mit Reinstwasser gespült, bis der basische pH-Wert in den neutralen Bereich überging. Die entsprechende Verbindung wurde in wenig Reinstwasser gelöst und vorsichtig aufgetragen. Die Elution der Verbindung erfolgte ebenfalls mit Reinstwasser.

Anion-Austausch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (IEX-HPLC)

Die HPLC-Läufe wurden an einer Hitachi-Anlage durchgeführt. Das Gerät bestand aus einem Diode Array Detector L 2455, einem *Autosampler L2200*. Für die RNA Oligonucleotide wurde eine DNAPac[™] PA-200 Säule der Firma Thermo Scientific verwendet.

IEX-HPLC-Methode:

I.) Reinigung der RNA-Oligonucleotide

Linearer Gradient aus NaClO₄-Puffer (pH= 8.0) von 0-100% bis 40 min in Tris-Puffer (pH= 8.0) bei einer Ofentemperatur von 50 °C.

Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für die Entsalzung der gereinigten RNA-Oligonucleotide wurde eine XK16/ 40 Säule gepackt mit Sephadex G-25 der Firma GE Healthcare verwendet. Die Entsalzung der RNA Oligonucleotide erfolgte durch Elution mit Reinstwasser innerhalb von 40 min bei Rt.

7.3 Massenspektrometrie

Elektrosprayionisation (ESI)

Die Standardmessungen erfolgten im positiven sowie negativen Ionenmodus an einem ESI-TOF Massenspektrometer 6224 der Firma Agilent Technologies. Phosphorhaltige Verbindungen wurden an einem maXis™ ESI-Q-TOF Massenspektrometer der Firma Bruker vermessen. Zur Messung der modifizierten Nucleosid-Phosphattriester diente Acetonitril als Lösungsmittel.

I.) Ionisierungsparameter für modifizierte Nucleosid-Phosphattriester

Source: Capillary Voltage: -4500 V, Nebulizer Gas: 3.0 bar, Dry Gas: 5.0 L/ min, Dry Temperature: 220 °C, Transfer: Funnel RF: 300 Vpp, ISCID Energy: 0 eV, Multiple RF: 300 Vpp, Collision-Cell Energy: 6.0 eV, Collision-RF 1200 Vpp, Transfertime: 40 µs, m/ z range: 200-1500, Ion Polarity: positive.

Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation (MALDI)

MALDI-Massenspektren wurden an einem MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer UltrafleXtreme™ Smartbeam II Laser der Firma Bruker aufgenommen.

Methode für modifizierte Triphosphate:

Für die Messung der modifizierten Triphosphate wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix verwendet. Nach *Kammerer* wurde DHB mit einer Konzentration von 5 mg/ mL in einem Gemisch aus 0.1% TFA und Acetonitril im Verhältnis 2:1 (v/ v) gelöst.^[126] Es wurde eine 25 mM Lösung des Analyten in Reinstwasser verwendet, die mit der Matrix im Verhältnis 1:1 (v/ v) auf einer Polished Steel Targetplatte kokristallisiert wurde. Die Messung erfolgte im negativ linearen Modus bei einer elektrischen Beschleunigungsspannung von 20 kV.

Methode für Oligonucleotide:

Gereinigte Oligonucleotide wurden jeweils bei einer Konzentration von ca. 25 µg/ mL in Reinstwasser gemessen. Als Matrix diente eine Ammoniumcitrat Lösung der Konzentration 10 mg/ mL im Verhältnis 1:1 (v/ v) Wasser/ Acetonitril, die mit 3- Hydroxypicolinsäure (HPA) gesättigt war. Probe und Matrix wurden im Verhältnis 1:1 (v/ v) auf

eine Ground Steel oder Polished Steel Targetplatte pipettiert und getrocknet. Als Standard diente ein eigens erstellter Oligonucleotidstandard, der den Massenbereich der jeweiligen Proben linear abdeckte.

7.4 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden im Institut für Organische Chemie und Anorganische Chemie aufgenommen. Die Messungen erfolgten an den Modellen DRX 500 MHz Spektrometer, AVANCE 400 MHz Spektrometer und dem Fourier 300 NMR-Spektrometer der Firma Bruker. Nach *Fullmer* wurde auf das jeweilige Lösungsmittelsignal kalibriert.^[146] Die ¹³C-NMR-Spektren in deuteriertem Wasser als Lösungsmittel wurden nicht kalibriert. Die chemischen Verschiebungen der ³¹P-NMR-Signale wurden gegen 85%ige Phosphorsäure als externen Standard angegeben.

Infrarot-Spektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit dem FT-IR-Spektrometer Model Alpha P mit Platinum-ATR-Modul der Firma Bruker bei Rt im Messbereich von 400-4000 cm⁻¹.

UV/Vis-Spektrometrie

Die Konzentrationen der Oligonucleotidlösungen wurden an einem *Nanodrop 2000c* der Firma Thermo Scientific bestimmt. Das Gerät wurde mit 1 µL Reinstwasser bzw. mit 1 µL des entsprechenden Puffers kalibriert. Die Messung von 1 µL Probelösung erfolgte im Oligo-DNA- bzw. Oligo-RNA-Modus. Bei modifizierten Oligonucleotiden wurde zusätzlich die entsprechende Molekulare Masse berücksichtigt, um eine genauere Berechnung des Extinktionskoeffizienten während der Messung zu erreichen.

7.5 Geräte

Circulardichroismus

Der Circulardichroismus der Oligonucleotide wurde an einem *Circular Dichroism Spectropolarimeter Model 815* der Firma Jasco gemessen. Für die Messungen des Circulardichroismus wurden dieselben Lösungen wie für die Messung der Schmelztemperaturen verwendet. Die molare Elliptizität wurde bei 10 °C zwischen 230-320 nm gemessen, wobei die Erfassung eines Datenpunktes alle 0.1 nm erfolgte. Mithilfe der Bedienungssoftware *Spectra Manager™ II* des Gerätes wurden die Messdaten aus zehn Messungen akkumuliert und für die graphische Darstellung der Messkurven im *Adaptive-Modus* gefiltert.

DNA/ RNA-Synthesizer

Synthese von DNA-Oligonucleotiden:

Die modifizierten und unmodifizierten Oligonucleotide wurden im 1 µmol-Maßstab nach der DNA Phosphoramidit-Methode am DNA/ RNA/ LNA Synthesizer H-8 der Firma K&A Laborgeräte synthetisiert. Aus nicht modifizierten Phosphoramiditen wurde eine 50 mM Lösung in Acetonitril hergestellt und nach einem Standardverfahren (s. Anhang) gekuppelt. Für die modifizierten Phosphoramidite wurden 25 mg der Verbindung in Acetonitril gelöst und ein modifiziertes Syntheseprotokoll (s. Anhang) verwendet, bei dem ein zusätzlicher Kupplungsschritt eingefügt und die Kupplungszeit verlängert wurde.

Es wurden folgende Reagenzien von Proligo, Link Technologies und Glen Research verwendet:

Detritylierung: 3% DCA in Dichlormethan

Kupplung: 0.3 M BMT in Acetonitril

Oxidation: 0.02 M I₂ in H₂O/ Pyridin/ THF (10:0.4:89.6)

Capping A: 5% Pac₂O in Pyridin/ THF

Capping B: 10% *N*-Methylimidazol in THF

Die Abspaltung der letzten DMTr-Schutzgruppe erfolgte automatisch nach der Synthese durch die Option „DMT Off“ oder wurde später manuell getätigt. Die anschließende Deblockierung und Abspaltung von der Festphase erfolgte manuell. Hierfür wurde die Festphase im 1 mL konzentriertem Ammoniak aufgenommen und für 5 h bei 55 °C im Thermomixer geschüttelt. Die Lösung wurde durch einen Spritzenfilter filtriert, die erhaltene wässrige Ammoniaklösung im Ölpumpenvakuum entfernt und das Oligonucleotid dreimal mit jeweils 150 µL Reinstwasser coevaporiert. Anschließend wurde das Oligonucleotid in 100 µL Reinstwasser aufgenommen, filtriert und mittels HPLC gereinigt.

Synthese von RNA-Oligonucleotiden:

Als Festphase zur Synthese von RNA-Oligonucleotiden diente 2'-O-Acetyl-geschütztes Polystyrol (RNA Primer Custom Support) der Firma GE Healthcare. Die RNA-Oligonucleotide wurden im 0.5 µmol-Maßstab unter Verwendung von 2'-TC geschützten RNA-Phosphoramiditen (SAFC) synthetisiert. Die Kupplungszeit richtete sich dabei nach dem Hersteller (siehe Anhang).

Neben den bereits angeführten Reagenzien wurden folgende Capping-Lösungen von Proligo verwendet:

Capping A: 5% Ac₂O in Pyridin/ THF

Capping B: 10% *N*-Methylimidazol in THF

Nach der Synthese wurde der feste Träger mit wasserfreiem Acetonitril gewaschen und im Argonstrom getrocknet. Die Abspaltung erfolgte mit wasserfreiem Ethylendiamin für 2 h bei Rt. Anschließend wurde mit 100 mM Triethylamin Puffer, pH 7.0 eluiert, filtriert und die Lösung gefriergetrocknet.

Gefriertrocknung

Verbindungen aus wässrigen Lösungen wurden mithilfe einer Christ Alpha 2-4 Gefrier-trocknungsanlage gewonnen.

Reinstwasseranlage

Die Reinigung des demineralisierten Wassers zu Reinstwasser erfolgte durch das Gerät *arium Pro UV* der Firma Sartorius Stedium.

Thermocycler

Zur Durchführung der Polymeraseketten-Reaktion wurde ein Thermocycler Primus 25 advanced der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH und zur radioisotopischen Markierung der Oligonucleotide ein Mastercycler® personal der Firma Eppendorf AG verwendet.

Polarimeter

Der optische Drehwert α der chiralen Verbindungen wurde an einem Polarimeter Optonic P8000 der Firma Krüss mit einer Na-Lampe ($\lambda = 598 \text{ nm}$; *D*-Linie) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt. Es wurde eine 10 cm lange Küvette verwendet. Mithilfe der Formel $[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha * 100}{c * l}$ wurde der spezifische Drehwert $[\alpha]_{\lambda}^t$ errechnet.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunktbestimmung nicht hygroskopischer Verbindungen erfolgte mit dem Modell apotec der Firma Otto Stein.

Schmelztemperaturbestimmung

Die Messung der Schmelztemperatur doppelsträngiger Nucleinsäure erfolgte mit einer $1 \mu\text{M}$ -Lösung an einem *Circular Dichroism Spectropolarimeter Model 815* der Firma Jasco. Hierfür wurden je 1 nmol der beiden Einzelstränge in 1 mL T_m -Puffer gelöst. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Temperaturintervall von $80 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Zunächst wurde die Probe zweimal auf $80 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und abgekühlt. Für die eigentliche Messung wurde die Probe mit einer Kühlrate von $2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ von $80 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $5 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde alle $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ein Datenpunkt erfasst. Die Auswertung der Absorptionskurven erfolgte durch das Programm *Origin* von Origin-Lab®.

7.6 Molekularbiologische Methoden

Restriktionsabbau mittels *EcoRI*

Für den Restriktionsabbau wurden jeweils 1.1 µg des jeweiligen Oligonucleotids eingesetzt. Dies entspricht einer optischen Dichte von 0.4. Das entsprechende Aliquot wurde in 100 µL DTT-Puffer gelöst, für zwei Minuten auf 70 °C erwärmt und anschließend langsam auf Rt abgekühlt. Die Inkubation erfolgte mit 27 µL (270 Units) *EcoRI* bei 23 °C. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden Proben von je 20 µL entnommen mit 40 µL Reinstwasser versetzt und an der HPLC vermessen. Je eine Blindprobe bei t= 0 h wurde sofort nach Zugabe der Restriktionsendonuclease gemessen.

Polymerase-Kettenreaktion

Als DNA-Matrize für Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente ein pET22b(+) Vektor mit einem über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* klonierten Insert von knapp 1000 bp. Das Plasmid sowie die zwei flankierenden Primer wurden freundlicherweise von Frau Dr. Anna Rath zur Verfügung gestellt. Für alle Experimente wurde jeweils eine Positivkontrolle mit allen dNTPs und eine Negativkontrolle ohne dGTP durchgeführt. Die Endkonzentration aller dNTPs betrug 250 µM bzw. 1.25 mM. Die Endkonzentration des Templates betrug 0.1 ng/ µL, die der Primer 0.05 ng/ µL. Es wurden pro Experiment 2.5 U der thermostabilen DNA-Polymerasen FIREPol® bzw. DreamTaq® verwendet. Für die Polymerasen wurden die entsprechenden Puffer und Additive mit einer Ansatzgröße von 100 µL verwendet. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 18 aufgeführt, die Schritte 2-4 wurden in 25 Zyklen wiederholt.

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen für die PCR mit den C8-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphaten

Schritt	Programm	Temperatur	Zeit
1	Primäre Denaturierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	95 °C	30 sec
3	Annealing	54 °C	30 sec
4	Elongation	72 °C	60 sec
5	Finale Elongation	72 °C	5 min

Anschließend wurde jeder Probe ein Aliquot von 10 µL entnommen, mit 1 µL des 6x DNA-Loading Puffers gemischt und auf ein 1%iges Agarose-Gel geladen. Die Zuordnung der DNA-Fragmente erfolgte mithilfe eines 1 kb Größenstandards.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von nicht radioaktiv markierten PCR-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurden 1%ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet, die für ca. 45 min einer Spannung von 120 V ausgesetzt wurden. Es wurde die Spannungsquelle PowerPac™ Basic Power Supply der Firma Bio-Rad verwendet. Als Gelelektrophoresekammer diente das horizontale PerfectBlue™ Gelsystem der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH.

Radioaktive Markierung

Für die Phosphorylierungsreaktion wurde die T4 Polynucleotidkinase verwendet. Die Kinase katalysiert die Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf eine freie 5'-OH Gruppe einzelsträngiger und doppelsträngiger Nucleinsäuren. Indem der Kinase ausschließlich $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ als Substrat zur Verfügung gestellt wird, wird die radioaktive Markierung des 5'-Terminus am Primer erreicht. Es wurde eine 10-fache Verdünnung eines 25mer Primers verwendet, sodass die Endkonzentration 40 pmol betrug. Die Menge an $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ wurde entsprechend ihrer Aktivität gewählt und die Menge an Reinstwasser angepasst.

Tabelle 19: Reaktionsansatz für die radioaktive Markierung

Markierungsreaktion
4 μL Primer
2 μL 10x PNK Puffer
9-12 μL Reinstwasser
1 μL PNK
1-4 μL $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

Dem Inkubationsprogramm des Thermocyclers wurde eine Inaktivierungszeit angefügt, um eine unerwünschte Markierung auszuschließen:

Tabelle 20: Reaktionsbedingungen für die radioaktive Markierung

Programm	Temperatur	Zeit
Reaktion	37 °C	30 min
Inaktivierung	80 °C	10 min

Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Reinigung radioaktivmarkierter Primer wurde eine präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Es wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem Mini-Protean® Tetra Cell von der Firma Bio-Rad verwendet, sowie das entsprechende Zubehör der Firma zur Gelpräparation mit einer Gelgröße von 130 mm x 80 mm x 0.75 mm. Die Zusammensetzung der 10%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gele (PAA-Gel) ist Tabelle 21 dargestellt. Die Denaturierung der Nucleinsäuren wird dabei durch die Zugabe des Harnstoffs erreicht.

Tabelle 21: Zusammensetzung für ein 10% denaturierendes PAA-Gel

10% denat. PAA-Gel
5 mL 20% Acrylamid-Lösung
5 mL 8 M Harnstoff-Lösung
70 µL 10% APS

Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2x RNA-Loading Puffer versetzt und für zwei min auf 80 °C erhitzt. Vor der Beladung des Gels erfolgte ein Vorlauf von 10 min bei 25 W unter Verwendung von TAE-Puffer. Um Harnstoffreste zu entfernen, wurden die Probenetaschen zuvor mit TAE-Puffer gespült. Nach Probenauftrag folgte die eigentliche Gelelektrophorese bei 25 W für ca. 10 min mit einem Power Supply EV232 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH.

Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse radioaktivmarkierter Oligonucleotide nach einem Polymeraseassay wurde eine 15%iges Sequenziergel der Größe 370 mm x 180 mm x 0.5 mm präpariert. Wichtig ist die vorherige Silylierung der Glasplatten mit 5%iger Dichlordimethylsilan-Lösung in Chloroform, um eine optimale Präparation der Gele zu erreichen.

Tabelle 22: Zusammensetzung für ein 15%iges Sequenziergel

15% denat. PAA-Gel
30 mL 20% Acrylamid-Lösung
10 mL 8 M Harnstoff-Lösung
280 µL 10% APS

Als Spannungsquelle wurde ebenfalls der Power Supply EV232 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH verwendet. Das PAA-Gel wurde in eine vertikale Gelelektrophoresekammer gespannt und einem Vorlauf von zwei Stunden bei 25 Watt unterzogen. Anschließend wurden je 5 µL der bereits denaturierten Probe des Polymeraseassay aufgetragen und alle übrigen Probenaschen mit dem gleichen Volumen an 2x RNA-Loading Puffer gefüllt. Die analytische Gelelektrophorese wurde bei 25 Watt für 3.5 h durchgeführt.

Autoradiographie

Für die Detektion der radioaktiv markierten Oligonucleotide wurde das jeweilige Polyacrylamid-Gel mit einem zuvor belichteten Storage Phosphor Screen der Firma GE Healthcare in einer Exposure Cassette der Firma Bio-Rad exponiert. Die Expositionszeit richtete sich dabei nach der Aktivität der radioaktiven Probe und wurde bei -20 °C durchgeführt. In einem Molecular Imager® FX der Firma Bio-Rad erfolgte die Detektion der Filme. Die Auswertung wurde mit der zugehörigen Software Quantity One® vorgenommen.

Isolierung und Reinigung von Nucleinsäure aus Polyacrylamid-Gelen

Die entsprechenden Gelstücke wurden aus dem Gel geschnitten und je zweimal 45 min bei 42 °C in 500 µL 0.3 M Natriumacetatlösung pH 5.2 inkubiert. Durch Diffusionselution gelangt die DNA in Lösung und kann direkt zur Alkoholpräzipitation weiter verwendet werden. Hierfür wurde der Lösung 1000 µL Isopropanol sowie 2 µL Glykogen zugefügt. Der niedrige pH-Wert der Acetatlösung und die Zugabe von Alkohol verringern die Löslichkeit der DNA, während die Zugabe von Glykogen die Fällung bei kurzen Oligonucleotiden erleichtert. Nach der Fällung von mindestens einer Stunde bei -20 °C, wurde bei 4 °C für 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Um eventuell präzipitierte Salze zu entfernen, wurde das Pellet mit 100 µL 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde einige min bei Rt getrocknet und anschließend in 10 µL Reinstwasser gelöst.

Hybridisierung

Für die Hybridisierungsreaktion wurde eine 1:100 Verdünnung des Template-Strangs angefertigt, sodass die Endkonzentration 5 pmol betrug. Der Hybridisierungsansatz

wurde 5 min bei 95 °C denaturiert und im ausgeschalteten Thermocyclerblock langsam über 2 Stunden auf Rt abgekühlt.

Tabelle 23: Hybridisierungsansatz

Hybridisierungsansatz
6 µL markierter Primer
15 µL Template
39 µL Hybridisierungspuffer

Primer-Verlängerungs-Studien

Das Endvolumen der Ansätze betrug je 20 µL. Die Endkonzentration der modifizierten bzw. nicht modifizierten dNTPs betrug 20 µM. Für die Positiv-Kontrolle wurden alle vier natürlichen dNTPs hinzugegeben, während die Negativ-Kontrolle keine dNTPs enthielt. Als Kontrolle wurden zusätzlich vier Ansätze präpariert, in denen jeweils nur eines der natürlichen Nucleotide dATP, dCTP, dGTP bzw. dTTP vorhanden war. Modifizierte Proben enthielten das entsprechende modifizierte dG*TP. Aus dem Hybridisierungsansatz wurden je 3 µL pro Reaktion verwendet, wobei das Reaktionsvolumen 20 µL betrug.

Die katalytische Aktivität der DNA-Polymerasen bestimmte die Menge an Polymerase sowie die Inkubationszeiten:

Tabelle 24: Inkubationsbedingungen für die Primer-Verlängerungs-Studien

Polymerase	Temperatur	Zeit	Katalytische End-Aktivität
Klenow Fragment exo-	37 °C	5 min	2.5 Units
Humane Polymerase β	37 °C	15 min	0.05 Units

Im Anschluss wurden den Proben je 2 µL 2x RNA-Puffer hinzugegeben und 2 min bei 80 °C denaturiert.

7.7 Chemische Synthesen

7.7.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Alle Reaktionen wurden unter Stickstoffatmosphäre in trockenen Lösungsmitteln durchgeführt, wenn nicht anders vermerkt.

AAV 1: Synthese der *N*-Aryl-hydroxamsäuren

Katalytische Mengen frischen Raney Nickles wurden im Vakuum getrocknet. Dazu wurde unter Kühlung langsam eine kalte Lösung des Nitroaromaten in Dichlo-rethan/ Ethanol (1:1) (pro g Edukt je 10 mL) hinzugegeben. Für die weiteren Synthe-seschritte von AAV1 wurde keine Intergasatmosphäre benötigt. Die Reaktionslösung wurde auf unter 5 °C gekühlt und innerhalb von 30 min wurden 10 Äquiv. Hydrazin Monohydrat hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 1.5 h bei 5 °C gerührt und an-schließend das Nickel durch Filtration entfernt. Nachdem das Lösungsmittel eingeeengt und der Rückstand in Diethylether gelöst wurde (10 mL pro g Edukt), wurde die Lösung auf unter 5 °C gekühlt, mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 mL pro mmol) versetzt und innerhalb von 30 min 1 Äquiv. Acetylchlorid hinzugegeben. Die Reaktions-lösung wurde bei unter 5 °C gerührt bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar war. Anschließend wurde das Rohprodukt mehrmals mit 1 M Natronlauge aus der organischen Phase extrahiert. Die wässrige Lösung wurde mit kon-zentrierter Salzsäure auf einen pH Wert von 1-3 angesäuert und das Produkt mehr-mals mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Nat-riumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel vorsichtig über eine Kälteedestillation ent-fernt.

AAV 2: Darstellung der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-Addukte

Das O⁶-Benzotriazol-3',5'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin wurde in Di-methoxyethan (10 mL pro mmol Edukt) gelöst. Anschließend wurden 2.0 Äquiv. der entsprechenden *N*-Arylhydroxamsäure und 2 Äquiv. Cäsiumcarbonat hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei Rt gerührt bis dünnschichtchromatographisch kein O⁶-Ben-zotriazol-3',5'-bis-(*tert*-dimethyl-silyl)-2'-desoxyguanosin mehr nachgewiesen werden konnte. Das Lösungsmittel wurde durch Kälteedestillation entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/ Methanol Gradienten von 0-5% aufgearbeitet.

AAV 3: Spaltung der *tert*-Butyldimethylsilylether

Das Nucleosid wurde in Tetrahydrofuran vorgelegt, dazu wurde eine Lösung aus 6 Äquiv. Tetra-*n*-butylammoniumfluorid in THF und 12 Äquiv. Eisessig hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei Rt gerührt bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr

nachgewiesen werden konnte und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Dichlormethan/ Methanol (9:1, v/ v) gereinigt bis spektroskopisch kein Tetra-*n*-butylammoniumfluorid mehr detektiert werden konnte.

AAV 4: Formamidin-Schätzung der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-Addukte

Für die Reaktion wurde das Nucleosid in Pyridin gelöst (25 mL pro mol Edukt) und 2 Äquiv. *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei Rt gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Dichlormethan/ Methanol (19:1, v/ v) aufgearbeitet.

AAV 5: Synthese von modifizierten *cycloSal*-Nucleotiden

Das Nucleosid wurde vor der Reaktion mehrmals mit Acetonitril coevaporiert und ausreichend im Vakuum getrocknet. Das Nucleosid wurde in Pyridin (7.5 mL/ mmol) gelöst, 30 min über 4 Å Molsieb getrocknet und auf -35 °C gekühlt. Es wurden 1.2 Äquiv. 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat in THF (1 mL/ mmol) gelöst und sehr langsam über 5 h in der Kälte hinzugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h weiter bei -35 °C gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/ Methanol-Gemisch (9:1 v/ v + 1% Essigsäure) gereinigt.

AAV 6: Synthese der C8-*N*-Acetyl-*N*-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate

Alle Edukte wurden vor der Reaktion ausreichend im Vakuum getrocknet. Für die Reaktion wurden 2 Äquiv. Phosphatsalz in DMF (1 mL pro 50 mg) gelöst und für eine Stunde über 4 Å Molsieb getrocknet. Dazu wurde eine Lösung aus *cycloSal*-Nucleotid in DMF (1 mL pro 25 mg) langsam hinzugetropft und die Reaktion bei Rt gerührt. Nach vollständigem Reaktionsumsatz wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde in wenig Wasser aufgenommen, mit 25% Ammoniak versetzt und zur vollständigen Abspaltung der Formamidin-Schutzgruppe für 16 h bei Rt auf dem Schüttler inkubiert. Nach Entfernen des Ammoniaks im Vakuum wurde das Rohprodukt mehrmals durch ultra-

performance flash purification (RP-UPFP) an RP-18-Silicagel mit unterschiedlichen Acetonitril-Gradienten gereinigt. Durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex (50WX8, NH₄⁺) und Gefriertrocknung wurde das Produkt erhalten.

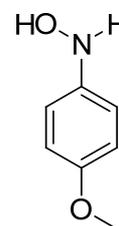
AAV 7: Synthese der C8-N-H-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphate

Es wurde eine Lösung aus frischem 25%igen Ammoniak und Methylamin im Verhältnis 1:1 und einer Endkonzentration von 0.25 M 2-Mercaptoethanol (AMA-Reagenz) hergestellt. Das entsprechende C8-N-Acetyl-N-Arylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat wurde eine Stunde bei 55 °C mit dem AMA-Reagenz auf dem Schüttler behandelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mehrmals mit Wasser coevaporiert. Durch anschließende Reinigung an Sephadex LH-20 mit Wasser als Eluent und Gefriertrocknung wurde das Produkt erhalten.

7.7.2 Synthesevorschriften der Verbindungen

Versuch zur Synthese von N-4-Methoxyphenyl-hydroxylamin 71

Es wurde 1.00 g (6.53 mmol) 4-Nitroanisol und 1.93 g (29.4 mmol, 4 Äquiv.) Zink in 80 mL Acetonitril für 30 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden 4.64 g (73.5 mmol; 10 Äquiv.) Ammoniumformiat hinzugegeben. Nach weiteren 30 min im Ultraschall, konnte nur die Ausbildung von Amin beobachtet werden.

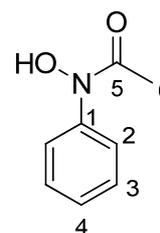


Versuch zur Synthese von N-4-Methoxyphenyl-hydroxylamin 71

Es wurde 500 mg (3.28 mmol) 4-Nitroanisol in 20 mL Methanol gelöst und mit 200 mg (1.64 mmol) Antimon-Staub versetzt. Anschließend wurden 370 mg (9.80 mmol) Natriumborhydrid langsam zur Reaktionslösung hinzugegeben. Dünnschichtchromatographisch konnte keine Produktbildung sondern nur die Bildung von Amin beobachtet werden.

N-Acetyl-N-Phenyl-hydroxamsäure 72

Die Synthese wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 12.5 mL (122 mmol) Nitrobenzol, 39.0 mL (639 mmol, 5 Äquiv.) 51% Hydrazin Monohydrat und 10.0 mL Acetylchlorid (140 mmol, 1.2 Äquiv.) verwendet. Es wurden 6.15 g (40.7 mmol, 33%, über zwei Stufen) eines hellgelben Feststoffs erhalten.

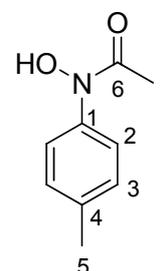


R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.56. Smp.: 64 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.58 (s, 1 H, OH), 7.61 (d, 2 H, H-2, ³J_{H,H}= 8.0), 7.37-7.33 (m, 2 H, H-3), 7.15-7.11 (m, 1 H, H-4), 2.19 (s, 3 H, H-6). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.1 (C-5), 141.6 (C-1), 128.3 (C-3), 124.6 (C-4), 120.5 (C-2), 22.4 (C-6). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3135, 2887, 1626, 1590, 1482, 1458, 1384, 1353, 1305, 1227, 1074, 1038, 1014, 913. **MS**: (ESI-HR, m/ z): ber.: 152.1704 [M+H]⁺, gef.: 152.0710 [M+H]⁺.

N-Acetyl-N-4-Methylphenyl-hydroxamsäure 73

Die Synthese wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 15.0 g (109 mmol) 1-Methyl-4-nitrobenzol, 35.0 mL (574 mmol, 5 Äquiv.) 51% Hydrazin Monohydrat und 9.40 mL Acetylchlorid (132 mmol, 1.2 Äquiv.) verwendet. Es wurden 5.70 g (34.5 mmol, 32%, über zwei Stufen) eines hellgelben Feststoffs erhalten.

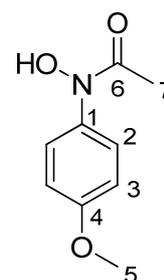


R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.54. Smp.: 80 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.51 (bs, 1 H, OH), 7.49 (d, 2 H, H-2, ³J_{H,H}= 8.2), 7.16 (d, 2 H, H-3, ³J_{H,H}= 8.3), 2.28 (s, 3 H, H-5), 2.17 (s, 3 H, H-7). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 139.3 (C-1), 128.8 (C-3), 22.3 (C-7), 20.4 (C-5). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3121, 2882, 1610, 1502, 1419, 1385, 1353, 1306, 1228, 1184, 1101, 1023, 915, 819. **MS**: (ESI-HR, m/ z): ber.: 165.1969 [M+H]⁺, gef.: 166.0863 [M+H]⁺.

N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-hydroxamsäure 74

Die Synthese wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 15.3 g (100 mmol) 1-Methoxy-4-nitrobenzol, 32.0 mL (525 mol, 5 Äquiv.) 51% Hydrazin Monohydrat und 7.1 mL Acetylchlorid (99 mmol, 1 Äquiv.) verwendet. Es wurden 6.41 g (35.4 mmol, 35%, über zwei Stufen) eines braunen Feststoffs erhalten.

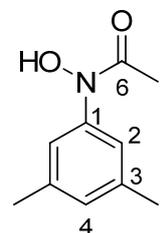


R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.85. Smp.: 52°C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.48 (bs, 1 H, OH), 7.46 (d, 2 H, H-2, ³J_{H,H}=8.0), 6.92 (d, 2 H, H-3, ³J_{H,H}= 8.0), 3.74 (s, 3 H, H-7), 2.14 (bs, 3 H, H-5). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 167.6 (C-6), 154.9 (C-1), 134.8 (C-3), 120.4 (C-4), 113.6 (C-5), 113.4 (C-2), 55.2 (C-5), 21.9 (C-7). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3096, 2836, 1605, 1501, 1435, 1389, 1298, 1249, 1249, 1222, 1172, 1123, 1096, 1031, 1005, 915, 829, 796. **MS:** (ESI-HR, m/ z): ber.: 182.1963 [M+H]⁺, gef.: 182.0811 [M+H]⁺.

N-Acetyl-N-3,5-Dimethylphenyl-hydroxamsäure 75

Die Synthese wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 12.0 g (79.4 mmol) 3,5-Dimethyl-5-nitrobenzol, 25.2 mL (413 mmol, 5 Äquiv.) 51% Hydrazin Monohydrat und 6.8 mL Acetylchlorid (95 mmol, 1.2 Äquiv.) verwendet. Es wurden 4.38 g (24.5 mmol, 31%, über zwei Stufen) eines hellgelben Feststoffs erhalten.

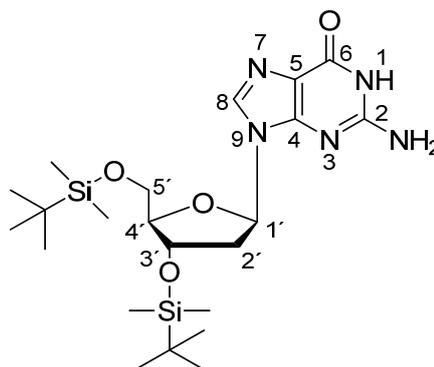


R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.85. Smp.: 49 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.49 (bs, 1 H, OH), 7.22 (s, 2 H, H-2), 6.79 (s, 2 H, H-4), 2.26 (s, 6 H, H-5), 2.16 (s, 3 H, H-7). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 141.6 (C-6), 137.4 (C-1, C-3), 126.2 (C-2, C-4), 22.5 (C-5), 21.0 (C-7). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3121, 2860, 1615, 1589, 1378, 1269, 1180, 1114, 1036, 998, 890, 842, 810, 687. **MS:** (FAB-HR, m/ z): ber.: 180.1024 [M], gef.: 180.1030 [M].

3',5'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 68

Es wurden 10.0 g 2'-Desoxyguanosin Monohydrat (35.1 mmol) zweimal mit 10 mL Pyridin coevaporiert und in 60 mL Pyridin suspendiert. Nach Zugabe von 16.4 g *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (109 mmol, 3.1 Äquiv.) und 11.6 g Imidazol (171 mmol, 4.9 Äquiv.). Die entstandene Lösung wurde 17 h bei Rt gerührt.



Der vollständige Umsatz der Reaktion wurde

dünnschichtchromatographisch verfolgt und die Reaktion durch Zugabe von 2 mL Methanol beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert.

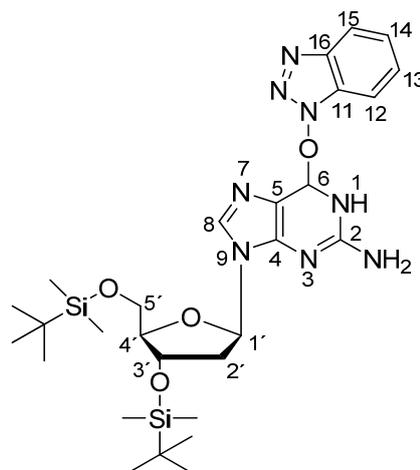
Das Rohprodukt wurde in je 150 mL Dichlormethan/ Wasser (1:1) gewaschen und das Dichlormethan anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde filtriert, mehrfach mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 17.0 g (34.4 mmol, 98%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.28. Smp.: Zersetzung ab 266 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589\text{ nm}}^{20\text{ °C}} = -2\text{ °}$ (c= 0.5, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1 v/ v).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.62 (s, 1 H, NH), 7.88 (s, 1 H, H-8), 6.47 (s, 2 H, NH₂), 6.10 (dd, 1 H, H-1', ³J_{H,H}= 7.7, ³J_{H,H}= 6.0), 4.50-4.47 (m, 1 H, H-3'), 3.81 (ddd, 1 H, H-4', ³J_{H,H}= 5.9, ³J_{H,H}= 4.4, ³J_{H,H}= 2.7), 3.69 (dd, 1 H, H-5'a, ²J_{H,H}= 11.1, ³J_{H,H}= 5.9), 3.64 (dd, 1 H, H-5'b, ²J_{H,H}= 11.0, ³J_{H,H}= 4.5), 2.64 (ddd, 1 H, H-2'a, ²J_{H,H}= 13.3, ³J_{H,H}= 7.8, ³J_{H,H}= 3.2), 2.23 (ddd, 1 H, H-2'b, ²J_{H,H}= 13.2, ³J_{H,H}= 6.1, ³J_{H,H}= 3.2), 0.89 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.10 (s, 6 H, SiC(CH₃)₂), 0.04 (s, 3 H, Si(CH₃)₂), 0.03 (s, 3 H, Si(CH₃)₂). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 156.7 (C-6), 153.7 (C-2), 151.0 (C-8), 116.7 (C-4), 109.0 (C-5), 87.0 (C-4'), 82.1 (C-1'), 72.2 (C-3'), 62.8 (C-5'), 39.0 (C-2'), 25.8 (SiC(CH₃)₃), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 18.0 (SiC(CH₃)₃), 17.7 (SiC(CH₃)₃), -4.8 (SiC(CH₃)₂), -4.9 (SiC(CH₃)₂), -5.4 (SiC(CH₃)₂), -5.5 (SiC(CH₃)₂). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3167, 2927, 2855, 1690, 1602, 1571, 1537, 1471, 1381, 1253, 1168, 1121, 1068, 1027, 1005, 967, 936, 885, 829, 774, 671, 640, 570, 497. **MS:** (ESI-HR, m/ z): ber.: 496.2775 [M+H]⁺, gef.: 496.2774 [M+H]⁺.

O⁶-Benzotriazol-3',5'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 34

Es wurden 14.0 g (28.3 mmol) 3',5'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** und 25.0 g (56.5 mmol, 2 Äquiv.) BOP in 250 mL DMF gelöst und 9.60 mL (56.5 mmol, 2 Äquiv.) DIPEA hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei Rt gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und säulenchromatographisch mit PE/ EE 2:1 aufgearbeitet.



Es wurden 12.5 g (20.3 mmol, 72%) eines hellgelben, kristallinen Feststoffs erhalten.

R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 19:1 v/ v): 0.71.

Smp.: 89 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589\text{nm}}^{20\text{°C}} = 15\text{°}$ (c= 0.5, CH₃OH).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 8.29 (s, 1 H, H-8), 8.17 (d, 1 H, H-14, ³J_{H,H}= 8.4 Hz), 7.77-7.75 (m, 1 H, H-12), 7.65 (dd, 1 H, H-13, ³J_{H,H}= 8.2, ³J_{H,H}= 7.0, ⁴J_{H,H}= 1.1), 7.53 (dd, 1 H, H-13, ³J_{H,H}= 8.2, ³J_{H,H}= 7.0, ⁴J_{H,H}= 1.1), 6.72 (s, 2 H, NH₂), 6.27-6.23 (m, 1 H, H-1'), 4.56-4.53 (m, 1 H, H-3'), 3.86-3.83 (m, 1 H, H-4') 3.74 (dd, 1 H, H-5'a, ²J_{H,H}= 11.1, ³J_{H,H}= 5.9), 3.66 (dd, 1 H, H-5'b, ²J_{H,H}= 11.1, ³J_{H,H}= 4.5), 2.79 (ddd, 1 H, H-2'a, ²J_{H,H}= 13.1, ³J_{H,H}= 7.3, ³J_{H,H}= 5.7), 2.32 (ddd, 1 H, H-2'b, ²J_{H,H}= 13.2, ³J_{H,H}= 6.2, ³J_{H,H}= 3.6), 0.89 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.86 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6 H, Si(CH₃)₂), 0.04 (s, 3 H, Si(CH₃)₂), 0.03 (s, 3 H, Si(CH₃)₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 159.3 (C-6), 158.7 (C-2), 156.3 (C-4), 142.8 (C-8), 140.4 (C-11), 129.1 (C-12), 128.5 (C-16), 125.2 (C-13), 119.9 (C-14), 111.3 (C-5), 109.3 (C-15), 87.1 (C-4'), 82.7 (C-1'), 72.0 (C-3'), 62.7 (C-5'), 38.6 (C-2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 17.9 (SiC(CH₃)₃), 17.8 (SiC(CH₃)₃), -4.8 (SiC(CH₃)₂), -5.0 (SiC(CH₃)₂), -5.5 (SiC(CH₃)₂), -5.5 (SiC(CH₃)₂). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2953, 2929, 2856, 1637, 1571, 1470, 1400, 1251, 1227, 1190, 1090, 1019, 940, 832, 776, 741, 670. **MS:** (ESI-HR, m/ z): ber.: 613.3102 [M+H]⁺, gef.: 613.3098 [M+H]⁺.

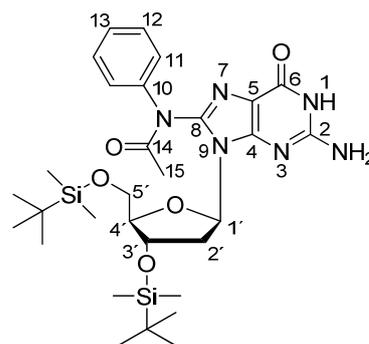
**C8-N-Acetyl-N-Phenyl-3',5'-O-bis-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin
76**

Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 6.08 g (9.92 mmol) O⁶-Benzotriazol-3',5'-bis-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **34**, 3.00 g N-Acetyl-N-Phenyl-hydroxamsäure **72** (19.8 mmol, 2 Äquiv.) und 6.47 g Cäsiumcarbonat (19.9 mmol, 2 Äquiv.) verwendet.

Die Reaktion wurde für 16 h bei Rt gerührt. Es wurden 2.99 g (4.76 mmol, 48%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.57.

Smp.: 131°C. Drehwert: $[\alpha]_{589\text{nm}}^{20^\circ\text{C}} = 117^\circ - (c=1, \text{CHCl}_3)$.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.83 (s, 1 H, NH), 7.49-7.22 (m, 5 H, H_{arom.}) 6.38 (s, 2 H, NH₂) 6.09-5.92 (m, 1 H, H-1'), 4.59-4.50 (m, 1 H, H-3'), 3.81-3.62 (m, 4 H, H-2'a, H-4', H-5'), 3.16-3.06 (m, 1 H, H-2'b), 2.00 (s, 3 H, H-15), 0.87 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.81 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.08 (s, 6 H, Si(CH₃)₂), -0.04 (s, 6 H, Si(CH₃)₂).

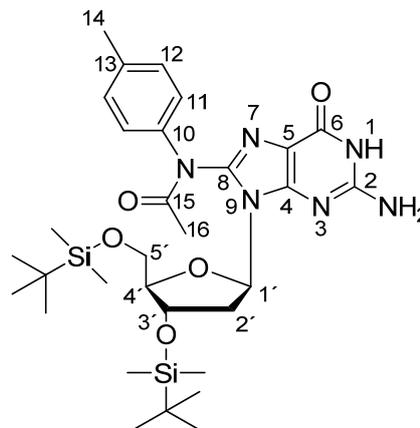
¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.8 (C-14), 156.2 (C-6), 153.4 (C-2), 150.6 (C-4), 141.6 (C-10), 129.1, 128.5, 128.3 (C_{arom.}), 122.9 (C-8), 118.9, 115.0 (C-5), 87.3 (C-4'), 83.3 (C-1'), 72.2 (C-3'), 63.1 (C-5'), 36.5 (C-2'), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 25.5 (SiC(CH₃)₃), 22.4 (C-15), 17.8 (SiC(CH₃)₃), 17.5 (SiC(CH₃)₃), -4.9 (SiC(CH₃)₂), -5.0 (SiC(CH₃)₂), -5.5 (SiC(CH₃)₂), -5.5 (SiC(CH₃)₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3150, 2929, 2856, 1702, 1632, 1599, 1542, 1495, 1471, 1368, 1286, 1252, 1080, 1032, 947, 836.

MS: (ESI-HR, m/z): ber.: 629.3303 [M+H]⁺, gef.: 629.3295 [M+H]⁺.

C8-N-Acetyl-N-4-Methylphenyl-3',5'-O-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 77

Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 11.99 g (19.56 mmol) *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **34**, 6.46 g *N*-Acetyl-*N*-4-Methylphenyl-hydroxamsäure **73** (39.1 mmol, 2 Äquiv.) und 12.75 g Cäsiumcarbonat (39.13 mmol, 2 Äquiv.) verwendet. Die Reaktion wurde für 18 h bei Rt gerührt. Es wurden 6.92 g (10.8 mmol, 55%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.



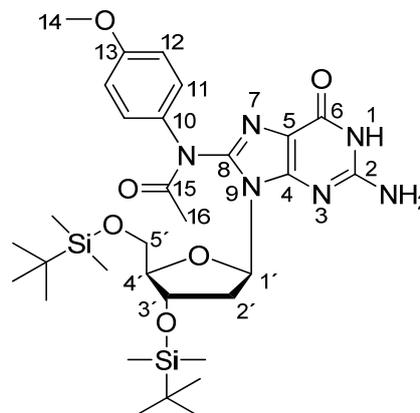
R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.43.

Smp.: 178 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ °C}} = 104\text{ °}$ (c= 0.5, CHCl₃).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.76 (s, 1 H, NH), 7.32-7.14 (m, 4 H, H-11, H12), 6.36 (s, 2 H, NH₂), 6.03-5.93 (m, 1 H, H-1'), 4.57-4.48 (m, 1 H, H-3'), 3.75-3.66 (m, 3 H, H-4', H-5'), 3.21-2.98 (m, 1 H, H-2'a), 2.29 (s, 3 H, H-14), 2.09-1.93 (m, 4 H, H-2'b, H-16), 0.87 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.81 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.09 (s, 6 H, Si(CH₃)₂), -0.03 (s, 6 H, Si(CH₃)₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 173.2 (C-15), 156.5 (C-6), 153.7 (C-2), 150.8 (C-4), 137.3 (C-10), 129.8 (C-12), 125.10 (C-13, C-8), 119.0 (C-11), 115.2 (C-5), 87.5 (C-4'), 83.5 (C-1'), 72.4 (C-3'), 63.2 (C-5'), 40.0 (C-2'), 25.8 (SiC(CH₃)₃), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 24.1 (C-16), 20.7 (C-14), 18.0 (SiC(CH₃)₃), 17.7 (SiC(CH₃)₃), -4.6 (SiC(CH₃)₂), -4.7 (SiC(CH₃)₂), -5.3 (SiC(CH₃)₂), -5.3 (SiC(CH₃)₂). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3136, 2928, 2855, 1701, 1634, 1608, 1569, 1539, 1509, 1462, 1433, 1317, 1286, 1251, 1185, 1086, 1062, 945, 833. **MS**: (ESI-HR, m/z): ber.: 643.3459 [M+H]⁺.gef.: 643.3464 [M+H]⁺.

C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-3',5'-O-bis-(tert-butylidimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 78

Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 4.43 g (7.23 mmol) O⁶-Benzotriazol-3',5'-bis-(tert-butylidimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **34**, 2.62 g N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-hydroxamsäure **74** (14.5 mmol, 2 Äquiv.) und 4.70 g Cäsiumcarbonat (14.4 mmol, 2 Äquiv.) verwendet. Die Reaktion wurde für 18 h bei Rt gerührt. Es wurden 2.41 g (3.66 mmol, 51%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.



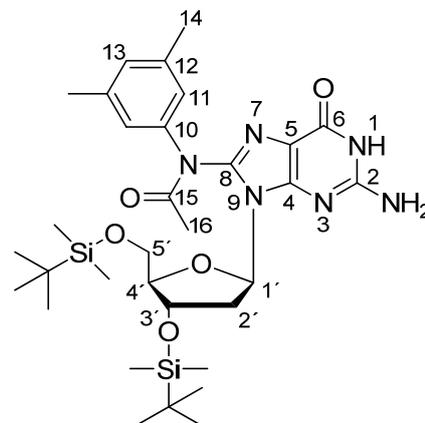
R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.43.

Smp.: 165 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ }^\circ\text{C}} = 104^\circ$ (c= 1, CHCl₃).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.64 2 (bs, 1 H, NH), 7.31 (d, 2 H, H-12; ³J_{H,H}= 8.2), 6.97 (d, 2 H, H-11, ³J_{H,H}= 8.8), 6.19 (bs, 2 H, NH₂), 6.06-6.02 (m, 1 H, H-1'), 4.53-4.60 (m, 1 H, H-3'), 3.84-3.69 (m, 6 H, H-14, H-5', H-4'), 3.14 (m, 1 H, H-2'a), 2.04-1.99 (m, 4 H, H-16, H-2'b), 0.93 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.86 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.14 (s, 3 H, Si(CH₃)₂), 0.12 (s, 3 H, Si(CH₃)₂), 0.01 (s, 6 H, Si(CH₃)₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.2 (C-15), 156.2 (C-6), 153.5 (C-2), 150.5 (C-4), 140.7 (C-10), 129.2 (C-8), 126.6 (C-12), 115.0 (C-13), 114.7 (C-11), 114.2 (C-5), 87.3 (C-4'), 83.3 (C-1'), 72.1 (C-3'), 63.1 (C-5'), 55.2 (C-14), 36.4 (C-2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 22.6 (C-16), 17.9 (SiC(CH₃)₃), 17.6 (SiC(CH₃)₃), -4.8 (SiC(CH₃)₂), -4.9 (SiC(CH₃)₂), -5.4 (SiC(CH₃)₂), -5.5 (SiC(CH₃)₂). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3144, 2928, 1703, 1634, 1607, 1542, 1463, 1365, 1287, 1246, 1083, 1029, 946, 831, 776, 629, 553, 401. **MS**: (ESI-HR, m/ z): ber.: 659.3408 [M+H]⁺, gef.: 659.3407 [M+H]⁺.

C8-*N*-Acetyl-*N*-3,5-Dimethylphenyl-3',5'-*O*-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **79**

Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 7.31 g (11.9 mmol) *O*⁶-Benzotriazol-3',5'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **34**, 4.28 g *N*-Acetyl-*N*-3,5-Dimethylphenyl-hydroxamsäure **75** (23.9 mmol, 2 Äquiv.) und 7.82 g Cäsiumcarbonat (24.0 mmol, 2 Äquiv.) verwendet. Die Reaktion wurde für 22 h bei Rt gerührt. Es wurden 4.32 g (6.58 mmol, 55%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.



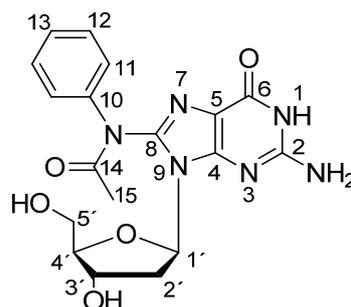
R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.41.

Smp.: 168 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20} = 106$ ° (c= 0.5, CHCl₃).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.82 (s, 1 H, NH), 7.04-6.66 (m, 3 H, H-11, H-13), 6.37 (s, 2 H, NH₂), 5.99 (s, 1 H, H-1'), 4.59 (s, 1 H, H-3'), 3.84-3.59 (m, 4 H, H-4', H-5', H-2'a), 3.23-3.05 (m, 1 H, H-2'b), 2.25 (s, 6 H, H-14), 1.98 (s, 3 H, H-16), 0.87 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.81 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.11-0.05 (m, 6 H, Si(CH₃)₂), 0.03 (s, 6 H, Si(CH₃)₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.3 (C-15), 156.1 (C-6), 153.4 (C-2), 150.5 (C-4), 141.5 (C-10), 140.4, 138.2 (C-12), 137.2 (C-8), 128.5, 126.0, 122.8, 117.9 (C_{arom.}), 114.9 (C-5), 87.2 (C-4'), 83.2 (C-1'), 72.2 (C-3'), 63.0 (C-5'), 36.3 (C-2'), 25.5 (SiC(CH₃)₃), 25.4 (SiC(CH₃)₃), 22.3 (C-16), 20.9, 20.7 (C-14), 17.7 (SiC(CH₃)₃), 17.4 (SiC(CH₃)₃), -4.9 (SiC(CH₃)₂), -5.1 (SiC(CH₃)₂), -5.6 (SiC(CH₃)₂), -5.6 (SiC(CH₃)₂). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3138, 2951, 2855, 1700, 1682, 1309, 1252, 1079, 833, 775. **MS**: (ESI-HR, m/z): ber.: 655.3459 [M+H]⁺, gef.: 655.3767 [M-H]⁻.

C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin **80**

Die Synthese wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 2.83 g (4.50 mmol) C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-3',5'-*O*-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **76**, 1.60 mL (27.2 mmol, 6 Äquiv.) Essigsäure und 3.90 mL (13.6 mmol, 3 Äquiv.) TBAF verwendet. Die Reaktion



wurde für 20 h bei Rt gerührt. Es wurden 1.55 g (3.87 mmol, 86%) eines braunen Feststoffs erhalten.

R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 8:2 v/ v): 0.42.

Smp.: 130 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ °C}} = 97^\circ$ (c= 0.5, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.03 (s, 1 H, NH), 7.50-7.27 (m, 5 H, H-11, H-12, H-13), 6.48 (s, 2 H, NH₂), 6.11-6.02 (m, H, H-1'), 5.37- 4.85 (m, 2 H, 3'-OH, 5'-OH), 4.37 (s, 1 H, H-3'), 3.82 (s, 1 H, H-4'), 3.65-3.59 (m, 1 H, H-5'a), 3.53-3.47 (m, 1 H, H-5'b), 2.95 (bs, 1 H, H-2'a), 2.94 (bs, 1 H, H-2'b), 2.12-1.94 (m, 4 H, H-2'b, H-15). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 156.3 (C-6), 153.6 (C-2), 150.4 (C-4), 129.3 (C_{arom.}), 115.2 (C-5), 88.2 (C-4'), 83.9 (C-1'), 71.2 (C-3'), 62.1 (C-5'), 36.9 (C-2'), 22.6 (C-15). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3318, 3183, 3152, 2936, 2872, 1682, 1632, 1592, 1492, 1434, 1401, 1368, 1325, 1282, 721. **MS:** (ESI-HR, m/z): ber.: 401.1651 [M+H]⁺, gef.: 401.1564 [M+H]⁺.

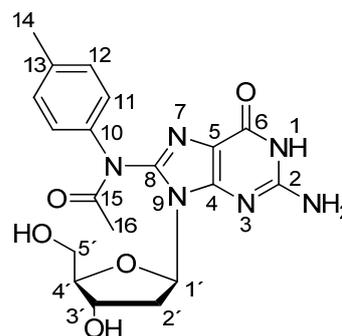
C8-*N*-Acetyl-*N*-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin 81

Die Synthese wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 3.26 g (5.08 mmol) C8-*N*-Acetyl-*N*-4-Methylphenyl-3',5'-*O*-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77**, 3.52 mL (60.9 mmol, 12 Äquiv.) Essigsäure und 8.66 mL (30.5 mmol, 6 Äquiv.) TBAF verwendet. Die Reaktion wurde für 18 h über Nacht bei Rt gerührt.

Es wurden 1.78 g (4.29 mmol, 85%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 8:2 v/ v): 0.46.

Smp.: 163 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ °C}} = 87^\circ$ (c= 0.4, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1).

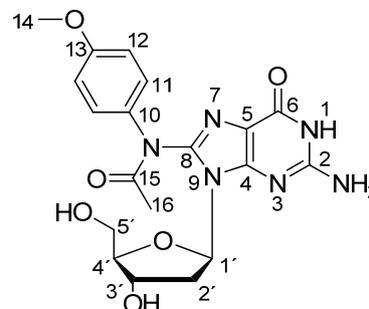


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.82 (s, 1 H, NH), 7.31-7.19 (m, 4 H, H-11, H-12), 6.61 (bs, 2 H, NH₂), 6.04 (s, 1 H, H-1'), 5.21 (bs, 1 H, 3'-OH), 4.95 (bs, 1 H, 5'-OH), 4.37 (s, 1 H, H-3'), 3.85 (s, 1 H, H-4'), 3.68-3.46 (m, 2 H, H-5'a, H-5'b), 2.34-2.26 (m, 4 H, H-2'a, H-14), 2.05-1.93 (m, 4 H, H-2'b, H-16). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 156.4 (C-6), 153.8 (C-2), 150.5 (C-4), 129.7 (C-11, C-12), 114.9 (C-5), 88.2 (C-4', C-1'), 71.3 (C-3'), 62.2 (C-5'), 36.9 (C-2'), 22.6 (C-16), 20.6 (C-14).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2358, 2213, 2177, 2079, 2043, 1974, 1681, 1537, 1283, 689, 578, 545, 511. **MS:** (ESI-HR,m/z): ber.: 415.1730 [M+H]⁺, gef.: 415.1729 [M+H]⁺.

C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin 82

Die Synthese wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 2.89 g (4.39 mmol) C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-3',5'-O-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **78**, 3.0 mL (53 mmol, 12 Äquiv.) Essigsäure und 7.60 mL (26.3 mmol, 6 Äquiv.) TBAF verwendet. Die Reaktion wurde für 17 h bei Rt gerührt. Es wurden 1.49 g (3.45 mmol, 79%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.



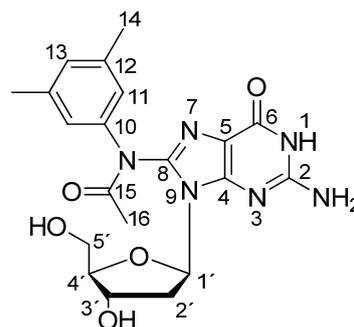
R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 8:2 v/ v): 0.66.

Smp.: 172 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ }^\circ\text{C}} = 88$ °(c= 1, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.15 (bs, 1 H, NH), 7.45-7.24 (m, 2 H, H-12), 7.05-6.91 (m, 2 H, H-11) 6.44-6.33 (m, 2 H, NH₂) 6.05 (bs, 1 H, H-1'), 5.52-5.19 (m, 1 H, 3'-OH), 4.95 (bs, 1 H, 5'-OH), 4.44-4.28 (m, 1 H, H-3'), 3.84 (bs, 1 H, H-4'), 3.75 (s, 3 H, H-14), 3.67-3.61 (m, 1 H, H-5'a), 3.55-3.48 (m, 1 H, H-5'b), 2.93 (bs, 1 H, H-2'a), 2.15-1.93 (m, 4 H, H-2'b, H-16). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 156.2 (C-6), 153.5 (C-2), 141.0 (C-8, C-10), 129.1 (C-12), 126.8 (C-12), 115.7 (C-5), 114.6 (C-11), 114.1 (C-11), 88.2 (C-4'), 84.3 (C-1'), 71.4 (C-3'), 61.9 (C-5'), 55.4 (C-14), 36.9 (C-2'), 23.0 (C-16). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3160, 2932, 1681, 1633, 1595, 1539, 1507, 1367, 1285, 1246, 1101, 1028. **MS:** (ESI-HR,m/z): ber.: 431.1679 [M+H]⁺, gef.: 431.1679 [M+H]⁺.

C8-N-Acetyl-N-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin 83

Die Synthese wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 4.00 g (6.09 mmol) C8-N-Acetyl-N-3,5-Dimethylphenyl-3',5'-O-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **79**, 4.2 mL (73 mmol, 12 Äquiv.) Essigsäure und



10.4 mL (36.5 mmol, 6 Äquiv.) TBAF verwendet. Die Reaktion wurde für 18 h bei Rt gerührt. Es wurden 2.08 g (4.86 mmol, 80%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 8:2 v/ v): 0.54.

Smp.: 165 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ }^\circ\text{C}} = 63^\circ$ (c= 0.2, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.83 8 (s, 1 H, NH), 7.12-6.89 (m, 3 H, H-11, H-13), 6.41 (s, 2 H, NH₂), 6.03 (s, 1 H, H-1'), 5.23-5.18 (m, 1 H, 3'-OH), 4.95 (bs, 1 H, 5'-OH), 4.38 (bs, 1H, H-3'), 3.82 (bs, 1 H, H-4'), 3.69-3.63 (m, 1 H, H-5 a), 3.54-3.48 (m, 1 H, H-5'b), 2.92 (bs, 1 H, H-2'a), 2.26 (s, 6 H, H-14), 2.10-1.93 (m, 4 H, H-2'b, H-16). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.4 (C-15), 156.2 (C-6), 153.5 (C-2), 150.3 (C-4), 140.5 (C-8), 139.6 (C-10), 138.5 (C-12), 128.9 (C-11), 123.5 (C-13) 115.1 (C-5), 88.2 (C-4'), 84.0 (C-1'), 71.2 (C-3'), 62.2 (C-5'), 37.0 (C-2'), 22.6 (C-16), 20.8 (C-14). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3155, 2928, 2361, 1685, 1593, 1538, 1367, 1278, 1101, 1054, 853, 674. **MS**: (ESI-HR, m/ z): ber.: 427.1730 [M-H]⁻, gef.: 427.1889 [M-H]⁻.

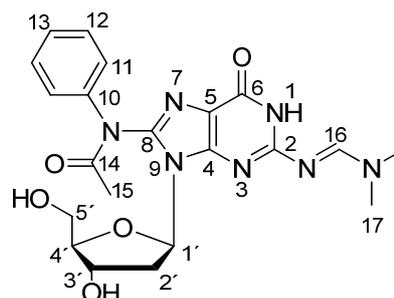
***N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-phenyl-2'-desoxyguanosin 84**

Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 1.57 g (3.93 mmol) C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin **80** und 1.4 mL (7.9 mmol, 2 Äquiv.) Dimethylformamiddiethylacetal verwendet.

Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei Rt konnten 1.46 g (3.21 mmol, 82%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten werden.

R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.20.

Smp.: 142 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ }^\circ\text{C}} = 101^\circ$ (c= 0.5, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1).

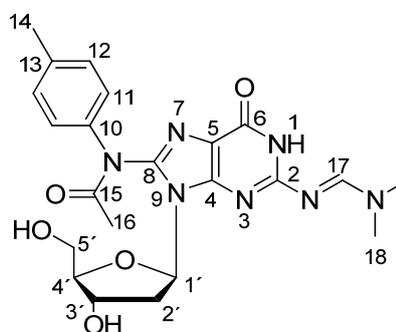


¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.53 (bs, 1 H, NH), 8.47 (s, 1 H, H-16), 7.55-7.28 (m, 5 H, H-11, H-12, H-13), 6.31 (bs, 1 H, H-1'), 5.31 (bs, 1 H, 3'-OH), 4.88 (bs, 1H, 5'-OH), 4.45 (s, 1 H, H-3'), 3.84 (s, 1 H, H-4'), 3.70-3.61 (m, 1 H, H-5'a), 3.58-3.50 (m, 1H, H-5'b), 3.13 (s, 3 H, H-17), 3.06-2.83 (m, 4 H, H-17, H-2'a), 2.20-1.97 (m, 4 H, H-2'b, H-15). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 172.2 (C-14), 158.3 (C-16), 157.6 (C-6), 157.2 (C-2), 141.4 (C-8, C-10), 129.5, 127.7, 125.7 (C-13, C-12, C-

11), 118.2 (C-5), 88.1 (C-4'), 84.1 (C-1'), 70.9 (C-3'), 62.0 (C-5'), 40.9 (C-17), 37.5 (C-2'), 34.6 (C-17), 23.0 (C-15).

*N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin **85**

Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 1.93 g (4.66 mmol) C8-*N*-Acetyl-*N*-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin **81** und 1.6 mL (9.3 mmol, 2 Äquiv.) Dimethylformamid-diethylacetal verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 65 h bei Rt konnten 1.87 g (3.99 mmol, 86%) eines hellgelben Feststoffs erhalten werden.



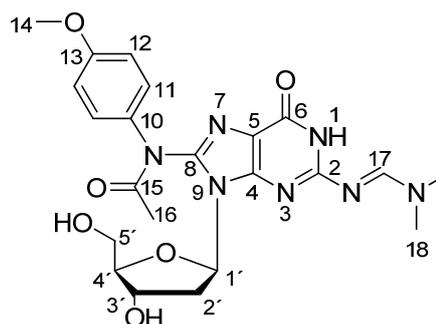
R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.21.

Smp.: 172 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589\text{nm}}^{20\text{°C}} = 94$ ° (c= 1, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.50 (bs, 1 H, NH), 8.47 (s, 1 H, H-17), 7.42-7.17 (m, 4 H, H-11, H-12), 6.16-6.09 (m, 1 H, H-1'), 5.29 (d, 1 H, 3'-OH, ³J_{H,H}= 4.6), 4.89-4.84 (m, 1 H, 5'-OH), 4.46 (bs, 1 H, H-3'), 3.84 (bs, 1 H, H-4'), 3.69-3.62 (m, 1 H, H-5'a), 3.59-3.51 (m, 1 H, H-5'b), 3.13 (s, 3 H, H-18), 3.07-2.89 (m, 4 H, H-18, H-2'a), 2.30 (s, 3 H, H-14), 2.07-1.99 (m, 4 H, H-16, H-2'b). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 172.0 (C-15), 158.3 (C-17), 157.6 (C-2), 157.2 (C-6), 149.2 (C-13), 141.5 (C-8), 137.5 (C-10), 130.0 (C-11), 127.6 (C-12), 125.5 (C-12), 118.0 (C-4, C-5), 88.0 (C-4'), 84.2 (C-1'), 71.0 (C-3'), 62.0 (C-5'), 37.5 (C-2'), 34.7 (C-18), 22.5 (C-16), 20.6 (C-14). IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 1682, 1629, 1524, 1284, 1110, 515, 384. MS: (ESI-HR, m/z): ber.: 470.2152 [M+H]⁺, gef.: 470.2143 [M+H]⁺.

*N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **86**

Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 2.35 g (5.46 mmol) C8-*N*-Acetyl-*N*-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **82** und 1.9 mL (11 mmol, 2 Äquiv.) Dimethylformamid-diethylacetal verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 17 h



bei Rt konnten 2.06 g (4.24 mmol, 78%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten werden.

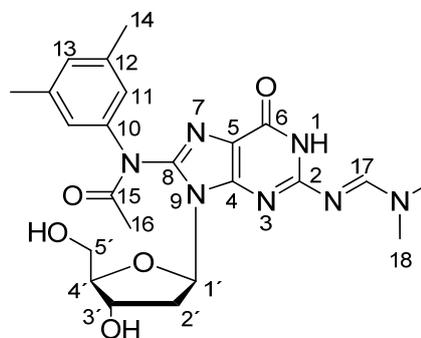
R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.28.

Smp.: 148 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ °C}} = 101\text{ °}$ (c= 0.75, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.49 (bs, 1 H, NH) 8.47 (s, 1H, H-17), 7.48-7.20 (m, 2 H, H-12), 7.00 (s, 2 H, H-11) 6.14 (s, 1 H, H-1'), 5.29 (d, 1 H, 3'-OH, ³J_{H,H}= 4.8), 4.89-4.82 (m, 1 H, 5'-OH), 4.52-4.41 (m, 1 H, H-3'), 3.88-3.85 (m, 1 H, H-4'), 3.76 (s, 3 H, H-14), 3.68-3.65 (m, 1 H, H-5'a), 3.58-3.52 (m, 1 H, H-5'b), 3.14 (s, 3 H, H-18), 3.08-2.89 (m, 4 H, H-18, H-2'a), 2.15-1.92 (m, 4 H, H-16, H-2'b). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 172.2 (C-15), 158.9 (C-17, C-13), 158.3 (C-2), 157.1 (C-6), 149.1, 142.0 (C-10, C-12); 141.7 (C-8), 129.2 (C-12), 127.0 (C-12), 118.1 (C-4), 114.9 (C-5), 114.4 (C-11), 88.0 (C-4'), 84.1 (C-1'), 70.9 (C-3'), 61.9 (C-5'), 55.4 (C-14), 40.8 (C-18), 37.4 (C-2'), 34.6 (C-18), 22.4 (C-16). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3273, 2927, 1681, 1630, 1526, 1506, 1422, 1323, 1285, 1245, 1173, 1112, 1053, 1027, 987, 967, 967, 836, 786. **MS:** (ESI-HR, m/ z): ber.: 486.2101 [M+H]⁺, gef.: 486.2109 [M+H]⁺.

***N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin 87**

Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 2.88 g (6.72 mmol) C8-*N*-Acetyl-*N*-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin **83** und 2.30 mL (13.4 mmol, 2 Äquiv.) Dimethylformamiddiethylacetal verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 21 h bei Rt konnten 2.40 g (4.96 mmol, 74%) eines braunen Feststoffs erhalten werden.



R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v): 0.26.

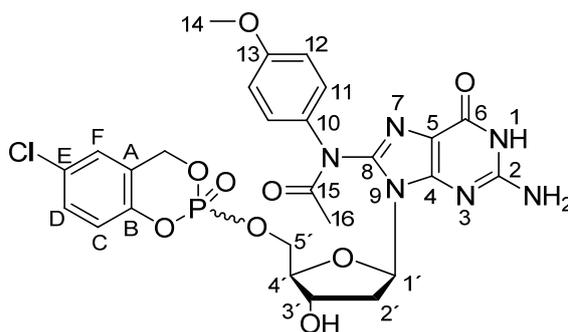
Smp.: 176 °C. Drehwert: $[\alpha]_{589}^{20\text{ °C}} = 102\text{ °}$ (c= 0.5, CH₂Cl₂/ CH₃OH, 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.53 (s, 1 H, NH), 8.48 (s, 1 H, H-17), 7.18-6.88 (m, 3 H, H-11, H-13), 6.12 (s, 1 H, H-1'), 5.31 (s, 1 H, 3'-OH), 4.89 (s, 1 H, 5'-OH), 4.48 (s, 1 H, H-3'), 3.87 (s, 1 H, H-4'), 3.69-3.63 (m, 1 H, H-5'a), 3.59-3.56 (m, 1 H, H-5'b), 3.14 (s, 3 H, H-18), 3.10-2.85 (m, 4 H, H-18, H-2'a), 2.28 (s, 6 H, H-14) 2.17-1.94 (m, 4 H, H-16, H-2'b). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.6 (C-15),

158.3 (C-17, C-6), 157.5 (C-2), 157.2 (C-4), 149.1 (C-10), 141.5 (C-8), 139.7 (C-12), 138.6 (C-12), 128.7 (C-13), 125.2 (C-11), 123.6 (C-11), 118.2 (C-5), 87.9 (C-4'), 84.1 (C-1'), 70.9 (C-3'), 62.0 (C-5'), 40.8 (C-18), 37.9 (C-2'), 34.6 (C-18), 22.5 (C-16), 20.8 (2x C-14). IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3303, 2929, 1682, 1631, 1525, 1423, 1355, 1307, 1278, 1113, 1052, 988, 854, 786. MS: (ESI-HR, m/z): ber.: 484.2308 [M+H]⁺, gef.: 484.2301 [M+H]⁺.

Synthese von 5-Chlor-cycloSal-8-N-acetyl-N-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **91**

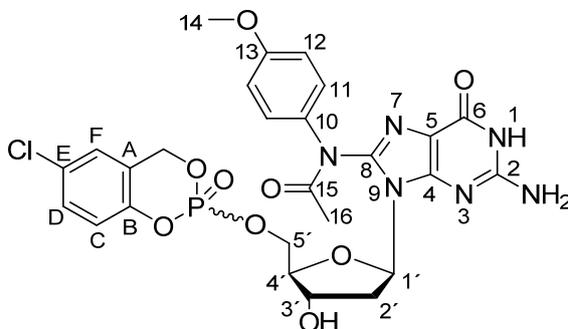
Es wurden 202 mg (0.467 mmol) C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **82** in 20 mL Acetonitril gelöst, auf -30 °C gekühlt und 90 µL (0.53 mmol, 1.1 Äquiv.) DIPEA hinzugefügt. Anschließend wurden 121 mg (0.544 mmol, 1.1 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit



hinzugetropft und zwei Stunden bei Rt gerührt. Bei -20 °C erfolgte die Zugabe von 93 µL (0.53 mmol 1.1 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid. Da dünnschichtchromatographisch nach 2 h bei Rt kein Reaktionsumsatz beobachtet werden konnte, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch eine säulenchromatographische Reinigung mit Dichlormethan/ Methanol (9:1 v/v + 1% Essigsäure) konnten 24.8 mg (39.2 µmol, 8%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

Synthese von 5-Chlor-cycloSal-8-N-acetyl-N-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **91**

Es wurden 94.0 mg (0.22 mmol) C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **82** in 10 mL Acetonitril gelöst, auf -20 °C gekühlt und 40.9 µL (0.24 mmol, 1.1 Äquiv.) DIPEA hinzugefügt. Anschließend wurden 53.6 mg (0.24 mmol, 1.1 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit



hinzugetropft und zwei Stunden bei Rt gerührt. Bei -20 °C erfolgte die Zugabe von 44 µL (0.24 mmol, 1.1 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid. Da dünnschichtchromatographisch nach 2 h bei Rt kein Reaktionsumsatz beobachtet werden konnte, wurde das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch eine säulenchromatographische Reinigung mit Dichlormethan/ Methanol (9:1 v/ v + 1% Essigsäure) konnten 24.0 mg (36.5 μmol , 17%) eines farblosen Feststoffs erhalten werden, dessen Diastereomerenverhältnis nicht bestimmbar war. Des Weiteren wurden 73.3 mg (170 μmol) Edukt reisoliert.

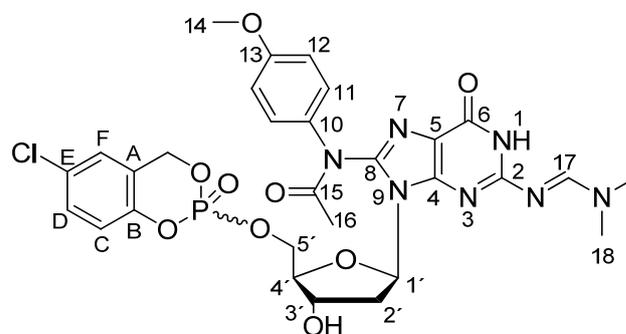
R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; 9:1 v/ v + 1% AcOH): 0.42. Smp.: 151 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 10.95 (bs, 2 H, NH), 7.46-7.22 (m, 8 H, $\text{H}_{\text{arom.}}$) 7.07-6.93 (m, 6 H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.58-6.39 (m, 4 H, NH_2), 6.11 (s, 2 H, H-1'), 5.48-5.28 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, 3'-OH) 4.57-4.33 (m, 6 H, H-3', H-5'), 3.98 (bs, 2 H, H-4'), 3.75 (s, 6 H, H-14), 2.17-1.85 (m, 10 H, H-16). **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= -10.26. **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]= 3110, 3135, 2946, 1675, 1481, 1287, 1247, 1023, 726.

Versuch zur Synthese von 5-Chlor-cycloSal- N^2 -formamidin-8- N -acetyl- N -4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat 92

Es wurden 101 mg (210 μmol) N^2 -Formamidin-8- N -acetyl- N -4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **86** in 20 mL Acetonitril gelöst, auf -30 °C gekühlt und 38.8 μL (0.23 mmol, 1.1 Äquiv.) DIPEA hinzugefügt.

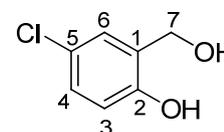
Anschließend wurden 50.9 mg (0.23 mmol, 1.1 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit hinzugesetzt und zwei Stunden bei Rt gerührt. Bei -20 °C erfolgte die Zugabe von 41.5 μL (228 μmol 1.1 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid. Da dünnschichtchromatographisch nach 2 h bei Rt kein



Reaktionsumsatz beobachtet werden konnte, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gewünschte Produkt konnte säulenchromatographisch nicht erhalten werden.

5-Chlor-2-hydroxybenzylalkohol 94

Es wurden 3.00 g (81.1 mmol, 2 Äquiv.) Lithiumaluminiumhydrid in 40 mL THF vorgelegt. Zu der Suspension wurde eine Lösung aus 7.00 g (40.6 mmol) 5-Chlor-2-hydroxybenzoesäure in 40 mL



THF langsam über 1.5 h bei Rt hinzugegossen. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktion für 1.5 h unter Rückfluss erhitzt.

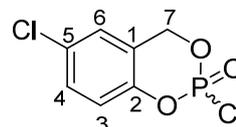
Anschließend wurde unter Kühlung das Lithiumaluminiumhydrid durch die portionsweise Zugabe von Eis hydrolysiert. Mit konz. Salzsäure wurde ein pH-Wert von 1 eingestellt, die wässrige Phase abgetrennt und fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in Chloroform umkristallisiert. Es wurden 4.99 g (31.6 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 20:1 v/ v): 0.46. Smp.: 93 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 9.63 (s, 1 H, Ph-OH), 7.27 (d, 1 H, H-6, ⁴*J*_{H,H}= 2.7 Hz), 7.07 (dd, 1 H, H-4, ³*J*_{H,H}= 8.5 Hz, ⁴*J*_{H,H}= 2.8 Hz), 6.76 (d, 1 H, H-3, ³*J*_{H,H}= 8.5 Hz), 5.09 (s, 1 H, Bn-OH), 4.45 (s, 2 H, H-7). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 152.8 (C-2), 131.0 (C-1), 126.7 (C-4), 126.5 (C-6), 122.4 (C-5), 116.0 (C-3), 57.6 (C-7). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3144, 2908, 1480, 1406, 1357, 1303, 1261, 1177, 1119, 1000, 885, 743, 701, 655, 452. **MS**: (ESI-HR, *m/z*): ber.: 157.0057 [M-H]⁻, gef.: 157.0039 [M-H]⁻.

5-Chlorsaligenylphosphorchloridat rac-88

Ein Lösung aus 3.00 g (18.9 mmol) 5-Chlor-2-hydroxybenzylalkohol **94** und 5.5 mL (40 mmol, 2.1 Äquiv.) Triethylamin in 60 mL THF wurde 1 h über 4 Å Molsieb im Tropftrichter getrocknet. An-



schließend wurde die Lösung bei -70 °C langsam zu einer Lösung aus 1.9 mL (21 mmol, 1.1 Äquiv.) Phosphorylchlorid in 60 mL THF hinzugegossen. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde bei -50 °C und 17 h bei Rt gerührt. Nach Filtration wurde das Rohprodukt durch Kälte-destillation erhalten und säulenchromatographisch mit PE/ EE 1:1 aufgearbeitet. Es wurden 3.06 g (12.6 mmol, 68%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier Enantiomere erhalten.

R_f -Wert (PE/ EE; 2:1 v/ v): 0.48. Smp.: 85 °C.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.36-7.32 (m, 1 H, H-4), 7.13 (d, 1 H, H-6, ⁴*J*_{H,H}= 2.4), 7.07 (d, 1 H, H-3, ³*J*_{H,H}= 8.8), 5.53-5.42 (m, 2 H, H-7). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 147.7 (d, C-2, ²*J*_{C,P}= 7.6), 131.3 (C-5), 130.7 (C-4), 125.5 (C-6), 121.0 (d, C-3, ³*J*_{C,P}= 11.3), 69.8 (d, C-7, ²*J*_{C,P}= 7.6). **³¹P-NMR** (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: -6.66.

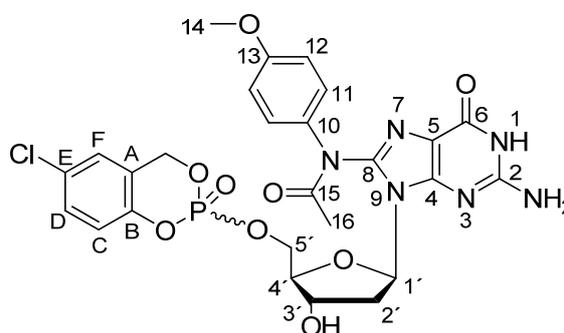
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3085, 1480, 1422, 1359, 1311, 1261, 1182, 1092, 952, 819, 693, 558.

MS: (ESI-HR, m/z): ber.: 238.9431 [M], gef.: 238.9431 [M+H⁺].

Versuch zur Synthese von 5-Chlor-cycloSal-8-N-acetyl-N-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **91**

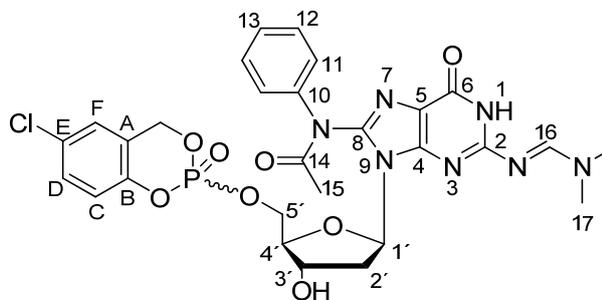
Es wurden 400 mg (929 μ mol) C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **82** in einer Mischung aus 6.9 mL Pyridin und 3.0 mL DMF gelöst und mit Molsieb versetzt. Bei -40 °C wurden über fünf Stunden 227 mg (954 μ mol) 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat gelöst in 1 mL THF hinzuge tropft.

Es wurde kein Reaktionsumsatz beobachtet, sodass die Reaktion weitere zwei Stunden bei -40 °C gerührt wurde. Das gewünschte Produkt konnte nicht erhalten werden. Es wurden 277 mg (644 μ mol) Edukt reisoliert.



5-Chlor-cycloSal-N²-formamidin-8-N-acetyl-N-phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **95**

Die Synthese wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 500 mg (1.10 mmol) N²-Formamidin-8-N-acetyl-N-phenyl-2'-desoxyguanosin **84** und 317 mg (1.33 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **88** verwendet.



Es konnten 407 mg (618 μ mol, 56%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1.0:0.9 erhalten werden.

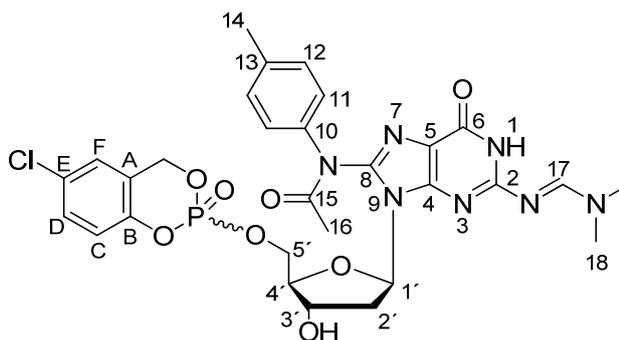
R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v + 1% AcOH): 0.50. Smp.: 110 °C.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.67 (bs, 2 H, NH), 8.50 (s, 2 H, H-16), 7.53-7.42 (m, 4 H, H_D, H_F), 7.38-7.30 (m, 6 H, H-11, H-12), 7.22-7.12 (m, 2 H, H-12), 6.97-6.73 (m, 4 H, H-13, H_C), 6.18-6.10 (m, 2 H, H-1'), 5.24-4.87 (m, 6 H, H-Bn, H-3'), 4.47-4.25 (m, 4 H, H-5'), 4.09 (bs, 2 H, H-4'), 3.35-3.16 (m, 8 H, H-2'a, H-17), 3.10 (s, 6 H, H-

17), 2.20 (bs, 2 H, H-2'b), 2.11-2.05 (m, 6 H, H-15). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 175.4 (C-14), 158.1 (2x C-16), 156.9 (C-6), 156.8 (C-2), 149.9 (C-8), 149.8 (C-8), 149.6 (C-4), 148.4 (d, C_B, ²J_{C,P}= 6.1 Hz), 148.3 (d, C_B, ²J_{C,P}= 6.1 Hz), 142.7 (C-10), 142.6 (C_E), 130.0 (C_D, C_F), 129.9 (C-11) 129.7 (C-11), 125.5 (C-12), 125.3 (C-13), 121.8 (d, C_A, ³J_{C,P}= 6.1 Hz), 121.7 (d, C_A, ³J_{C,P}= 6.1 Hz), 120.0 (d, C_C, ³J_{C,P}= 9.1), 119.9 (d, C_C, ³J_{C,P}= 9.1), 118.9 (2x C-5), 84.5 (d, C-4', ³J_{C,P}= 6.1 Hz), 84.4 (d, C-4', ³J_{C,P}= 6.1 Hz), 84.0 (2x C1'), 71.7 (C-3'), 71.5 (C-3'), 68.4 (d, C-Bn, ²J_{C,P}= 7.6 Hz), 68.2 (d, C-Bn, ²J_{C,P}= 7.6 Hz), 67.2 (2x C-5'), 41.8 (2x C-17), 36.9 (C-2'), 36.8 (C-2'), 35.5 (2x C-17), 23.0 (C-15), 21.0 (C-15). **³¹P-NMR** (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: -9.38, -9.52. **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2921, 1682, 1628, 1542, 1281, 1018, 695. **MS**: (ESI-HR Methode I, m/z): ber.: 658.15823 [M+H]⁺, gef.: 658.1629 [M+H]⁺.

5-Chlor-cycloSal-*N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **96**

Die Synthese wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 418 mg (890 μmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin **85** und 245 mg (1.03 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **88** verwendet. Es konnten



305 mg (453 μmol, 54%) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier Diastereomere erhalten werden, deren Verhältnis nicht bestimmbar war.

R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v + 1% AcOH): 0.51. Smp.: 116 °C.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 10.38 (bs, 2 H, NH), 8.47 (s, 2 H, H-17), 7.50-7.29 (m, 4 H, H-12), 7.22-7.07 (m, 5 H, H_F), 6.99-6.66 (m, 4 H, H-11, H_C, H_D), 6.20-6.08 (m, 2 H, H-1'), 5.25-4.83 (m, 6 H, CH₂-Bn, 2x H-3'), 4.52-4.27 (m, 6 H, H-4', H-5'), 3.40-3.14 (m, 8 H, H-2'a, H-18), 3.07 (s, 6 H, H-14), 2.37-2.24 (m, 5 H, H-2'b, H-18), 2.12-1.90 (m, 9 H, H-16, H-18). **¹³C-NMR** (76 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 176.2 (C-15), 158.7 (C-6), 158.1 (C-17), 156.9 (C-2), 150.1 (C-8), 150.0 (C-8), 148.4 (C_B), 143.0 (C-10, C_E), 142.5 (C-10), 130.3 (C_C), 129.9 (C-12, C_F), 125.4 (C_D, H-11), 125.3 (C_D, H-11), 121.8 (2x C-13), 121.6 (2x C_A), 118.5 (C-4), 118.4 (C-5), 87.5 (C-4'), 84.4 (C-1'), 72.9 (C-3'), 71.1 (C-3'), 68.3 (C-Bn), 68.2 (C-Bn), 67.1 (C-5'), 41.8 (C-18) 41.7 (C-18),

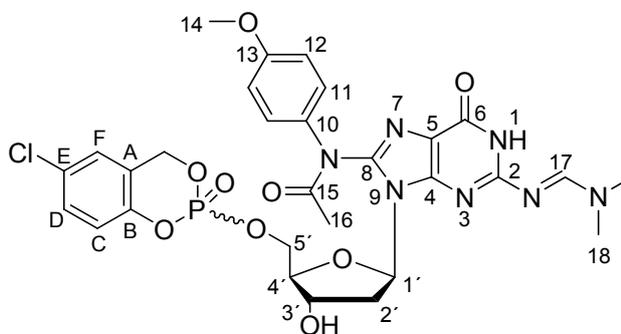
36.8 (2x C-2'), 35.5 (2x C-14), 21.2 (C-16), 21.1 (C-16). **³¹P-NMR** (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: -9.46, -9.54. **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2923, 1629, 1525, 1422, 1284, 1186, 1113, 1018, 940, 864, 814, 786, 727, 615, 519, 472, 442. **MS**: (ESI-HR Methode I, m/z): ber.: 672.1738 [M+H]⁺, gef.: 672.1794 [M+H]⁺.

5-Chlor-cycloSal-*N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **92**

Die Synthese wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 490 mg (1.01 mmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin **86** und 296 mg (1.24 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **88** verwendet.

Es konnten 399 mg (579 mmol, 57%) eines hellgelben Feststoffs als Gemisch zweier Diastereomere erhalten werden, deren Verhältnis nicht bestimmbar war.

R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/v + 1% AcOH): 0.47. Smp.: 121 °C.

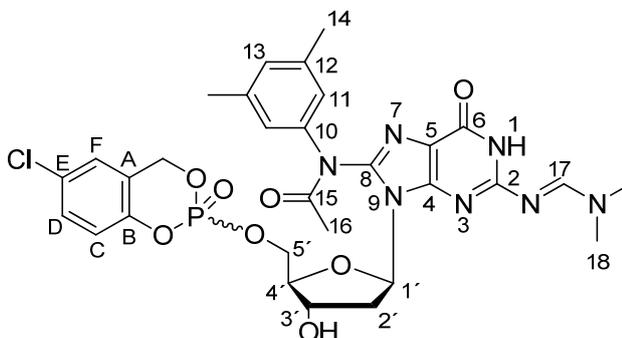


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 10.08 (bs, 2 H, NH), 8.51 (s, 2 H, H-17), 7.51-7.37 (m, 4 H, H-12) 7.21-7.11 (m, 2 H, H_F), 6.97-6.64 (m, 8 H, H-11, H_C, H_D), 6.13 (m, 2 H, H-1'), 5.24-4.85 (m, 6 H, CH₂-Bn, H-3'), 4.47-4.26 (m, 4 H, H-5'), 4.10 (bs, 2 H, H-4'), 3.80-3.72 (m, 6 H, H-14), 3.38-3.16 (m, 8 H, H-18, H-2'a), 3.09 (s, 6 H, H-18), 2.29 (bs, 2 H, H-2'b), 2.05 (s, 3 H, H-16), 2.00 (s, 3 H, H-16). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 175.2 (C-15), 158.0 (2x C-17), 157.9 (C-6, C-2), 149.9 (C-8), 149.7 (C-8), 148.4 (d, C_B, ²J_{C,P}= 6.0 Hz), 148.3 (d, C_B, ²J_{C,P}= 6.0 Hz), 143.0 (C-10, C_E), 130.0 (C-13), 129.9 (C-12, C_F), 125.4 (C_D), 125.3 (C_D), 121.8 (C_A), 121.7 (C_A), 120.0 (d, C_C, ³J_{C,P}= 9.1), 118.9 (C-5), 114.9 (C-11, C-4), 84.5 (2x C-4'), 84.4 (C-1'), 84.3 (C-1'), 71.7 (C-3'), 71.5 (C-3'), 68.3 (C-Bn), 67.3 (C-5'), 55.7 (C-14), 41.9 (2x C-18), 36.9 (C-2'), 35.5 (C-14), 22.8 (C-16), 21.0 (C-16). **³¹P-NMR** (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: -9.43, -9.61. **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2930, 1678, 1629, 1507, 1422, 1245, 1185, 1113, 1019, 941, 863, 439. **MS**: (ESI-HR Methode I, m/z): ber.: 688.1687 [M], gef.: 688.17412 [M+H]⁺.

5-Chlor-cycloSal-*N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **97**

Die Synthese wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 490 mg (1.01 mmol) *N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin **87** und 290 mg (1.21 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **88** verwendet.

Es konnten 375 mg (0.547 mmol, 54%) eines hellbraunen Feststoffs als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1.0:0.8 erhalten werden.

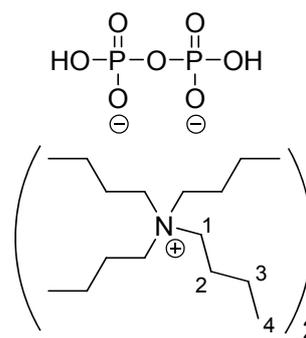


R_f -Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v + 1% AcOH): 0.35. Smp.: 114 °C.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 9.94 (bs, 2 H, NH), 8.46 (s, 2 H, H-17), 7.21-6.66 (m, 12 H, H_{arom}), 6.13 (s, 2 H, H-1'), 5.21-4.79 (m, 6 H, CH₂-Bn, H-3'), 4.47-4.24 (m, 4 H, H-5'), 4.16-4.06 (m, 2 H, H-4'), 3.24 (bs, 2 H, H-2'a), 3.16 (s, 6 H, H-18), 3.03-3.00 (m, 6 H, H-18), 2.31-2.20 (m, 14 H, H-2'b, H-14), 2.09-2.05 (m, 6 H, H-16). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 175.5 (C-15), 158.0 (2x C-17), 156.7 (C-2, C-6), 149.8 (C-8), 149.7 (C-8), 148.4 (d, C_B, ²J_{C,P}= 7.6 Hz), 148.3 (d, C_B, ²J_{C,P}= 6.1 Hz), 142.8 (C_E), 142.7 (C_E, C-10), 139.5 (2x C-12), 129.9 (C-11), 129.8 (C-11), 125.4 (C-13), 125.2 (C-13), 121.9 (C_D), 121.8 (C_A), 121.7 (C_A), 120.0 (2x C_F), 119.9 (C_C), 119.8 (C_C), 118.8 (C-4), 118.7 (C-5), 84.5 (d, C-4', ³J_{C,P}= 6.0 Hz), 84.4 (d, C-4', ³J_{C,P}= 6.0 Hz), 83.9 (2x C-1'), 71.4 (2x C-3'), 68.2 (C-Bn), 68.1 (C-Bn), 67.3 (2x C-5'), 41.8 (C-18), 37.1 (C-2'), 36.9 (C-2'), 35.4 (C-18), 22.8 (C-16), 21.3 (C-14), 21.3 (C-14), 21.1 (C-16). **³¹P-NMR** (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= -9.32, -9.52. **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2919, 1682, 1629, 1526, 1423, 1280, 1186, 1114, 1019, 721. **MS**: (ESI-HR Methode I, m/z): ber.: 686.1895[M+H]⁺, gef.: 686.1937 [M+H]⁺.

Bis-(tetra-*n*-butylammonium)dihydrogenpyrophosphat 98

Der Ionentauscher Dowex (50WX8) wurde mit verdünnter Salzsäure gespült, bis ein pH-Wert des Eluats von 1-2 erreicht war. Anschließend wurde die restliche Salzsäure mit Reinstwasser entfernt bis das Eluat einen pH-Wert von 7 erreicht hatte. Es wurden 2.62 g (5.87 mmol) Dinatriumdihydrogenpyrophosphat Decahydrat in 45 mL Reinstwasser gelöst und auf den Ionentauscher aufgetragen. Der Ionentauscher wurde mit Reinstwasser gespült und die protonierte Verbindung aufgefangen. Die Lösung wurde mit einer 40%igen Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid-Lösung in Reinstwasser auf pH= 3.5 titriert, sodass 2 Gegenionen vorlagen. Anschließend wurde die Lösung gefriergetrocknet, der erhaltene Feststoff mehrfach unter Stickstoffatmosphäre fein gemörst und intensiv im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 3.30 g (4.99 mmol, 85%) eines feinpulverig, farblosen, Feststoffs erhalten werden.

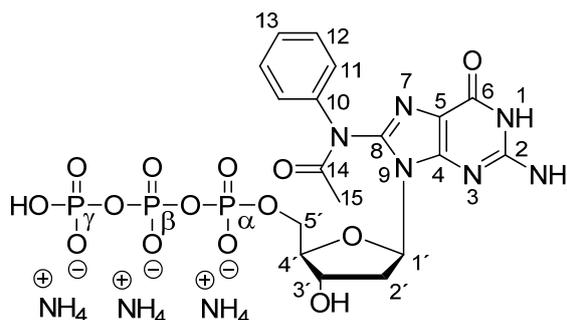


Der Ionentauscher wurde mit Reinstwasser gespült und die protonierte Verbindung aufgefangen. Die Lösung wurde mit einer 40%igen Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid-Lösung in Reinstwasser auf pH= 3.5 titriert, sodass 2 Gegenionen vorlagen. Anschließend wurde die Lösung gefriergetrocknet, der erhaltene Feststoff mehrfach unter Stickstoffatmosphäre fein gemörst und intensiv im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 3.30 g (4.99 mmol, 85%) eines feinpulverig, farblosen, Feststoffs erhalten werden.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm]= 3.20-3.17 (m, 16 H, H-1), 1.67-1.61 (m, 16 H, H-2), 1.39-1.32 (m, 16 H, H-3), 0.94 (t, 24 H, H-4, ³J_{H,H}= 7.4). **³¹P-NMR** (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -10.9.

C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 99

Die Synthese wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 110 mg (170 μmol) 5-Chlor-*cycloSal-N*²-formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **95** und 220 mg (334 μmol, 2 Äquiv.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)dihydrogenpyrophosphat **98** verwendet.



Nach 16 h Reaktionszeit konnten 73.5 mg (106 μmol, 64%, bezogen auf drei Ammoniumionen) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

R_F-Wert (*iso*-Propanol/ Ammoniak/ H₂O; 40:10:25 v/ v): 0.20.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.63-7.37 (m, 5 H, H_{arom.}), 6.31 (s, 1 H, H-1'), 4.46-4.10 (m, 3 H, H-4', H-5'), 3.27-2.97 (m, 1 H, H-2'a), 2.36-1.59 (m, 4 H, H-2'b, H-15). **¹³C-NMR** (151 MHz, D₂O): δ [ppm]= 163.3 (C-14), 158.7 (C-6), 153.6 (C-2), 151.6

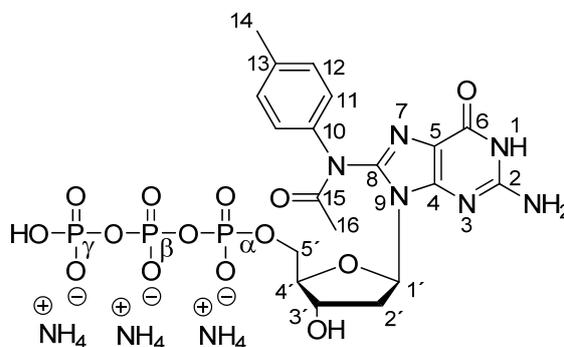
(C-4), 146.6 (C-8), 130.2, 129.3, 127.5, 126.0, 123.1 (C_{arom.}), 119.4 (C-10), 114.7 (C-5), 85.7 (C-4'), 84.5 (C-1'), 71.4 (C-3'), 65.4 (C-5'), 35.7 (C-2'), 21.6 (C-15). ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -9.69 (d, P_γ, ²J_{P,P}= 17.8 Hz), -11.05 (d, P_α, ²J_{P,P}= 19.4 Hz), -22.79 (t, P_β, ²J_{P,P}= 17.8 Hz). IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2970, 2517, 2193, 2172, 1970, 1620, 1540, 1227, 1060, 900, 684. MS (MALDI⁻, m/z): ber.: 639.041 [M-H]⁻, gef.: 639.490 [M-H]⁻.

C8-N-Acetyl-N-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 100

Die Synthese wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 90.7 mg (135 μmol) 5-Chlor-cycloSal-N²-formamidin-8-N-acetyl-N-4-methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **96** und 178 mg (270 μmol, 2 Äquiv.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)dihydrogenpyrophosphat **98** verwendet.

Nach 18 h Reaktionszeit konnten 57.7 mg (81.8 μmol, 61%, bezogen auf drei Ammoniumionen) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

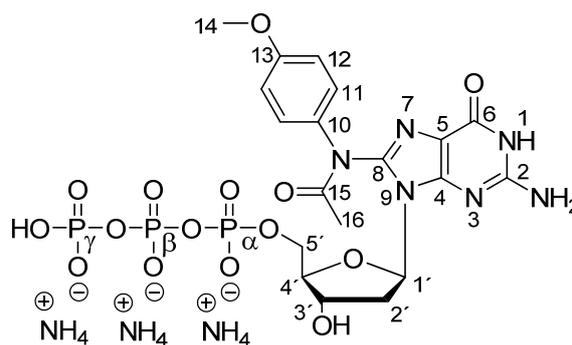
R_F-Wert (iso-Propanol/ Ammoniak/ H₂O; 40:10:25 v/ v): 0.16.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.43-7.19 (m, 4 H, H_{arom.}), 6.37-6.24 (m, 1 H, H-1'), 4.43-4.12 (m, 3 H, H-4', H-5'), 3.33-3.02 (m, 1 H, H-2'a), 2.43-2.10 (m, 7 H, H-2'b, H-14, H-16). ¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ [ppm]= 174.7 (C-15), 158.9 (C-6), 153.6 (C-2), 151.6 (C-4), 141.9 (C-8), 139.3 (C-10), 130.7 (C-13), 130.5, 127.1, 125.7, 120.3 (C_{arom.}), 115.0 (C-5), 85.7 (C-4'), 84.8 (C-1'), 71.5 (C-3'), 65.4 (C-5'), 35.7 (C-2'), 21.6 (C-16), 20.2 (C-14). ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -10.43 (d, P_γ, ²J_{P,P}= 19.4 Hz), -11.09 (d, P_α, ²J_{P,P}= 19.4 Hz), -23.00 (t, P_β, ²J_{P,P}= 21.1 Hz). IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2841, 1670, 1432, 1370, 1216, 1056, 899, 526. MS (MALDI⁻, m/z): ber.: 653.0562[M-H]⁻, gef.: 653.453 [M-H]⁻.

8-*N*-Acetyl-*N*-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 101

Die Synthese wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 100 mg (146 μmol) 5-Chlor-*cycloSal*-8-(*N*-acetyl)-*N*-4-methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **92** und 195 mg (296 μmol , 2 Äquiv.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)dihydrogenpyrophosphat **98** verwendet.



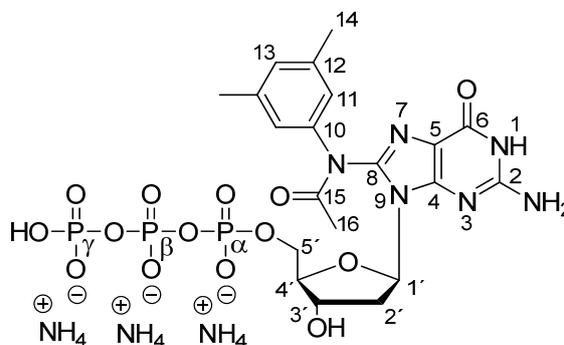
Nach einer Reaktionszeit von 17 h konnten 65.6 mg (90.9 μmol , 63%, bezogen auf drei Ammoniumionen) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

R_f -Wert (*iso*-Propanol/ Ammoniak/ H_2O ; 40:10:25 v/ v): 0.20.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm]= 7.56-7.32 (m, 2 H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.11- 7.04 (m, 2 H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.35-6.26 (m, 1 H, H-1'), 4.88 (s, 1 H, F H-3'), 4.43-4.08 (m, 3 H, H-4', H-5'), 3.86 (s, 3 H, H-14), 3.26 (bs, 1 H, H-2'a), 2.29 (bs, 1 H, H-2'b), 2.18 (s, 3 H, H-16). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, D_2O): δ [ppm]= 174.8 (C-15), 159.6 (C-13), 158.5 (C-6), 153.7 (C-2), 153.5 (C-4), 141.7 (C-8), 132.1 (C-10), 130.0, 128.9, 127.5, 115.3 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 115.1 (C-5), 85.7 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 9.1$ Hz, C-4'), 84.6 (C-1'), 71.5 (C-3'), 65.4 (C-5'), 55.6 (C-14), 35.7 (C-2'), 21.5 (C-16). **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, D_2O): δ [ppm]= -10.86 (d, P_γ , $^2J_{\text{P,P}} = 19.4$ Hz), -11.14 (d, P_α , $^2J_{\text{P,P}} = 19.4$ Hz), -23.16 (t, P_β , $^2J_{\text{P,P}} = 19.4$ Hz). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]= 3164, 2977, 2906, 1668, 1509, 1436, 1372, 1228, 1056, 906. **MS** (MALDI $^-$, m/ z): ber.: 669.051 [M-H] $^-$, gef.: 669.486 [M-H] $^-$.

8-*N*-Acetyl-*N*-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 102

Die Synthese wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 116 mg (170 μmol) 5-Chlor-*cycloSal*- N^2 -formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-3,5-dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-monophosphat **97** und 226 mg (343 μmol , 2 Äquiv.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)dihydrogenpyrophosphat **98** verwendet.



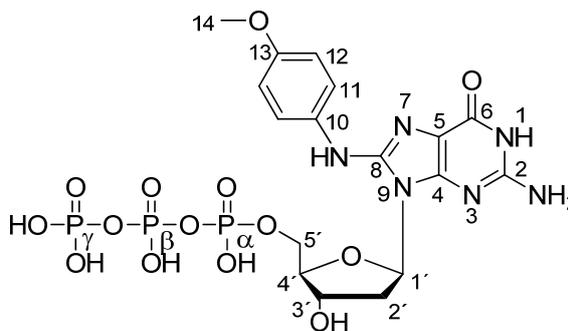
Nach 16 h Reaktionszeit konnten 49.8 mg (69.3 μmol , 41%, bezogen auf drei Ammoniumionen) eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

R_f -Wert (*iso*-Propanol/ Ammoniak/ H₂O; 40:10:25 v/ v): 0.18.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.27-7.00 (m, 3 H, H-11, H-13), 6.30 (s, 1 H, H-1'), 4.92-4.85 (m, 1 H, H-3'), 4.43-4.31 (m, 1 H, H-4'), 4.27-4.09 (m, 2 H, H-5'), 3.25 (bs, 1 H, 2'a), 2.34 (s, 6 H, H-14) 2.24-2.13 (m, 4 H, H-2'b, H-16). **¹³C-NMR** (151 MHz, D₂O): δ [ppm]= 173.0 (C-15), 124.8 (C-11), 123.2 (C-13), 114.6 (C-5), 85.9 (C-4'), 84.8 (C-1'), 71.6 (C-3'), 65.3 (C-5'), 35.7 (C-2'), 20.2 (C-14, C-16). **³¹P-NMR** (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -10.78 (d, P_γ, ²J_{P,P}= 19.4 Hz), -11.21 (d, P_α, ²J_{P,P}= 21.1 Hz), -23.19 (t, P_β, ²J_{P,P}= 19.0 Hz). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3199, 3042, 2011, 1970, 1672, 1643, 1216, 1060, 897. **MS** (MALDI⁻, m/ z): ber.: 667.072 [M-H]⁻, gef.: 667.547 [M-H]⁻.

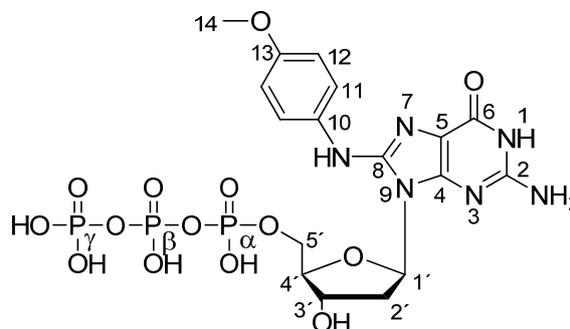
Versuch zur Synthese von C8-*N*-*N*-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **103a**

Es wurden 26 mg (40 μ mol) C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101** mit 1000 μ L eines Gemisches aus Methanol/ Wasser/ Triethylamin im Verhältnis 7:3:1 versetzt und bei Rt für 18 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach insgesamt 52 h konnte jedoch kein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet werden.



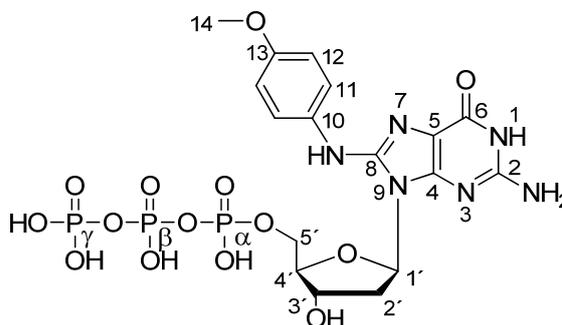
Versuch zur Synthese von C8-*N*-*N*-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **103b**

Es wurden 27 mg (40 μ mol) C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101** mit 1000 μ L konzentriertem Ammoniak versetzt und bei Rt für 18 h auf dem Schüttler inkubiert. Eine teilweise Abspaltung der Acetylgruppe im ¹H-NMR konnte zwar beobachtet werden, jedoch auch nach insgesamt 52 h bei Rt nicht vervollständigt werden.



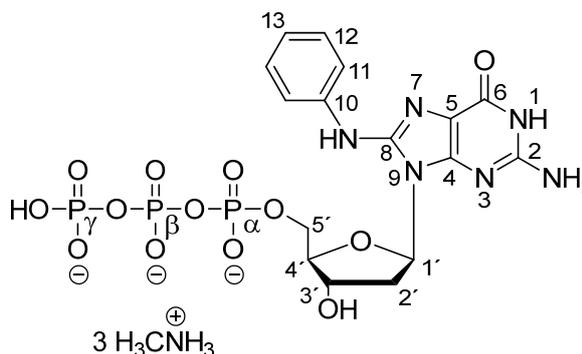
Versuch zur Synthese von C8-*N*-*N*-4-Methoxyphenylamin-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **103c**

Es wurden 27 mg (40 μmol) C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101** mit je 500 μL konzentriertem Ammoniak und 40%igem Methylamin im Verhältnis 1:1 versetzt und bei Rt für 15 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiteren 17 h konnte keine Acetylgruppe mehr im $^1\text{H-NMR}$ detektiert werden. Durch eine Reinigung mit ultra-performance flash an RP-18-Silicagel mit Wasser und anschließendem Acetonitril-Gradienten konnte das Produkt nicht erhalten werden. Es wurden 5.4 mg *N*-Methyl-*N*-4-Methoxyphenylamin in Form eines Methylammonium-Salzes isoliert.



C8-*N*-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **107**

Es wurden 10 mg (14 μmol) C8-*N*-Acetyl-*N*-Phenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **99** mit 500 μL AMA-Reagenz nach AAV 7 versetzt. Es konnten 8.9 mg (13 μmol ; 89%, bezogen auf drei Methylammoniumionen) farbloser Feststoff erhalten werden.

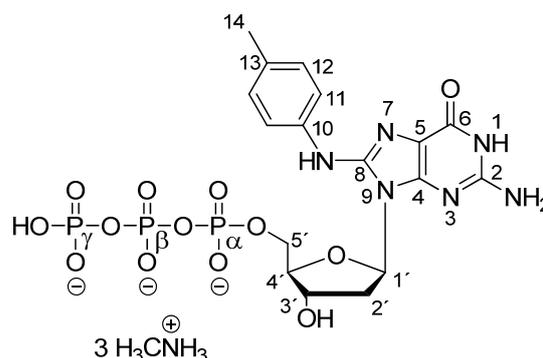


R_f -Wert (*iso*-Propanol/ Ammoniak/ H_2O ; 40:10:25 v/ v): 0.17.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]= 7.47-7.40 (m, 4 H, H-11, H-12), 7.18-7.13 (m, 1 H, H-13), 6.35 (t, 1 H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$), 4.88-4.84 (m, 1 H, H-3'), 4.42-4.21 (m, 3 H, H-4'; H-5'), 3.16-3.08 (m, 2 H, H-2'a), 2.62 (s, 9 H, H_3CNH_3^+), 2.35 (ddd, 1 H, H-2'b, $^4J_{\text{H,H}} = 4.0$, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$, $^2J_{\text{H,H}} = 12.0$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]= 157.7 (C-6), 153.0 (C-2), 151.0 (C-4), 146.6 (C-8), 140.1 (C-10), 130.0 (C-11), 123.0 (C-13), 119.3 (C-12), 85.1 (C-4'), 83.5 (C-1'), 70.8 (C-3'), 65.7 (C-5'), 36.4 (C-2'), 24.57 (H_3CNH_3^+). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]= -9.17 (d, P_γ , $^2J_{\text{P,P}} = 21.1$ Hz), -11.26 (d, P_α , $^2J_{\text{P,P}} = 25.9$ Hz), -22.83 (t, P_β , $^2J_{\text{P,P}} = 19.4$ Hz). IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]= 2982, 1597, 1560, 1498, 1217, 1074, 964, 898, 489. MS (MALDI $^-$, m/ z): ber.: 597.030 [M-H] $^-$, gef.: 596.902 [M-H] $^-$.

C8-N-H-N-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 105

Es wurden 10 mg (14 μmol) C8-N-Acetyl-N-4-Methylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **100** mit 500 μL AMA-Reagenz nach AAV 7 versetzt. Es konnten 9.6 mg (14 μmol ; 96%, bezogen auf drei Methylammoniumionen) farbloser Feststoff erhalten werden.

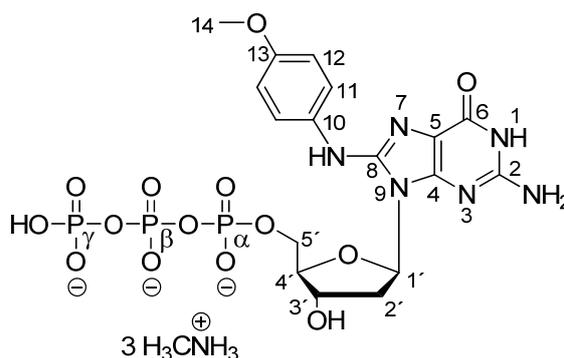


R_f -Wert (*iso*-Propanol/ Ammoniak/ H_2O ; 40:10:25 v/ v): 0.20.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O): δ [ppm]= 7.30-7.09 (m, 4 H, H-11, H-12), 6.23 (t, 1 H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$), 4.32-4.12 (m, 3 H, H-4'; H-5'), 3.12-2.93 (m, 2 H, H-2'a), 2.52 (s, 9 H, H_3CNH_3^+), 2.31-2.11 (m, 4 H, H-2'b, H-14). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, D_2O): δ [ppm]= 157.3 (C-6), 152.5 (C-2), 151.2 (C-4), 147.2 (C-8), 137.3 (C-13, C-10), 129.6 (C-12), 119.7 (C-11), 110.1 (C-5), 85.5 (C-4'), 83.7 (C-1'), 70.8 (C-3'), 65.3 (C-5'), 36.3 (C-2'), 24.5 (H_3CNH_3^+), 19.8 (C-14). **$^{31}\text{P-NMR}$** (81 MHz, D_2O): δ [ppm]= -9.79 (d, P_γ , $^2J_{\text{P,P}} = 20.3$ Hz), -11.38 (d, P_α , $^2J_{\text{P,P}} = 19.4$ Hz), -22.91 (t, P_β , $^2J_{\text{P,P}} = 19.4$ Hz). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]= 3202, 1638, 1600, 1564, 1514, 1229, 1074, 957, 910, 504. Die Verbindung konnte massenspektrometrisch nicht identifiziert werden.

C8-N-H-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat 106

Es wurden 38.6 mg (53.5 μmol) C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **101** mit 500 μL AMA-Reagenz nach AAV 7 versetzt. Es konnten 34.4 mg (47.7 μmol ; 89%, bezogen auf drei Methylammoniumionen) farbloser Feststoff erhalten werden.



R_f -Wert (*iso*-Propanol/ Ammoniak/ H_2O ; 40:10:25 v/ v): 0.19.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O): δ [ppm]= 7.26 (d, 2 H, H-11, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$), 6.89-6.84 (m, 2 H, H-12), 6.18 (t, 1 H, H-1', $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$), 4.33-4.08 (m, 3 H, H-4', H-5'), 3.74 (s, 3 H, H-14), 3.04-2.86 (m, 2 H, H-2'a), 2.52 (s, 9 H, H_3CNH_3^+), 2.29-2.08 (m, 1 H, H-2'b). **$^{13}\text{C-NMR}$**

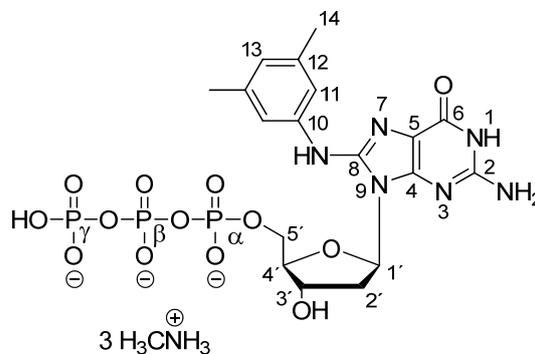
(101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 157.2 (C-6), 154.9 (C-13), 152.6 (C-2), 151.1 (C-4), 147.5 (C-8), 132.9 (C-10), 121.8 (C-11), 114.6 (C-12), 112.4 (C-5), 85.1 (C-4'), 83.4 (C-1'), 70.8 (C-3'), 65.3 (C-5'), 55.6 (C-14), 36.5 (C-2'), 24.5 (H₃CNH₃⁺). **³¹P-NMR** (81 MHz, D₂O): δ [ppm]= -9.70 (d, P_γ, ²J_{P,P}= 20.3 Hz), -13.49 (d, P_α, ²J_{P,P}= 19.4 Hz), -24.56 (t, P_β, ²J_{P,P}= 20.3 Hz). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3138, 1632, 1601, 1562, 1509, 1227, 1075, 900, 490. **MS** (MALDI⁻, m/z): ber.: 627.0407 [M-H]⁻, gef.: 627.158 [M-H]⁻.

C8-N-H-N-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **104**

Es wurden 8.0 mg (11 μ mol) C8-N-Acetyl-N-3,5-Dimethylphenyl-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat **102** mit 500 μ L AMA-Reagenz nach AAV 7 versetzt.

Es wurden 7.0 mg (9.7 μ mol; 88%, bezogen auf drei Methylammoniumionen) farbloser Feststoff erhalten.

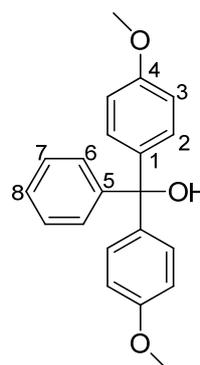
R_F-Wert (*iso*-Propanol/ Ammoniak/ H₂O; 40:10:25 v/v): 0.17.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 6.96 (s, 2 H, H-11) 6.73 (s, 1 H, H-13), 6.27 (t, 1 H, H-1', ³J_{H,H}=6.0), 4.33-4.13 (m, 3 H, H-4'; H-5'), 3.08-3.01 (m, 1 H, H-2'a), 2.54 (s, 9 H, H₃CNH₃⁺), 2.28-2.22 (m, 7 H, H-2'b, H-14). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 157.6 (C-6), 152.7 (C-2), 151.3 (C-4), 146.6 (C-8), 140.3 (C-8), 139.5 (C-12, C-10), 124.0 (C-13), 116.3 (C-11), 112.7 (C-5), 85.3 (C-4'), 83.8 (C-1'), 70.8 (C-3'), 65.3 (C-5'), 36.3 (C-2'), 24.5 (H₃CNH₃⁺), 20.4 (C-14). **³¹P-NMR** (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -9.56 (d, P_γ, ²J_{P,P}= 19.4 Hz), -11.32 (d, P_α, ²J_{P,P}= 19.4 Hz), -22.91 (t, P_β, ²J_{P,P}= 21.1 Hz). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3202, 1683, 1634, 1588, 12230, 1073, 1003, 1003, 949, 899, 490. **MS** (MALDI⁻, m/z): ber.: 625.0614 [M-H]⁻, gef.: 625.272 [M-H]⁻.

4,4'-Dimethoxytriphenylcarbinol 110

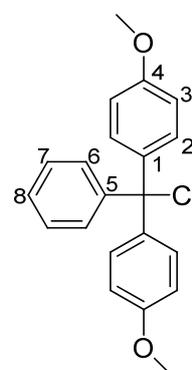
Es wurden 1.72 g (70.7 mmol) Magnesium in 7.0 mL THF suspendiert und mit 0.7 mL (6.0 mmol) 4-Bromanisol versetzt. Der Beginn der Reaktion machte sich durch Wärmeentwicklung bemerkbar. Daraufhin wurden 8.0 mL (64 mmol) 4-Bromanisol, gelöst in 17.5 mL THF, hinzuge tropft und die Suspension 30 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde vorsichtig eine Lösung aus 4.3 mL (30 mmol) Benzoesäureethylester in 4.3 mL THF hinzuge tropft und die Reaktion für weitere 30 min zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde mit 30 g Eis hydrolysiert und der entstandene Niederschlag in 50 mL 10%iger Schwefelsäure gelöst. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 25 mL Diethylether extrahiert, die organischen Phasen zweimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 10 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 15 mL Toluol gelöst und azeotrop destilliert. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurden 9.21 g (28.7 mmol; 96%) eines gelben Öls erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.31-7.25 (m, 2 H, H-6), 7.22-7.18 (m, 3 H, H-7, H-8), 7.10-7.05 (m, 4 H, H-2), 6.86-6.81 (m, 4 H, H-3), 6.23 (s, 1 H, -OH), 3.72 (s, 6 H, -OCH₃). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 158.2 (C-4), 149.0 (C-5), 140.5 (C-1), 129.2 (C-2), 127.9 (C-6), 127.6 (C-7), 126.6 (C-8), 113.0 (C-3), 80.1 (C-OH), 55.3 (O-CH₃). **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 3479, 2953, 2835, 1606, 1582, 1506, 1444, 1295, 1243, 1173, 1115, 1031, 898, 825.

4,4'-Dimethoxyphenylmethylchlorid 111

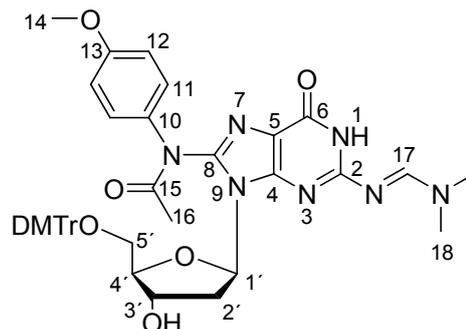
Es wurden 9.21 g (28.5 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylcarbinol **110** in 8 mL Toluol gelöst und mit 7.0 mL (98 mmol, 3 Äquiv.) Acetylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 2 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch Kälte destillation entfernt, der Rückstand in 8 mL Cyclohexan und 0.2 mL Acetylchlorid umkristallisiert und zur vollständigen Kristallisation zwei Tage bei 4 °C gelagert. Abschließend wurde unter Inertgasatmosphäre filtriert und mehrmals mit Cyclohexan gewaschen. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurden 8.58 g (25.3 mmol, 88%) eines farblosen Feststoffs erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.40-7.34 (m, 3 H, H-7, H-8), 7.17-7.15 (m, 2 H, H-6), 7.07-7.03 (m, 4 H, H-2), 6.96-6.91 (m, 4 H, H-3), 3.76 (s, 6 H, O-CH₃). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 158.9 (C-4), 145.0 (C-5), 136.8 (C-1), 130.7 (C-2), 129.2 (C-6), 128.1 (C-8), 127.9 (C-7), 113.2 (C-3), 55.2 (O-CH₃).

***N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin 109**

Über Nacht wurden 200 mg (412 μmol) *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methoxy-phenyl-2'-desoxyguanosin **86** im Vakuum getrocknet. Das Edukt wurde mit 3 mL Pyridin coevaporiert, in 12 mL Pyridin gelöst und mit 168 mg (494 μmol, 1.2 Äquiv.) 4,4'-Dimethoxyphenylmethylchlorid **111** versetzt. Nach 20 h Reaktionszeit bei Rt



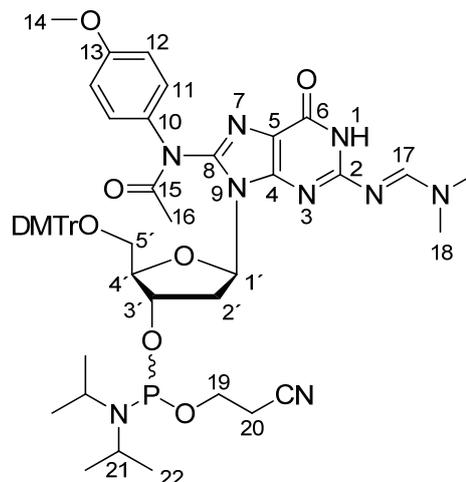
wurde die Reaktionslösung mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und Dichlormethan versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel durch Kälte destillation entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/ Methanol Gradienten von 0-5% mit 0.5% TEA aufgearbeitet. Es wurden 259 mg (329 μmol, 80%) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

R_F-Wert (CH₂Cl₂/ CH₃OH; 9:1 v/ v + 0.1% TEA): 0.45.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 11.40 (bs, 1 H, NH), 8.19 (s, 1 H, H-17), 7.38-7.25 (m, 3 H, H_{arom.}), 7.14-7.07 (m, 8 H, H_{arom.}), 7.00-6.91 (m, 2 H, H_{arom.}), 6.80-6.57 (m, 4 H, H_{arom.}), 6.24-6.15 (s, s, 1 H, H-1'), 5.32 (d, 1 H, 3'-OH, ³J_{H,H}= 4.8), 4.63-4.56 (m, 1 H, H-3'), 3.97-3.89 (m, 1 H, H-4'), 3.72-3.69 (m, 9 H, H-14, OCH₃), 3.13-3.08 (m, 1 H, H-2'a), 3.00 (s, 3 H, H-18), 2.94 (s, 3 H, H-18), 2.02-1.97 (m, 4 H, H-16, H-2'b). **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]= 2964, 2953, 2928, 1607, 1506, 1442, 1286, 1244, 1174, 1115, 1070, 963, 827. **MS**: (ESI-HR, m/ z): ber.: 788.3411 [M], gef.: 788.3407 [M].

*N*²-Formamidin-8-*N*-acetyl-*N*-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-*O*-(*N,N'*-diisopropyl)-cyanoethylphosphit-2'-desoxyguanosin **108**

Das *N*²-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **109** wurde mehrmals mit Acetonitril coevaporiert und über Nacht im Vakuum getrocknet. Es wurden 316 mg (401 μ mol) **109** in einer Mischung aus 6 mL Acetonitril und 6 mL Dichlormethan gelöst und mit 47.7 mg (404 μ mol, 1 Äquiv.) 4,5-Dicyanoimidazol versetzt. Der Lösung wurden tropfenweise 147 mg (487 μ mol, 1.2 Äquiv.) Bis-



N,N'-diisopropylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit hinzugegeben und anschließend für 17 h bei Rt gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt mit Benzol gefriergetrocknet. Es konnten 262 mg (265 μ mol, 66%) eines hellbraunen Feststoffs als Gemisch zweier Diastereomere erhalten werden, deren Verhältnis nicht bestimmbar war.

R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; 9:1 v/v + 0.1% TEA): 0.61.

¹H-NMR (400 MHz, Benzol-*d*₆): δ [ppm]= 8.27 (s, 2 H, H-17), 7.64-7.55 (m, 6 H, $H_{\text{arom.}}$) 7.43-7.38 (m, 8 H, $H_{\text{arom.}}$), 7.26 (bs, 2 H, $H_{\text{arom.}}$), 7.10-6.97 (m, 10 H, $H_{\text{arom.}}$), 6.70-6.40 (m, 8 H, $H_{\text{arom.}}$), 6.43-6.36 (m, 2 H, H-1'), 5.31-5.18 (m, 2 H, H-3'), 4.45-4.35 (m, 2 H, H-4'), 3.72-3.69 (m, 24 H, H-14, OCH₃, H-2'a, H-5'), 2.72-2.31 (m, 12 H, H-18), 2.18-1.88 (m, 8 H, H-2'b, H-16), 1.47-0.75 (m, 34 H, H-21, H-19, H-20, H-22). ³¹P-NMR (162 MHz, Benzol-*d*₆): δ [ppm]= 149.1, 148.9.

7.8 Oligonucleotide

7.8.1 Quadruplex-Sequenzen

Synthese des unmodifizierten DNA-Oligonucleotids **112**

5'-d(TGG GGT)-3'

M: 1862.3

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode I): 26.64 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 1861.2 [M-H]⁻

Synthese des C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-modifizierten DNA-Oligonucleotids 113

5'-d(TG^[Ac-4-methoxyphenyl]G GGT)-3'

M: 2025.4

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode I): 39.42 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 2024.5 [M-H]⁻

Synthese des C8-N-Acetyl-N-4-Methoxyphenyl-modifizierten DNA-Oligonucleotids 114

5'-d(TGG GG^[Ac-4-methoxyphenyl]T)-3'

M: 2025.4

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode I): 41.95 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 2024.1 [M-H]⁻

7.8.2 NarI-Sequenzen

Synthese des unmodifizierten DNA-Oligonucleotids 122

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

M: 3564.6

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II) 24.49 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 3564.7 [M-H]⁻

Synthese des unmodifizierten RNA-Oligonucleotids 126

5'- (cuc ggc gcc auc)-3'

M: 3744.5

Retentionszeit (IEX-HPLC-Methode I): 27.04 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 3744.6 [M-H]⁻

Synthese des unmodifizierten RNA-Oligonucleotids 125

5' - (gau ggc gcc gag)-3'

M: 3887.6

Retentionszeit (IEX-HPLC-Methode I): 29.00 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 3887.4 [M-H]⁻**Synthese des ABASIC modifizierten DNA-Oligonucleotids 117**

5' - d(GAT GGX GCC GAG)-3'

M: 3600.6

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 23.45 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 3599.9 [M-H]⁻**Synthese des ABASIC modifizierten DNA-Oligonucleotids 132**

5' - d(CTC GGC XCC ATC)-3'

M: 3431.6

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 22.10 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 3443.6 [M-H]⁻**Synthese des Benzo-modifizierten Oligonucleotids 123**

5' - d(CTC GGC BCC ATC)-3'

M: 3677.7

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 33.50 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 3677.3**Synthese des Thieno-modifizierten DNA-Oligonucleotids 124**

5' - d(CTC GGC SCC ATC)-3'

M: 3594.6

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 27.20 min.

MS: (MALDI⁻, m/z): 3596.4 [M-H]⁻

7.8.3 *Eco*RI-Sequenzen

Synthese des unmodifizierten DNA-Oligonucleotids 127

5'-d(GAT GAA TTC TAC)-3'

M:3645.5

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 25.49 min.

MS: (MALDI⁻,m/z): 3644.0 [M-H]⁻

Synthese des Benzo-modifizierten DNA-Oligonucleotids 128

5'-d(**B**AT GAA TTC TAC)-3'

M:3739.7

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 41.48 min.

MS: (MALDI⁻,m/z): 3738.5 [M-H]⁻

Synthese des Benzo-modifizierten DNA-Oligonucleotids 129

5'-d(GAT **B**AA TTC TAC)-3'

M:3739.7

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 35.60 min.

MS: (MALDI⁻,m/z): 3738.7 [M-H]⁻

Synthese des Thieno-modifizierten DNA-Oligonucleotids 130

5'-d(**S**AT GAA TTC TAC)-3'

M:3657.6

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 29.44 min.

MS: (MALDI⁻,m/z): 3656.5 [M-H]⁻

Synthese des Thieno-modifizierten Oligonucleotids 131

5'-d(GAT **S**AA TTC TAC)-3'

M:3656.6

Retentionszeit (RP-HPLC-Methode II): 27.92 min.

MS: (MALDI⁻,m/z): 3655.7 [M-H]⁻

8 Gefahrstoffverzeichnis

Das folgende Verzeichnis umfasst Verbindungen und Lösungsmittel, mit denen während dieser Promotion gearbeitet wurde. Die Gefahrstoffe sind mit den jeweiligen Gefahrensymbolen sowie den H-Sätzen und P-Sätzen gekennzeichnet. Die Substanzen, für die keine Gefahreinschätzung bekannt ist, sind als gefährlich einzustufen. Es ist zu vermeiden, sich oder eine an andere Person mit diesen Substanzen zu kontaminieren und diese Stoffe in die Umwelt einzubringen.

Substanz	Piktogramm	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		Gefahr	225-319-336	210-233-305+351+338
Acetonitril		Gefahr	225-332-302-312-319	210-305+351+338-403+235
Acetylchlorid		Gefahr	225-314	210-280-305+351+338-310
Acrylamid		Gefahr	350-340-361f-301-372-332-312-319-315-317	201-280-310-305+351+338-308+131
Ammoniaklösung	 	Gefahr	314-335-400	273-280-301+330+331-304+340+351+338+310
Ammoniumpersulfat	 	Gefahr	271-302-315-319-335-334-317	280-305+351+338-302+352-304+341-342+311
Benzol-d ⁶	 	Gefahr	225-350-340-372-304-319-315	201-210-308+313-301+310-331-305+351+338-302+352
Benzophenon		Achtung	410	273
BOP		Gefahr	228-315-335	210-261
Calciumhydrid		Gefahr	260	231+232-370+378-422
Cäsiumcarbonat		Achtung	315-319-335	261-305+351+338
5-Chlor-salicylalkohol		Achtung	315-319-335	261-305+351+338
5-Chlor-salicylsäure		Achtung	315-319-335	261-305+351+338

Cyclohexan		Gefahr	225-304-315-336-410	210-240-273-301+310-331-403+235
Chloroform		Achtung	302-315-351-373	302+352-314
1,2-Dichlorethan		Gefahr	225-350-302-319-335-315	201-210-302+352-304+340-305+351+338-308+313
Dichlormethan		Achtung	315	281-308+313
Diisopropyl-ethyl-amin		Gefahr	225-301-314-412	210-273-280-301+330+331-305+351+338-309-310
Diethylether		Gefahr	224-302-336	210-240-403+235
1,2-Dimethoxyethan		Gefahr	225-360FD-332	201-210-308+313
N,N-Dimethyl-formamid		Gefahr	360D-226-332-312-319	201-302+352-305+351+338-308+313
N,N-Dimethyl-formamiddiethylacetal		Gefahr	225-302-315-319-335	210-261-305+351+338
DTT		Achtung	302-315-319	302+352-305+351+338
Dimethylsulfoxid	-	-	-	-
EDTA		Achtung	319	305+351+338
Essigsäure		Gefahr	226-314	280-301+330+331-307+310-305+351+338
Essigsäure-ethylester		Gefahr	225-319-336	210-240-305+351+338
Ethanol		Gefahr	225	210
n-Hexan		Gefahr	225-361f-304-373-315-336-411	210-240-273-301+310-331-302+352-403+235

Hydrazinhydrat		Gefahr	226-350-331-311-301-314-317-410	301+310-303+361+353-305+351+338-320-361-405-501
Imidazol		Gefahr	302-314-361d	280-301+330+331-305+351+338-309-310
iso-Propanol		Gefahr	225-319-336	210-233-305+351+338
Lithium-aluminium-hydrid		Gefahr	260-314	223-231+232-280-305+351+338-370+378-422
Kalium		Gefahr	260-314	223-231+232-280-305+351+338-370+378-422
Kaliumphosphat Kieselgel	-	-	-	260
Magnesium		Gefahr	250-260	222-223-231+232-370+378-422
Mercapto-ethanol		Gefahr	301-310-330-315-318-410	280-273-302+352-304+340-305+351+338-309-310
Methanol		Gefahr	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352
Methylamin 40% in Wasser		Gefahr	220-315-318-332-335	210-261-264-280-302+352-304+340-305+351+338+310+321-332+313-362-377-381-403+233-405-501
Natrium		Gefahr	260-314	380-301+330+331-305+351+338-309-310-370+378-422
Natriumchlorid	-	-	-	-
Natrium-hydroxid		Gefahr	314-290	280-301+330+331-309+310-305+351+338
Natriumsulfat	-	-	-	-
4-Nitroanisol		Gefahr	331-311-301-373-412	273-280-302+352-304+340-309+310
4-Nitro- <i>m</i> -xylo		Gefahr	302-312-332	26^1-280-302+352-304+340-322-501
Nitrobenzol		Gefahr	351-361f-331-311-301-372-411	273-281-314

Petrolether		Gefahr	225-304-315- 336-361f- 373-411	201-210-233-240- 273-280-281- 301+310-302+352- 304+340-308+313- 331-403+233-501
Phosphoroxychlorid		Gefahr	330-372-302- 314	280-305+351+338- 310
Pyridin		Gefahr	225-332-312- 302	210-233-302+352
Salzsäure konz.		Gefahr	290-314-335	234-260-304+340- 303+361+353- 305+351+338- 309+311-501
Schwefelsäure konz.		Gefahr	314-290	280-310+3300331- 309-310-305- 351+338
Tert-Butyl-dimethylsilylchlorid		Gefahr	314	260-264-280- 301+330+331- 303+361+353- 304+340- 305+351+338-310- 321-405
Tetrahydrofuran		Gefahr	225-319-335- 351	210-233-243- 305+351+338
TBAF		Gefahr	314	280-305+351+338- 310
p-Toluidin		Gefahr	331-311-301- 351-319-317- 400	272-280-302+352- 304+340- 305+351+338- 309+310
Toluol		Gefahr	225-361d- 304-373-315- 336	210-301+310-331- 302+352
Triethylamin		Gefahr	225-331-311- 302-314	210-280- 303+361+353- 305+351+338-310- 312
TEMED		Gefahr	225-332-302- 314	210-233-280- 301+330+331- 305+351+338- 309+310
Trifluoressigsäure		Gefahr	332-314-412	271-273-301-330- 331-305+351+338- 309+310
Tris		Achtung	315-319-335	261-305+351+338

9 Literatur

- [1] Holliday, R., Pugh, J. E., DNA modification mechanisms and gene activity during development, *Science* **1975**, 187, 226-232.
- [2] Beck-Sickinger, A., Hahn, U., Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C., Lehrbuch der Biochemie, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Auflage: 2. aktualisierte u. erweiterte Auflage, Weinheim, **2010**, 1032-1042.
- [3] Rehn, L., Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern, *Arch. f. Klin. Chir.* **1895**, 50, 588-600.
- [4] Leichtenstern, O., Über Harnblasenentzündung und Harnblasengeschwülste bei Arbeitern in Farbfabriken, *DMW* **1898**, 24, 709-713.
- [5] 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, 4205-4208.
- [6] 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, 25089-25098.
- [7] 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, 3409-3412.
- [8] Patrianakos, C., Hoffmann, D., Chemical studies on tobacco smoke LXIV. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke **1979**, *J. Anal. Toxicol.*; 3, 150-154.
- [9] 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.
- [10] Doll, R., Peto, R., Wheatly, K., Gray, R., Sutherland, I., Mortality in relation to smoking: 40 years observation on male british doctors, *BMJ* **1994**, 309, 901-911.

- [11] Brennan, P., Bogillot, O., Cordier, S., Greiser, E., Schill, W., Vineis, P., Cigarette smoking and bladder cancer in man: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int. J. Cancer* **2000**, 86, 289-294.
- [12] Pesch, B., Haerting, J., Ranft, U., Klimpel, A., Oelschlägel, B., Schill, W., Occupational risk factors for urothelial carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter Urothelial and Renal Cancer, *Int. J. Epidemiol.* **2000**; 29, 238-247.
- [13] Weiss, T., Ewers, U., Flieger, A., Angerer, J., Innere Belastung der Allgemeinbevölkerung mit Amino- und Nitroaromatischen Verbindungen, *Umweltmed. Forsch. Prax.* **2000**, 2, 101-106.
- [14] Bryant, M. S., Vineis, P., Skipper, P. L., Tannebaum, S. R., Hemoglobin adducts of aromatic amines: associations with smoking status and type of tobacco, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85,9788–9791.
- [15] Rafii, F., Hall, J. D., Cerniglia, C. E., Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract, *Food Chem. Toxicol.* **1997**, 35, 897-901.
- [16] Macwana, S. R., Punj, S., Cooper, J., Schwenk, E., John, G. H., Identification and isolation of an azoreductase from *Enterococcus faecium*, *Curr. Iss. Mol. Biol.* **2010**, 12, 43-48.
- [17] Richtlinie 2002/ 61/ EG vom 19. Juli 2002 zur 19. Änderung der Richtlinie 76/ 769/ EWG, Amtsblatt der EG L243/ 15 ff
- [18] Brüscheweiler, B. J., Küng, S., Bürgi, D., Muralt, L., Nyfeler, E., Identification of non-regulated aromatic amines of toxicological concern which can be cleaved from azo dyes used in clothing textiles, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, 69, 263-272.
- [19] Richtlinie 2002/ 72/ EG vom 6. August 2002 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, Amtsblatt der Europäischen Union, Verordnung Nr. 10, **2011**.

- [20] Wittke, K., Hajimiragha, H., Dunemann, L., Begerw, L., Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **2001**, 755, 215-228.
- [21] Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes, Stoffmonographie und Referenzwerte für monozyklische Aminoaromaten, *Bundesgesundheitsbl.* **2011**, 54, 650-663.
- [22] Schut H. A., Snyderwine E. G., DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implecation for mutagenesis and carcinogenesis, *Carcinogenesis* **1999**, 20, 353-368.
- [23] Walter, R., Milano, F., Brasky, T. M., White, E., Long-term use of ataminophen, aspirin, and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of hematologic malignancies, *J. Clin. Oncol.* **2011**, 29, 2424-2431.
- [24] Beland, F. A., Heflich, R. H., Howard, P. C., Fu, P. P., The in vitro metabolic activation of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons, *ACS Sym. Ser.* **1985**, 283, 371–396.
- [25] Cramer, J. W., Miller, J. A., Miller, E. C., The hydroxylation of the carcinogen 2-acetylaminofluorene by rat liver: stimulation by pretreatment in vivo with 3-methylcholanthrene, *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 250-256.
- [26] Lower, Jr. G. M., Nilsson, T., Nelson, C. E., Wolf, H., Gamsky, T. E., Bryan, G. T., N-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark, *Environ. Health Persp.* **1979**, 29, 71-79.
- [27] Bell, D. A., Badawi, A. F., Lang, N. P., Ilett, K. F., Kadlubar, F. F., Hirvonen, A., Polymorphism in the N-Acetyltransferase 1 (NAT1) Polyadenylation signal: association of NAT1*10 Allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue, *Adv. Canc. Res.* **1995**, 55, 5226-5229.
- [28] Albrecht, W., Neumann, H.-G., Biomonitoring of aniline and nitrobenzene, Hemoglobin binding in rats and analysis of adducts, *Arch. Toxicol.* **1985**, 57, 1-5.
- [29] 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, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1986**, *112*, 100-106.

[30] Cui, L., Sun, H.-L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., Skipper, P. L., Identification of Adducts Formed by Peaction of *N*-Acetoxy-3,5-dimethylaniline with DNA, *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1730-1736.

[31] Kumar, N. V. A., Rangappa, K. S., Synthesis and Characterization of Thymidine Adducts of Arylamines, *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 259-264.

[32] Thorp, H. H., Electron-, energy-, and atom-transfer reactions between metal complexes and DNA, *Adv. Inorg. Chem.* **1995**, *43*, 127-177.

[33] Beland, F. A., Beranek, D. T., Dooley, K. L., Heflich, R. H., Kadlubar, F. F., Arylamine-DNA Adducts in vitro and in vivo: their role in bacterial mutagenesis and urinary bladder carcinogenesis, *Environ. Health Persp.* **1983**, *49*, 125-134.

[34] Novak, M., Kennedy, S. A., Selective trapping od *N*-Acetyl-*N*-(4-biphenyl)nitrenium and *N*-Acetyl-*N*-(2-fluorenyl)nitrenium ions by 2'-deoxyguanosine in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 574-575.

[35] Humphreys, W. G., Kadlubar, F. F., Guengerich, F. P., Mechanism of C8 alkylation of guanine resiued by activated arylamines: evidence for initial adduct formation at the *N*⁷ position, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 8278-8282.

[36] Borosky, G. L., Ultimate cancerogenis metabolites from aromatic and heterocyclic aromatic amines: a computational study in relation to their mutagenic potential, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *20*, 171-180.

[37] Gupta, R. C., Dighe, N. R., Formation and removal of DNA adducts in rat liver treated with *N*-hydroxy derivates of 2-acetylaminofluorene, 4-acetylaminobiphenyl and 2-acetylaminophenanthrene, *Carcinogenesis* **1984**, *5*, 343-349.

[38] Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D., Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1973**, *70*, 2281-2285.

- [39] Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/ Mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.* **1975**, *31*, 347-364.
- [40] Randerath, K., Reddy, M. V., Gupta, R. C., ³²P-labeling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 6126-6129.
- [41] Phillips, D. H., Arlt, V. A., The ³²P-postlabeling assay for DNA adducts, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2772-2781.
- [42] Böge, N., Synthese von Arylamin-modifizierten 2'-dG-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Hamburg **2008**.
- [43] Krüger, S., Synthese von C8-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Hamburg **2011**.
- [44] Famulok, M., Synthese von N-Acetoxyverbindungen carcinogener Arylamine und ihre *in vitro*-Reaktion mit (Bio)Nucleophilen: Entscheidene electrophile Metaboliten Aromatischer Amine, *Dissertation*, Philips-Universität Marburg/ Lahn **1989**.
- [45] 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*, 349-350.
- [46] Louie, J., Hartwig, J. F., Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl alides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609-3612.
- [47] 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.
- [48] Gräsl, S., Meier, C., Synthesis of Oligonucleotide Building Blocks of 2'-Deoxyguanosine Bearing a C8-Arylamine Modification, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2003**, *22*, 1119-1121.
- [49] Meier, C., Gräsl, S., Detmer, I., Marx, A., Synthesis of oligonucleotides Bearing an Arylamine Modification in the c8-position of 2'-Deoxyguanosine, *Nucleos. Nucleoti. Nucl.* **2005**, *24*, 691-694.

- [50] Gräsl, S., Synthese C8-Arylamin-modifizierter 2'-Desoxyguanosinderivate und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Hamburg **2005**.
- [51] 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, 14043-14052.
- [52] 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, 556-563.
- [53] Gillet, L. C. J., Alzeer, J., Schärer, O. D., Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosine-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA Synthesis, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 1961-1969.
- [54] 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, 3907-3914.
- [55] van Osterwijk, M. F., Filon, R., de Groot, A. J. L., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. F., Lack of transcription-coupled repair of acetxlamino fluorene DNA adducts in human fibroblasts contrasts their efficient inhibition of transcription, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13599-13604.
- [56] Mu, H., Kropachev, K., Wang, L., Zhang, L., Kolbanovskiy, A., Kolbanovskiy, M., Geacintov, N. E., Broyde, S., Nucleotide excision repair of 2-acetylaminofluorene- and 2-aminofluorene-(C8)-guanine adducts: molecular dynamics simulations elucidate how lesion structure and base sequence context impact repair efficiencies, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 1-16.
- [57] Jain, V., Hilton, B., Patnaik, S., Zou, Y., Chiarelli, M. P., Cho, B. P., Conformational and thermodynamic properties modulate the nucleotide excision repair of 2-aminofluorene and 2-acetylaminofluorene dG adducts in the *NarI* sequence, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 3939-3951.

- [58] Patnaik, S., Cho, B. P., Structures of 2-Acetylaminofluorene Modified DNA Revisited: Insight into Conformational Heterogeneity, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1650-1652.
- [59] O'Handley, S. F., Sanford, J., Xu, R., Lester, C. C., Hingerty, B. E., Broyde, S., Krugh, T. R., Structural characterization of an *N*-acetyl-2-aminofluorene (AAF) modified DNA Oligomer by NMR, energy minimization and molecular dynamics, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2481-2497.
- [60] Mauls, M. J., Barends, T. R. M., Glas, A. F., Cryle, M. J., Domratcheva, T., Schneider S., Schlichting, I., Carell, T., Crystall Structure and Mechanism of a DNA (6-4) Photolyase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076-10080.
- [61] Schorr, S., Schneider, S., Lammens, K., Hopfner, K.-P., Carell, T., Mechanism of replication blocking and bypass of Y-family polymerase η by bulky acetylaminofluorene DNA adducts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 20720-20725.
- [62] Meier, C., Boche, G., ^1H - und ^{13}C -NMR-Konformationsanalysen und Minimal-Potential-Energie-Rechnungen an Desoxyguanosin-, Guanosin- und 5'-Guanosinmonophosphat-Addukten des Grenzcancerogens 4-Methylanilin (Proton and carbon-13 NMR-conformational analysis and minimal-potential-energy calculations with deoxyguanosine, guanosine and 5'-guanosine monophosphate adducts of the borderline carcinogen 4-methylaniline), *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 1707-1713.
- [63] Meier, C., Boche, G., The modification of guanine nucleosides and nucleotides by the borderline arylamine carcinogens 4-methyl- and 4-methoxyaniline: chemistry and structural characterization, *Carcinogenesis* **1991**, *12*, 1633-1640.
- [64] Yoshikawa, M., Kato, T., Takenishi, T., A Novel Method for Phosphorylation of Nucleosides to 5'-Nucleotides, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065-5068.
- [65] Yoshikawa, M., Kato, T., Takenishi, T., Studies of phosphorylation III. Selective phosphorylation of unprotected nucleosides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 3505-3508.

- [66] Ludwig, J., Eckstein, F., Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thio-triphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631–635.
- [67] Hoard, D. E., Ott, D. G., Conversion of Mono- and Oligonucleotides to 5'-Triphosphates, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1785-1788.
- [68] Moffatt, J. G., Khorana, H. G., Nucleoside Polyphosphates. The Synthesis and Some Reactions of Nucleoside-5'-Phosphoromorpholidates and Related Compounds. Improved Methods for the Preparation of Nucleoside-5' Polyphosphates, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649-658.
- [69] Moffatt, J. G., A General Synthesis of Nucleoside-5'-triphosphates, *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 599-604.
- [70] Sun, Q.; Edathil, J.P.; Wu, R.; Smidansky, E.D.; Cameron, C.E.; Peterson, B.R. One-Pot Synthesis of Nucleoside 5'-Triphosphates from Nucleoside 5'-H-Phosphonates, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1703–1706.
- [71] Warnecke, S., Meier, C., Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with *cycloSal*-Nucleotides, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
- [72] Meier, C., 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphinin-2-oxides: A new concept for lipophilic, potential prodrugs of biologically active nucleoside monophosphates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70-72, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 77-79.
- [73] Meier, C., Lorey, M., De Clercq, E., Balzarini, J., Cyclic Saligenylphosphotriesters of 2'-3'-Dideoxy-2'-3'-didehydrothymidine (d4T) – A New Pro-Nucleotide Approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *2*, 99-104.
- [74] Wendicke, S., Warnecke, S., Meier, C., Efficient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1523-1525; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.

- [75] Wolf, S., Zismann, T., Lunau, N., Warnecke, S., Wendicke, S., Meier, C., A Convenient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses and Other Polyphosphorylated Bioconjugates, *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89*, 63-75.
- [76] Tonn, V. C., Meier, C., Solid-Phase Synthesis of (Poly)phosphorylated Nucleosides and Conjugates, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9832-9842.
- [77] Meier, C., Sarac, I., Method for the solid-phase based synthesis of phosphate-bridged nucleoside conjugates, Patent: PCT/ EP2013/ 051156, **2013**.
- [78] Meier, C., *CycloSal* Phosphates as Chemical Trojan Horses for intracellular Nucleotide an Glycosylmonophosphate Delivery- Chemistry Meets Biology, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *5*, 1081-1102.
- [79] Meselson, M., Stahl, F.W., The replication of DNA in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, *44*, 671–682.
- [80] Joyce, C. M., Steitz, T. A., *Annu. Rev. Biochem.*, **1994**, *63*, 777–822.
- [81] Bräutigam C. A., Steitz T. A., Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 54–63.
- [82] Sawaya, M.R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S.H., Kraut, J., Crystal-Structure of rat dna-polymerase-beta - evidence for a common polymerase mechanism, *Science* **1994**, *264*, 1930-1935.
- [83] Wang, J., Sattar, A. K. M. A., Wang, C. C., Karam, J. D., Konigsberg, W. H., Steitz, T., A., Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69, *Cell* **1997**, *89*, 1087-1099.
- [84] Beese, L. S., Steitz, T. A., Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism, *EMBO J.* **1991**, *10*, 25-33.
- [85] Ahn, J., Kraynov, V. S., Zhong, X., Werneburg, B. G., Tsai, M. D., DNA polymerase beta: Analysis of the contributions of tyrosine-271 and asparagine-279 to substrate

specificity and fidelity of DNA replication by pre steady state kinetics, *Biochem. J.* **1998**, 323, 79-87.

[86] Cline, J., Braman, J. C., Hogrefe, H. H., PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases, *Nucleic Acid Res.* **1996**, 24, 3546-3551.

[87] McCulloch, S. D., Kunkel, T., The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases, *Cell Res.* **2008**, 18, 148-161.

[88] Murakami, K. S., Trakselis, M. A., *Nucleic acid polymerases*, 30, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, **2014**, S. 2.

[89] <http://www.genenames.org/genefamilies/POL>, letzter Zugriff: 20.05.2014.

[90] Starcevic, D., Dalal, S., Sweasy, J. B., Is there a link between DNA polymerase beta and cancer?, *Cell Cycle* **2004**, 3, 998–1001.

[91] Srivastava, D. K., Husain, I., Arteaga, C. L., Wilson, S. H., DNA polymerase beta expression differences in selected human tumors and cell lines, *Carcinogenesis* **2004**, 20, 1049–1054.

[92] Gellert, M., Lipsett, Davies, D. R., Helix Formation by Guanylic Acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, 48, 2013-2018.

[93] Sundquist, W. I., Klug, A., Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops, *Nature* **1989**, 342, 825-859.

[94] Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., Bacchetti, S., Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity, *EMBO J.*, **1992**, 11, 1921–1929.

[95] Tran, P. L. T., Virgilio, A., Esposito, V., Citarella, G., Mergny, J.-L., Galeone, A., Effects of C8-methylguanine on structure, stability and kinetics of formation of tetramolecular quadruplexes, *Biochimie* **2011**, 93, 399-408.

[96] Cohn, W. E., 5-Ribosyl uracil, a carbon-carbon ribofuranosyl nucleoside in ribonucleic acids, *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, 32, 569-571.

- [97] Davis, D. R., Stabilization of RNA stacking by pseudouridine, *Nucleic Acid. Res.* **1995**, *23*, 5020-5026.
- [98] Tite, T., Lugiakis, N., Myriantopoulos, V., Marakos, P., Mikros, E., Pouli, N., Tenta, R., Fragopoulou, E., Nomikos, T., Design and synthesis of new C-nucleosides as potential adenosine deaminase inhibitors, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9620-9628.
- [99] Cho, A., Saunders, O. L., Butler, T., Zhang, L., Xu, J., Vela, J. E., Feng, J. Y., Ray, A. S., Kim, C. U., Synthesis and antiviral activity of a series of 1'-substituted 4-aza-7,9-dideazaadenosine C-nucleosides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2705-2707.
- [100] Cho, A., Zhang, L., Xu, J., Lee, R., Butler, T., Metobo, S., Aktoudianakis, V., Lew, W., Ye, H., Clarke, M., Doerffler, E., Byun, D., Wang, T., Babusis, D., Carey, A. C., German, P., Sauer, D., Zhong, W., Rossi, S., Fenaux, M., McHutchison, J. G., Perry, J., Feng, J., Ray, A. S., Kim, C. U., Discovery of the First C-Nucleoside HCV Polymerase Inhibitor (GS-6620) with Demonstrated Antiviral Response in HCV Infected Patients, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1812-1825.
- [101] Chiba, J., Takeshima, S., Mishima, K., Maeda, H., Nanai, Y., Mizuno, K., Inouye, M., Artificial DNAs Based on alkynyl C-Nucleosides as a Superior Scaffold for Homo- and Heteroexcimer Emissions, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8124-8130.
- [102] Cao, S-Q., Okamoto, I., Tsunoda, H., Ohkubo, A., Seio, K., Sekine, M., Synthesis and triplex-forming properties of oligonucleotides containing thio-substituted C-nucleoside 4-thiopseudoisocytidine, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *52*, 407-410.
- [103] Kole, R., Krainer, A. R., Altman, S., RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides, *Nature Rev.* **2012**, *11*, 125-140.
- [104] Scremin, C. L., Boal, J. H., Wilk, A., Phillips, L. R., Beaucage, S. L., [(2-Deoxy- α - and β -D-erythro-pentofuranosyl)thymine-1-YL] methane derivatives as potential conformational probes for altDNA oligonucleotides, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 207-212.
- [105] Letsinger, R. L., Ogilvie, K. K., Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3350-3355.

- [106] Hall, R. H., Todd, A., Webb, R. F., Mixed Anhydrides as Intermediates in the Synthesis of Dinucleoside Phosphates, *J. Chem. Soc.* **1957**, 0, 3291-3296.
- [107] Beaucage, S. L., Caruthers, M. H., Deoxynucleoside phosphoramidites-A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.
- [108] McBride, L. J., Caruthers, M. H., An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 245-248.
- [109] Peña Fuentes, D., Synthese von Homo-C-Nucleosidanaloga und deren Phosphoramiditderivate sowie neuer Glycoaminosäuren auf der Basis von D-Ribose und 2-Desoxy-D-ribose, *Dissertation*, Rostock **2013**.
- [110] Wächtler, H., Peña Fuentes, D., Quincoces Suarez, J. A.; Michalik, D., Villinger, A., Kragl, U., Vogel, C., A versatile approach to novel homo-C-nucleosides based on aldehydes and acetylenic ketones derived from ribo- and 2-deoxy-ribofuranose C-glycosides, *ARKIVOC* 2012 **2012**, 3, 110-133.
- [111] 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, 226-227.
- [112] Ren, P., Dong, T., Wu, S., Synthesis of N-arylhydroxylamines by antimony catalyzed reduction of nitroarenes, *Synth. Commun.* **1997**, 27, 1547-1552.
- [113] Ayyangar, N. R., Brahme, K. C., Kalkote, U. R., Srinivasan, K. V., Facile transferreduction of nitroarenes to N-hydroxylamines with hydrazine in the presence of Raney Nickel, *Synthesis* **1984**, 11, 938-941.
- [114] Nelson, S. D., Nelson, W. L., Trager, W. F., N-hydroxylamide metabolites of lidocaine. Synthesis, characterization, quantitation, and mutagenic potential, *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 721-725.

- [115] Woo, J., Sigurdsson, S. T., Hopkins, P. B., DNA Interstrand Cross-Linking Reactions of Pyrrole-Derived, Bifunctional Elektrophiles: Evidences for a Common Target Site in DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3407-3415.
- [116] Bae, S., Lakshman M. K., O⁶-(Benzotriazol-1-yl)inosine Derivatives: Easily Synthesized, Reactive Nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 782-189.
- [117] Evans, F. E., Miller, D. W., Beland, F. A., Sensitivity of the conformation of deoxyguanosine to binding at the C8-position by N-acetylated and unacetylated 2-amino-fluorene, *Carcinogenesis* **1980**, *1*, 955-959.
- [118] Johnson, F., Huang, C.-Y., Yu, P.-L., Synthetic and oxidative studies on 8-(Arylamino)-2'-deoxyguanosine and 2'-guanosine derivatives, *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102*, 143-149.
- [119] Warnecke, S., Neue Synthese phosphorylierter Biokonjugate aus *cycloSal*-aktivierten Nucleotiden, *Dissertation*, Hamburg **2010**.
- [120] Meier, C., Lorey, M., De Clercq, E., Balzarini, J., Cyclosaligenyl-2'-3'-dideoxy-2'-3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cycloSal*-d4TMP): Synthesis and antiviral Evaluation of a new d4TMP delivery system, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.
- [121] Tonn, V., Festphasen-gebundene *cycloSal*-Nucleotide zur Synthese phosphorylierter Biomoleküle, *Dissertation*, Hamburg **2011**.
- [122] Ludek, O. R., Synthese carbocyclischer Analoga des Thymidylats für Struktur-Aktivitätsuntersuchungen an Thymidylatkinasen, *Dissertation*, Hamburg **2005**.
- [123] Jessen, H. J., Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten, *Dissertation*, Hamburg **2008**.
- [124] Lunau, N. Synthese seltener und funktionalisierter Nucleosiddiphosphat-Zucker, *Dissertation*, Hamburg **2012**.
- [125] Burgess, K., Russell, D. H., Shitangkoon, A., Zhang, A. J., MALDI and FAB Mass Spectrometry of Nucleoside Triphosphates: A comparative Study, *Nucleosides & Nucleotides* **1996**, *15*, 1719-1723.

- [126] Kammerer, B., Frickenschmidt, A., Laufer, A., Gleiter, C. H., Liebich, H., MALDI-TOFMS Analysis of Urinary Nucleosides, *J. Am. Soc. Mass Spect.* **2005**, *16*, 940-947.
- [127] Szombati, Z., Synthese von C8-(N-Acetyl)- und C8-NH-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyadenosin-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Hamburg **2011**.
- [128] Reddy, M. P., Hanna, N. B., Farooqui, F., Fast cleavage and deprotection of oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4311-4314.
- [129] Altona, C., Sundaralingam, M., Conformational Analysis of the SugR Ring in Nucleosides and Nucleotides. Improved Method for the Interpretation of Proton Magnetic Resonance Coupling Constants, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *95*, 2333-2344.
- [130] Neidle, S., Principles of Nucleic Acid Structure, *Academic Press Elsevier* **2010**, S. 33.
- [131] Yathindra, N., Sundaralingam, M., Conformational Studies on Guanosine Nucleotides and Polynucleotides. The effect of the base on the glycosyl and backbone conformations, *Biopolymers* **1973**, *12*, 2075-2082.
- [132] Frisch, A. E., Hratchian, H. P., Dennington II, R.D., Keith, T. A., Millam, J., Nielsen, A. B., Holder, A. J., Hiscok, J., *GaussView*, Version 5.0.8, Gaussian Inc., 235 Wallingford CT, **2009**.
- [133] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, Barone, G. V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels,

A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski J., Fox, D. J., Gaussian 09 Revision B.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

[134] Krüger, S., Meier, C., Synthesis of Site-Specific Damaged DNA Strands by 8-(Acetylarylamino)-2'-deoxyguanosine Adducts and Effects on Various DNA Polymerases, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 6, 1158-1169.

[135] Böge, N., Jacobsen, M., Szombati, Z., Baerns, Di Pasquale, F., Marx, A., Meier, C., Synthesis of DNA Strands Site-Specifically Damaged by C8-Arylamine Purine Adducts and Effects on Various DNA Polymerases, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 11194-11208.

[136] Tanabe, K., Bohn, E. W., Wilson, S. H., Steady-state kinetics of mouse DNA polymerase beta, *Biochemistry* **1979**, 18, 3401-3406.

[137] Chou K. M, Cheng Y. C., An exonucleolytic activity of human apurinic/ apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA, *Nature* **2002**, 415, 655-659.

[138] Lech, C.J.; Lim, J. K .C.; Lim, J. M. W.; Amrane, S.; Heddi, B.; Phan, A.T. Effects of Site-Specific Guanine C8-Modifications on an Intramolecular DNA G-Quadruplex. *Biophys. J.* **2011**, 101, 1987-1998.

[139] Lu, M., Guo, Q., Kallenbach, N. R., Thermodynamics of G-tetraplex formation by telomeric DNAs, *Biochemistry* **1993**, 32, 598-601.

[140] Koffel-Schwartz, N., Fuchs, R. P., Sequence determinants for -2 frameshift mutagenesis at NarI-derived hot spots, *J. Mol. Biol.* **1995**, 252, 507-513.

[141] Puglisi, J. D., Tinoco, I., Absorbance melting curves of RNA, *Methods Enzymol.* **1989**, 180, 304-325.

[142] Mergny J. L., Lacroix, L., Analysis of Thermal Melting Curves, *Oligonucleotides* **2003**, 13, 515-537.

[143] Baker, E. S.; Bowers, M. T.; B-DNA Helix Stability in a Solvent-Free Environment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **2007**, 18, 1188-1195.

[144] Jacobsen, M., Synthese und Untersuchungen von C8- und N6-Arylamin-2'-desoxyguanosin-modifizierten Oligonucleotiden, *Dissertation*, Hamburg **2010**.

[145] Wang, F., DeMuro, N. E., Elquist, C. E., Stover, J. S., Rizzo, C. J., Stone M. P., Base-displaced intercalated structure of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the recognition sequence of the NarI restriction enzyme, a hotspot for -2 bp deletions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10085-10095.

[146] Fullmer, G. R., Miller, A. J. M., Sherden, N. H., Gottlieb, H. E., Nudelman, A., Stoltz, B. M., Bercaw, J. e., Goldberg, K. I., *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.

10 Anhang

10.1 Synthese-Protokoll für unmodifizierte DNA

Schritt	Aktion	Zeit [sec]
1	DCA to TRM	2.0
2	Wait	10
3	DCA to TRM	2.0
4	Wait	10
5	DCA to Col	3.5
6	Wait	10
7	DCA to Col	3.0
8	Wait	5
9	Gas to TRM	3.0
10	ACN to Waste	0.2
11	ACN to Col	1.9
12	Wait	4
13	Gas to TRM	3.0
14	ACN to Waste	0.2
15	ACN to Col	3.5
16	Wait	5
17	Gas to Waste	1.0
18	Gas to Col	3.5
19	BMT to Col	0.2
20	Wait	2.0
21	AMD to Col	1.0
22	AMD BMT to Col	1.0
23	Wait	20
24	AMD BMT to Col	0.8
25	Wait	40
26	AMD BMT	0.8
27	ACN to Waste	2.0
28	GAS to Waste	2.0
29	Wait	17
30	Gas to Top	21.0
31	Wait	21
32	ACN to Waste	1.0
33	ACN to Col	1.0
34	Gas to Col	3.5
35	Gas to Waste	2.0
36	Oxi to Col	5.0
37	ACN to Waste	1.0
38	Wait	60
39	Gas to Col	3.0
40	ACN to Waste	0.2
41	ACN to Col	2.0
42	Wait	4
43	ACN to Col	1.5
44	Wait	5.0
45	Gas to Col	3.0
46	ACN to Waste	0.2
47	ACN to Col	1.5

48	Gas to Waste	1
49	Gas to Col	3
50	Cap A_B to Col	2.5
51	Wait	30
52	Cap A_B to Col	1.5
53	Wait	40
54	Gas to Col	2.0
55	ACN to Waste	0.2
56	ACN to Col	30
57	Gas to Col	3
58	ACN to Waste	0.2
59	ACN to Col	3.0
60	Wait	2.0
61	Gas to Waste	1.5
62	Wait	0.2
63	Gas to Col	3.0

ACN: Acetonitril

Cap A, B: Cappingreagenz A und B

Col: Column

DCA: 3% Dichloressigsäure in Dichlormethan

TRM: Trithylmonitor

Oxi: Oxidizer

BMT: Benzomercaptotetrazol

10.2 Synthese-Protokoll für modifizierte DNA

Protokoll siehe Anhang 10.1 mit folgenden Schritten statt Schritt 20-35:

Schritt	Aktion	Zeit [sec]
64	Wait	199
65	AMD to Col	1.0
66	AMD BMT to Col	0.8
67	Wait	199
68	AMD to Col	0.1
69	AMD BMT to Col	0.8
70	Wait	199
71	AMD BMT to Col	0.8
72	Wait	199
73	ACN to Waste	2.0
74	GAS to Waste	2.0

10.3 Syntheseprotokoll für unmodifizierte RNA

Protokoll siehe Anhang 10.1 mit folgenden Schritten statt Schritt 20-35:

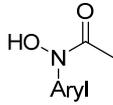
Schritt	Aktion	Zeit [sec]
75	Wait	199
76	AMD to Col	1.0
77	AMD BMT to Col	1.0
78	Wait	60
79	AMD BMT to Col	1.0
80	Wait	70
81	AMD BMT to Col	1.0
82	Wait	80
83	ACN to Waste	2.0
84	GAS to Waste	2.0

10.4 Nucleic Acid Mini Screen™

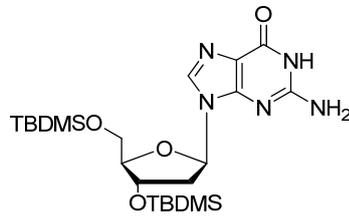
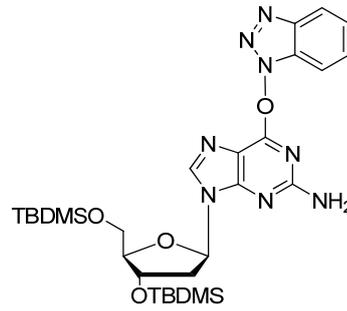
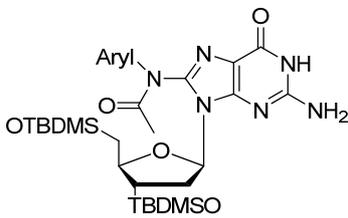
Kristallisations-Screen Nucleic Acid Mini Screen™ der Firma Hampton Research:

Tube Number	Precipitant	Tube Number	Buffer	Tube Number	Polyamine	Tube Number	Monovalent Ion	Tube Number	Divalent Ion
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

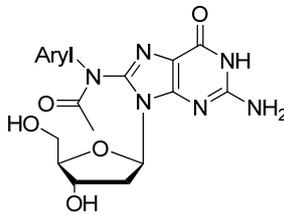
Verbindungsliste



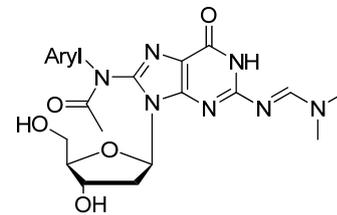
Aryl= Phenyl **72**
 4-Methylphenyl **73**
 4-Methoxyphenyl **74**
 3,5-Dimethylphenyl **75**

**68****34**

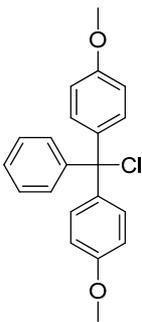
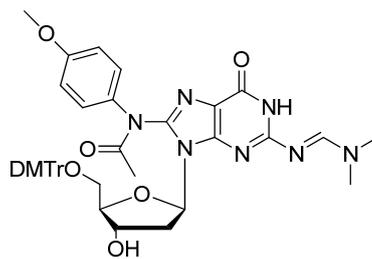
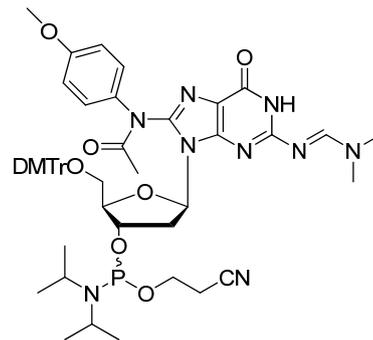
Aryl= Phenyl **76**
 4-Methylphenyl **77**
 4-Methoxyphenyl **78**
 3,5-Dimethylphenyl **79**

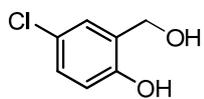


Aryl= Phenyl **80**
 4-Methylphenyl **81**
 4-Methoxyphenyl **82**
 3,5-Dimethylphenyl **83**

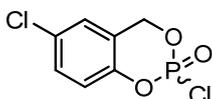


Aryl= Phenyl **84**
 4-Methylphenyl **85**
 4-Methoxyphenyl **86**
 3,5-Dimethylphenyl **87**

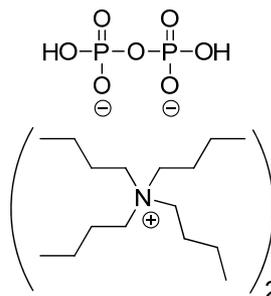
**111****109****108**



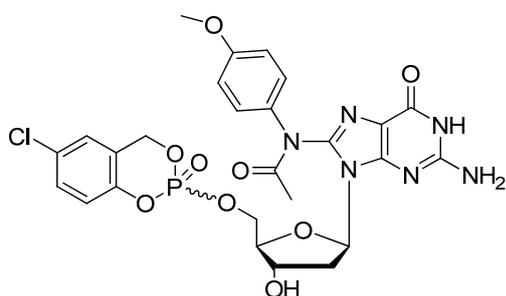
94



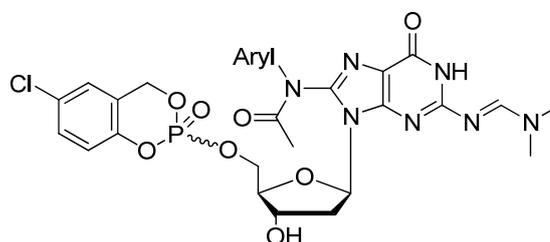
88



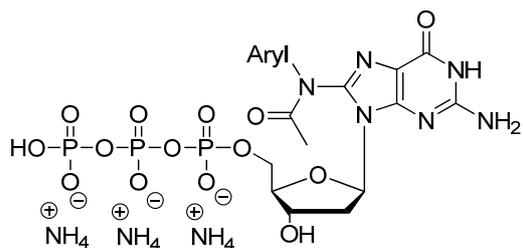
98



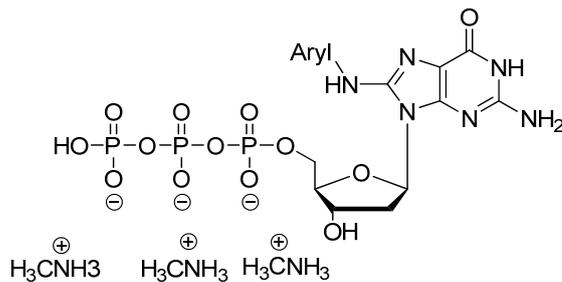
91



Aryl= Phenyl **95**
4-Methylphenyl **96**
4-Methoxyphenyl **92**
3,5-Dimethylphenyl **97**



Aryl= Phenyl **99**
4-Methylphenyl **100**
4-Methoxyphenyl **101**
3,5-Dimethylphenyl **102**



Aryl= Phenyl **107**
4-Methylphenyl **105**
4-Methoxyphenyl **106**
3,5-Dimethylphenyl **104**

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet 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.

Hamburg, den 10.02.2015

Katharina Höfler